Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

# Aislamiento e identificación de glucósidos en el germen del trigo

Moreno, María Alcira

1963

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:
Moreno, María Alcira. (1963). Aislamiento e identificación de glucósidos en el germen del trigo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1173_Moreno.pdf

Cita tipo Chicago:
Moreno, María Alcira. "Aislamiento e identificación de glucósidos en el germen del trigo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1173_Moreno.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

1173

1173

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales

# AISLAMIENTO é IDENTIFICACION DE GLUCOSIDOS EN EL GERMEN DEL TRIGO

Maria Alcira Moreno

RESUMEN DE LA TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN QUIMICA

ORIENTACION BIOLOGICA

1963

# RESUMEN

Del germen de trigo se aislan tres glucósidos fenólicos que posteriormente se detallan.

Se describe en primer lugar la técnica de aislamiento utilizada, luego los métodos empleados para la determinación de su estructura y finalmente la aplicación de éstos a los glucósidos del germen.

Especial énfasis se da a los métodos de ambientación por el hecho y sus características, los que permiten una aproximación muy grande para la determinación de la estructura de estos glucósidos fenólicos.

Por acción del agua de bromo diluída, los glucósidos dan como la espirolina, el p-hidroxifenil estirósido, el p-hidroxifenil glucósido y el derivado de coniferina de la alcohol-cinnamílico y coniferil-glucósido el cual, al decir de Bogorad e Ottoni.

De los glucósidos que tienen estas fenólicas hidroxilo-hidrogenadas no se conocen detalles, o sea al incompleto.

El estudio de los compuestos glucosídicos en [illegible] de la p-hidroxifenilina cuando se trata con agua de bromo [illegible] sobre el p-hidroxifenil y luego la formación de bromopicrina por [illegible] con agua bromada en cloroformo [illegible].

El caso del resorcinol glucósido, la liberación de glucosa es producida en forma gradual y cuando se agrega agua de bromo. Los productos [illegible] en los espectros así como los obtenidos por cromatografía, evidencian la

Padrino de Tesis

Dr. Carlos E. Cardini

# R E S U M E N

Del germen de trigo se aislan tres glucósidos fenólicos cuya estructura se determina.

Se describe en primer lugar la técnica de aislamiento utilizada, luego los métodos empleados para la determinación de su estructura y finalmente la aplicación de éstos a los glucósidos del germen.

Especial énfasis se da a los métodos de oxidación por el bromo y por oxidasas vegetales, los que permiten una aproximación muy grande para la determinación de la estructura de estos glucósidos fenólicos.

Por acción del agua de bromo diluída, los glucósidos tales como la arbutina, el p-hidroxifenil celobiósido, el p-hidroxifenil genciobiósido y el derivado monometílico de la hidroquinona liberan inmediata y cuantitativamente el resto hidrato de carbono o metanol.

En los glucósidos que tienen todas funciones hidroxilo bloqueadas no se produce reacción, o esta es incompleta.

El estudio de los espectros ultravioletas comprueba la formación de la p-benzoquinona cuando se trata con agua de bromo arbutina, hidroquinona, p-etoxi o p-metoxifenol y luego la formación de hidroquinona por reducción con agua saturada con adhidrido sulfuroso.

El caso del resorcinol glucósido, la liberación de glucosa se produce en forma gradual y requiere un mayor agregado de agua de bromo. Los cambios producidos en los espectros así como los observados por cromatografía, evidencian la

formación de derivados bromados y finalmente un compuesto cetónico con una doble ligadura. Se estudia además la acción sobre otros fenoles y sus respectivos glucósidos.

En cuanto a la acción de la fenol oxidasa, se observa la liberación del resto de hidrato de carbono cuando se incuban con esta enzima glucósidos tales como el resorcinol glucósido, la arbutina, el hidroxifenil genciobiósido y celobiósido.

Con glucósidos como el fenil glucósido, el p-metoxifenil glucósido y genciobiósido o el metoxihidroquinona glucósido no hay liberación de glucosa y no se observa cambio alguno. Los espectros de los productos de incubación de los diversos fenoles y glucósidos con la fenol oxidasa muestran cuando se incuba hidroquinona o arbutina la formación del espectro característico de la hidroxi p-benzoquinona; la metoxihidroquinona da lugar al máximo de las p-quinonas, mientras que su glucósido no cambia de máximo: el resorcinol glucósido no da un espectro con máximo característico y la resorcina no experimenta ningún cambio.

La reactividad de la fenol oxidasa con glucósidos como la arbutina y el resorcinol glucósido se explica de acuerdo a la reactividad de esta enzima frente a los fenoles con sustituyentes $-CH_3$ ó $-OCH_3$ en posición meta o para con respecto al grupo hidroxilo libre.

Tanto la acción de la fenol oxidasa como la del agua de bromo diluída se usan en la identificación de los glucósidos aislados del germen de trigo. Estos se aislaron a partir de un extracto acuoso de germen previamente desengrasado, el que luego se purifica por adsorción en carbón y los glucósidos se aislan por cromatografía en papel. Por elución del papel se aislaron finalmente tres glucósi-

dos fenólicos.

El glucósido I, que corre menos en cromatografía, se obtiene en forma de un precipitado y es identificado como un trisacárido glucósido. El resto trisacárido es liberado cuantitativa e inmediatamente por acción del agua de bromo, hidrolizado por el ácido sulfúrico a glucosa la que es identificada específicamente por acción de la glucosa oxidasa. En cuanto a la parte del compuesto fenólico, éste es identificado como la metoxihidroquinona en tres solventes diferentes. Los espectros ultravioletas del glucósido natural son además idénticos a los espectros del glucósido preparado sintéticamente.

Por acción de la glucosa oxidasa, tanto el glucósido natural como el sintético no reaccionaron y los espectros de los productos de reacción no presentaron cambios en el máximo.

En cuanto a los otros dos glucósidos (II y III), se identificaron como disacárido glucósido (II) y monosacárido glucósido (III).

La parte de hidrato de carbono es identificada como genciobiósa (glucósido II) y como glucosa (glucósido III). Los espectros de estos glucósidos son idénticos a los del trisacárido glucósido. Por hidrólisis y cromatografía se comprueba que el fenol de estos glucósidos es también la metoxihidroquinona.

547.9
M 893
3 ejs
1173

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales

# AISLAMIENTO é IDENTIFICACION DE GLUCOSIDOS EN EL GERMEN DEL TRIGO

Maria Alcira Moreno

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL

TITULO DE DOCTOR EN QUIMICA

ORIENTACION BIOLOGICA

1963

TESIS: 1173

FCEYN-BA

Padrino de Tesis

Dr. Carlos E. Cardini

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Carlos E. Cardini por su dirección, su constante interés y sus consejos.

Al Dr. Luis F. Leloir y a todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas que han hecho posible la realización de este trabajo con su permanente ayuda.

Al Dr. M. Vernengo por la realización de los espectros infrarrojos.

Al Dr. E. Recondo por la corrección del manuscrito.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme concedido una beca durante la realización de este trabajo.

# I N D I C E

INTRODUCCION

Generalidades . . . . . 1

Biosíntesis de glucósidos . . . . . 4

PARTE EXPERIMENTAL

Métodos . . . . . 8

Preparación de sustratos . . . . . 11

Aislación y ensayo de la fenol oxidasa . . . . . 15

PRIMERA PARTE

Acción del bromo sobre los fenoles y los glucósidos fenólicos . . . . . 17

SEGUNDA PARTE

Acción de la fenol oxidasa de papa sobre los fenoles y glucósidos fenólicos . . . . . 30

TERCERA PARTE

Aislamiento e identificación de los glucósidos del germen de trigo . . . . . 36

CONCLUSIONES . . . . . 48

BIBLIOGRAFIA . . . . . 50

# INTRODUCCION

## Generalidades

Los glucósidos forman, desde un punto de vista biológico, un grupo importante de compuestos dentro de los hidratos de carbono. Su distribución en el reino vegetal es muy grande. En 1926 Bourquelot (1) encontró glucósidos en 205 de las 281 especies de Fanerógamas examinadas, y parece un hecho general que la mayoría de los fenoles de bajo peso molecular estén en las plantas en forma de glucósidos (2).

Aunque mucho más extendidos en las plantas, los glucósidos también se encuentran en los insectos, en las paredes celulares de los microorganismos, etc.

El monosacárido que forma parte más comúnmente de la estructura de los glucósidos, es la D-glucosa, pero casi todos los monosacáridos naturales han sido encontrados como glucósidos en plantas. Sólo tres de los azúcares más comunes (D-galactosa, D-manosa y D-fructosa) están raramente formando parte de los glucósidos. Algunos desoxiazúcares han sido a menudo hallados, especialmente el 6-desoxi-L-manosa y el 6-desoxi-L y D-galactosa.

En los glucósidos fenólicos naturales, el componente hidrato de carbono, puede estar constituído por un único residuo o por una cadena corta de varios monosacáridos. En el caso de un solo residuo la aglucona está unida al átomo de carbono glucosídico del monosacárido y este tiene estructura piranósica y, salvo algunas excepciones, la unión es $\beta$. Cuando se encuentran varios restos de monosacáridos, éstos pueden formar una cadena no reductora. En los glucósidos fenólicos simples con más de un resto de monosacárido siempre el resto glucosa está unido directamente al fenol.

De los glucósidos fenólicos naturales, la arbutina (hidroquinona β-D-glucósido) y la metilarbutina (p-metoxifenil β-D-glucósido) son los más simples y conocidos. Se los encuentra generalmente juntos en una gran variedad de plantas, principalmente en las Ericaceas.

Otros glucósidos fenólicos simples son : la salicina, la populina, y la coniferina. La salicina se encuentra en la corteza del sauce y del álamo, hallándose acompañada en esta última planta por la populina. La salicina es el O-hidroximetil-fenil β-D-glucósido, y la populina es el 6-benzoil derivado de la salicina (3).

Freudenberg y colaboradores (4) señalaron recientemente la importancia de la coniferina (glucósido del alcohol 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico) y de otros glucósidos relacionados con este alcohol, que ya eran conocidos hace mucho tiempo. Estos autores demostraron que los fenoles de estos glucósidos, liberados por hidrólisis, son dehidrogenados muy fácilmente por enzimas y durante el proceso se polimerizan a materiales del tipo de las ligninas.

La vainillina (4-hidroxi 3-metoxi benzaldehido) se encuentra en las plantas como glucósido y en particular en la chaucha de vainilla comercial. El glucósido y otros glucósidos relacionados han sido obtenidos por síntesis química. El -glucósido de la vainillina es el glucósido más fácilmente hidrolizado por la emulsina de almendras.

En el trigo han sido aislados glucósidos tales como el de la vainillina (5) y el de la metoxihidroquinona (6), este último obtenido del germen.

Virtanen y colaboradores aislaron en plantas de maíz y de trigo un grupo

de glucósidos cuyas agluconas son derivados de la 1-4 benzoxacina (7,8,9).

Bardinskaya (10) ha encontrado en diversas variedades de trigo toda una serie de derivados fenólicos, libres y combinados, estando estos últimos en mayor proporción. Entre los compuestos aislados se encuentran : los ácidos felúrico, cumárico, cafeico, vainillico y sus respectivos aldehidos.

Cuando las cadenas glucosídicas están formadas por dos restos de glucosa, las uniones más comunes son la $\beta$ 1-2(soforosa) y la $\beta$ 1-6(genciobiosa).

Se ha demostrado recientemente que los diglucósidos que tienen como resto de hidrato de carbono a la soforosa (2-$\beta$-D-glucopiranosil-D-glucosa) están asociados comúnmente en la naturaleza con pigmentos del tipo de las antocianinas y las flavonas. El estudio de la estructura de estos glucósidos ha sido realizado por Harborne (11). La soforosa, lejos de ser un azúcar raro, es el más común de los disacáridos que contienen glucosa asociada con los flavonoides.

La genciobiosa es el otro disacárido de glucosa que ha sido encontrado como componente de los flavonoides y antocianidinas glucósidos. En hojas y flores de plantas de Prímula sinensis han sido aislados, por Harborne, genciobiósidos de la pelargonidina, cianidina, peonidina, petunidina y malvidina. En pétalos de Tritonia también ha sido aislado un genciobiósido : pelargonidina 3-genciobió - sido (12).

Glucósidos con un resto de hidrato de carbono formado por un trisacárido que contiene tres restos de glucosa han sido aislados también en Prímula sinensis (11). Se han aislado triglucósidos que tienen como aglucona a la pelargonidina, peonidina, petunidina y malvidina. Es de hacer notar el hecho de que en esta planta (Prímula sinensis) estén presentes los mono, di, y triglucósidos de

una misma aglucona.

En una nota previa se comunicó el aislamiento en el germen de trigo (13) de un glucósido con tres restos de glucosa junto con glucósidos con sólo dos y un resto de glucosa y la misma aglucona.

En esta Tesis se realiza un estudio completo de su estructura y de algunos de los métodos que se han empleado para llevar a cabo esta investigación.

Biosíntesis de los glucósidos

Mucho se conoce acerca de la biosíntesis de los carbohidratos (14) y de los compuestos fenólicos (15), pero desde hace muy poco tiempo se conoce el mecanismo de la formación de los derivados glucosídicos del fenol, aunque parece existir bastante evidencia de que el resto monosacárido se uniría al fenol de una de las últimas etapas de la síntesis para formar el glucósido.

La primera biosíntesis in vivo de glucósidos fenólicos, fué la que realizaron Ciamician y Ravenna (16), quienes trataron plantas jóvenes de maíz con fenoles y obtuvieron los glucósidos respectivos. Así aislaron la salicina (O-hidroximetil-fenil-$\beta$-glucósido) utilizando la saligenina (o-hidroxi-bencilalcohol). Posteriormente se demostró que se trataba de un isómero de la salicina.

