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

Uridina-difosfato-azúcares en bulbo de dalia

González, Nélida Susana

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:
González, Nélida Susana. (1963). Uridina-difosfato-azúcares en bulbo de dalia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1184_Gonzalez.pdf

Cita tipo Chicago:
González, Nélida Susana. "Uridina-difosfato-azúcares en bulbo de dalia". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1184_Gonzalez.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

FCEyN-BA.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
facultad de ciencias
exactas y naturales

uridina_difosfato_azucares en bulbo de dalia

nelida susana gonzalez

TESIS: 1164

tesis presentada para optar al titulo de
doctora en quimica
orientacion biologica

buenos aires
1963

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
facultad de ciencias
exactas y naturales

uridina_difosfato_azucares en bulbo de dalia

nelida susana gonzalez

resumen de la tesis presentada para optar al
titulo de doctora en quimica
orientacion biologica

buenos aires
1963

Padrino de Tesis

Dr. Horacio O. Pontis

Durante el estudio de los nucleótidos presentes en bulbos de Dalia, se han logrado aislar UDP-glucosa y UDP-galactosa, acompañados de otro nucleósido-difosfato-azúcar que se identificó como UDP-fructosa.

También se determinó la presencia de UDP-acetilglucosamina, conjuntamente con UDP-acetilgalactosamina en una mezcla similar a la descripta por Pontis en hígado.

Si bien se han intentado varios métodos de purificación de los extractos alcohólicos de bulbo, se ha recurrido principalmente al uso de Dowex-1-acetato seguido de cromatografía en papel o de intercambio iónico en columna de Dowex-1-cloruro.

El extracto alcohólico se pasó por una columna de Dowex-1-acetato y eluyó con una solución de cloruro de sodio 0.2 M - ácido clorhídrico 0.003 N. La fracción de los nucleótido-azúcares se adsorbió sobre carbón-celita, recuperándoselos como sales de sodio por elución con alcohol-50 %. Estos eluatos se purificaron posteriormente por cromatografía en papel con los solventes de etanol-acetato de amonio neutro y acídico descriptos por Paladini y Leloir o por cromatografía de intercambio en columna de Dowex-1-cloruro utilizando gradiente de elución de cloruro de sodio a pH constante. De esta forma se obtuvieron dos fracciones que contenían principalmente UDP-glucosa y UDP-acetilglucosamina, respectivamente.

Todas las fracciones de UDP-glucosa separadas en las distintas preparaciones y por los distintos métodos de aislamiento utilizados, liberaban sustancias reductoras al ser sometidas a hidrólisis durante 15 min. a 100° C en ácido clor -

hídrico 0.01 N.

La cromatografía en papel de estos productos de hidrólisis utilizando fenol-agua o butanol-piridina-agua como solventes permitió separar tres manchas revelables con nitrato de plata alcalino y cuyos R_{ribosa} eran coincidentes con los de glucosa, galactosa y fructosa.

Se obtuvieron idénticos resultados por electroforésis o cromatografía en butanol-piridina-agua, ambos sobre papel impregnado en tetraborato de potasio. La fructosa separada previamente por cromatografía en fenol-agua de los otros componentes, se la identificó por el espectro característico del color desarrollado en presencia de resorcinol-ácido clorhídrico en la reacción de Roe.

Además se reveló la presencia de fructosa por reducción con borohidruro de sodio, identificándose solamente sorbitol y manitol por cromatografía en papel impregnado con molibdato de amonio utilizando butanol-piridina-agua como solvente.

El espectro de absorción en el ultravioleta de la fracción UDP-glucosa era indistinguible del de uridina y presentaba los mismos cambios con el pH. Los nucleótidos liberados por hidrólisis de 15 min. en ácido 0.01 N y de 30 min. en ácido 1 N a 100° C, se identificaron como UDP y UMP respectivamente , por cromatografía en papel utilizando los solventes de etanol-acetato de amonio neutro y ácido.

Por tratamiento con la pirofosfatasa orgánica de veneno de serpiente se separaron dos fracciones; una con absorción en el ultravioleta formada por el nucleósido residual y otra que contenía los fosfatos orgánicos. La primera se identificó, cromatográficamente en tres sistemas distintos de solventes y por

electroforésis a pH 2, como uridina. Los ésteres fosfóricos liberados durante la hidrólisis enzimática se estudiaron por electroforésis sobre papel impregnado con tetraborato de cetil-trimetilamonio, observándose tres manchas con reacción positiva de fosfatos (Burrows) y cuyas movilidades eran similares a las de glucosa-1-fosfato, galactosa-1-fosfato y fructosa-1-fosfato.

La cromatografía en isopropanol-amoníaco-agua de la fracción UDP-glucosa, permitió obtener UMP y los ésteres cíclicos. Estos últimos se aislaron e hidrolizaron durante 30 min. a 100° en ácido clorhídrico 1 N, cromatografiándose en papel impregnado con tetraborato de potasio 0.01 M usando butanol-piridina-agua como solvente. Se identificaron tres manchas reductoras con R_{rib} de glucosa, galactosa y fructosa.

El estudio analítico de esta fracción permitió determinar la presencia de dos grupos fosfato por molécula de base, siendo uno de ellos liberable como fosfato inorgánico durante una hidrólisis de 15 min. a 100° C con ácido clorhídrico 1 N. Además, por hidrólisis suave se liberaba una molécula de azúcar reductor por molécula de uridina.

La incubación con UDP-glucosa dehidrogenasa de hígado de la fracción de UDP-glucosa, permitió confirmar la presencia en la mezcla de un compuesto con fructosa. El UDP-ácido glucurónico formado por acción de la enzima sobre el UDP-glucosa se separó del resto de la mezcla por cromatografía en columna de Dowex-1-formiato que se eluyó con gradiente lineal de formiato de amonio. Posteriormente se determinó en la mezcla residual la relación de los tres azúcares liberados en la hidrólisis ácida y separados convenientemente por cromatografía de papel.

Los valores obtenidos indican que la fructosa comprendía el 9.4% de la mezcla oxidada, mientras que en la mezcla original el porcentaje era del 3.4 %.

El hecho de que el nucleótido de fructosa se comporte en forma idéntica al UDP-glucosa o UDP-galactosa en cromatografía de papel o de columna de intercambio, indica que estas sustancias están estructuralmente muy relacionadas. Además, libera UDP y UMP en las mismas condiciones de acidez que el UDP-glucosa, por lo que se puede deducir que la unión entre la uridina y la fructosa es a través de un grupo 5'-pirofosfato. Este tipo de unión está corroborado por la acción del veneno de serpiente que conduce a la formación de una mezcla éster - res fosfóricos y de uridina, por acción de la 5'-nucleotidasa, también presente en el extracto enzimático, sobre el nucleótido-monofosfato producido en la hidrólisis del puente pirofosfato.

Estos datos, sin embargo, no permiten determinar cuál es el C de la fructosa a través del cual se une al nucleótido difosfato. No obstante, una apreciación visual de los cromatogramas indica que la velocidad de liberación de la fructosa es similar a la de la glucosa y galactosa.

La velocidad de hidrólisis en medio ácido diluído del UDP-fructosa sintético preparado a partir de UMP-5'-morfolidato y de fructosa-1-fosfato es mucho menor que la de glucosa a partir de UDP-glucosa. Esto indicaría que en el nucleótido natural, la fructosa no está unida a través del C-1, sino a través de una unión más lábil probablemente involucrando al C-2.

La presencia de UDP-fructosa en tubérculos de Dalia es interesante, ya que lo señala como posible intermediario en la biosíntesis de fructosanos.

La fracción de UDP-acetilglucosamina se determinó que libera por hidrólisis ácida nueve sustancias que dan la reacción de Morgan-Elson para acetilhexosaminas y que migran como acetilglucosamina y acetilgalactosamina en cromatografía de papel impregnado con borato de potasio, utilizando butanol-piridina-agua como solvente.

La sustancia con la misma movilidad que la acetilgalactosamina sometida a una hidrólisis ácida que lleva a su completa desacetilación se comporta como galactosamina en cromatografía de papel con butanol-piridina-agua.

Además, por oxidación con ninhidrina de esta hexosamina, se determinó la formación de la correspondiente pentosa : lixosa, de acuerdo a su movilidad en butanol-piridina-agua.

Por hidrólisis ácida en clorhídrico 0.01 N y 1 N se observó la formación de UDP y UMP respectivamente, de acuerdo a su comportamiento en cromatografía de papel con los solventes neutro y acídico de etanol-acetato de amonio.

Estas observaciones indican que en bulbo de Dalia se encuentra presente una mezcla de UDP-acetilglucosamina y UDP-acetilgalactosamina similar a la aislada en hígado y que no habría sido detectada aún en vegetales superiores.

Además, en tan solo una de las preparaciones, se logró aislar por cromatografía, en el solvente neutro de etanol-acetato de amonio, una fracción que migraba como GDP-manosa.

Su espectro era indistinguible del de guanosina y presentaba los mismos cambios con el pH. Se encontraron dos grupos fosfato por molécula de base, uno de ellos liberable en ácido clorhídrico 1 N durante 20 min. a 100° C.

Por hidrólisis suave a pH 2 durante 15 min. a 100° C, se comprobó la liberación de tres azúcares reductores cuyos R_{ribosa} en fenol-agua eran coincidentes con los de glucosa, manosa y fructosa.

