

Tesis de Posgrado

Presencia de Tocoferol y Quinonas Isoprenoides en la fracción de Lípidos insaponificables de levaduras

Billerbeck, Miguel Angel

1975

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Billerbeck, Miguel Angel. (1975). Presencia de Tocoferol y Quinonas Isoprenoides en la fracción de Lípidos insaponificables de levaduras. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1480_Billerbeck.pdf

Cita tipo Chicago:

Billerbeck, Miguel Angel. "Presencia de Tocoferol y Quinonas Isoprenoides en la fracción de Lípidos insaponificables de levaduras". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1975.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1480_Billerbeck.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

PRESENCIA DE TOCOFEROL Y QUINONAS ISOPRENÓIDAS
EN LA FRACCIÓN DE LÍPIDOS INCAPONIFICABLES
DE LEVADURAS.

Tesis para optar al título de Doctor
de la Universidad de Buenos Aires.

Miguel Angel de Billerbeck

11 3
1975

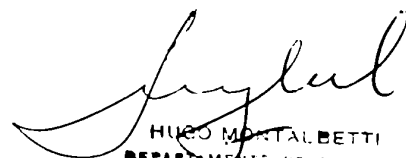


UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Buenos Aires,

1975

En el día _____ fecha, la Sub-Comisión de Doctorado del Departamento de Química Biológica, presentó dos (2) ejemplares del Trabajo de Tesis realizado por el Licenciado MIGUEL ANGEL DE BILLERBECK, a sus efectos.-


HUGO MONTALBETTI
DEPARTAMENTO DE ALUMNOS
JEFE

Buenos Aires,

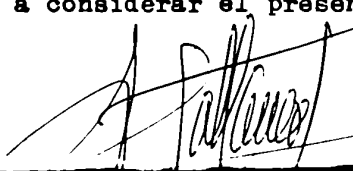


1975

Fuse al Jurado designado a _____
se sirva considerar el presente Trabajo de Tesis.-


GUSTAVO
SECRETARIO

Buenos Aires, 18 de Diciembre de 1975.-

En el día de la fecha, el Jurado designado procedio a considerar el presente Trabajo de Tesis, resolviendo aceptarlo.-

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Raúl E. Trucco.

Se lo inició en el Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires. Fue continuado en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Fue finalizado en el Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

acco.
la
onal
lolo-
onal
idad

A mis padres,
que me educaron con su ejemplo.

A mi esposa,
que supo afrontar la enorme exigencia de fuerzas morales
impuesta por las circunstancias en que se realizó ésta tesis.

A mis hijos,
que quisiera plasmar llenos de fé, amor y aprecio el trabajo.

AGRADECIMIENTOS.

Tributo mi más sincero y amplio reconocimiento al Dr. Raúl E. Trucco, por sus consejos, tolerancia y comprensión brindados desde que lo conociera. La experiencia adquirida y los momentos vividos en su laboratorio han dejado una marca indeleble en mi espíritu y personalidad.

A los Dres. Raúl E. Trucco, Ranwel Caputto, Héctor R. Juliani, Ricardo Luti, Jaime Pahissa Campa, a los Ings. Luis F. Maltese, Jorge Ferreras, Angel Degiampietro y Alejandro D. Marocchi que hicieron posible alcanzar esta meta gestionando apoyo financiero y/o facilitando el uso de instalaciones e instrumental.

Al Sr. Danilo Londero por la colaboración prestada en la confección del original.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Fundación Bariloche, que subsidiaron éstos estudios.

I
I
I
MA
B
C
DA
B
CA.
B.

CONTENIDO

	Página
Indice de tablas	viii
Indice de figuras	ix
Lista de abreviaturas no usuales	xi
Motivos y propósitos de éste estudio	1

Capítulo I

CROMANOLES Y QUINONAS ISOPRENOIDES NATURALES
Y COMPUESTOS RELACIONADOS

A. Principales familias de quinonas naturales	3
B. Compuestos vinculados a quinonas isoprenoides	11
C. Conversiones moleculares de cromanoles y quinonas	19
D. Posible relación entre estructura química y función	23

Capítulo II

PAPEL DE CROMANOLES Y QUINONAS EN
EL METABOLISMO CELULAR

A. Cromanoles y quinonas como vitaminas	25
B. Funciones no ligadas a la transferencia de H	28
C. Funciones vinculadas a la transferencia de H	34

Capítulo III

EMPLEO DE MICROORGANISMOS PARA EL ESTUDIO DE LA
FUNCION BIOLOGICA DE CROMANOLES Y QUINONAS

A. Ventajas del empleo de organismos unicelulares. Selección de levaduras	39
B. Tocoferol y filoquinona en levaduras	42

Capítulo IV

AISLAMIENTO DE CROMANOLES Y QUINONAS ISOPRENOIDES DE
LEVADURAS

A. Extracción de cromanoles y quinonas	51	R.
B. Selección de procedimientos de extracción de tocoferoles y quinonas de levaduras	55	C.
C. Fraccionamiento del extracto de lípidos de levaduras	64	D.
D. Aislamiento de tocoferoles y quinonas cromatográficamente puros	97	E.
E. Recuperación de tocoferol y ubiquinona de las secuencias de aislamiento seleccionadas	104	

Capítulo V

IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE CROMANOLES Y QUINONAS
DE LEVADURAS

A. Procedimientos de identificación y determinación de cromanoles y quinonas	108	
B. Análisis de levadura de panadería comercial	120	
C. Análisis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 66 y 68	131	
D. Análisis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DC 740 y <i>Candida guilliermondii</i> ATCC 9058	136	
E. Análisis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 59 R	139	
F. Análisis de levadura de panadería recogida del filtro prensa, en fábrica	145	
G. Análisis de materiales que pueden aportar tocoferoles como contaminantes, en el cultivo de levaduras	154	
H. Ubiromenol en levaduras	160	

Capítulo VI

CONSIDERACIONES FINALES

A. El procedimiento analítico	163	
-------------------------------	-----	--

	B. Sustancias reductoras en levaduras	168
	C. Quinonas isoprenoides en levaduras	173
	D. Biosíntesis de tocoferol y filoquinona por levaduras	175
51	E. Función del tocoferol en levaduras	177

55		
64	BIBLIOGRAFIA	181
97		

104

108

120

131

136

139

145

154

160

163

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página	Fig.
1. Familias de quinonas isoprenoides naturales.	5	1
2. Distribución de quinonas isoprenoides en los principales taxones.	8	2
3. Comparación de procedimientos de extracción de lípidos de <i>Saccharomyces</i> .	62	3
4. Contenido relativo de lípidos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	65	4
5. Sensibilidad de los reactivos empleados para detectar cromanoles y quinonas en capa delgada.	81	5
6. Características de fracciones separadas por cromatografía en capa preparativa.	86	6
7. Cromatografía en columna, de compuestos terpenoides.	90	7
8. Características de fracciones separadas por cromatografía en columna.	94	8
9. Recuperación final de tocoferol y ubiquinona exógenos en las secuencias de aislamiento seleccionadas.	105	9
10. Comparación cromatográfica de α -tocoferol estándar y el aislado de levadura de panadería comercial.	122	10
11. Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad respiratoria y los lípidos insaponificables de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 59 R.	142	11
12. Comportamiento cromatográfico del α -tocoferol aislado de levadura de panadería recogida del filtro prensa.	153	12
13. Sustancias reductoras del reactivo de Emmerie-Engel en materiales empleados para la producción de levaduras.	157	13
		14

INDICE DE FIGURAS

Figura	Figura	Página
5	1. Principales familias de quinonas naturales.	4
8	2. Compuestos relacionados estructuralmente a quinonas isoprenoides. Sus interconversiones.	12
62	3. Tocoferoles y tocotrienoles.	13
65	4. Intermediarios biosintéticos de quinonas isoprenoides.	17
65	5. Conversiones moleculares de cromanoles, quinoles y quinonas. Estados de oxidación intermedios.	20
81	6. Cromatografía en capa delgada del material aislado de levadura para panificación por extracción con solventes.	67
86	7. Cromatograma obtenido en fase gaseosa de extractos de lípidos de levadura para panificación.	68
90	8. Cromatografía en capa preparativa de lípidos insaponificables de levadura de panadería comercial.	84
94	9. Fracciones separadas del extracto de lípidos insaponificables de levadura por cromatografía en capa preparativa.	85
105	10. Fraccionamiento del extracto de lípidos insaponificables de levadura de panadería comercial por cromatografía en columna.	92
122	11. Cromatografía en capa delgada de las fracciones eluidas de cromatografía en columna de lípidos insaponificables de levadura de panadería comercial.	93
142	12. Secuencia de operaciones empleadas para aislar posibles cromanoles y quinonas de levadura de panadería comercial.	101
153	13. Cromatografía en fase gaseosa de α -tocoferol estándar y de α -tocoferol aislado de levadura comercial para panificación.	124
157	14. Cromatografía en fase gaseosa de α -tocoferolquinona estándar y del producto de oxidación con $AuCl_4^-$ del α -tocoferol aislado de levadura de panadería.	125

- | | |
|--|-----|
| 15. Espectro de absorción ultravioleta de α -tocoferol estándar, de α -tocoferol aislado de levadura de panadería comercial y de sus productos de oxidación con AuCl_4H . | 126 |
| 16. Cromatografía en fase gaseosa de la fracción en que debería hallarse α -tocoferol, proveniente de un extracto con solventes de levadura recogida del filtro prensa. | 148 |
| 17. Cromatografía en fase gaseosa de la fracción en que debería hallarse α -tocoferol, proveniente del residuo celular de la extracción anterior. | 149 |
| 18. Cromatografía en fase gaseosa de componentes de extractos de levadura recogida del filtro prensa, que eluyen de columna de ácido silícico y migran en capa delgada como α -tocoferol sintético. | 150 |
| 19. Cromatografía en fase gaseosa de la fracción en que debería hallarse tri-, di- y mono-metil-tocoles (tocoferoles) proveniente del antiespuma Hodag GN-31. | 158 |
| 20. Espectro de absorción ultravioleta de ubicromenol aislado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . | 162 |

tra
los
Jou
LonLas
fra

ABREVIATURAS NO USUALES.

Se indican a continuación las abreviaturas empleadas en éste trabajo que no se encuentran en el índice de abreviaciones, símbolos, convenciones y definiciones del folleto "Policy of the Journal and Instructions to Authors", The Biochemical Society, London, 1971, p. 13.

fr.	fracción de un extracto de lípidos
gc	gramo de células
gch	gramo de células húmedas
gcs	gramo de células secas
kgch	kilogramo de células húmedas
mA	mili átomo gramo
R_f	$R_f \times 100$
R_t	tiempo de retención en cromatografía gas-líquido
uDO	unidad de densidad óptica

Las abreviaturas empleadas para designar extractos de lípidos o fracciones derivadas de ellos, se introducen en el curso del texto.

MOTIVOS Y PROPOSITOS DE ESTE ESTUDIO

Cromanoles (tocoferoles) y una quinona (filoquinona) son requeridos como vitaminas (E y K₁ respectivamente) por organismos animales.

Cromanoles y quinonas isoprenoides naturales se hallan estrechamente relacionados en estructura y biogénesis. Pueden sufrir múltiples conversiones en sistemas biológicos aunque no se conocen las transformaciones que ocurren en el seno de las estructuras lipoproteicas, al amparo de los metabolitos disueltos en el sistema acuoso de la matriz celular.

Las vitaminas E y K₁ y la ubiquinona desempeñan una función esencial en organismos eucarióticos. Los mecanismos de acción postulados son insuficientes para explicar su función biológica y en el caso de filoquinona y tocoferoles puede afirmarse que se desconoce su rol. Ante la descripción de estados de deficiencia en el hombre y los conocidos y severos efectos de su deficiencia en mamíferos y aves, se hace necesario localizar el sitio primario de acción de estas vitaminas.

Los sistemas experimentales empleados hasta el presente no han sido fructíferos en este sentido. Los organismos unicelulares pueden presentar ventajas para el estudio de la función de estas vitaminas. Las levaduras parecen ser organismos apropiados para el examen de los mecanismos alterados por deficiencias de estos compuestos en células eucarióticas quimiotróficas.

Los antecedentes contradictorios acerca de la presencia o no de estos compuestos en hongos lleva a la necesidad de establecer (o revisar) el contenido de tocoferoles y filoquinona en levaduras con

métodos analíticos sensibles y específicos.

Este estudio es aconsejable no solo a los fines de establecer si las levaduras son organismos adecuados para el análisis de la función biológica de cromanoles y quinonas, sino también porque las levaduras están siendo utilizadas cada vez más como componentes de dietas para alimentación animal, con desconocimiento de los niveles de vitaminas liposolubles en ellas. Esto entraña un riesgo potencial para la producción animal.

Estos fueron los motivos fundamentales que dieron origen a nuestro trabajo.

Se consideró oportuno analizar también la presencia de compuestos relacionados o precursores de tocoferoles y quinonas isoprenoides en razón de las relaciones estructurales y funcionales existentes entre ellos.

Nuestro estudio incluyó el análisis de tocoferoles, el isómero estructural del α -tocoferol (XIV c ó d, p.13), sus dímeros o trímeros; ubiquinona, ubicromenol, filoquinona, prenil fenoles y prenilquinonas; escualeno y ergosterol, además de procurarse la caracterización de compuestos reductores del reactivo de Emmerie-Engel distintos de los ya citados.

Ello implica un problema analítico de magnitud en razón de la variedad de compuestos y la similitud de sus propiedades. De aquí que, como paso previo, fuera necesario copilar un procedimiento de análisis que permitiera el aislamiento de cromanoles y quinonas de los lípidos de levaduras y su identificación.

CAPITULO I

CROMANOLAS Y QUINONAS ISOPRENOIDES NATURALES Y COMPUESTOS RELACIONADOS.

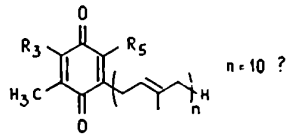
- A. Principales familias de quinonas naturales.
 - 1. Estructura.
 - 2. Nomenclatura.
 - 3. Distribución.
- B. Compuestos vinculados a quinonas isoprenoides.
 - 1. Compuestos relacionados estructuralmente.
 - 2. Intermediarios biosintéticos.
 - 3. Compuestos con posible relación funcional.
- C. Conversiones moleculares de cromanoles y quinonas.
- D. Posible relación entre estructura química y función.

A. PRINCIPALES FAMILIAS DE QUINONAS NATURALES

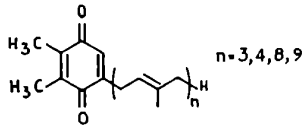
1. Estructura.

Las quinonas isoprenoides pueden distinguirse en benzo y naftoquinonas, según su anillo aromático. Las benzoquinonas más difundidas pueden separarse en dos familias: metil-benzoquinonas (I), para las que no se ha propuesto designación general y metoxibenzoquinonas (IV), conocidas como ubiquinonas (figura 1).

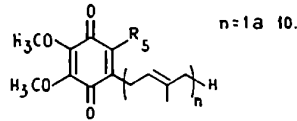
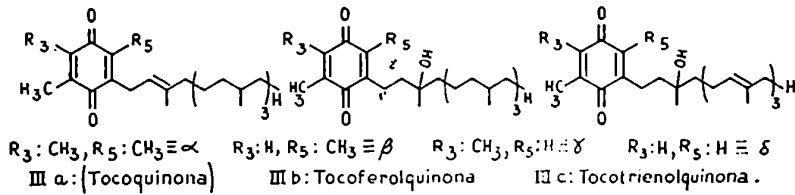
Se sugiere la estructura I como fórmula general para las metilbenzoquinonas isoprenoides en razón de que existen en la naturaleza compuestos derivados de ella que pueden agruparse en cuatro series: plastoquinonas (II), fitil-metil-benzoquinonas (IIIa), toco-



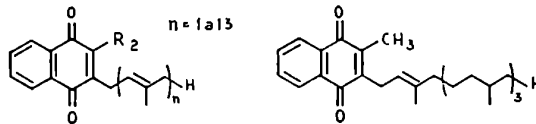
I:



II: Plastoquinona - n



IV a: $R_5: CH_3$ Ubiquinona - n
 IV b: $R_5: H$ 5. Demetil-Ubiquinona - n.



Va: $R_2: CH_3$ Menaquinona - n Vc: Filoquinona
 Vb: $R_2: H$ 2. Demetil-menaquinona - n

Figura 1. Principales familias de quinonas naturales.

nafto-
 lifun-
 (I),

metil-
 turala-
 tro se-
 , toco-

Tabla 1.

FAMILIAS DE QUINONAS ISOPRENOIDES NATURALES.

Designación Trivial	Núcleo Quinónico	Cadena Lateral
Plastoquinona - n	2,3-dimetil-benzoquinona	multiprenilo
Tocoquinona (1)	mono, di o trimetil-benzoquinona	fitilo
Tecoferolquinona	mono, di o trimetil-benzoquinona	3' -hidroxi-fitilo
Tecotrienolquinona	mono, di o trimetil-benzoquinona	3' -hidroxi-hexadecahidro-fitilo
Ubiquinona - n	2,3-dimetoxi-5-metil-benzoquinona	multiprenilo
Menoaquinona - n	2-metil-naftoquinona	multiprenilo
Filicoquinona	2-metil-naftoquinona	fitilo

(1) En este trabajo se extiende la designación de tocoquinona incluyendo también en este grupo las mono y dimetil-fitil-benzoquinonas.

be
de
dr
bl
de
y
si
ti
ti
qu
ve
na
te
ci
to
de
de
do
II
I,
lo
te

ferolquinonas (IIIb) y tocotrienolquinonas (IIIc) (1,2,3). Un solo representante natural se ha aislado hasta ahora del compuesto I, el homólogo con $n=10$ (4); del IIIa, el isómero δ (5) y del IIIc, el α (3).

Las naftoquinonas naturales isoprenoides pueden ordenarse en dos series: menaquinonas (Va) y filoquinonas (Vc) (2,3).

Las características estructurales de los principales grupos de quinonas isoprenoides se resumen en la tabla 1.

Existen en la naturaleza numerosas variaciones de estructura de los tipos quinónicos señalados. Se han descrito algunas plastoquinonas, ubiquinonas y menaquinonas con cadena lateral parcialmente saturada, monohidroxilada y aun con ese hidroxilo esterificado por ácidos grasos. Se han hallado 5-demetil-ubiquinonas (IVb) y 2-demetil-menaquinonas (Vb), que carecen del metilo vecino a la cadena isoprenoide (vecino a uno de los carbonilos quinónicos) (2,3).

En medio de tanta diversidad (se han aislado algo más de veinticinco quinonas pertenecientes a estas familias), hay características comunes singulares: la cadena carbonada poliprenoide en posición orto a uno de los oxígenos de la estructura para-quinoides y la conformación trans de todos los enlaces dobles de dicha cadena.

Debe observarse también que todas estas quinonas poseen un doble enlace en posición 2', 3' o su equivalente (derivado por hidratación del doble enlace), un hidroxilo en posición 3' de la cadena lateral. Las características estructurales comunes de las benzo y naftoquinonas poliprenoides pueden representarse por la

fórmula general VI (fig. 2).

Existen otros tipos de quinonas escasamente distribuidos, con o sin cadena poliprenoide (1, 2, 3). Entre ellas rodoquinona, aurotioglicocladina y relacionadas, fumigatina, clorobiumquinona, etc. Su estudio no ofrece interés, al menos en la actualidad, pues parecen ser producto del catabolismo del organismo que las produce.

2. Nomenclatura.

En este trabajo se adoptan las reglas tentativas para nomenclatura de quinonas con cadena lateral isoprenoide sugeridas por la IUPAC - IUB, en particular la propuesta I para la designación de los miembros de cada grupo (6).

Se sugiere que la designación de tocoquinona se reserve para las metil-benzoquinonas con cadena lateral fitilo y que se extienda la designación plastoquinona a todas las metil-benzoquinonas con cadena lateral prenilo. Así las plastoquinonas actuales serían δ -plastoquinonas-n y la llamada vitamina $E_2^p(50)$ sería α -plastoquinona-10.

3. Distribución.

Los estudios de distribución de quinonas han mostrado su existencia en casi todos los seres vivos. Estos estudios se resumen en la tabla 2, en la que se indica el rango de contenido de quinonas en los taxones principales. La mayor parte de los datos fueron compilados de las referencias citadas en las revisiones 1, 2 y 3 y las mencionadas más abajo.

Los organismos fototróficos productores de oxígeno contienen

Tabla 2.

DISTRIBUCION DE QUINONAS ISOPRENÓIDES EN LOS PRINCIPALES TAXONES¹

Phylum o División	Plastoqui- nonas	Tocoferol- quinonas	Ubiquinonas	Menaquinonas	Filoquinona
Vertebrados	na ³	0.6-200 (7)	nd-3200(67)	0.01 (1)	nd-1 (3)
Artropodos	na	na	1-260 (8)	na	na
Protozoos	na	nd ⁴ (1)	85-600 (60)	na	na
Fungiomicetos	nd (2)	nd (6)	nd-3700(39)	nd-3100(39)	nd (39)
Mixomicetos y Mucicofitos	na	nd-13 (6)	15-520 (21)	na	na
Cianofitos	90-3240 (5)	40-180 (4)	nd (5)	nd (5)	9-120 (5)
Euglenofitas, Clorofitas, Algas y Rodofitas	10-2500(10)	6-550(17)	15-260 (8)	nd (2)	20-60 (2)
Briofitas y Trequeofitas	30-2800(11)	3-200(11)	1-45 (13)	nd (2)	1-12 (2)

1. Valores expresados en μg quinona (total; incluye cromenoles y quinoles) / gramo de célula seca (μgcs). Entre paréntesis, número de especies incluido.

2. Designación según Curtis H., (1972), "Biología" (Ediciones Omega, Barcelona), p. 927.

3. na : no analizado

4. nd : no detectada; el límite de detección varía en cada trabajo pero puede estimarse comprendido entre 0.2 y 5 $\mu\text{g}/\text{gcs}$.

invariablemente plastoquinonas, tocoferolquinonas y filoquinona en su aparato fotosintético (7, 8, 9), con excepción de *Anacystis nidulans*, alga procariótica en la que no se detectó tocoferolquinona (9,10). Las células de plantas superiores y algas eucarióticas poseen también ubiquinona localizada en mitocondrias de tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos (11). Las algas procarióticas no poseen ubiquinonas (12).

Las bacterias fotosintéticas no contienen plastoquinonas; en ellas se encuentran ubiquinonas y/o menaquinonas (1,3,13,14) acompañadas en algunos casos de otras quinonas. Pareciera haber tocoferolquinona en *Chlorobium* (15). No se ha hallado referencia sobre el contenido de esta quinona en otras especies.

Los organismos quimicheterotróficos carecen de plastoquinona. Vertebrados, invertebrados, protozoarios y hongos (con excepción del género *Blastocladiella*) poseen ubiquinona y ésta es la quinona más abundante en ellos (1,2). La ubiquinona se halla localizada en mitocondrias y microsomas. Es de especial interés la detección de ubiquinona en metalo-flavoproteínas cristalizadas (2).

Los vertebrados poseen también cantidades a nivel de trazas de tocoferolquinona (en mitocondrias) (2,16,17), menaquinonas (18) y otras naftoquinonas no identificadas (19) (en mitocondrias y microsomas), todas provenientes de la dieta y/o de la actividad de la flora intestinal (20,21). Sus tejidos no sintetizan el núcleo de estas quinonas pero pueden reemplazar o modificar la cadena lateral de las metil-benzoquinonas o naftoquinonas exógenas (4,22, 23). No se tiene conocimiento de que se haya estudiado la presencia de tocoferolquinonas o naftoquinonas en invertebrados, protozoarios y hongos ni tampoco la capacidad de estos organismos para sintetizarlas.

non
men
pos
eub
qui
ubi
tas
nes
den
ya
bac
su
Hay
y p
zac
poc
bien
quie
func
desa
quie
ben
cas
siti

Las eubacterias heterotróficas poseen ubiquinonas y/o menaquinonas en su membrana celular. Las gram positivas sintetizan sólo menaquinonas, sean aerobias estrictas o facultativas; en las gram positivas anaerobias estudiadas no se han detectado quinonas. Las eubacterias gram negativas aerobias estrictas sintetizan sólo ubiquinonas mientras que algunos géneros facultativos sintetizan ubiquinonas y menaquinonas. Las gram negativas anaerobias estrictas contienen sólo menaquinonas (ver referencias en las revisiones 1,2 y 3). Una especie gram positiva autotrófica (*Micrococcus denitrificans*) parece ser la excepción a estas generalizaciones, ya que sintetiza únicamente ubiquinona (24).

Hasta el presente no se han detectado tocoferolquinonas en bacterias, pero lo cierto es que al parecer no se ha analizado su contenido.

Los estudios de distribución efectuados son insuficientes. Hay aun grandes grupos taxonómicos, especialmente entre animales y plantas inferiores, que requieren investigación. La caracterización de las quinonas en algunas especies es incompleta. En muy pocos organismos se ha estudiado el efecto que las condiciones ambientales y la edad de las células ejercen sobre el contenido de quinonas, a pesar de haberse establecido en los examinados el profundo efecto del proceso de producción de energía y del grado de desarrollo (1,25,26,27). Los resultados que indican ausencia de quinonas o compuestos relacionados de algunos organismos no deben considerarse concluyentes: la aplicación de las nuevas técnicas de análisis, más sensibles y específicas puede modificar esa situación.

A pesar de estas observaciones se han detectado quinonas "en

más sitios y en cantidades mayores que las que se pueden explicar sobre la base de la función en el transporte de electrones celular, reconocida para alguna de ellas". "El estudio de su distribución llevará sin duda a una mayor comprensión de los mecanismos y significado de las reacciones de oxidoreducción celulares" (1) mitocondriales como no mitocondriales.

B. COMPUESTOS VINCULADOS A QUINONAS ISOPRENOIDES.

1. Compuestos relacionados estructuralmente.

Singular importancia han cobrado quinoles (VII) y cromanoles (IX) en relación a la función biológica de las quinonas isoprenoides. Ambos compuestos son formas reducidas de las quinonas y pueden ser oxidados reversiblemente "en vitro" a las quinonas VI y XII respectivamente (figura 2).

Se han aislado quinoles (llamados también hidroquinonas o dihidroquinonas) derivados de todas las quinonas conocidas. Se encuentran en cantidad variable (10 a más del 60% del contenido de quinonas) en los organismos que contienen las quinonas parentales (7,26,28,31). Recientemente se han identificado 4-O-metil-éteres de γ -tocoquinol (5) y menaquinol (32).

Existen naturalmente plastocromanoles derivados de plastoquinona (33). Tocoferoles (XIVa) y tocotrienoles (XIVb) (figura 3). cromanoles derivados de tocoquinonas. La identificación de naftocromanoles naturales parece haber sido errónea (34,35); no se han aislado ubicromanoles celulares (36).

Los tocoferoles (vitamina E) son sin duda alguna el grupo más abundante y fisiológicamente el más importante de los cromanoles naturales. Se encuentran en tejidos fotosintéticos y no fotosin -

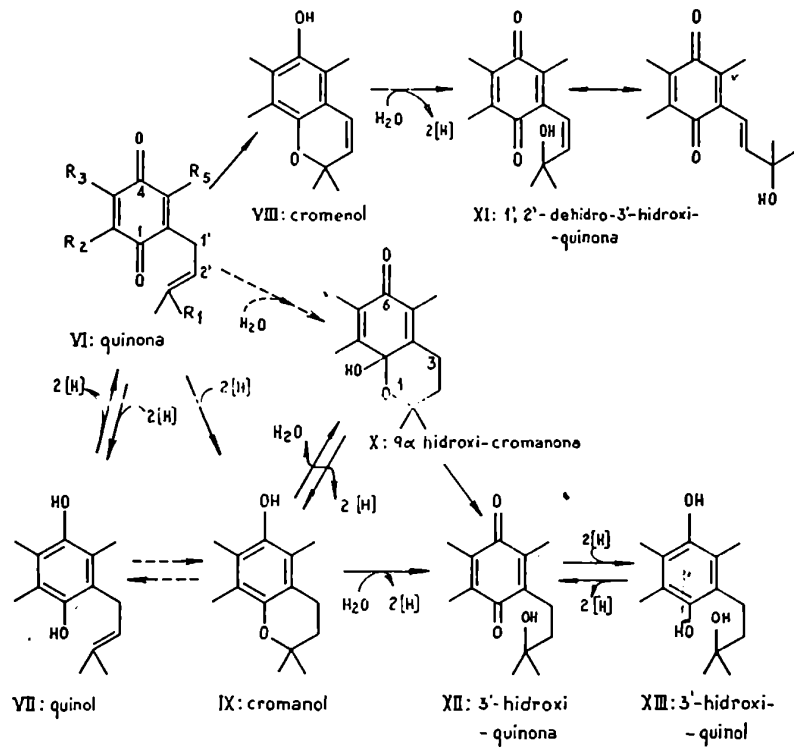
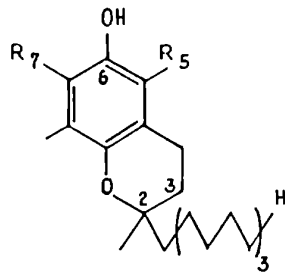
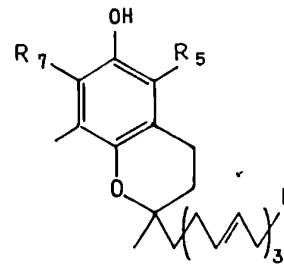


Figura 2. Compuestos relacionados estructuralmente a quinonas isoprenoides. Sus interconversiones.



$R_5: CH_3, R_7: CH_3 \equiv \alpha$
XIVa: Tocoferoles

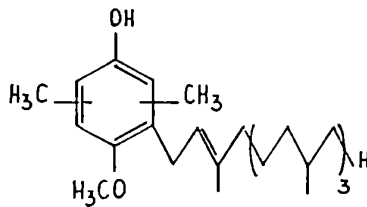
$R_5: CH_3, R_7: H \equiv \beta$



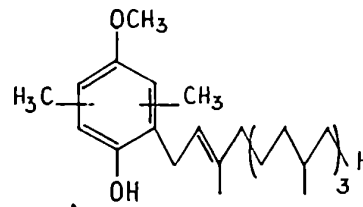
$R_5: H, R_7: CH_3 \equiv \gamma$

XIVb: Tocotrienoles

$R_5: H, R_7: H \equiv \delta$



XIVc



XIVd

Isómeros estructurales del α -tocoferol

Figura 3. Tocoferoles y tocotrienoles.

té
al
ric
ba
ma
tiz
llu
bra
de
bra
tet
do
ent
otro
tece
F
quid
(41)
tos
mos
H
usua
O-me
pued
los
tota
do (

téticos, especialmente semillas, de plantas superiores (37-39) y en algas eucarióticas (27). Se hallan también en algunas algas procarióticas (40); no ha sido detectado en *Anacystis* (10) que sin embargo parece contener una 3-hidroxiquinona (tipo XII) u otro cromanol (40). Algunas bacterias fotosintéticas son capaces de sintetizarlo (ej. *Chlorobium*) y otras no (ej. *Cromatium* y *Rhodospirillum*) (41,42).

También se encuentran tocoferoles en los tejidos de los vertebrados (mamíferos y aves) analizados (16,17,43,44) pero provienen de la dieta (20). No se ha estudiado su distribución en invertebrados y el único protozoario analizado (*Tetrahymena*) no lo sintetiza (41). Su presencia en hongos es incierta; se han examinado levaduras y *Phycomyces* (45-51) con resultados contradictorios entre distintos autores: los estudios efectuados se discuten en otra sección (p.42) en razón de la importancia que poseen como antecedentes de este trabajo.

Es incierta también la distribución de tocoferoles en bacterias quimiotróficas. En cinco especies heterotróficas no fue detectado (41) pero se lo ha hallado en otra, anaerobia estricta (52). Estos análisis deberían repetirse y ampliarse el número de organismos examinados.

Recientemente se ha anunciado el aislamiento de un isómero inusual del α -tocoferol de estructura no cíclica y con un grupo O-metilo (metil éter) (53). Los hechos estructurales detectados pueden representarse por la fórmula XIVc o XIVd; la posición de los metilos aromáticos es indeterminada. Este compuesto puede ser totalmente idéntico al O-metil-éter del γ -tocoquinol ya mencionado (ambos fueron detectados en *Euglena*) (5). La existencia natural

de este isómero es de sumo interés: será un precursor, un metabolito o la forma activa del α -tocoferol?. De cualquier manera debe considerarse su posible existencia y la de su quinona (α -tocoquinona) en todo sistema en que desee evaluarse el contenido de tocoferoles totales.

Los cromenoles (VIII) son isómeros cíclicos de las quinonas. Se han aislado ubicromenol-5,-6 y -9 derivados de ubiquinona-6, -7 y -10 respectivamente (47,55-57). No ha concluido la discusión sobre si son compuestos naturales o artefactos de aislamiento; la evidencia experimental tiende a sostener su origen natural. Hasta el momento no se han identificado con seguridad naftocromenoles ni tococromenoles naturales. Es de interés señalar que se han hallado cromenos sustituidos entre los productos de excreción de varios microorganismos (58); ello parece indicar que la reacción de isomerización de quinonas a cromenoles es un caso particular de un tipo de ciclización más general.

La distribución de quinonas y cromenoles en animales, vegetales y protistas así como los efectos de deficiencia en vitaminas E (59) y K (60) observados en mamíferos y aves, hacen pensar que la capacidad para sintetizar miembros de la serie de la plastoquinonas y tocoquinonas (tocoferolquinonas, tocotrienolquinonas) y la cadena fitilo de la filoquinona, estaría restringida a células que efectúan fotosíntesis con desprendimiento de oxígeno (si se excluye la incierta presencia de tocoferoles de hongos) (3,61). En contraste, la biosíntesis de ubiquinonas y la cadena lateral de menadionas, es efectuada por animales y todos los microorganismos que contienen esas quinonas (3,20).

El rol vitamínico de las naftoquinonas para mamíferos y aves

se e
siq
rism
El r
pues
plan
pued
oti
la f
L
que
(20)
S
poli
la b
comp
L
XVII
ros
pues
ello
E
dos
pues
curs
2-te

se atribuye a la ausencia en células animales de la vía del ácido siquímico y a la consecuente imposibilidad de la síntesis de co-rismato (precursor de naftoquinonas en bacterias y plantas) (3). El requerimiento de vitamina E no se explica hasta el presente, pues según lo que se conoce de la biosíntesis del tocoferol en plantas, el precursor de su núcleo es el ácido homogentísico, que puede ser sintetizado por las células animales desde fenilalanina o tirosina vía p-hidroxi-fenilpirúvico (3). Podrá atribuirse a la incapacidad de los tejidos animales para sintetizar fitol?

La ubiquinona se sintetiza desde p-hidroxibenzoato compuesto, que en mamíferos deriva de fenilalanina o tirosina de la dieta (20).

2. Intermediarios biosintéticos.

Se han aislado varios tipos de fenoles, p-quinonas y quinoles poliprenocidos sustituidos, que posiblemente, son intermediarios en la biosíntesis de las quinonas isoprenocidos. Sus estructuras se compendian en la figura 4.

Los multiprenilfenoles XV y XVI y los multiprenil-benzoquinonas XVII a XIX se han aislado de varias bacterias y tejidos de mamíferos (42,62-64), pero no se los detectó en hongos (50). Los compuestos XX y XXI han sido detectados pero aun no aislados. Todos ellos serían precursores biosintéticos de ubiquinona.

El quinol XXII y su quinona, aun no aislados, han sido postulados intermediarios en la biosíntesis de plastoquinona. Estos compuestos con cadena lateral geranil-geranil ($n = 4$) serían los precursores de tocoferoles y tocotrienoles (3). Se ha sugerido que el 2-tetraprenilfenol (XV, $n = 4$), sería precursor de tocoferoles(42).

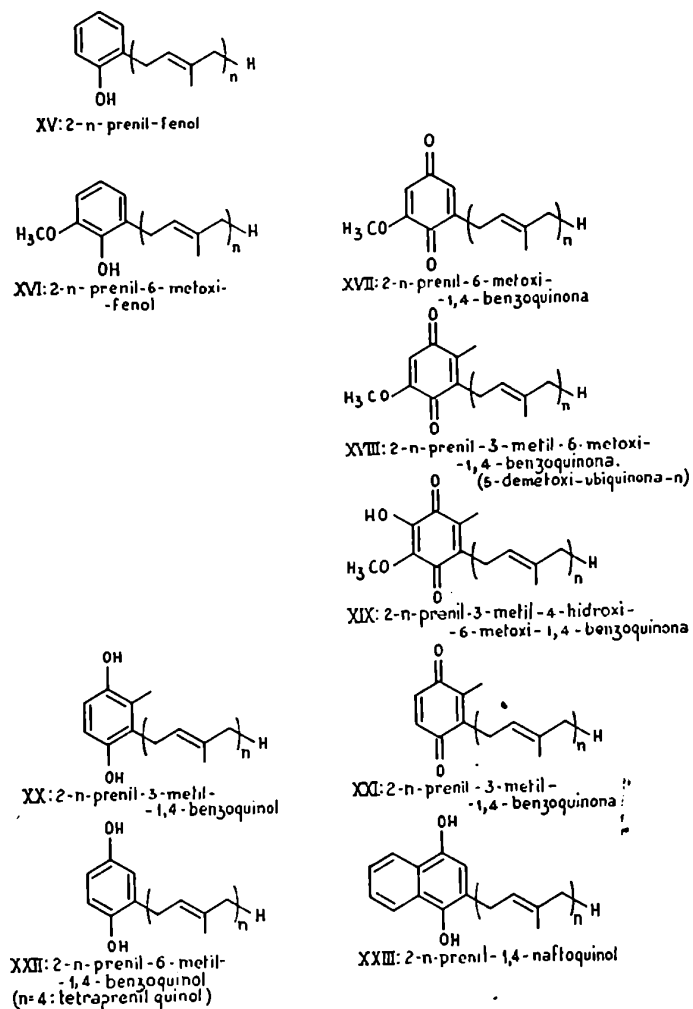


Figura 4. Intermediarios biosintéticos de quinonas isoprenoides.

Sir
nol
pla

de
te
non

nol
sua

Fe(
etc

S₂O
2
sore

pues
do s

duct

cron
vinc

E
de c

lógi
pose

Se h
han

Sin embargo esta hipótesis debe ser desestimada pues los prenilfenoles derivan del p-hidroxi-benzoato, mientras que la síntesis de plastoquinonas y tocoferoles ocurre vía ácido homogentísico (3).

El primer compuesto isoprenoide en la secuencia de biosíntesis de naftoquinonas sería el 2-poliprenil-naftoquinol (XXIII); existe en la naturaleza a la par de su quinona, la 2-demetil-naftoquinona (Vb).

3. Compuestos con posible relación funcional.

Una propiedad común de cromanoles, quinonas y compuestos isoprenoides es la de oxidarse o reducirse en condiciones relativamente suaves. Cromanoles, fenoles y quinoles se oxidan con Fe^{+++} , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$, Cl_4Au^- , Ag_2O , neotetrazolium, N-bromosuccinimida, O_2 , etc.; y las quinonas se reducen con H_2 , BH_4^- , ácido ascórbico, $\text{S}_2\text{O}_4^{=}$, leuco-azul de metileno, leuco-azul de Nilo A, etc. La absorción al ultravioleta con bandas características para cada compuesto, es otra propiedad común; esta absorción se modifica cuando se oxidan o reducen.

Compuestos liposolubles con absorción en el ultravioleta, reductores u oxidantes de los reactivos mencionados, pueden ser cromanoles, quinonas, quinoles o poseer estructuras desconocidas vinculadas a ellos, no sólo química sino también funcionalmente.

Pueden ser los intermediarios en las transformaciones químicas de cromanoles y quinonas, indicar el mecanismo de su acción biológica o ser intermediarios biosintéticos. De aquí el interés que posee su localización, aislamiento y determinación estructural. Se ha aislado un buen número de estas sustancias, que aun no se han identificado, de microorganismos (65,66), mitocondrias (67) y

aun preparados enzimáticos (68).

C. CONVERSIONES MOLECULARES DE CROMANOLAS Y QUINONAS.

Por un hábito mental se visualiza normalmente la estructura orgánica formal de las quinonas isoprenoides en la forma paráquinoides (VI). Pero es importante considerar que otras especies moleculares esencialmente equivalentes (X, XXIV, XXVa - XXVd) (figura 5) no sólo pueden existir sino ser preponderantes en un medio químico o celular apropiado. A tal punto poseen igual estabilidad, que la diferencia de energía entre las estructuras VI y XXIV es de -0.3 kcal/mol. La especie activa podría ser una u otra de ellas, dependiendo de la función o transformación involucrada.

Los compuestos estructuralmente derivados de quinonas (VI) pueden convertirse unos en otros con relativa facilidad. Las conversiones moleculares que ocurren "en vitro", se compendian en la figura 2. Todas las estructuras señaladas han sido aisladas y la mayor estabilidad de una frente a otras "en vitro" queda determinada por el pH y la polaridad del medio. Los estados de oxidación intermedios entre quinonas y sus cromanoles o quinoles se indican en la figura 5.

Existe evidencia experimental de la existencia transitoria de los intermediarios señalados "en vitro" y la de algunos de ellos "en vivo". La polaridad y disponibilidad de H o H^+ en el entorno de la molécula, determinan la especie molecular neutra, iónica o radical libre que se forma y el curso de la reacción. Algunas transformaciones requieren medios estrictamente anhidros o entornos fuertemente hidrofóbicos.

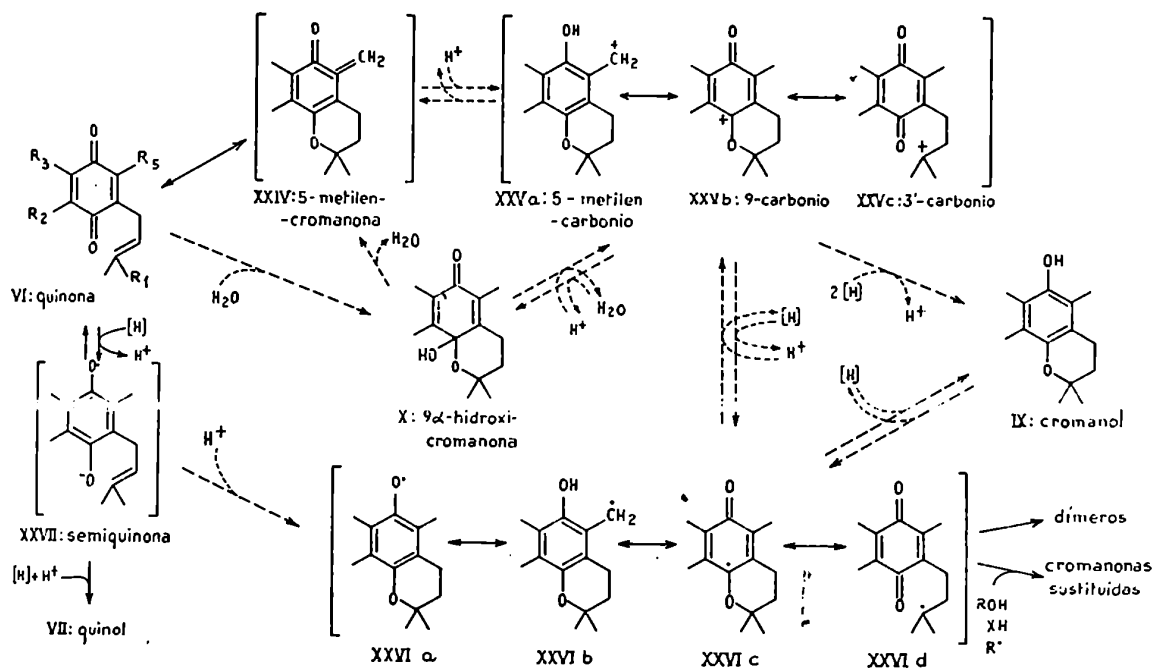


Figura 5. Conversiones moleculares de cromanoles, quinoles y quinonas. Estados de oxidación intermedios.