Miwa y colaboradores (17) mojando discos de hojas en soluciones de glucosa que contenían varios compuestos fenólicos, obtuvieron los glucósidos de la vainillina, el aldehido salicílico y la hidroquinona. La cantidad de glucósido formado se incrementaba cuando en lugar de la glucosa se usaba el glucosa 1-fosfato. La trituración de las hojas causaba pérdida de la actividad, pero se obtuvo una preparación activa libre de células a partir de semillas de poroto

(Vacia faba) y del pino azul (Pinus cavita). Por diálisis se perdía la activi - dad, pero ésta era restablecida por adición de la mezcla de los nucleótidos de la levadura y de adenosina trifosfato.

Trabajos posteriores de Hutchinson y colaboradores (18) han confirmado mu - chas de estas observaciones. Estos investigadores estudiaron principalmente la formación de la florina (floroglucinol $\beta$-glucósido) en discos de hojas de manzano, los cuales habían sido infiltrados con soluciones de floroglucinol y de glucosa radioactiva. En forma similar se obtuvieron diferentes glucósidos con hojas de varias especies de plantas, usando floroglucinol y otros fenoles.

Pridham (19) ha estudiado la formación de glucósidos por la absorción de soluciones acuosas de fenoles de bajo peso molecular por los tallos de las plantas de porotos. En estas condiciones los fenoles tales como el catecol, la hidroquinona, el resorcinol y el floroglucinol eran todos convertidos por la planta en los $\beta$-glucósidos respectivos. El pirogalol y la hidroxihidroquinona eran también glucosilados pero con estos dos fenoles no ha sido bien establecido el número y la posición de los restos de glucosa introducidos. Aunque se ha comprobado que el fenol es altamente tóxico para el poroto, no se ha demostrado en esta planta, la formación de su glucósido. Recientemente Nystrom y colaboradores (20) han demostrado la formación del fenil-$\beta$-glucósido cuando las hojas de cebada o trigo son alimentadas con trazas de fenol. Cuando los tallos de las plantas de porotos fueron alimentados con saligenina, se formó el O-hidroxi-bencil $\beta$-glucósido y no salicina. Resultados similares se obtuvieron cuando se hacen germinar semillas de porotos entre trozos de algodón empapados en soluciones de los distintos feno-

les (21) obteniéndose por este camino mayor cantidad de glucósidos.

El dador de glucosa en la biosíntesis de glucósidos es probablemente la uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), nucleótido que se sabe está muy distribuído en las plantas (22). Cardini y colaboradores (23) han encontrado síntesis de glucósidos incubando distintos fenoles con UDP-glucosa en presencia de una enzima de germen de trigo. El uso de otros dadores potenciales de glucosa, tales como : glucosa 1-fosfato, sacarosa, celobiosa, o maltosa fueron también investigados , pero en ningún caso hubo formación de glucósidos. La enzima de germen de trigo no actúa cuando el sustrato es un fenol que tiene un solo hidroxilo libre.

Recientemente (24) han sido probados otros nucleótidos azúcares como dadores de glucosa y se encontró que el adenosina difosfato glucosa es mejor dador que el UDP-glucosa, por el contrario cuando se usó deoxi-adenosina-difosfato-glucosa, UDP-maltosa o un isómero de UDP-glucosa en el cual la glucosa está unida a través de la posición 6, los resultados fueron negativos. La guanosina difosfato glucosa y la citidina difosfato glucosa actúan como dadores de glucosa en muy pequeña proporción.

La preparación enzimática de porato también cataliza la glucosidación de los fenoles por el UDP-glucosa (21).

Se han encontrado los uridina difosfato derivados de galactosa, xilosa, arabinosa y el ácido glucurónico en plantas y es probable que estos compuestos intervengan en la formación de los glucósidos que poseen los azúcares correspondientes.

La primera biosíntesis in vivo de disacáridos-glucósidos del fenol fué

realizada por Miller (25), quien trató plantas de gladiolo y de tomate con O-clorofenol y aisló O-clorofenil-β-genciobiósido. Miller también obtuvo 2;2;2 tricloroetil-β-genciobiósido tratando diversas especies de plantas con hidrato de cloral.

Pridham y colaboradores (26) obtuvieron la síntesis de p-hidroxifenil-β-genciobiósido por incubación de la arbutina con una preparación dializada de proteínas de corteza de Populus tremuloides, de almendras dulces o de semillas de porotos. Las incubaciones de la enzima con hidroquinona y glucosa o con hidroquinona y genciobiósa no producen la formación ni de arbutina ni de genciobiósido. Esta evidencia sugiere que un mecanismo involucrado en la biosíntesis de disacáridos glucósidos, es una transglucosidación catalizada por la β-glucosidasa, actuando como dador y aceptor de moléculas de glucosa la arbutina. En este mecanismo no intervienen las coenzimas de la uridina. Cardini y Yamaha (23) encontraron cuando incubaban un extracto de germen de trigo con hidroquinona y UDP-glucosa que había formación de p-hidroxifenil-β-genciobiósido junto con arbutina, o sea que parecería que hubiera dos mecanismos para la biosíntesis de diglucósidos fenólicos. Los resultados conocidos parecen indicar que in vivo el camino en el que intervienen los nucleótidos azúcares es el más importante.

Recientemente Nagahama y colaboradores han descripto la formación del β-laminaribiosiloxiazoximetano, neocasin A, por transglucosidación del β-glucosiloxiaziximetano en presencia de la emulsina de cicadacea (27), y también la formación de un oligosacárido mayor, neocasin C, identificado como un tetrasacárido glucósido, el β-laminaritetraosa oxiazoximetano (28).

# PARTE EXPERIMENTAL

## MATERIALES

El germen de trigo utilizado fué el producto comercial. Este germen consiste principalmente del embrión, muy poco escutelo, algo de harina y apreciable cantidad de salvado. El hidroxifenil $\beta$-celebiósido fué donado por el Dr.Kocourek de la Universidad de Charles, Praga, a quien agradecemos su amabilidad. La arbutina, el orto, meta y para-metoxifenol y el orto, meta y para-etoxifenol son compuestos comerciales.

## METODOS

### Determinación cuantitativa de fenoles

Se usó el método de Folin y Ciocalteu (29). Este es un ensayo muy sensible para la valoración de los fenoles libres y se basa en la reacción entre el ácido fosfotungstomolíbdico y los fenoles, en medio alcalino, originándose compuestos de color azul intenso. En condiciones experimentales bien precisas el color desarrollado es proporcional a la cantidad de fenol. Usando como testigo la arbutina, puede determinarse cualquier mono o difenol, pues no hay variación en la coloración.

### Medición de azúcares por su poder reductor

Se efectuó por el método de Somogyi y Nelson (30). El método se basa en el poder reductor de los azúcares sobre las sales cúpricas dando compuestos cuprosos que reducen el ácido arsenomolíbdico del reactivo de Nelson dando un color azul.

Determinación de azúcares totales

Método de Dubois y colaboradores (31). Esta reacción sirve para la valoración de azúcares simples, oligosacáridos y polisacáridos libres o combinados, y se basa en la medición del color producido cuando estas sustancias se tratan en condiciones determinadas con ácido sulfúrico concentrado y fenol. Se usa como testigo una solución de glucosa.

Valoración de glucosa por acción de la glucosa oxidasa (32)

El método se basa en la oxidación específica de la glucosa por la glucosa oxidasa dando ácido glucónico y agua oxigenada y luego la determinación de esta última con la peroxidasa en presencia de un aceptor cromógeno de oxígeno. El reactivo utilizado es el siguiente :

125 mgr glucosa oxidasa (Sigma), 5 mgr peroxidasa (Mann Research Laboratories) y 0.5 ml de orto-dianisidina al 1 % en etanol 95°, se llevan a 100 ml con buffer fosfato pH 7.0, 0.25 molar.

Se toman 0.2 ml de la muestra a analizar y se le agregan 2.5 ml del reactivo. Los tubos se incuban en un baño a 37° C durante 1 hora y se leen en un colorímetro a 420 m$\mu$ utilizando un testigo de glucosa.

Revelado de fenoles y glucósidos fenólicos en papel

Se usó el reactivo de Pridham (33). Este es una solución de p-nitroanilina diazotada, la que pulverizada sobre el cromatograma reacciona con los fenoles con hidroxilos libres dando compuestos azoicos de diferentes coloraciones.

Revelado de fenoles con el reactivo de Burke y colaboradores (34)

Consiste en una solución saturada de nitrato de plata en agua y luego diluída

con acetona. Con este reactivo es posible diferenciar los distintos fenoles por la diferencia que presentan en la coloración y en el tiempo de aparición de las manchas.

Revelado de azúcares y glucósidos

Se usa el reactivo de nitrato de plata en medio alcalino (35).

Solventes de cromatografía

Como solvente de cromatografía general para azúcares y glucósidos se usó la mezcla de n-butanol, piridina, agua (6:4:3 volúmenes respectivamente) (36). Cuando se cromatografía en papel Whatman N° 1 y N° 4, los cromatogramas se desarrollan en forma descendente durante 16 horas y durante 30 horas cuando se cromatografía en papel Whatman N° 17.

Para la identificación de los fenoles se usaron los siguientes solventes :

1°) Benceno, ácido acético, agua (8:2:1 volúmenes respectivamente) (37). Se forman dos capas; se agita bien para saturar con agua la capa no acuosa y luego se elimina la capa acuosa por decantación. Se desarrollan los cromatogramas en forma ascendente durante 30 horas.

2°) n-butanol, ácido acético, agua (4:1:5 volúmenes respectivamente) (38). Se procede en igual forma que con el solvente anterior. Los cromatogramas se desarrollaron en forma descendente durante 20 horas

3°) n-butanol saturado con agua. Se agita el butanol con agua, se deja decantar y se usa la capa no acuosa.

Con este último solvente se usaron papeles impregnados en solución de borato de sodio preparados según el método de Jurd (39). Para esto se colocan las hojas de papel Whatman N° 1 en solución saturada de acetato de sodio en etanol

absoluto 10 min. Se saca, se seca entre hojas de papel de filtro y luego al aire. Se sumergen en solución de ácido bórico saturada 10 minutos y se secan de igual manera.

Electroforésis de azúcares

Se utiliza el método de Aso y Hamada (40) con buffer borato de potasio pH 8.9 durante 3 horas a 20 V/cm.

Hidrólisis con $\beta$ glucosidasa

Se usó $\beta$ glucosidasa pura (Worthington Biochemical Corp.). La mezcla de incubación usada es la siguiente : 0.4 $\mu$ moles del glucósido, buffer acetato pH 5.4 0.1 ml, y $\beta$ glucosidasa: 0.4 mgr en un volumen final de 0.3 ml. La hidrólisis de los glucósidos se realiza incubando durante toda una noche en atmósfera de tolueno. La mezcla de incubación se desproteiniza por calentamiento a 100° durante 2 minutos.

Preparación de los sustratos

Metoxihidroquinona $\beta$-glucósido

Se preparó según el método de Robertson y Waters (41). Este método se basa en la interacción del fenol con el O-tetra acetil $\alpha$-glucosil bromuro en presencia de óxido de plata y quinolina. En el caso de que se utilice un difenol, para obtener el monoglucósido hay que proteger un grupo hidroxilo por una acilación parcial. En este caso se preparó el derivado monobenzoilado de la metoxihidroquinona.

O-monobenzoil metoxihidroquinona

A una solución de metoxihidroquinona (15 gr) en hidroxido de potasio al 2 % enfriada a -15° C en atmósfera de $N_2$ , se le agrega 14 gr cloruro de benzoílo

en varias porciones, mientras se hace una agitación vigorosa hasta que el olor a cloruro de benzoílo haya desaparecido. La mezcla se vuelca en una solución saturada de bicarbonato de sodio en agua (300 ml) y después de media hora el precipitado se filtra y lava con agua. Se recristaliza de alcohol al 70 %.

O-tetra acetil $\alpha$-glucosil bromuro

Se prepara por la técnica de acetilación y bromuración utilizando el método de Bárczai y Martos (42) en el que se realizan ambas operaciones simultáneamente.

Metoxihidroquinona monoglucósido

Se agregan 3 gr de óxido de plata seco, activo, agitando a una pasta de O-monobenzoil metoxihidroquinona (2,5 gr), O-tetra acetil $\alpha$-glucosil bromuro (5 gr) y quinolina (10 ml). La mezcla se agita durante 15 minutos y la pasta que resulta se deja en un desecador durante 1 hora. La solución del producto en 40 ml de ácido acético se filtra para eliminar las sales de plata no disueltas, el filtrado se vuelca en 200 ml de agua helada. El tetraacetil glucósido precipita en esta forma y luego se recristaliza de alcohol.

Desacetilación

La hidrólisis de los grupos acetilo y benzoílo se realizó usando alcohol metílico saturado con amoníaco. Una solución de tetraacetato (2 gr) en alcohol metílico (40 ml) se enfría a 0° C y se satura con amoníaco seco, se deja en la heladera durante 16 horas. Se elimina por evaporación a presión reducida el amoníaco y el alcohol metílico y el residuo se disuelve en agua caliente. Por enfriamiento precipita el metoxihidroquinona-$\beta$-glucósido. El producto

obtenido es bastante impuro. Para purificarlo se lo solubiliza en agua y se pasa por una columna de carbón-celita, ésta se lava con agua para eliminar todo el fenol y la glucosa que no han reaccionado y luego se eluye el glucósido con etanol al 50 %. Los eluídos se concentran, se cromatografían en papel usando n-butanol, piridina, agua como solvente y la zona del glucósido se eluye.