Si bien la cantidad disponible no permitió efectuar un estudio más detallado de esta fracción, los datos experimentales obtenidos señalarían la presencia en tubérculo de Dalia de una mezcla de nucleótidos de guanosina semejante a la encontrada por Pontis et al. en el hongo Eremothecium Ashbyii.

- - -

FCE-UNA-BA.

Padrino de Tesis

Dr. Horacio G. Pontis

Llegue mi agradecimiento a todos aquellos que de una u otra forma me han permitido incursionar en el campo de la investigación bioquímica.

Al Dr. Horacio G. Pontis mi sincero reconocimiento por sus enseñanzas, sus críticas y su constante guía en la conclusión de este trabajo.

Al Dr. Luis F. Leloir, Carlos E. Cardini y demás miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por sus acertadas críticas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca que me concediera, por dos períodos consecutivos, y que permitió dedicarme de lleno a la realización de este trabajo.

A mis padres

ABREVIATURAS USADAS

TMP, TDP, TTP	:	Timidina-fosfatos
CMP, CDP, CTP	:	Citidina-fosfatos
AMP, ADP, ATP	:	Adenosina-fosfatos
UMP, UDP, UTP	:	Uridina-fosfatos
GMP, GDP, GTP	:	Guanosina-fosfatos
λ	:	Longitud de onda
E_λ	:	Extinción a la longitud de onda λ
$m\mu$	:	milimicra
μM	:	micromol
U.V.	:	ultravioleta
DPN_{ox}	:	Difosfopiridin-nucleótido oxidado
UDPG	:	UDP-glucosa
UDPAG	:	UDP-acetilglucosamina
GDPM	:	GDP-manosa
Fru-1-P	:	Fructosa-1-fosfato
Gal-1-P	:	Galactosa-1-fosfato
Glu-1-P	:	Glucosa-1-fosfato
P_i	:	Fosfato inorgánico

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
PARTE EXPARIMENTAL	
Materiales	5
Métodos	
analíticos	5
cromatográficos	7
electroforéticos	7
de extracción y purificación de nucleósido-difosfato-azúcares	9
Aislamiento de uridina-difosfato-azúcares	12
Fracción UDP-acetil-glucosamina	
identificación de los azúcares	18
" " de UDP y UMP	20
Fracción UDP-glucosa	
identificación de los azúcares	21
" " de los ésteres fosfóricos	22
" " del nucleósido	23
" " de UDP y UMP	24
obtención de los ésteres cíclicos	24
acción de la UDP-glucosa-deshidrogenasa	25
RESULTADOS	
Estudio de la fracción GDP-manosa	29
" " " " UDP-acetilglucosamina	30
" " " " UDP-glucosa	35
DISCUSION	43
BIBLIOGRAFIA	45

introduccion

En el metabolismo celular ocupan un lugar preponderante una serie de com - puestos derivados principalmente del uridina-difosfato y cuyo número ha ido aumentando paulatinamente a partir del aislamiento del uridina-difosfato-glucosa en 1949, en extractos de levadura (1, 2, 3). Su presencia se ha detectado también en tejidos animales, tumores, plantas, hongos.

Con posterioridad y de diversos materiales, se han podido aislar los UDP-derivados de los siguientes azúcares : galactosa (4), ácido glucurónico (5), ácido galacturónico (6), acetilglucosamina (7), acetilgalactosamina (8), D-xilosa (9), L-arabinosa (9), ácido murámico (10, 11), ramnosa (12), dihidroxiacetona (13); así como otros nucleósido-difosfato derivados de distintas bases, tales como : CDP-glicerol (14, 15, 16, 17), CDP-ribitol (14, 15, 16, 17), CDP-colina (18), CDP-etanolamina (18), GDP-manosa (1(), GDP-glucosa (20), GDP-fructosa (20), TDP-ramnosa (21), TDP-glucosa (22), TDP-manosa (23), ADP-glucosa (24), ADP-ácido fosfoglicérico (25).

Estos compuestos están involucrados en reacciones de transformación del resto azúcar, que comprenden :

Isomerizaciones : tales como la interconversión de galactosa y glucosa fosfatos, que tiene lugar a través de las siguientes reacciones :

(I) galactosa-1-fosfato + UDP-glucosa ⟷ glucosa-1-fosfato + UDP-galactosa

(II) UDP-glucosa ⟷ UDP-galactosa

en suma

galactosa-1-fosfato ⟷ glucosa-1-fosfato

El sistema responsable de esta epimerización y que se llamó de la galacto - waldenasa, fué estudiado por Caputto et al. (26) en extractos de Saccharomyces fragilis crecida en lactosa. Posteriormente Kalckar et al. (27, 28) separaron la galactosa-1-fosfato uridil-transferasa que cataliza la reacción (I) y la UDP-galactosa-4-epimerasa, que lo hace con la reacción (II).

También se han estudiado otras reacciones de formación de epímeros, como ser : transformación de ácido glucurónico a ácido galacturónico (29, 30, 31) , acetilglucosamina a acetilgalactosamina (32, 33), D-xilosa a L-arabinosa (34,35) glucosamina a galactosamina (33).

Oxidaciones: UDP-glucosa a UDP-ácido glucurónico (36, 37, 38, 39) que comprende la oxidación de la glucosa a nivel del C-6.

Oxido-reducción interna: GDP-manosa a GDP-L-fucosa (GDP-L-6-deoxigalactosa) (40) que requiere una inversión de las posiciones 3, 4 y 5 y una reducción del C-6. El proceso involucra una oxido-reducción interna con formación del 4-ceto-6-deoxicompuesto, seguido de enolización.

Decarboxilación: UDP-ácido glucurónico a UDP-D-xilosa (29, 30), que comprende la eliminación enzimática del -COOH del ácido urónico.

La mayor parte de estos compuestos se ha demostrado que actúan también como dadores de su resto azúcar en la síntesis de di- y polisacáridos naturales.

De un modo general, el UDP-glucosa interviene de acuerdo a la siguiente reacción :

UDP-glucosa + aceptor —→ UDP + glucosil-aceptor

Leloir y Cardini (41, 42) demostraron, con extractos de germen de trigo, la formación de sacarosa, donde la fructosa libre actúa como aceptor, de acuerdo a la siguiente reacción :

UDP-glucosa + fructosa —→ UDP + sacarosa

Los mismos autores (43) encontraron la enzima que cataliza la reacción

UDP-glucosa + fructosa-6-fosfato ——→ sacarosa-fosfato + UDP

En los tejidos vegetales hay fosfatasas que defosforilan este éster fosfórico, por lo que, la formación de sacarosa-fosfato sería otro mecanismo de síntesis de sacarosa en plantas.

Otros investigadores lograron aislar los sistemas enzimáticos que sintetizan otros disacáridos: trehalosa-fosfato (44), lactosa (45), glucurónidos (46 , 47), glucósidos (48, 49, 50), así como galactolípidos (51, 52, 53, 54) y polisacáridos.

de Fekete, Leloir y Cardini (55) detectaron en el gránulo de almidón la enzima responsable de la síntesis de ese polisacárido, según la siguiente reacción:

UDP-glucosa + aceptor —→ UDP + $\chi(1\rightarrow4)$glucosil-aceptor

También se determinó la biosíntesis de otros polisacáridos, tales como el glucógeno (56, 57), celulosa (58, 59), quitina (60, 61), ácido hialurónico (62, 63, 64), callosa (65).

Las plantas pertenecientes a la familia de las Compositae se caracterizan porque acumulan sus reservas de hidratos de carbono como polisacáridos de fructosa. Entre ellos el más estudiado es la inulina. Este es un polímero lineal

de fructosa, donde los residuos fructofuranosil se encuentran unidos a través de las posiciones 1-2', habiéndose demostrado la existencia de un resto no reductor de glucosa en el extremo de la cadena.

Como se ha visto, una de las funciones más importantes de los nucleósido-difosfato-azúcares es la de comportarse como dadores en la biosíntesis de una serie de substancias constitutivas de organismos tanto animales como vegetales, de modo que la identificación de un nucleótido con un residuo de fructosa en extractos de bulbo de Dalia, sería un indicio de mecanismo análogo para la síntesis de la inulina.

GDP-fructosa es el único nucleótido con fructosa descripto hasta el presente, y ha sido aislado de la fracción de GDP-manosa en Eremothecium ashbyii conjuntamente con GDP-glucosa, por Pontis, James y Baddiley (20).

Durante el curso de esta investigación se han aislado del tubérculo de Dalia UDP-glucosa y UDP-galactosa, acompañados de otro nucleótido de estructura similar que se identificó como UDP-fructosa.

Además, también se demostró la existencia de UDP-acetilglucosamina mezclado con UDP-acetilgalactosamina (8, 66, 67), cuya presencia no había sido detectada en plantas superiores.

parte experimental

Materiales

Bulbos de Dalia fueron adquiridos en el comercio.

UDP-glucosa, UDP-acetilglucosamina y GDP-manosa fueron obtenidos en el laboratorio a partir de levadura de pan (68).

ADP-glucosa, obtenido por síntesis química, fué cedido gentilmente por el Dr. E. Recondo.

Acetilgalactosamina y galactosamina fueron cedidas gentilmente por el Dr. Carlos E. Cardini.

Enzimas:

Pirofosfatasa orgánica de veneno de serpiente (Crotalus adamanteus), fué cedida gentilmente por el Dr. R. Piras.

UDP-glucosa-dehidrogenasa fué preparada según el método descripto por Strominger (37) hasta la etapa de precipitación con sulfato de amonio alcalino, a partir de hígado de conejo.