Las conversiones de quinonas a cromanoles o quinoles y viceversa son de especial interés, ya que alguna(s) de ella(s) puede(n) constituir la base molecular de la función biológica de estos compuestos.

Es difícil establecer la estructura de las quinonas reducidas enzimáticamente durante el transporte celular de H, debido a su rápida autooxidación; puede ser quinol, semiquinona o cromanol. Quinonas (VI, XII) y quinoles (VII, XIII) se reducen y oxidan reversiblemente en esas condiciones. Son posibles otras especies moleculares reducidas distintas del quinol, pero semiquinona, cromanol u otras no constituirían más del 1 al 2% de la quinona (total) presente en la célula (29,31,69).

Se ha detectado la existencia "en vivo" de radicales semiquinona (XXVII) de ubiquinona (31,70), plastoquinona (71) y menaquinona (72).

La reducción de quinonas a quinol via el radical semiquinona (XXVII), ocurre con separación de cargas. La conversión entre ambas formas es reversible.

La formación de ubisemiquinona parece estar ligada al funcionamiento del sistema de transporte de H (31,70); por otro lado estudios cinéticos indican que la separación de semimenquinona es independiente del transporte neto de H (72). La no detección de mayores niveles de semiquinona puede ser debida a su dismutación en quinol (VII) y quinona (VI) durante el aislamiento de lípidos (31) o consecuencia de extremadamente bajas concentraciones del radical en condiciones de equilibrio, estado estacionario o transiente (72).

Se ha obtenido evidencia indirecta de la ciclización reductiva

y reversible de quinonas a cromanoles "en vitro" (73). Esta reducción puede ocurrir vía 5-metilen-cromanona (XXIV), isómero cíclico de la quinona (VI) (74); los intentos por detectar su formación "en vivo" no han dado resultados positivos (69,75,76). El intermediario podría ser la 9-hidroxicromanona (X); ésta puede reducirse a cromanol o isomerizarse a 3'-hidroxi-quinona (XII) (77,78).

La oxidación de cromanoles a quinonas, que involucra la pérdida neta de dos H, podría ser realizada por una deshidrogenasa y esta sería una forma en que los tocoferoles ejercieran su función. Los cromanoles (IX) se oxidan con formación intermedia del hemiacetal (X) en presencia de reactivos nucleofílicos (77). Esta conversión pareciera ser reversible y puede ser un mecanismo celular de transferencia de H con separación de cargas en un entorno hidrofóbico, como el que se da en el seno de las membranas lipoproteicas, en las proximidades a grupos alcohol o tiol; ello permitiría la transferencia de protones y electrones vía ión carbonio (77) sin oxidación a 3'-hidroxi-quinona (XII). La isomerización de la 9-hidroxi-cromanona (X) a 3'-hidroxi-quinona (XII) no es reversible. Las 3'-hidroxi-quinonas (es el caso de tocoferolquinonas) se reducen reversiblemente al 3'-hidroxi-quinol (XIII) y no al cromanol (IX) (tocoferol) (79).

Por ello las 3'-hidroxi-quinonas no participarían de procesos de oxidoreducción catalizados por cromanoles, o viceversa. De aquí que el par redox tocoferolquinona/tocoferol no jugaría algún rol en el transporte de electrones (79); podría hacerlo en cambio el par 9-hidroxi-cromanona/tocoferol (77).

Es difícil mostrar la ocurrencia de esta transformación "en vivo" por la existencia efímera de la hidroxí-cromanona fuera de

icever-
de(n)
os com-
cidas
e su
nol.
en re-
ies mo-
croma-
(total)
iquino-
quinona
ona
tre am-
nciona-
o estu-
es in-
de ma-
ión en
s(31)
radical
nte
activa

un entorno lipídico adecuado. Sin embargo la detección en sistemas biológicos de su isómero estable 3'-hidroxi-quinona (73) puede ser un indicio de su existencia.

Esta observación es altamente significativa pues la estructura 3'-hidroxi-quinona existe como tocoferolquinona en las células animales y vegetales; ello reactualiza una posible función de los tocoferoles en el acoplamiento energético entre el transporte de H y la fosforilación del ADP.

Como conclusión, quedan aun por demostrar la estructura de los intermediarios y el mecanismo por el cual las quinonas se convierten a ellos en los procesos redox y de conservación de energía celulares.

La ciclización no reductiva de las quinonas a su isómero cromenol (VIII) no ocurre espontáneamente pero puede efectuarse "en vitro" y existen evidencias de su ocurrencia "en vivo". La transformación inversa de un cromenol (tocoferol) a una quinona (tocoquinona-10 ó E₂ (50)) se ha detectado "en vivo" (4).

Finalmente, parte de cromenoles y quinonas isoprenoides es transformada en γ -lactonas conocidas como metabolitos de Simon. Estos metabolitos son excretados por vía urinaria, probablemente como glucurónidos (80).

D. POSIBLE RELACION ENTRE ESTRUCTURA QUIMICA Y FUNCION

Los caracteres estructurales comunes de las quinonas isoprenoides pueden indicar los grupos o estructuras vinculadas a su función biológica. La estructura para-quinoides, capaz de reducirse reversiblemente, con un potencial redox intermedio entre los donores y acep -

tomas de hidrógeno celulares, es la base molecular de su función catalítica en el transporte de H. Sus cadenas laterales isoprenoides de cuatro o más unidades, con grado de saturación variable, pero con un par de electrones en posición 2',3', especialmente adyacente a un carbonilo quinónico, hace posible la formación de un anillo cromano durante la reducción. Esta puede ser la base molecular del papel postulado para las quinonas isoprenoides en la transferencia de fosfato activado (rico en energía). Además la cadena isoprenoide larga confiere a las quinonas extraordinaria solubilidad, y en consecuencia movilidad -difusión- en las estructuras lipoproteicas celulares, lo que hace posible su función como auténticos portadores de H o fosfato.

Se ha verificado que los caracteres estructurales mencionados son necesarios para restaurar el transporte de electrones acoplados a fosforilación del ADP, en sistemas de partículas celulares capaces de oxidación de sustratos ligados a la reducción de oxígeno, nitrato, sulfato o algunos aceptores orgánicos como fumarato; o en partículas capaces de fotosíntesis, cuando ambos tipos de partículas fueron privados de quinonas. En algunos casos se ha señalado el requerimiento adicional de un metilo en C-5, pero la existencia de sistemas de transporte que funcionan con demetilquinonas (IVb y Vb), pone en duda que se trate de un requerimiento esencial.

renoides
 ión bio-
 rsible-
 acep -

CAPITULO II.

PAPEL DE CROMANOLES Y QUINONAS EN EL METABOLISMO CELULAR.

- A. Cromanoles y quinonas como vitaminas.
 - 1. Tocoferoles.
 - 2. Naftoquinonas.
 - 3. Ubiquinonas.

- B. Funciones no ligadas a la transferencia de H.
 - 1. Tocoferoles.
 - a. Acción antioxidante.
 - b. Acción sobre el metabolismo de ácidos grasos y la estructura de las membranas biológicas.
 - c. Acción sobre el metabolismo de proteínas y en el control de la actividad enzimática.
 - 2. Plastoquinona.

- C. Funciones ligadas a la transferencia de H.
 - 1. Transporte de H.
 - a. Ubiquinonas y naftoquinonas.
 - b. Tocoferolquinonas.
 - 2. Acoplamiento energético.
 - a. Ubiquinonas y naftoquinonas
 - b. Tocoferol.

A. CROMANOLES Y QUINONAS COMO VITAMINAS.

El requerimiento absoluto de naftoquinonas (vitamina K) y toco-

fero
te e
seri
estu
brad
S
tista
bios
proc
tante
83) e
La
de ex
avita
gesta
Otras
hepát
lomal
oveja
(59,8
Un
anima
cienc
los t
en vi
tras

feroles (vitamina E) por los mamíferos y aves es un hecho totalmente establecido. Los trastornos producidos por su carencia son tan serios que conducen a la muerte del animal deficiente. No se han estudiado los requerimientos de estos compuestos por otros vertebrados o por los invertebrados.

Si a ello se suma la presencia de naftoquinonas en algunos protistas y la existencia de ubiquinona en todos los organismos aerobios estudiados, se concluye que estos compuestos deben actuar en procesos metabólicos esenciales para la vida. El aislamiento de mutantes bacterianos que no sintetizan ubiquinona ó naftoquinonas (62,81-83) apoya este concepto.

1. Tocoferoles.

La carencia de vitamina E en la dieta produce una gran variedad de enfermedades mortales en mamíferos y aves. El signo clásico de avitaminosis en la rata hembra es la resorción fetal (síndrome de gestación - reabsorción) y en el macho la degeneración testicular. Otras consecuencias bien definidas de la deficiencia son: necrosis hepática en la rata, ratón y chanco; diatesis exudativa y encefalomalacia en el pollo; distrofia muscular en rata, pollo, conejo, ovejas y bovinos; distrofia muscular y anemia en primates, etc., (59,84,85).

Un síntoma dado de deficiencia se manifiesta en unas especies animales y no en otras; en una especie dada los síntomas de deficiencia son múltiples, lo que indica una acción generalizada sobre los tejidos del organismo. Hay trastornos debidos a la deficiencia en vitamina E cuya remisión se logra sólo por esta vitamina, mientras que otros síntomas responden a otros compuestos: antioxidan -

estruc-

control

y toco-

tes sintéticos, selenio o aminoácidos azufrados (85). Las tocoferolquinonas no revierten la deficiencia en vitamina E.

En el hombre adulto, dietas con contenido restringido de vitamina E no han producido manifestaciones clínicas definidas, aunque aumentan la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemólisis y su tiempo de vida media (86). Pacientes con abetalipoproteinemia poseen un nivel bajo de tocoferol en sangre; en ellos se ha observado anomalías en la ultraestructura de algunas membranas de células del epitelio intestinal, que desaparecen con la administración de vitamina (87). En niños nacidos con bajo peso y alimentados con fórmulas artificiales, se ha observado un síndrome de deficiencia en vitamina E (88,89), que se evita suplementando la "leche" comercial con tocoferol. El contenido mínimo recomendado de vitamina E en la dieta humana es 0.6 mg α -tocoferol/g de ácidos grasos no saturados (90).

2. Naftoquinonas.

La deficiencia de vitamina K en animales afecta el proceso de coagulación sanguínea a punto tal que se producen hemorragias subcutáneas intramusculares, que pueden causar la muerte (91).

En condiciones naturales la microflora intestinal de mamíferos y aves produce cantidad suficiente de compuestos con actividad de vitamina K para las necesidades del animal, aunque se discute si ella es absorbida en ausencia de coprofagia (92). En el niño recién nacido la lenta implantación de la flora intestinal, y en el adulto modificaciones severas en ella o deficiencias en la absorción de lípidos, producen signos de hemorragia que revierten por tratamiento con la vitamina (93,94).

Se
5 μ g/

La
ha me

tenid
la fl

Le
les y

y/o e

En
cione

none
totro

fotos
plen

La
na E

siste
lleva

ferol
putar

Se ha estimado que el requerimiento diario de vitamina K es de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso.

3. Ubiquinonas.

Las ubiquinonas no son vitaminas para los mamíferos y aves. Se ha mostrado que su nivel en los tejidos es independiente del contenido de ubiquinone en la dieta y de la actividad biosintética de la flora intestinal (64).

Los estudios efectuados sobre la función biológica de cromanoles y quinonas sugieren su participación en la transferencia de H y/o en otros procesos celulares no vinculados a ella.

En lo que sigue se hará referencia únicamente a posibles funciones en organismos quimioheterótrofos. Sólo en ellos naftoquinonas y tocoferoles juegan un papel vitamínico. En organismos fototrofos la función de estos compuestos parece ligada a procesos fotosintéticos, lo que no ayuda a comprender la función que cumplen en los organismos quimiotróficos.

B. FUNCIONES NO LICADAS A LA TRANSFERENCIA DE H.

1. Tocoferoles.

La variedad de tejidos afectados por la deficiencia de vitamina E en animales (músculo esquelético y cardíaco, glóbulos rojos, sistema vascular, médula ósea, epitelio renal, cerebelo, etc.), lleva a la presunción de que las células animales requieren tocoferoles para su funcionamiento normal. Dos grandes escuelas disputan desde hace veinte años cual es la función del tocoferol:

la que promueve su acción antioxidante, protectora de lípidos, general y no específica; y la que sostiene la participación del tocoferol en un proceso celular básico, aun no establecido.

a. Acción antioxidante.

La vitamina E sería el antioxidante biológico natural, evitando la peroxidación de lípidos en vivo. Los tocoferoles actuarían interrumpiendo reacciones en cadena, al reaccionar con radicales alquilo peroxilo formados por autoxidación de lípidos no saturados sensibles a O_2 . Se ha propuesto la formación de un radical tocoferolse-miquinona y un sistema redox acoplado con la glutathion reductasa, para regenerar el tocoferol (95).

La formación de peróxidos, en ausencia de vitamina E, produciría la desorganización y hasta la disociación de enzimas lipoproteicas y membranas al alterar la organización de su estructura o matriz lipídica con el consecuente y serio daño no específico a los tejidos.

La peroxidación de lípidos puede resultar de la actividad de ciertas enzimas (ej. NADP-oxidasa ligada a microsomas) de membranas, y la función del tocoferol sería preservar la estructura de dichas membranas (96) del ataque de radicales.

En apoyo de la hipótesis de la acción antioxidante de la vitamina E se cita su reactividad con lípidos peróxidos "en vitro" (97); su acción protectora de cortes de tejidos, que evita la formación de peróxidos "en vitro" (98) y el aislamiento de productos de autoxidación del tocoferol en esas condiciones.

Sin embargo se cuestiona que los lípidos celulares insaturados sean realmente peroxidados "en vivo" a las extremadamente bajas

tens:
dado
nido
tamir
vitar
ácido
lacia
bles
de de
dieta
Es
gener
dos a
b. Ac
de
A
plica
truct
nas d
En
memb
inemi
rimer
(103)
El
por e
ficie

tensiones de oxígeno de las células (99). Técnicas sensibles, cuidadosamente efectuadas, no han detectado diferencias en el contenido de peróxidos (trazas) de tejidos animales deficientes en vitamina E y controles (100). El único síndrome de deficiencia en vitamina E que se conoce con seguridad ocurre solo si ciertos ácidos grasos poliinsaturados se agregan a la dieta (encefalomalacia), no va acompañado de la formación de cantidades detectables de productos de autoxidación (101). En cambio hay síntomas de deficiencia en vitamina E que se manifiestan aun cuando la dieta no contenga ácidos insaturados (101).

Estas observaciones restan base racional a la postulada acción general del tocoferol como protector de los lípidos de los tejidos animales contra su hipotética autoxidación (102).

b. Acción sobre el metabolismo de ácidos grasos y la estructura de las membranas biológicas.

A pesar que la acción antioxidante no es suficiente para explicar la función biológica del tocoferol, es un hecho que la estructura, estabilidad y funcionamiento de membranas y lipoproteínas depende notablemente de su presencia.

En efecto, se mencionó ya las anomalías observadas en algunas membranas del epitelio intestinal en pacientes con abetalipoproteinemia (87); defectos similares pueden inducirse en animales experimentales que desarrollan en dietas deficientes en vitamina E (103) y en membranas mielínicas formadas "en vitro" (104).

El transporte intestinal de aminoácidos (105) y su absorción por el músculo esquelético (106) están alterados en animales deficientes, no así el transporte de azúcares; ello indica un efec-

to específico en la funcionalidad de la membrana celular.

La vitamina E puede afectar la síntesis (o estabilidad?) de algunos ácidos grasos no saturados (107,108); o estar involucrada directamente en su incorporación a (y/o estabilidad en) las lipoproteínas, en particular a las membranas celulares (103).

Se ha propuesto que los tocoferoles tienen acción directa sobre la estabilidad de las membranas regulando el equilibrio entre la configuración micelar y la estructura bimolecular en doble capa (109,110). Su ausencia provocaría traslocaciones y aun dislocaciones en puntos específicos de la membrana alterando así su funcionamiento normal.

c. Acción sobre el metabolismo de proteínas y en el control de la actividad enzimática.

El transporte de glicina aumenta en diafragma de conejo dietético (106) y el de valina disminuye en intestino de ratas deficientes en vitamina E (105), "en vitro".

En niños malnutridos (malnutrición proteica-calórica) se ha observado un aumento estadísticamente significativo del nivel de hemoglobina con la administración de vitamina E (111).

La actividad de numerosas enzimas se modifica en deficiencia de vitamina E. Varias enzimas catabólicas (cathepsina, ribonucleasas, desoxiribonucleasas, arilsulfatasas, creatinofosfoquinasa, xantina dehidrogenasa, de origen lisosomal) parecen dereprimirse; mientras que otras, anabólicas o del metabolismo intermedio (δ -amino levulínico sintetasa, δ -amino levulínico dehidratasa y algunas dehidrogenasas: succínico dehidrogenasa, α -cetoglutarato dehidrogenasa) pierden actividad a medida que progresa la deficien-

cia
lat
deb
c r
pro
los
a l
sea
pro
vo
Pue
rol
ción
diac
ría
por
form
dra
en
tas
ducl
E (1
O
cier
-has

cia (85). El efecto sobre la actividad enzimática parece ser re -
 lativamente específico ya que, malato dehidrogenasa, isocitrato
 dehidrogenasa, glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, NADPH - citocromo
 c reductasa, no son afectados (85).

La observación que la etionina (inhibidor de síntesis proteica)
 produce el mismo efecto que la administración de tocoferol sobre
 los niveles de creatina fosfoquinasa en plasma de conejos, llevó
 a la hipótesis de que la actividad "represora" de la vitamina E
 sea debida a una posible función de correpresor en la síntesis de
 proteínas específicas (112), a nivel genético.

El efecto activador de la vitamina E no ha sido explicado, sal
 vo para la declinación de la actividad respiratoria "en vitro".
 Puede deberse a una acción protectora, de "pantalla", del tocofe -
 rol sobre grupos -SH reactivos (113); o a cambios de configura -
 ción en enzimas respiratorias, o de la membrana mitocondrial, me-
 diados por NAD particulado, cuya asociación a la membrana esta -
 ría controlada por el tocoferol (114).

El efecto activador y su contraparte, la represión enzimática
 por vitamina E podría darse sobre distintas isoenzimas. De esta
 forma se explica que si bien las aminolevulínico oxidasa y dehi-
 dratasa son menos activas en hígado de animales deficientes que
 en preparaciones de animales no deficientes, la actividad de es-
 tas enzimas se reduce en animales no deficientes con porfiria in-
 ducida (con alilisopropil-acetamida) si se los trata con vitamina
 E (115).

Como conclusión, los múltiples y severos efectos de la defi -
 ciencia en vitamina E en células y tejidos animales, no pueden
 -hasta hoy- ser explicados con un concepto unificante acerca de

de al-
 rada di
 ipopro-
 e sobre
 re la
 capa
 ocacio
 uncio-
 de la
 dis -
 s defi
 ha ob
 de he
 ncia
 uclea
 esa ,
 mirse;
 (δ-
 y al-
 rato
 eficien-

su función biológica. Varios efectos son sin duda secundarios a la deficiencia, pero cuáles son los mecanismos celulares primarios dependientes de la vitamina E?

Quizás la mayor parte de las consecuencias de la deficiencia puedan explicarse asumiendo un efecto directo sobre la estructura de lipoproteínas, distinto de la protección de los ácidos grasos contra la peroxidación; pero esta presunción será ambigua mientras no se establezca el modo en que el tocoferol participa en, o confiere estabilidad a, las estructuras lipoproteicas.

El descubrimiento de estados de deficiencia en el hombre con fiere mayor trascendencia al estudio de la función biológica de la vitamina. Ello justifica el ensayo de nuevos sistemas experimentales y una revisión crítica de los experimentos que apoyan cada hipótesis.

2. Filoquinona.

a. Acción en la coagulación sanguínea.

Si bien la vitamina K es factor antihemorrágico, ella no ejerce acción directa sobre la coagulación sanguínea, ni es parte (cofactor) de la molécula de protrombina, la más afectada de la cascada que lleva a la formación de fibrina (94). Es necesaria para la síntesis de protrombina (factor II), proconvertina (factor VII) y los factores IX y X participantes en el proceso de coagulación. La vitamina K no actúa liberando estos factores glicoproteicos ya preformados de las células hepáticas que los producen, sino en su síntesis (116,117).

Los estudios efectuados para definir su papel en la inducción de la síntesis de esas proteínas específicas, ha sido resu-

mido
almen
(118)
mal (1
proteí
tamina
a la
síntes
por fi
Ma
difícil
proteí
tetiza
rente
sis,
defici
canis
afecta
protr
(124)
Lo
proteí
ficien
La
ción
rilsc

mido por Wasserman y Taylor (85). Con la evidencia disponible actualmente, no es posible señalar con precisión el sitio de acción (118); los datos recogidos indican que puede actuar a nivel ribosomal (119,120), estimulando la síntesis "de novo" de la porción proteica de la protrombina (121). Otros autores sugieren que la vitamina K actúa en el sitio donde la fracción carbohidrato se liga a la cadena polipeptídica ya terminada (122). Singularmente, la síntesis de glicoproteínas en mitocondrias aisladas es estimulada por filoquinona (123).

Martius (124) en base a consideraciones evolutivas, considera difícil entender que el organismo animal regule la síntesis de una proteína vital mediante un compuesto que no produce y que es sintetizado por otros organismos para una función totalmente diferente. Aporta nuevos elementos de juicio en sostén de su hipótesis, según la que el defecto en la síntesis de protrombina, en deficiencia de vitamina K, es debido a alguna alteración en el mecanismo de conservación o transferencia de energía (125). Ello afectaría el anabolismo celular, primordialmente la síntesis de protrombina, por tratarse de una proteína vital de alto "turnover" (124).

Lo cierto es que la vitamina K afecta la síntesis de algunas proteínas en vertebrados y que la evidencia experimental es insuficiente para establecer el mecanismo preciso de su acción.

C. FUNCIONES VINCULADAS A LA TRANSFERENCIA DE H.

Las quinonas terpenoides desempeñarían en las células una función catalítica en el transporte de H particulado y en la fosforilación oxidativa acoplada a ella.

La cantidad y localización celular de las quinonas es compatible con esa función. Se ha calculado que, suponiendo una relación equimolar con el contenido de cit c (126), sería necesaria una concentración de quinonas del orden de 5.6 $\mu\text{g}/\text{gcs}$ para llevarla a cabo.

1. Transporte de H.

a. Ubiquinonas y naftoquinonas:

Al menos parte de la ubiquinona mitocondrial es esencial para la actividad de los sistemas succínico oxidasa (127,128) y NADH oxidasa (129). La ubiquinona se localiza entre las flavoproteínas y el citocromo c, pero su posición respecto al citocromo b no es segura (130-134).

Sin embargo la velocidad de reducción de la ubiquinona durante la transferencia de electrones no es commensurada con la velocidad de oxidación del donador (135). Aun no se han explicado las notables diferencias en la cinética de óxido-reducción de la ubiquinona en sistemas fosforilantes y no fosforilantes (135,136). Pero estos datos deben interpretarse con cautela pues se desconoce cual es la especie molecular activa de la quinona en la transferencia. El estado de reducción de la quinona se ha determinado en base al contenido de quinol; de ocurrir reacciones de un electrón en el sitio de la ubiquinona (137,138), el turnover de los radicales que se formarían no sería medido por la relación ubiquinona a ubiquinol (139).

Con relación a la posible participación de filoquinona en el transporte de electrones mitocondrial, es de interés señalar que se ha aislado una vitamina K reductasa, soluble, capaz de oxidar al NADH (140) y otra vitamina KH_2 -citocromo c reductasa, particulada, que oxida el filoquinol (141). Pero la velocidad de reduc -

ción de la quinona por NADH o succinato no es compatible con la velocidad de oxidación de estos sustratos (142).

Lo cierto es que la participación de estas quinonas en la respiración aerobia ha quedado totalmente establecida con bacterias mutantes que no las sintetizan (31,81,83,143,144). Se ha mostrado inequívocamente que ubiquinona y/o menaquinona (según el microorganismo) son componentes obligados del sistema de transporte particulado de H en bacterias. Sufren reacciones redox ligadas al transporte de electrones; se requieren para oxidación de NADH, succinato, malato, lactato y α -glicerofosfato con oxígeno, nitrato o fumarato como aceptores (26,29,31,81,83,145,153). En los organismos procarióticos ubiquinona y menaquinona interactúan de modo no establecido, junto con el (los) citocromo(s) de tipo b, entre las NAD - o FAD -dehidrogenasas y los citocromos c. Pero tampoco en estos sistemas la velocidad de reducción de ubiquinona es compatible con la actividad de oxidasas (154).

Los modelos clásicos del transporte de electrones particulado no explican los estudios cinéticos. Las quinonas podrían actuar en más de un sitio en algunas oxidasas (31,155) y es posible que su función sea la de un activador de un componente de la secuencia de transporte (hierroproteína no hémica) mas que un portador propiamente dicho. Se ha llegado a sugerir que las quinonas no participarían en la vía principal de transporte de electrones en partículas intactas (136,156).

b. Tocoferolquinonas:

Es posible que compuestos de esta familia participen en sistemas redox. El α -tocoferol revierte, al parecer competitivamente, la inactivación del transporte de electrones por antimicina A en re-

ductasas sensibles, incluso de levaduras y *Neurospora* (78). Ello indicaría un sitio de acción común para ambos compuestos.

Se ha obtenido indicios de la participación de una quinona no identificada, posiblemente vinculada con α -tocoferol (157) en fracciones celulares solubles de *Clostridium sticklandii* que efectúan la oxidación de NADH acoplada a la reducción de glicina (158).

Los estudios efectuados son insuficientes y hasta objetables técnicamente, por lo que hasta el momento la participación directa del tocoferol en el transporte de electrones particulado es incierta.

2. Acoplamiento energético.

Se ha propuesto que en el transporte de H con separación de cargas las quinonas terpenoides o algunos de sus derivados, formarían compuestos de alta energía, de muy corta vida media, que efectuarían el acople entre la transferencia de H y la fosforilación del ADP al menos en uno de los sitios de fosforilación.

a. Ubiquinonas y naftoquinonas:

La cantidad de ubiquinona mitocondrial endógena reducida depende de la concentración de fosfato y ADP en el medio de suspensión, "en vitro" (159).

Filoquinona y menaquinona exógenas participan en baja proporción en la fosforilación oxidativa efectuada por extractos libres de células de *Mycobacterium phlei* (160). En este proceso se forma un derivado fosforilado de las quinonas, de estructura desconocida, capaz de transferir el grupo fosfato al ADP (160,161).

b. Tocoferolquinonas:

Hasta la fecha no hay dato confiable que permita proponer un rol directo de tocoferoles o sus quinonas en la fosforilación oxidativa. Sin embargo la posible participación de cromanoles en ella ha sido reactualizada por la detección de 3' -hidroxiquinona resultante de la actividad de sistemas fosforilantes de *Mycobacterium* (73) la que podría formarse via cromanol (ver p.22).

Lo cierto es que queda abierta la cuestión de una evaluación completa de la actividad funcional de la quinona en el acomplamiento energético. Pueden ser sumamente útiles en estos estudios las mutantes deficientes en quinonas.

). Ello

nona no

7) en

que

glicina

tables

n directe

es inlier

ón de car

formarían

efectus -

ción del

de depende

nsión,"en

propor -

s libres

se forma

sconocida,

CAPITULO III

EMPLEO DE MICROORGANISMOS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCION BIOLOGICA DE CROMANOLES Y QUINONAS.

A. Ventajas del empleo de organismos unicelulares.

Selección de levaduras.

B. Tocoferol y filoquinona en levaduras.

A. VENTAJAS DEL EMPLEO DE ORGANISMOS UNICELULARES.

Las alteraciones observadas en la síntesis de componentes celulares y en la regulación de los procesos celulares en deficiencia de vitaminas E y K₁, son indicios de que ambas desempeñan una función esencial en células de organismos eucarióticos.

Sin embargo a más de cincuenta años de establecido el requerimiento de vitamina E por tejidos animales (162) y treinta y ocho años después de haberse determinado su estructura (163), no se conoce aun su función biológica. Algo similar ocurre con la vitamina K₁ descubierta en 1929 (164).

El hallazgo de estados de deficiencia en el hombre; la acción del tocoferol sobre pacientes con abetalipoproteinemia; su posible acción sobre enfermos con porfiria, hacen necesarios nuevos esfuerzos por localizar el sitio de acción de ambas vitaminas.

El escaso y hasta confuso conocimiento actual acerca de la función de tocoferoles y filoquinona puede atribuirse en parte a los sistemas empleados para procurar establecerla.

Se han seguido dos líneas experimentales. Una, la observación de los efectos de la deficiencia en vitaminas E y K₁ sobre orga -

nismos (animales) enteros, "en vivo"; se han analizado los cambios producidos en composición, actividad enzimática, estructura, etc., de los tejidos. Y otra, los estudios "en vitro" de la acción de los tocoferoles y filoquinona sobre cortes de tejidos o preparados enzimáticos provenientes de animales deficientes en vitamina o en preparados enzimáticos desprovistos de ellas por extracción con solventes.

Ninguna de estas aproximaciones es satisfactoria. Lo prueba el hecho que no han producido hipótesis segura acerca de la función de las vitaminas E y K₁, a pesar de los severos síntomas que su deficiencia produce en animales. El empleo de animales enteros dificulta la interpretación de los resultados debido a la multiplicidad, en estructura y función, de los tejidos que los constituyen y su interrelación, pudiendo llevar a conclusiones erróneas acerca las causas de los efectos observados. Los experimentos "en vitro" pueden conducir a la detección de efectos que no ocurren "en vivo" (en organismos enteros).

Nuestro laboratorio estaba interesado en contribuir al conocimiento de la función biológica de la vitamina E. Entre las líneas en estudio se creyó oportuno examinar la posibilidad de emplear levaduras con ese fin. Los microorganismos (protistas) surgen como un sistema experimental más apropiado que los sistemas pluricelulares.

En efecto, es posible contar con una población del tamaño deseado, de células homogéneas; controlar y modificar su composición, desarrollo y estado fisiológico regulando las condiciones de cultivo o ambientales; aislar mutantes que requieren el compuesto cuyo función se estudia. Esto permite disponer de masa suficiente

es celu-
biencia
una fun-
queri-
y ocho
o se co-
vitamina
acción
posi -
uevos
nas.
e la fun
e a los
rvación
orga -

de células con igual genotipo, analizar el efecto de condiciones fisicoquímicas sobre la actividad que se estudia y sobre el contenido de sustancias de interés, así como determinar las vías metabólicas en que ellas participan. Todo ello con las ventajas de la experimentación con organismos vivos enteros y sin los inconvenientes que se dan en la experimentación con organismos animales o vegetales.

Esta aproximación experimental, empleada para establecer la función biológica y biosíntesis de un gran número de componentes celulares, ha sido poco empleada para sustancias liposolubles. Maguigan y Walker (165) seleccionaron microorganismos con el propósito de dilucidar los factores intermediarios vinculados a la síntesis de esteroides y su función, en razón de la "uniformidad de este material biológico y su organización simple". Bishop y col. (166) propusieron su empleo para el estudio de la función biológica de ubiquinona y vitamina K pues, "muestran más variedad de caminos" metabólicos que los animales superiores y pueden ser cultivados en "medios simples" con lo que se reduce "el riesgo de introducir materiales lipídicos extraños". Brodie y col. (160,161) han usado bacterias para estudiar la función biológica de la menaquinona. Se han aislado mutantes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que no sintetizan ubiquinona o menaquinona (81-83), se ha efectuado su análisis genético y se las ha empleado para algunos estudios de la función biológica de éstas quinonas.

Entre los organismos unicelulares eucarióticos no fotosintéticos, las levaduras parecieran ser los más apropiados para el estudio de la función biológica de las vitaminas E y K₁. En efecto, pueden desarrollarse en medios de composición definida con glucosa

y a
nit
bre
né
pro
tro
nida
son
est
prot
cap
to d
cos,

I
a la
male
nos
"cula
glób
híga
agré
las
vale
sugi
emba

y amonio como fuentes de carbono, donador de electrones y fuente de nitrógeno; se conoce el efecto de las condiciones ambientales sobre sus mecanismos de producción de energía, así como su mapa genético y modos de transferencia de genes. Otro grupo, el de los protozoarios, no es tan conveniente: buena parte de ellos son fagotrofos, no se dispone de medios de cultivos de composición definida para los osmotróficos y los conocimientos sobre su genética son más limitados. De aquí la selección de levaduras para iniciar estudios de la función biológica de tocoferoles y filoquinona en protistas eucarióticos. De ser posible contar con mutantes incapaces de sintetizar estos compuestos, podría estudiarse el efecto de la deficiencia en el metabolismo de ácidos grasos y nucleicos, de proteínas y en la regulación de la actividad enzimática.

B. TOCOFEROL Y FILOQUINONA EN LEVADURAS.

Las levaduras han sido los protistas más estudiados en relación a la vitamina E. En la década del 50 comenzó a observarse en animales un efecto protector de la levadura de la dieta, contra algunos efectos de la deficiencia en vitamina E. La hemólisis intravascular causada por la inyección de aloxano, la lisis "in vitro" de glóbulos rojos por ácido dialúrico y la necrosis hemorrágica de hígado, en rata, pueden ser reducidos en incidencia y severidad agregando a la dieta suplementos de levadura (1 g diario de células frescas) o extractos alcohólico o etéreo de levadura (equivalentes a 8 gramos de células húmedas (gch)) (46). Estos efectos sugieren la presencia de pequeñas cantidades de vitamina E. Sin embargo Forbes y György no detectaron compuesto alguno con R_f

(cromatografía en papel) de α -, β -, γ - δ -tocoferol en 1 mg de los extractos mencionados; los autores podían detectar 5 μ g de α -tocoferol mezclado a 0.5 mg de extracto de lípidos lo que significa que no habría más de 250 μ g de α -tocoferol/gramo de células secas (gcs) (se extrajo 30 g de lípidos de 5 kgch). Las levaduras de cerveza y de panificación (tipo 5009) marca Fleischmann (Standard Brands Inc., New York) eran las más activas en la prevención de la hemólisis por ácido dialúrico y no inducían la necrosis hepática en rata, mientras que la levadura de panadería británica (The Distillers Co. Ltd., Great Burgh, Epson, Surrey) y Candida (Torula) (Lake States Yeast Corp., Rhinelander, Wisconsin) eran usadas rutinariamente para inducción de necrosis por aquel entonces.

Forbes y György parecen desconocer un trabajo anterior de Swick y Bauman (45) quienes sostienen que "la levadura de panadería (origen no indicado) contiene tan poco tocoferol que ha sido usada rutinariamente en dietas basales para el ensayo de vitamina E". Swick y Bauman dosan 4.12 μ g de α -tocoferol/gcs con el reactivo de Emmerie-Engel (167) después de aislar el "tocoferol" por extracción de lípidos con etanol, saponificación del extracto y cromatografía del insaponificable en columna de floridina; y 16.68 μ g/gcs cuando extraen con etanol y aislan el "tocoferol" del extracto por destilación molecular e hidrogenación.

Casi al mismo tiempo que Forbes y György, Cowlshaw y Prange (168) anuncian el aislamiento de un compuesto con propiedades químicas y biológicas similares a las de los tocoferoles (aunque su R_f , en papel, no coincidió con ninguno de ellos; los autores señalan que el R_f variaba con la pureza de la solución). Aislan 50 μ g/gc en la levadura Fleischmann 50 B y más de 300 μ g/gc en Can -

dida
rial
diaz
trie
con
te".
da e
extr
M
rigu
leva
y en
Corp
gcs,
marc
dura
en u
ron
car
deri
treid
-no
celu
esté
crome
que
en le
nol.

dida (Torula) 1N y 3N (Lake States Yeast Corporation), de un material Emmerie-Engel positivo, que no reacciona con o-dianisidina diazotada (lo que indica que no debe ser δ - o δ -tocoferol o toco-trienol); ese material poseía "actividad antihemolítica comparable con la de una cantidad de tocoferol de poder reductor equivalente". Fue aislado por saponificación y también por hidrólisis ácida en presencia de ácido ascórbico, seguida de saponificación del extracto, y purificado por cromatografía en papel.

Más adelante Green y col. (47) interesados en obtener dietas rigurosamente libres de tocoferoles, examinaron varios lotes de levadura. En levadura de panadería seca (The Distillers Co. Ltd.) y en *Candida utilis* (Torula) tipo B y tipo 361 (Lake States Yeast Corp.) también secas, hallaron 0.3 , 2.5 y 4.2 μg α -tocoferol/gcs, respectivamente. En Torula seca británica (sin indicación de marca o productor) sólo hallaron trazas de α -tocoferol. En levadura de panadería fresca, en paquetes (The Distillers Co. Ltd.) y en una cepa aislada de ella y cultivada en laboratorio determinaron 0.8 μg α -tocoferol/gcs; finalmente en melaza de caña de azúcar empleada en la elaboración comercial de la levadura de panadería, hallaron 0.2 μg α -tocoferol/g. Distintos lotes fueron extraídos empleando varios procedimientos (extracción con solventes -no puede precisarse cual- y saponificación del extracto; lisis celular con dietilamina y con acetato de etilo y extracción con este solvente o con benceno-metanol) y el tocoferol se aisló por cromatografía en Decalso y en papel. En este trabajo se sostiene que "la sustancia no identificada similar al tocoferol" detectado en levadura por Cowlishaw y Prange (168) "es claramente" ubicromenol.

Spiller y col. (50) utilizaron levadura de panadería en paquete (The Distillers Co. Ltd.) para estudiar la biosíntesis de ubiquinona y señalan que "el informe según el cual levadura contiene α -tocoferol no puede ser sostenido", refiriéndose al trabajo de Green y col. (47). Debe notarse que Spiller y col. extrajeron lotes de células no mayores de 5 gcs por saponificación y de no más de 12.5 gcs con etanol; la separación de los componentes del extracto se efectuó por cromatografía en columna de alúmina, pero no se indica cómo se realizó la detección del tocoferol.

Puede estimarse que en esas condiciones el límite de detección (no indicado) no debió ser menor que 5 $\mu\text{g/gcs}$. Estos autores incubaron células en medios sin fuente de nitrógeno y con L ($\text{CH}_3 - ^{14}\text{C}$) metionina, (1,2 - ^{14}C) shikímico, (U - ^{14}C) p-hidroxibenzoico ó (2 - ^{14}C) malonato; analizados extractos de las células así incubadas (nunca más de 12.5 gcs), no se detectó radioactividad en la zona de la placa donde debía migrar el α -tocoferol. Pero ello no asegura que éste compuesto no es sintetizado por *Saccharomyces*. En primer lugar, el único precursor conocido del tocoferol, entre los trazadores empleados, es el ácido shikímico; y éste no se incorpora, prácticamente, a las células de levadura a causa de una barrera de permeabilidad a nivel de pared celular, según los mismos autores. Por otro lado, la masa de células marcadas pudo ser insuficiente para detectar la síntesis de trazas de tocoferol radioactivo. Finalmente, las condiciones experimentales fueron tales que sólo permiten afirmar que la síntesis de tocoferoles no fue estimulada por aireación; la de ubiquinona, en cambio, lo fue.

Otra mención de que la levadura no contiene tocoferol fue he -

che
(To
Gree
culd
toru
extr
en b
"el
masa
 μg c
cien
nida
ber
Mort
L
en l
y co
cial
salve
dici
gcs.
cofer
fra
lor
tores
anter
No
ten

cha por Skinner y Sturm (51). Estos autores analizaron *Candida* (Torula) 1N y 3N, secas (de igual origen que las empleadas por Green y col.) (47), *Rhodotorula*, *Candida rugosa* y *Candida pelliculosa* (éstas de origen no especificado). Con excepción de *Rhodotorula*, las otras cepas fueron extraídas por saponificación y el extracto de lípidos se examinó por cromatografía en capa delgada en busca de α -tocoferol y su quinona. Los autores señalan que "el más bajo límite de detección cromatográfica posible (con las masas de células empleadas) fue $2.0 \mu\text{g}$ α -tocoferol / gcs y $0.4 \mu\text{g}$ α -tocoferolquinona / gcs". Green y col. (47), continúan diciendo, "comunicaron 2.5 a $4.2 \mu\text{g}$ α -tocoferol/gcs en *Torula* obtenida de la misma fuente". Con relación al ubicromenol dicen haber detectado el ubicromenol-6 en *Torula*, como ya lo habían hecho Morton y col. (56).

La historia de los estudios sobre la presencia de tocoferoles en levadura concluye con la mención de los efectuados por Mahler y col. (49) quienes detectan en una levadura de panadería comercial, marca "Springer" (origen no especificado) y en una cepa salvaje cultivada en el laboratorio (composición del medio y condiciones de cultivo no indicadas), poco más de $13 \mu\text{g}$ α -tocoferol/gcs. Este es el valor más alto señalado para el contenido de tocoferoles en levadura. En vista de lo significativo de esta cifra y de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, su valor se discute más adelante (p. 139). Debe señalarse que los autores no hacen referencia alguna a esa cifra ni a publicaciones anteriores.

No se ha hallado en la literatura mención alguna sobre la existencia de filoquinona en hongos.

La situación contradictoria en la literatura acerca la síntesis de tocoferoles y filoquinonas por levadura hace necesario que antes de comenzar estudios metabólicos, selección de mutantes auxotróficas, etc., deba establecerse el contenido real de estos compuestos y eventualmente seleccionarse las cepas más apropiadas.

Además, el empleo creciente de dietas balanceadas para producción animal y de las levaduras como fuente de proteínas (y vitaminas) en ellas, en reemplazo de otras proteínas de origen animal o vegetal, hace necesario conocer si las levaduras son o no capaces de sintetizar tocoferoles y filoquinonas. Ello permitiría prevenir trastornos motivados por carencia de estos compuestos en la dieta.