El producto obtenido da una sola mancha con un $R_{arbutina}$ : 0.94 cuando se revela con p-nitroanilina diazotada o con nitrato de plata alcalino. Por acción del agua de bromo diluída libera inmediata y cuantitativamente glucosa, igual resultado se obtiene por hidrólisis con ácido sulfúrico 1.5 N durante 3 horas a 100° C. Por incubación con $\beta$ glucosidasa da glucosa y metoxihidroquinona.

Preparación del metoxihidroquinona glucósido por síntesis enzimática

Se preparó según la siguiente reacción catalizada por la uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa) difenol transglucosidasa (43).

UDP-glucosa + metoxihidroquinona $\longrightarrow$ UDP+ metoxihidroquinona $\beta$- glucósido

La mezcla de incubación es la siguiente en $\mu$ moles: buffer tris maleato pH 6.4 400, versene 2, UDP-glucosa 8, cisteína 2, metoxihidroquinona 8, 0.8 ml de la fracción 1 de enzima, volumen final 2 ml. Se incuba durante una hora, se detiene la reacción por el agregado de 2 ml de $SO_4Zn$ al 5 %, 2 ml de $(HO)_2$ Ba 0.3 normal y 4 ml de agua. Se centrifuga, se lava el precipitado y el sobrenadante junto con los lavados se concentran y se cromatografían en papel Whatman N° 1 lavado. El glucósido formado se eluye con agua y se concentra.

Método general de preparación de otros glucósidos

Se usó el método de Wath y Rydon (44). En este método se hace reaccionar el fenol con la penta O-acetil β -D-glucosa en presencia del ácido p-toluen sulfónico. Utilizando esta síntesis se obtuvieron los glucósidos del fenol, el p-metoxifenol, el m-metoxifenol y el p-metoxi fenil genciobiósido.

Resorcinol β-glucósido

Se preparó según la técnica de Fisher (45) a partir de acetobromo glucosa y resorcina en quinolina anhidra.

Preparación de fenoles

Metoxihidroquinona: se prepara según el método de Dakin (46) a partir de vainillina.

Hidroxihidroquinona: por el método de Thiele (47) haciendo reaccionar la hidroquinona con ácido sulfúrico y ácido acético. Se desacetila por tratamien - to del triacetato con ácido clorhídrico.

1-metoxi, 2-4 hidroxifenol: según la patente de Hoffman La Roche D.R.P. 109789 a partir de la sal de potasio del ácido 2 oxi, 1 metoxibenzol sulfónico por fusión alcalina.

1-2 dihidroxi, 4-metoxibenceno: fué preparado por hidroxilación del o-meto-xifenol (48). 1.3 milimoles de $SO_4Fe$, 6,5 milimoles de versene, 14 milimoles de ácido ascórbico, y 6 milimoles del fenol en 250 ml de buffer fosfato pH 6.7 se agitan durante 2 horas en atmósfera de oxígeno a 37° C. Luego se acidifica con ácido acético y se adsorbe en carbón y luego se eluye con fenol acuoso, de acuerdo a la técnica original.

Preparación de la fenol oxidasa

La oxidasa de papa se aisló según el método de Kubowitz (49). Las papas lavadas se cortan y se utiliza la zona periférica incluyendo la corteza. Se hace un homogeneizado en una licuadora y se filtra por un buchner. El líquido obtenido, color marrón rojizo, se precipita con acetona hasta un 37 %. El precipitado se descarta y el sobrenadante se precipita con acetona hasta un 55 %. El precipitado obtenido se suspende en una treinta ava parte de agua del volumen original, se centrifuga y el sobrenadante se lleva a una saturación del 42 % en sulfato de amonio. El precipitado obtenido se separa por centrifugación y se descarta. Al sobrenadante se le agrega sulfato de amonio sólido hasta un 68 % de saturación. El precipitado obtenido se suspende en agua y se dializa durante 48 horas contra agua. Durante la diálisis se forma un precipitado que se separa por centrifugación y se descarta. El sobrenadante se usa como enzima.

Ensayo enzimático

La mezcla de incubación contiene en $\mu$ moles : glucósido 0.5, Buffer trihidroxi-metil amino metano pH 7.2 2, enzima 0.01 ml. Para cada glucósido se hace un blanco en el que la enzima se agrega al final de la incubación. Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 0.2 moles de glucosa en 30 minutos a 30° C usando como sustrato la arbutina.

Ensayo cromatográfico

La reacción se detiene por enfriamiento en una mezcla de hielo y sal y toda la mezcla de incubación se coloca en una sola mancha en papel Whatman N° 1 ó 4

según el azúcar que se espera obtener. El cromatograma se desarrolla durante toda la noche usando n-butanol, piridina, agua como solvente y se revela con nitrato de plata alcalino.

Medición del azúcar liberado

La reacción se detiene por calentamiento en baño maría durante 2 minutos a 100°. Se agrega a los tubos 0.5 ml de agua y se mide el poder reductor liberado por el método de Somogyi y Nelson.

Ensayo espectrofotométrico

La mezcla de reacción contiene en $\mu$ moles : glucósido o fenol 0.2 buffer fosfato pH 5.4 2, ensima 0.01 ml. Los tubos se incuban con agitación. A los tiempos indicados se agrega un ml de agua y se lee el espectro contra un blanco de la ensima y buffer. En todos los ensayos espectrofotométricos las incubaciones se hicieron a 30° C.

Proteína

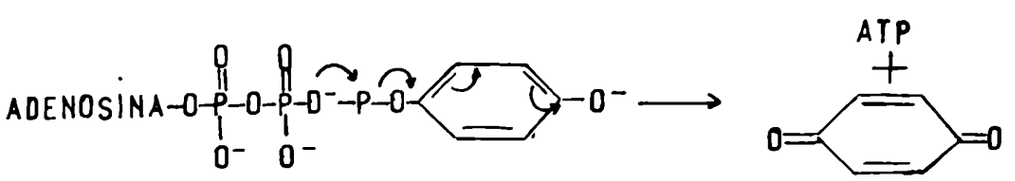
Se midió por el método de Lowry y colaboradores (50).

# PRIMERA PARTE

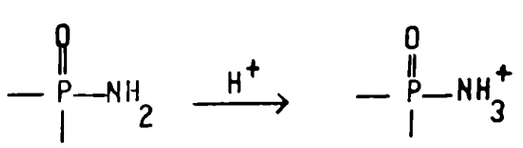
## ACCION DEL BROMO SOBRE LOS FENOLES Y LOS GLUCOSIDOS FENOLICOS

El descubrimiento de la reacción con el bromo fué realizado al estudiar un mecanismo oxidativo de transglucosidación a la luz de los trabajos de Wieland y Patterman (51). Estos autores, a partir de una solución de naftohidroquinona-monofosfato en metanol y oxidando con hipoiodoto obtienen la correspondiente quinona y fosfato monometílico.

Harrison (52) realizó igual experiencia con hidroquinona monofosfato y ADP y logró la síntesis de ATP y sugirió el siguiente esquema para la reacción :




El mecanismo de activación sería formalmente análogo al de la "activación" por protonisación de los fósforoamidatos :



que hacen al fósforo apto para ser atacado por el ADP y dar ATP. Biológicamente el proceso sería de gran importancia en la explicación de la fosforilación oxidativa. Un estudio detallado de la reacción ha sido realizado por Todd y colaboradores (53).

La peculiar estructura de la arbutina (hidroquinona-$\beta$-glucósido), llevó a ensayar un posible mecanismo ya no de fosforilación oxidativa, sino de glucosilación oxidativa, y en la búsqueda de diversos oxidantes se ensayó la acción de la fenol oxidasa y la de oxidantes químicos suaves.

Las experiencias con la fenol oxidasa se describen en la segunda parte.

Entre los oxidantes químicos, el mejor fué el agua de bromo diluída pues no modifica el pH del medio y el exceso se elimina rápidamente por aireación evitando reacciones secundarias.

La reacción del bromo sobre el fenol es clásica en química analítica : así el fenol origina instantáneamente tribromo fenol insoluble. Si en cambio se parte de soluciones diluídas de arbutina a las que se agrega agua de bromo diluída hasta una coloración amarilla casi imperceptible, y se airea de inmediato, se observa por cromatografía la desaparición total de la mancha de glucósido y la aparición de una mancha de glucosa. La liberación de glucosa es cuantitativa y estudiando el espectro ultravioleta, se tienen los resultados de la Fig. 1 : por el agregado del agua de bromo, desaparece el máximo del espectro de la arbutina a 280 m$\mu$ y se forma el espectro de la p-benzoquinona (con máximo a 250 m$\mu$), el que por reducción con $SO_2$ desaparece dando lugar al espectro de la hidroquinona, ligeramente distinto al de la arbutina (máximo a 290 m$\mu$). Con la hidroquinona

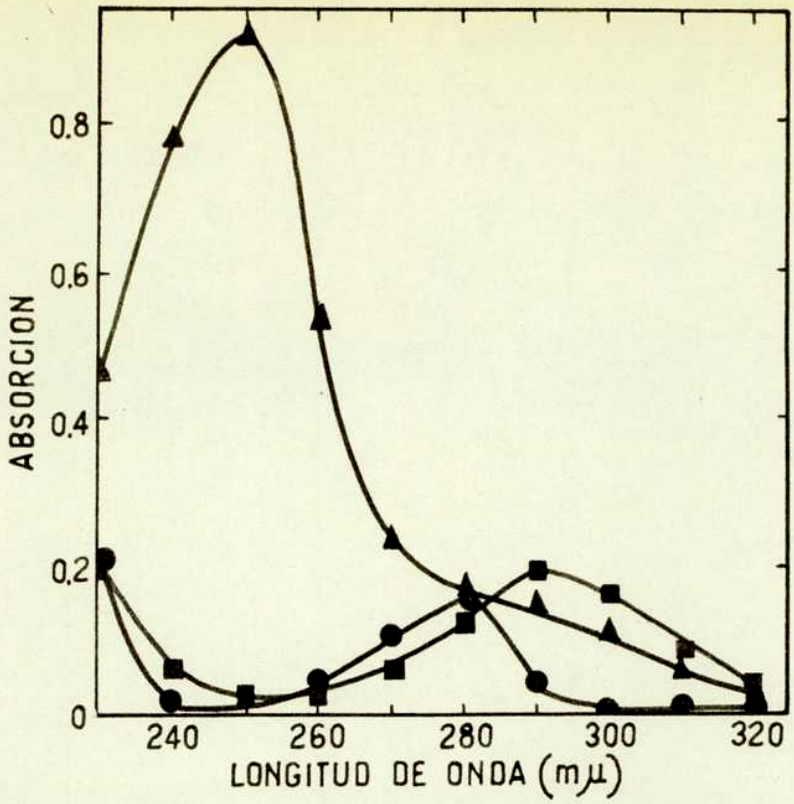



Fig. 1. Espectros de la arbutina: ● sola, ▲ con agua de $Br_2$, ■ con agua de $Br_2$ y $SO_2$

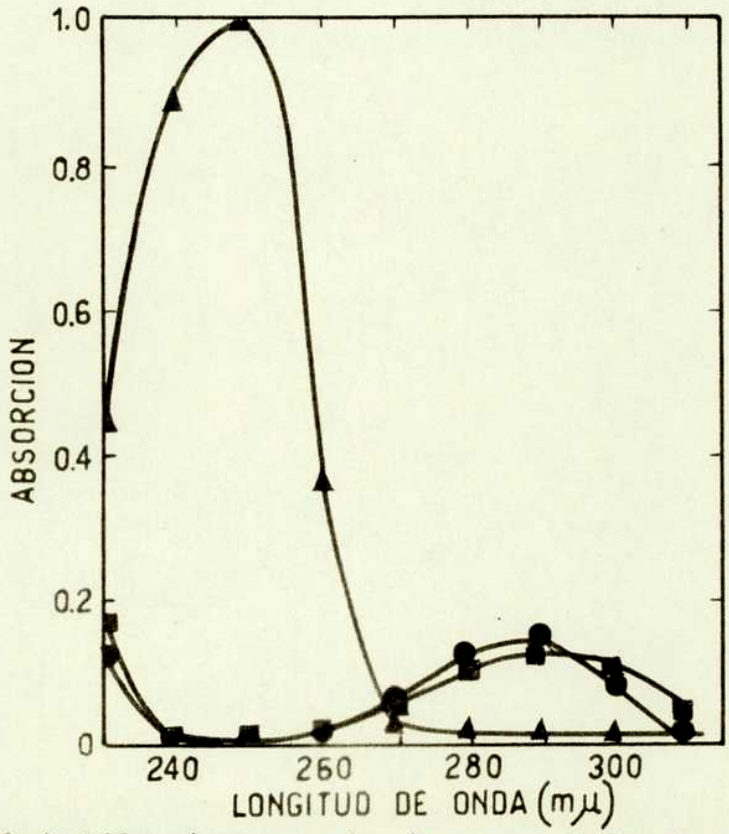
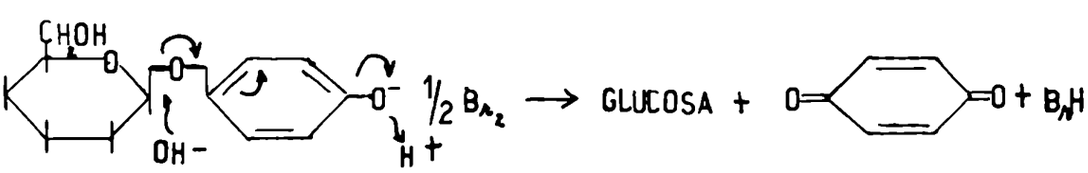



Fig.2. Espectros de la hidroquinona: ● sola, ▲ con agua de $Br_2$, ■ con agua de $Br_2$ y $SO_2$

los resultados son iguales, sólo que se regenera el espectro original por acción del $SO_2$ (Fig. 2).