Métodos

A) Analíticos

1) Determinación de fosfato.

Método de Fiske y SubbaRow (69).

Este método se basa en la formación del Azul de Molibdeno durante la reducción del ácido fosfomolíbdico por el ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico.

2) Determinación de azúcares reductores.

Método de Park y Johnson (70).

Este método aprovecha de la propiedad de los azúcares de reducir, en medio alcalino a los iones ferricianuro, para formar el Azul de Prusia en presencia de iones férricos.

Método de Dubois - Gilles - Hamilton y Smith (71).

Este método se basa en la coloración que desarrollan los disacáridos, polisacáridos, azúcares libres y sus derivados con el fenol en presencia de ácido sulfúrico concentrado.

3) Determinación de fructosa.

Método de Roe (72).

Este método está basado en la formación de un producto de condensación coloreado entre la resorcina y el derivado furánico producido por acción del ácido clorhídrico en caliente, sobre la fructosa.

4) Determinación de pentosas.

Método de Mejbaum (73).

Este método se basa en la coloración que presenta, en presencia de iones férricos, el producto de condensación de la orcina con el furfural formado por acción del ácido clorhídrico sobre la pentosa.

5) Determinación de acetilhexosaminas.

Método de Morgan y Elson (Modificación de Reissig-Strominger y Leloir)(74).

Este método se basa en la formación de un derivado pirrólico por interacción entre los grupos acetilo y aldehídico de la acetilhexosamina, en medio alcalino; que luego se condensa con p-dimetil-amino-benzaldehido en

solución ácida con formación de un cromógeno característico.

B) Cromatografía sobre papel

Se usaron los siguientes solventes:

6) Azúcares

butanol-piridina-agua (6:4:3) (75)

fenol-agua (9:1) (76)

Para la identificación de acetilhexosaminas y de polialcoholes se usó el primer solvente con papel previamente impregnado en tetraborato de potasio 0,2 M y en molibdato de amonio 5 % (77) respectivamente.

Para la separación de fructosa y arabinosa se usó este mismo solvente con papel previamente impregnado en tetraborato de potasio 0.01 M.

7) Nucleótidos

sulfato de amonio saturado-acetato de sodio 0.1 M-isopropanol (79:19:2) (78)

etanol-acetato de amonio 1 M pH 3,8 (OL-38) (7:3)
etanol-acetato de amonio 1 M pH 7,2 (OL-22) (7:3) (79)

8) Bases

isopropanol-ácido clorhídrico-agua (39:11:10) (80)

butanol acuoso (80 % v/v) con 5 % de amoníaco (81)

9) Ésteres fosfóricos

isopropanol-amoníaco-agua (7:1:2) (82)

C) Electroforésis sobre papel

Se usó un aparato semejante al descripto por Markham y Smith (83).

10) Azúcares

Papel Whatman Nº 1 impregnado con tetraborato de potasio 0.05 M pH 9,2 durante 5 horas a 600 voltios (84).

11) Esteres fosfóricos

Papel Whatman N° 1 impregnado en tetraborato de potasio durante 2 horas a 1.000 voltios.

Papel Whatman N° 1 impregnado en tetraborato de cetiltrimetilamonio 0,1 M pH 9,2 a 1.000 voltios durante 5 horas (85).

12) Bases

Papel Whatman N° 1 impregnado con buffer cloruro de potasio-ácido clorhídrico 0.02 N pH 2 durante 1 1/2 horas a 1.000 voltios (20).

D) Detección de las sustancias sobre el papel

13) Azúcares

Nitrato de plata alcalino (86) para separaciones cromatográficas y el mismo revelador, según modificación de Cabib y Leloir (87) para ionoforésis.

Bencidina-ácido tricloroacético (88), en especial para acetilhexosaminas.

14) Polialcoholes

Nitrato de plata alcalino (86)

15) Esteres fosfóricos

Reactivo de Burrows (89)

16) Bases y nucleótidos

Se localizaron sobre el papel con luz ultravioleta.

Estudio de los métodos de extracción

a) ácido tricloroacético 5 % en frío.

b) alcohol etílico 50 % en caliente.

a) Los bulbos se pelaron, se cortaron en trozos y homogeneizaron en la licuadora con ácido tricloroacético 7 % previamente enfriado (100 ml / 100 grs de bulbo).

Por una experiencia previa se determinó en los bulbos un 85 % de agua; valor que se tuvo en cuenta para el cálculo de la concentración final del ácido tricloroacético en la primera extracción.

Se filtró con vacío a través de Celita, extrayéndose la torta residual por dos veces más con ácido tricloroacético 5 %. Los filtrados se extrajeron tres veces con éter para quitar el ácido tricloroacético, y llevaron a neutralidad con álcali.

b) El bulbo descortezado se cortó en trozos y homogeneizó en la licuadora con etanol (100 ml de alcohol + 50 ml de agua/100 grs de bulbo. El homogenato, calentado lentamente y con agitación, se llevó a ebullición durante 1 min.. Se lo dejó durante la noche en el cuarto frío a 4° C , y al día siguiente se filtró por Buchner con ayuda de Celita. El filtrado se ajustó a pH 7 con álcali, observándose la formación de un precipitado, que se separó filtrando por papel.

Estudio de los métodos de purificación del extracto alcohólico

c) Precipitación con acetato de bario (90).

El extracto alcohólico se llevó a pH 9 con hidróxido de potasio, agre-

gándose acetato de bario 8 % (100 ml/100 grs de bulbo original) seguido de etanol hasta una concentración de 80 % (V/V) final. Se dejó en la heladera durante la noche, y al día siguiente se centrifugó. El precipitado se lavó con alcohol 80 %, alcohol y finalmente con éter. Se secó al vacío en desecador con cloruro de calcio.

El precipitado se disolvió en ácido clorhídrico 0.1 N frío y ajustó a pH 9 con hidróxido de potasio. Se dejó en baño de hielo durante una hora y se centrifugó.

El siguiente esquema explica las operaciones efectuadas.

precipitado A: sales de bario insolubles en agua

sobrenadante: se agregó alcohol hasta 80 % (V/V). Se dejó a 0° C por 1 hora y centrifugó.

precipitado B: sales de bario solubles en agua e insolubles en alcohol 80 %.

sobrenadante

d) Precipitación con acetato de mercurio (3)

El extracto alcohólico se llevó a pH 3 con ácido nítrico 5 N, agregándose 30 ml de acetato de mercurio 20 % por cada 1.000 ml. de líquido. Se dejó toda la noche en la heladera y al día siguiente se filtró a través de una capa de Celita. El precipitado de sales mercúricas se suspendió en agua. El recipiente se colocó en un baño de hielo y con agitación contínua du -

rante el burbujeo de una corriente de sulfuro de hidrógeno. Cuando no se absorbió más gas, la suspensión se filtró y el precipitado de sulfuro mercúrico se lavó exhaustivamente con agua.

El filtrado y los líquidos de lavado se juntaron y sorearon para eliminar todo resto de sulfuro de hidrógeno. Se ajustó a pH 7 con amoníaco.

e) Cromatografía en Dowex-1-acetato.

Se usó una columna de Dowex-1 X4 (200-400 mesh) en la forma acetato de 1,5 x 12 cm para 50 γM de la mezcla previamente precipitada como sales de Hg, y de 4,5 x 50 cm para 11.000 γM de extracto alcohólico.

Luego de absorbida la muestra, la resina se lavó con agua hasta lograr una E_{260} mμ por debajo de 0,100 , y también reacción negativa de azúcares y polisacáridos con fenol-ácido sulfúrico.

Se eluyó con una solución 0,2 M cloruro de sodio-0,003 N ácido clorhídrico recogiéndose volúmenes de 5 ml para la columna de 1,5 cm de diámetro y de 12 ml para la columna de 4,5 cm, en un colector de fracciones.

El desarrollo de la cromatografía se siguió por E_{260} mμ en el espectrofotómetro cada cuatro tubos. Esta longitud de onda corresponde al valor máximo de absorbancia de la uridina, siendo el índice de absorbancia molar $(\alpha \times 10^3) - 10$

concentración de uridina 4 Mγ/cc de solución E_{260} mμ /10

Las fracciones correspondientes a cada pico se juntaron, ajustándose a pH 7 con álcali. Los nucleótidos se aislaron como sales sódicas por absorción sobre carbón y subsiguiente elución con alcohol 50 % y finalmente con alcohol 50 % -amoníaco.

AISLAMIENTO DE URIDINA-DIFOSFATO-AZUCARES

Preparación 1 :

El extracto alcohólico preparado a partir de 5,6 kgrs. de bulbo, con una concentración de 18.000 μM calculados como uridina, se purificó por precipitación con acetato de mercurio, obteniéndose 1.400 μM.

Sobre alícuotas de 44 μM se intentó la separación de los componentes por los siguientes métodos

1) Cromatografía en columna de Dowex-1-Cl^- .

Se pasó la mezcla por una columna de Dowex-1 X4 (200 - 400 mesh) en la forma Cl^- de 1 x 12 cm, lavándose con agua hasta bajar la E_{260} mμ por debajo de 0,100. Se eluyó sucesivamente con soluciones de ácido clorhídrico : 0,001 N, 0,005 N, 0,01 N y luego con soluciones de ácido clorhídrico 0,01 N con concentraciones crecientes de cloruro de sodio de 0,01, 0,02, 0,03 y 0,1 N. La elución de la columna se siguió por E_{260} mμ y determinación de fosfato inorgánico por el método de Fiske y SubbaRow.