A.

B.

C. 1

2

1

3

4

CAPITULO IV

AISLAMIENTO DE CROMANOLAS Y QUINONAS ISOPRENOIDES DE
LEVADURAS

- A. Extracción de cromanoles y quinonas.
- B. Selección de procedimientos de extracción de tocoferoles y quinonas de levaduras.
 - 1. Procedimientos de extracción empleados.
 - 2. Comparación de procedimientos de extracción.
- C. Fraccionamiento del extracto de lípidos de levaduras.
 - 1. Procedimientos de fraccionamiento utilizados.
 - a. Separación de lípidos en exceso.
 - b. Cromatografía en columna de ácido silícico.
 - c. Cromatografía de adsorción en capa preparativa.
 - d. Cromatografía de adsorción en capa delgada.
 - e. Cromatografía de partición en capa delgada.
 - 2. Caracterización preliminar de componentes del extracto.
 - a. Irradiación con luz ultravioleta.
 - b. Reactivo de Emmerie-Engel.
 - c. Reacción de Lester-Ramasarma.
 - d. Revelado con indicadores redox reducidos.
 - e. Reactivo de Liebermann-Burchard.
 - f. Iodo.
 - g. Sensibilidad de los procedimientos de detección empleados.
 - 3. Cromatografía en capa preparativa.
 - Posibilidades e inconvenientes.
 - 4. Cromatografía en columna.
 - Posibilidades e inconvenientes.

- D. Aislamiento de tocoferoles y quinonas cromatográficamente puros.
- E. Recuperación de tocoferol y ubiquinona en las secuencias de aislamiento seleccionadas.

La determinación de cromonoles y quinonas isoprenoides, componentes menores de la fracción insaponificables de lípidos, no es fácil. Su inestabilidad en presencia de oxígeno, luz, calor, medios alcalinos y ácidos, metales, etc. (169) puede llevar a pérdidas considerables. Se hallan en células o tejidos en cantidades de décimas a pocos microgramos por gramo. Los procedimientos para su extracción son tanto más eficientes cuanto mayor es la masa de lípidos extraída, con la consecuente dificultad para aislarlos del extracto.

No existen métodos específicos para su determinación o no son aplicables en presencia de otros lípidos.

Cuando se analizan componentes a nivel de trazas, se suma a estas dificultades el problema de las contaminaciones ajenas al material en estudio y los artefactos provenientes de transformaciones químicas de sustancias biológicas. Morton y col. hallaron δ -tocotrienol en médula ósea; una reinvestigación demostró que provenía de la membrana usada en la diálisis de los lípidos (170).

Los contaminantes pueden ser concentrados por lípidos presentes en materiales biológicos (171); en particular por los lípidos de los microorganismos. Una sustancia aislada puede no ser componente natural del material estudiado, sino provenir de la manipulación de la muestra, ej. ubicromenol en *Candida* (56) y tocoferol en levadura de panadería (ver p.156 de esta Tesis), o ser confundida con

otra
ta
pro
qui
los
leva
sos
dire
lico
rial
carb
visi
quin
blea
Ning
tori
1. A
lare
ni a
ras
y el
dria

otra de interés si no se efectúa una identificación lo más completa posible.

Puede encontrarse en la literatura referencias de los distintos procedimientos aplicados para el análisis de tocoferoles (172-177), quinonas isoprenoides (178-180) y sus precursores (62, 27).

En las secciones siguientes se discuten, describen y comparan los que se seleccionaron para el análisis de estos compuestos en levaduras.

A. EXTRACCION DE CROMANOLES Y QUINONAS.

Los cromanoles y quinonas isoprenoides se han extraído de diversos modos de las células que los contienen. Se ha usado extracción directa con solventes (hidrocarburos, acetona, mezcla de éter etílico-etanol o cloroformo-metanol, etanol) ó hidrólisis del material celular con ácidos o álcalis seguida de extracción (con hidrocarburos o éter etílico) del insaponificable. Se han publicado revisiones de procedimientos de extracción de quinonas (no tocoferol quinona) (178,180, 27); las revisiones de procedimientos aplicables a extracción de tocoferoles (172,181) no son actualizadas. Ninguno de los procedimientos descritos es plenamente satisfactorio y es difícil seleccionar el más conveniente.

1. Así, la extracción con solventes no expone los componentes celulares a la acción de agentes químicos que puedan alterarlos. Pero ni aun los más polares extraen los lípidos ligados a las estructuras celulares. En levaduras éstos constituyen el 1 % del peso seco y el 10 % de los lípidos totales (182,183). En preparados mitocondriales el 35 % de la ubiquinona está fuertemente ligado, a tal

punto que sólo es extraído después de tratamiento de la suspensión con álcali (56,184); algo similar parece ocurrir con los tocoferoles (172).

Varios solventes se han empleado para la extracción de fenoles y quinonas poliprenoides de hongos. Se utilizaron etanol y etanol-éter (50,183), metanol (185,186), metanol-éter de petróleo (51) y otros solventes (56,187) para levaduras. Se extrajeron compuestos isoprenoides de *Neurospora crassa* con acetona (188).

La extracción con solventes se recomienda cuando se dispone de pequeña cantidad de material para análisis (178) o en los casos en que ensayos preliminares indiquen que la proporción de contaminantes no es alta.

A efectos de aislar lípidos ligados se ha efectuado la lisis celular previa a la extracción con solventes, por medios mecánicos o por hidrólisis alcalina, ácida o enzimática.

2. La disgregación de las estructuras celulares por hidrólisis alcalina seguida de la extracción de los lípidos liberados es, comparativamente, un procedimiento más simple y rápido. Aumenta notablemente la proporción de lípidos isoprenoides en el extracto por la hidrólisis de ésteres grasos y la solubilidad de sus productos en agua. Pero puede llevar a pérdidas y hasta destrucción de los compuestos de interés, que sufren reacciones de isomerización, ciclización, sustitución, oxidación, etc., catalizadas por HO^- (189,190). La velocidad de éstas reacciones puede reducirse a un mínimo si se observan precauciones especiales (177,178). Este procedimiento se ha aplicado a una mayor variedad de materiales que cualquier otro y se recomienda como método general, en

espe
una
vari
cas
cedi
caci
E
veni
pren
centr
T
Eugle
rable
truic
Mo
crome
húmed
e hid
Le
(192)
las h
Pa
males
nific
dos e
didas
que l
(47)

especial en aquellos casos en que los lípidos isoprenoides sean una fracción muy reducida de los lípidos totales (180,187). Una variante de la hidrólisis alcalina es el empleo de bases orgánicas (186) para la lisis celular. A efectos de distinguir este procedimiento de los que emplean KOH, se reserva el término saponificación para este último caso.

En la literatura no existe criterio unánime acerca de la conveniencia de la saponificación para la extracción de lípidos isoprenoides. Las discrepancias pueden deberse a las distintas concentraciones de reactivos y solventes empleados.

Threfall y Goodwin (27) encuentran que la saponificación de *Euglena gracilis*, aun en presencia de pirogalol, lleva a considerable destrucción de quinonas terpenoides. La vitamina K es destruida totalmente por saponificación (178,180).

Morton y col. (56) extraen mayor cantidad de ubiquinona y ubiquinonol de *Candida* cuando emplean la saponificación de células húmedas en lugar de otros procedimientos (extracción con solventes e hidrólisis-ácida).

Lester y Crene (187,191), Green y col. (57), Ramasarma y col. (192) y Trelfall y col. (50) emplearon la saponificación de células húmedas para aislar ubiquinona de varios hongos.

Para recuperar cuantitativamente el α -tocoferol de tejidos animales deben seleccionarse cuidadosamente las condiciones de saponificación y extracción, en especial cuando su contenido en tejidos es menor de 1 $\mu\text{g/gcs}$, pues la saponificación puede causar pérdidas de tocoferoles (193). Los tocotrienoles son más sensibles que los tocoferoles a la acción de los álcalis (194). Green y col. (47) y Mahler y col. (49) han aislado tocoferoles de levaduras por

ispen -
 los to-
 fenoles
 y etanol
 eo (51)
 compues-
 sione de
 casos
 e conta-
 lisis
 mecáni -
 lisis
 os es,
 umenta
 extrac-
 le sus
 lestruc -
 de iso -
 talizadas
 e redu -
 (177,178).
 e mate -
 aeral, en

saponificación.

3. La saponificación de "extractos con solventes" en lugar de la saponificación directa del material celular, puede ser ventajosa, especialmente por el menor tiempo requerido para la hidrólisis de los ésteres, lo que reduce el riesgo de destrucción de los compuestos sensibles y la aparición de artefactos.

Para el aislamiento de tocoferoles y ergosterol de levaduras, Skinner y Sturm (51) y Morimoto y col. (185) han empleado respectivamente, saponificación de extractos celulares con solventes.

Scharf y Simpson (195) han aislado carotenoides de *Saccharomyces* por saponificación de extracto libres de células preparados por ruptura mecánica (prensa de French y "molino coloidal").

4. La hidrólisis ácida de células no es aconsejable, pues aparte de las reacciones catalizadas por H^+ que pueden ocurrir (97,196), los ácidos grasos liberados son extraídos con los solventes usados para la extracción de los lípidos, creando dificultades en el fraccionamiento del extracto. Los ácidos grasos actúan como fases estacionarias en las cromatografías de partición (197) y/o reaccionan con los componentes del extracto, formando compuestos estables como sucede con el α -tocoferol (198).

Sin embargo es la única alternativa para disociar glicósidos de ácidos fenólicos (199) y de prenil fenoles (50). También, al igual que la saponificación, libera lípidos no extraídos con solventes - o ligados - (183). Las quinonas parecen estables en medio ácido aunque los quinoles pueden ciclarse en esas condiciones (180).

Los resultados de Morton y col. (56) indican que la hidrólisis ácida es más efectiva que la extracción con solventes, pero lo es

men
ubi

5.
de
en

B.

ext
lan
efl

(2

par
ens

I.

II.

III

IVa

menos que la saponificación, para la extracción de ubiquinona y ubicromenol de *Candida*.

5. La hidrólisis enzimática fue empleada para explorar la presencia de precursores de ubiquinona en levadura (50) y de naftoquinonas en hígado vacuno (200).

B. SELECCION DE PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION DE TOCOFEROLES Y QUI- NONAS DE LEVADURAS.

No se han efectuado estudios comparativos de procedimientos de extracción destinados a establecer el más conveniente para el aislamiento de tocoferoles de microorganismos. Sólo se ha evaluado la eficiencia de extracción de ubiquinona de *Candida* (56) y *Euglena* (27).

Con el propósito de seleccionar el procedimiento más apropiado para la extracción de tocoferoles y ubiquinonas de levaduras, se ensayaron los siguientes.

- I. Extracción de células liofilizadas con ciclohexano y metanol en el aparato de Soxhlet.
- II. Extracción con hexano, acompañada de molienda con sílice, de células liofilizadas.
- III. Extracción de células húmedas con metanol y metanol-éter etílico seguida de partición con hexano de los extractos combinados.
- IVa. Extracción con etanol y etanol-éter seguida de partición del extracto con isooctano y saponificación de los lípidos extraídos en este último.

IVb. Saponificación del residuo celular de la extracción anterior con etanol y etanol-éter etílico.

V. Saponificación de células húmedas y extracción del inseponificable con éter etílico.

VI. Hidrólisis ácida de células húmedas y partición de la mezcla con éter etílico.

Estos procedimientos se describen a continuación. Se señalan los motivos por los cuales fueron ensayados y de las modificaciones introducidas en los procedimientos originales.

1. Procedimientos empleados para la extracción de lípidos.

a. Procedimiento I : Extracción de células liofilizadas con ciclohexano y metanol.

Basado en el empleado por Lester y Crane (187) para aislar ubiquinona de *Candida*, reemplazando el isooctano por ciclohexano y metanol para una más completa extracción de lípidos.

Células liofilizadas se extrajeron dos veces con ciclohexano y una vez con metanol en un aparato de Soxhlet, por períodos sucesivos de 6 h; se emplearon 20 ml de solvente por gcs en cada extracción. El extracto se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 2 ml de benceno por cada 5 gcs extraídos. Se descartó el residuo insoluble.

b. Procedimiento II : Extracción con hexano, acompañada de molienda con sílice, de células liofilizadas.

Goodwin y col. (188) emplearon la extracción con acetona acompañada de molienda con sílice, para aislar hidrocarburos de Neu-

rosp
de e
S
90
das;
de h
resi
c. P
y
e
M
de e
petr
leva
razó
más
L
éter
empl
pido
modi
S
con
lúme
dujo
y se
un v

rospara. En nuestro caso se reemplazó la acetona por hexano a fin de evitar la extracción de un exceso de lípidos impurificantes.

Se colocó en un mortero de vidrio 0.5 g de alúmina (RR Alumdam, 90 mesh, Norton) y 5 ml de hexano por cada g de células liofilizadas; se molió 15 min. Se repitió la extracción con igual volumen de hexano otras dos veces. El extracto se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 2 ml de benceno por cada 5 gos extraídos.

c. Procedimiento III : Extracción de células húmedas con metanol y metanol-éter etílico seguida de partición con hexano de los extractos combinados.

Morimoto y col. (185) han empleado metanol para la extracción de esteroides de Candida y Skinner y Sturm (51) metanol-éter de petróleo para extracción de tocoferol y tocoferolquinona de varias levaduras. Se reemplazó el éter de petróleo por éter etílico en razón de la mayor polaridad del último, con la idea que extraería más lípidos isoprenoides,

Luego de ensayar la partición de los extractos combinados con éter etílico y con hexano, se prefirió esta última pues cuando se emplea hexano no se producen emulsiones; además la cantidad de lípidos en la fase hexánica es menor que en la etérea, sin que ello modifique la masa de α -tocoferol extraída en la partición.

Se extrajo la masa celular dos veces, con agitación continua, con 3.75 ml de etanol por gch a 60 °C, y una tercera con igual volumen de metanol-éter etílico (1:3) a 30 °C, durante 1 h. Se redujo el volumen del extracto alcohol-éter combinado a la mitad y se lo particionó con igual volumen de hexano después de agregar un volumen de agua (se separó un aceite viscoso, amarillo, entre

ambas fases, que se descartó). La fase hexánica se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 2 ml de hexano por cada 20 gch extraídos.

Ocasionalmente se evaporó la fase alcohol-éter después de particionarla con hexano y se saponificó el residuo, extrayéndose el material insaponificable con éter etílico. No se detectó ubiquinona, pero sí esteroides, en este extracto.

d. Procedimiento IVa : Saponificación del extracto de lípidos obtenido con solventes.

Etanol y etanol-éter etílico han sido utilizados con buen rendimiento para el aislamiento de cromanoles, quinonas y sus precursores desde *Euglena* (27), levadura de panadería (50) y bacterias Gram negativas (62). En estos trabajos se particiona el extracto con éter etílico a fin de reducir la proporción de contaminantes que acompañan a los compuestos de interés; en esta partición se forman emulsiones persistentes. Por ello se prefirió la extracción con isooctano y saponificación del aceite extraído, después que ensayos preliminares mostraron que α -tocoferol y ubiquinona agregados a extractos de levadura, eran recuperados en un 92 y 95 % respectivamente.

Se extrajo dos veces con 3.75 ml de etanol por gch a 60 °C, y una tercera con igual volumen de etanol-éter etílico (1:3) a 30 °C con agitación continua durante 1 h. El extracto se reextrajo tres veces con igual volumen de isooctano y esta fase se evaporó a sequedad. El residuo, Z g (cuando la masa del residuo de la fase superior fue menor que 1 g, se consideró Z = 1), se disolvió en 1,5 ml de solución de pirrolol al 1 % (m/v) en etanol, se agregó 0.5 Z ml de KOH acuoso al 60 % y se calentó a 60 °C durante 10 min,

con agitación continua; se dejó enfriar, se agregó 4 Z ml de agua y se extrajo tres veces con 3 Z ml de isooctano. La fase isooctano se evaporó y el residuo se disolvió en 1 ml de benceno o hexano por cada 20 gch extraídos.

La concentración de KOH durante la saponificación y extracción subsiguiente, así como la de etanol, fueron las mismas empleadas en el procedimiento V; la concentración de pirogalol en la mezcla de saponificación fue del 1.5 % (15 mg/g aceite).

e. Procedimiento IVb : Saponificación del residuo celular de la extracción anterior.

La masa celular ya extraída con alcohol y alcohol-éter (procedimiento IVa) se saponificó como se indica en el procedimiento V, a fin de verificar si la extracción con los solventes indicados permite el aislamiento total de tocoferol y ubiquinona. El líquido de saponificación se extrajo con éter etílico, se lavó con agua se colocó a - 20 °C por 12 h; el material soluble se disolvió en 1 ml de hexano caliente por cada 20 gch iniciales. Esta solución se colocó a - 20 °C durante 12 h; el material soluble en hexano se designó IRC/sH.

f. Procedimiento V : Saponificación de células húmedas

La saponificación de células húmedas fue, de los procedimientos ensayados por Morton y col. (56), el que extrajo mayor cantidad de ubiquinona y ubiromenol de *Candida*. En nuestro caso se emplearon condiciones de saponificación similares a las utilizadas por Mahler y col. (49), pues estos autores describen el aislamiento de una notable cantidad de α -tocoferol de levaduras por saponificación. Se empleó etanol en lugar de metanol, pues se ob-

servó que el etanol extraía mayor cantidad de material amarillo durante el período de una hora previo al calentamiento.

La masa de células húmedas (Z, Z ≥ 400g), suspendida en 3.75 Z ml de solución de pirogalol al 1,5 % (m/v) en etanol absoluto, se colocó en un balón (3 litros) de dos bocas con uniones esmeriladas, a las que se acopló un refrigerante y un burbujeador que llegaba hasta el fondo del balón; por éste último se hizo pasar nitrógeno. Al cabo de una hora a temperatura ambiente la mezcla se calentó a ebullición; alcanzada ésta se agregó poco a poco 0.5 Z ml de solución acuosa de KOH al 150 % (m/v) con agitación circular continua y se mantuvo a reflujo durante 30 min. Luego se colocó el balón en un baño de hielo y agua, se agregó 5 Z ml de éter etílico y 10 Z ml de agua fría. Después de cerrar el paso de N₂ se transfirió la mezcla a ampollas de decantación donde se separó la fase etérea. La fase acuosa se reextrajo otras dos veces con 5 Z ml de éter. El extracto etéreo se lavó con un tercio de su volumen de agua hasta eliminar todo el álcali y se secó con 50 g de Na₂SO₄ (anh.) por litro de extracto. Se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio bajo N₂; completada la evaporación del solvente se observó ocasionalmente algunas gotas de agua residual, las que se eliminaron agregando 50 ml de etanol absoluto por litro de extracto evaporado y llevando a sequedad nuevamente. El residuo seco se disolvió en el menor volumen de metanol a ebullición (unos 0.2 Z ml).

En las condiciones empleadas la concentración de pirogalol, KOH y etanol fue, respectivamente: 1 %, 15 % y 75 % (56 mg, 0.75 g y 3.75 ml por gch) durante la saponificación; y fue de 0.3 %, 5 % y 25 % respectivamente, durante la partición con éter.

g. Pr

Se

do en

lumen

etili

secó

en O.

Se

disoc

encon

Se

levad

mismo

extra

fotom

por c

metrí

Lo

La

la ma

manole

dió la

La rel

se com

sultad

g. Procedimiento VI : Hidrólisis ácida de células húmedas.

Se calentó a ebullición una suspensión de Z g de material húme do en 2.25 Z ml de HCl 6N durante dos horas; se agregó igual vo lumen de agua y se extrajo tres veces con igual volumen de éter etílico. Este se lavó con agua hasta quedar libre de cloruros, se secó con SO_4Na_2 , se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 0.1 Z ml de benceno.

Se ensayó este procedimiento pues ha sido utilizado para la disociación de glicósidos fenólicos (199) y bajo esta forma podría encontrarse el tocoferol en la levadura.

2. Comparación de procedimientos de extracción.

Se extrajeron según cada procedimiento dos lotes de 20 gch de levadura de panadería comercial; todos los lotes provenían de un mismo paquete. Se determinó gravimétricamente la masa de lípidos extraída. En una alícuota del extracto se dosó ergosterol espectro- fotométricamente. Del resto se aislaron ubiquinona y α -tocoferol por cromatografía en capa delgada y se los dosó por espectrofoto- metría y cromatografía en fase gaseosa, respectivamente.

Los procedimientos analíticos se describen en p. 108.

La eficiencia de la extracción de lípidos neutros se valoró por la masa de lípidos extraída. Como control de la estabilidad de cro manoles, quinonas y esteroides frente a cada procedimiento, se mi dió la cantidad de α -tocoferol, ubiquinona y ergosterol extraídos. La relación de las tres últimas cifras a la masa total de lípidos se consideró un índice de la selectividad de la extracción. Los re sultados se indican en la tabla 3.

Tabla 3.

COMPARACION DE PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION DE SACCHAROMYCES

Componentes	Procedimiento de extracción ¹						Valores según Mehler y col (49)
	I	III	IVa	IVb	V	VI	
Lípidos extraídos (mg)	27.2	21.0	18.5	8.7	12.5	94.0	12.0
Ergosterol (mg)	3.05	4.15	4.20	2.75	4.40	sac ²	0.59
Ubiquinona (µg)	75.0	90.0	170.0	20.0	145.0	110.0	140.0
α-Tocoferol (µg)	1.30	1.75	1.80	0.15	1.40	1.05	13.0

1. Detalles experimentales en el texto. Se indican valores medios por gcs.

2. sac: sin absorción ultravioleta característica.

La
traídos
nida co
valores
La e
ponific
te para
traccio
del res
extrae
lo indi
comple
práctic
La e
miento
dimient
dos por
(proced
De I
nificac
ubiquin
Los
nificac
cida es
ción de
tor del
valor o
gcs; pr

La masa de lípidos, ergosterol, α -tocoferol y ubiquinonas extraídos empleando el procedimiento II, es algo menor que la obtenida con el procedimiento I. Por esta razón no se incluyen esos valores en la tabla 3.

La extracción de las células con etanol y etanol-éter y la saponificación del extracto (procedimiento IVa), fue la más eficiente para el aislamiento de quinonas y cromanoles, aunque la extracción de éstos compuestos no fue completa. La saponificación del residuo celular resultante de aplicar el procedimiento IVa, extrae otros componentes, en especial quinonas y esteroides como lo indican los valores colocados bajo el encabezamiento IVb. La complejidad operacional hace que el procedimiento IVa sea poco práctico para masas celulares mayores de 100 gch.

La saponificación directa de la masa celular húmeda (procedimiento V) es más simple técnicamente. Se extrajo con este procedimiento el 85 % de la ubiquinona y el 75 % del tocoferol obtenidos por extracción con solventes y saponificación del extracto (procedimiento IVa), cifras éstas que se consideran satisfactorias.

De los procedimientos ensayados por Morton y col. (56) la saponificación de células húmedas fue el más indicado para extraer ubiquinona y ubicromenol de *Candida*.

Los otros procedimientos de extracción con solventes fueron ineficaces. La disgregación del material celular por hidrólisis ácida es inconveniente. En este último caso parece haber destrucción de lípidos. Ella se evidencia por el aumento de poder reductor del extracto (equivalente a 240 $\mu\text{g/gcs}$) en comparación con el valor obtenido por otros procedimientos (procedimiento I: 10 $\mu\text{g/gcs}$; procedimiento III: 92 $\mu\text{g/gcs}$; procedimiento IVa: 80 $\mu\text{g/gcs}$).

Además el espectro ultravioleta del extracto carece de los picos característicos del ergosterol, los que son reemplazados por un máximo a 230 nm, lo que indica descomposición de éste compuesto, el principal componente de la fracción de lípidos neutros de levadura.

En base a estos resultados se decidió adoptar en estos estudios la extracción con solventes y saponificación del extracto (procedimiento IVa) para la extracción de lotes de menos de 100 g de masa húmeda y la saponificación directa de células húmedas (procedimiento V) para lotes de mayor masa. La aplicación de ambos procedimientos a lotes de células de un mismo organismo, permitió descartar que la ausencia de tocoferoles en algunos de ellos fuera debida a insuficiente extracción de los lípidos ligados (IVa) o a destrucción de tocoferoles por condiciones alcalinas (V).

C. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE LÍPIDOS DE LEVADURAS.

En los hongos existe una gran variedad de lípidos distintos de cromanoles y quinonas isoprenoides. En la levadura de panadería se han descrito 18 esteroides (182,183,185) en la fracción insaponificable. La relación de tocoferol, ubiquinona y ubicromenol a los otros lípidos es muy baja. Empleando los datos de la literatura pueden calcularse relaciones en masa de lípidos isoprenoides de *Saccharomyces cerevisiae* que se indican en la tabla 4.

Estas cifras señalan la necesidad de separar tocoferoles, quinonas y compuestos relacionados del extracto crudo de lípidos antes de efectuar su identificación y/o determinación.

La complejidad de los extractos y las dificultades para deter-

CONTE

Los val
ferenci
más baj

Lí

Lípidos

α

Ub

Ub

Ee

Er

Lípidos

Hf

Ee

GL

Acidos

Acidos

Fosfoli

Lípidos

1. El
cer2. Val
en3. Val
pid

Tabla 4.

CONTENIDO RELATIVO DE LÍPIDOS EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Los valores indicados fueron calculados con los datos de las referencias citadas. En la columna (a) se han ubicado los valores más bajos y en la (b) los más altos, hallados en la bibliografía.

Lípido	Contenido relativo ¹		Referencia
	(a)	(b)	
Lípidos isoprenoides			
α -Tocoferol	1-4		47
		65	49
Ubicromenol	1-26		47
Ubiquinona	5-165		47
		700-1.250	49,50,191
Escualeno	1.800		182
Ergosterol	3.000		49
		13.000-95.000	165,183
Lípidos neutros			
Hidrocarburos	11.700 ²		201
		60.000	182,202
Esteroles	45.000		49
		57.000-160.000	165,183,203
Glicéridos		175.000 ²	201
Acidos grasos libres		354.000 ²	201
Acidos grasos totales		435.000	202
Fosfolípidos	125.000 ³		183
		190.000	202
Lípidos totales	350.000		182
		580.000-845.000	165,183,202

1. El menor contenido de α -tocoferol determinado en *Saccharomyces cerevisiae* (0.2 $\mu\text{g}/\text{gcs}$) se tomó como unidad.
2. Valor calculado aceptando la masa de lípidos totales indicada en la referencia (184).
3. Valor calculado suponiendo que el 4 % en masa de los fosfolípidos es fósforo.

minar componentes menores se hacen evidentes cuando se examina cromatográfica o espectrofotométricamente los extractos crudos.

La cromatografía bidimensional en capa delgada (figura 6) de un extracto de levadura para panificación preparado por extracción con solventes (procedimiento IVa) reveló un mínimo de 23 componentes en el extracto. Estos ensayos permitieron detectar la presencia de ubiquinona-6, ubiquinol-5, ergosterol y escualeno; pero no se observó tocoferoles, tocoferolquinona o filoquinona. El límite de sensibilidad de los reactivos empleados (ver tabla 5) permite detectar compuestos presentes en cantidad mayor a 2 µg.

El análisis por cromatografía gas-líquido de los extractos preparados por extracción con solventes (PHES) (procedimiento IVa) y por saponificación del residuo celular (IRC/sE) (procedimiento IVb), reveló la presencia de un componente (numerado XVIII) con tiempo de retención (R_t) igual al del α -tocoferol (figura 7). Pero este compuesto no puede ser α -tocoferol. En efecto, la cantidad del compuesto XVIII en los extractos PHES e IRC/sE, 5 µg/gcs y 1.1 mg/gcs respectivamente, hubiera permitido observar una mancha muy intensa con R_f de α -tocoferol en las cromatografías en capa delgada. Estudios posteriores mostraron que el compuesto XVIII correspondía al designado S en p.93 (fig. 11). En los cromatogramas de la figura 7 puede observarse la presencia de componentes con R_t de escualeno y ergosterol y la ausencia de filoquinona. No se detectó α -tocoferol succinato o α -tocoferol acetato en el extracto PHES mediante cromatografía en capa delgada o gas-líquido.

El espectro ultravioleta del extracto PHES no posee máximos de absorción sino hombros cerca de 230, 245, 280 y 293 nm ; esto in-

Figura
leva

Capa: 2
cutivas
Muestra

1: E
2: M

Procedi
das con
zonas l
ca con

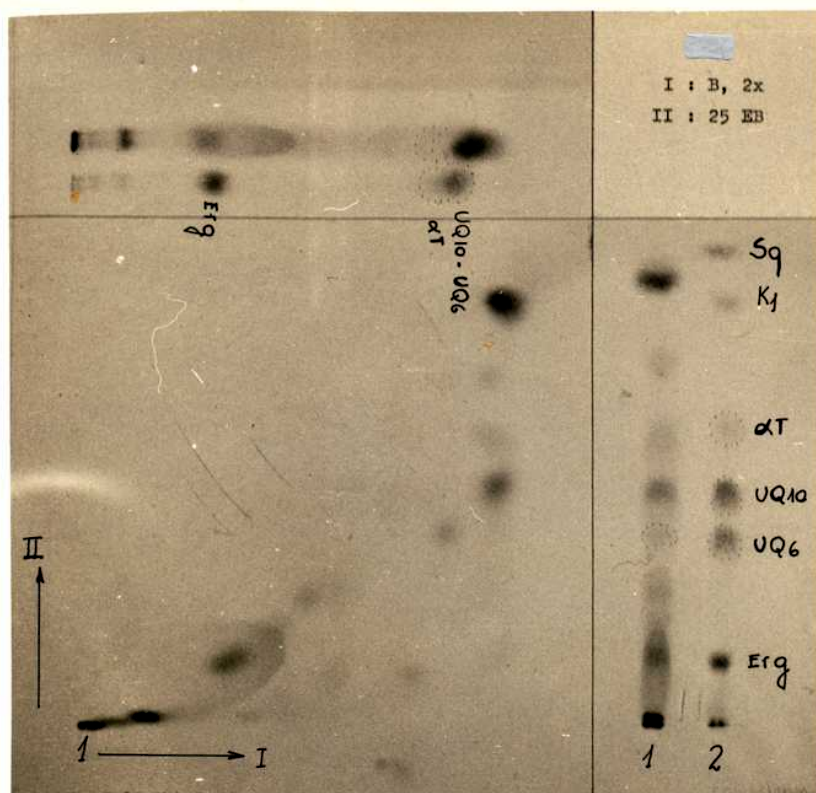


Figura 6. Cromatografía en capa delgada del material aislado de levadura para panificación, por extracción con solventes.

Capa: 2 mm. Solventes: dirección I, desarrollada dos veces consecutivas con benceno; dirección II, benceno-éter etílico (75:25).

Muestras sembradas:

- 1: Extracto de lípidos, 1 mg, equivalente a 0.5 gcs.
- 2: Mezcla de estándares: escualeno (Sq), filoquinona (K_1), ubiquinona-10 (UQ₁₀), ubiquinona-6 (UQ₆), α -tocoferol (α T), ergosterol (Erg) y α -tocoferolquinona (α TQ), 5 μ g de cada una.

Procedimientos de observación. Las bandas laterales fueron rociadas con el reactivo de Lester-Ramasarma (reaccionaron con el las zonas limitadas con líneas de puntos). Luego se roció toda la placa con reactivo de Liebermann-Burchard (p. 77 y 78).

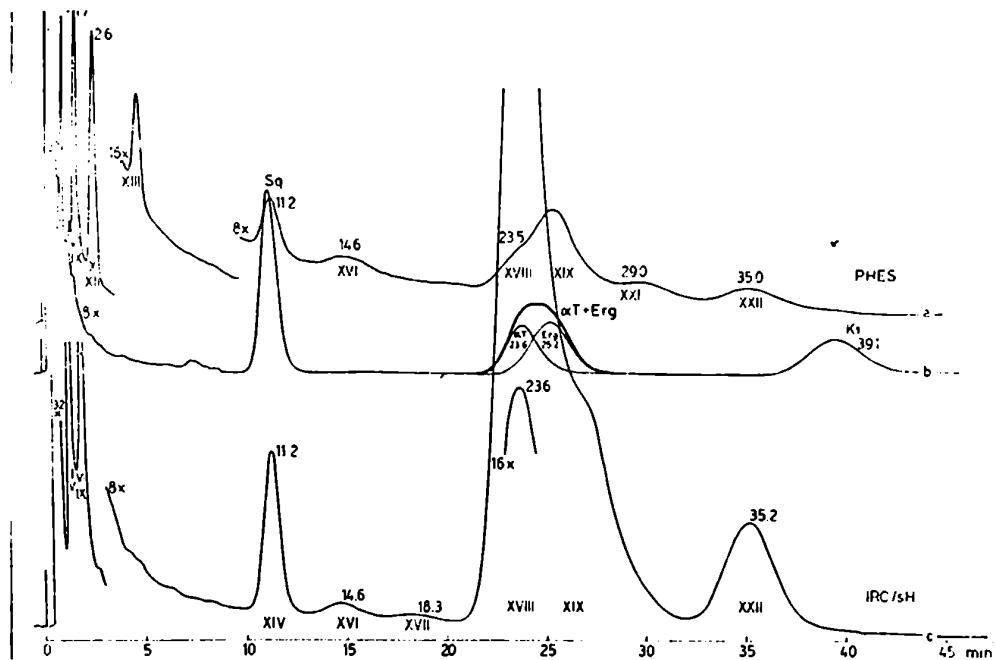


Figura 7. Cromatograma obtenido en fase gaseosa, de extractos de lípidos para panificación.

Columna: 1.8 m x 4 mm id, 3 % SE-30 sobre Chromosorb W AW DMCS HP 80/100.

Temperaturas: inyector, 250 °C; columna 225 °C; detector, 250 °C. Gas portador, 60 ml/min.

Atenuación: la indicada en cada trazado x 10^{-11} Amp/mV.

Muestras inyectadas. PHES: material obtenido por extracción con solventes y ulterior partición del extracto con hexano, fase hexánica, 59 μ g, equivalente a 30 mgcs. IRC/sH: material obtenido por saponificación del residuo celular de la extracción anterior, soluble en hexano, 22 μ g, equivalente a 6.5 mgcs.

Para obtener los trazados superpuestos en b se inyectaron las soluciones I: escualeno (Sq), α -tocoferol (α T) y filoquinona (K_1); II: Sq, ergosterol (Erg) y K_1 y III: Sq, α T, Erg y K_1 , conteniendo en todos los casos 500 ng de cada estándar.

dica qu
ra que
tracto
see más
compon
estero
de este
De
el dos
extrac
ultrav
de este
A f
lípidos
prepar

a. Sep
Con
nonas
las cr
paró de
algunas
tenol
100 g
La
ubiqui
cristal

dica que no hay predominio de alguno de los compuestos de levadura que absorben al ultravioleta. El espectro ultravioleta del extracto IRC/sH (a una concentración equivalente a 55 mgcs/ml) posee máximos a 270 y 282 nm, lo que indica que los principales componentes con absorción ultravioleta son compuestos del tipo esteroides Δ^{5-7} diénicos, los que constituyen el 60 % de la masa de este extracto.

De lo expuesto hasta aquí se puede concluir que no es posible el dosaje de cromanoles, quinonas y compuestos relacionados en los extractos de lípidos de levadura sin fraccionar, por sus espectros ultravioleta o por cromatografía gas-líquido en razón del exceso de esteroides (ergosterol y el compuesto S).

A fin de separar tocoferoles y quinonas del extracto crudo de lípidos se ha empleado en este trabajo la cromatografía en capa preparativa y la cromatografía en columna.

1. Procedimientos de fraccionamiento utilizados.

a. Separación de lípidos en exceso.

Con el propósito de aumentar la proporción de cromanoles y quinonas en el extracto, reducir la masa de adsorbente a emplear en las cromatografías y mejorar la resolución de las mismas, se separó del extracto crudo el grueso de los lípidos contaminantes en algunas ocasiones. Se empleó la precipitación de esteroides en metanol (173) toda vez que se extrajo una masa de células mayor de 100 g por saponificación.

La separación puede efectuarse sin pérdidas de tocoferol o ubiquinona si el enfriamiento no es muy prolongado como para que cristalice ésta última.

ctos de

DMCS

250 °C.

ón con
se he-
btenido
nterior,

las so-
nona (K_1);
, con-

b. Cromatografía en columna de ácido silícico.

Se emplearon 60 a 100 g de ácido silícico (Mallinckrodt, CC-4 100 mesh, Anedra, Buenos Aires) por gramo de lípidos extraídos. La relación diámetro:altura de la masa de adsorbente empaquetada fue próxima a 1:5 (20 g de ácido silícico usado forman una columna húmeda de 28 ml).

La columna se empaquetó y activó siguiendo el procedimiento de Hirsh y Ahrens (204) reemplazando los discos de papel de filtro por capas de Cellite (Johns-Manville Prod. Co., New York) secada como la sílice.

El material a cromatografiar se disolvió en un volumen de hexano igual al de la columna empaquetada. Los lípidos se eluyeron con mezclas de éter etílico en hexano (EH) al 0.25 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % y 100 % (v/v). Estos eluyentes se indicarán en el texto por el porcentaje de éter etílico, seguido de las iniciales EH (ej. 0.25 % EH). Se emplearon 8 ml de cada eluyente por g de sílice, con excepción del 3 % EH del que se usaron 12 ml/g de sílice. Cada eluido, incluso el hexano de siembra y lavado, se recogió por separado.

Cada una de las fracciones recogidas se evaporó a sequedad, se pesó el residuo y se lo disolvió en un volumen de benceno tal que la concentración de lípidos no fuera mayor que 50 mg/ml.

Con el objeto de observar la distribución de lípidos en cada fracción y localizar las que contienen compuestos de interés, se sembró 60 ó 600 μ g (cuando el extracto provino de hasta 20 o de más de 100 gch, respectivamente) de lípidos sobre una línea de 1 cm en una capa de sílica gel G de 0.25 mm de espesor. Las fracciones eluidas con mezclas EH de concentración menor o igual a

3 9
nes
tar
Eng
pla

die
lon
loq
es
sor
ade
men
se
min
a ef
de l

c. C

I
prep

ra e

* SE
mate
fici
mate

3 % se cromatografiaron en benceno y las eluidas con concentraciones mayores que el 3 %, en éter etílico-benceno (15:85). Las sustancias presentes se visualizaron con los reactivos de Emmerie - Engel, de Lester-Ramasarma y de Liebermann-Burchard (ver p.74) en placas separadas.

La elución del material con absorción ultravioleta se siguió midiendo la densidad óptica de las fracciones eluidas a 265 nm. Esta longitud de onda fue seleccionada pues en ella la absorción de filloquinona, ubicromenol, ubiquinona, ergosterol y tocoferolquinonas es el 85 %, 79 %, 81 %, 69 % y 92 % del valor en el máximo de absorción, respectivamente; ello hace que esta longitud de onda sea adecuada para detectar la elución de cualquiera de los compuestos mencionados. La concentración relativa de compuestos absorbentes se evaluó determinando el valor de $SE_{265 \text{ nm}}^{1 \%}$ *. También se determinó el espectro ultravioleta de cada fracción entre 220 y 350 nm a efectos de contar con una idea preliminar sobre la naturaleza de la principal sustancia absorbente en ellas.

c. Cromatografía de adsorción en capa preparativa.

La cromatografía en capa preparativa de sílica (o cromatografía preparativa en capa) fue el procedimiento empleado inicialmente para el fraccionamiento del extracto de lípidos insaponificables de

* $SE_{\lambda}^{1 \%} = E_{\lambda}^{1 \%} / \text{masa de células (secas) de que proviene el material que se examina. Su significado es el mismo que el del coeficiente de extinción específico. Permite comparar legítimamente materiales provenientes de lotes de células de distinta masa.}$

Saccharomyces. Posteriormente se restringió su uso al fraccionamiento de lípidos provenientes de no más de 100 gch.

Se emplearon capas de sílica gel G (E. Merck, A.G., Darmstadt) de 0.5 a 2.0 mm de espesor, según la masa de lípidos a fraccionar. En ocasiones se incorporó Rodamina 6G (GN 500, Duperial, Buenos Aires) a la capa de sílica, empleando para preparar la suspensión una solución acuosa al 0.004 % del colorante fluorescente en lugar de agua.

Se colocaron 5 a 8 mg de lípidos (concentración no mayor de 30 mg/ml) por cm sembrado (60 a 100 mg en una línea de 12 cm/placa) en capas de 2 mm de espesor. Ello equivale a separar 2.5 a 4.0 mg de lípidos por g de sílica.

La cromatografía inicial del extracto se efectuó en benceno. Para la purificación de los componentes del extracto en escala preparativa se emplearon distintos solventes según la polaridad del compuesto, los que se indican en la figura 12. Las cubas fueron presaturadas.

Los compuestos que interesaba aislar se localizaron observando las placas bajo luz ultravioleta (UV) a 254 nm (p.75). Los estándares y la mezcla de éstos con una alícuota de la muestra de lípidos se revelaron con el reactivo de Emmerie-Engel. Los lípidos de interés se eluyeron con etanol (tres veces el volumen de la sílica empaquetada en pequeñas columnas de vidrio); en el caso de sílica con Rodamina 6G se eluyó el material adsorbido con 6 volúmenes de éter etílico en lugar de etanol.

Las fracciones eluidas fueron examinadas espectrofotométricamente y purificadas e identificadas por repetidas cromatografías en capa delgada de sílica.

d. Cro

Se

lica

Se

princi

dispor

tos (p

de col

ductor

ciones

de esc

La

ción d

pas de

ducen

ca y p

car re

Cua

ción e

nales

sivame

e. Cro

Se

igual

geneida

teriore

d. Cromatografía de adsorción en capa delgada.

Se reserva esta designación para la cromatografía en capa de sílica gel de 0.25 mm de espesor.

Se la empleó con diversos fines. Para explorar los componentes principales de extractos de lípidos antes de su fraccionamiento y disponer de un "mapa" de ellos a fin de comparar distintos extractos (por cromatografía bidimensional). Para controlar la elución de columnas y localizar las fracciones que contienen sustancias reductoras y quinonas. Para purificar compuestos aislados de fracciones diversas y como una técnica auxiliar para la identificación de esos compuestos.

La preparación de las placas, su sembrado, desarrollo y la elución de lípidos se efectuaron de la misma forma que para las capas de mayor espesor. La masa de sílica por placa y la carga se reducen proporcionalmente; son suficientes 6 g de sílica gel por placa y pueden sembrarse hasta 700 μ g de lípidos por cm sin sacrificar resolución.

Cuando se buscaba detectar compuestos presentes en baja proporción en la muestra se sembraron placas para corridas bidimensionales hasta con 1.5 mg de lípidos/cm sin que ello alterara excesivamente la separación.

e. Cromatografía de partición en capa delgada.

Se la empleó para la separación de compuestos que migran con igual R_f en cromatografías de adsorción. Para verificar la homogeneidad de las sustancias purificadas por los procedimientos anteriores y como un criterio adicional para su identificación, en

especial la verificación del número de unidades isoprenoides en la cadena lateral.