La reacción es instantánea y no hay indicios de la formación de derivados bromados, ni de ácido glucónico, y la misma se puede formular de la siguiente manera :




Utilizando en lugar de arbutina el p-metoxi, o el p-etoxifenol se obtienen iguales resultados (Fig.3), lo que indica la separación del grupo metil o del grupo metoxilo. Esto se confirma por la cromatografía de los productos obtenidos después del tratamiento con agua de bromo y reducción con $SO_2$ usando como solvente benceno, ácido acético, agua : se observa la formación de hidroquinona.

La reacción transcurre igualmente en metanol, etanol, propanol o butanol, pero contrariamente a los resultados con fenil fosfato no hay indicios de formación del metil, etil o propil glucósido a juzgar por el ensayo cromatográfico.

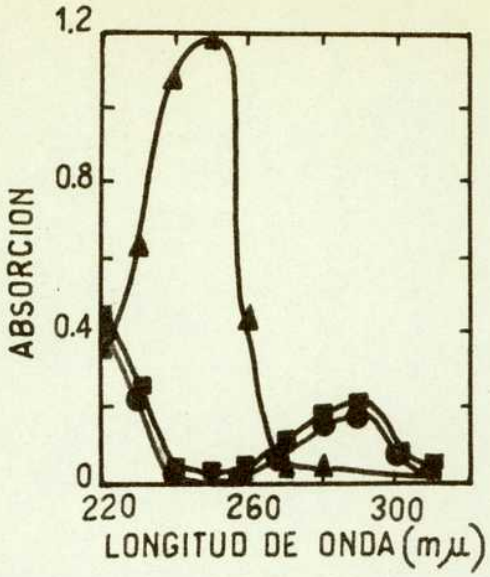



Fig. 3. Espectros del p-metoxifenol: ● solo, ▲ con agua de $Br_2$, ■ con agua de $Br_2$ y $SO_2$

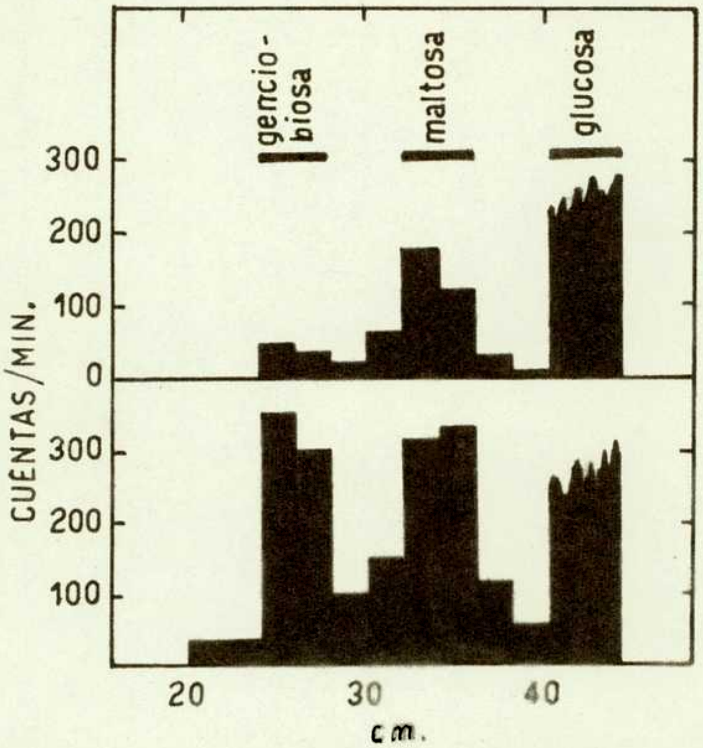
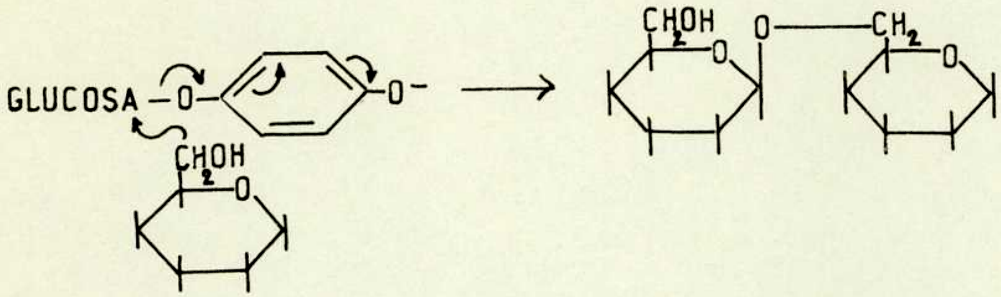



Fig. 4. A. 1 mol de glucosa $C^{14}$ en 1 ml de agua se adiciona de agua de $Br_2$, se airea, se concentra y cromatografía en butanol, piridina, agua. Se corta el papel en tiras de 1 cm, se eluye y se cuenta.

B. Igual que en A., pero se adiciona además un mol de arbutina.

En cuanto a la posibilidad de que en el proceso se produzca una transgluco - sidación oxidativa, se comprueba haciendo la reacción con la arbutina en presen - cia de glucosa $C^{14}$ y cromatografiando en butanol, piridina, agua. Se observa la aparición de radicactividad en la zona correspondiente a la maltosa y sobre todo en la zona correspondiente a la genciobiosa (Fig. 4).

El mecanismo de la reacción sería :




Es evidente la importancia de esta reacción como ensayo analítico de la ar- butina y de los derivados análogos, pues se logra una separación inmediata y cuan- titativa del resto glucosa y la formación del espectro característico de la p- benzoquinona. Si en lugar de la arbutina se emplea el genciobiósido, el celo - biósido o el derivado metílico de la hidroquinona, se separa por acción del agua de bromo, genciobiosa, celobiosa o metanol respectivamente.

Con el fin de estudiar la utilidad de esta reacción se han ensayado diver - sos glucósidos. El fenil o glucósido no reaccionan; el bloqueo de la función hidroxilo del fenol lo vuelve no reactivo, lo que está de acuerdo con la forma de reaccionar de estas sustancias. El naftol-glucósido no reacciona, el p-meto- xifenilglucósido, es decir la arbutina con el hidroxilo metilado, reacciona muy lentamente y libera glucosa en forma incompleta. Los otros fenoles ensayados

son los siguientes :

Resorcinol β-glucósido

Es muy interesante la reacción de este glucósido frente al bromo. En lugar de producirse una liberación inmediata y cuantitativa de glucosa, ésta se produce en forma gradual y requiere un agregado de agua de bromo en mucha mayor cantidad. Además, a medida que se aumenta el agregado de agua de bromo, se producen cambios paulatinos en el espectro y en el cromatograma, indicando la formación de nuevos productos.

En la Tabla I figuran los resultados obtenidos cuando a una solución diluída de resorcinol glucósido en agua (1μ mol/ml) se le adiciona paulatinamente agua de bromo saturada diluída al décimo, hasta llegar finalmente a una coloración amarilla persistente. Se mide en cada etapa la liberación de glucosa por el método de Somogyi, se cromatografía en n-butanol, piridina, agua y se siguen los cambios en el espectro de absorción. (Fig. 5)

Tabla I

| | Glucosa liberada | Rf (butanol, piridina, agua) | | |
|---|---|---|---|---|
| Original | 0 % | 0.71 (rojo) | - | - |
| I | 5 % | 0.71 (rojo) | 0.78 (rojo) | 0.88 (pardo) |
| II | 29 % | - | 0.77 (rojo) + | 0.88 (pardo) ++ |
| III | 60 % | - | 0.77 (rojo) | 0.88 (pardo) + |
| IV | 100 % | - | - | 0.88 (pardo) |
| V | 100 % | - | - | 0.88 (pardo) |

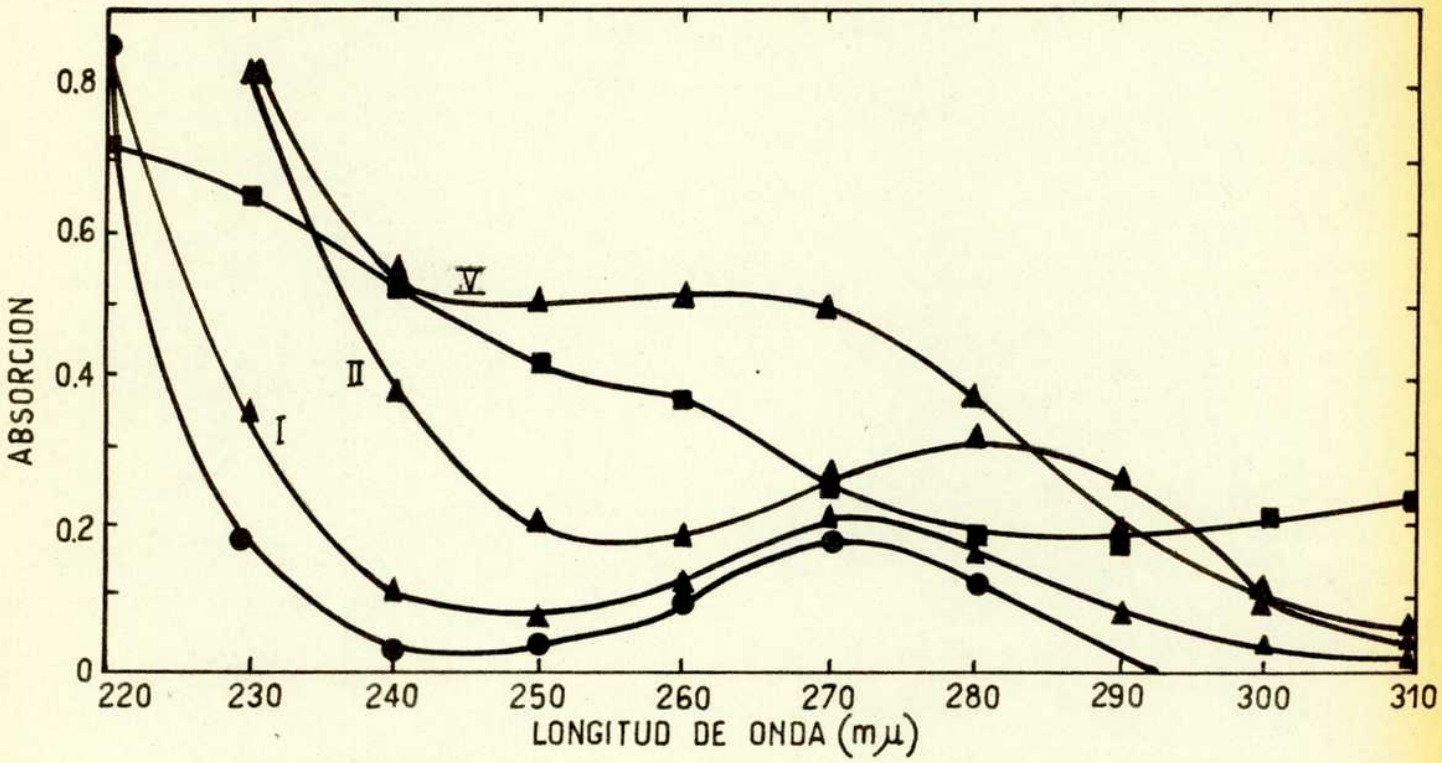


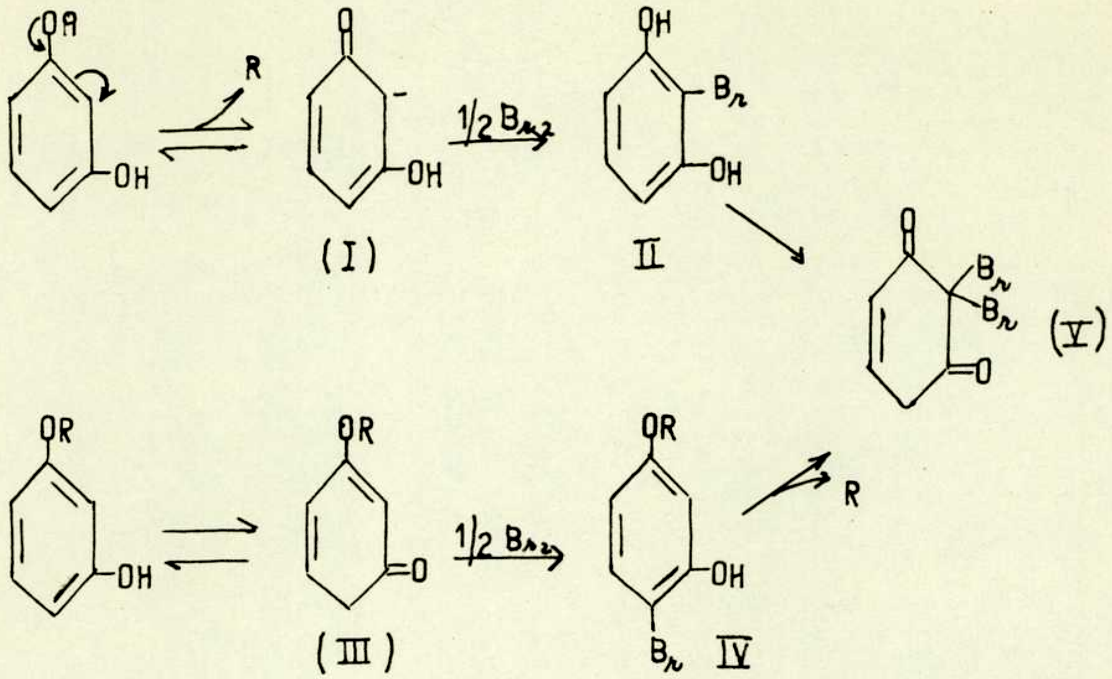

Fig. 5. Espectros del resorcinol glucósido: ● solo, ▲ I, II y V con cantidades crecientes de agua de $Br_2$ , ■ V adicionado de $SO_2$ .