Sólo se observó separación de gran cantidad de fosfato inorgánico. La recuperación de los micromoles colocados, calculados como uridina, fué muy baja.

2) Cromatografía sobre papel.

La mezcla se colocó sobre Whatman N° 17, cosido a N° 1 para disminuir la velocidad de flujo del solvente; el cromatograma se desarrolló durante 48 horas en etanol-acetato de amonio pH 7,2 (fig.1) obteniéndose una serie de bandas absorbentes en el ultravioleta. El acetato de amonio se eliminó del papel por lavado, en sistema ascendente-descendente, con alcohol absoluto. Las sustancias correspondientes a cada banda se eluyeron con agua destilada y tra-

tó de identificarlas por su espectro de absorción en el ultravioleta entre 220 y 300 mμ en medio ácido y alcalino. Posteriormente se caracterizaron por cromatografía con etanol-acetato de amonio pH 3,8 y con sulfato de amonio -acetato de Na e isopropanol (fig. 2 y 3).

Las bandas absorbentes separadas por cromatografía en CL-22 se eluyeron, concentraron y cromatografiaron en el solvente de Markham y Smith, obteniéndose tres bandas principales en la zona de los nucleósido-difosfato-azúcares, que se eluyeron separadamente.

Las sales fijas de los eluatos se intentaron eliminar por los siguientes métodos:

a) Carbón:

Adsorción sobre carbón - celita en frío y elusión con alcohol - 50 % a temperatura ambiente.

b) Dowex-1-carbonato:

Este método fué descripto por Cohn et al. (91) para separar nucleótidos de aniones fijos, usando como eluyente carbonato de trietilamonio neutro que puede eliminarse fácilmente por liofilización.

Un alícuota de 7 ml de eluato conteniendo 3 μM de sustancia calculados como uridina, se pasaron a través de una columna de Dowex-1-carbonato de 1 x 13 cm. Se lavó con agua hasta alcanzar una E_{260} mμ por debajo de 0.100 y comenzó a eluir con carbonato de trietil-amonio 0.05 M pH 6,5.

Se fraccionó cada 10 ml, determinándose la presencia del anión sulfato con cloruro de bario en medio ácido diluído, y de nucleótido por su absorbancia a 260 mμ . Se recogieron 40 ml sin E_{260} mμ y sin sulfato.

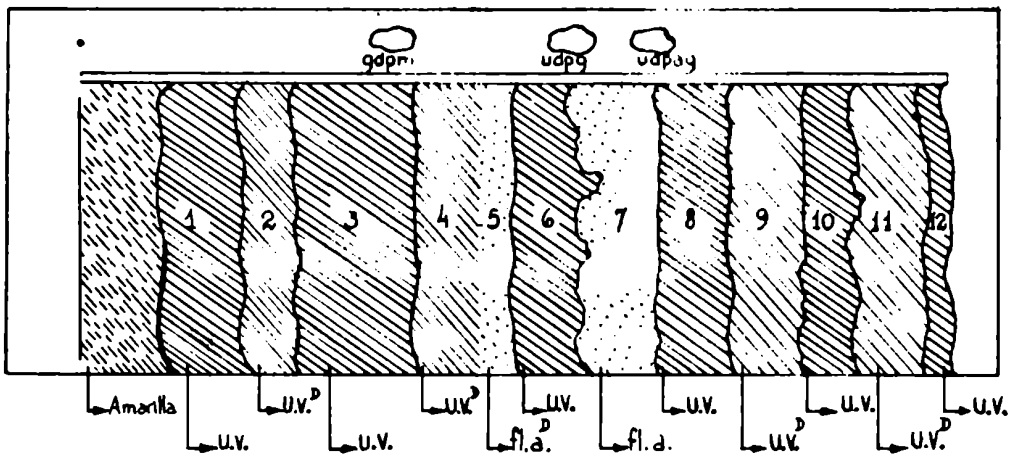


fig 1 cromatograma desarrollado en OL-22.

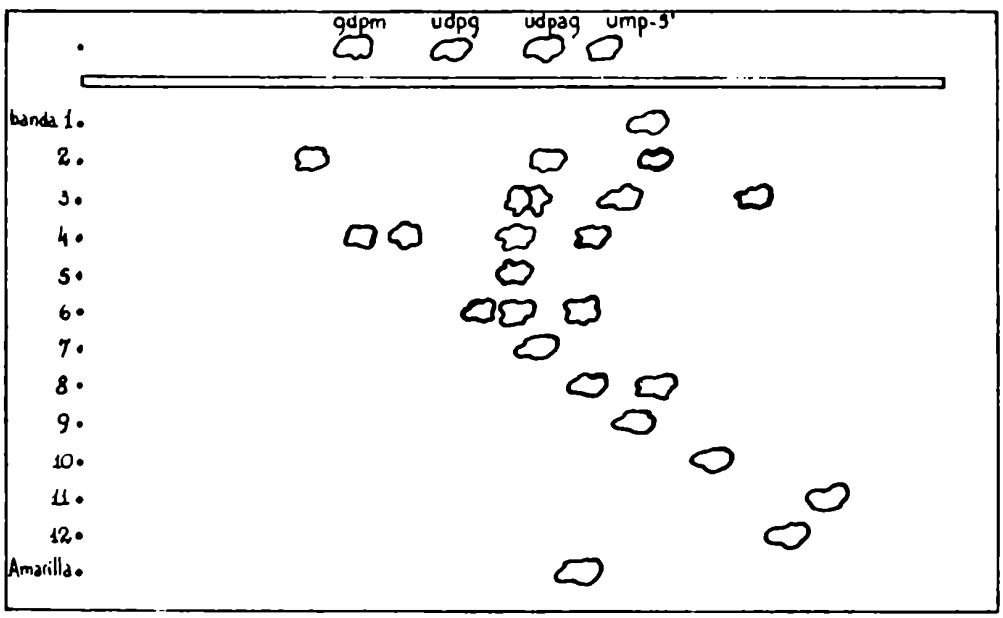


fig 2 cromatograma desarrollado en OL-38

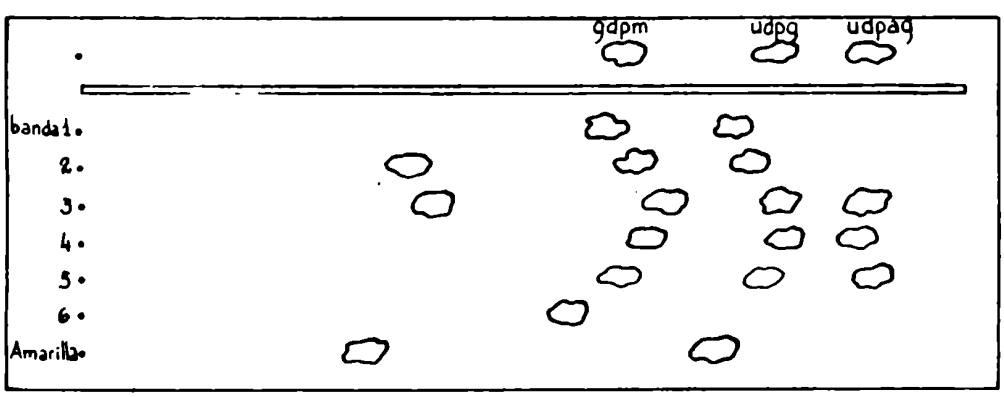


fig 3 cromatograma desarrollado en $SO_4(NH_4)_2$-CH_3-COONa - isopropanol.

Se aumentó la molaridad del eluyente a 0.1, recogiéndose otros 40 ml. En esta fracción se encontró todo el sulfato y la absorción colocados en la columna.

c) Uso de Sephadex-G-25, de polivinil-cloruro (P.V.C.) y de celulosa.

1 cc de eluato se pasó a través de una columna de Sephadex-G-25, equilibrado en agua, de 1 x 50 cm. Se eluyó con agua, recogiéndose fracciones de 1 ml a una velocidad de 0.1 ml por minuto.

Se midió $E_{260\ m\mu}$, así como la presencia de sulfato, encontrándose que ambos se eluían juntos de la columna.

También se hicieron experiencias similares con Sephadex-G-25, P.V.C. y celulosa, pero equilibrados en alcohol-50%, en columnas de las mismas dimensiones que la anterior y que se eluyeron con alcohol-50 %; no lográndose tampoco separación alguna.

3) Cromatografía en columna de Dowex-1-acetato.

La mezcla se absorbió sobre una columna de Dowex-1-acetato en las condiciones descriptas durante el estudio de los métodos de purificación.

Durante la elución se separaron tres picos (fig. 4) que se caracterizaron por cromatografía en papel usando etanol-acetato de amonio pH 3,8 como solvente.

Del tercer pico (III) se aisló por cromatografía con etanol-acetato de amonio pH 3,8 en papel Whatman N° 3, una banda con R_f similar al del UDP-glucosa y cuyo espectro de absorción en el ultra violeta

se identificó con el de la uridina.

Esa zona correspondiente al UDP-glucosa, se eluyó con agua, previa eliminación del acetato de amonio con etanol absoluto, se concentró y recromatografió en etanol-acetato de amonio pH 7,2.