La impregnación de capas para cromatografía en capa inversa, se efectuó colocando las placas en una cuba cromatográfica conteniendo una solución al 5 % de parafina líquida en éter de petróleo (60/80) en cantidad suficiente para cubrir un cm de la placa; se retiró ésta cuando la solución alcanzó el borde superior.

Se sembraron los materiales a separar una vez seca la capa. La carga máxima compatible con una buena separación fue 8 a 10 veces menor que la recomendada para placas no parafinadas. Los solventes empleados en las separaciones fueron presaturados con parafina.

No debe incorporarse a estas placas colorantes fluorescentes como Rodamina 6G, pues son solubles en los solventes utilizados en las particiones (soluciones de 5 a 25 % de agua en acetona). Para el revelado de los compuestos de interés se emplearon los mismos reactivos utilizados para capas no parafinadas.

2. Caracterización preliminar de componentes del extracto.

La identificación de grupos funcionales se efectuó con reacciones más o menos específicas realizadas sobre capas de sílica gel, luego de las separaciones cromatográficas. En diversas ocasiones se emplearon radiación ultravioleta; las reacciones de Emmerie - Engel, de Lester-Ramasarma, de Liebermann-Burchard, de Gibbs y de Millon; indicadores redox reducidos, sales de diazonio e iodo.

a. Irr

Cro

se dis

fondo

dad no

dos lo

los co

nicos;

ligera

El

acentu

las pl

te. El

menole

mo man

cuelen

La

para le

puesto

ción, l

verde c

Esta

la luz

vacione

go se e

El e

Mineral

colocada

a. Irradiación con luz ultravioleta.

Cromonoles y quinonas, en razón de su absorción al ultravioleta, se distinguen como manchas púrpuras o violetas oscuras, sobre un fondo violeta más claro (característico de la sílica). Esta propiedad no es específica de quinonas y cromonoles pues la presentan todos los compuestos con absorción ultravioleta. Por ejemplo, entre los componentes de extractos de lípidos, los esteroides Δ^{5-7} diénicos; aunque el ergosterol se observa con coloración azul oscura, ligeramente fluorescente, más que violeta.

El contraste entre las sustancias absorbentes y la sílica puede acentuarse agregando Rodamina 6G al preparar las capas o rociando las placas ya corridas con soluciones de este colorante fluorescente. Ello confiere a la sílica una intensa coloración amarilla. Cromonoles, cromenoles, quinonas y ergosterol se observan entonces como manchas violetas; otros lípidos isoprenoides (ej. dolicoles, escualeno, esteroides no diénicos) muestran fluorescencia rosa.

La irradiación con luz ultravioleta es particularmente indicada para la detección de filoquinona. En placas sin Rodamina este compuesto se observa de color violeta oscuro al comenzar la exposición, pero al cabo de 1 a 2 min adquiere fluorescencia celeste a verde claro, intensa (205).

Esta reacción muestra la sensibilidad de algunos compuestos a la luz ultravioleta. De aquí la necesidad de efectuar las observaciones cubriendo con placas de vidrio las bandas de las que luego se eluirán compuestos de interés.

El examen de las capas fue realizado con una lámpara UV SL - 25 Mineralight (Ultra-Violet Products Inc., San Gabriel, California), colocada unos 5 cm sobre la placa. La observación con Rodamina 6G

fue hecha agragándola durante la preparación de las capas (ver p. 72) o rociando las placas ya cromatografiadas con una solución al 0.0005 % del colorante en acetona-etanol (1:1).

b. Reactivo de Emmerie-Engel (167; reacción 91 en ref. 206.).

Todos los compuestos con potencial redox tal que puedan reducir el Fe^{+++} a Fe^{++} , reaccionan con éste reactivo. El Fe^{++} forma un complejo rojo con α, α' -dipiridilo que lo estabiliza e impide su reoxidación.

Cromanoles, cromenoles, quinoles, algunos fenoles (es el caso de los poliprenilfenoles) reaccionan sobre capas de sílica a poco de rociadas con el reactivo (2 a 5 min después de evaporado el solvente) tomando color rosa brillante a rojo sobre el fondo blanco de sílica. Otros compuestos, particularmente carotenoides, esteroides y sus ésteres reaccionan lentamente (generalmente 2 a 24 hs después de revelados) adquiriendo color amarillo a amarillo rojizo, netamente diferenciable del que caracteriza a los compuestos citados en el primer grupo.

Se designa (en este trabajo y en la literatura) compuestos reductores sólo a aquellos que muestran reacción positiva en pocos minutos. Los ésteres de tocoferoles no reaccionan con este reactivo.

La reacción se efectúa rociando la placa con una mezcla 1:1 de una solución de $FeCl_3$ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ AR, Mallinckrodt, Anedra, Buenos Aires, Argentina) al 0.2 % y otra de α, α' -dipiridilo (2,2'-dipiridilo, Certified, Fischer Scientific Company, Fair Lawn, New York) al 0.5 %, ambas en etanol bidestilado. Las soluciones se conservan en frascos oscuros a temperatura ambiente durante un

mes;
uso.

c. Re

La

a su

neote

éste

tecta

En

reoxi

das)

riabl

mente

react

casid

sin r

conóc

El

0.1 %

como

ción)

HCl a

acela:

cador

se pu

ta fo

mes; se mezclan directamente en el pulverizador justo antes de su uso.

c. Reacción de Lester y Ramasarma (7,207).

Las quinonas isoprenoides son reducidas por NaBH_4 . Los quinoles a su vez pueden ser reoxidados por reactivos tales como cloruro de neotetrazolium o FeCl_3 . La reducción del neotetrazolium hace que éste tome color rojo a púrpura; la reducción del Fe^{+++} puede detectarse con α, α' -dipiridilo.

En este trabajo se empleó el reactivo de Emmerie-Engel para la reoxidación de quinoles. Ubiquinonas y tocoferol quinonas (reducidas) reaccionan de inmediato. Con filoquinona la reacción es variable en razón de la rápida autoxidación del filoquinol. Naturalmente también dan reacción positiva las sustancias reductoras del reactivo de Emmerie-Engel no reducibles por NaBH_4 . De aquí la necesidad de revelar paralelamente con el reactivo de Emmerie-Engel sin reducción previa con NaBH_4 , una alícuota de toda muestra desconocida.

El revelado se efectúa pulverizando una solución de NaBH_4 al 0.1 % en etanol (si las quinonas se hallan en cantidad suficiente como para distinguir su color amarillo, se observa su decoloración). Antes de evaporado el etanol, rociar con una solución de HCl acuosa al 1 % (a fin de descomponer el exceso de NaBH_4); para acelerar la evaporación del agua se calienta la placa con un secador de cabello, por el lado del vidrio. Apenas evaporada el agua se pulveriza con el reactivo de Emmerie-Engel. Procediendo de esta forma es posible la detección de filoquinona.

d. Revelado con indicadores redox reducidos (207; reacción N° 154 en ref. 206).

Se aprovecha la propiedad de las quinonas de oxidar la forma reducida (incolore) de ciertos colorantes. Son de interés las reacciones con leucoazul de metileno, oxidado por benzoquinonas y filoquinona pero no por menaquinonas; y con leucoazul de nilo A, oxidado por todas las quinonas isoprenoides conocidas.

Las quinonas que reaccionan hacen que la zona donde se encuentran se torne azul en pocos minutos; el fondo adquiere tonalidad celeste que se va oscureciendo por autooxidación en particular con azul de metileno. Si bien la reacción es bastante específica, hay compuestos en los extractos de lípidos de levadura que dan reacción positiva aun cuando no son reducibles por NaBH_4 . Por ello se registran como positivas únicamente las que alcanzan intensidad máxima en los 5 min posteriores al revelado. El contraste se reduce con posterioridad al oscurecerse el fondo.

Los colorantes (Merk A.G., Darmstadt) en solución acuosa 10^{-3} M, se reducen (20 ml) con Zn en polvo (1 g) y H_2SO_4 concentrado (2 ml); antes de pulverizar las partículas de Zn se separan filtrando a través de lana de vidrio.

e. Reactivo de Liebermann-Burchard (208,209; reacción 1 en ref. 206).

La reacción de Liebermann-Burchard empleada habitualmente para la detección y cuantificación de Δ^5 , $\Delta^{5,7}$ y Δ^7 estenoles, fue utilizada en nuestro trabajo como reactivo general para la visualización de componentes del extracto de lípidos insaponifica-

bles
nente

La
azul
escua
gris
pardo

Be
calen
fluor
leste

que a
nas y
tensa

serva
con m
de on

El
Para
drido

5 ml
nas q

f. Io

Es
la di
tract

En

bles de levadura. En efecto, sólo dos de más de veinticinco componentes detectados no son observables con este reactivo.

Los esteroides más abundantes reaccionan en frío tomando colores azul a verde. Otros compuestos reaccionan en caliente: quinonas y escualeno adquieren tonalidades violáceas; tocoferoles se tiñen de gris-negruzco; otros componentes toman tonos desde el amarillo a pardo intenso, todos observados al visible.

Bajo la iluminación ultravioleta (254 nm) se observan, luego de calentar la placa, dos grupos de sustancias: aquellas que emiten fluorescencia amarilla, comportamiento típico de ergosterol, colesterol, sus ésteres y de los esteroides citados en general y otras que absorben la luz ultravioleta, comportamiento de benzoquinonas y tocoferoles. La filoquinona exhibe fluorescencia rojiza intensa, mientras que el escualeno y acetato de tocoferol no se observan al ultravioleta. Los materiales fluorescentes se observan con mayor intensidad empleando luz ultravioleta de mayor longitud de onda (366 nm).

El reactivo se preparó inmediatamente antes de rociar la placa. Para ello se agregó 0.5 ml de H_2SO_4 concentrado a 0.5 ml de anhídrido acético a 5 °C; la mezcla se diluyó en frío, agregándola a 5 ml de etanol. Luego de pulverizar la placa y registrar las zonas que reaccionan en frío, se la calienta a 110 °C, 15 minutos.

f. Iodo (reacción 141 en ref. 206).

Este revelador general de lípidos puede ser de gran utilidad en la diferenciación y localización de algunos componentes de los extractos de lípidos insaponificables.

En efecto, hay sustancias que no fijan el iodo, la mayoría de

las presentes en los extractos; estas toman coloración transiente amarilla a marrón intenso, según la cantidad. Otras en cambio, lo fijan, es decir reaccionan con él adquiriendo coloración estable verde, marrón o rojiza. No se conoce la estructura de las sustancias del extracto que reaccionan de este modo, pero se ha observado que el ergosterol presenta esta reacción. Cromanoles y quinonas caen en el primer grupo.

Un tercer grupo de sustancias reaccionan, pero el exceso de I_2 fijado sobre ellas se volatiliza de modo que se decoloran como las del primer grupo. Sin embargo se hace evidente su reacción con I_2 al examinarlas con algún otro criterio. De especial utilidad ha sido el rociado de las placas con el reactivo de Emmerie-Engel luego de esa decoloración. El escualeno se vuelve reductor y los tocoferoles pierden su capacidad reductora. La modificación del escualeno es específica (no la mostró otro componente del extracto), puede ser tomada como reacción de detección e identificación; no ha sido descrita según nuestras noticias. Los tocoferoles se oxidan a tocoferolquinonas, lo que ha sido establecido eluyendo el material de la zona de estos compuestos luego de la exposición a vapores de iodo y efectuando su espectro ultravioleta; la oxidación es prácticamente cuantitativa.

En general el revelado con iodo se efectuó colocando la placa en una cuba saturada con vapores durante 3-5 minutos. Ocasionalmente se pulverizó sobre la capa de sílica una solución de iodo al 0.5 % en cloroformo. La única ventaja que posee este modo de revelado es la posibilidad de evitar la exposición al iodo de toda la placa, cubriendo bandas de ella con otra placa de vidrio.

Tabla 5.

SENSIBILIDAD DE LOS REACTIVOS EMPLEADOS PARA DETERMINACION

Table 5.

SENSIBILIDAD DE LOS REACTIVOS EMPLEADOS PARA DETECCION
DE CROMANOL Y QUINONAS EN CAPA DELGADA 1

Revelado	Observación ultravioleta	Observación ultravioleta con Rodamina	Emmerie		Lester		Leucosul de Milo A
			Engel	Ramserna	Ramserna	Milo A	
Ubiquinona	2	0.5	-	-	1	1	10
α-Tocoferolquinona	5	1	-	-	1	1	10
Filoquinona	0.5	-	-	-	5	5	20
α-Tocoferol	20	5	2	2	2	2	-
Ubicromenol	20	5	2	2	2	2	-
Ergosterol	5	1	-	-	-	-	-
Escualeno	-	5	-	-	-	-	-

1. Detalles experimentales en el texto.

g. Sensibilidad de los procedimientos de detección empleados.

Fue establecida sembrando alícuotas de 0.5, 1, 2, 5, 10 y 20 μg de los compuestos que se indican en la tabla 5, en líneas de 1 cm sobre capas de 0.25 mm de espesor. Las cromatografías se desarrollaron con benceno.

3. Cromatografía en capa preparativa.

Possibilidades e inconvenientes.

Se ensayó en varios solventes la separación de escualeno, oleato de colesterol, filoquinona, acetato de α -tocoferol, α -, β -, δ - y δ -tocoferoles, ubiquinona-10, ubiquinona-6, ergosterol y α -tocoferolquinona. Estos estándares fueron elegidos como representativos de las siguientes clases de compuestos: hidrocarburos, ésteres de esteroides, naftoquinonas, ésteres de tocoferoles, tri-, di- y monometiltocoles, benzoquinonas, esteroides y benzoquinonas con cadena lateral polar, respectivamente.

Entre los solventes ensayados el benceno fue el que permitió la separación de los compuestos mencionados, a excepción de β -tocoferol y δ -tocoferol que migran juntos. La posición de los estándares puede observarse en las figuras 8 y 9. Los demetiltocoles migraron a zonas diferenciadas en éter hexano-isopropílico (8:2), pero éste solvente no separa todos los compuestos ensayados.

Empleando capas de 1 a 2 mm de espesor y benceno como fase móvil, fue posible el fraccionamiento del extracto de lípidos de la levadura en escala preparativa.

La separación lograda de componentes de extractos de lípidos insaponificables solubles en metanol (ILE) provenientes de levadura

ra d
E
nas
lar
sarm
nas
a 25.
gel
resce
color
Co
se ha
exami
De
yeron
tocof
 α -to
llaba
tural
To
de ma
leta
La
do de
togram
fectue
insape
de líq

ra de panadería comercial, puede observarse en la figura 8.

En la figura 8 se indica en bandas verticales sucesivas, las zonas o manchas que se observan bajo la luz visible luego de revelar con los reactivos de Liebermann-Burchard (LB), de Lester-Ramersma (LR) y Emmerie-Engel (EE). En la figura 9 se indican las zonas diferenciadas luego de observar con luz ultravioleta filtrada a 254 nm y revelar a continuación con el reactivo de Emmerie-Engel (UV-EE). Dentro de cada zona se señala el color de la fluorescencia en el caso de observación con luz ultravioleta o los colores al visible en los otros casos.

Con estos procedimientos de observación han podido distinguirse hasta veinte compuestos (zonas diferenciables) en el extracto examinado.

De las placas sembradas con el extracto insaponificable se eluyeron zonas que podrían contener tocoferolquinonas (zona A), δ -tocoferol (zona B), γ y β -tocoferoles y ubiquinonas (zona Q) y α -tocoferol (zona α). También se eluyó una zona en la que se hallaba una sustancia reductora de R_f mayor que el tocoferol, de naturaleza desconocida (zona D).

Todas estas zonas se indican en la figura 9. La distribución de masa en el cromatograma, los máximos de absorción al ultravioleta y el $SE \frac{1}{\lambda_{\text{máx}}}$ de cada fracción, figuran en la tabla 6.

La cromatografía en capa preparativa es un procedimiento rápido de fraccionamiento del extracto. El desarrollo de cada cromatograma no lleva más de 40 min. Si bien el sembrado debe ser efectuado cuidadosamente, el fraccionamiento inicial del extracto insaponificable proveniente de 500 gch de levadura (400 a 750 mg de lípidos; unas 4 a 8 placas de 2 mm), puede ser efectuado en

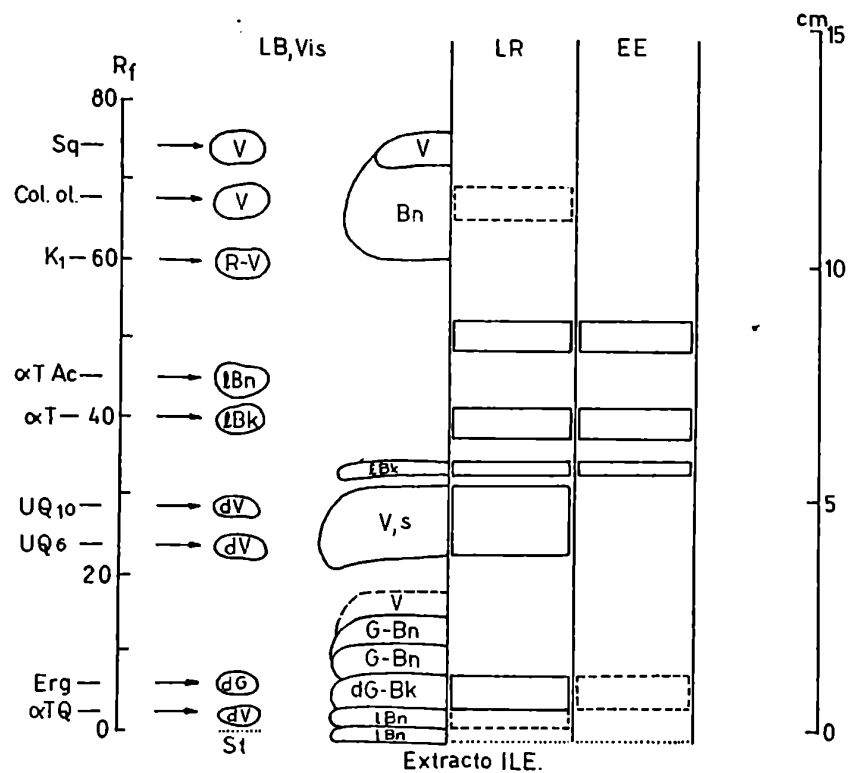


Figura 8. Cromatografía en capa preparativa, de lípidos insaponificables de levadura de panadería comercial.

Capa: 2mm. Solvente: benceno.

Muestras sembradas. St: mezcla de estándares; incluye los siguientes compuestos: α -tocoferol (α T), escualeno (Sq), oleato de colesterol (Col. ol.), filoquinona (K₁), acetato de α -tocoferol (α TAc), ubiquinona-6 (UQ₆), ubiquinona-10 (UQ₁₀), ergosterol (Erg) y α -tocoferolquinona (α TQ). Extracto ILE: extracto de lípidos insaponificables parcialmente libre de esteroides, 8 mg/cm.

Procedimientos de observación. LB, Vis: rociado con el reactivo de Liebermann-Burchard, observación bajo luz blanca. LR: revelado con reactivo de Lester-Ramasarma. EE: rociado con el reactivo de Emmerie-Engel.

Los colores distinguidos con los procedimientos de observación se indican con las abreviaturas empleadas en la figura 9. Las zonas apenas perceptibles se señalan enmarcadas con líneas de trazos.

Figura
fic

Capa:
Mater
Inclu
ILE c
Proce
(254
Los-c
viatu

dE
LE
Le le
es in
tenci
Mater

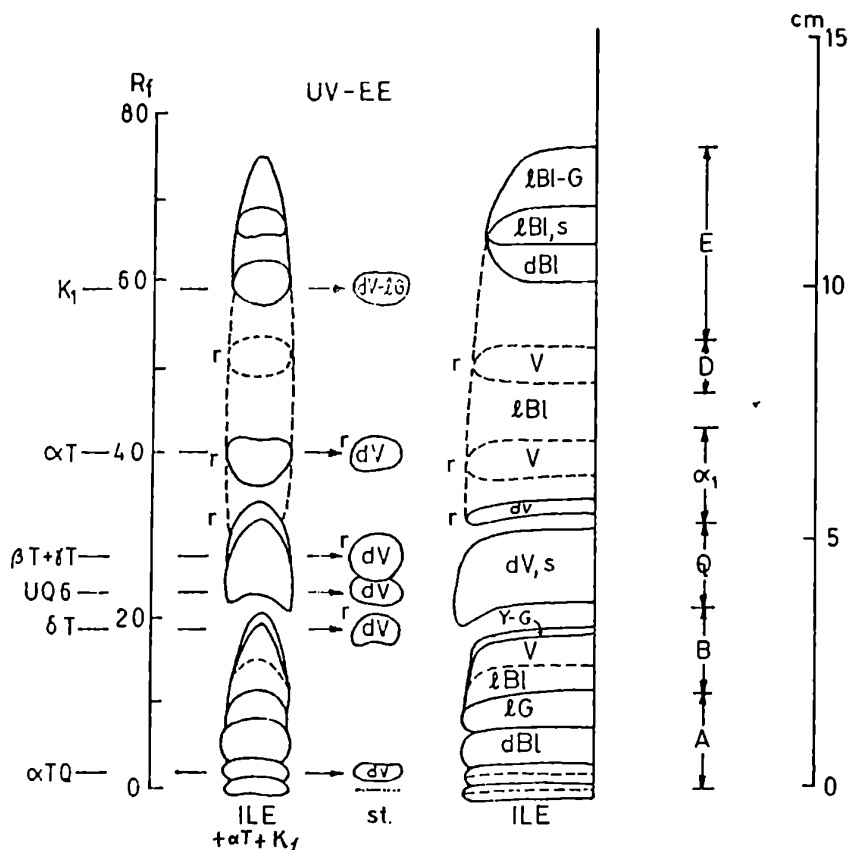


Figura 9. Fracciones separadas del extracto de lípidos insaponificables de levaduras por cromatografía en capa preparativa.

Capa: 2 mm. Solvente: benceno.

Materiales sembrados. ILE y St: los mismos que en la figura 8 (se incluyen β -, γ - y δ -tocoferoles (β T, γ T y δ T)). ILE + α T + K1: ILE con agregado de α -tocoferol y filoquinona.

Procedimiento de observación: iluminación con luz ultravioleta (254 nm) seguida de rociado con el reactivo de Emmerie-Engel.

Los colores observados al ultravioleta se indican con las abreviaturas siguientes:

dV: violeta oscuro	dG: verde oscuro	lBn: beige
V: violeta	G: verde	Bn: marrón
dBl: azul	lG: verde claro	R: rojo
lBl: celeste	Y: amarillo	lBk: negruzco

La letra s colocada luego de la abreviatura del color indica que es intenso. La letra r a la izquierda de cada zona indica las sustancias reductoras del reactivo de Emmerie-Engel.

Materiales eluidos: fracciones A, B, Q, α_1 , D y E.

Tabla 6.

CARACTERISTICAS DE FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFIA EN
CAPA PREPARATIVA

Se sembraron 381 mg de inseparables "libre de esteroides" (ILE) provenientes de 110 gcs, en cuatro placas de sílice de 2 mm de espesor. Se cromatografió en benceno. La sílice de las zonas indicadas en la figura 9 se eluyó con 5 volúmenes de etanol. Se pesó el material seco eluído de cada una de ellas y se determinó su espectro de absorción entre 220 y 350 nm.

Zona	A	B	Q	1	D	E	86
Masa eluída (% del lípido sembrado)	39	23	7	4	9	6	
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	265(sh), 272 281, 292	265(sh), 272 281, 292	272	272	279	265(sh), 272 282, 294	
$SE_{\lambda_{\text{máx}}}$ ($10^3/\text{g}$)	190	43	690	6	14	163	

cinco
togra
alred
La
de d
60 mg
termin
lugar
los c
retien
apreci
A
la cre
sufici
tros d
trezas
motivo
pidos
el ins
En
tros r
menol,
bles (
m toco
La
ción d
en el
llos

cinco horas (sembrado, desarrollo, revelado y registro del cromatograma, separación de la sílica). La elución de la sílica lleva alrededor de seis horas.

La recuperación de α -tocoferol es satisfactoria. De una mezcla de α -tocoferol (60 μg) con extracto insaponificable (ILE, 60 mg), se recuperó el $90\% \pm 2\%$ del tocoferol agregado (5 determinaciones). Los resultados mencionados permiten concluir sin lugar a dudas que, en las condiciones descritas, la ubiquinona, los componentes del extracto insaponificable o la sílica gel, no retienen el α -tocoferol y que éste no se descompone en cantidad apreciable en la separación cromatográfica.

A pesar de su rapidez y de la buena recuperación de tocoferol, la cromatografía en capa preparativa resultó un procedimiento insuficiente para el fraccionamiento de extractos de lípidos neutros de hongos con vistas al aislamiento de componentes a nivel de trazas, como es el caso de cromonoles y quinonas isoprenoides. El motivo de esta insuficiencia reside en el gran exceso de otros lípidos y su variedad, aun en extractos de los que se ha separado el insoluble en metanol.

En efecto, en levadura de panadería comercial habría según nuestros resultados alrededor de 1 μg de α -tocoferol, 2 μg de ubicromenol, 50 μg de ubiquinona, en 4 a 8 mg de extractos insaponificables (ILE) por gcs. Es decir, en el mejor de los casos una relación m tocoferol: m ubicromenol: m ubiquinona: m ILE = 1:2:50:4000.

La complejidad del extracto lleva a una considerable superposición de sustancias. La baja proporción de tocoferoles y quinonas en el extracto hace difícil separar estos compuestos de aquellos más abundantes que migran a igual posición. La detección,

y con más razón el aislamiento de α -tocoferol y tocoferolquinonas, es prácticamente imposible en razón del gran exceso de estos roles presentes en las zonas A y B. También es engorroso el aislamiento del compuesto reductor de la zona D y la separación de β - y δ -tocoferoles de ubiquinona -6.

4. Cromatografía en columna.

Posibilidades e inconvenientes.

Frente a las dificultades mencionadas se resolvió ensayar la cromatografía en columna para el fraccionamiento inicial del extracto de lípidos.

La cromatografía en columna ofrece perspectivas interesantes para el análisis de trazas. Su mayor capacidad de resolución y la elución selectiva, dadas por la posibilidad de modificar gradualmente la polaridad del eluyente, la hacen adecuada para el fraccionamiento de materiales que difieren considerablemente en el contenido de sus distintos componentes.

El uso de columnas de alúmina y la elución de los lípidos con mezclas de éter etílico y éter de petróleo o hexano, procedimiento desarrollado por Morton y col. (210), es el sistema preferido para la cromatografía de compuestos isoprenoides por investigadores ingleses (27,211).

Si bien la separación de los distintos compuestos es excelente, hay referencias contradictorias en la literatura acerca de la estabilidad de quinonas sobre éste adsorbente. Según algunos autores la vitamina K es destruida en gran cantidad (180) y la ubiquinona lo es parcialmente (178, 180); otros en cambio aseguran

haber
quinon
Dad
quinon
que oc
cromat
tar co
ción d
los co
tad pr
inicial
pleo de
solvent
Si l
do para
sejado
tenido
ción (1
isopren
y Sturm
rol en
La s
la fact
para el
Es p
de una
-6 y ve
Aplic

haber obtenido recuperación cuantitativa de ubiquinona, tocoferol quinona y vitamina K_1 (27).

Dada la falta de criterio uniforme acerca de la estabilidad de quinonas en alúmina y después que ensayos preliminares mostraron que ocurrían pérdidas considerable de α -tocoferol cuando se lo cromatografiaba sobre Decalso y Florisil, se decidió experimentar con ácido silícico como adsorbente junto al sistema de elución de la escuela inglesa (27,210), para el fraccionamiento de los componentes del extracto de lípidos de levaduras. La dificultad principal con columnas de ácido silícico, su reducido caudal inicial y su progresivo "tañonamiento", se superaron con el empleo de material con tamaño de grano uniforme y, en la elución, solventes anhidros.

Si bien el ácido silícico no ha sido el adsorbente más utilizado para el análisis de tocoferoles y quinonas, su uso se ha aconsejado para materiales con un amplio rango de variación en el contenido de lípidos (178,191) y por su mayor capacidad de resolución (178). No se hallaron referencias de destrucción de lípidos isoprenoides sobre sílice. Esta técnica fue empleada por Skinner y Sturm (51) para sus estudios sobre la presencia de α -tocoferol en levaduras.

La separación y recuperación de estándares (tabla 7), muestran la factibilidad de la cromatografía en columna de ácido silícico para el análisis de compuestos isoprenoides.

Es posible aislar α -tocoferol, tocoferolquinona y vitamina K_1 de una mezcla que contiene diez veces más escualeno y ubiquinona-6 y veinte veces más de ergosterol, casi cuantitativamente.

Aplicada al fraccionamiento de lípidos insaponificables de le-

y con más razón el aislamiento de α -tocoferol y tocoferolquinonas, es prácticamente imposible en razón del gran exceso de estos roles presentes en las zonas A y B. También es engorroso el aislamiento del compuesto reductor de la zona D y la separación de β - y δ -tocoferoles de ubiquinona -6.

4. Cromatografía en columna.

Posibilidades e inconvenientes.

Frente a las dificultades mencionadas se resolvió ensayar la cromatografía en columna para el fraccionamiento inicial del extracto de lípidos.

La cromatografía en columna ofrece perspectivas interesantes para el análisis de trazas. Su mayor capacidad de resolución y la elución selectiva, dadas por la posibilidad de modificar gradualmente la polaridad del eluyente, la hacen adecuada para el fraccionamiento de materiales que difieren considerablemente en el contenido de sus distintos componentes.

El uso de columnas de alúmina y la elución de los lípidos con mezclas de éter etílico y éter de petróleo o hexano, procedimiento desarrollado por Morton y col. (210), es el sistema preferido para la cromatografía de compuestos isoprenoides por investigadores ingleses (27,211).

Si bien la separación de los distintos compuestos es excelente, hay referencias contradictorias en la literatura acerca de la estabilidad de quinonas sobre éste adsorbente. Según algunos autores la vitamina K es destruida en gran cantidad (180) y la ubiquinona lo es parcialmente (178, 180); otros en cambio aseguran

haber obtenido recuperación cuantitativa de ubiquinona, tocoferol quinona y vitamina K₁ (27).

Dada la falta de criterio uniforme acerca de la estabilidad de quinonas en alúmina y después que ensayos preliminares mostraron que ocurrían pérdidas considerable de α -tocoferol cuando se lo cromatografiaba sobre Decalso y Florisil, se decidió experimentar con ácido silícico como adsorbente junto al sistema de elución de la escuela inglesa (27,210), para el fraccionamiento de los componentes del extracto de lípidos de levaduras. La dificultad principal con columnas de ácido silícico, su reducido caudal inicial y su progresivo "tapeamiento", se superaron con el empleo de material con tamaño de grano uniforme y, en la elución, solventes anhidros.

Si bien el ácido silícico no ha sido el adsorbente más utilizado para el análisis de tocoferoles y quinonas, su uso se ha aconsejado para materiales con un amplio rango de variación en el contenido de lípidos (178,191) y por su mayor capacidad de resolución (178). No se hallaron referencias de destrucción de lípidos isoprenoides sobre sílice. Esta técnica fue empleada por Skinner y Sturm (51) para sus estudios sobre la presencia de α -tocoferol en levaduras.

La separación y recuperación de estándares (tabla 7), muestran la factibilidad de la cromatografía en columna de ácido silícico para el análisis de compuestos isoprenoides.

Es posible aislar α -tocoferol, tocoferolquinona y vitamina K₁ de una mezcla que contiene diez veces más escualeno y ubiquinona-6 y veinte veces más de ergosterol, casi cuantitativamente.

Aplicada al fraccionamiento de lípidos insaponificables de le-

Tabla 7.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE COMPUESTOS TERPENOIDES

Se cromatografió por duplicado una mezcla de 50 μ g de α -tocoferol, filoquinona y α -tocoferolquinona con 500 μ g de escualeno y ubiquinona-6 y 1 mg de ergosterol, en 5 g de ácido silícico. Se eluyó con mezclas de éter etílico en hexano de polaridad creciente. En las fracciones eluidas se determinó esos compuestos espectrofotométricamente (excepto escualeno) (ver p116). Se indica la recuperación media de los compuestos ensayados, con cada eluyente.

Eluyente éter etílico-hexano (%)	Sustancias eluidas	Recuperación (%)
0.25	escualeno	nd ¹
	filoquinona	85
1	-	-
3	α -tocoferol	97
5	ubiquinona-6	98
10	-	-
15	ergosterol	98
20	α -tocoferolquinona	93
100	-	-

1.nd: no determinado.

vadura, solubles en metanol (extracto ILE, inseaponificable parcialmente libre de esteroides), resultó un procedimiento eficaz para la separación de clases de lípidos.

Las figuras 10 y 11 muestran como procede la elución de una columna de ácido silícico (50 g) sembrada con extracto ILE (765 mg, disueltos en 50 ml de hexano), provenientes de levadura de panadería comercial (250 gcs). La columna fue eluida con 2 x 200 ml de 0.25 % y 1 % EH; con 3 x 200 ml de 3 % EH; con 4 x 100 ml de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 % y 100 % EH; y finalmente con 2 x 100 ml de metanol. Se determinó el peso seco y el espectro de absorción ultravioleta de cada fracción. Tres alícuotas de cada una de ellas se cromatografiaron en capa delgada; las fracciones eluidas con 0.25 %, 1 % y 3 % EH fueron cromatografiadas en benceno y las eluidas con los solventes restantes lo fueron en benceno-éter etílico (85:15). En cada fracción se detectaron compuestos reductores, quinonas y esteroides como se indicó en p.74.

En la figura 10 se observa como varía la masa eluida (%) en cada fracción separada (33 en total) en función del volumen de eluyente recogido (curva a), y la variación de absorción al ultravioleta (expresada como $SE \frac{1\%}{265 \text{ nm}}$) a medida que progresa la elución (curva b). La figura 11 es copia de la cromatografía en capa delgada de la primera y última fracción eluida con cada mezcla, efectuada a efectos de establecer cuales eran los componentes de cada fracción y para localizar en ellas los compuestos de interés.

El aspecto físico, la masa eluida por cada eluyente y otras propiedades de las fracciones, se indican en la tabla 8.

El α -tocoferol, compuesto E, es eluido por hexano con 3 % de éter etílico; el mismo solvente eluye también otra sustancia re-

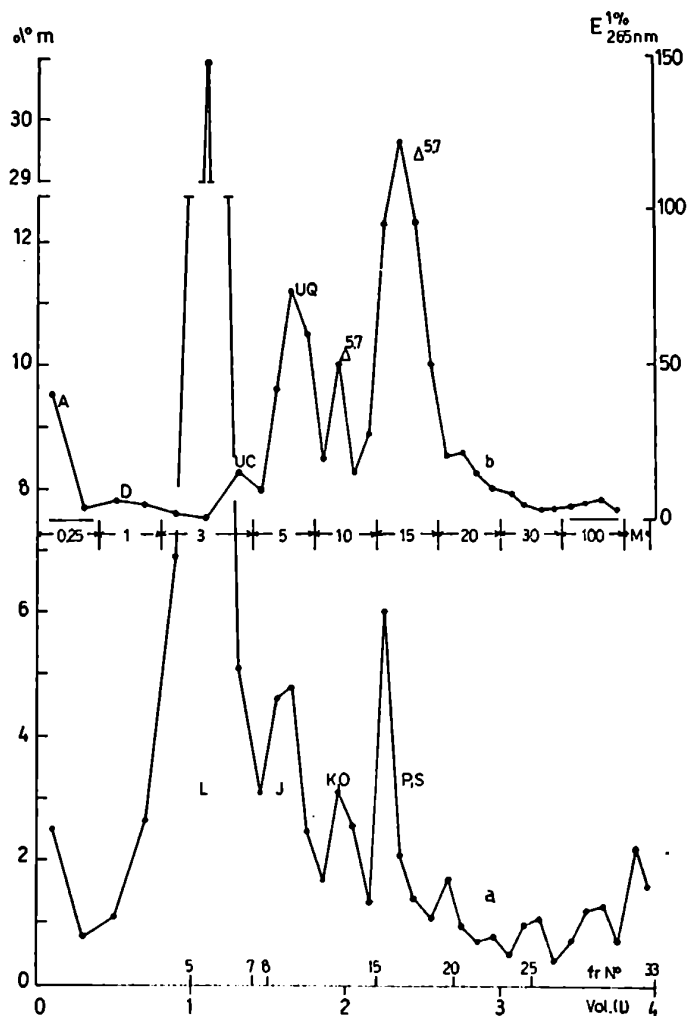


Figura 10. Fraccionamiento del extracto de lípidos insaponificables de levadura de panadería comercial, por cromatografía en columna.

Detalles experimentales en el texto.

Curva a: masa (porcentaje de la masa de lípidos sembrada) eluida en cada fracción.

Curva b: absorción específica de cada fracción a 265 nm.

Abreviaturas. 0.25, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 y 100 : porcentaje de éter etílico en hexano en las soluciones empleadas para elución. M: metanol. A, D, L, J, UC, K, O, P, S : componentes del extracto (ver figura 11) a los que se atribuyen los picos de elución detectados. UC, UQ, Δ^{5-7} : componentes que presentan curvas de absorción en el ultravioleta características de ubiquinona, ubiquinona y estercoles Δ^{5-7} diénicos, respectivamente.

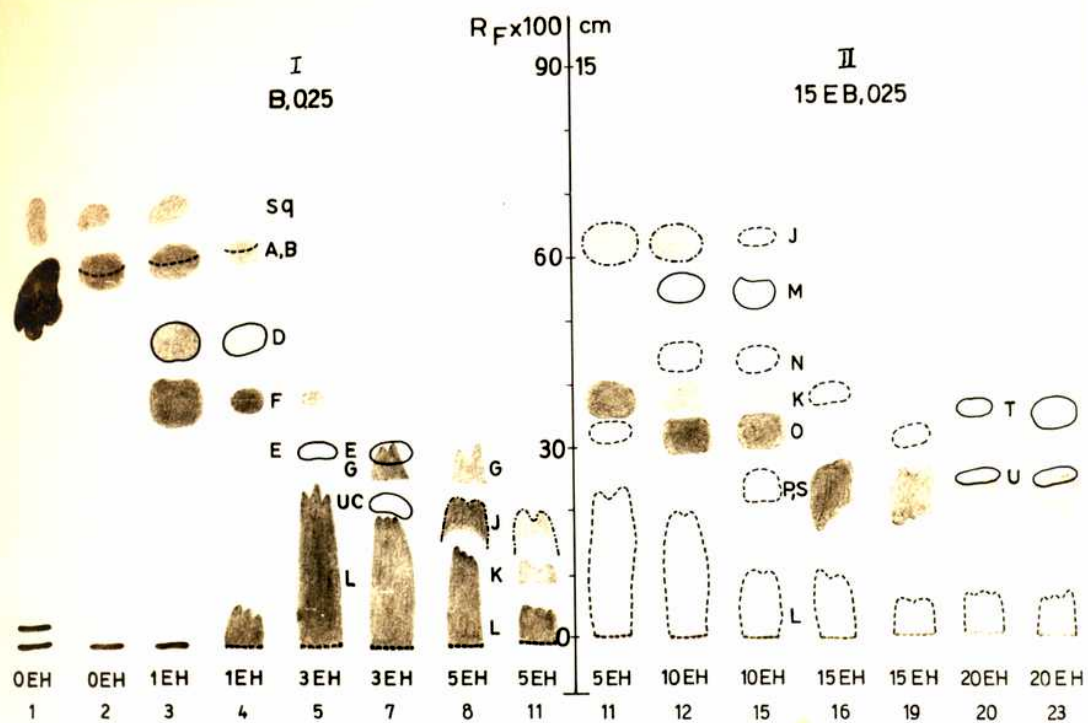


Figura 11. Cromatografía en capa delgada de las fracciones eluidas durante la cromatografía en columna, de lípidos insaponificables de levadura de panadería comercial.

Capa: 250 μ m. Solventes: I, benceno; II, benceno-éter etílico (85:15). Materiales sembrados: primera y última fracción recogida con cada uno de los eluyentes empleados en la cromatografía descrita en la p. 91, 600 μ g. Los números 1 a 23 identifican las fracciones y las abreviaturas 025 EH a 20 EH el porcentaje de éter etílico en hexano con que fueron eluidas.

Procedimientos de observación: una placa se reveló con el reactivo de Emmerie-Engel y otra, con las mismas muestras, con el reactivo de Lester-Ramasarma; ambas fueron rociadas con el reactivo de Liebermann-Burchard a continuación y fotocopiadas.

Las sustancias que reaccionaron con el reactivo de Emmerie-Engel se indican circunvaladas con una línea llena. La sustancia J reaccionó con el reactivo de Lester-Ramasarma. Las zonas apenas perceptibles con el reactivo de Liebermann-Burchard se señalan enmarcadas con líneas de trazos.

A a U, designación arbitraria asignada a las sustancias detectadas en las distintas fracciones.

Tabla 8.

CARACTERÍSTICAS DE FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA 1

% EH	Fracción Nº	Aspecto	m (mg)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	SE $\lambda_{\text{máx}} \cdot 10^3$ (1/ gcs)	Reacciones de		
						EE	LR	LB
0.25	1 y 2	Aceite incoloro, denso	42	230	1300	-	-	+
1	3	Aceite incoloro	30	282	200	-	-	+
	4	Sólido frasco, amarillo débil		279	32	+	+	-
3	5	Sólido blanco gelatinoso	342	272	13	+	+	-
	6 y 7	Aceite incoloro		siné		+	+	-
5	8 a 11	Aceite amarillo, denso	119	275	240	-	+	+
10	12	Aceite amarillo	68	275		-	+	+
	13 a 15	Aceite incoloro		265, 272	160 ⁴	-	+	-
				281, 295				

Tabla 8 (continuación)

% E H	Fracción Nº	Aspecto	m (mg)	λ máx (nm)	SE λ máx (1/écs)	$1\% \lambda$ máx $\cdot 10^3$	Reacciones de	
							EE LR	LB
15	16 a 19	Sólido blanco graso	85	265,272 281,295	440 ⁴	-	-	+
20	20 21 a 23	Sólido blanco graso Aceite incoloro	32	sma	nd ⁵	+	-	+
30	24 a 27	Aceite incoloro	23	sma	nd	-	-	+
100	28 a 31	Aceite amarillo	31	sma	nd	-	+	+
M	32 y 33	Sólido blanco y aceite amarillo	31	sma	nd	-	+	+

95

1. Detalles experimentales en p.
2. EE: Emmerie-Engel. LR: Lester-Ramasarma. LB: Liebermann-Burchard.
3. sma: sin máximos de absorción.
4. a 261 nm.
5. nd: no determinado.

ductora, UC. En las fracciones eluidas con 3 % EH se encuentra el 43 % de la masa de lípidos sembrada; dicha masa corresponde casi exclusivamente al compuesto denominado L. La absorción ultravioleta del material eluido con 3 % EH es despreciable; no se observa el máximo de absorción ultravioleta característico de los tocoferoles.