Se observa un paulatino desprendimiento de glucosa y la formación de un compuesto que tiene una relación de frente ($R_f$) mayor que la del compuesto original ( de $R_f$ 0.71 se pasa a 0.78 ) lo que está de acuerdo con la formación de un derivado bromado: así el fenil-glucósido por acción del agua de bromo pasa de un $R_f$ 0.73 a 0.79, cambio muy parecido al señalado en la Tabla I.

El nuevo compuesto de $R_f$ 0.78 da también reacción de glucósido con el reactivo de nitrato de plata alcalino, pero el que corre con un $R_f$ 0.88 no y solamente reacciona con el reactivo diazoico, indicando la presencia de un grupo fenol libre en la molécula, pero que ya no tiene el resto de glucosa. A medida que aumenta la cantidad de agua de bromo adicionada se hace cada vez menos intensa esta mancha. El resorcinol da color amarillo con este reactivo, en cambio este último compuesto da color pardo debido probablemente a la formación de un derivado bromado.

La secuencia de reacciones puede explicarse en base a la conocida reactividad de los meta difenoles, en los que las posiciones orto y para son sumamente susceptibles de un ataque electrofílico por tener una densidad electrónica relativamente más elevada.

Puede suponerse que las formas resonantes se establecen con cualquiera de los hidroxilos fenólicos. Cuando interviene el hidroxilo unido a la glucosa ésta se libera ( I y IV ).




Se forma finalmente un derivado cetónico que no reacciona con el diazo reactivo. Tratando en este último caso antes de cromatografiar con $SO_2$ reaparece algo de reacción, debido a la formación de una pequeña cantidad de fenol.

En el esquema de reacciones se observa que a medida que la reacción avanza se va formando un fenol bromado (II) y un glucósido bromado (IV), el cual cambia el máximo de su espectro de 270 m a 280 m - 290 m y finalmente un compuesto cetónico con una doble ligadura, igual que lo que ocurre cuando se trata el fenol simple con un exceso de bromo.

Estudiando las curvas de absorción de compuestos similares en la literatura, se observa que muchas cetonas cíclicas no saturadas tienen curvas muy semejantes. (54, 55, 56, 57)

Vemos que la posición del hidroxilo en meta cambia fundamentalmente el tipo de reacción con el agua de bromo : la liberación de glucosa es lenta y no instantánea y se originan derivados bromados, que en el caso de la arbutina no pueden formarse por dar inmediatamente p-benzoquinona, la cual ya no reacciona con el bromo. En el caso del resorcinol glucósido, la alta reactividad de las posiciones orto y para hacen que la fijación de bromo sea el proceso dominante.

Resultados similares se obtienen con la resorcina libre, con el meta metoxifenol y con el derivado monometilado de la floroglucina o con el glucósido correspondiente, la florina. En los casos de derivados trifenólicos las curvas de absorción son naturalmente diferentes.

Metoxihidroquinona y metoxihidroquinona glucósido

Como se observa en la Fig. 6, la 2-metoxihidroquinona por acción del agua de bromo diluída produce un espectro con el máximo característico de las p-quinonas a 250 m$\mu$ pero éste es de mucha menor intensidad si se lo compara con el máximo que en iguales condiciones dan la arbutina, la hidroquinona o el p-metoxifenol. Por acción del $SO_2$ no se reestablece el espectro original.

En el caso del glucósido de la metoxihidroquinona (Fig. 7), por acción del agua de bromo diluída, se produce un aumento de extinción en casi todo el espectro, manteniéndose el máximo original a 285 m$\mu$. La liberación de glucosa es cuantitativa e inmediata. Por acción del $SO_2$ no se reestablece el espectro original.

Hidroxihidroquinona e hidroxihidroquinona glucósido

La hidroxihidroquinona no da un máximo en su espectro por tratamiento con agua de bromo, desapareciendo el máximo original a 290 m$\mu$ , el que no reaparece

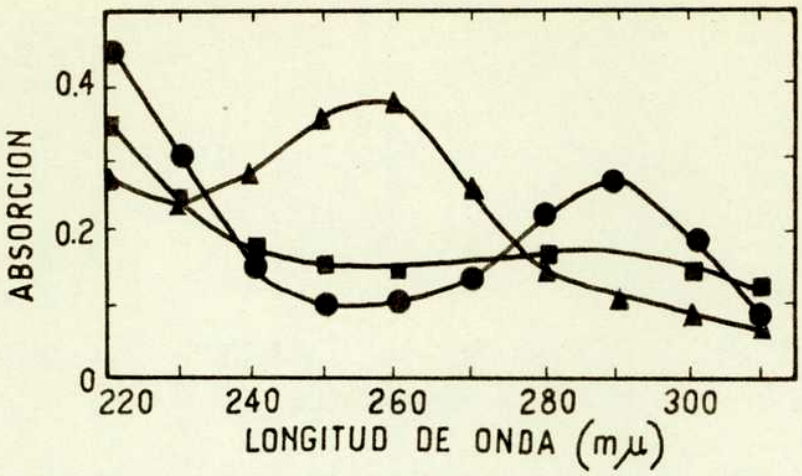



Fig. 6. Espectros de la 2-metoxihidroquinona: ● sola, ▲ con agua de $Br_2$, ■ con agua de $Br_2$ y $SO_2$.

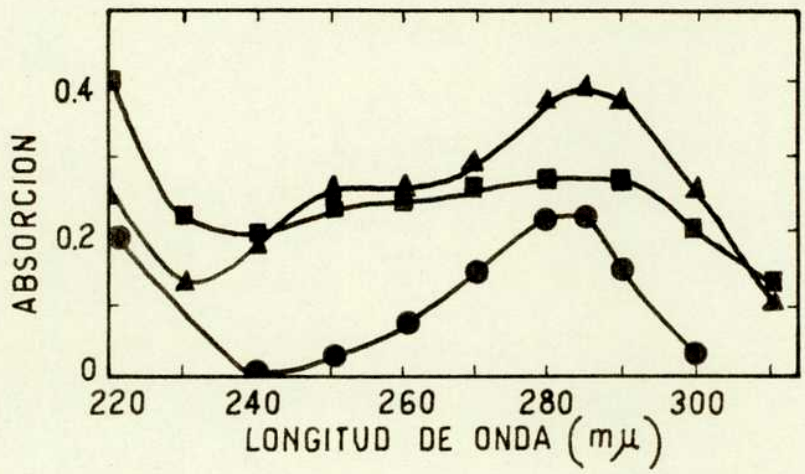



Fig. 7. Espectros del glucósido de la metoxihidroquinona: ● solo, ▲ con agua de $Br_2$, ■ con agua de $Br_2$ y $SO_2$ .

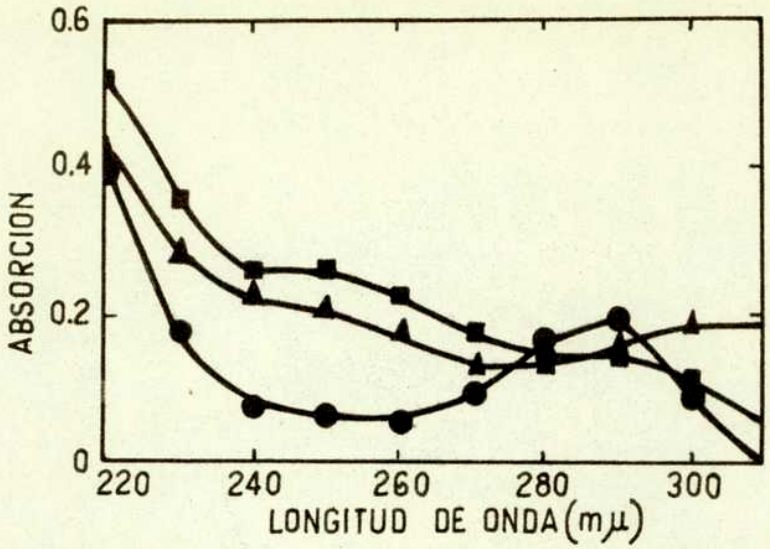



Fig. 8. Espectros de la hidroxihidroquinona: ● sola, ▲ con agua de $Br_2$, ■ con agua de $Br_2$ y $SO_2$.

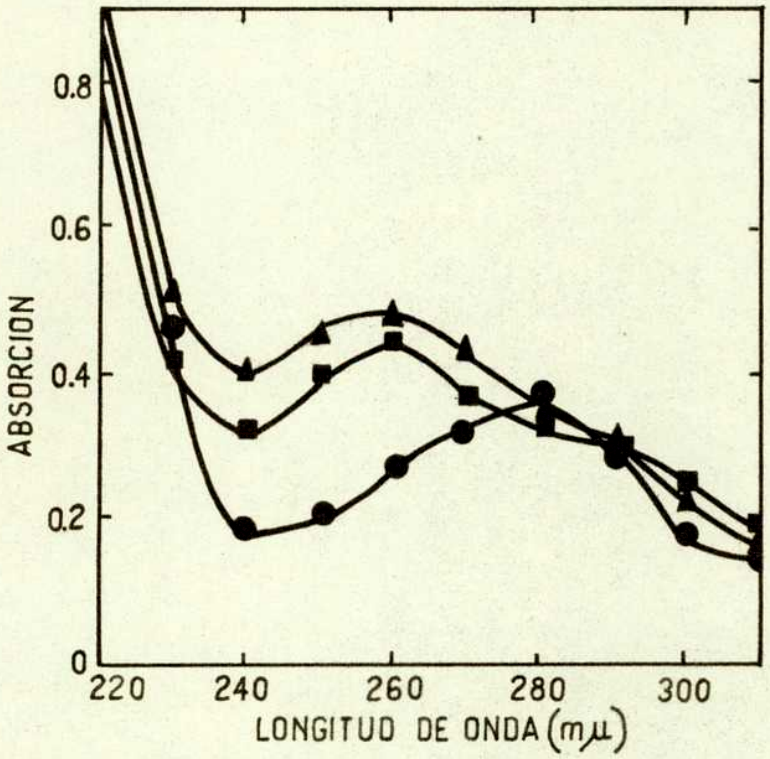



Fig. 9. Espectros del glucósido de la hidroxihidroquinona: ● solo, ▲ con agua de $Br_2$, ■ con agua de $Br_2$ y $SO_2$.

por tratamiento con $SO_2$ (Fig. 8). Dada la gran reactividad de este trifenol se debe formar, además de la p-benzoquinona, derivados bromados y otros productos secundarios.

En el caso del glucósido de la hidroxihidroquinona se observa que por acción del agua de bromo (Fig. 9) desaparece el máximo original a 280 m$\mu$ junto con un aumento en la extinción con máximo a 260 m$\mu$. Este máximo podría ser debido a la formación de la hidroxi p-quinona, ya que esta sustancia tiene uno de sus máximos a esta longitud de onda (59).

Por acción del $SO_2$ no se regenera el espectro original, manteniéndose el máximo a 260 m$\mu$.

TABLA II

GLUCOSA LIBERADA POR DISTINTOS GLUCOSIDOS POR ACCION DEL BROMO

| Glucóside | Glucosa liberada $\mu$ moles |
|---|---|
| Arbutina | 1 |
| Salicina | 0 |
| Fenil glucósido | 0 |
| p-metoxi fenil glucósido | 0.22 |
| m-metoxi fenil glucósido | 0.11 |
| Resorcinol glucósido | 0.42 |

A un $\mu$ mol normal de glucósido en 0.5 ml de agua se le agrega 1 gota de agua de bromo saturada y luego se airea hasta total desaparición del color amarillo . Luego se mide la glucosa liberada con el método de Somogyi.

## SEGUNDA PARTE

### Acción de la fenol oxidasa de papa sobre los fenoles y los glucósidos fenólicos

Cuando se incuba la oxidasa de papa con distintos glucósidos fenólicos, se produce en algunos casos la liberación del azúcar correspondiente, como se ve en las Tablas III y IV. Así ocurre con la arbutina, el glucósido del resorcinol, el hidroxifenil $\beta$-celobiósido y el hidroxifenil $\beta$-genciobiósido. Se observa también con el transcurso de la reacción la formación de un color rosado que se intensifica mucho con el tiempo.

Si los productos de la reacción a distintos tiempos de incubación se cromatografían en papel usando como solvente n-butanol, piridina, agua, se observa la disminución de la mancha correspondiente al glucósido junto con la aparición de las manchas del mono o disacárido liberado; no se observa, sin embargo, la presencia del fenol, lo que indica que la oxidasa reacciona con el fenol dando productos que no aparecen en la cromatografía.

Con glucósidos como el fenil glucósido, el p-metoxifenil glucósido, el p-metoxifenil genciobiósido o la metoxihidroquinona glucósido no se observa ningún cambio visible, no se produce liberación del resto azúcar; la cromatografía de la mezcla de reacción no muestra ninguna mancha correspondiente a los azúcares liberados, ni se observa disminución de las manchas de los glucósidos.

Agregando a la mezcla de incubación, que tiene arbutina como sustrato, azúcares tales como genciobiosa, maltosa, xilosa, maltotriosa o celobiosa y luego se cromatografían los productos de la reacción, no se observa que se produzca ningún proceso de transglucosidación.