Preparación 2 :

Un extracto alcohólico conteniendo 11.000 µM como uridina, se pasó a través de una columna de Dowex-1-acetato, eluyéndose con una solución de cloruro de sodio 0,2 M - ácido clorhídrico 0.003 N previo lavado de la resina con agua para eliminar las sustancias que no se retienen .(Fig.5) Las fracciones correspondientes a cada pico se juntaron y neutralizaron recuperándose los nucleótidos, como sales de sodio, por adsorción sobre carbón y posterior elución con alcohol-50 %.

De los picos C y E se aislaron, por cromatografía en papel con etanol - acetato de amonio pH 3,8, dos sustancias con R_f similares a los de UDP-glucosa y de GDP-manosa respectivamente; los cuales se purificaron por recromatografía en DL-22. (Tabla 1)

Preparación 3 :

De un modo semejante a la preparación 2, por elución de la columna de Dowex-1-acetato con la solución de cloruro de sodio-ácido clorhídrico, se obtuvieron tres zonas : la primera no coloreada y con elevada concentración de polisacáridos; una segunda ligeramente coloreada y la última intensamente amarilla.

Las fracciones correspondientes a la segunda zona se juntaron, neutralizaron y desalificaron por adsorción sobre carbón-celita, con posterior

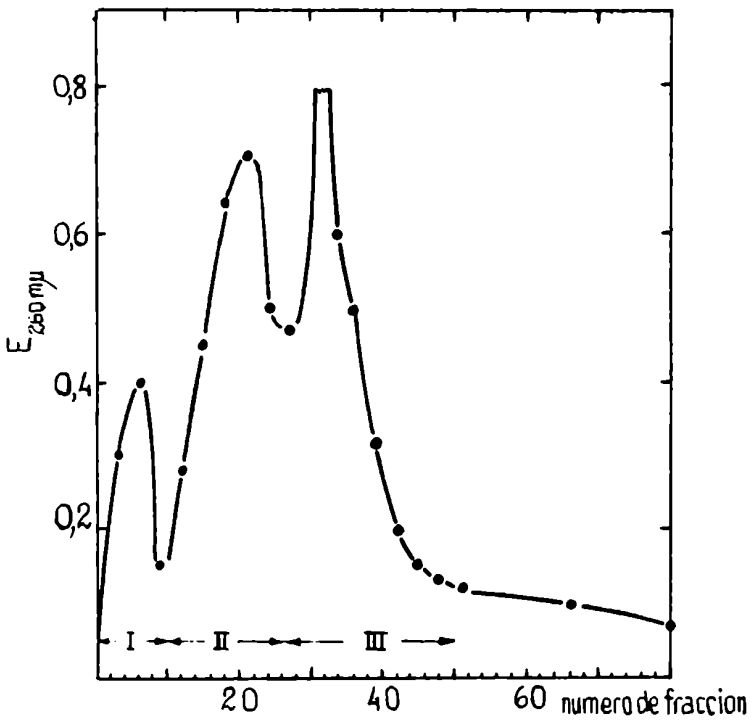


fig 4 separacion de los nucleotidos de dalia (sales mercuricas) en dowex-1-acetato.

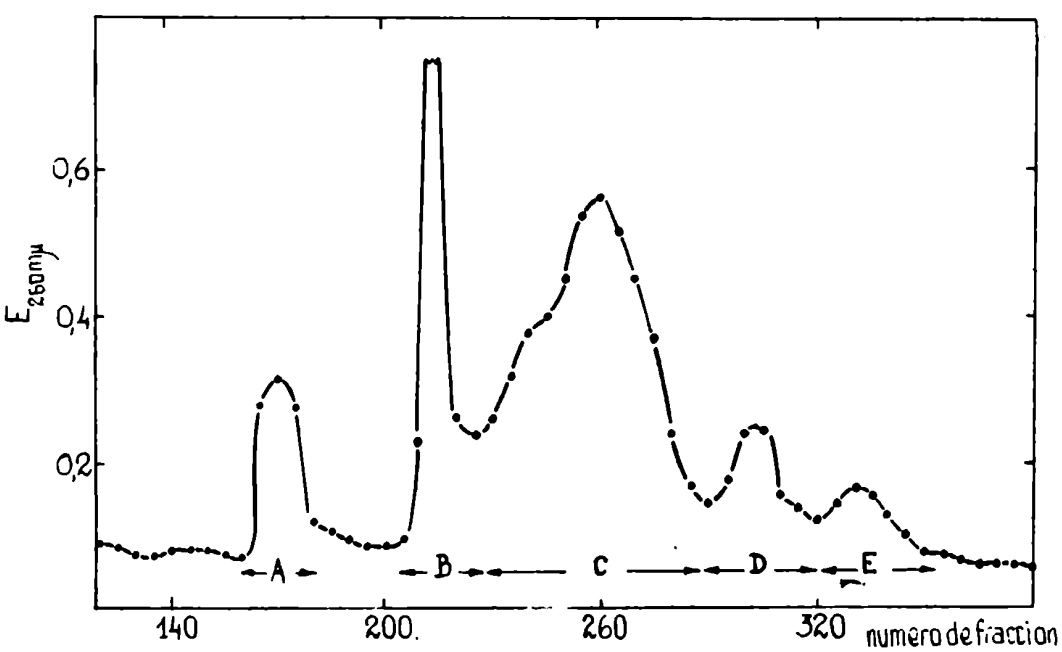


fig 5 separacion de los nucleotidos de dalia (extracto alcoholico) en dowex-1-acetato.

elución con alcohol-50 %. El total de estos eluídos del carbón (280 µM como uridina) se pasó por una columna de Dowex-1-cloruro de 2 x 100 cm. La resina se lavó con agua hasta bajar la E_{260} mµ a menos de 0.100. Los nucleótidos se eluyeron con gradiente de cloruro de sodio a pH constante según el procedimiento de Pontis-Cabib y Leloir (68). Se usó una cámara de mezcla con 5 litros de solución de cloruro de sodio 0.02 N-ácido clorhídrico 0.01 N y un reservorio con la solución concentrada de cloruro de sodio 0.1 N-ácido clorhídrico 0.01 N. Se fraccionó cada 25 ml en un colector de fracciones a una velocidad de 2 ml/min.. (fig. 6)

Las fracciones correspondientes a los picos se juntaron, neutralizaron y recuperaron libres de sales por adsorción sobre carbón y elución con alcohol-50 %.

La posición de los picos, según el desarrollo del gradiente, se observó coincidente con la de UMP (I), UDP-acetilglucosamina (II) y UDP-glucosa (III).

Estudio de los productos de hidrólisis del pico II de UDP-acetil-glucosamina. Identificación de los azúcares:

Un alícuota se hidrolizó durante 20 min. a pH 2 en baño maría. Se quitaron las sales por pasaje a través de una columna de Dowex-50-H^+ y de Amberlite IR-4B-OH^-, y colocó sobre papel impregnado con tetraborato de potasio 0.2 M; el cromatograma se desarrolló en butanol-piridina-agua durante 16 horas. Los extremos laterales del cromatograma se cortaron y revelaron con bencidina, obteniéndose dos manchas con R_f de acetilglucosamina