Un compuesto (K), que migra en capa delgada con igual R_f que α -tocoferolquinona, eluye de la columna de sílice con 5 % y 10 % EH, mientras que la quinona lo hace con 20 % EH. Las fracciones eluidas con 20 % EH no absorben al ultravioleta; ello indica que la masa de tocoferolquinona en las fracciones sería muy reducida, tanto como para que no se detecten sus máximos de absorción.

La ubiquinona-6, compuesto J, es eluida por 5 % EH. Otras dos quinonas, H e I, eluyen hacia fines del pasaje de 3 % EH y comienzos de la elución con 5 % EH, respectivamente. Se detectan sustancias reductoras del reactivo de Emmerie-Engel, distintas de tocoferoles y la llamada UC, en los eluidos con 1 % EH (compuesto D), 10 % EH (compuesto M) y 20 % EH (compuestos T y U); las tres últimas a nivel de trazas.

Se estima de que la cromatografía en columna de sílice es más adecuada que la cromatografía preparativa en capa de sílice para el fraccionamiento de extractos de lípidos de hongos. La separación y recuperación de α -tocoferol, α -tocoferolquinona, ubiquinona-6 y ergosterol, es prácticamente total. Las fracciones eluidas de la columna contienen menos componentes que las eluidas de capa preparativa. Los valores de $SE \frac{1}{\lambda_{m\acute{a}x}}$ muestran que en general la concentración de material absorbente al ultravioleta en las primeras es 2 o más veces mayor que en las segundas. La única

excepción a esta generalización son las fracciones que contienen ubiquinona; esta se encuentra casi tres veces más pura en la fracción Q (figura 8) que en las fracciones eluidas con 5 % EH (tablas 6 y 8). Esto se atribuye a la presencia de la sustancia L en las fracciones eluidas de la columna, lo que no ocurre con las eluidas de la capa preparativa. La mayor concentración y menor variedad de contaminantes en las fracciones eluidas de columna, permite la detección y hasta el dosaje sin interferencias de algunos componentes del extracto.

La separación de compuestos que migren con el mismo R_f que α -tocoferolquinona, es total, pues aquellos eluyen con 10 % EH, mientras que la tocoferolquinona eluye con 20 % EH. El ubicromenol y la ubiquinona eluyen con solventes de distinta polaridad, por lo que puede aislárselos sin que uno este contaminado con el otro.

A pesar que el tiempo requerido para fraccionar un extracto por cromatografía en columna es 4 o 5 veces mayor que el necesario para efectuarlo por cromatografía en capa preparativa, se piensa que la cromatografía en columna es más conveniente en razón del fraccionamiento más completo que se logra. Basta imaginar los compuestos de la figura 11 mezclados y corridos en una sola placa para apreciarlo.

D. AISLAMIENTO DE TOCOFEROLES Y QUINONAS CROMATOGRAFICAMENTE PUROS.

La cromatografía en columna o la preparativa en capa, si bien llevan quizás al mayor enriquecimiento de una sustancia en una frac

ción dada alcanzable con un único paso analítico, no permiten obtener fracciones cromatográficamente puras. Es por ello que antes de la identificación y/o determinación de algunas sustancias de interés, fue necesario separarlas de aquellas que pudieran interferir en la aplicación del método seleccionado.

De los eluidos de cada zona de las cromatografías preparativas en capa o de los eluidos provenientes de las columnas, se aislaron y purificaron clases de compuestos isoprenoides, cromatográficamente puros: naftoquinonas, mono-, di-, y tri-metil tocoles, ubiquinonas, esteroides, quinonas y sustancias reductoras no identificadas. En la figura 12 se resumen los procedimientos de extracción, fraccionamiento y purificación compilados para aislar cromonoles y quinonas cromatográficamente puros.

La fracción α_1 (aislada por cromatografía preparativa en capa) y la fracción 3 % EH (eluida de columnas de ácido silícico) contienen dos sustancias reductoras. La de mayor R_f , α_2 , coincidente con el del α -tocoferol, fue separada de la otra en benceno. La que migra por debajo del α -tocoferol fue aislada e identificada como ubicromenol (UCL)

La cromatografía de α_2 en benceno:metanol (98:2) permitió obtener un producto α_{TL} incoloro, que reacciona con el reactivo de Emmerie-Engel y absorbe al ultravioleta sobre placa, prácticamente libre de un material con fluorescencia celeste que lo acompañaba en otros solventes.

Las fracciones α_1 o 3 % EH fueron purificadas en algunas ocasiones por cromatografía en fase gaseosa. Para ello se empleó 3 % SE-30 como fase estacionaria (ver p. y). Empleando el detector

de ionización por llama se estableció con α -tocoferol estandar el intervalo de tiempo durante el cual eluía ese compuesto en las condiciones cromatográficas fijadas. A continuación se conectó la columna al detector de conductividad térmica y se recogió "a cie-
ga" y condensó el material eluido en el intervalo determinado. El tubo colector se lavó con etanol y la presencia de α -tocoferol en la solución fue establecida con los procedimientos analíticos que se describen en el capítulo V.

La presencia de α -tocoferolquinona en el extracto insaponificable fraccionado por cromatografía en capa preparativa se sospechó pues la zona A (figura 9) mostraba una clara reacción positiva para quinonas (figura 8). El revelado con otros reactivos (I_2 , $StCl_3$, Rodamina 6G), indicó que en la zona A se hallaba una considerable variedad de compuestos. El 39 % del extracto (en masa) se halló en esta zona (tabla 6). El principal compuesto es un material designado L (figura 11) que se extiende desde el origen hasta el borde con fluorescencia amarillo verdosa ($R_f = 20$ en la figura 9) y que cuando la placa se sobrecarga puede extenderse hasta el centro de la banda de ubiquinona.

Estos hechos hicieron que el aislamiento de una posible quinona con R_f de α -tocoferolquinona desde la fracción A, obtenida por cromatografía en capa preparativa, fuera engorroso. No se hallaron solventes del todo satisfactorios para separarla de los otros compuestos.

El eluido con 20 % EH de la cromatografía en columna no contiene la variedad (figura 11) ni la masa de lípidos presentes en la fracción A aislada por cromatografía en capa preparativa (tablas 6 y 8), lo que permitió aislar un material α -TQ mucho más puro,

Figura 12.

Notas

- (1). D, 1, Q, B y A : fracciones eluidas de cromatoplasas preparativas (ver figura 8 y tabla 6).
- (2). 1 EH, 3 EH, 5 EH, 20 EH : fracciones eluidas de columnas de ácido silícico con 1, 3, 5 y 20 % de éter etílico en hexano (ver figura 10 y tabla 8).
- (2). Primera purificación de las fracciones anteriores por cromatografía en capa delgada (CCD). Solventes: 40 EH, hexano-benceno (6:4); C, cloroformo; 2 MB, benceno-metanol (98:2) 15 EB, benceno-éter etílico (85:15).
- (3). Fracciones eluidas de la capa anterior, aún no cromatográficamente puras. D₂, material reductor no identificado de mayor R_f que α -tocoferol. α_2 , UC, $\beta\delta T_2$, δT_2 y αTQ_2 , materiales que migran a igual posición que α -tocoferol, ubicromenol, β -tocoferol + δ -tocoferol, δ -tocoferol y α -tocoferolquinona respectivamente.
- (4). Segunda purificación en capa delgada. Solventes: 20 HB, benceno-hexano (80:20); B 2x, desarrollo unidimensional, repetido dos veces en benceno; 5 MB, benceno-metanol (95:5).
- (5). Fracciones cromatográficamente puras en las que se encontrarían los compuestos indicados. DL, material reductor de mayor R_f que α -tocoferol.

(1) D y B

(2) CCD:

(3)

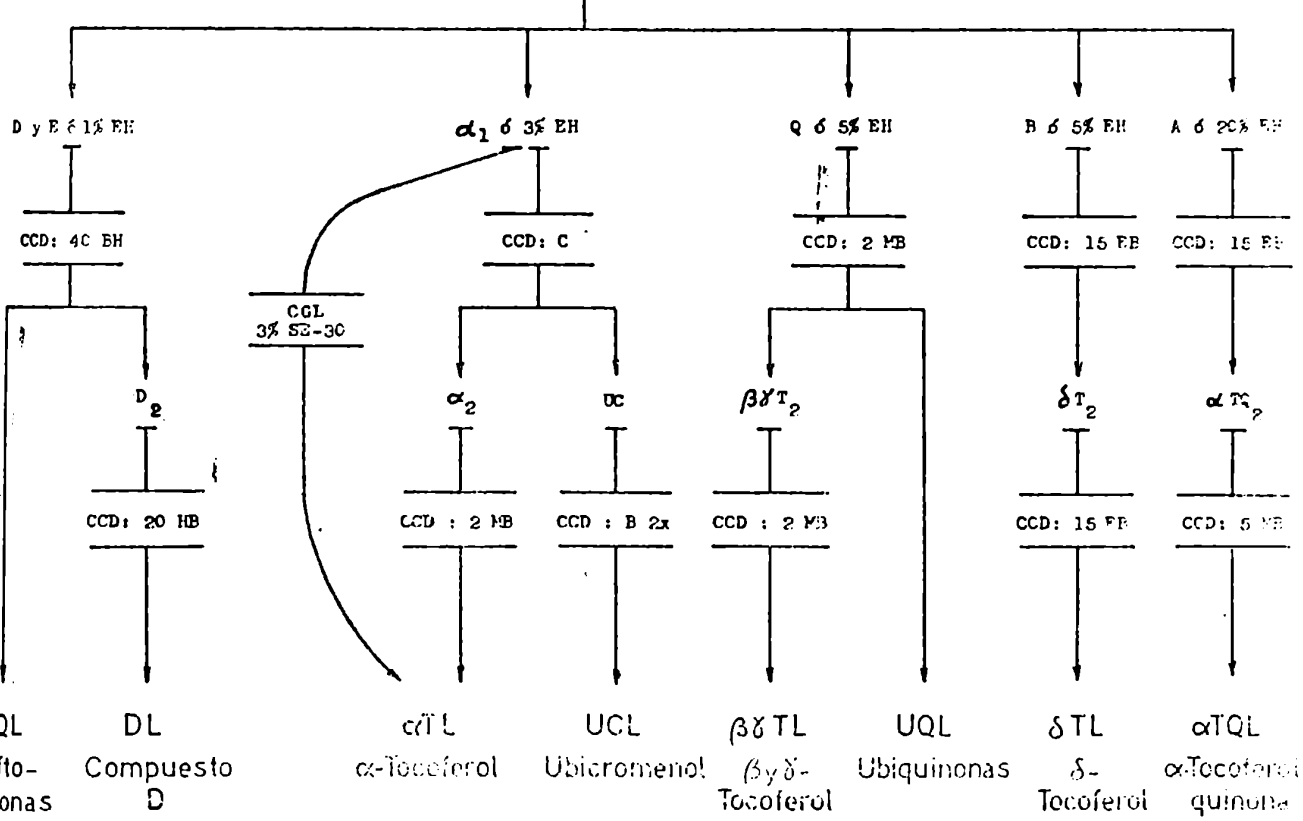
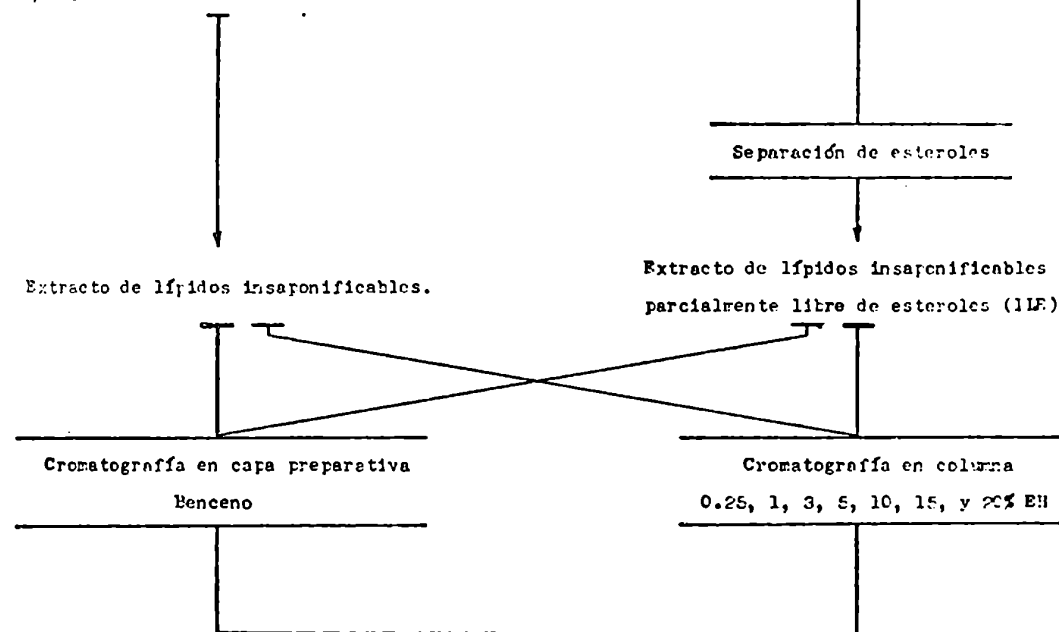
(4)

(5) NQL
Nafto-
quinonas

DE LA VITAMINA DE LA FABRICA COMERCIAL

Extracción de células húmedas ($m \leq 100$ g)
con etanol y etanol-éter etílico.
Partición del extracto con isooctano.
Saponificación del soluble en isooctano.

Saponificación de células húmedas
($m > 100$ g).
Extracción con éter etílico.



en el que debía hallarse α -tocoferolquinona. Este material es incoloro, no absorbe al ultravioleta, no da reacciones de quinonas y tampoco reacciones con I_2 .

En la fracción B (figura 9) o en los eluidos con 3 y 5 % EH, no se observó sustancia reductora que migrara con R_f de α -tocoferol. A pesar de ello fueron examinados ante la posibilidad de que este compuesto pudiera hallarse en el extracto a una concentración muy baja como para ser detectado. A fin de concentrarlo, los eluidos citados fueron cromatografiados dos veces en benceno:éter etílico (98:2), solvente que separa completamente α -tocoferol de ubiquinona. Después de la segunda cromatografía se aisló un material incoloro que absorbe al ultravioleta sobre la placa, que da sobre ella una reacción de Emmerie-Engel muy débil y que reacciona fugazmente con I_2 . Se lo designa α TL. Está contaminado con una sustancia fluorescente; no se intentó continuar su purificación más allá de éste punto por la escasa cantidad de material que se logró reunir.

Se intentó aislar β - y δ -tocoferoles de la zona Q (figura 9) y de los eluidos con 3 y 5 % EH. El solvente que dió la separación más satisfactoria de estos tocoferoles y ubiquinona-6 fue benceno:metanol (98:2). Con el se efectuaron dos cromatografías sucesivas de eluidos de zonas a donde migraba la mezcla de dimetiltocoles, eluyéndose finalmente un material $\beta\delta$ TL. Es incoloro, no absorbe al ultravioleta, no reacciona con el reactivo de Emmerie-Engel sobre placa o con I_2 .

Se examinó la presencia de naftoquinonas (filoquinona) en el eluido de las zonas E de la cromatografía preparativa en capa y

en el obtenido con 1 % EH de las columnas de ácido silícico. El material que migraba con R_f de filoquinona fue separado de otros presentes en esas fracciones por cromatografía en capa delgada en hexano:benceno (6:4) y designado NQL. Es fluorescente al ultravioleta (azul), no da reacciones de quinonas ni muestra la fluorescencia roja característica de filoquinona cuando se revela con el reactivo de Liebermann-Burchard.

En el eluido de las columnas de ácido silícico con 1 % EH se detectó un material reductor del reactivo de Emmerie-Engel (compuesto D, figura 11) que migra con mayor R_f que α -tocoferol y debajo de filoquinona en capa delgada (figura 9). Este compuesto fue purificado por cromatografía en capa delgada en hexano:benceno (6:4) y benceno:hexano (8:2). El material así purificado se designó DL. Absorbe al ultravioleta, no da reacciones de quinonas ni de Liebermann-Burchard.

Aunque no se indica en la figura 12, puede señalarse aquí que el isómero estructural del α -tocoferol (XIV c o d) eluiría con 0.25 % EH y separaría de filoquinona en capa delgada desarrollada con hexano:benceno (6:4). Los prenil-fenoles (XV) y prenil-metoxifenoles (XVI) se hallarían en las fracciones D y E provenientes de capa preparativa o en los eluidos con 1 % EH y 3 % EH de las columnas de ácido silícico. Los dímeros y trímeros de α -tocoferol eluyen con 3 % EH y podrían encontrarse en la zona D. Las quinonas XVII y XVIII se hallarían en la fracción Q o eluirían de las columnas de sílice con 5 a 8 % EH (ver p. 111).

Los estudios efectuados con materiales obtenidos de levadura de panadería comercial se describen en p. 120 y siguientes.

E. RECUPERACION DE TOCOFEROL Y UBIQUINONA
CON LOS PROCEDIMIENTOS ANALITICOS EMPLEADOS.

La recuperación de α -tocoferol de una mezcla de lípidos en la que se encontraba en una relación 1:1000, fue $90 \pm 2 \%$ cuando se lo separó de ella por cromatografía en capa. Se recuperó el 97 % del α -tocoferol presente en una mezcla de estándares en una relación 1:43, cuando se lo aisló de ella por cromatografía en columna. Estos datos señalan la estabilidad del α -tocoferol en las condiciones cromatográficas empleadas y su no retención por los lípidos de la mezcla.

Ante la no detección de tocoferol en algunos lotes de levadura, se determinó la recuperación final de tocoferol y ubiquinona exógenos luego de aplicar las secuencias de operaciones para el aislamiento de estos compuestos esquematizadas en la figura 12.

A tres lotes de levadura, equivalentes a 5 gcs, se agregó 20 μg de α -tocoferol y 200 μg de ubiquinona-6. Uno de ellos se extrajo por saponificación de las células húmedas (procedimiento V); tocoferol y ubiquinona fueron aislados mediante cromatografía en columna seguida de cromatografía en capa delgada de las fracciones eluidas con 3 y 5 $\frac{1}{2}$ EH. Los otros dos lotes fueron extraídos con etanol y etanol-eter etílico (procedimiento IVa); estos extractos fueron fraccionados por cromatografía en capa. De las fracciones α_1 y 2 se aisló α -tocoferol y ubiquinona cromatográficamente puros por cromatografía en capa delgada. De la fracción α_1 del otro extracto IVa se aisló el tocoferol por cromatografía en fase gaseosa. Tres lotes de células de igual masa fueron procesados paralelamente a fin de establecer su contenido endógeno. Tocofe-

Table 9.

RECUPERACION FINAL DE α -TOCOPFEROL (α T) Y UBIQUINONA-6 (UQ) EXOGENOS ¹
 EN LAS SECUENCIAS DE AISLAMIENTO SELECCIONADAS.

Extracción	Fraccionamiento del extracto	Aislamiento de fracciones puras	Recuperación de α T	UQ
Saponificación; extracción del insaponificable con éter etílico. (procedimiento V)	Cromatografía en columna	Cromatografía en capa delgada	57	68
Con etanol y etanol-éter; partición con isooctano; saponificación de fase superior (procedimiento IVa)	Cromatografía en caps	Cromatografía en caps delgada	67	73
	Cromatografía en caps	Cromatografía en fase gaseosa	83	nd ²

1. Por ciento de α -tocopherol y ubiquinona agregados.

Detalles experimentales en el texto.

2. nd: no determinado.

rol y ubiquinona fueron determinados por espectrofotometría (ver p. 116). Los resultados se indican en la tabla 9.

Debe destacarse que el α -tocoferol exógeno es estable y su recuperación satisfactoria, al menos cuando se halla en una proporción de 4 p.p.m. del peso celular seco, en las condiciones de extracción y purificación empleadas.

La utilización de más de un procedimiento de extracción se debe a que ninguno de los ensayados es totalmente satisfactorio. Los seleccionados permiten descartar que la ausencia de alguno de los compuestos de interés sea debida a insuficiente extracción de lípidos ligados o a su destrucción por condiciones alcalinas.

La utilización alternativa de dos procedimientos de fraccionamiento tuvo como objeto aprovechar las ventajas que ofrecen la cromatografía en capa preparativa (mayor rapidez de análisis y en consecuencia menor exposición de lípidos a condiciones ambientales) por un lado, y la cromatografía en columna (mayor separación de componentes) por otro. Con ello se pretende evitar que cualquier resultado negativo pueda ser atribuido a la metodología empleada.

A

B.

C.

CAPITULO V

IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE CROMANOLES Y QUINONAS
DE LEVADURAS

- A. Procedimientos de identificación y determinación de cromanoles y quinonas.
 1. Estudios cualitativos.
 - a. Posiciones cromatográficas.
 - b. Espectrofotometría.
 - . reducción de p-quinonas con NaBH_4 .
 - . oxidación de cromanoles y quinoles con AuHCl_4 .
 - . Oxidación de quinoles con NaHO .
 - . ionización de fenoles en Na /etanol.
 2. Determinaciones cuantitativas.
 - a. Espectrofotométricas.
 - . cromanoles y quinoles.
 - . quinonas.
 - . cromanoles.
 - . esteroides.
 - b. Por cromatografía en fase gaseosa.
- B. Análisis de levadura de panadería comercial.
 1. α -Tocoferol.
 2. Di- y mono-metiltocoles.
 3. Tocoferolquinonas.
 4. Filoquinona.
 5. Ubiquinona.
- C. Análisis de *Saccharomyces cerevisiae* 66 y 68.
 1. Cultivo de levaduras.

2. α -Tocoferol en cultivos en fase exponencial.
 3. α -Tocoferol en cultivos en fase estacionaria y cultivos envejecidos.
- D. Análisis de *Saccharomyces cerevisiae* DC 740 y *Candida guilliermondii* ATCC 9058.
Cultivos en distintas fuentes de carbono.
- E. Análisis de *Saccharomyces cerevisiae* 59 R.
Cultivos con distinta actividad respiratoria.
- F. Análisis de levadura de panadería recogida del filtro prensa en fábrica.
- G. Análisis de materiales que pueden aportar tocoferoles como contaminantes, en el cultivo de levaduras.
- H. Ubicromenol en levaduras.

A. PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE CROMANOLAS
Y QUINONAS

1. Estudios cualitativos.

a. Posiciones cromatográficas.

Dos de los criterios adoptados para la identificación de los componentes del extracto de lípidos fueron su posición (R_f) en cromatografías en capa delgada y su tiempo de retención (R_t) en cromatografías gas-líquido.

La polaridad del solvente con que un compuesto dado es eluido de columnas de ácido silíceo fue considerado criterio presuntivo acerca su naturaleza; el valor de este criterio es escaso ya que

la retención de compuestos por adsorbentes depende de la actividad de este último y este parámetro no se controló en nuestro estudio ni se hace habitualmente en otros.

La identificación cromatográfica se basó no en valores de R_f o R_{f_t} sino en la cromatografía simultánea con y contra muestras de estructura conocida coincidente con la del compuesto que se deseaba identificar. A fin de comparar las posiciones en los cromatogramas de un experimento con los de otros, fueron establecidas las relaciones relativas a un estándar interno: R_f relativo (RR_f) y tiempos de retención relativos (RR_t). Como estándares internos se emplearon α -tocoferol y escualeno para cromatografía en capa delgada y gaseosa, respectivamente.

La cromatografía en capa delgada se efectuó como se ha descrito en p. 73. La cromatografía en fase gaseosa se efectuó empleando columnas de vidrio rellenas con DC 550, SE-30, QF-1 o XE-60 sobre Chromosorb W (materiales provistos por Applied Science Labs. Inc., State College, PA) o Aeropack 30 (Varian Aerograph, Walnut Creek, Ca.). Se utilizó un instrumento Varian - Aerograph 1520 B con detector de ionización por llama y nitrógeno como gas portador. Las condiciones experimentales empleadas en los análisis descritos se indican en cada caso.

Las posiciones cromatográficas en capa delgada de los principales compuestos examinados en este trabajo pueden observarse en las figuras 8 y 9.

Los tiempos de elución en cromatografía gas líquido de escualeno, α -tocoferol, ergosterol y filloquinona se indican en la figura 7. La mejor separación de α -tocoferol, β -tocoferol y γ -tocoferol

δ -tocoferol y α -tocoferol succinato, α -tocoferolquinona, ergosterol, α -tocoferol acetato y filoquinona se logró sobre 3% SE-30; los tiempos de retención relativos a escualeno fueron 1.33, 1.65 y 1.71, 2.07 y 2.09, 2.16, 2.28, 2.49 y 3.30 respectivamente, determinados a 235 °C con caudal de nitrógeno 60 ml/min. Es destacable el poco efecto que la temperatura de columna o el caudal de portador tienen sobre los tiempos de retención relativos; como ejemplo, a 250 °C, los tiempos de retención relativos de α -tocoferol y filoquinona fueron 2.00 y 3.16 respectivamente. En iguales condiciones de temperatura y caudal los RR_t de un compuesto dado fueron reproducibles en ± 0.02 .

Los criterios cromatográficos combinados fueron aplicados para decidir la presencia o no de sustancias de los que no se disponían muestras sintéticas o identificadas previamente, en base a datos recogidos de la bibliografía. En particular, de isómeros estructurales de α -tocoferol (XIV c y d, p.13) y dímeros y trímeros de tocoferoles; estos compuestos derivan de los tocoferoles, han sido aislados de extractos de lípidos y podrían dar cuenta de la ausencia de tocoferoles en algunos organismos analizados.

El isómero estructural del α -tocoferol aislado de Euglena (5, 53) eluye de alúmina antes que α -tocoferol (53), con 0.25% EH (5); cromatografiado por adsorción o partición en capa delgada migra más que filoquinona (5); es separable de α -tocoferol por cromatografía en fase gaseosa sobre OV-1 (silicona de igual composición que SE-30, empleada en nuestro trabajo) (53).

Los dímeros y trímeros de tocoferoles (212) son eluidos de columna de ácido silícico por 3% EH junto con el α -tocoferol; migran en capas de sílica por encima de α -tocoferol (213). Algunos

son cromatografiables en fase gaseosa con SE-30, sufriendo pirólisis en la columna de modo que se detecta uno (o un par) de tocoferoles (213).

Los criterios cromatográficos son también útiles en la identificación de precursores de ubiquinona. Así 2-multiprenil-6-metoxifenol (XVI, p.17), 2-multiprenil-fenol (XV), 5-demetoxi-ubiquinona (XVIII) y 2-multiprenil-6-metoxi-1,4-benzoquinona (XVII) eluyen de columnas de alúmina con 1 % EH, 1 a 3 % EH, 5 a 8 % EH, respectivamente (62); lo harían con la misma polaridad desde columnas de sílice (214). Los prenil fenoles migran en capa delgada con mayor R_f que α -tocoferol; las prenil quinonas lo hacen inmediatamente por debajo de ubiquinona, a tal punto que sólo son separables de ella con poca carga, cuando se emplea cromatografía de adsorción (62,215). No se tiene noticia de que estos compuestos sean cromatografiables en fase gaseosa.

b. Espectrofotometría.

La espectrofotometría de absorción ultravioleta combinada con los criterios cromatográficos y caracterización de grupos funcionales (p.74), permitió la identificación inambigua de α -tocoferol, ubiquinona-6 y ergosterol en los lípidos de levadura de panadería comercial y hubiera permitido la de otros tocoferoles, tocoferolquinonas, filoquinona, prenilfenoles y prenil-quinonas si se hubieran hallado en los extractos. Los espectros de absorción infrarroja y emisión ultravioleta del α -tocoferol fueron efectuados a fin de verificar la identidad del material aislado de levadura.

Los espectros de absorción ultravioleta fueron efectuados en un espectrofotómetro Cary 14 y los de emisión en un espectrofluorómetro Aminco. Para los espectros de absorción se disolvieron las muestras en hexano, isooctano o etanol absoluto espectrofotométricamente puros; para los espectros de emisión se empleó etanol como solvente.

Los espectros infrarrojos fueron realizados en un espectrofotómetro Beckman IR 8. Una gota de solución de la muestra en hexano anhidro se colocó sobre una pastilla de 200 mg de KBr (Mallinckrodt, desecado por fusión) y se evaporó el solvente bajo una lámpara infrarroja; la operación se repitió dos o tres veces hasta observar una película aceitosa sobre la pastilla. El espectro se realizó empleando como blanco una pastilla igual expuesta a las mismas condiciones que la que sirvió de soporte al aceite. En ocasiones en que se efectuó el espectro de materiales sólidos, fueron mezclados al KBr molido a una concentración 0.5 a 1 % (m/m).

Tocoferoles, tocoferolquinonas, ubiquinonas, ubiquinoles, ubiquinonoles, filcoquinonas, filoquinol, prenilfenoles y 2-poliprenil-6-metoxi-1,4-benzoquinonas poseen máximos de absorción característicos que permiten distinguir claramente los miembros de un grupo de los de otro (174,179).

No es posible distinguir un tocoferol de otro, demetoxiubiquinonas de ubiquinonas o 2-multiprenil-fenoles de 2-multiprenil-6-metoxi-fenoles por absorción ultravioleta (62,214). Tampoco es posible distinguir de este modo α -tocopherol de su isómero estructural (XIV c ó d) o tocoferoles de sus dímeros y trímeros por espectrofotometría ultravioleta, pues todos poseen una banda de absorción muy similar (5,53,212).

Es de gran valor para la caracterización de algunos grupos funcionales de los presentes en cromanoles y quinonas, la detección de su reacción o no con ciertos reactivos específicos y la verificación del grupo funcional formado, mediante la comparación de sus espectros de absorción antes y después de la reacción. Se ha determinado de este modo en nuestro trabajo la reducción de p-quinonas con NaBH_4 , la oxidación de cromanoles y quinbles con AuHCl_4 , la oxidación de quinoles con NaHO , la ionización de fenoles en Na /etanol y la isomerización de ubiquinona a ubicromenol catalizada por piridina.

. Reducción de p-quinonas con NaBH_4 (178).

Las quinonas isoprenoides son reducidas a sus quinoles por NaBH_4 con modificación de su espectro ultravioleta. Los máximos de absorción de ubiquinonas (275 nm) y tocoferolquinonas (260 y 268 nm) son reemplazados por otros menos intensos a 290-295 nm.

La reducción se efectúa agregando a una solución de las quinonas en etanol (DO máxima 0.300-0.900) dos o tres pequeños cristales de NaBH_4 directamente en la celda del espectrofotómetro y luego de haber registrado el espectro de la quinona; la reducción se completa en 30 seg y al cabo de ese tiempo puede registrarse el espectro del quinol. Los quinoles se reoxidan lentamente por lo que no conviene efectuar las mediciones más allá de los 15 min desde la reducción.

En el caso de filoquinona sus máximos de absorción entre 240 y 270 (243, 249, 260, 270) nm son reemplazados por un máximo más intenso a 244 nm.

Para observar la reducción de filoquinona es necesario evitar condiciones alcalinas ya que el quinol se reoxida casi instantá -

neamente en ollas. La reducción se realiza en una cubeta espectro-
fotométrica tapada. Se disuelve la muestra en 2 ml de etanol con-
teniendo 0.02 ml de un buffer 1.0 M acetato de amonio (pH 5.0); se
agrega 0.04 ml de una solución 0.1 M de NaBH_4 , acuosa, recién pre-
parada, agitando hasta que cese el desprendimiento de H_2 (debe re-
petirse el agregado dos o tres veces más). El espectro debe regis-
trarse antes de los 10 min (216).

. Oxidación de cromanoles y quinoles con AuHCl_4 (217).

Cromanoles y quinonas son oxidados a las quinonas correspondien-
tes con modificación de su absorción ultravioleta, cuyos máximos
pasan de 290-295 nm a 260 y 268 nm para tocoferoles y tocoquino-
les, a 275 para ubicromanoles y ubiquinoles y de 244 a 240-270 pa-
ra naftocromanoles y naftoquinoles. Los cromanoles no se oxidan
en las condiciones empleadas en este trabajo.

A una solución de la muestra en 2 ml de etanol (DO 0.050-0.200
a 290 nm) se agrega 0.2 ml de una solución acuosa de AuHCl_4 al 10
%; se mezclan las soluciones y coloca en la oscuridad por 30 min.
Al cabo de ese tiempo se extrae la quinona, después de añadir 2 ml
de agua, tres veces con 2 ml de isooctano. La reacción y la extrac-
ción se efectúan en un tubo de 10 ml con tapa; en la extracción de-
be procederse con suavidad, girando suavemente el tubo colocado
horizontalmente para evitar contaminación de la fase orgánica con
el reactivo, ya que ello interfiere en las determinaciones. Se e-
vapora el isooctano y se disuelve el residuo en 2 ml de etanol pa-
ra realizar el espectro ultravioleta. La reacción procede cuanti-
tativamente y la extracción también si se agrega agua antes del
isooctano; esta modificación de la técnica original se introdujo
pues, extrayendo sin diluir la fase etanólica con isooctano no se

obtenía más que 40 a 60 % de la densidad óptica calculada, oxidan de α -tocopherol estándar.

Una vez medido el espectro de absorción de la muestra oxidada, puede reducirse ésta con NaBH_4 como se describió.

. Oxidación de quinoles con NaHO (218).

Los quinoles se oxidan al aire a las quinonas parentales con mayor o menor facilidad, según su estructura. Esta autooxidación es catalizada por álcalis. Cromanoles y cromenoles no son oxidados en condiciones moderadamente alcalinas.

A 2 ml de solución de la muestra en etanol (DO a 290-295 nm: 0.050-0.200), se agrega 0.1 ml de 1 N. NaHO ; se mezcla y al cabo de 10 min se registra la absorción de la muestra oxidada.

. Ionización de fenoles en Na /etanol (54).

Los compuestos fenólicos según los sustituyentes que posean y la posición de éstos en el núcleo aromático, se ionizan en solu - ciones de distinta alcalinidad, lo que se traduce en desplazamien - to de sus bandas de absorción ultravioleta hacia mayores longitu - des de onda con o sin modificación de la absorción. Esta propie - dad de gran utilidad para la identificación de flavonoides no ha sido aplicada en el caso de cromanoles y cromenoles, salvo el ubi cromenol (54). Podría ser de valor en la caracterización y/o di - ferenciación de sustancias reductoras del reactivo de Emmerie-En gel, presentes en extractos de lípidos.

La modificación del espectro de absorción por ionización se en - sayó agregando a 2.5 ml de solución etanólica del compuesto (DO máxima: 0.200-0.400 u 50), 5 μ l de una solución 1 M de Na en eta - nol (concentración final de Na : 0.002 M); luego de registrar la

curva de absorción en estas condiciones se agregó 45 μ l de la misma solución de Na en etanol (concentración final de Na: 0.02 M) y se registró nuevamente el espectro de absorción. A fin de verificar si la reacción era reversible se añadió a continuación 50 μ l de 1 N.HCl acuoso, midiéndose nuevamente la absorción. Todos los agregados se hicieron directamente en la celda del espectrofotómetro.

2. Determinaciones cuantitativas.

a. Espectrofotométricas.

. Cromanoles y quinoles.

El procedimiento más específico para su determinación está basado en el aumento de absorción que acompaña la oxidación de la muestra con $AuHCl_4$.

El dosaje de α -tocoferol, único compuesto de éste grupo detectado en levadura, se efectuó en base a la diferencia entre los coeficientes de absorción específica de la quinona y el cromanol, $E_{262 \text{ nm}}^{1\%}$: 415 (expresada en masa de α -tocoferol).

Dada la especificidad de la reacción de oxidación y de la absorción de la tocoferolquinona, es posible efectuar la determinación en fracciones del extracto obtenidas por cromatografía en capa preparativa o por cromatografía en columna, sin necesidad de tratamiento ulterior. En caso que la muestra sin oxidar posea absorción considerable a 262 nm es aconsejable efectuar la determinación empleando la diferencia de absorción específica entre la quinona y su quinol, $E_{262}^{1\%}$: 410 (expresado en masa de α -tocoferol). Para ello se oxida la muestra y extrae la quinona, la que se reduce luego con $NaBH_4$; se mide la caída de absorción a 262 nm que acom -

paña a la reducción. La ventaja de esta variante reside en que las sustancias con absorción irrelevante a esa longitud de onda no son extraídas por isooctano.

La sensibilidad de estas determinaciones, efectuadas como se indica en p. 114, es de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

También se efectuó el dosaje de estos compuestos en fracciones cromatográficamente puras mediante la reacción de Emmerie-Engel (167).

A 1 ml de solución etanólica de la muestra (2 a 50 μg de α -tocoferol) se agrega 0.5 ml de 0.2 % (m/v) α, α' -dipiridilo en etanol y 0.5 ml de 0.2 % (m/v) FeCl_3 en etanol. Los reactivos se agregan en la oscuridad; al cabo de 2 min se lee la densidad óptica a 520 nm.

El coeficiente de absorción específica en las condiciones empleadas por nosotros fue $E_{520 \text{ nm}}^{1\%} : 420$. El límite de sensibilidad para esta reacción es 1 μg de α -tocoferol/ml. La reacción cumple la ley de Lambert-Beer hasta una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La presencia de ubiquinona-6 en relación 5:1 respecto al α -tocoferol no altera las lecturas; cuando esa relación fue 10:1 las lecturas aumentaron un 11 %.

Hay varios compuestos en el extracto de lípidos de levadura que reducen el reactivo de Emmerie-Engel. Como ejemplo, el poder reductor de las fracciones A, B, C, α_1 , D y E obtenidas por capa delgada (ver figura 9) fue equivalente a 10, 8.7, 5.2, 8.0, 7.5 y 9.2 μg de α -tocoferol/ μgcs (lote extraído por procedimiento IVa). Esto muestra la poca especificidad de la reacción y que no puede aplicarse más que a materiales cromatográficamente puros; la zona en que se encuentran α -tocoferol y ubiquinona (α_1), los princi-

paes componentes reductores, posee poder reductor menor que otras.

. Quinonas.

La determinación de filoquinona, ubiquinona-6 y α -tocoferolquinona se efectuó midiendo la variación de absorción en la longitud de onda de máxima absorción de cada quinona luego de reducirla con NaBH. Los valores de extinción específica empleados fueron $E_{248 \text{ nm}}^{1\%}$: 420 para filoquinona; $E_{275 \text{ nm}}^{1\%}$: 207 para ubiquinona-6 y $E_{262 \text{ nm}}^{1\%}$: 397 para α -tocoferolquinona (expresada en masa de quinona). La reducción se realiza como se indicó en p. 113.

El dosaje puede efectuarse en fracciones obtenidas por cromatografía en caps preparativa o en columna. No es posible la determinación directa de quinonas en el extracto de lípidos de levadura por el exceso de ergosterol. La sensibilidad de la reacción es 1 $\mu\text{g/ml}$ para filoquinona, 2 $\mu\text{g/ml}$ para ubiquinona y 1 $\mu\text{g/ml}$ para tocoferolquinona.

. Cromenoles.

El ubicromenol se dosó en base a su absorción específica a 275 nm, $E_{275 \text{ nm}}^{1\%}$: 96 (54).

. Esteroles.

Los esteroles $\Delta^{5,7}$ diénicos presentan máximos de absorción cercanos a 272, 282 y 293 nm (además de un hombro de 260 nm) (219). La extinción específica para ergosterol fue $E_{282 \text{ nm}}^{1\%}$: 292, en etanol. Midiendo la absorción de una solución a esa longitud de onda se valoró el contenido de esteroles diénicos (como ergosterol) en fracciones de interés.

La determinación de ergosterol por absorción a 282 nm puede efectuarse en extractos sin fraccionar si la relación de densidades ópticas a 282:293 es aproximadamente 1. Ello asegura que en los extractos el ergosterol es el principal componente con absorción ultravioleta. En caso contrario se evaluó con buena aproximación el contenido de ergosterol midiendo la densidad óptica a 293 nm y empleando el coeficiente $E_{293 \text{ nm}}^{1\%}$: 170; a esa longitud de onda la contribución de otros componentes del extracto a la absorción es despreciable.

La sensibilidad de este método es de 1.5 μg ergosterol/ml.

Todas las determinaciones espectrofotométricas fueron efectuadas contra un blanco preparado eluyendo sílica o ácido silícico, según cual fue el material empleado en el paso previo de purificación. Los límites de sensibilidad (que en realidad son límites de confiabilidad) fueron calculados para una densidad óptica de 0.040.

b. Por cromatografía en fase gaseosa.

Fueron determinados en fase gaseosa (o al menos se estableció la factibilidad de hacerlo con estándares), α -tocoferol, α -tocoferolquinona, filoquinona, escualeno y ergosterol. Las determinaciones pueden efectuarse directamente en fracciones obtenidas por capa preparativa o cromatografía en columna: ofrecen la ventaja de su rapidez, sensibilidad y al mismo tiempo se realiza la identificación tentativa del material.

Se empleó el método de normalización interna con escualeno como estándar. Este estándar fue agregado a una concentración de 100 a 500 ng/ml en la muestra a analizar. Las áreas de cada

pico fueron calculadas por triangulación. La respuesta específica de los distintos compuestos relativa a escualeno (Sq) fue evaluada con:

$$\text{RSR} = \frac{A_j/m_j}{A_{\text{Sq}}/m_{\text{Sq}}}$$

con RSR, respuesta específica relativa; m_j y m_{Sq} masas de compuesto j y escualeno, respectivamente, inyectadas; A_j y A_{Sq} , área (respuesta, mm^2) de los picos correspondientes a compuesto j y escualeno.

Los valores para filoquinona, ergosterol, α -tocoferolquinona y α -tocoferol fueron: 0.86, 0.59, 0.43 y 0.38 respectivamente, en las condiciones cromatográficas empleadas en la figura 7. Debe señalarse que la variación de los RSR con la temperatura y/o caudal de portador fue despreciable al menos en el rango 225-255 °C y 30-60 ml/min.

Los límites de detección (área mínima 40 mm^2) fueron: 6, 7, 10, 14 y 16 ng para escualeno, filoquinona, ergosterol, α -tocoferolquinona y α -tocoferol respectivamente, operando a una amplificación de 1×10^{-11} Amp/mV. En realidad la capacidad de amplificación del equipo empleado llega a 1×10^{-12} Amp/mV, pero nuestra experiencia nos indica que una amplificación 10 veces menor es un límite seguro compatible con una línea de base estable. Se verificó que la respuesta del detector de llama y la amplificación fue lineal al menos hasta los 5 μg para escualeno y α -tocoferol.

B. ANALISIS DE LEVADURA DE PANADERIA COMERCIAL

Extractos de lípidos de levadura fueron preparados por extrac-

ción con etanol-éter etílico o por saponificación (procedimientos IVe y V). De los extractos se obtuvieron fracciones crudas que podían contener tocoferoles o tocoferolquinona, por cromatografía en capa preparativa o en columna. De las fracciones crudas se aislaron materiales designados α TL, β TL, δ TL y α TOL por cromatografía en capa delgada (ver p. 97).