Cuando las incubaciones se realizan a pH 7.2, el máximo de liberación de glucosa se obtiene después de una hora de incubación. La reacción es más lenta a pH 5.4, obteniéndose el máximo a las dos horas de incubación.

TABLA III

ACCION DE LA FENOL OXIDASA SOBRE DIVERSOS MONOGLUCOSIDOS

La mezcla de incubación es la descripta en "Ensayo enzimático". Las incubaciones se realizaron a 30° C durante 3 horas y luego se mide el poder reductor liberado por el método de Somogyi.

| Sustrato | Sustituyentes en el anillo bencénico | μ moles de azúcar liberado | % de poder reductor liberado |
|---|---|---|---|
| arbutina | 1 OG, 4 OH | 0.35 | 100 |
| fenil β glucósido | 1 OG | 0 | 0 |
| p-metoxifenil β - glucósido | 1 OG, 4 $OCH_3$ | 0 | 0 |
| salicina | 1 OG, 2 $CH_2OH$ | 0 | 0 |
| resorcinol β - glucósido | 1 OG, 3 OH | 0.25 | 71 |
| monoglucósido aislado de germen de trigo | | 0.06 | 17 |
| metoxihidroquinona β - glucósido | 1 OG, 3 $OCH_3$, 4 OH | 0.06 | 17 |

G - glucosil residuo.

TABLA IV

ACCION DE LA FENOL OXIDASA SOBRE DIVERSOS DISACARIDOS GLUCOSIDOS

| Sustrato | Sustituyentes en el anillo bencénico | Disacárido liberado | $\mu$ moles de azúcar liberado |
|---|---|---|---|
| hidroxifenil $\beta$-celobiósido | 1 OC, 4 OH | celobiosa | 0.2 |
| hidroxifenil $\beta$-gentiobiósido | 1 OG, 4 OH | gentiobiosa | 0.2 |
| disacárido glucósido aislado del germen de trigo. | | gentiobiosa | 0.05 |

C - resto celobiosa
G - resto gentiobiosa

Productos de la oxidación enzimática de los distintos fenoles y glucósidos

Cuando se sigue espectrofotométricamente la acción de la oxidasa sobre los distintos y sus respectivos glucósidos, se observa en el caso de la hidroquinona (Fig. 10 A) y de su glucósido, la arbutina (Fig. 10 B) que cuando se incuba a pH 5.4, el máximo original a 280 m$\mu$ desaparece lentamente y aparecen a las dos horas de incubación nuevos máximos a 340 m$\mu$ y 320 m$\mu$ respectivamente. Estos máximos corresponden con el que tiene a ese pH la hidroxi p-benzoquinona (59).

En las mismas condiciones la metoxihidroquinona reacciona más rápidamente (Fig. 10 C) dando un máximo a 250 m$\mu$ característico de las p-quinonas (60). El monoglucósido de la metoxihidroquinona no presenta cambio en el máximo de su espectro (Fig. 10 D), pero se debe hacer notar el aumento de la extinción, debido

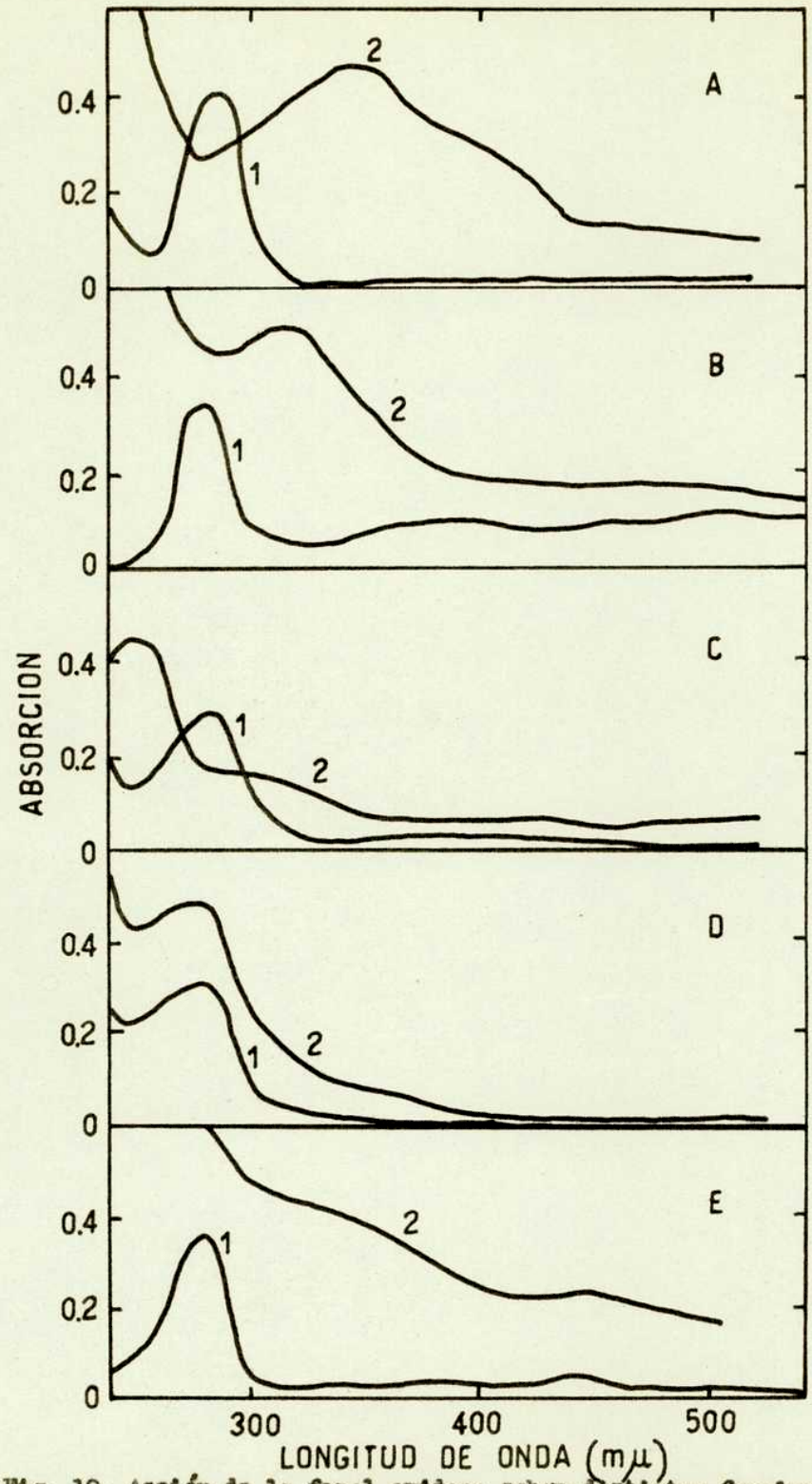


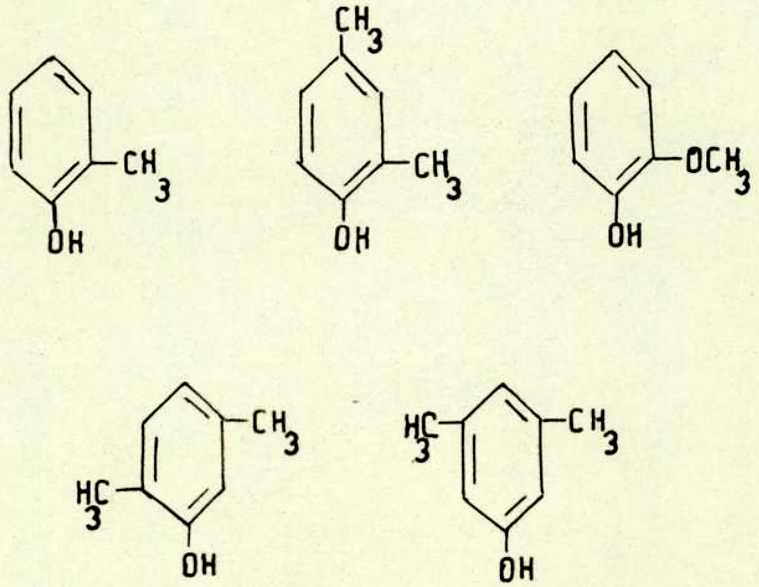

Fig. 10. Acción de la fenol oxidasa sobre distintos fenoles y glucósidos: A. hidroquinona, B. arbutina, C. metoxihidroquinona, D. metoxihidroquinona glucósido, E. resorcinol glucósido. 1. inmediatamente de agregada la enzima; 2. a las 2 horas de incubación.

posiblemente a impurezas, ya que el glucósido ha sido aislado de papel.

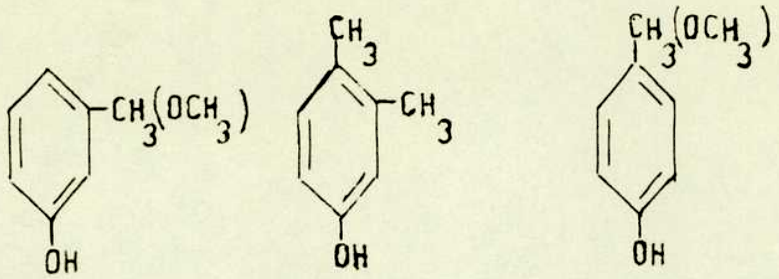
Como se ve en la Fig. 10 E, el resorcinol glucósido, después de incubado con la oxidasa de papa, cambia su espectro con máximo a 280 m$\mu$ para dar otro con un gran aumento de extinción en toda la zona del espectro pero sin ningún máximo característico.

El resorcinol, en iguales condiciones, no experimenta ningún cambio en su espectro aún a las tres horas de incubación y tampoco se observa cambio en la coloración de la mezcla de incubación.

De acuerdo a los resultados señalados por Cushing (61), Enselwe y Vigneau (62) y Pugh y Raper (63), las estructuras siguientes no son atacadas por la fenol oxidasa:

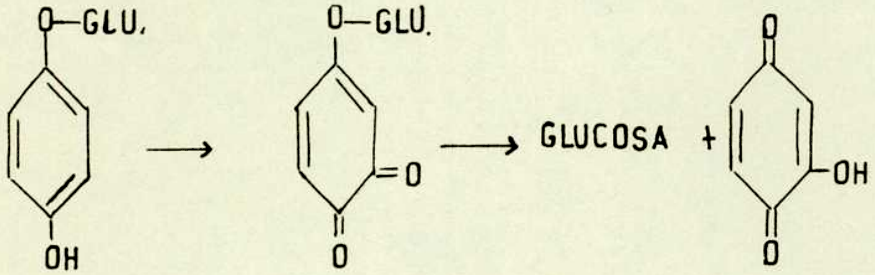


Por el contrario, esta enzima reacciona con estructuras de este tipo :




Esto explicaría el ataque de la fenoloxidasa sobre la arbutina y el resorcinol glucósido, ya que la estructura de estos glucósidos es del tipo del p-metoxifenol y del m-metoxifenol respectivamente.

En el caso de la arbutina, los resultados obtenidos de liberación de glucosa y de cambios en el espectro ultravioleta, pasando del máximo a 280 m $\mu$ a otro a 320 m$\mu$, se pueden explicar de acuerdo a la siguiente serie de reacciones :




Igual tipo de reacción ocurría en el caso de la hidroquinona.

En la reacción con metoxihidroquinona, como sustrato, el hecho de tener sustituída la posición orto respecto del hidroxilo libre da por resultado la formación de p-benzoquinona, como lo evidencia el espectro.

## T E R C E R A  P A R T E

### Aislamiento e identificación de los glucósidos del germen de trigo

La materia prima es el germen de trigo comercial el que se desengrasa previamente con éter de petróleo durante 24 horas en un extractor de Soxhlet.

200 grs de germen desengrasado se extraen con 1 litro de agua calentando en baño de maría hirviente durante 15 minutos, se enfría y se centrifuga a 0° C a 16.000Xg. Se separa el sobrenadante que es un líquido amarillo transparente. El sobrenadante que contiene los glucósidos, se adsorbe en carbón. Para tal fin se emplea carbón "Darco" (Atlas Power Company) y Celita (Hyflo-supercel). Esta última se prepara de la siguiente manera: la Celita comercial se suspende en agua y se deja sedimentar durante 15 minutos, se descarta el sobrenadante y lo que ha sedimentado se seca a 80° C. 60 grs de carbón y 60 grs de Celita, se agregan al sobrenadante de 16.000 x g y se agita durante media hora a 4° C.

El carbón se separa centrifugando a 16.000 x g durante 20 minutos. El carbón-celita con los glucósidos adsorbidos se lava con agua destilada para eliminar los azúcares reductores. Una técnica apropiada es la siguiente : en un embudo buchner se pone un papel de filtro y luego una capa de Celita preparada como se indicó. Se cubre con un nuevo papel de filtro y luego se pone el carbón-celita, que también se cubre con un disco de papel. Se lava con agua destilada hasta eliminar los azúcares reductores, lo que se comprueba por el método de Somogyi. Los di y trisacáridos se eluyen por lavado con etanol al 10 % y finalmente se eluyen los glucósidos con etanol al 50 %. Los extractos así obtenidos, se concentraron en un evaporador rotatorio al vacío y a baja temperatura para eliminar el alcohol,

y el residuo se disuelve en agua.

Se obtiene un extracto que contiene 500 $\mu$ moles de glucósidos calculados como arbutina (ver métodos).

El extracto se coloca en la línea de origen en papel Whatman Nº 17 y se cromatografía en la mezcla de n-butanol, piridina, agua. Se cortan dos tiras marginales del papel y se revelan con p-nitroanilina diazotada apareciendo tres zonas que dieron reacción positiva con este reactivo. Estas se cortan y se eluyen con agua y los eluídos correspondientes a cada mancha son luego concentrados al vacío y a baja temperatura.