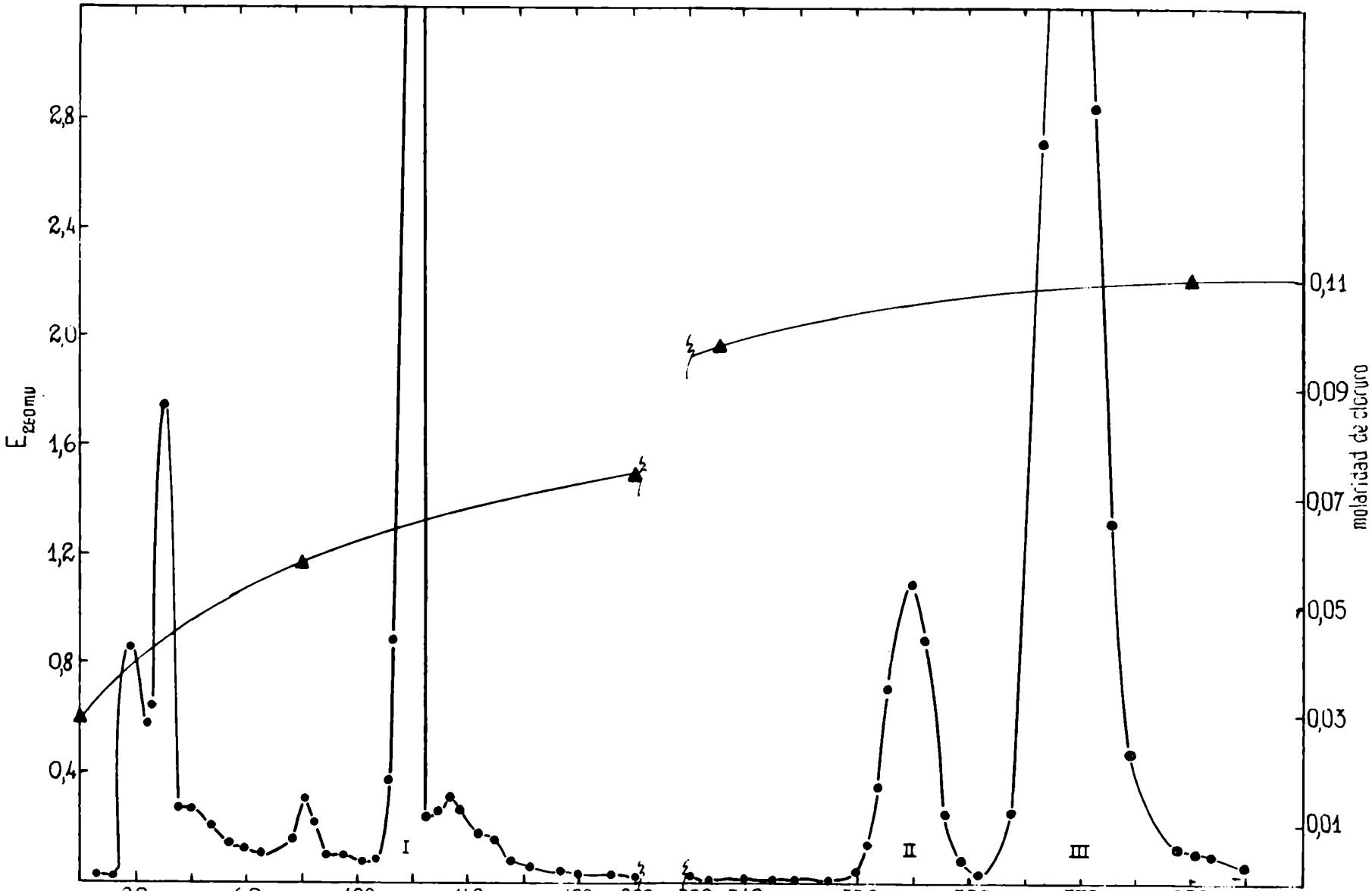


fig 6 separacion de los nucleotidos de dalia en dowex-1-cloruro pico I: unip, pico II: udpag, pico III: udpg

y de acetilgalactosamina respectivamente. Del resto del papel se eluyeron las bandas coincidentes con las zonas de reacción positiva de hexosaminas. Las sales de los eluatos se eliminaron por pasaje a través de Dowex-50-H^+ y evaporación con metanol (92). El residuo se disolvió en ácido clorhídrico 2 N y calentó, en tubo cerrado, durante 3 horas. El ácido clorhídrico se eliminó por sucesivas evaporaciones al vacío.

Un alícuota de estos productos desacetilados se oxidaron separadamente con ninhidrina (93).

Un volumen de 0.2 ml de muestra conteniendo aproximadamente 1 /4M de hexosamina, se mezcló con igual volumen de una solución 0,48 % de ninhidrina en buffer citrato 0.1 M pH 4,7. Se calentó durante 30 min. a 100° C. Se quitaron las sales con Dowex-50-H^+ y Amberlite IR-4B-OH^-.

Alícuotas de la muestra desacetilada y de la oxidada se cromatografiaron en butanol-piridina-agua para identificarlos según especímenes conocidos. (Tabla 5)

Hidrólisis a UDP y UMP

Una muestra de la mezcla se hidrolizó a pH 2 durante 15 min. a 100° C. Se neutralizó con amoníaco y colocó directamente en papel.

Un alícuota de la mezcla se hidrolizó durante 30 min. en ácido clorhídrico 1 N a 100° C. Se llevó a sequedad varias veces con vacío para eliminar la mayor parte del clorhídrico; se disolvió en agua, neutralizó con amoníaco y colocó en papel. (Tabla 6)

Estudio de los productos de hidrólisis de la fracción de UDP-glucosa.

Identificación de los agúcares:

Un alícuota de la mezcla se calentó a pH 2 durante 20 min. a 100° C, se pasó por resinas para eliminar las sales, se concentró al vacío y sometió a cromatografía sobre papel en distintos solventes y a electroforésis en papel impregnado con buffer tetraborato de potasio 0.05 M pH 9.2 (Tabla 7).

Caracterización de la fructosa.

1) 3 µM de la mezcla se hidrolizaron durante 30 min. en ácido clorhídrico 1 N a 100° C. Se pasó por resinas y separó por cromatografía sobre papel con fenol-agua como solvente. La zona de fructosa, que se localizó previamente sobre una tira lateral del cromatograma con nitrato de plata alcalino, se eluyó con agua y concentró al vacío. Se hizo la reacción de Roe con resorcinol-ácido clorhídrico y determinó el espectro de absorción del color desarrollado, entre 380 - 600 mµ . (Fig. 9)

2) Un alícuota de la fructosa, obtenida en las condiciones anteriores, se sometió a la acción del borohidruro de sodio.

1 parte de azúcar se mezcló con 4 partes de borohidruro de sodio y dejó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se agregó ácido acético 1 M para detener la reducción, se pasó por resinas, concentró al vacío y colocó sobre papel impregnado en molibdato de amonio 5 % usando butanol-piridina-agua como solvente. (Tabla 8)

Acción de la pirofosfatasa orgánica de veneno de serpiente

Identificación de los ésteres fosfóricos.

Con el material proveniente de la banda C_a de la preparación 2, banda absorbente del pico C, pág. 29, Tabla 1, se llevó a cabo la incubación con la pirofosfatasa orgánica para identificar los ésteres fosfóricos y la base.

2 µM de esta fracción de UDP-glucosa se incubaron con la enzima en presencia de 0.05 ml de cloruro de magnesio 0.1 M en un volumen de 0.5 ml de buffer glicina 0.1 M pH 8,5, durante 60 min. a 37° C.

Se calentó durante 1 min. a 100° C para coagular la proteína, se centrifugó y descartó el precipitado.

Un alícuota del sobrenadante se cromatografió sobre papel Whatman N° 4 durante 16 horas usando isopropanol-amoníaco-agua como solvente. Se separó la zona de los ésteres fosfóricos, se eluyó con agua, concentró y sometió a electroforésis sobre papel impregnado con buffer tetraborato de cetil-trimetilamonio. (Fig. 11)

El resto del incubado se separó por cromatografía de papel con etanol-acetato de amonio pH 3,8, obteniéndose una zona con reacción positiva de fosfato (Burrows, 89) y otra con absorción en el ultravioleta. Ambas se eluyeron y concentraron.

Con el eluato de la zona de los fosfátos orgánicos se efectuó :

a) Identificación de los ésteres ácido estables :

La muestra se calentó durante 5 min. en ácido clorhídrico 0.01 N a 100° C. Se llevó a sequedad varias veces para eliminar el ácido clorhídrico; el residuo se suspendió en agua, neutralizó con amoníaco diluído y sometió

a electroforésis con papel impregnado en buffer tetraborato de potasio 0.05 M pH 9,2.

Sólo se detectaron, con el reactivo para fosfatos, tres manchas que migraban como glucosa-1-fosfato, pequeña cantidad, galactosa-1-fosfato y fosfato inorgánico.

b) Purificación por precipitación con acetato de bario e identificación (94).

La mezcla de ésteres en un volumen de 2.5 ml se adicionó de 0.14 ml de buffer glicina 0.5 M pH 10 y 0.08 ml de acetato de bario 1 M. Se dejó en baño de hielo durante 30 min. y centrifugó separándose el precipitado de fosfato de bario. Al sobrenadante se agregaron dos volúmenes de etanol 96 % y dejó en la congeladora durante toda la noche. Se centrifugó en frío y el precipitado se lavó con alcohol, suspendiéndoselo en agua. Esta suspensión se trató con Dowex-50-H^+ hasta observar disolución. El líquido se pasó luego por una columna de Dowex-50-H^+ (0.5 x 2 cm), que se lavó con 2 ml de agua.

El eluato y los líquidos de lavado se neutralizaron con hidróxido de sodio, concentraron e identificaron por electroforésis en papel impregnado con tetraborato de cetil-trimetilamonio.

Identificación del nucleósido :

La banda con absorción en el ultravioleta recuperada en la experiencia anterior se identificó por su comportamiento en :

1) Electroforésis sobre papel impregnado en buffer cloruro de potasio-ácido clorhídrico pH 2.

2) Cromatografía de papel en butanol 86 % - amoníaco.

3) Cromatografía de papel ascendente-descendente en isopropanol-ácido clorhídrico-agua. (Tabla 10)

Obtención de UDP y UMP :

Un alícuota se hidrolizó a pH 2 durante 15 min. a 100° C, se neutralizó con amoníaco diluído y colocó en papel.

Una muestra de la mezcla se calentó a 100° C durante 30 min. en ácido clorhídrico 1 N. Se llevó a sequedad varias veces para eliminar la mayor parte del ácido; el residuo se disolvió en agua, neutralizó con amoníaco y colocó en papel. (Tabla 9)

Obtención de ésteres cíclicos:

5 µ M de la mezcla se colocaron en papel Whatman N° 1; el cromatograma se desarrolló durante 48 horas en isopropanol-amoníaco-agua. En el cromatograma se identificaron tres bandas revelables con Burrows, que se eluyeron, concentraron e identificaron por cromatografía en papel como UMP, banda UDP-glucosa sin ciclar y mezcla de ésteres cíclicos.

El eluído de la zona de los ésteres cíclicos se pasó por Dowex-50-H^+ y calentó durante 30 min. en ácido clorhídrico 1 N a 100° C.

Se pasó por resinas y separó por cromatografía de papel con fenol-agua, eluyéndose la zona de glucosa-galactosa y la de fructosa. Ambas se pasaron por resinas y cromatografiaron en butanol-piridina-agua sobre papel impregnado con tetraborato de potasio 0.01 M. (Tabla 11)

Acción de la UDP-glucosa-dehidrogenasa.