1. α -Tocoferol.

De todos los lotes de levadura de panadería examinados se aisló una sustancia reductora del reactivo de Emmerie-Engel (α TL) que fue identificada como α -tocoferol con los criterios siguientes:

a. Cromatográficos.

La sustancia aislada y su producto de oxidación con AuCl_4H (α TL_{ox}) fueron indistinguibles de α -tocoferol sintético (α T) y de su producto de oxidación (α T_{ox}), respectivamente, por cromatografía en capa delgada y en papel. Los valores de R_f de estos compuestos en los sistemas examinados figuran en la tabla 10. Como control se utilizó una mezcla de α T y α TL. No se observó separación de ellas por cromatografía de adsorción o de partición, lo que constituye una fuerte evidencia en favor de la identidad de estas sustancias.

De igual modo la sustancia aislada y su producto de oxidación con AuCl_4H fueron indistinguibles de α -tocoferol y α -tocoferolquinona por cromatografía en fase gaseosa. Trazados superpuestos de α TL- α T y α TL_{ox}- α T_{ox} se presentan en las figuras 13 y 14.

b. Espectroscópicos.

Los espectros de absorción ultravioleta de α TL y α TL_{ox} coinci-

Tabla 10.

COMPARACION CROMATOGRAFICA (R_f) DE α -TOCOFEROL ESTANDAR (αT) Y EL AISLADO DE LEVADURA DE PANADERIA COMERCIAL (αTL)

Solvente	αT	αTL	αT_{ox}	αTL_{ox}
Hexano-éter isopropílico (80:20)	34	31	nd ¹	nd
Benceno	35	35	8	5
Cloroformo	39	39	10	10
Ciclohexano-acetona (80:20)	nd	nd	31	30
Benceno-éter isopropílico (80:20)	58	58	30	30
Benceno-metanol (98:2)	59	59	42	41
Benceno-éter etílico (85:15)	58	60	36	36
Benceno-éter etílico (75:25)	67	65	43	41
Benceno-acetato de etilo (85:15)	nd	nd	44	45
Benceno-acetato de etilo (75:25)	84	85	80	81
Acetona-agua (95:5) ²	66	67	74	73
Acetona-agua (85:15) ²	33	36	nd	nd
Ciclohexano-benceno (70:30) ³	58	56	nd	nd
Etanol 95 % ⁴	69	67	nd	nd

1. nd : no determinado.
2. Soporte : Sílica gel G parafinada.
3. Soporte : Papel-CO₃Zn.
4. Soporte : Papel parafinado.

dieron con el de α -tocoferol y su producto de oxidación (figura 15). Lo mismo ocurrió con los espectros de absorción de α TL_{ox} y α -tocoferolquinona reducidos con KBH_4 y con los de α TL y α -tocoferol en Na/etanol.

También fueron idénticos los espectros de excitación-emisión ultravioleta de α TL y α -tocoferol y sus espectros de absorción infrarroja.

c. Concentración celular.

El contenido de α -tocoferol varía ligeramente de lote en lote y con el procedimiento de extracción empleado (ver tabla 3). Extrayendo los lípidos por saponificación (procedimiento V) y aislando el α -tocoferol por cromatografía en columna y en capa delgada, la concentración de α -tocoferol en levadura "Duquesa" varió entre 0.2 y 0.3 $\mu\text{g/gch}$, sin corregir por pérdidas en los procedimientos de aislamiento. Teniendo en cuenta la recuperación media del 67 % para el procedimiento de análisis, el contenido de α -tocoferol en la levadura comercial examinada fue de 1.2 a 1.8 $\mu\text{g/gcs}$. Coinciden en este rango los valores calculados desde mediciones colorimétricas con el reactivo de Emmerie-Engel o espectrofotométricas por oxidación a α -tocoferolquinona y posterior reducción al quinol. En la muestra de la que se obtuvo material para el trazado de los espectros de la figura 15 (19 gcs) había 1.5 μg de α -tocoferol/gcs.

También se efectuaron determinaciones cuantitativas de α -tocoferol por cromatografía en fase gaseosa. En estos experimentos se efectuó la extracción con etanol-éter etílico (procedimiento IVa). Del extracto se aisló la fracción α_1 que contenía α -tocoferol por cromatografía en capa delgada en benceno. Esta fracción

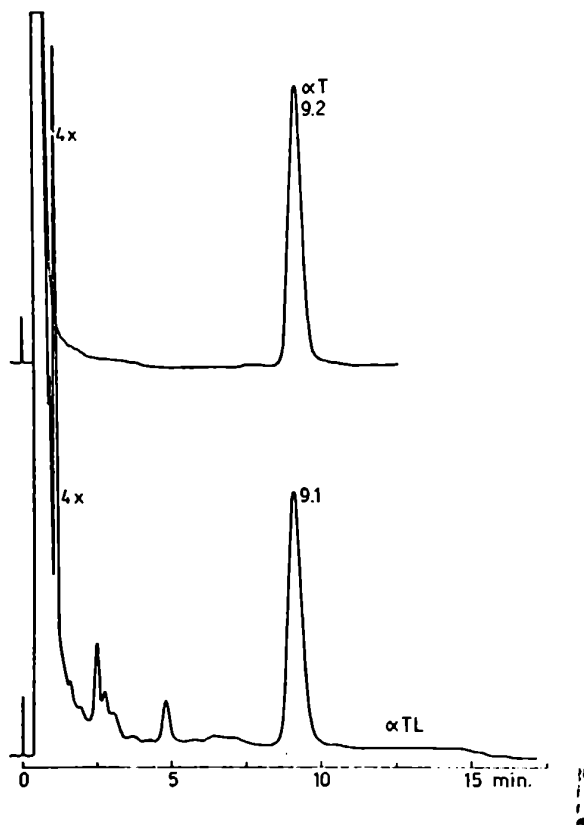


Figura 13. Cromatografía en fase gaseosa de α -tocoferol estandar (αT) y α -tocoferol aislado de levadura comercial para panificación (αTL).

Columna: 1,3 m x 4 mm id, 3 % SE-30 sobre Chromosorb W AW DMCS 60/80.

Temperaturas: inyector, 260 °C; columna, 245 °C; detector, 260 °C.

Gas portador: 30 ml/min. Atenuación: 4×10^{-11} Amp/mV.

Muestras inyectadas: αT , 700 ng; αTL , equivalente a 0.31 gcs.

De estos cromatogramas se determinó: respuesta específica de α -tocoferol, $660 \text{ mm}^2/\mu\text{g}$; contenido de α -tocoferol en la muestra αTL , 610 ng.

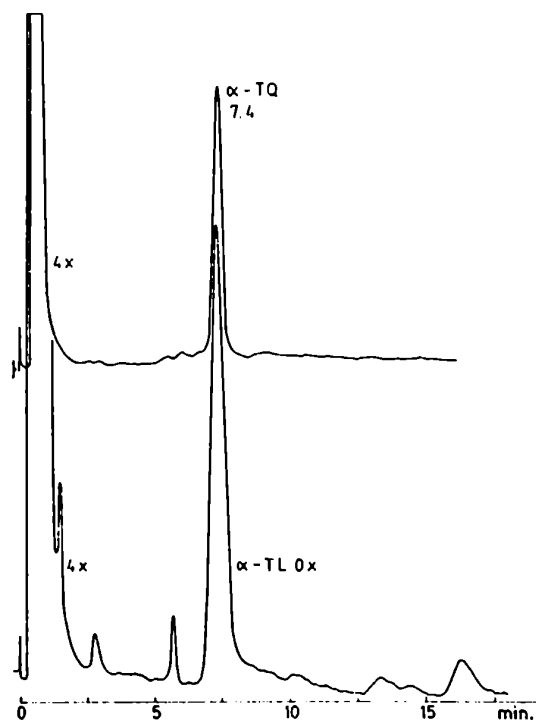


Figura 14. Cromatografía en fase gaseosa de α -tocoferolquinona estándar (α TQ) y del producto de oxidación con AuCl_4H del α -tocoferol aislado de levadura de panadería comercial (α TL_{ox}).

Columna y temperaturas de inyector y detector, las indicadas en la figura 13; temperatura de columna, 250 °C.

Muestras inyectadas: α TQ, 500 ng; α TL_{ox}, equivalente a 0.70 gcs.

De estos cromatogramas se determinó: respuesta específica de α -tocoferolquinona, 800 $\text{mm}^2/\mu\text{g}$; contenido de α -tocoferolquinona en la muestra α TL_{ox}, 1.31 μg .

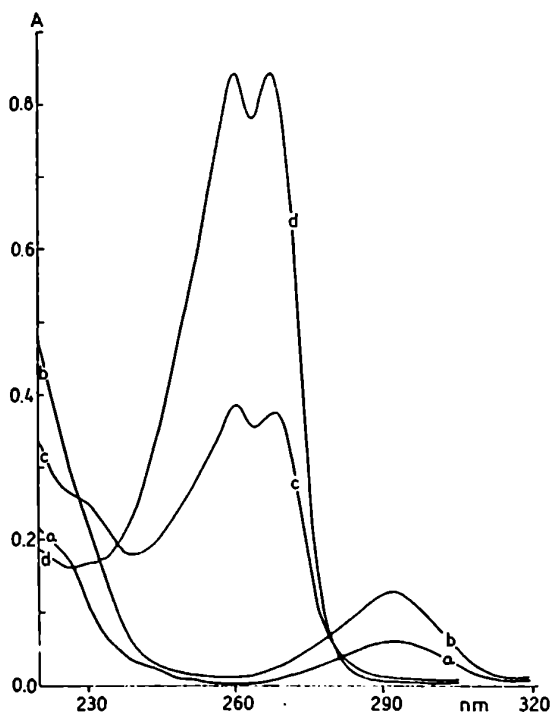


Figura 15. Espectros de absorción ultravioleta de α -tocoferol estandar (α T), de α -tocoferol aislado de levadura de panadería comercial (α TL) y de sus productos de oxidación con AuCl_4H .

Muestras: a, α TL proveniente de 19 gcs;
b, α T 39 μg ;
c y d, muestras a y b oxidadas, respectivamente.

De las curvas b y d se determinó el $E_{260}^{1\%} = 430$ para el α -tocoferol. De las curvas a y c se determinó el contenido de α -tocoferol en la muestra a, 18.3 μg .

se cromatografió en fase gaseosa sin purificación posterior. Los valores del contenido celular de α -tocoferol que se obtuvieron de este modo estaban comprendidos entre 0.380 y 0.480 μg α -tocoferol/gch. Este valor es mayor que los determinados espectrofotométricamente; ello se atribuye a que el procedimiento de preparación de la muestra analizada es más directo y al menor volumen de extracto manipulado (en estas determinaciones se emplearon 20 gcs). El valor corregido (por pérdidas en el procedimiento de análisis) del contenido de α -tocoferol en levadura de panadería comercial examinada fue 1.70 a 2.30 $\mu\text{g/gcs}$.

La alícuota con que se efectuó el cromatograma de la figura 13 provenía de 0.31 gcs. De acuerdo con la respuesta obtenida había en ella 2.13 μg de α -tocoferol/gcs.

A efectos de verificar que el pico eluido a 9.1 min cuando se inyectaron fracciones α_1 era α -tocoferol libre de contaminantes, y al mismo tiempo completar su identificación, se cromatografió en la columna analítica conectada al detector de conductividad térmica la muestra proveniente de 20 gcs y se recogió a ciegas el material eluido entre 7.5 y 10.5 min. El tubo colector se lavó con etanol y la solución se oxidó con AuCl_4H . La masa del producto oxidado fue equivalente a 1.95 μg α -tocoferol/gcs. Comparando esta cifra con el valor 2.13 determinado anteriormente para el mismo lote se concluye que, a pesar de la purificación incompleta de la fracción inyectada, los contaminantes no interfieren en la determinación por cromatografía gaseosa; y que el tocoferol no se descompone significativamente en las condiciones cromatográficas empleadas.

Alícuotas del compuesto oxidado se cromatografiaron en fase ga-

seosa analítica y en capa delgada; en ambos casos sus posiciones coincidieron con las de α -tocoferolquinona sintética.

2. Di- y mono- metiltocoles.

La fracción $\beta\delta$ TL aislada por cromatografía en capa preparativa no absorbía al ultravioleta ni contenía sustancias detectables por cromatografía gaseosa. En cambio la fracción δ TL obtenida de la misma forma absorbía levemente en el ultravioleta ($E_{285 \text{ nm, max.}}^{1\%} = 10$); su espectro no se modificó por oxidación con AuCl_4H , con comportamiento que no es característico de tocoferoles.

Lo mismo ocurrió con los materiales eluidos de columnas de ácido silícico con 5 % EH.

Se intentó entonces la detección de estos tocoferoles de un modo más directo empleando el procedimiento descrito en la p. 124.

Alicuotas del material aislado por cromatografía en fase gaseosa, equivalentes a 1 gcs, fueron recromatografiadas en fase gaseosa; en ellas no se detectaron picos con el R_t de los estándares a una amplificación de 4×10^{-11} Amp/mV. Ello significa que en los lotes de levadura examinados no habría β -, δ - o δ -tocoferoles en cantidad mayor que 100 ng/gcs.

3. Tocoferolquinonas.

Únicamente se procuró detectar α -tocoferolquinona pues esta es la que se ha aislado e identificado con seguridad en células eucarióticas.

El material α TQL (p. 99) absorbía al ultravioleta pero sin pre

sentar máximos de absorción entre 220 y 320 nm. Por cromatografía en fase gaseosa se estableció que este material estaba constituido por el compuesto S (p. 93), que si bien posee R_t algo mayor que la α -tocoferolquinona no puede ser separado de trazas de la quinona que son enmascaradas en su frente de elución. Estos compuestos fueron separados por cromatografía de partición en capa delgada con acetona-agua (9:1). Sin embargo el revelado con el reactivo de Lester-Ramasarma y la cromatografía en fase gaseosa del material con R_f de α -tocoferolquinona no indicaron la presencia de este compuesto.

Se concluye que el contenido de α -tocoferolquinona en los lotes de levadura analizados no fue mayor que 100 ng/gcs.

4. Filoquinona.

El espectro de absorción de la fracción NQL, aún en las muestras aisladas por saponificación, posee máximos a 272 , 281 y 290 nm, lo que indica que el principal material absorbente es un compuesto con enlaces poliénicos conjugados, quizás un hidrocarburo (o trazas de un éster de esteroide Δ^{5-7} diénico) por su escasa polaridad.

Dada la sensibilidad y especificidad de la reducción con NaBH_4 para la detección de filoquinona, se redujo una muestra NQL extraída con etanol-éter etílico (procedimiento IVa sin el paso de saponificación del extracto, a fin de evitar la descomposición de filoquinona en condiciones alcalinas), purificado por cromatografía en columna y en capa delgada. Una alícuota equivalente a 40 gcs no mostró aumento de absorción a 244 nm. Esto significa que en la muestra examinada no había más de 300 ng/gcs de filoquinona.

Tampoco fue posible detectar filoquinona cromatografiando en fase gaseosa una alícuota equivalente a 1 gcs, lo que indica que el contenido de dicho compuesto debe ser menor de 50 ng/gcs.

5. Ubiquinona.

La fracción UQL posee características cromatográficas y espectroscópicas de ubiquinona. El principal homólogo presente en esa fracción fue ubiquinona-6. En extractos obtenidos por saponificación del residuo celular de la extracción con etanol-éter etílico (procedimiento IVb), se detectó la presencia de dos compuestos quinoides (H e I) indistinguibles de ubiquinona por su absorción ultravioleta antes y después de su reducción con NaBH_4 . Estos compuestos fueron aislados por cromatografía de partición en capa delgada empleando acetona-agua (9:1). La posición cromatográfica del compuesto I es la que correspondería a una ubiquinona de 34 átomos de carbono (calculado desde su R_f) en su cadena lateral (220); el quinol del compuesto I migra en cromatografía de partición en acetona-agua (85:15) a una posición coincidente con la publicada para el ubiquinol-7 (215). Al compuesto H se le ha calculado una longitud de cadena lateral de 37 átomos de carbono y su quinol migra con un R_f ligeramente superior al publicado para ubiquinol-8.

En los lotes de levadura comercial examinados el contenido de ubiquinona-6 varió entre 90 y 120 $\mu\text{g/gcs}$; el del compuesto H fue de 48 a 60 $\mu\text{g/gcs}$ y el del compuesto I fue de 30 a 38 $\mu\text{g/gcs}$ (cuando la extracción se efectuó por los procedimientos I Va y IVb).

C. ANALISIS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE 66 y 68

El medio de cultivo ¹ empleado en la producción comercial de la levadura para panificación examinada puede contener tocoferoles. Green y col. (47) establecieron que muestras de melaza de caña de azúcar tenían 0.2 µg de α-tocoferol/g. El tocoferol del medio de cultivo podría ser concentrado selectivamente por las células, disolviéndose en los lípidos de su pared celular. Debe tenerse en cuenta que las células de los microorganismos poseen un área específica elevada, lo que, sumado a la agitación continua a que se los somete en cultivos sumergidos, favorecería la captación de sustancias liposolubles presentes en el medio acuoso. Esta captación puede llegar a ser total si estas sustancias se hallan a nivel de trazas.

También es posible que los tocoferoles se descompongan parcialmente durante el empaquetado y/o almacenamiento de la levadura. Esto se ha observado en la elaboración de diversos productos alimenticios que contienen tocoferoles (221).

A raíz de ello, y a fin de establecer si el tocoferol es sintetizado por levaduras y su contenido real en ellas, se analizaron células recién cosechadas de dos cepas - *Saccharomyces cerevisiae* 66 y 68 - aisladas de levadura de panadería. Estos lotes fueron cultivados en medios de composición definida, libres de tocoferoles, en nuestro laboratorio.

1. Composición (gentileza de Destilería San Ignacio, El Manantial, Tucumán):

Mosto de melaza, diluido (con agua de arroyo) a 50 °Ex: 55 m³.
 Fosfato de amonio, técnico 150 kg.
 Silcolapse 5001 (Duperial Argentina, Buenos Aires), según necesidad.

1. Cultivo de levaduras.

Se empleó un medio basal de composición definida que contiene sales y vitaminas del complejo B (222). Al medio basal se agregó una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, que se indicarán para cada lote, de modo que la concentración de carbono y nitrógeno fuera 330 y 60 mA respectivamente.

Los cultivos se iniciaron con inóculos preadaptados a crecer en la fuente de nitrógeno y carbono elegida durante 8 a 10 generaciones. La escala de cultivo se aumentó 10 veces en cada transferencia, inoculándose un volumen de medio con un décimo de ese volumen de cultivo en fase exponencial.

Los cultivos fueron efectuados a 28 °C con agitación rotatoria a 160 giros/min (cuando se emplearon erlenmeyers), o con caudal de aire de 0.7 a 0.8 ml/min/l medio (cuando se usó botellones). El pH se mantuvo entre 4.5 y 5.5. y la evolución del cultivo se siguió midiendo su densidad óptica a 670 nm. Alcanzado el desarrollo deseado se cosecharon las células por centrifugación continua a 4 °C y 15.000 rpm en una centrífuga Sorvall SS-4. La pasta obtenida se lavó con agua destilada enfriada a 4 °C y se conservó a esa temperatura hasta su extracción o se liofilizó.

2. α -Tocoferol en cultivos en fase exponencial.

No fue posible detectar α -tocoferol cromatográfica o espectrofotométricamente en células cultivadas con glucosa y urea o glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, recogidas hacia fines de la fase exponencial de crecimiento (10 a 12 hs de cultivo). Se emplearon los métodos analíticos utilizados para el análisis de levadura de panadería comercial.

Las fracciones cromatográficamente puras que debían contener - tocoferol se designaron $\alpha 66$ y $\alpha 68$, según la cepa de que provenían. El espectro de absorción ultravioleta de ambas no tuvo máximos entre 290 y 300 nm. Una muestra de $\alpha 68$ que provenía de 40 gcs fue oxidada con AuCl_4H sin que se modifique su espectro de absorción; si la muestra hubiera contenido $3.6 \mu\text{g}$ de α -tocoferol, es decir unos $100 \mu\text{g/gcs}$, se hubiera observado un aumento de absorción de 0.050 uDO a 260 y 268 nm.

Las muestras de $\alpha 66$ y $\alpha 68$ fueron analizadas por cromatografía en fase gaseosa. No se detectó en ellas compuesto que eluyera con R_t de α -tocoferol inyectando alícuotas equivalentes a 0.9 gcs. Si los lotes examinados hubieran contenido 120 ng tocoferol/gcs, se hubiera observado un pico de unos 20 mm de alto (atenuación 2×10^{-11} Amp/mV).

No cabe duda de lo satisfactorio del método de análisis. La factibilidad de detectar tocoferoles con él ha quedado demostrada en las experiencias descritas para levadura de panadería. Se ha mostrado la posibilidad de detectar hasta décimas de microgramo de α -tocoferol con las técnicas analíticas experimentadas.

Nuestros resultados con *S. cerevisiae* cultivada en el laboratorio se contradicen con los de Green y col. (47). Por ello se decidió reproducir en lo posible las condiciones de cultivo y extracción empleadas por dichos autores. Utilizaron 300 gch cultivadas en un medio con sacarosa como única fuente de "energía"; no señalan la fuente de nitrógeno, la concentración de vitaminas y sales o el uso de agentes antiespuma. Las células fueron lisadas con dietilsamina y extraídas con acetato de etilo.

Fue así que se cultivó la cepa *S. cerevisiae* 66 con sacarosa al

4 % y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0.4 % agregados al medio basal. Las células se cosecharon hacia fines de la fase exponencial (10 hs de cultivo), fueron lisadas con ciclohexilamina y extraídas con acetato de etilo (186). Del extracto proveniente de 585 gcs se purificó el soluble en metanol frío por cromatografía en capa preparativa. La fracción en que debía hallarse el α -tocoferol se dividió en dos partes (cada una equivalente a 70 gcs) ; a una de ellas se agregó 19 μg de α -tocoferol.

Ambas alícuotas se examinaron por cromatografía en fase gaseosa; se inyectaron volúmenes equivalentes a 2 gcs y se operó a atenuación 4×10^{-11} Amp/mV. En la alícuota sin agregado de α -tocoferol no se detectó ese compuesto en cantidad mayor que la correspondiente a 120 ng/gcs. En la alícuota control se determinó 520 ng de α -tocoferol, resultado que se hubiera obtenido con la muestra anterior si en las células extraídas el contenido de α -tocoferol fuera 0.330 $\mu\text{g/gcs}$. Esta concentración es un tercio de la que Green y col. (47) aseguran haber determinado en un lote de levadura cultivado con la misma fuente de carbono.

Se determinó el espectro de absorción ultravioleta de las dos alícuotas antes y después de oxidarlas con AuCl_4H . Antes de la oxidación ninguna de las dos alícuotas mostró la banda de absorción característica del α -tocoferol; en el caso de la muestra control, ello se debe a enmascaramiento del tocoferol agregado por la absorción propia de la fracción examinada. La curva de absorción de la alícuota sin agregado de tocoferol no se modificó luego de su oxidación; esto significa que no había más de 4.2 μg tocoferol/70 gcs, es decir más de 60 ng/gcs. La curva de absorción de la alícuota a que se agregó tocoferol mostró un aumento de densidad óptica a 260

nm equivalente a 18.2 μg de ese compuesto, lo que confirma que en la oxidación no hay pérdidas significativas.

Si aceptamos el valor señalado por Green y col. (47) para la levadura cultivada en sacarosa, la alícuota sin agregado de α -tocoferol debía contener 70 μg de ese compuesto. En ese caso se hubiera registrado un pico a toda escala en la cromatografía en fase gaseosa de una muestra equivalente a 1 gcs; y un aumento de absorción de 1.500 uDO a 260 nm luego de oxidar la alícuota completa.

La conclusión es clara: cepas de levadura aisladas de las comercializadas en plaza para panificación, cultivadas en medios de composición definida carentes de tocoferoles no sintetizan más que 100 ng de tocoferol/gcs, en las condiciones de cultivo ensayadas.

3. α -Tocoferol en cultivos en fase estacionaria y cultivos envejecidos.

Se ha observado que el contenido de ubiquinona en células de *Candida utilis* cultivadas en glucosa 5 % y peptona 1 %, aumenta con el tiempo de cultivo, pasando de 70 $\mu\text{g/gcs}$ a las 15 hs a 500 $\mu\text{g/gcs}$ a los siete días (56). También en *Tetrahymena pyriformis* la masa de ubiquinona/gcs aumenta con la edad del cultivo (223). No se han efectuado estudios sobre el contenido de tocoferoles durante el crecimiento de microorganismos.

Ante estos antecedentes se decidió examinar lotes de levadura cultivados durante 15 hs (fase estacionaria) y 96 hs (cultivo envejecido). Se empleó la cepa *S. cerevisiae* 66 que fue desarrollada en un medio con glucosa y urea; al cultivo que se dejaría envejecer se agregó 10 g de glucosa/l a las 12, 24 y 36 hs de inoculado.

Las células se extrajeron por saponificación; se aislaron las fracciones que debían contener α -tocoferol por cromatografía en capa preparativa. En ninguna de ellas se pudo detectar α -tocoferol por espectrofotometría (las muestras examinadas equivalían a 48 gcs) o por cromatografía en fase gaseosa (en alícuotas equivalentes a 2 gcs), en cantidad mayor a 170 ng/gcs.

El contenido de ubiquinona fue 83 $\mu\text{g/gcs}$ en el lote cosechado a las 15 hs y 240 $\mu\text{g/gcs}$ en el lote de células envejecidas. Esta variación es menor que la observada por Morton y col.(56) para *Candida utilis*.

D. ANALISIS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE DC 740
Y CANDIDA GUILLIERMONTII ATCC 9058.
CULTIVOS EN DISTINTAS FUENTES DE CARBONO

La diferencia entre los resultados descriptos en esta tesis y los de Green y col.(47) puede ser atribuida a que no se han empleado las mismas cepas. La composición de esteroides de levadura es distinta según las cepas de *S. cerevisiae* (183). Se han aislado mutantes de *Escherichia coli* que no producen ubiquinona o menaquinona (63,81,82).

Por ello se procuró analizar las mismas cepas estudiadas por Green y col.(47). Los autores no conservan cultivos de las levaduras empleadas pero sugirieron que la cepa de levadura de panadería podía ser obtenida de Distillers Co. (Great Burgh, Epsom, Surrey) y la de *Candida* (*Torula*) de Lake States Yeast Corp. (Rhineland, Wisconsin). La primera de estas compañías nos envió un cultivo de la cepa DC 740; la segunda se excusó de facilitar cepa alguna en

razón de la política de la empresa de no proporcionar cultivos de sus productos. Se obtuvo entonces de la American Type Culture Collection la cepa ATCC 9058 de *Candida guilliermondii*, empleada para la producción de riboflavina; fue seleccionada para estos estudios pues Green y col. (47) hallaron la máxima cantidad de tocoferol (4.2 $\mu\text{g/gcs}$) en una cepa de *Candida* (*Torula*) "con alta cantidad de vitamina B".

La cepa *S. cerevisiae* DC 740 fue cultivada en el laboratorio con glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La cepa *C. guilliermondii* ATCC 9058 se cultivó con sacarosa 4 % o con acetato 1.4 %; se empleó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno. Las células fueron cosechadas en fase exponencial, al cabo de 10 hs de cultivo en glucosa y sacarosa y 34 hs de cultivo en acetato.

El cultivo en acetato como fuente de carbono y donador de electrones se efectuó pues este es un sustrato no fermentable por levadura; este organismo solo puede emplearlo para producir energía por vía oxidativa (222). Si el tocoferol jugara algún papel en el transporte de electrones aerobio o en la fosforilación oxidativa, la cantidad de este compuesto en las células cultivadas en acetato debería ser mayor que en las cultivadas en glucosa o sacarosa, que son utilizadas parcialmente por vía fermentativa para producir energía.

La masa de células húmedas se saponificó y extrajo según el procedimiento V. Los extractos parcialmente libres de esteroides se fraccionaron por cromatografía en columna. Las fracciones eluidas con 3 % EH y con 20 % EH se examinaron por espectrofotometría y cromatografía en fase gaseosa en busca de tocoferol y tocoferolquinona. Para los estudios al ultravioleta se emplearon muestras equivalentes

a 40 gcs, con excepción de las provenientes del cultivo en acetato, del que se emplearon muestras equivalentes de 22 gcs en razón de la menor masa de células obtenida con esa fuente de carbono. Las alícuotas examinadas por cromatografía en fase gaseosa fueron equivalentes a 1 gcs (atenuación 2×10^{-11} Amp/mV).

También se extrajeron células (80 gch) de los lotes cultivados en glucosa y sacarosa con etanol-éter etílico (procedimiento IVa); estos extractos se fraccionaron por cromatografía en capa delgada y en fase gaseosa.

Los lotes examinados no contenían más de 80 a 120 ng de α -tocoferol/gcs. Estos estudios confirman los resultados obtenidos con cepas de levadura aisladas localmente y llevan a afirmar que, levaduras cultivadas en medios de composición definida, estrictamente libres de tocoferoles, no sintetizan estos compuestos en cantidad mayor que 0.08 p.p.m. del peso seco, cantidad ésta 10 veces menor que la señalada por Green y col. (47), para la cepa de Distillers Co. y más de 50 veces menor que la indicada para su cepa de "Torula".

Si bien no se utilizaron los mismos métodos de Green y col. para la extracción y purificación de tocoferoles, los valores de recuperación con estándares así como la masa de α -tocoferol determinada en levadura de panadería comercial, indican que nuestros métodos son por lo menos tan satisfactorios como los del grupo de Vitamins Laboratories en lo que respecta a sensibilidad y estabilidad de cromatogramas y quinonas en el proceso de análisis. Por ello se descarta que la diferencia de resultados pueda deberse a metodología no común. La no aplicación de los procedimientos utilizados por los autores citados se debe a que los empleados en nuestro trabajo ofrecen ventajas en cuanto a separación de conta-

minantes y seguridad de identificación.

E. ANALISIS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE 59 R.
CERVEJOS CON DESTINADA ACTIVIDAD RESPIRATORIA.

A fin de completar el análisis de las cepas de levadura para las que se describió la presencia de α -tocoferol, se examinó la cepa 59 R de P.P.Slonimski, empleada por Mahler y col. (49). Los autores citados cultivaron esta cepa en un medio no especificado y la cosecharon en fase exponencial; saponificaron 20 gcs y el insaponificable parcialmente libre de esteroides fue cromatografiado en columna de alúmina. Eluyeron los lípidos con mezclas de éter etílico en éter de petróleo al 0, 2, 4, 6, 10, 30 y 100 %; en las fracciones eluidas con 6 y 10 % encontraron "tocoferol" (no se indica cual). No se describe como fue efectuada la determinación de este compuesto, salvo una vaga referencia a una publicación de Pennock, Neiss y Mahler (224); todo indica que el "tocoferol" fue dosado con el reactivo de Emmerie-Engel directamente en los eluidos 6 y 10 %.

Mahler y col. (49) hallaron 13 μ g de "tocoferol"/gcs (en realidad se indica 13.1 mg/gcs -ver tabla 1 del trabajo citado- lo que estimamos debe ser un error tipográfico pues sino habría 11 mg de lípidos insaponificables/mgcs). El contenido de "tocoferol" es 17 veces mayor que el más alto de los determinados por Green y col. (47) para *S. cerevisiae*. De 20 gcs de la cepa 59 R deberían aislarse 260 μ g de "tocoferol", cantidad suficiente para identificarlo por espectrofotometría ultravioleta e *in vitro*, además de cromatografías en capa delgada y gruesa. la masa de "tocoferol"

extraíble de 5 gcs (65 μ g) permitiría su cómoda detección por nuestros métodos espectrofotométricos y cromatográficos en fase gaseosa ya que sus límites de confiabilidad son 2.5 μ g y 70 ng respectivamente.

Con esta cepa se realizaron varios experimentos en los que se emplearon distintas fuentes de carbono para el crecimiento celular, procurando lograr condiciones en las que la biosíntesis de tocoferol fuera estimulada. Si la función del tocoferol en células eucarióticas estuviera vinculada de alguna forma a la respiración aerobia, es razonable esperar un mayor contenido de tocoferol en condiciones de máxima actividad respiratoria. La capacidad respiratoria, la actividad de enzimas de los ciclos de los ácidos cítricos y glioxílico y de la cadena de transporte de electrones, y aun el grado de desarrollo del sistema de estructuras membranosas extranucleares, en *S. cerevisiae*, son regulados por la naturaleza y la concentración de la fuente de carbono que emplea para su desarrollo (222,225,226). Puede emplear glucosa para la producción de energía por vía fermentativa o por respiración aerobia; las enzimas de los ciclos de Krebs y del ácido glioxílico son reprimidas a medida que la concentración de éste azúcar en el medio de cultivo aumenta, a punto de ser totalmente inhibidas cuando ella supera el 5 % (225). Con sacarosa no ocurre este fenómeno pues el disacárido va siendo hidrolizado a medida que la célula requiere energía para su desarrollo. Lactato y acetato son donores de electrones no fermentables por levaduras; su asimilación se realiza casi exclusivamente por el ciclo de Krebs para el primero y por la vía del ácido glioxílico para el segundo (226). Por otro lado el acetato es una fuente de carbono que reduce la lipogénesis (227) lo que podría facilitar el aplanamiento de los lípidos isoprenoí-

des que fueran esenciales.

Por ello se cultivaron células de la cepa 59 R en medios con distinta concentración de glucosa o con sacarosa, lactato o acetato como fuentes de carbono y donores de electrones; como fuente de nitrógeno se utilizó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se empleó también un medio de composición no definida compuesto por glucosa (2 %) peptona (1 %) y extracto de levadura (1 %) (medio GYP). Se lo ensayó pues si bien Melher y col. (49) no mencionan la composición del medio empleado para el cultivo de la cepa 59 R, en un trabajo anterior (228) hacen referencia a un medio que lleve glucosa y extracto de levadura (229); se le agregó peptona con la idea de que pudiera ejercer sobre la biosíntesis de tocoferol el mismo efecto estimulante observado para ubiquinona en *Candida utilis* (56).

En la tabla II se copilan los datos de rendimiento, capacidad respiratoria (medida en un aparato de Warburg con concentraciones finales de KH_2PO_4 , 66 mM; glucosa o acetato de sodio, 330 mM carbono/ l y 0.5 ml del cultivo al tiempo de cosecha; volumen final, 3.0 ml) y contenido de algunos lípidos, obtenidos en los distintos lotes. Las células fueron recolectadas hacia el final de la fase logarítmica de crecimiento salvo las desarrolladas en acetato que lo fueron a mitad de dicha fase. Los lípidos de 5 gcs de cada lote se extrajeron por saponificación empleando las mismas concentraciones de reactivos que Melher y col. (49) (procedimiento V). Se aislaron las fracciones que debían contener α -tocoferol, ubiquinona-6 y ergosterol por cromatografía en capa delgada con benceno. Ubiquinona y ergosterol se dosaron espectrofotométricamente. Las fracciones en que debía hallarse α -tocoferol se examinaron por cromatografía en fase gaseosa; no se detectó pico algu-

Tabla 11.

EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA Y LOS LÍPIDOS INSAPONIFICABLES
DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE 59 R ¹

Fuente de Carbono y concentración inicial	Rendimien- to gcs/l	¹⁸ O ₂ µl O ₂ /h.mgcs glucosa / acetato	Lípidos insaponi- ficables mg/gcs	Ergosterol mg/gcs	Ubiquinona µg/gcs
Glucosa 5 %	2.2	12	10.0	0.92	60
Glucosa 1 %	1.6	36	14.4	1.10	72
Glucosa 0.3 %	1.2	49	9.6	1.35	107
Sacarosa 4 %	1.7	nd ²	13.5	1.15	123
Lactato 1.24 %	1.1	nd	8.7	1.18	140
Acetato 1.37 %	0.5	56	6.3	1.23	138
Glucosa 2 % - Extracto de levadura 1 % - Peptona 1 %	2.8	nd	17.9	1.80	90
No indicado	nd	nd	11.1	0.79	80
Medios H.R. y col (49)					

1. No se detectó α -tocoferol en las fracciones α_1 (figura 9) empleando cromatografía en fase
faseosa (límite de detección: 120 ng/gcs).

2. nd: No determinado.

no con R_t del estándar. Dado el límite de detección de α -tocoferol por cromatografía en fase gaseosa y la recuperación en el procedimiento de extracción puede calcularse que las muestras estudiadas no contenían más de 120 ng/ μ cs (se inyectaron alícuotas equivalentes a 2 μ cs), es decir unas 100 veces menos que el valor señalado por Mahler y col. (49)!

A fin de poseer material para estudios espectrofotométricos se extrajeron 375 μ ch de células cultivadas con glucosa 1 % y 570 μ ch de células cultivadas en el medio GYP, por saponificación. El soluble en metanol frío se fraccionó por cromatografía en columna y se procuró aislar α -tocoferol y α -tocoferolquinona de los eluidos con 3 % EH y con 20 % EH respectivamente. Se repitieron los experimentos descritos para levadura de panadería comercial sin que fuera posible obtener indicio alguno de la presencia de tocoferol o su quinona en los lotes examinados.

Se plantea entonces donde se halla la causa de tan marcada contradicción entre nuestros resultados y los de Mahler y col (49). Pensamos que ello no puede atribuirse a condiciones de cultivo que no favorecen, o a situaciones fisiológicas que no requieren, la síntesis de tocoferoles.

Las condiciones empleadas en nuestros cultivos fueron lo suficientemente variadas como para producir células con marcadas diferencias de actividad respiratoria y aun con notables cambios estructurales (230). La estabilidad del tocoferol frente a las técnicas analíticas empleadas para su aislamiento, identificación y dosaje ha sido probada y ellas fueron aplicadas con éxito a materiales que lo contienen. Por ello se descarta la posibilidad de pérdidas significativas, y más aun, que puedan producirse pérdi-

das totales.

Solo quedan dos vias para explicar las diferencias de resultados. O bien Mahler y col. realizaron el cultivo en un medio no desprovisto de tocoferoles y las células fueron contaminadas con él, o el α -tocoferol fue confundido con otro compuesto. En relación con la última hipótesis, extraña que el α -tocoferol eluya luego de ubiquinona (224). Se ha descrito que ubiquinona-10 comienza a eluir con menor o igual polaridad que α -tocoferol (231,232), pero a medida que se acorta la cadena lateral ubiquinona es retenida con mayor intensidad por el adsorbente; así, ubiquinona-9 y ubiquinona-8 eluyen después del α -tocoferol de columnas de alúmina (27,233). No se halló referencia donde se indique la secuencia de elución de α -tocoferol y ubiquinona-6, pero se estima con los antecedentes citados que debe eluir luego del α -tocoferol; de mono-metil tocoles pueden hallarse junto a ubiquinona-8 (27) o eluir con o después de ubiquinona-9 (233). En levaduras hay sustancias reductoras que eluyen de columnas de sílice luego de la ubiquinona; en el curso de nuestros estudios se aisló de *S. cerevisiae* 68 y 59 R una sustancia reductora (designada M; ver figura 11) eluida con 10% EH, que luego de purificación por cromatografía en capa delgada en éter etílico-benceno (4:6) mostró su máximo de absorción a 270 nm.

Es posible que se haya confundido al ubicromenol o al compuesto que hemos llamado M con α -tocoferol. Mahler y col. (49) no son lo suficientemente explícitos acerca de la forma en que fue identificado el compuesto llamado por ellos "tocoferol". Al parecer se lo identificó por R_f en un solvente y el espectro ultravioleta de las fracciones 6 y 10% EH sin oxidar (224), ensayos de escaso valor en un material no cromatográficamente puro. Ello pone en duda que

ese material sea realmente α -tocoferol.

Mahler y col. (49) no detectaron ubicromenol pero no indican en que fracción y cómo lo buscaron. Sin embargo en el curso de nuestro trabajo se aisló ubicromenol-5 del lote cultivado en glucosa 1 % (los otros no se examinaron); este compuesto eluyó de la columna de ácido silícico con 3 μ M y se lo purificó por cromatografía en capa delgada. Se aislaron 3 μ g de ubicromenol cromatográficamente puro/gcs el que fue identificado por cromatografía de partición y por su espectro ultravioleta (ver p. 160). La cantidad de este compuesto en la cepa 59 R cultivada por nosotros puede dar cuenta de la masa de tocoferol determinada por aquellos autores.

F. ANALISIS DE LEVADURA DE PANADERIA RECOGIDA DEL FILTRO PRENSA EN FABRICA.

Los resultados descriptos hasta aquí marcan una clara diferencia entre los lotes analizados. Aquellos cultivados en el laboratorio, en medios de composición definida, no sintetizan tocoferol en cantidad mayor que 80 a 100 ng/gcs. Los lotes de levadura de panadería adquiridos en plaza, en cambio, contienen α -tocoferol en cantidad superior a 1 μ g/gcs. Ello plantea interrogantes acerca el origen del α -tocoferol hallado en lotes comerciales. Su presencia se debe a biosíntesis en condiciones ambientales que no pudieran ser reproducidas en el laboratorio? O el tocoferol es incorporado de alguna forma a la masa celular una vez que el cultivo ha terminado?.

A efectos de procurar definir esta situación se analizó detenidamente un lote de células obtenido del filtro prensa en fábrica

(Destilería "San Ignacio", El Manantial, Tucumán). En la producción comercial de levadura se centrifuga el cultivo una vez alcanzado el rendimiento establecido; la "crema" (material que aun contiene un 40 a 50 % de líquido) se refrigera, se mezcla con agua y se re-centrifuga; la "crema" lavada se filtra a través de un filtro prensa. La masa húmeda de células que se obtiene (contiene un 23 a 25 % de agua) pasa a continuación a empaquetado. Se obtuvo el material del filtro prensa pues se estimó que la muestra reflejaría la composición celular al final del período de cultivo lo más exactamente posible. La muestra fue trasladada hasta el laboratorio refrigerada y por vía aérea.

Se intentó aislar el total de los lípidos isoprenoides en las condiciones más suaves posibles; 700 gch se extrajeron según el procedimiento IVa, sin efectuar la saponificación del extracto con solventes. El material que particionó en isooctano, del extracto con solventes, se denominó PHES. La masa celular ya extraída con solventes se saponificó como se indica en el procedimiento IVb; el soluble en hexano frío se designó IRC/sH.

La masa de lípidos extraída con solventes fue el 8.3 % del peso seco; la extraída por saponificación del residuo celular fue el 1.6 % del peso seco. Longley y col. (183) empleando otra cepa de levadura crecida en glucosa al 1 %, extrajeron con solventes 10.5 % del peso seco y 1.2 % adicional por hidrólisis ácida del residuo celular.