Tanto el eluído total de carbón con alcohol 50 % como los eluídos correspondientes a cada uno de los glucósidos tienen un color anaranjado cuando están en soluciones concentradas

TABLA V

| Glucósido | $R_{arbutina}$ | $\mu$ moles totales | $\mu$ moles/ por gr de germen |
|---|---|---|---|
| I | 0.93 | 15 | 0.07 |
| II | 0.57 | 49 | 0.25 |
| III | 0.3 | 230 | 1.1 |

En la Tabla V se muestran las cantidades de los glucósidos obtenidos a partir de 200 grs de germen de trigo desengrasado. Los glucósidos previamente valorados por el método de Folin-Ciocalteu y calculados como arbutina, de acuerdo a lo indicado en "Métodos".

Como se ve en la Tabla, el glucósido con $R_{arbutina}$ 0.3 es el que se encuentra

en mucha mayor proporción en el extracto, unas quince veces más que el glucósido con $R_{arbutina}$ 0.93 y cuantro veces más que el que tiene $R_{arbutina}$ 0.57.

El glucósido I tiene una movilidad similar a la de la arbutina, lo que sugirió que pudiera ser un monoglucósido. La mancha II tiene una movilidad similar a la del genciobiósido de la hidroquinona. La tercera mancha tiene una movilidad bastante menor, lo que evidencia la presencia de un trisacárido glucósido.

Como el extracto del germen contiene muchas proteínas y otras sustancias extrañas, el lavado del carbón se hace, al comienzo, muy dificultoso y, debido a eso, en otras preparaciones del extracto, antes de tratarlo con carbón, se añade alcohol a una concentración del 70 %. El precipitado formado se separa por centrifugación y se lava con etanol al 70 %.

El sobrenadante junto con los líquidos de lavado se concentró al vacío y a baja temperatura para eliminar el alcohol, y el residuo, luego de disuelto en agua, se adsorbe en carbón. Luego el proceso se sigue en igual forma que con el método anterior.

De una solución que contiene 350 $\mu$ moles/ml del glucósido de $R_{arbutina}$ 0.3 se obtiene, dejándola en la congeladora a -15° C durante varias semanas, un precipitado blanco que se separa por centrifugación en frío y se seca en un desecador. Se obtuvieron así 64 mgr de precipitado.

Identificación del precipitado

a) Identificación del azúcar.

El precipitado obtenido por el método anterior se disuelve en agua y se cromatografía en butanol, piridina, agua. Por revelado con p-nitroanilina diazotada

da una sola mancha de color anaranjado que luego pasa a azul-violeta, lo mismo ocurre si luego de revelado se trata con una solución alcalina. Por revelado con nitrato de plata alcalino da también una sola mancha que aparece lentamente, lo que indica la presencia de un azúcar no reductor. La mancha tiene un $R_{arbutina}$ 0.3.

El glucósido tratado con agua de bromo diluída, cromatografiado en n-butanol, piridina, agua y revelado con nitrato de plata da una sola mancha de $R_{glucosa}$ 0.2. Cuando se revela con p-nitroanilina diazotada no aparece ninguna mancha.

La liberación de azúcar, por acción del agua de bromo, es rápida y cuantitativa, lo que se comprueba por medición del poder reductor.

El azúcar reductor obtenido por acción del agua de bromo se aisla por cromatografía. El azúcar eluído de papel e hidrolizado con ácido sulfúrico 1.5 N durante 3 horas a 100° C y luego cromatografiado da sólo una mancha que corre como glucosa (solvente: n-butanol, piridina, agua). Por hidrólisis con ácido sulfúrico 0.1 N durante 1 hora a 100° C da dos manchas identificadas como genciobiosa y glucosa por cromatografía en n-butanol, piridina, agua y por electroforésis en buffer borato pH 8.7. Además este azúcar reductor sometido a la acción de la $\beta$ glucosidosa es hidrolizado totalmente a glucosa.

La glucosa liberada por hidrólisis con ácido sulfúrico 1.5 N durante 3 horas a 100° C es además identificada específicamente por acción de la glucosa oxidasa dando un 100% de glucosa.

La relación de glucosa a fenol se determina midiendo el azúcar total con el reactivo de fenol sulfúrico o por la glucosa oxidasa después de hidrólisis con ácido sulfúrico 1.5 N durante 3 horas a 100° C. El fenol se determina directamente con testigo de arbutina. El valor obtenido es de un resto de fenol para cada

tres de glucosa.

Todas estas experiencias llevan a la conclusión de que el azúcar reductor liberado por acción del agua de bromo diluída debe ser un trisacárido con uniones $\beta$ 1-6, dado que por hidrólisis parcial sólo se obtiene gentiobiosa. La diferencia de velocidad de hidrólisis entre uniones $\beta$ 1-6 y $\beta$ 1-4 es pequeña por lo que este último tipo de unión, si está presente, debería aparecer una mancha correspondiente a la celobiosa. Otros tipos de unión $\beta$ 1-2 y $\beta$ 1-3 son improbables y darían manchas bien diferentes.

b) Identificación de la aglucona

El glucósido da coloración con el reactivo de p-nitroanilina diazotada y también es positiva la reacción con el reactivo de Folin y Ciocalteu, lo que está indicando la presencia de un hidroxilo libre además del que forma parte de la unión glucosídica.

Cuando el trisacárido se somete a la acción de la $\beta$ glucosidasa, la mezcla de incubación que al comienzo es incolora, se va coloreando de rosa, color que se va intensificando con el transcurso del tiempo. La cromatografía de los productos de reacción en los solventes usados para identificar fenoles no da ninguna mancha o éstas son muy pequeñas. En cambio haciendo las incubaciones en atmósfera de hitrógeno en un tubo con tapa esmerilada se evita la formación de productos coloreados, que provienen seguramente de la oxidación del fenol liberado por acción de la glucosidasa.

La cromatografía de los productos de hidrólisis por acción de la $\beta$ glucosidasa en n-butanol, ácido acético, agua y revelando con el reactivo de Burie da glucosa y otra mancha que corre en la zona de los fenoles color gris verdoso , que

TABLA VI

$R_f$ de distintos fenoles y de los productos de hidrólisis

Solvente I: butanol, ácido acético, agua (4:1:5)
Solvente II: benceno, ácido acético, agua (8:2:1)

| Sustancia | Sustituyente en el núcleo bencénico | $R_f$ solvente I | $R_f$ solvente II | Reacción con $NO_3Ag$ color / tiempo (horas) | |
|---|---|---|---|---|---|
| hidroquinona | 1 OH, 4 OH | 0.88 | 0.07 | gris/verde | ½ - 1 |
| pirogalol | 1 OH, 2 OH, 3 OH | 0.77 | 0.01 | gris | inmediat. |
| pirocatequina | 1 OH, 2 OH | 0.88 | 0.25 | verde | ½ - 1 |
| hidroxihidroquinona | 1 OH, 2 OH, 4 OH | 0.73 | 0.01 | gris oscuro | inmediat. |
| floroglucina | 1 OH, 2 OH, 4 OH | 0.76 | 0.0 | rojo/marrón | 1 - 1½ |
| resorcina | 1 OH, 3 OH | 0.86 | 0.07 | marrón | 12 - 24 |
| orcinol | 1 OH, 3 OH, 5 $OCH_3$ | 0.89 | 0.11 | marrón | 1 - 2 |
| metoxihidroquinona | 1 OH, 2 $OCH_3$, 4 OH | 0.84 | 0.25 | gris | ½ - 1 |
| metoxipirocatequina | 1 OH, 2 OH, 4 $OCH_3$ | | 0.27 | gris/verde | ½ - 1 |
| metoxiresorcina | 1 OH, 3 OH, 4 $OCH_3$ | | 0.30 | gris | ½ - 1 |
| 2-5 dimetil hidroquinona | 1 OH, 4 OH, 2 $CH_3$, 5 $CH_3$ | 0.92 | 0.0 | gris | ½ - 1 |
| producto de hidrólisis del trisacárido | | 0.84 | 0.25 | gris | ½ - 1 |

aparece después de unos minutos de revelado el papel.

Como se ve en la Tabla VI, el producto de hidrólisis tiene un $R_f$ igual al de la metoxihidroquinona y la mancha aparece en el mismo tiempo y tiene igual color.

Cuando se usa como solvente benceno, ácido acético, agua, para identificar los productos de hidrólisis y se revela con el mismo reactivo, aparece una mancha que en este solvente también tiene la misma relación de frente que la metoxihidroquinona (Tabla VI).

La posibilidad de que el fenol sea un derivado de la resorcina ( ya que tiene un $R_f$ muy parecido en el solvente I) queda descartada por los resultados de la cromatografía en el solvente II y por el revelado con el reactivo de Burke, la resorcina reacciona mucho más lentamente en estas condiciones.

Otra posibilidad que surge de los resultados de la cromatografía es que la mancha incógnita sea la pirocatequina. Esta posibilidad queda descartada por los resultados de la cromatografía usando como solvente n-butanol saturado con agua. En estas condiciones y usando papeles impregnados con ácido bórico y acetato de sodio y sin impregnar se ve (Tabla VII) que la mancha correspondiente al hidrolizado del glucósido desconocido, no presenta ninguna disminución de la relación de frente cuando se cromatografía en papeles impregnados y sin impregnar.

Espectros ultravioletas

Como se ve en la Fig. 11, el espectro de la solución del precipitado tiene una extinción máxima a 285 m$\mu$ . Cuando se trata con agua de bromo diluída, este máximo aumenta y también hay un incremento de extinción entre 240 m$\mu$ y 260 m$\mu$ . Si luego se hace actuar el anhidrido sulfuroso el máximo a 280 m$\mu$ disminuye pero

no se restituye el espectro original.

Cambios similares se observan en el espectro del glucósido de la metoxihidroquinona obtenido por síntesis química, como se vió en la primera parte.

TABLA VII

$R_f$ DE DIFERENTES FENOLES USANDO COMO SOLVENTE n-BUTANOL SATURADO CON AGUA

| Sustancias | Sustituyentes en el núcleo bencénico | $R_f$ en el papel in impregnar | $R_f$ en el papel impregnado | $\Delta$ |
|---|---|---|---|---|
| pirogalol | 1 OH, 2 OH, 3 OH | 0.71 | 0.1 | - 0.6 |
| pirocatequina | 1 OH, 2 OH | 0.81 | 0.4 | - 0.4 |
| metoxihidro - quinona | 1 OH, 4 OH, 2 $OCH_3$ | 0.81 | 0.83 | + 0.02 |
| hidroquinona | 1 OH, 4 OH | 0.81 | 0.86 | + 0.05 |
| metoxipirocatequina | 1 OH, 2 OH, 4 $OCH_3$ | 0.81 | 0.23 | - 0.57 |
| producto de hidrólisis del triglucósido | | 0.80 | 0.83 | + 0.02 |

$\Delta$ = $R_f$ papel impregnado - $R_f$ papel sin impregnar.

Acción de la fenol oxidasa

Cuando se incuba el triglucósido con la fenol oxidasa y luego se cromatografían los productos en papel, por revelado con nitrato de plata alcalino no se observa liberación del trisacárido. Los espectros de las incubaciones a distintos tiempos no muestran cambios en los máximos (Fig. 12), igual que en el caso del glucósido de la metoxihidroquinona sintético.

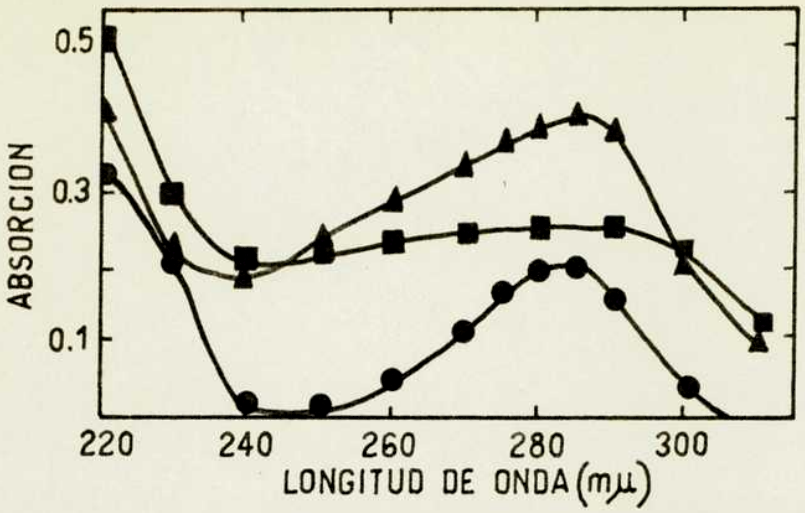



Fig. 11. Espectros del trisacárido glucósido aislado de germen de trigo: • solo, ▲ con agua de $Br_2$, ■ con agua de $Br_2$ y $SO_2$

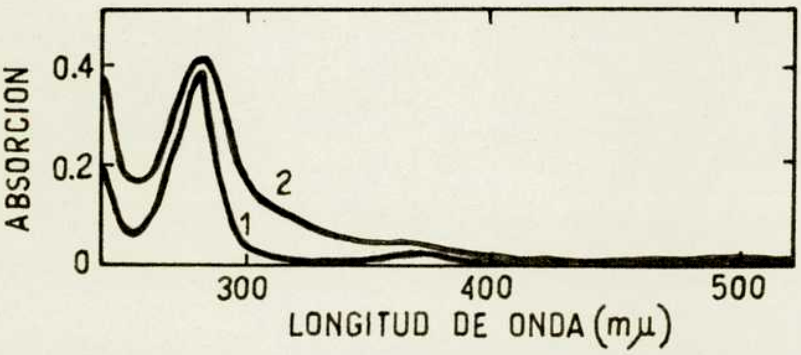



Fig. 12. Acción de la fenol oxidasa sobre el trisacárido glucósido: 1. inmediatamente de agregada la enzima; 2. a las 2 horas de incubación.