10 µM de mezcla se incubaron con la enzima en presencia de 40 µM de DPN_{ox} en un volumen de 4 ml de buffer glicina 0.1 M pH 8,6 durante 16 hs a 37° C. Se calentó durante 1 min. a 100° C, se centrifugó y el sobrenadante libre de proteína se pasó a través de una columna de Dowex-1-formiato de 0,5 x 20 cm, lavándose con agua hasta obtener una E_{260} m µ por debajo de 0.100.

Se eluyó con un gradiente lineal de formiato de amonio de 0 a 2 M, con un volumen total de 200 ml. Se recogieron fracciones de 2.5 ml en un colector de fracciones, siguiéndose la elución por E_{260} mµ en el espectrofotómetro. (Figura 12)

Las fracciones correspondientes a cada pico se unieron y concentraron a presión reducida. El formiato de amonio residual se eliminó en desecador sobre cloruro de calcio-ácido sulfúrico e hidróxido de sodio a 27° C.

Una muestra de esta fracción de UDP-glucosa oxidada previamente con la UDP-glucosa dehidrogenasa, se hidrolizó durante 30 min. a 100° C en ácido clorhídrico 1 N. Se eliminaron las sales pasando a través de una columna de Dowex-50-H - Amberlite IR-4B-OH- y separó por cromatografía de papel usando butanol-piridina-agua como solvente. Se eluyeron las zonas de glucosa, galactosa y fructosa, determinándose los porcentajes respectivos por Park - Johnson.

En idénticas condiciones se hidrolizó y separó por cromatografía un alícuota de la mezcla sin oxidar. (Tabla 12)

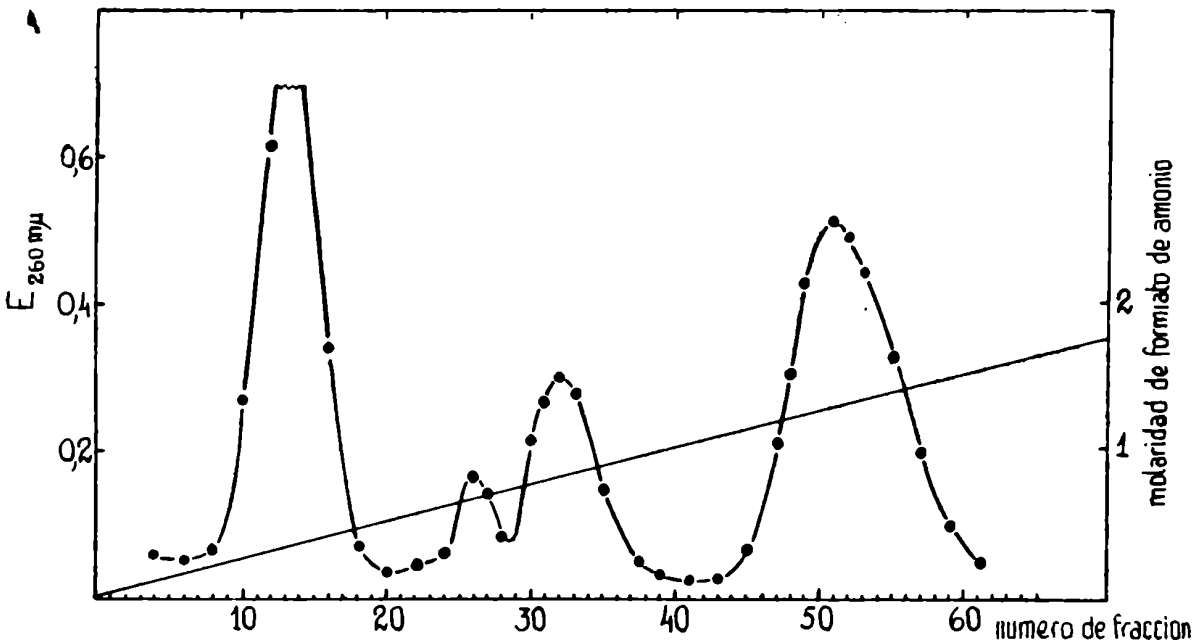
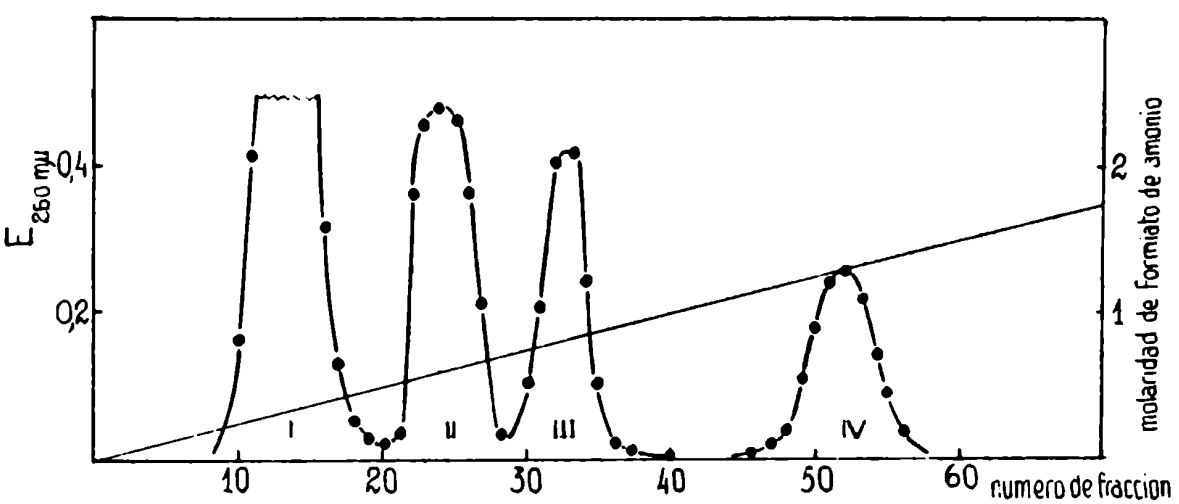
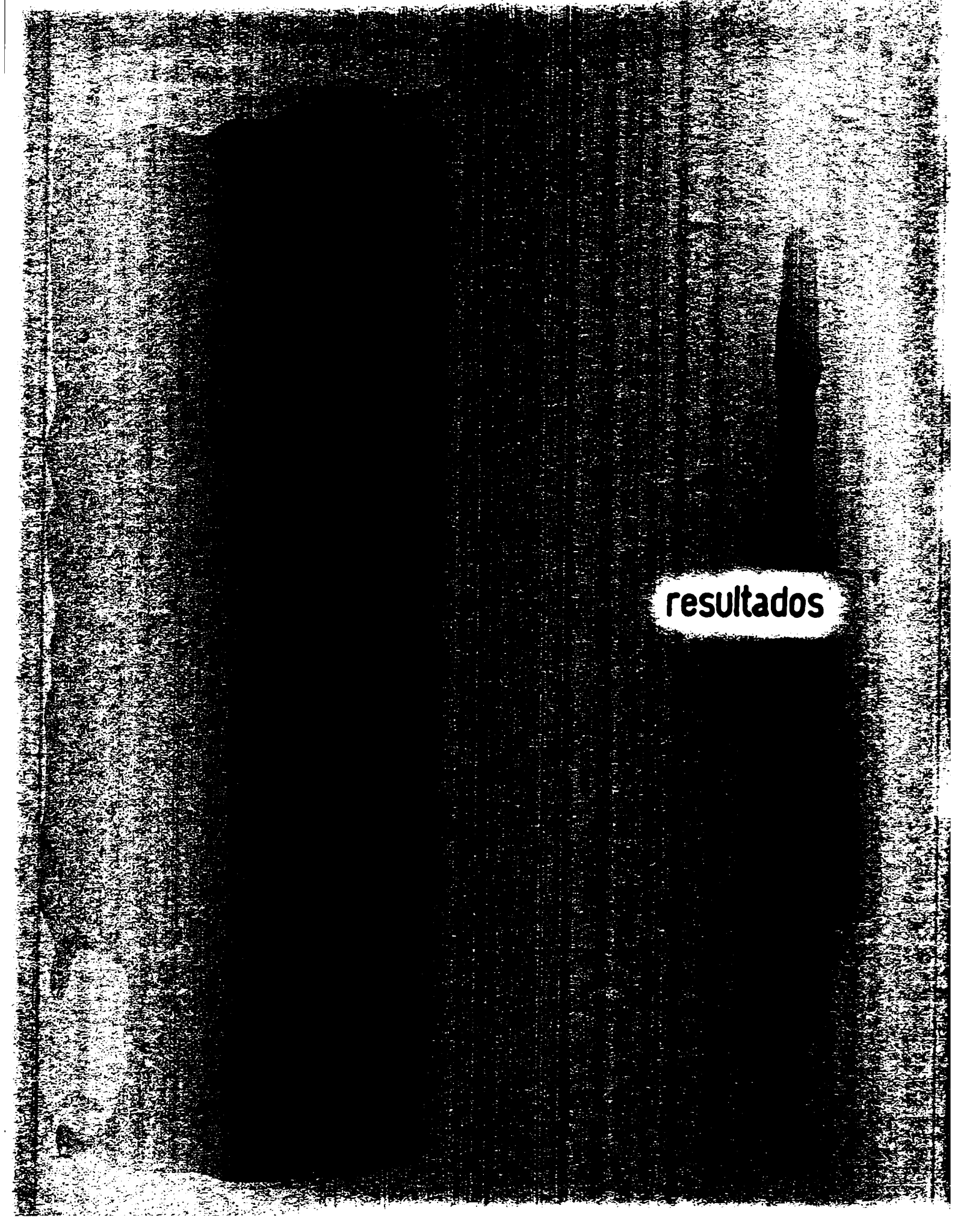


fig 12 separacion de los nucleotidos de la fracción udpg oxidada, en dowex-1-formiato



separacion en dowex-1-formiato pico I: dpn, pico II: ump, pico III: udpg
pico IV: udp-acido glucuronico.


resultados

Aislamiento de la fracción de UDP-glucosa.