Según el conocimiento actual acerca la extractibilidad de tocoferoles y quinonas isoprenoides, el total de estos lípidos debería encontrarse en los extractos PHES e IRC/sH. Estos extractos se fraccionaron por cromatografía en columna. En las fracciones del extrac

to PHES eluidas con 5 % EH , 12 % EH , 25 % EH y 100 % EH se detectaron sustancias reductoras, ninguna de ellas con R_f de α -tocoferol. En las fracciones del extracto IRC/sH eluidas con 3 % EH se halló una sustancia reductora que migra poco más que el α -tocoferol. En fracciones de los dos extractos eluidas con 5 % EH y 100 % EH se hallaron quinonas, ninguna de ellas con R_f de tocoferol-quinona o filoquinona.

Las fracciones de cada extracto eluidas con 3 % EH (fr. 5 y 6), en las que debía encontrarse el α -tocoferol, fueron examinadas por cromatografía en fase gaseosa. Los trazados correspondientes a las fracciones 5 de los extractos PHES e IRC/sH se hallan en las figuras 16 y 17. Allí se los compare con los de una mezcla de escualeno y α -tocoferol puros. En ambas fracciones hay trazas de un compuesto con R_t muy similar al del α -tocoferol. En la fracción proveniente del extracto PHES se encontró una cantidad equivalente a 48 ng/gcs de dicho compuesto y en la proveniente del extracto IRC/sH se halló 28 ng/gcs, del mismo.

A fin de establecer si es α -tocoferol la sustancia que es retenida alrededor de 23 min en la columna, se cromatografiaron estas fracciones en capa delgada y se eluyeron las bandas que migraban con igual posición que α -tocoferol sintético ($R_f = 38$). Los eluidos provenientes de IRC/sH y PHES se designaron α_L y α'_L , respectivamente. Se los cromatografió en fase gaseosa; los resultados se muestran en la figura 18. Nuevamente se detecta un compuesto que eluye con R_t muy similar al del α -tocoferol en las dos muestras. No se detectó este compuesto en eluidos de zonas de la placa donde no migra el α -tocoferol.

El resto de las fracciones α_L y α'_L se oxidó con AuCl_4^- alí-

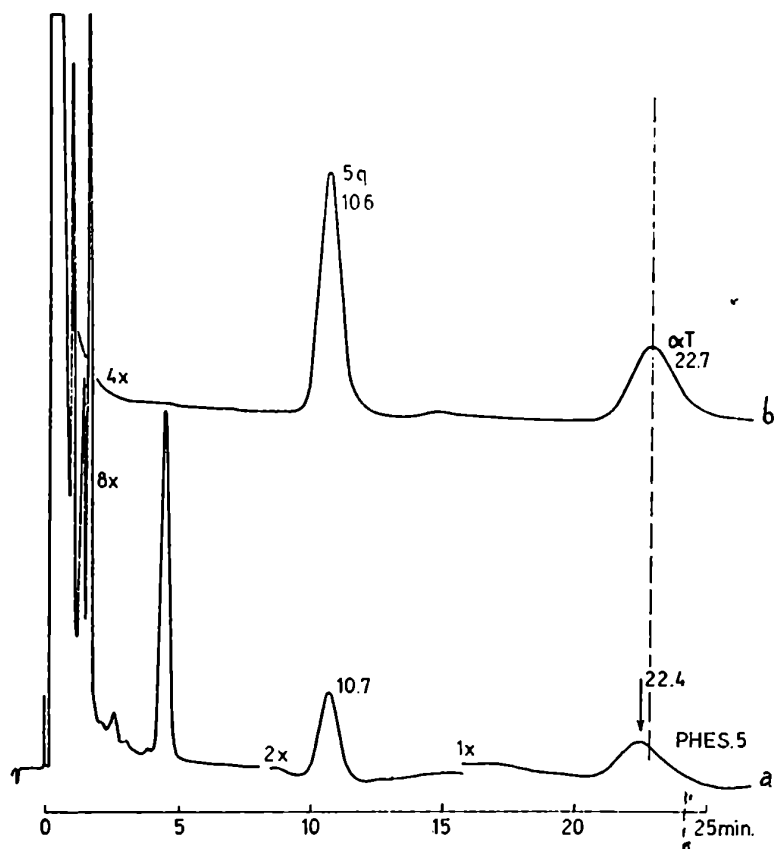


Figura 16. Cromatografía en fase gaseosa de la fracción 5, proveniente del extracto PHES (PHES.5), eluida de una columna de ácido silícico con 3 % de éter etílico-hexano.

Columna: 1.8 m x 4 mm id. 3 % GE-30 sobre Chromosorb W AW DMCS HP 80/100

Temperaturas: inyector, 250 °C; columna, 225 °C; detector, 250 °C.
Gas portador: 60 ml/min. Atenuación: la indicada en cada trazado $\times 10^{-11}$ Amp/mV.

Muestras inyectadas: a: PHES.5, equivale a 0.9 μ g;
b: mezcla de 300 ng de escualeno (5q) y 250 ng de α -tocoferol (α T).

De estos trazados se determinó la masa de α -tocoferol en la muestra PHES.5, 38 ng.

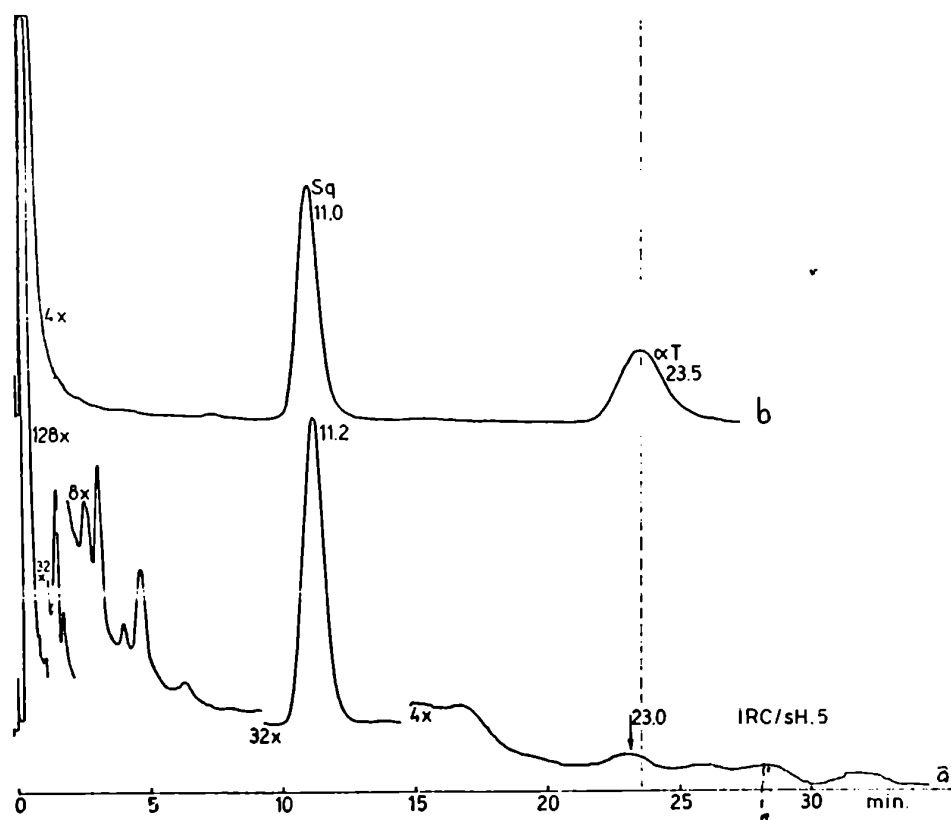


Figura 17. Cromatografía en fase gaseosa de la fracción 5, proveniente del extracto IRC/sH (IRC/sH.5), eluida de una columna de ácido silícico con 3% de éter etílico-hexano.

Condiciones experimentales: las mismas que en la figura 16.

Muestras inyectadas: a: IRC/sH.5, equivalente a 2.7 gcs;
b: mezcla de 300 ng de escualeno (Sq) y 250 ng de α -tocoferol (α T).

De estos trazados se determinó la masa de α -tocoferol en el extracto IRC/sH, 57 ng.

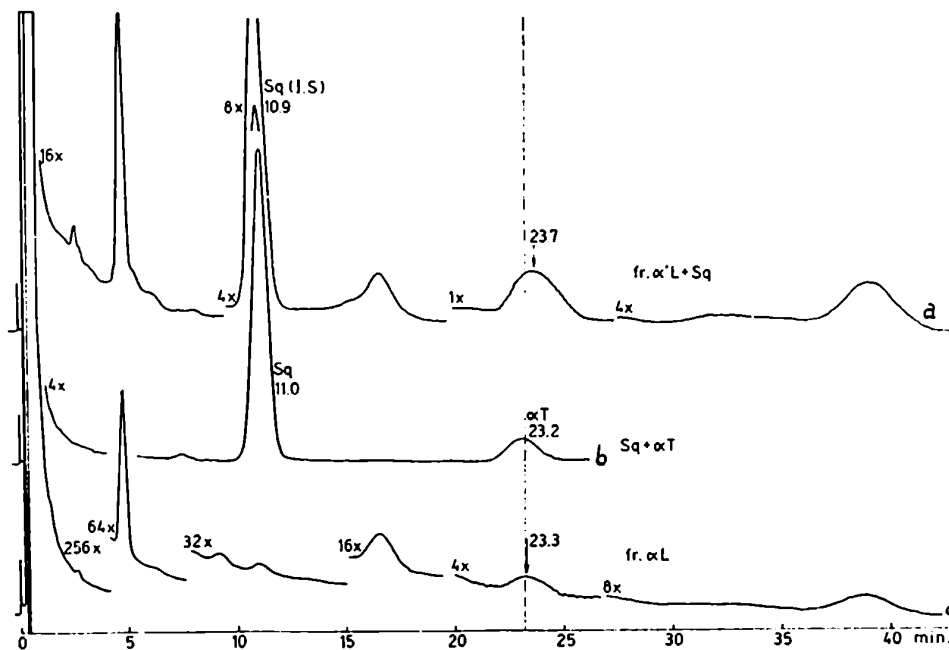


Figura 18. Cromatografía en fase gaseosa de los componentes de los materiales PHES.5 e IRC/sH.5 (fr. $\alpha'L$ y αL , respectivamente) que migran en igual posición que α -tocoferol sintético en capa delgada. Condiciones cromatográficas: las mismas que en la figura 16.

Muestras inyectadas: a; fr. $\alpha'L$, equivalente a 3.1 gcs más 450 ng de escualeno;
b: 450 ng de escualeno más 120 ng de α -tocoferol;
c: fr. αL , equivalente a 8.8 gcs.

Masa de α -tocoferol detectada en las muestras a y c: 75 ng.

cuotas de las fracciones oxidadas se cromatografiaron en fase gaseosa. Se detectó en ellas compuestos con igual R_t que α -tocoferolquinona. Ante la imposibilidad de detectar la cantidad de tocoferolquinona que había en las muestras αL y $\alpha' L$ oxidadas por absorción al ultravioleta (cantidad calculada 0.25 y 0.70 $\mu g/ml$ respectivamente), y con el propósito de completar su caracterización, se optó por cromatografiarlas en éter etílico-benceno (25:75), eluir la zona donde debía migrar α -tocoferolquinona y examinar por cromatografía gas-líquido el material eluido. En ambos eluidos se detectaron compuestos con R_t de α -tocoferolquinona.

Las muestras αL y $\alpha' L$ contienen 27 y 11 ng/gcs del compuesto con R_t de α -tocoferol, lo que indica que el 71 % fue extraído con éxito, y el 29 % restante por adsorción del residuo celular. La cantidad de tocoferol presente en las fracciones αL y $\alpha' L$ es aproximadamente la mitad del detectado en las fracciones 5 de PHES e IRC/sH (40 y 57 % respectivamente). Esta diferencia puede ser debida a trazas de un contaminante con igual R_t pero distinto R_f que el α -tocoferol, o a descomposición de este compuesto y error del método, que pueden ser considerables con tan baja cantidad de sustancia. Como control de posibles pérdidas se agregó a las fracciones 5 de PHES e IRC/sH una cantidad de α -tocoferol equivalente a 165 ng/gcs y se determinó su contenido luego de cromatografiarlas en capa delgada, eluir la zona que migra con R_f de α -tocoferol, oxidar con $AuHCl_4$ el eluido, cromatografiar el material oxidado en benceno-éter etílico y eluir de estas placas el compuesto que migra con R_f de tocoferolquinona. Se determinó, por cromatografía en fase gaseosa de los últimos eluidos, que la recuperación del tocoferol agregado fue 68 y 72 %.

Otras fracciones eluidas de las columnas sembradas con los extractos PHES e IRC/sH se analizaron por cromatografía en fase gaseosa, empleando cantidades equivalentes (en gcs) a las empleadas para el estudio de las fracciones 5, a fin de establecer en que medida se distribuye en ellas el compuesto que se presume es α -tocoferol. Se detectaron compuestos con R_t de tocoferol sólo en las eluidas con 1 % y 15 % EH provenientes de PHES y en las eluidas con 15 % EH del extracto IRC/sH. Pero sólo el compuesto presente en la fracción eluida con 1 % (trazas) de PHES se oxidó con $AuHCl_4$ dando un producto con R_f y R_t de α -tocoferolquinona. El compuesto con R_t de α -tocoferol presente en las otras fracciones es el S (p.93) de naturaleza desconocida.

En razón del reducido contenido en levadura de la sustancia que presumiblemente es α -tocoferol, no fue posible caracterizarla en forma más completa. Los experimentos realizados, resumidos en la tabla 12, aportan sin embargo, considerable evidencia para identificarla con el α -tocoferol. En efecto se trata de un material que eluye de cromatografía en columna de ácido silícico con 3 % EH, que migra con igual R_f que α -tocoferol en capa de sílica gel desarrollada con benceno; que posee un R_t coincidente con el del α -tocoferol a 225 °C sobre SE-30. La oxidación con $AuHCl_4$ transforma a este material en un compuesto que migra en igual posición que α -tocoferolquinona en capa delgada desarrollada con benceno-éter-etílico (75:25), y que eluye con igual R_t que α -tocoferolquinona de 3 % SE-30 a 225 °C. Es muy poco probable que un compuesto distinto del α -tocoferol se comporte en la forma descrita frente a cinco o seis criterios analíticos, incluyendo una transformación química. La levadura de panadería comercial, reco-

Tabla 12.

COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO DEL α -TOCOPFEROL AISLADO DE LEVADURA DE PANADERIA ESCOGIDA DEL
 FILTRO PRENSA

Se indican los valores del tiempo de retención relativo a escualeno, de sustancias con características de α -tocopherol presentes en las fracciones que se señalan. Detalles de aislamiento en el texto. Condiciones experimentales durante cromatografía en fase gaseosa, las mismas que en la figura 16.

Material	Origen	Extracto PHES	Extracto INC/sH	α -tocopherol sintético(α T)
Eluido de columna de ácido silícico (fracción 5; 3% EH)	PHES.5:	2.09	INC.5:	2.06 α T: 2.13
		2.10		2.08 2.14
		2.12		2.08 2.14
Compuesto con R_f de α -tocopherol aislado de fracción 5 (cromatografía en capa delgada en benceno; $R_f = 38$)	α 'L:	2.09	α L:	2.08 α T: 2.10
		2.16		2.12 2.12
Compuesto con R_f de α -tocopherolquinona, aislado después de oxidar el anterior con AuCl H (cromatografía en capa delgada en benceno:éter etílico (75:25), $R_f = 43$)	α 'Lox:	2.19	α Lox:	2.18 α T $_{\alpha}$: 2.20
		2.22		2.19 2.21

gida del filtro prensa en fábrica contendría entonces 55 ng de α -tocoferol/gcs.

La búsqueda de α -tocoferolquinona no dió resultado. Las fracciones de ambos extractos eluidas con 15 y 25 % EH fueron cromatografiadas en capa delgada con benceno-éter etílico (75:25). El eluido de la zona adonde migró α -tocoferolquinona sintética fue examinado al ultravioleta y por cromatografía en fase gaseosa. Empleando una alícuota equivalente a 40 gcs no se observaron máximos de absorción entre 220 y 320 nm, ni la modificación de la curva de absorción luego del agregado de KBH_4 . En alícuotas equivalentes a 2.5 gcs cromatografiadas en fase gaseosa (atenuación 2×10^{-11} Amp/mV) no se detectó elución de material con R_t de tocoferolquinona. Estos dos ensayos excluyen la posibilidad de que haya en la muestra de levadura analizada más de 20 ng de α -tocoferolquinona/gcs.

G. ANALISIS DE MATERIALES QUE PUEDEN APORTAR TOCOPEROLES COMO CONTAMINANTES EN EL CULTIVO DE LEVADURAS.

Los estudios efectuados con levadura de panadería comercial indican que hay en ella más de 1 μg de α -tocoferol/gcs. En cambio la levadura recogida en el filtro prensa, contiene una cantidad 40 a 50 veces menor de α -tocoferol. Pareciera entonces que la mayor parte del α -tocoferol es incorporado a las células luego de su cosecha.

A fin de esclarecer esta situación, se examinó en detalle el proceso de fabricación "in situ". Se observó que se agregaba un lí

quido a la masa de células antes de su entrada a la máquina empaquetadora. El agregado de pequeñas cantidades de aceite o emulsificantes, luego de la filtración en filtro prensa, es práctica corriente en la producción de levadura (234) con el propósito de dar a la masa húmeda la consistencia apropiada para la extrusión. En el caso que nos ocupa el líquido era un aceite comestible cuyo origen no pudo ser precisado.

Se analizó una muestra de dicho aceite ante la presunción de que allí se hallaba la causa de las diferencias observadas en el contenido de α -tocoferol; se procuraba establecer si la cantidad de aceite y, consecuentemente de tocoferoles, agregados (1.3 litro aceite/540 kg levadura húmeda), daba cuenta del valor determinado. Se intentó explicar porque se detectaba únicamente α -tocoferol cuando la mayoría de los aceites de oleaginosas contienen varios tocoferoles. También se efectuó el análisis de un antiespuma (Hodag GN-31, Hodag Chem. Co., Skokie, Illinois) empleado comunmente para evitar la producción de espuma en cultivos de microorganismos en escala industrial o en el laboratorio. No se han encontrado estudios acerca del contenido de tocoferoles en antiespumas; pero algunos de estos agentes tensioactivos suelen prepararse con aceites vegetales, razón por la cual podrían ser una fuente de contaminación con tocoferoles; otros son siliconas. Los resultados obtenidos con el antiespuma GN-31, llevaron al análisis del Silcolapse 5001 (Duparisl Argentina, Buenos Aires) utilizado en la producción de levadura comercial por la Destilería San Ignacio.

Los tres materiales (1.0 g) fueron saponificados como se describe en el procedimiento IVA para el extracto con solvente. El

insaponificable de cada uno se disolvió en 0.5 ml de hexano y la solución se enfrió a 0 °C ; los compuestos que precipitaron a esa temperatura fueron descartados (en la tabla 13 se los designa: es teroles). El soluble en hexano se examinó por cromatografía en fa se gaseosa y se localizaron y aislaron de él los compuestos reduc tores del reactivo de Emmerie-Engel empleando cromatografía en ca pa delgada. Los compuestos reductores fueron identificados por cromatografía gas-líquido y espectrofotometría ultravioleta. Los resultados se resumen en la tabla 13.

En el aceite agregado a la levadura de panadería comercial se identificó α -tocoferol (650 $\mu\text{g}/\text{g}$ aceite) y el compuesto reductor designado M (p. 93; cantidad no determinada). No se aislaron di- o mono- metil-tocoles ni tocoferolquinona en cantidad mayor que 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ aceite.

En el antiespuma GN-31 se detectaron α -tocoferol, di-metil-tocoles y α -tocoferol en una concentración de 75 μg , 310 μg y 180 $\mu\text{g}/\text{g}$ antiespuma, respectivamente (figura 19). Si el antiespuma Silcolapse 5001 contiene tocoferoles, éstos deben hallarse a una concentración menor a 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ silicona.

Estos resultados muestran sin lugar a dudas que el mayor contenido de α -tocoferol de la levadura en paquete se debe a una con taminación producida al añadir aceite comestible a la masa "pre n sada" a efectos de facilitar su extrusión por la máquina empaqueta dora. El único tocoferol identificado en ese aceite es α -to co fe rol; el volumen de aceite agregado a la masa celular equivale a añadir 6.8 μg α -tocoferol/gca, de acuerdo a su contenido en el aceite. Este valor es unas tres veces mayor que la cantidad de α -tocoferol hallado en la levadura de panadería comercial. Esta

Tabla 13.

SUSTANCIAS REDUCTORAS EN MATERIALES EMPLEADOS PARA LA PRODUCCION DE LAS CUBIERTAS

	Antiespuma Silcolapse 5001	Antiespuma Hodag CN-31	Antiespuma agregado luego del "pre- sado"	Antiespuma agregado luego del "pre- sado"	
Materiales insaponificables (mg/g)	18	690	48	15	
Material 1 (mg/g)	-	1	58	32	
Cromatografía en capa delgada, R _f de sustancias reductoras 2	-	39	58	32	
Cromatografía en fase gaseosa, R _t de posibles tocoferoles 3	-	8.9	10.8	nd ⁵	
Máximas absorción ultravioleta, del compuesto sin oxidar (nm) del compuesto oxidado con AuCl ₄	-	293	293	275	
Contenido 4 (µg/g)	sma ⁵	260,268	260,268	sma	
Identidad	sma	262,268	α-toco ferol	nd	
	1	310	α-toco ferol	75	
	-	180	dimetil tocoles	nd	
	-	δ-toco ferol	compues to M	75	

157

1. Insoluble a 30 °C en un volumen de hexano (ml) igual a la masa de material saponificado.
2. Solvente, benceno, corrida dos veces en la misma dirección.
3. Condiciones cromatográficas, las indicadas en la figura 16.
4. Dosado por cromatografía en fase gaseosa.
5. R_t no determinado; sma, sin máximos de absorción.

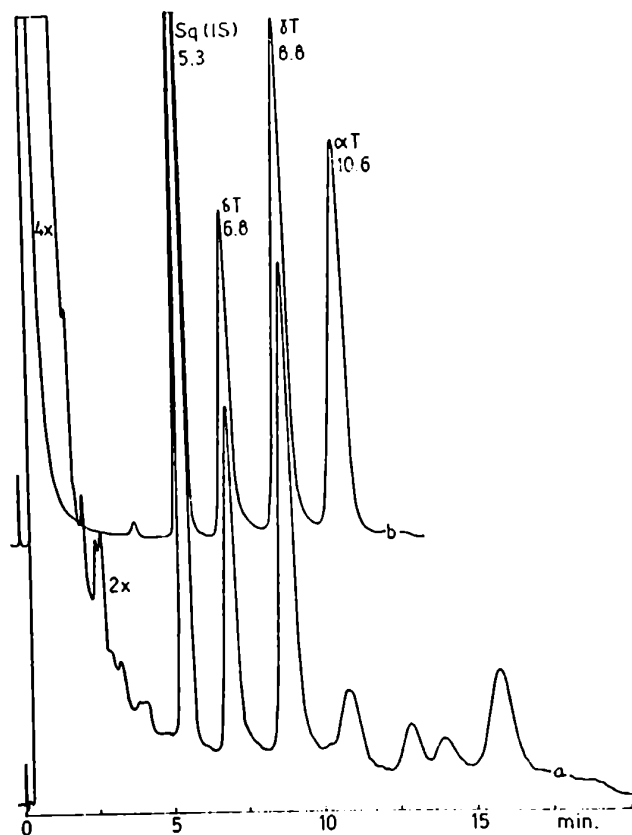


Figura 19. Cromatografía en fase gaseosa de la fracción del insaponificable del antiespuma Hodag CN-31 en la que deberían hallarse tocoferoles ($15 \leq R_f \leq 45$, en benceno), (fracción "toco").

Condiciones cromatográficas: las indicadas en la figura 16, excepto temperatura de columna, que fue 242°C .

Muestras inyectadas: a: fracción "toco", equivalente a $1.7\ \mu\text{l}$ de antiespuma, más $1.2\ \mu\text{g}$ de escualeno (Sq);
b: mezcla de estándares: escualeno (Sq), $1.2\ \mu\text{g}$; δ -tocoferol (δT), $0.45\ \mu\text{g}$; γ -tocoferol (γT), $0.9\ \mu\text{g}$ y α -tocoferol (αT), $0.9\ \mu\text{g}$.

En la muestra a se determinaron $0.13\ \mu\text{g}$ de α -tocoferol, $0.52\ \mu\text{g}$ de β -tocoferol más δ -tocoferol y $0.31\ \mu\text{g}$ de δ -tocoferol.

discrepancia puede explicarse por descomposición del tocoferol durante el almacenamiento del aceite antes de su empleo o durante la distribución del producto envasado (221); por otro lado el dato sobre cantidad de aceite agregado es aproximado, lo que se pudo observar en fábrica.

El contenido de otros tocoferoles o α -tocopherolquinona en la levadura empaquetada sería menor de 80 $\mu\text{g}/\text{gcs}$, según el contenido de estos compuestos en el aceite.

Otro hecho mostrado en estos estudios es que algunos antiespumantes comerciales pueden contener cantidades apreciables de tocoferol. El empleo de estos agentes en la producción de microorganismos es casi rutinario y ello puede explicar la presencia de tocoferoles en lotes de levadura cultivados en el laboratorio en medios de composición definida, que no son libres de vitamina E si se emplea alguno de esos antiespumantes.

El agregado de 0.1 ml de CN-31 por litro de cultivo equivale a agregar 12 μg tocoferoles/ gcs , si las células fijaran un 50 % del tocoferol presente, suponiendo un rendimiento de 2 gcs/litro de medio. Ya se ha explicado que las células microbianas en su continuo ir y venir a través del medio de cultivo, pueden actuar como concentradores de éstos compuestos, disolviéndolos en los lípidos de su pared celular. En los cultivos de laboratorio descritos en éste trabajo se evitó la producción excesiva de espuma y sus efectos reduciendo la aireación a los valores indicados en p.132 y llenando los botellones de cultivo no más de la mitad de su volumen. En caso de ser imprescindible el empleo de antiespumantes para producción de células para análisis de lípidos, se recomienda utilizar los de tipo silicona, con las reservas del caso

en cuanto a las dificultades que acarreen en el análisis de lípidos (235).

H. UBICROMENOL EN LEVADURAS

El ubicromenol es una de las sustancias reductoras cuya existencia y origen en levadura y otros Ascomicetos ha sido más estudiada. Entre los Ascomicetos ha sido descrito en *Saccharomyces cerevisiae* (47), *Candida utilis* (56, 57) y *Aspergillus fumigatus* (55), de los que fue extraído y aislado por diversos procedimientos, para algunos de los cuales "se conoce que no convierten ubiquinona a ubicromenol" (236) o al menos que "minimizan la posibilidad de isomerización" (57).

Se ha cuestionado (180) que sea un producto natural, es decir biosintetizado por las células que los contienen, en razón que puede producirse por ciclización de ubiquinona catalizada por KOH etanólico (237), alúmina activada (238) y aun por la sílica gel G (57) empleada para cromatografía en capa delgada, aunque en muy pequeña escala. El ubicromenol-6 aislado de lotes comerciales desecados de *Candida utilis* es ópticamente activo (56) hecho esgrimido como argumento para justificar su biosíntesis. Pero cultivos de laboratorio y células húmedas producidas comercialmente, de éste organismo, poseen 20 veces menos ubicromenol-6 que los lotes comerciales desecados, lo que resta valor al argumento mencionado. Sin querer tomar partido en la controversia sobre el origen del ubicromenol, se desea destacar que Morton y col. (239) aislaron de *Aspergillus fumigatus* marcado con ácido nevalónico -2- ^{14}C , ubicromenol-9 con actividad específica constante 1.4 veces mayor que

la ubiquinona del mismo organismo; si bien esta observación no ha sido discutida o mencionada en la literatura en apoyo a la síntesis celular de ubiquinona, se estima que es significativa.

En nuestros estudios se detectó ubiquinona por su reacción con el reactiva de Engel positiva y por su R_f , en todos los extractos de la levadura examinados. Se lo observa fácilmente en capas de sílica gel con Rodamina 6G con color violeta oscuro brillante. Este compuesto migra apenas por encima de ubiquinona en capa delgada (ver figura 9) y la mayor parte de él eluye de columnas de ácido silícico junto al α -tocoferol, con el sistema de eluyentes empleado (figura 11, compuesto UC).

Se aisló este compuesto de levadura de panadería comercial obtenida en el Instituto Pasteur, de S. cerevisiae 66 cultivada en glucosa 1% - urea, y de S. cerevisiae 59 R cultivada en glucosa 1% - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El material presente en extractos inseparables parcialmente libre de esteroides (procedimiento V) fue aislado y purificado por cromatografía en columna y capa delgada. La cantidad de compuesto cromatográficamente puro que se obtuvo fue: 3.0 $\mu\text{g/gcs}$, 1.2 $\mu\text{g/gcs}$ y 1.4 $\mu\text{g/gcs}$ para los lotes de levadura de panadería y S. cerevisiae 66 y 59 R respectivamente. Cuando se empleó el procedimiento IVa se hallaron cantidades casi equivalentes de ubiquinona-5 en los extractos PHES e IRC/sH. Green y col. (47) determinaron en el lote de levadura de panadería comercial examinado por ellos, 5.7 $\mu\text{g/gcs}$. En una cepa aislada de este producto y crecida sobre sacarosa no detectaron ubiquinona (su límite de detección parece ser igual o menor a 0.2 $\mu\text{g/gcs}$). Wahler y col. (49) no encontraron ubiquinona en sus estudios de la cepa 59 R.

El compuesto aislado de los lotes mencionados fue identificado por su espectro de absorción ultravioleta (54), el medio más rápido y específico para ello.

La curva de absorción se muestra en la figura 20; presenta máximos de absorción característicos a 274 y 330 nm, con marcadas inflexiones a 231 y 282 nm, en etanol, idénticos a los de ubicromenol-9 (54).

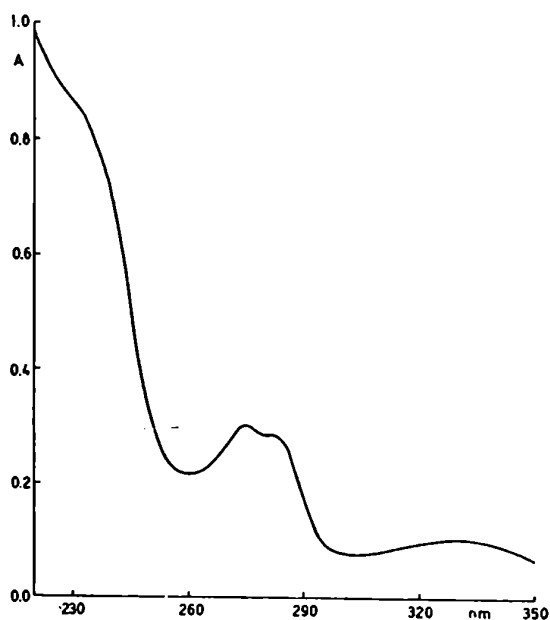


Figura 20. Espectro de absorción ultravioleta de ubicromenol aislado de levadura de panadería obtenida del filtro prensa.

Muestra : material UC proveniente de 14 gcs.

Contenido de ubicromenol en la muestra, 41 μ g.

CAPITULO VI.
CONSIDERACIONES FINALES.

A. El procedimiento analítico.

Purificación de tocoferoles por cromatografía
en fase gaseosa.

2. Seguridad.
3. Sensibilidad.
4. Especificidad.

B. Sustancias reductoras en levaduras.

1. Tocoferoles.
2. Otras sustancias reductoras.

C. Quinonas isoprenoides en levaduras.

D. Biosíntesis de tocoferol y filoquinona por levaduras.

E. Función del tocoferol en levaduras.

-A. EL PROCEDIMIENTO ANALITICO.

La combinación de procedimientos seleccionados y adaptados para el estudio de los lípidos insaponificables de levaduras, permite la determinación segura, sensible y específica de tocoferoles, quinonas y otros compuestos isoprenoides.

1. Purificación de tocoferoles por cromatografía
en fase gaseosa.

Se ha mostrado la imposibilidad de detectar tocoferoles y quinonas en los extractos crudos. Las cromatografías en columna y en capa permiten aislar compuestos cromatográficamente puros;

pero la reiteración de la cromatografía en capa para la purificación de dichos compuestos lleva a pérdidas apreciables de los mismos. El reemplazo de la cromatografía en capa delgada por la cromatografía en fase gaseosa para el aislamiento de fracciones puras, mejora significativamente la recuperación de tocoferoles y filoquinona.

El empleo de la cromatografía gas líquido para la purificación de compuestos de interés constituye la principal contribución analítica de éste trabajo. A lo largo de nuestro estudio se tuvo ocasión de aplicarla a extractos de distinta complejidad y con distinta proporción de tocoferoles. En el aceite agregado a la levadura para panificación fue posible determinar y aislar tocoferoles por cromatografía en fase gaseosa directamente del insaponificable, sin el empleo previo de otra forma de cromatografía. Para determinar tocoferoles en el antiespuma Hodag GN-31 fue necesario y suficiente aislar del insaponificable la fracción que contenía todos los tocoferoles, por cromatografía en capa delgada ($15 \leq R_f \leq 45$, en benceno) antes de la cromatografía en fase gaseosa; la baja proporción de tocoferoles en el insaponificable no permitió detectarlos directamente. Los extractos de levadura debieron ser fraccionados por cromatografía en columna, o debió aislarse en capa la fracción que contiene α -tocopherol ($35 \leq R_f \leq 45$), antes del aislamiento y/o determinación de α -tocopherol por cromatografía gas-líquido.

2. Seguridad.

La seguridad de la determinación de tocoferol depende fundamentalmente de dos factores: extractibilidad y estabilidad de

dicho compuesto, con y en los procedimientos de análisis.

Los valores relativos de extracción de tocoferol con los procedimientos ensayados (tabla 3) no dan una idea real de la extractibilidad del α -tocoferol. El tocoferol es de origen exógeno en el lote empleado para esos experimentos; casi con seguridad está localizado en las superficies celulares externas. Sin embargo se ha mostrado que el 70 % del compuesto con características de α -tocoferol detectado en levadura de panadería recogida del filtro prensa (p. 151), es extraído con solventes (procedimiento IVa). Si bien no se determinó que cantidad de tocoferol endógeno es extraído por saponificación de la masa celular húmeda (procedimiento V), se estima que debe ser cuantitativa en razón de la destrucción total de las estructuras celulares por hidrólisis alcalina.

Cada lote de levadura cultivado en nuestro laboratorio y la levadura comercial en paquete, fueron extraídos con solventes (procedimiento IVa) y por saponificación de la masa celular (procedimiento V). Por ello se estima que el 70 % del tocoferol endógeno pudo ser extraído.

El α -tocoferol es razonablemente estable en las condiciones de extracción y purificación empleadas. Cuando las células fueron extraídas por saponificación y el tocoferol fue aislado por cromatografía en columna y en capa delgada, se recuperó el 57% del tocoferol agregado a la masa húmeda. Cuando las células se extrajeron con solventes y se saponificó el extracto (procedimiento IVa) y luego se aisló el α -tocoferol (exógeno) por cromatografía en capa delgada, se recuperó el 67% del tocoferol exógeno (tabla 9).

Se estima entonces que fue factible aislar como mínimo el 45% del tocoferol endógeno de levaduras, con grado de pureza cromatográfico.

Si se emplea la determinación por cromatografía en fase gaseosa pueden obviarse etapas de purificación en columna y/o capa, con mayor recuperación de tocoferol, que llega a 83%. Puede estimarse que empleando esta alternativa fue posible determinar al menos el 62 % del tocoferol endógeno de levaduras.

Si bien estos valores pueden parecer bajos, es preciso considerar que se ha tenido en cuenta la extracción incompleta del tocoferol endógeno con solventes, o la sensibilidad del α -tocopherol a la saponificación, además de las pérdidas en las cromatografías en columna y en capa .

3. Sensibilidad.

Los límites de detección confiables fueron 2.5 μg y 35 ng (a atenuación 2×10^{-11} Amp/ μV) de tocoferol, por espectrofotometría ultravioleta y cromatografía gas-líquido respectivamente. Considerando la masa de células de que provenían las alícuotas ensayadas (40 gcs y 2 gcs, habitualmente) y las correcciones por pérdidas de tocoferol en las operaciones de aislamiento, ello equivale a detectar un mínimo de 100 ng/gcs y 30 ng/gcs por dosaje espectrofotométrico y cromatográfico en fase gaseosa. El dosaje cromatográfico pudo hacerse más sensible empleando una columna de mayor longitud con la que se logró mejor separación de contaminantes, siendo posible así inyectar alícuotas provenientes de hasta 8.8 gcs; el límite de detección llegó así hasta 8 ng/gcs, límite con el que se trabajó en los estudios de levadura obtenida del filtro prensa.

No se tienen noticias de que se hayan empleado límites de detección tan bajos para el análisis de lípidos isoprenoides por espectrofotometría o cromatografía en fase gaseosa.

Los límites de detección han sido señalados excepcionalmente en la literatura. Skinner y Stara (51) efectuaron sus análisis de α -tocoferol y α -tocoferolquinona con un límite de detección de 2.5 y 0.5 $\mu\text{g/gcs}$, respectivamente. Green y col. (47) sostienen que los "métodos de análisis disponibles ahora permiten detectar cantidades de tocoferol mucho menores que 1 $\mu\text{g/gcs}$ "; no especifican cuanto menos, pero la mínima cantidad dosada fue 200 ng α -tocoferol/gcs. Bishop y col. (166) indican que no contienen ubiquinona aquellas bacterias en las que no se detectó más de 800 ng/gcs. El límite de detección más bajo para esteroides parece ser el de Schubert y col. (240): 1 $\mu\text{g/gcs}$ (analizan 100 gcs). Matschiner y Amelotti (241) determinaron aproximadamente 10 ng menaquinona/gcs en hígado vacuno, para lo que extrajeron 125 kg de material húmedo!

4. Especificidad.

La caracterización cromatográfica en capa delgada y en fase gaseosa de un compuesto que se sospecha es tocoferol y de su producto de oxidación con AuCl_4^- , se considera suficiente para identificarlo con alguno de los metil-tocoles. Si a éstos criterios se agrega el espectro ultravioleta del material oxidado, se tiene un conjunto de caracteres superado en especificidad sólo por la espectrometría de masas. La adición de la caracterización espectrofotométrica permite la identificación de tocoferoles, ya que no se ha encontrado compuesto que presente todas esas características en la literatura. Al parecer ésta combinación

de cromatografía en capa delgada, gaseosa y espectrofotometría ultravioleta no ha sido empleada para la caracterización de tocoferoles.

En resumen, el esquema analítico propuesto no afecta la estabilidad de tocoferoles y quinonas más que los que fueron empleados para el análisis de levadura por otros autores y permite la detección, identificación y dosaje confiable de 8 ng de tocoferoles / gcs.

B. SUSTANCIAS REDUCTORAS EN LEVADURAS.

1. Tocoferoles.

Lotes de levadura de panadería en paquete, contienen 1.2 a 2.2 μ g de α -tocoferol/gcs.

No se detectó más de 100 ng/gcs de este compuesto en cepas aisladas de levadura comercial, o en las cepas de *Saccharomyces* y *Candida* empleadas por Green y col. (47), cultivadas en el laboratorio.

El análisis de lotes de células de estas cepas mostró que el envejecimiento del cultivo no estimula la síntesis del tocoferol; que el empleo de glucosa, sacarosa o un sustrato no fermentable como fuentes de carbono no favorece la producción de ese compuesto; que la lisis celular con dietilamina, previa a la extracción de lípidos, no aumenta la cantidad de tocoferol extraíble.

Tampoco se halló α -tocoferol en cantidad mayor que 180 ng / gcs en lotes de *Saccharomyces cerevisiae* 59 R, cepa empleada por Mahler y col. (49), cultivados en siete medios diferentes. Con 1 gcs, según el contenido determinado por esos autores, se hubiera obtenido cantidad suficiente para la detección cromatográfica

y espectrofotométrica del compuesto que ellos designan tocoferol: sin embargo no fue posible detectarlo en 40 gcs de los lotes cultivados en nuestro laboratorio.

La variedad de cepas y condiciones de cultivo empleadas en el laboratorio (uso de distintas fuentes de carbono y donores de electrones; uso de distintas fuentes de nitrógeno y cosecha en distintas fases de crecimiento) llevan a la conclusión que *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida guilliermondii* no sintetizan más de 80 ng/gcs de tocoferoles en condiciones aerobias, aun en aquellas de máxima y mínima actividad respiratoria. Tampoco se estimuló la síntesis de tocoferoles en cultivos envejecidos.

La levadura de panadería comercial recogida en filtro prensa, en fábrica, contiene cincuenta veces menos α -tocoferol que la levadura empaquetada. Esto descarta que condiciones de cultivo en fábrica no reproducidas en laboratorio, estimulen la biosíntesis de tocoferol.

En un aceite agregado en fábricas a la masa húmeda antes del empaquetado, se determinó 650 μ g de α -tocoferol/g aceite; es decir, el α -tocoferol presente en la levadura ya empaquetada es de origen exógeno. El análisis de un antiespuma empleado frecuentemente para el cultivo de microorganismos, permitió establecer que contiene 75 μ g de α -tocoferol/g aceite; ello puede determinar que células cultivadas en su presencia incorporan más de 1 μ g de α -tocoferol/gcs, nuevamente de origen exógeno.

En el curso de estos estudios no se detectó β -, γ - o δ -tocoferoles en cantidad mayor que 100 ng/gcs en los lotes de levadura. Tampoco se detectaron en dichos lotes dímeros o trímeros de

α -tocoferol, el isómero estructural (XIV c ó d) del α -tocoferol o ésteres de tocoferoles en cantidad mayor a 2 $\mu\text{g/gcs}$. Dada la relativa estabilidad del α -tocoferol en las condiciones de extracción y purificación empleadas (p106), indicaría ello que las levaduras no sintetizan niveles de los compuestos citados, superiores a los que se indicaron.

En el aceite agregado a la levadura de panadería comercial no se halló más de 10 μg de dimetiltocoles o δ -tocoferol/g de aceite. En cambio en el antiespuma CN-31 se determinó 255 μg de dimetil-tocoles y 180 μg de δ -tocoferol/g de aceite.

La disparidad de valores y hasta la confusión existente en la literatura acerca del contenido de tocoferol en levaduras, pueden atribuirse no sólo al uso de procedimientos de extracción y aislamiento no bien valorados y a una masa de muestras insuficiente, sino a contaminaciones que pueden ocurrir si no se emplean medios de cultivos libres de tocoferoles. Para que un medio cumpla este requisito es necesario asegurar que sus componentes, incluso antiespuma, lubricantes, etc., sean de origen sintético; en caso contrario debe verificarse la ausencia de tocoferol en los que sean productos de origen natural.

Otro motivo determinante de esa confusión es la caracterización incompleta de compuestos designados "tocoferol", que puede llevar a confundir con, y dosar como tales, a sustancias reductoras del reactivo de Emmerie-Engel distintas de los tocoferoles.