Espectro infrarrojo

Presenta los máximos característicos de la sustitución 1,4 ó 1,2,4 del núcleo bencénico.

De los datos obtenidos por cromatografía en los distintos solventes se deduce que la aglucona es la 2 - metoxihidroquinona, lo que está también confirmado por los resultados obtenidos en los espectros ultravioletas e infrarrojo del glucósido.

Identificación de las manchas de $R_{arbutina}$ 0.57 y 0.93

Debido a la mucho menor proporción en que se encuentran estas sustancias en el germen, no pudieron ser aislados en forma pura.

Los eluídos de papel, luego de concentrados se sometieron a un análisis igual que el descripto para el triglucósido.

Cromatografiados en n-butanol, piridina, agua y revelando con p-nitroanilina diazotada o con nitrato de plata alcalino, da cada eluído una sola mancha. Con el primero de los reactivos se obtiene una coloración anaranjada que con el transcurso del tiempo o por acción de soluciones alcalinas (solución de carbonato de sodio o de hidróxido de sodio) pasa a azul ; con el segundo de los reactivos la aparición de las manchas es lenta.

Por acción del agua de bromo diluída, la mancha de $R_{arbutina}$ 0.57 (I) da un azúcar reductor que se comporta como genciobiosa en cromatografía y electroforésis, y la mancha de $R_{arbutina}$ 0.93 (II) da un azúcar reductor que se comporta como glucosa en iguales condiciones.

El azúcar liberado por acción del agua de bromo sobre la mancha 1, por hi -

drólisis con ácido sulfúrico 1.5 N da sólo glucosa identificada por cromatogra - fía y por acción de la glucosa oxidasa. Iguales resultados se obtienen por hi - drólisis con $\beta$ glucosidasa.

El azúcar liberado por acción del agua de bromo sobre la mancha II, es identificado específicamente como glucosa por acción de la glucosa oxidasa. Las manchas I y II son totalmente hidrolizadas a glucosa por acción de la $\beta$ glucosidasa.

Los espectros ultravioletas de ambas manchas tienen los mismos máximos que el que presenta el espectro del triglucósido e igual variación por acción del agua de bromo diluída y del anhidrido sulfuroso, lo que evidencia que estas sustancias deben tener igual aglucona que el triglucósido. Efectivamente, hidrolizando las manchas I y II con $\beta$ glucosidasa en atmósfera de nitrógeno y cromato - grafiando los productos de hidrólisis en benceno, ácido acético, agua y revelando con el reactivo de Burke dan ambos hidrolizados manchas que corren como metoxihidroquinona.

## TABLA VIII

$R_{glucosa}$ DE LOS AZUCARES LIBERADOS POR ACCION DEL AGUA DE BROMO SOBRE LOS GLUCOSIDOS AISLADOS DEL GERMEN.

Solvente: n-butanol, piridina, agua (6:4:3) papel Whatman N° 4

| Azúcar o glucósido | Tipo de unión | $R_{glucosa}$ |
|---|---|---|
| maltosa | β -1-4 | 0.68 |
| gentiobiosa | β -1-6 | 0.54 |
| celobiosa | β -1-4 | 0.64 |
| laminaribiosa | β -1-3 | 0.79 |
| glucósido de $R_a$ 0.3 | | 0.2 |
| glucósido de $R_a$ 0.57 | | 0.54 |
| glucósido de $R_a$ 0.93 | | 1 |

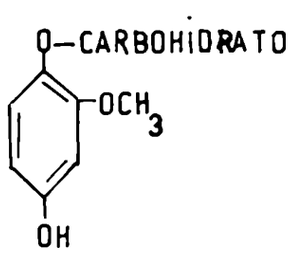
## CONCLUSIONES

Por ensayos cromatográficos de un extracto de germen de trigo comercial se demostró la existencia de glucósidos con 1, 2 y 3 restos glucosídicos unidos a una aglucona que tiene además un hidroxilo fenólico libre. En este trabajo se describe el aislamiento de los mismos.

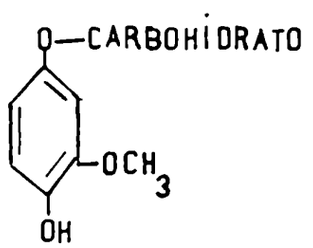
Se estudiaron técnicas analíticas como ser la acción del agua de bromo y la acción de la fenol oxidasa y su utilización especial en el caso de los glucósidos fenólicos. Con estas técnicas, además de los métodos clásicos de cromatografía, se llegó a determinar que el resto carbohidrato consiste en una, dos y tres unidades de glucosa unidas en posición $\beta$ 1-6.

El resto aglucona está constituído por la metoxihidroquinona, la que está unida por un hidroxilo fenólico al resto de hidrato de carbono.

De las dos estructuras posibles :




I




II

se descarta la estructura I por los resultados obtenidos por tratamiento del glucósido con la fenol oxidasa. Como se vió, la incubación de los glucósidos con esta enzima no produce liberación del resto de azúcar, lo que está de acuerdo con

una estructura del tipo de la estructura II.

Ya en 1953, Bungenkert de Jong y colaboradores (64), en una nota manifestaron haber aislado el monoglucósido de la metoxihidroquinona y de haber efectuado su síntesis. El aislamiento por el método de Bungenkert de Jong no pudo ser repetido como tampoco la síntesis química en las condiciones indicadas, de allí que su caracterización sea dudosa.

Otros autores han comprobado la presencia de quinonas derivadas de la metoxihidroquinona : la metoxi p-quinona y la dimetoxi p-quinona (65, 66).

Estas últimas se originarían a partir del glucósido por acción de la $\beta$ glucosidasa y los fenoles liberados en presencia del oxígeno del aire serían oxidados a las quinonas correspondientes. La importancia de estos derivados parece ser de gran interés en los procesos de panificación en donde por el agregado de la levadura a la masa con la $\beta$ glucosidasa que contiene, sería la causante de la formación de estas quinonas con las secuelas de coloración que se originan.

La presencia de glucosidasas y de oxidasas en el salvado de trigo ha sido ya bien demostrada (67) por lo que una acción tal podría originarse en las harinas mezcladas con el mismo, como ser las harinas integrales.

## BIBLIOGRAFIA


1. Bourquelot, E., citado por Bequin, C. Pharm. Acta. Helv. 1, 90 (1926).
2. Barnah, P. y Swain, T., Biochem. J. 66, 321, (1957).
3. Piria, P., Ann., 56, 35 (1845) - Richtmer, N.R., J.Am. Chem.Soc.56,2495 (1934).
4. Freudemberg, K.F., Reznik, H., Boesenberg, H., Ber., 85, 641, (1952).
5. McIlroy, R.J. The plant glucosides. Edward Arnold, London, (1951).
6. Bungenkerg, H.L., Klaar, W.J. y Vliegenthart,J.A., Nature 172, 402, (1953).
7. Virtanen, A.I. y Hielata, P.K., Suomen Kemistilehti B. 32, 138 (1959).
8. Virtanen, A.I. y Wahlroos, O., Suomen Kemistilehti B., 32, 139 (1959).
9. Virtanen, A.I., Braunwissenschaft, 14, 98 (1961).
10. Bardinskaya, M.S. y Shubert, T.A., Biokhimiya, 27, 46 (1962).
11. Harborne, J.B., Phytochemistry, 2, 85 (1963).
12. Harborne, J.B. y Sherrat, H.S.A., Biochem. J., 78, 298 (1961).
13. Conchie, J., Moreno, A., y Cardini C.E., Arch. Biochem. Biophys. 94, 342 (1961)
14. Hough, L. y Jones, J.R.N., Advanc. Carbohydrate Chem., 11, 185 (1956).
15. Bogard, L., Ann. Rev. Plant. Physiol, 9, 417 (1958), Ollis "Chemistry of natural phenolic compounds", Pergamon Press (1961).
16. Ciamician, G. y Ravenna, C., Atti. Reale Accad.Lencei, 25, 3. (1916).
17. Miwa, T., Naramura, S. y Shibata, A., Kōso Kagabu Shinpojiuma,12,48 (1957).
18. Hutchinson, A., Roy, C. y Towers, G.H.N., Nature, 181, 841 (1958).
19. Pridham, B.J., Nature, 182, 795 (1958).
20. Nystrom, C.W., Tolbert, N.E., y Wender, S.H., Plant Physiol., 34, 142 (1959).
21. Pridham, B.J., y Saltmarsh, M.J., Biochem. J., 74, 42 (1960).

22. Burma, D.P., y Mortimer, D.C., Arch. Biochem. Biophys. 62, 16 (1956)
Ginsburg, V., Stumpf, R.R., y Hassid, W.Z., J.Biol. Chem., 223, 977 (1956).

23. Cardini, C.E., y Leloir, L.F., Ciencia e Invest., 13, 514 (1957).
Cardini, C.E., y Yamaha, T., Nature, 182, 1446 (1958)
Yamaha, T., y Cardini, C.E., Arch. Biochem. Biophys., 86, 127 (1960).

24. Trivelloni, J.C., Recondo, E., y Cardini, C.E., Nature, 195, 1202 (1962).

25. Miller, L.P., Science, 92, 42 (1940).
Miller, L.P., Contribs. Boyce Thompson Inst., 12, 193 (1941).

26. Anderson, D., Hough, L., y Pridham, J.B., Biochem.J., 77, 564 (1960).

27. Nagahama, T., Nishida, R., Numata, T., Bull. of the Agric. Chem. Soc. of Japan, 24, 322 (1960).

28. Nagahama, T., Nishida, R., Numata, T., Bull. of the Agric. Chem. Soc. of Japan, 24, 537 (1960).

29. Folin, O., y Ciocalteu, V.J., J. Biol. Chem., 73, 627 (1927).

30. Somogyi, M., J. Biol. Chem., 160, 61 (1945).

31. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., y Smith, F., Anal. Chem., 28, 350 (1956).

32. Hugget, A.G., y Nixon, D.A., Biochem. J., 1957, p.12.

33. Pridham, J.B., Anal. Chem. 29, 1167, (1957).

34. Burke, W.J., Potter, A.D., y Parkhurst, R.M., Anal. Chem. 32, 727 (1960).

35. Trevelyan, W.E., Procter, D.P., Nature, 166, 444 (1950).

36. Jeanes, A., Wise, C.S., y Dimler, R.J., Anal. Chem., 23, 415 (1951).

37. Barbier, M., y Lederer, E., Biokhimiya, 22, 236 (1957).

38. Burke, W.J., Potter, A.D., y Parkhurst, R.M., J. of Cromatog., 6, D 19 (1961)

39. Jurd Leonard, J. of Cromatog., Suplemento 4, 369 (1960).

40. Aso, K., y Hamada, S., Tohoku Journal of Agricultural Research, 5, 317 (1955).

41. Robertson, A., y Waters, R.B., J. Chem. Soc. 2729 (1930).

42. Bárcsai, M., Nature, 165, 369 (1950).

43. Yamaha, T., y Cardini, C.E., Arch. Biochem. Biophys., 86, 127 (1960).

44. Nath, R.S., y Rydon, N.H., Biochem. J., 57, 1 (1954).

45. Fisher, R., Bergman, M., Ber. 50, 74 (1917).

46. Darin, H.D., Am. Chem. Journal, 42, 478 (1909).

47. Thiele, Ber. 31, 1248.

48. Dalgliesh, C.E., Arch. Biochem. Biophys. 58, 215 (1955).

49. Kubowitz, F., Biochem. Zeitschrift, 292, 221 (1937).

50. Lowry, O.H., Farr, J.N., Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).

51. Wieland, T.H., Pattermann, F., Angew. Chem., 70, 313 (1958).

52. Harrison, R., Nature, 181, 1131 (1958).

53. Clark, M.V., y Todd, A. "In vitro phosphorilation involving oxidation of quinol phosphates", en Ciba Foundation Symposium on "Quinones in electron transport" (1961), pág. 161.
Clark, Kirby, Todd, Nature, 181, 1600 (1958).
Clark, Hutchinson, Todd, Nature, 187, 59 (1960).

54. Bloot E., Eager, V., Silverman, D., J. Am. Chem. Soc. 68, 567 (1946).

55. Morton, R.A., Hassan, A., Calloway, T.C., J. Chem. Soc. 883, (1934).

56. Fieser y Fieser, "Organic Chemistry", pág. 703.

57. Loury y colaboradores, J. Chem. Soc., 1313, 1935.

58. Gillam, A.E., y Moss, D.G., J. Chem. Soc., 1387, 1947.

59. Mann, H.S., J. Biol. Chem. 181, 803 (1949).

60. Brauds, E.A., J. Chem. Soc. 490 (1945).

61. Cushing, M.C., J. Am. Chem. Soc. 70, 1184 (1948).

62. Ennelus, J. y Vigneau, J.L. Bull. Soc.Chim. Biol. 27, 387 (1945).

63. Pugh, C.E., Raper, H.S., Biochem. J. 21, 1370 (1927).

64. Bungenkert de Jong, Kaar, W.J., Vliegenthart, J.A., Nature, 172, 402 (1953).

65. Consgrove, D.J., Daniels, D.G.H. y colaboradores, Nature, 169, 966 (1952).

66. Consgrove, D.J., Daniels, D.G.H. y colaboradores, J. Chem. Soc. 1952,4821.

67. Bertrand, G., Compt. Rend. 145, 1352 (1908).