Debe señalarse que en los estudios publicados tampoco se han definido fase de crecimiento y condiciones de cultivo de las muestras analizadas. Ello es aconsejable en razón de la variación del contenido de ubiquinona (tabla 11) y los cambios en la estructura

celular (230) observados en el curso de nuestro trabajo al modificar las condiciones ambientales.

El efecto que puede tener sobre la alimentación animal el empleo de levaduras en reemplazo de otras fuentes de proteínas depende del proceso de producción que se siga y de la composición de la dieta. El requerimiento de vitamina E por las especies animales puede estimarse entre 10 y 500 μg α -tocoferol/kg peso; depende fundamentalmente del contenido de ácidos grasos poli-insaturados y selenio en la dieta (59). Según nuestros resultados la cantidad de α -tocoferol detectada cuando se emplea la melaza de caña de azúcar como fuente de carbono, es insuficiente para el desarrollo normal de aves y mamíferos. Sin embargo el agregado de aceites vegetales convenientemente seleccionados a la levadura o directamente a los alimentos balanceados, evitaría esa deficiencia. Sin embargo como el tratamiento de los componentes durante la elaboración de alimentos balanceados y su almacenamiento pueden alterar el contenido de tocoferol (221), sólo el análisis de la dieta sometida a las condiciones de comercialización habituales asegura el contenido de tocoferoles.

2. Otras sustancias reductoras.

Nuestros estudios confirman la presencia de ubiquinol-5 entre los lípidos insaponificables extraídos de levaduras. En estos extractos se determinó 1 a 3 μg de ubiquinol/gos.

El compuesto D (figuras 9 y 11) observado en todos los extractos obtenidos por saponificación de células levaduríferas, se comporta cromatográficamente (columna; de adsorción y partición en capa del

gada) como 2-hexaprenil-fenol (XV, n = 6) (50,62). Su espectro de absorción al ultravioleta presenta un máximo (en etanol y hexano) a 280 nm, que no coincide exactamente con el descrito para prenil-fenoles ($\lambda_{\text{máx}}$ 272 y 279 nm) (215). El contenido del compuesto D en levadura de panificación es de 0.6 $\mu\text{g/gcs}$ (calculado con el coeficiente de extinción del α -tocoferol). Spiller y col (50) no detectaron éste compuesto en sus estudios sobre biosíntesis de ubiquinona por *Saccharomyces*; estimamos que la masa de células analizada no fue suficiente para detectarlo química o radioquímicamente: la aireación del cultivo durante el período de incubación con precursores marcados, determina que todo intermediario biosintético se transforme en ubiquinona.

Otros tres compuestos reductores (designados M, T y U en la figura 11) fueron observados en los extractos de lípidos de levadura para panificación y de *Saccharomyces cerevisiae* 59 R (cultivada en glucosa -extracto de levadura-peptona). La cantidad de ellas es menos que la del compuesto D. No se intentó su identificación. Por su espectro ultravioleta el compuesto T podría ser la sustancia S_{282} descrita por Green y col. (242).

Ninguno de estos compuestos reductores se halló en el aceite agregado a la levadura para panificación antes de su empaquetamiento.

En nuestro estudio no se detectaron 2-n-prenil-6-metoxi-fenoles (XVI), quinolen y el compuesto reductor de Forbes y György (243, 244), en cantidad mayor a 1 - 2 $\mu\text{g/gcs}$.

C. QUINONAS ISOPRENOIDES EN LEVADURAS.

No se detectó cantidad mayor que 100 ng de α -tocoferolquinona/gcs y mayor que 50 ng de filoquinona/gcs, en los lotes de levadura examinados.

En *Saccharomyces cerevisiae* cultivada con diversas fuentes de carbono y nitrógeno, en aerobiosis, se halló ubiquinona-6 y en *Candida guilliermondii* ubiquinona-7. El contenido de ubiquinona varía según las condiciones de cultivo; en las muestras analizadas se halló 65 a 275 μ g/gcs. Estos valores son comparables con los determinados por Green y col. (47), Mehler y col. (49), Morton y col. (56) y Spiller y col. (50).

De *Saccharomyces cerevisiae* se aislaron otras dos quinonas (compuestos H e I) identificadas tentativamente como ubiquinona-7 y ubiquinona-8. La presencia de ubiquinona-7 en *Saccharomyces* fue descrita por Folkers y col. (245); no se tiene noticia de un anuncio similar para ubiquinona-8. No se detectaron prenil-quinonas (XVII a XIX) en cantidad mayor que 1 μ g/gcs.

D. BIOSÍNTESIS DE TOCOPEROLO Y FILOQUINONA POR LEVADURAS.

Si bien la caracterización del compuesto de levadura de panadería del filtro prensa, identificado como α -tocoferol, deja pocas dudas sobre su identidad, no puede asegurarse a éste nivel de los estudios, su biosíntesis por *Saccharomyces*.

La posibilidad de responder a esta cuestión mediante determinación radioquímica de α -tocoferol marcado desde precursores radioactivos en lugar de la determinación química empleada en este

trabajo, resolvería la duda del origen endógeno o exógeno. Pero "a priori" no pueden esperarse resultados satisfactorios por esta línea. En efecto, poco es lo que se conoce acerca la biosíntesis de tocoferol (3) a tal punto que aun no se ha establecido el precursor más cercano al núcleo. Se ha propuesto sin ningún fundamento experimental (42) que podría ser el 2-tetraprenil-fenol. Los estudios más adelantados fueron realizados con brotes de maíz (246-248); se sabe que el α -tocoferol, su quinona y γ -tocoferol se marcan con ácido ($G-^{14}C$) shiquímico, con ($U-^{14}C$; anillo- ^{14}C y $\beta-^{14}C$) fenilalanina, con ($CH_3-^{14}C$, 3H) metionina y con ($2-^{14}C$) mevalónico; no se marcan con p-hidroxi- ($U-^{14}C$) benzoico ni con ($\beta-^{14}C$) cinámico. Con tirosina ($U-^{14}C$; $\beta-^{14}C$ y $\alpha-^{14}C$) ocurre un hecho singular: se inhibe la síntesis de α -tocoferol en brotes de maíz, a tal punto que no se lo detecta al final de la incubación, aunque sí se marcan α -tocoferolquinona y γ -tocoferol. Acido shiquímico, fenilalanina, metionina y tirosina marcan también a ubiquinonas, plastoquinonas y naftoquinonas; únicamente con ($\alpha-^{14}C$) tirosina hubo marcación significativa en 3- β -hidroxi-esteroles y escualeno; el ácido mevalónico marca considerablemente a esteroles y alcoholes, hidrocarburos y quinonas isoprenoides.

De estos precursores el más próximo al núcleo del α -tocoferol, el ácido shiquímico, no puede ser empleado con levaduras pues su pared celular es casi impermeable a este compuesto (50); podría emplearse tirosina, fenilalanina o quizás sería mejor el p-hidroxi-fenil-pirúvico, si la célula fuera permeable a éste cetoácido, ya que se sospecha que la marcación desde los dos aminoácidos procede via el cetoácido (246,247).

Al desconocimiento de los precursores próximos al núcleo debe agregarse las dificultades resultantes de la poca incorporación desde los aminoácidos: sólo 0.15 % y 0.06 % de la radioactividad de L-(U-¹⁴C) tirosina y de L-(U-¹⁴C) fenilalina, respectivamente, se incorporaron al material celular de brotes de maíz (247).

La síntesis de filoquinona es tan poco conocida como la de tocoferoles. Por lo que se conoce de la síntesis de menaquinonas por bacterias y de juglona y lawsona por plantas, ocurriría vía el ácido shiquímico, pero el núcleo naftalénico se formaría desde el ácido corísmico por condensación con un derivado del ácido glutámico (249,250). Se desconoce si el ácido corísmico penetra en las células de levadura. El ácido L-(U-¹⁴C) glutámico podría ser un marcador adecuado; pero este compuesto se deriva hacia varias vías metabólicas, lo que lleva a suponer que muy poca radioactividad se incorporaría a una posible filoquinona.

Por ello se presume que la detección radioquímica de tocoferoles y filoquinonas no ofrece menos dificultades ni incertidumbres que la detección química. Este es el motivo que llevó a no intentarlo.

Llama la atención la posible incapacidad de levaduras para sintetizar tocoferoles y filoquinona, por tratarse de organismos eucarióticos. Estos compuestos cumplen alguna función en tejidos de animales superiores, a juzgar por los severos síntomas de deficiencia observados en animales alimentados con dietas carentes de vitaminas E y K. Las levaduras desarrollan sin limitaciones en medios libres de estas vitaminas. Si se acepta, en base a las observaciones efectuadas con organismos eucarióticos no fotosintéticos

superiores (animales), que ambas desempeñan alguna función a nivel celular, no se explica su presunta ausencia en levaduras.

Pudo la evolución y diferenciación de la célula de los organismos superiores llevar al requerimiento de compuestos de estructura algo especializada, como los tocoferoles y filoquinona, ausentes en los protistas eucarióticos? Al parecer la situación que se ha dado a lo largo de la evolución ha sido otra: compuestos sintetizados por protistas eucarióticos son requeridos como vitaminas o factores de crecimiento por algunos organismos eucarióticos más evolucionados; esto es lo que ha sucedido con las vitaminas solubles en agua y los aminoácidos esenciales.

Por el momento también quedan pendientes los interrogantes acerca si tocoferoles y filoquinona son requeridos para procesos celulares muy específicos que no se dan en todas las células, o al menos no en todas las condiciones de crecimiento celular. Si serán requeridos para la actividad funcional no fotosintética de células organizadas en tejidos, exclusivamente. O si será que su función puede ser realizada por un grupo de sustancias similares presentes unas en ciertas células y otras en las restantes. Ya se ha sugerido esta posibilidad al observarse que *Anacystis nidulans* es la única de las algas azul-verdes y de los organismos que realizan fotosíntesis con liberación de O_2 , analizados, que carecen de α -tocoferol y α -tocoferolquinona; la función de α -tocoferolquinona en ese proceso puede quizás ser realizada por una hidroxifiloquinona que no está en las otras especies analizadas (10,47).

Nuestro trabajo estuvo orientado a la detección de tocoferoles y filoquinona. Pero los compuestos investigados pueden no ser la forma activa de las vitaminas E y K. Martius y col (4,251) han

sostenido reiteradamente que ninguno de los tocoferoles es la forma activa de la vitamina E. Bien puede suceder que el tocoferol se transforme rápidamente en la forma activa una vez sintetizado y aun que la biosíntesis de la forma activa no pase por el tocoferol. La forma activa puede ser algún otro componente de los lípidos isoprenoides; o hallarse ligada a proteínas (enzimas) de modo que no sea extraída con solventes. Esta hipótesis no es descabellada; se ha descrito una proteína extraíble de mitocondrias que lleva ligado un compuesto quinoide o reductor no identificado (68) y también formas solubles en agua de vitamina K (252) y ergosterol (253). Esto puede determinar que los compuestos activos no sean extraídos con los procedimientos habituales en el estudio de lípidos.

E. FUNCION DEL TOCOPFEROL EN LEVADURAS.

El menor contenido de tocoferoles en tejidos animales es de 0.6 $\mu\text{g/gcs}$ (44, 181). La menor cifra hallada en la literatura para organismos que sintetizan tocoferoles (vegetales) es 0.7 μg (α -tocoferolquinona)/gcs (51). Entre las vitaminas solubles en agua, la menos abundante en las células es biotina: en levadura de panadería cultivada sobre melazas hay 1 - 2 $\mu\text{g/gcs}$; en *Candida*, 0.2 - 3 $\mu\text{g/gcs}$ (234); en *Aerobacter aerogenes*, 4 $\mu\text{g/gcs}$ (254). Estos datos llevan a pensar si puede desempeñar algún papel en el funcionamiento celular un compuesto que se encuentre a una concentración de 40 ng/gcs. Si bien no es posible dar respuesta definida a esta cuestión, se pueden aportar algunos elementos de juicio en torno a ella.

La función del tocoferol en levadura no parece ligada con la actividad respiratoria celular. Su biosíntesis no es estimulada por condiciones en que esa actividad aumenta, ni acompaña la depresión de enzimas de los ciclos de Krebs o del ácido glioxílico, lo que sí ocurre con ubiquinona-6 (tabla 11 y ref. 225 y 226). La cantidad del presunto tocoferol presente en levadura, no permite aceptar la hipótesis de su posible participación en el sistema de transporte de electrones de levadura, ya que se ha estimado que el contenido de un compuesto que intervenga en ella debe ser superior a 1 $\mu\text{g/gcs}$ (166) o 5 $\mu\text{g/gcs}$ (p. 35) aproximadamente. El contenido de ubiquinona-6 en levadura (ver tabla 11) está de acuerdo con esta función.

Tampoco parece aceptable que cumpla un papel protector de las membranas celulares, evitando la peroxidación de los ácidos grasos no saturados.

El contenido de ácidos grasos aumenta con la actividad respiratoria y también lo hace la proporción de no saturados en *Saccharomyces cerevisiae* (202, 255). Sin embargo condiciones que favorecen el desarrollo de membranas citoplasmáticas y aumentan el contenido de ácidos grasos no saturados, no estimularon la síntesis de tocoferol.

El 79 % de los ácidos grasos -87 mg/gcs (202)- son insaturados (257), fundamentalmente linoleico y oleico; se puede calcular que hay alrededor de 4×10^9 moléculas de ácidos grasos/célula. Es difícil concebir que 1.000 moléculas de tocoferol (ver más abajo) pueden evitar la peroxidación de tantas moléculas de ácidos grasos aunque ella ocurriera en muy baja proporción.

Queda en pie sin embargo una posible función catalítica del tocoferol, no establecida aun. La levadura de panadería comercial contiene 5.6×10^{10} células/gcs. Con este dato, el peso molecular del α -tocoferol y el número de Avogadro puede establecerse que 40 ng de α -tocoferol/gcs equivalen a unas 1.000 moléculas de α -tocoferol/célula. Estimamos que este número de moléculas es suficiente para jugar alguna función catalítica, como cofactor. Suponiendo que cada molécula de cofactor operara con una de enzima, y para ésta un peso molecular de 6×10^5 g/mol, puede calcularse que esa enzima sería el 0.005 % del peso celular seco, cifra que no parece excesivamente baja. Tampoco es bajo el número de moléculas por célula para un intermediario metabólico de corta vida media. En razón del bajo contenido de α -tocoferol en aerobiosis, se estima que ese papel de cofactor no debe ser alguno vinculado a la síntesis de macromoléculas o producción de energía en presencia de oxígeno, salvo que el tocoferol no sea la forma activa de la vitamina E.

Una situación muy cercana a la del tocoferol es la de filoquinona. Su función en la coagulación sanguínea en mamíferos es bien conocida; a pesar de ello la presencia en tejidos animales de una sustancia con actividad de vitamina K sólo había sido detectada por ensayo biológico (257). Recién en el año 1968 se aisló de hígado de conejo y pollo una sustancia similar a filoquinona (258); se encuentra en esas especies en cantidad aproximada a $1 \mu\text{g}$ y $0.6 \mu\text{g/gcs}$ respectivamente. De hígado vacuno después de varios ensayos infructuosos (259) se aisló e identificó 8 ng de menaquinona/gcs (23,241).

No se ha discutido la relación entre esa cantidad de naftoqui

nona y la función biológica. Tampoco se ha establecido si es sintetizada por el tejido; se ha señalado que la vitamina K de tejidos de rumiantes puede ser de origen exógeno, provenir de la dieta o ser sintetizada por la flora del rumen o la intestinal (260). Es interesante destacar que la forma activa de la vitamina K no pareciera ser filoquinona ni las menaquinonas identificadas, sino menaquinona-4 (22,23, 261), compuesto que solo se ha detectado radioquímicamente.

BIBLIOGRAFIA.

1. Crane F.L. (1965). En "Biochemistry of Quinones" (Morton R.A., ed., Academic Press, London), p. 183.
2. Pennock J.F. (1966). Vitam. Horm. 24, 307
3. Threlfall D.R. (1971). Vitam. Horm. 29, 153.
4. Martius C. y Furer E. (1963). Biochem. Z. 336, 474.
5. Whistance G.R. y Threlfall D.R. (1970). Phytochemistry 9, 213.
6. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. (1964). Publicadas en Biochim. biophys. Acta 107, 5 (1965) y en J. biol. Chem. 241, 2989 (1966).
7. Bucke C., Leech R.M., Hallaway M. y Morton R.A. (1966). Biochim. biophys. Acta 112, 19.
8. Egger K. (1965). Planta 64, 41.
9. ... (1967). Archs Biochem. Biophys. 120, 503.
10. Henninger M.D., Bhagavan H.N. y Crane F.L. (1965). Archs Biochem. Biophys. 110, 69.
11. Dilley R.A. y Crane F.L. (1963). Plant Physiol. 38, 452.
12. Carr N.G. y Hallaway J.M. (1966). En "Biochemistry of Chloroplasts" (Goodwin T.W. ed., Academic Press, New York), p. 159.
13. Redfearn E.R. y Powls R. (1968). Biochem. J. 106, 50 P.
14. Maroc J., De Klerk H. y Kamen M.D. (1968). Biochim. biophys. Acta 162, 621
15. Arnon D.I. y Crane F.L. (1965). En "Biochemistry of Quinones" (ya citado), p. 433.
16. Morton R.A. y Phillips W.E.J. (1959). Biochem. J. 73, 427.
17. Diplock A.T., Green J., Edwin E.E. y Bunyan J. (1960). Biochem. J. 76, 563.
18. Matschiner J.T. y Amelotti J.M. (1968). J. Lipid Res. 9, 176.
19. Hamilton J.W. y Dallam R.D. (1968). Archs Biochem. Biophys. 123, 514

20. Glover J. (1965). En "Biochemistry of Quinones" (ya citado), p. 207.
21. Doisy E.A. y Matschiner J.T. (1965). En "Biochemistry of Quinones" (ya citado), p. 317.
22. Billeter M. y Martius C. (1960). Biochem. Z. 333, 430.
23. Daggart W.V. y Matschiner J.T. (1969). Biochemistry, Easton 8, 1141.
24. Kröger A. y Klingenberg M. (1970). Vitam. Horm. 28, 533.
25. Polglase W.T., Pun W.T. y Withaar J. (1966). Biochim. biophys. Acta 118, 426.
26. Kroger A., Dadák V., Klingenberg M. y Diemer F. (1971). Eur. J. Biochem. 21, 322.
27. Threlfall D.R. y Goodwin T.W. (1967). Biochem. J. 103, 573 y 589.
28. Chance B. (1965). En "Biochemistry of Quinones" (ya citado), p. 459.
29. Kroger A. y Dadák V. (1969). Eur. J. Biochem. 11, 328.
30. Klingenberg M. y Kroger A. (1966). Biochem. Z. 344, 317.
31. Cox G.B., Newton N.A., Gibson F., Snowwell A.K. y Hamilton H.A. (1970). Biochem. J. 117, 551.
32. Powls R. (1970). FEBS Lett. 6, 40.
33. Peake I.R., Dunphy P.J. y Pennock J.F. (1970). Phytochemistry 2, 1345.
34. Klubes P. y Brodie A.F. (1966). Biochemistry, Easton 5, 4171.
35. Powls R. y Redfearn E.R. (1969). Biochim. biophys. Acta 172, 429.
36. Folkers K., Smith J.L. y Moore H.W. (1965). Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol. 24, 79.
37. Green J. (1958). J. Sci. Food Agr. 9, 801.
38. Booth V.H. y Hobson-Frohcock A. (1961). J. Sci. Food Agr. 12, 251.
39. Slover H.T. (1971). Lipids 6, 291.
40. Powls R. y Redfearn E.R. (1967). Biochem. J. 104, 24 C.

41. Green J., Price S.A. y Care L. (1959). *Nature*, Lond. 184, 1339.
42. Olsen R.K., Daves G.D., Moore H.W., Folkers K., Parson W.W. y Rodney H. (1966). *J. Am. chem. Soc.* 88, 5919.
43. Edwin E.E., Diplock A.T., Bunyan J. y Green J. (1961). *Biochem. J.* 79, 91.
44. Bunyan J., Edwin E.E., Diplock A.T. y Green J. (1961). *Nature*, Lond. 190, 637.
45. Swick R.W. y Kaumann C.A. (1952). *Anal. Chem.* 24, 758.
46. Forbes M. y Gyorgy P. (1957). *J. Nutrit.* 63, 461.
47. Diplock A.T., Green J., Edwin E.E. y Bunyan J. (1961). *Nature*, Lond. 189, 749.
48. Kubin H. y Fink H. (1961). *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 63, 280.
49. Mahler H.R., Neiss G. Slonimski P.P. y Mackler B. (1964). *Biochemistry*, Boston 3, 893.
50. Miller G.M., Farrell D.R. y Whistance G.R. (1968). *Archs Biochem. Biophys.* 125, 786.
51. Skinner W.A. y Sturm P.A. (1968). *Phytochemistry* 7, 1893.
52. Cinquina C.L. (1968). *J. Bact.* 95, 2436.
53. Vance J. y Bentley R. (1970). *Fedn Proc. Fedn Am. Soc. exp. Biol.* 29, 936, Abstract N° 3938.
54. Laidman D.L., Morton R.A., Paterson J.Y.F. y Pennock J.F. (1960) *Biochem. J.* 74, 541.
55. Packter N.M. y Glover J. (1962). *Biochim. biophys. Acta* 58, 531.
56. Stevenson J., Hayward P.J., Hemming P.W. y Morton R.A. (1962). *Nature*, Lond. 196, 1291.
57. Mc Hale D., Green J., Diplock A.T. (1962). *Nature*, Lond. 196, 1293.
58. Ollis W.D. y Sutherland I.C. (1961). En "Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds" (Ollis, W.D., ed., Pergamon Press, London), p. 74.
59. Symposium on Vitamin E and Metabolism, Karrer P., Chairman, (1962). *Vitam. Horn.* 20, 27, 541, 559, 621, 633 y 645.

60. Scott M.L. (1966): Vitam. Horm. 24, 633.
61. Whistance R.G., Threlfall D.R. y Goodwin T.W. (1967). Biochem. J. 105, 145.
62. Whistance G.R., Brown B.S. y Threlfall D.R. (1970). Biochem. J. 117, 119.
63. Young I.G., Mc Carrn L.M., Stroobant P. y Gibson F. (1971). J. Bact. 105, 769.
64. Olson R.E. (1966). Vitam. Horm. 24, 551.
65. Smith J.L. y Alford J.A. (1970). Lipids 5, 795
66. Ramen T.S., Sharma B.V.S., Jayaraman J. y Ramasarma T. (1965). Archs Biochem. Biophys. 110, 75.
67. Sottocasa G.L. y Crane F.L. (1965). Biochemistry, Easton 4, 305.
68. Ozawa T., Yamanaka N., Hagihara M. y Yagi K. (1970). J. Biochem. Tokio, 67, 737.
69. Snyder C.D. y Rapoport H. (1968). Biochemistry, Easton 7, 2318.
70. Hamilton J.A., Cox G.B., Looney F.D. y Gibson F. (1970). Biochem. J. 116, 319.
71. Weaver E.C.. (1968). Ann. Rev. Plant Physiol. 19, 283.
72. Weber M.M., Hollocher T.C. y Rosso G. (1965). C. biol. Chem. 240, 1776
73. Brodie A.F. y Watanabe T. (1966). Vitam. Horm. 24, 447.
74. Vilkas M. y Lederer E. (1965). Bull. Soc. Chim. France, p. 2505.
75. Di Mary S.J., Snyder C.D. y Rapoport H. (1968). Biochemistry, Easton 7, 2301.
76. Parson W.W. y Rudney H. (1966). Biochemistry, Easton 5, 1013.
77. Boguth W. (1969). Vitam. Horm. 27, 1
78. Vasington F.D., Reichard S.M. y Nason A. (1960). Vitam. Horm. 18, 43
79. Green J. y Mc Hale D. (1965). En "Biochemistry of Quinones" (ya citado), p. 261.
80. Wiss C. y Gloor E. (1966). Vitam. Horm. 24, 575

81. Jones R.G.W. (1967). *Biochem. J.* 103, 714.
82. Cox G.B., Gibson F. y Pittard J. (1968). *J. Bact.* 95, 1591.
83. Sasarman A., Purvis P. y Portelance V. (1974). *J. Bact.* 117, 911.
84. Hatch C.D. (1968). *Vitam. Horm.* 26, 501.
85. Sasarman R.H. y Taylor A.W. (1972). *Ann. Rev. Biochem.* 41, 179.
86. Horwitt M.K., Century B. y Zeeman A.A. (1963). *Am. J. Clin. Nutr.* 12, 99.
87. Molenaar I., Hommes F.A., Braams W.G. y Polman H.A. (1968). *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 982.
88. Oski F.A. y Barnes L.A. (1967). *J. Pediatrics* 70, 211.
89. Ritchie J.H., Fish M.B., Mc Masters V. y Grossman M. (1968). *N. Engl. J. Med.* 279, 1185.
90. Harris P.L. y Embree N.D. (1963). *Am. J. Clin. Nutr.* 13, 385.
91. Scott M.L. (1966). *Vitam. Horm.* 24, 633.
92. Hötzel D. y Barnes R.H. (1966). *Vitam. Horm.* 24, 115
93. Vest M. (1966). *Vitam. Horm.* 24, 649.
94. Deutsch E. (1966). *Vitam. Horm.* 24, 665.
95. Tappel A.L. (1962). *Vitam. Horm.* 20, 493.
96. Mc Cay P.E., Foyer J.L., Pfeifer P.M., May H.E. y Gilliam J.M. (1971). *Lipids* 6, 297.
97. Gruger E.H. y Tappel A.L. (1970). *Lipids* 5, 326.
99. Slater E.C. (1962). *Vitam. Horm.* 20, 521
100. El-Khatib S., Chenu H.A., Carpenter M.P., Trucco R.E. y Caputto R. (1964). *Nature, Lond.* 201, 188.
101. Dam H. (1962). *Vitam. Horm.* 20, 527.
102. Green J. y Bunyan J. (1969). *Nutr. Abs. Rev.* 39, 321.
103. Molenaar L., Vos J., Jager F.C. y Hommes F.H. (1970). *Nutr. Metab.* 12, 358.

104. Anderson O.R., Roels O.A., Dreher K.D. y Schulman J.H. (1967). *J. Ultrastruct. Res.* 19, 600.
105. Imani R.H., Reiser S. y Christiansen P.A. (1970). *J. Nutr.* 100, 101.
106. Diehl J.F. (1966). *Biochim. biophys. Acta* 115, 239.
107. Bernhard K., Leinsinger S. y Pedersen W. (1963). *Helv. Chim. Acta* 46, 1767.
108. Bieri J.G. y Andrews E.L. (1964). *Biochem. biophys. Res. Commun.* 17, 115.
109. Lucy J.A. y Glauert A.M. (1964). *J. Mol. Biol.* 8, 727.
110. Lucy J.A. (1964). *Theor. Biol.* 7, 366.
111. Whitaker J.A., Fort E.G., Vimokesant S. y Dinning J.S. (1967). *Am. J. Clin. Nutr.* 20, 783.
112. Olson R.E. y Carpenter P.C. (1967). *Adv. Enzyme Regul.* 5, 325.
113. Schwarz K. (1962). *Vitam. Horm.* 20, 463.
114. Schwarz K. y Baumgartner W. (1970). En "The Fat Soluble Vitamins" (De Luca H.F. y Suttie J.W., eds., University of Wisconsin Press, Madison), p. 317.
115. Nair P.P., Murty H.S. y Groseman N.R. (1970). *Biochim. biophys. Acta* 215, 112.
116. Barnhardt M.I. y Anderson G.F. (1962). *Biochem. Pharmacol.* 9, 23.
117. Barnhardt M.I., Noonan S.M. y Anderson G.F. (1970). En "The Fat Soluble Vitamins" (ya citado), p. 399.
118. Suttie J.W. (1969). *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* 28, 1696.
119. Hill R.B., Gaetani S., Paolucci A.M., Rama Rao P.B., Alden R., Ranhotra G.S., Shah D.V., Shah V.K. y Johnson B.C. (1968). *J. biol. Chem.* 243, 3930.
120. Suttie J.W. (1967). *Archs Biochem. Biophys.* 118, 166
121. Li L.F., Kipfer R.K. y Olson R.E. (1970). *Archs Biochem. Biophys.* 137, 494.
122. Johnson H.V., Martinovic J. y Johnson B.C. (1971). *Biochem. biophys. Res. Commun.* 43, 1040.

123. Bernacki R.J. y Bosmann H.B. (1970). Biochem. biophys. Res. Commun. 41, 498.
124. Martius C. (1966). Vitam. Horm. 24, 441
125. Martius C. y Nitz-Litzow D. (1954). Biochim. biophys. Acta 13, 152.
126. Morrison M., Hollocker T., Murray R., Marinetti G. y Stotz E. (1960) Biochim. biophys. Acta 41, 334.
127. Crane F.L., Widmer C., Lester R.L. y Hafezi Y. (1959). Biochim. biophys. Acta 31, 476.
128. Lester R.L. y Fleischer S. (1959). Biochim. biophys. Acta 47, 358.
129. Szarkowska L. (1966). Archs Biochem. Biophys. 113, 519.
130. Green D.E. y Wharton D.C. (1963). Biochem. Z. 338, 335.
131. Green D.E. y Tzagoloff A. (1966). Archs Biochem. Biophys. 116, 293.
132. Krozer A. y Klinzenger M. (1966). Biochem. Z. 344, 317.
133. Redfearn E.C. (1966). Vitam. Horm. 24, 465.
134. Green D.E. y Mac Lennan D.H. (1969). Bio Science 19, 213.
135. Chance B. y Redfearn E.R. (1961). Biochem. J. 80, 632.
136. Chance B. (1965). En "Biochemistry of Quinones" (ya citado), p. 460.
137. Baum H., Rieske J.S., Silman H.I. y Lipton S.A. (1967). Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 57, 798.
138. Baum H., Silman H.I., Rieske J.S. y Lipton S.H. (1967). J. biol. Chem. 242, 4876.
139. Green D.E. y Brieley G.P. (1965). En "Biochemistry of Quinones" (ya citado), p. 405.
140. Wosilait W.D. (1960). J. biol. Chem. 235, 1196.
141. Wosilait W.D. (1961). Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol. 20, 1005.
142. Colpa-Boonstra J.P. y Slater E.C. (1958). Biochim. biophys. Acta 27, 122.
143. Cox G.B., Snowwell A.M. y Gibson F. (1968). Biochim. biophys. Acta 153, 1.

144. Bragg P.D. y Hou C. (1967). Archs Biochem. Biophys. 119, 194.
145. White D.C. (1965). J. biol. Chem. 240, 1387.
146. Benziman M. y Goldhamer H. (1968). Biochem. J. 108, 311.
147. Swank R.T. y Burris R.H. (1969). J. Bact. 98, 311.
148. Knook D.L. y Planta R.J. (1972). J. Bact. 105, 483.
149. Krogstad D.J. y Howland J.L. (1966). Biochim. biophys. Acta 118, 189.
150. Erickson S.K. y Parker G.L. (1969). Biochim. biophys. Acta 180, 56.
151. Asano A. y Brodie A.F. (1964). J. biol Chem. 239, 4280.
152. Kashket E. y Brodie A.F. (1963). Biochim. biophys. Acta 78, 52
153. Kashket E. y Brodie A.F. (1963). J. biol. Chem. 238, 2564.
154. Knowles C.J. y Redfearn E.R. (1968). Biochim. biophys. Acta 162, 348.
155. Ruzicka F.J. y Crane F.L. (1970). Biochem. biophys. Res. Commun. 38, 249.
156. Chance B., Parsons D. y William G.R. (1964). Science 143, 136.
157. Stadtman T.C. (1958). Biochem. Z. 331, 46.
158. Stadtman T.C. (1962). Archs Biochem. Biophys. 99, 36
159. Hafezi Y. (1959). Biochim. biophys, Acta 31, 502.
160. Brodie A.F. (1965). En "Biochemistry of Quinones" (ya citado), p. 355.
161. Watanabe T, y Brodie A.F. (1966). Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 56, 940.
162. Evans H.M. y Bishop K.S. (1922). J. Metabolic Research 1, 319 y 335.
163. Fernholz E. (1938). J. Am. chem. Soc. 60, 700.
164. Dam H. (1929). Biochem. Z. 215, 475.
165. Maguigan W.H. y Walker B. (1940). Biochem. J. 34, 804.
166. Bishop D.H.L., Pandya R.P. y King E.K. (1962). Biochem J. 83, 606.

167. Emmerie A. y Engel C. (1938). *Rec. trav. Chim.* 57, 1351
168. Cowlishaw B. y Franco L. (1957). *Biochim. biophys. Acta* 23, 663.
169. Bollinger H.R. y Köning A. (1969). En "Thin Layer Chromatography" (Stahl E., ed., Springer-Verlag, New York), p. 259.
170. Merton R.A. (1967). *Wiss. Veroff. Deut. Ges. Ernähr.* 16, 1.
171. Brown B.S. (1967). *Chemistry in Britain* 3, 524.
172. Johnson R.W. (1955). En "Methods of Biochemical Analysis" (Glick D.E., ed., J.Wiley, New York) Vol II, p. 153.
173. Vitamin E Panel, Analytical Methods Committee, Society for Analytical Chemistry, London. (1959). "Report". *Analyst* 84, 356.
174. Kofler M., Sommer P.F., Bollinger H.R., Schmidli B. y Vecchi M. (1962). *Vitam. Horm.* 20, 407.
175. Lang K. (1967). En "Tocopherols" (Lang K., ed., Steinkopff, Darmstadt).
176. Bunnell R.H. (1967). En "The Vitamins" (György P. y Pearson W.N., eds., Academic Press, New York), Vol. VI, p. 134.
177. Bunnell R.H. (1971). *Lipids* 6, 345.
178. Crane F.L. y Dilley R.A. (1963). En "Methods of Biochemical Analysis" (ya citado), Vol. XI, 279.
179. Sommer P. y Kofler M. (1966). *Vitam. Horm.* 24, 349.
180. Ramasarma P. (1968). En "Advances in Lipid Research" (Paoletti R. y Kritchevsky D., eds., Academic Press, New York), Vol. 6, p. 107.
181. Edwin E.L., Diplock A.T., Bunyan J. y Green J. (1960). *Biochem. J.* 75, 459.
182. Eddy A.A. (1958). En "Chemistry and Biology of Yeasts" (Cook A.H., ed., Academic Press, New York), p. 157.
183. Longley R.P., Rose A.H. y Knights B.A. (1968). *Biochem. J.* 108, 401.
184. Pumphrey A.N. y Hedfearn G.N. (1969). *Biochem. J.* 76, 61.
185. Morimoto H., Iida I., Tanaka T. y Matsunoto N. (1967). *Liebigs Ann. Chem.* 708, 240.

186. Green J., Price S.A. y Edwin E. (1959). British Patent 801.390. Chemical Abstracts 53, 6543 a.
187. Lester R.L. y Crane F.L. (1959). Biochim. biophys. Acta 32, 492.
188. Davies B.H., Jones D. y Goodwin T.W. (1963). Biochem J. 87, 326.
189. Varios. (1961). En "Ciba Symposium on Quinones in Electron Transport" (Folstenholme G.E.W. y O'Connor C.M., eds., Churchill Ltd., London) p. 196.
190. Crane F.L. (1961). En "Ciba Symposium on Quinones in Electron Transport" (ya citado), p. 36.
191. Lester R.L. y Crane F.L. (1959). J. biol. Chem. 234, 2169.
192. Raman T.S., Sharma B.V.S., Jayaraman J. y Ramasarma T. (1965). Archs Biochem. Biophys. 110, 75.
193. Diplock A.T., Green J., Bunyan J. y McHale D. (1966). Br. J. Nutr. 20, 95.
194. Chow C.K., Draper H.H. y Csallany A.S. (1966). Anal. Biochem. 32, 81.
195. Scharf S.S. y Simpson K.L. (1968). Biochem. J. 106, 311.
196. Shunk C.H., Trenner N.R., Hoffman C.H., Wolf D.E. y Folkers K. (1960). Biochem. biophys. Res. Commun. 2, 427.
197. Sturm P.A., Parkhurst R.M., Skinner W.A. (1966). Anal. Chem. 38, 1244.
198. Porter W.L., Levasseur L.A. y Henick A.S. (1971). Lipids 6, 1.
199. Ibrahim R.K. y Towers G.H.N. (1960). Archs Biochem. Biophys. 87, 125.
200. Hamilton J.W. y Dallam R.D. (1968). Archs Biochem. Biophys. 123, 514.
201. Barron E.J. y Henahan D.J. (1958). J. biol. Chem. 231, 493.
202. Kovac L., Subík J., Russ G. y Kollar K. (1967). Biochim. biophys. Acta 144, 94.
203. Appleton G.S., Kieber R.J. y Payne W.J. (1955). Appl. Microbiol. 3, 249.
204. Hirsh J. y Ahrens E.H. (1958). J. biol. Chem. 233, 311.

205. Green J.P. y Dem H. (1954). Acta chem. Scand. 8, 1354.
206. Krebs K.G., Heusser D. y Wimmer H. (1969). En "Thin Layer Chromatography" (ya citado), p. 854.
207. Lester R.L. y Ramasarma T. (1959). J. biol. Chem. 234, 672.
208. Cook R.P., Kliman A. y Fisser L.F. (1954). Archs Biochem. Biophys. 52, 439.
209. Cook R.P. y Rattray B.M. (1968). En "Cholesterol" (Cook R.P., ed., Academic Press, New York), p. 117.
210. Beaton F.W., Lowe J.S. y Morton R.A. (1957). Biochem. J. 67, 208.
211. Bishop D.H.L., Pandya K.P. y King H.K. (1962). Biochem. J. 83, 606.
212. Nilsson J.L.G., Daves G.D. y Folkers K. (1968). Acta Chem. Scand. 22, 200 y 207.
213. Nilsson J.L.G. y Folkers K. (1968). 22, 400.
214. Nilsson J.L.G., Farley T.M. y Folkers K. (1968). Analyt. Biochem. 23, 422.
215. Whistance G.R., Dillon J.F. y Threlfall D.R. (1969). Biochem. J. 111, 461.
216. Lester R.L., White D.C. y Smith S.L. (1964). Biochemistry, Easton 3, 949.
217. Dilley R.A. y Crane F.L. (1963). Analyt. Biochem. 5, 531.
218. Dilley R.A. (1964). Analyt. Biochem. 7, 240.
219. Dorfman L. (1953). Chem. Revs. 53, 47.
220. Wagner H. y Dengler B. (1962). Biochem. Z. 336, 380.
221. Harris R.S. (1962). Vitam. Horm. 20, 603.
222. Polakis E.S. y Bartley J. (1965). Biochem. J. 97, 284.
223. Crane F.L. (1962). Biochemistry, Easton 1, 510.
224. Pennock J.F., Neiss G. y Mahler H.R. (1962). Biochem. J. 85, 530.
225. Polakis E.S., Bartley J. y Meek G.S. (1964). Biochem. J. 90, 369.

226. Polakis E.S., Bartley W. y Meek G.A. (1965). *Biochem. J.* 97, 298.
227. Klein H.P. (1955). *J. Bact.* 69, 290
228. Mahler H.R., Mackler B., Grandchamp S. y Slonimski P.P. (1964). *Biochemistry, Easton* 3, 668.
229. Somlo M. (1962). *Biochem. biophys. Acta* 65, 333.
230. de Billerbeck, M.A. y Aoki A. (1971). *Actas V Jornadas Argentinas de Micología, Rosario*, p. 9.
231. Cunningham N.F. y Morton R.A. (1959). *Biochem. J.* 72, 92.
232. Mervyn L. y Morton R.A. (1959). *Biochem. J.* 72, 106.
233. Hall G.S. y Laidman D.L. (1968). *Biochem. J.* 108, 465.
234. Pyke M. (1958). En "The Chemistry and Biology of Yeasts" (ya citado), p. 535.
235. Tornabene T.G., Kates M., Gelpi E. y Oro J. (1968). *J. Lipid Res.* 10, 294.
236. Packter N.M. y Glover J. (1960). *Nature, Lond.* 187, 413.
237. Draper H.H. y Csallany S.S. (1960). *Biochem. biophys. Res. Commun.* 2, 307.
238. Links J. y Tol O. (1960). *Biochim. biophys. Acta* 38, 193.
239. Burgos J., Butterwoth P.H.W., Hemming P.W. y Morton R.A. (1964). *Biochem. J.* 91, 22P.
240. Schubert K., Rose G., Wachtel H., Hörhold C. e Ikekawa N. (1968). *Eur. J. Biochem.* 5, 246.
241. Matschiner J.T. y Amelotti J.M. (1968). *J. Lipid Res.* 9, 176.
242. Edwin E.E., Green J., Diplock A.T. y Buryan J. (1961). *Nature, Lond.* 189, 750.
243. Forbes M., Zillken F., Roberts G. y György P. (1958). *J. Am. chem Soc.* 80, 385.
244. Meisinger M.A.P., Kuehl F.A., Rickes E.L., Brink N.G. y Folkers K. (1959). *J. Am. chem. Soc.* 81, 4979.
245. Doyle Daves G., Muraca R.F., Whittick J.S., Friis P. y Folkers K. (1967). *Biochemistry, Easton* 6, 2861.

246. Whistance G.R., Threlfall D.R. y Goodwin T.W. (1967). Biochem. J. 105, 145.
247. Whistance G.R. y Threlfall D.R. (1967). Biochem. biophys. Res. Commun. 28, 295.
248. Whistance G.R. y Threlfall D.R. (1970). Biochem. J. 117, 593.
249. Robins D.J., Campbell I.M. y Bentley R. (1970). Biochem. biophys. Res. Commun., 39, 1098
250. Dansette P. y Azerad R. (1970). Biochem. biophys. Res. Commun. 40, 1090.
251. Martius C. (1962). Vitam. Horm. 20, 457.
252. Lev M. y Milford K. (1966). Nature, Lond. 210, 1120.
253. Adams B.G. y Tarks L.W. (1968). J. Lipid Res. 9, 8.
254. Thompson R.C. (1942). Texas Univ. Publ. 4237, 87.
255. Bloomfield D.K. y Bloch K. (1960). J. biol. Chem. 235, 337.
256. Suzuki Y., Uda Y. y Okui S. (1965). Yakugaku Zasshi 85, 72.
257. Green J.P., Sondergaard E. y Dam H. (1956). Biochim. biophys. Acta 19, 182.
258. Hamilton J.W. y Dallem R.D. (1968). Archs Biochem. Biophys. 123, 514
259. Teggart W.V. y Matschiner J.T. (1969). Biochemistry, Easton 8, 1141.
260. Matschiner J.T. (1970). J. Nutr. 100, 190.
261. Dialameh G.H., Yekundi K.G. y Olson R.B. (1970). Biochem. biophys. Acta 223, 332.

Billerbeck

[Handwritten signature]