Se estudiaron diversos procedimientos con el objeto de aislar los nucleótido-azúcares de bulbo de Dalia.

El uso de ácido tricloroacético 5 %, que dió buen resultado a Hurlbert y colaboradores (95) en su estudio de las fracciones de nucleótidos en hígado de rata condujo, en cambio, en nuestro caso a una apreciable hidrólisis de la fracción de nucleósido-difosfato-azúcares, como se pudo comprobar analíticamente. Por este motivo, se usó la extracción alcohólica siguiendo en general las técnicas desarrolladas por Caputto y col. (3) y Cabib et al. (68) para el aislamiento de nucleótidos de levadura.

Se usaron distintos procedimientos para aislar los nucleótidos de los extractos alcohólicos. Inicialmente se los precipitó como sales de bario en medio alcalino de acuerdo al esquema descripto por Smith y Mills (90) con extractos de hígado de rata; pero este método fué dejado de lado al obtenerse bajos rendimientos. Al mismo tiempo los nucleótidos así aislados estaban siempre acompañados de gran cantidad de sustancias coloreadas que hacían dificultosa su purificación posterior.

Finalmente se usaron principalmente dos técnicas:

a) precipitación como sales mercúricas según la técnica desarrollada por Caputto et al., seguida por cromatografía de intercambio en columna de Dowex-1-acetato o por cromatografía sobre papel.

b) pasaje directo del extracto alcohólico por columna de Dowex-1-acetato, como una etapa de purificación grosera, seguido de cromatografía de intercambio en Dowex-1-cloruro o cromatografía en papel.

En los casos en que se recurrió a la cromatografía sobre papel el solvente de sulfato de amonio-acetato de sodio-isopropanol de Markham y Smith probó ser excelente desde el punto de vista de separar netamente las sustancias coloreadas de los nucleótidos. Sin embargo, el uso de este solvente trajo aparejado el problema de la eliminación del sulfato de amonio presente en los eluatos del papel.

Su separación se intentó por diversos procedimientos como ser : columnas de carbón-celita de acuerdo a los trabajos de Bergkvist (96), cromatografía en columnas de Dowex-1-carbonato según experiencias de Cohn (91) y en columnas de Sephadex, polivinil-cloruro (P.V.C.) y celulosa, usando en los últimos casos tanto agua como alcohol 50 % como eluyentes.

De todos los métodos probados el único que permitía una cierta separación fué el descripto por Bergkvist, pero con tan bajos rendimientos que llevó a abandonar el uso de aquel solvente y concentrar la purificación en las técnicas de cromatografía en columnas de resina de intercambio iónico combinada con cromatografía sobre papel en los solventes de etanol-acetato de amonio de Paladini-Leloir (79), de donde la sal es fácilmente eliminada por tratamiento de los cromatogramas con alcohol absoluto.

Los distintos procedimientos usados permitieron el aislamiento de tres fracciones que se estudiaron en mayor detalle :

fracción GDP - manosa

fracción UDP - acetilglucosamina

fracción UDP - glucosa

Estudio de la fracción GDP-manosa

El estudio de los nucleótidos presentes en la preparación 2, demostró que existía una sustancia contenida en el pico E (Tabla 1), cuyo comportamiento en cromatografía de papel en el solvente de etanol-acetato de amonio (pH 3.8) era idéntico al de GDP-manosa.

Tabla 1 Cromatografía en papel de los nucleótidos eluídos de Dowex-1-acetato (preparación 2).

	R_{Ad} de las manchas absorbentes en el U.V. etanol-acetato de amonio pH 3.8		
Guanosina difosfato		0.378	
GDP-manosa		0.44	
Adenosina difosfato		0.53	
ADP-glucosa		0.588	
Uridina difosfato		0.624	
Guanosina-5'-fosfato		0.649	
UDP-glucosa		0.66	
Adenosina-5'-fosfato		0.767	
UDP-acetilglucosamina		0.799	
Uridina-5-fosfato		0.89	
Pico C	0.65	0.83 (x)	0.95 (x)
Pico E	0.446	0.87	0.97

(x) fluorescencia azul.

La banda con R_{Ad} 0.446 fué eluída del papel, y se encontró que su espectro era indistinguible del de guanosina y mostraba los mismos cambios con el pH. (Fig. 7)

Más aún, se encontraron dos grupos fosfato por molécula de guanosina, uno de ellos liberable como fosfato inorgánico por hidrólisis durante 20 min. en ácido clorhídrico 1 N a 100° C.

Por hidrólisis a pH 2 durante 15 min. a 100° C se comprobó, por cromatografía en fenol-agua (Tabla 2) la liberación de tres azúcares con la misma movilidad que glucosa, manosa y fructosa.

Tabla 2 Cromatografía en papel de los azúcares de la fracción GDP-manosa.

	R_{ribosa} fenol - agua
glucosa	0.58
galactosa	0.66
manosa	0.71
fructosa	0.87
azúcares de la fracción GDP-manosa	0.574 - 0.695 - 0.867

Lamentablemente la cantidad disponible era insuficiente para un estudio más detallado y en subsiguientes preparaciones no fué posible reaislar esta fracción de GDP-manosa

Sin embargo, estos datos experimentales señalarían la presencia en los tubérculos de Dalia de una mezcla de nucleótidos de guanosina semejante a la encontrada por Pontis et al. en el hongo Eremothecium Ashbyii.

Si bien fué imposible determinar la relación cuantitativa entre los tres azúcares, la observación visual del cromatograma indicaría que los mismos se encontraban en cantidades aproximadamente iguales.

Estudio de la fracción de UDP-acetilglucosamina.

Por cromatografía de intercambio en columna de Dowex-1-cloruro (fig. 6) fué posible aislar una fracción cuyo comportamiento en las columnas de resina y en

cromatografía de papel con los solventes neutro y acídico de etanol-acetato de amonio, era igual al del UDP-acetilglucosamina (Tabla 3, Pico II).

Tabla 3 Cromatografía en papel de los nucleótidos eluídos de Dowex-1-cloruro (preparación 3).

	R_{Ad} de las manchas absorbentes en el U.V. etanol-acetato de amonio.	
	pH 7,2	pH 3,8
Uridina difosfato	0.213	0.47
Uridina-5'-fosfato	0.39	0.81
UDP-glucosa	0.54	0.56
UDP-acetilglucosamina	0.668	0.70
Pico II	0.65	0.70
Pico III	0.53 - 0.40(x)	0.55 - 0.815(x)

(x)-débilmente absorbente

El espectro de absorción era indistinguible del de uridina y presentaba los mismos cambios con el pH. (Fig. 8)

Dos grupos fosfato se encontraban presentes por molécula de uridina, uno de los cuales era liberado como fosfato inorgánico por hidrólisis durante 20 min. en ácido clorhídrico 1 N a 100° C.

Por hidrólisis a pH 2 durante 20 min. a 100° C se liberaban sustancias reductoras que daban reacción positiva de acetil-hexosaminas con el reactivo de Morgan y Elson, y que migraban como acetilglucosamina y acetilgalactosamina en cromatografía sobre papel impregnado en tetraborato de potasio usando butanol-piridina-agua como solvente. (Tabla 4)

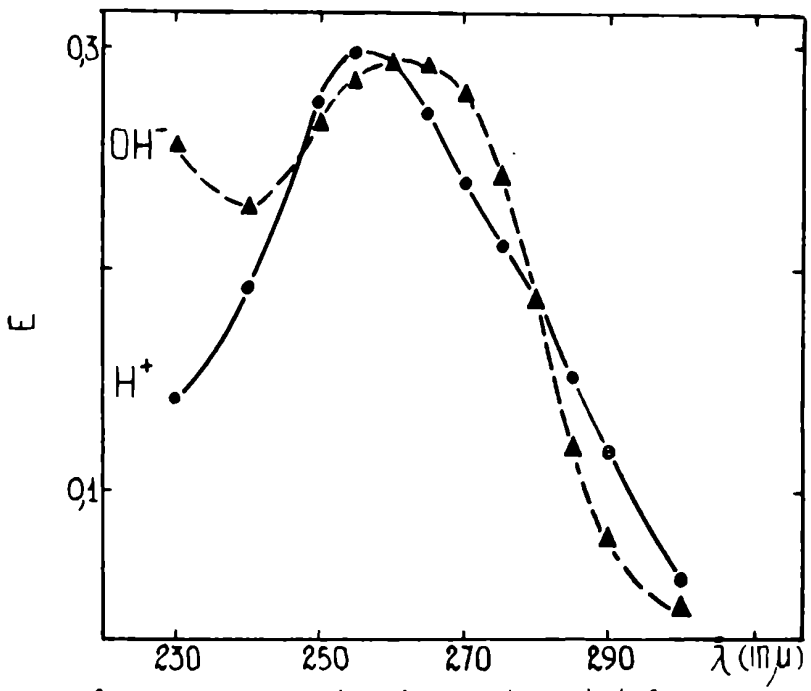


fig 7 espectro de absorcion en el u.v. de la fraccion gdpm

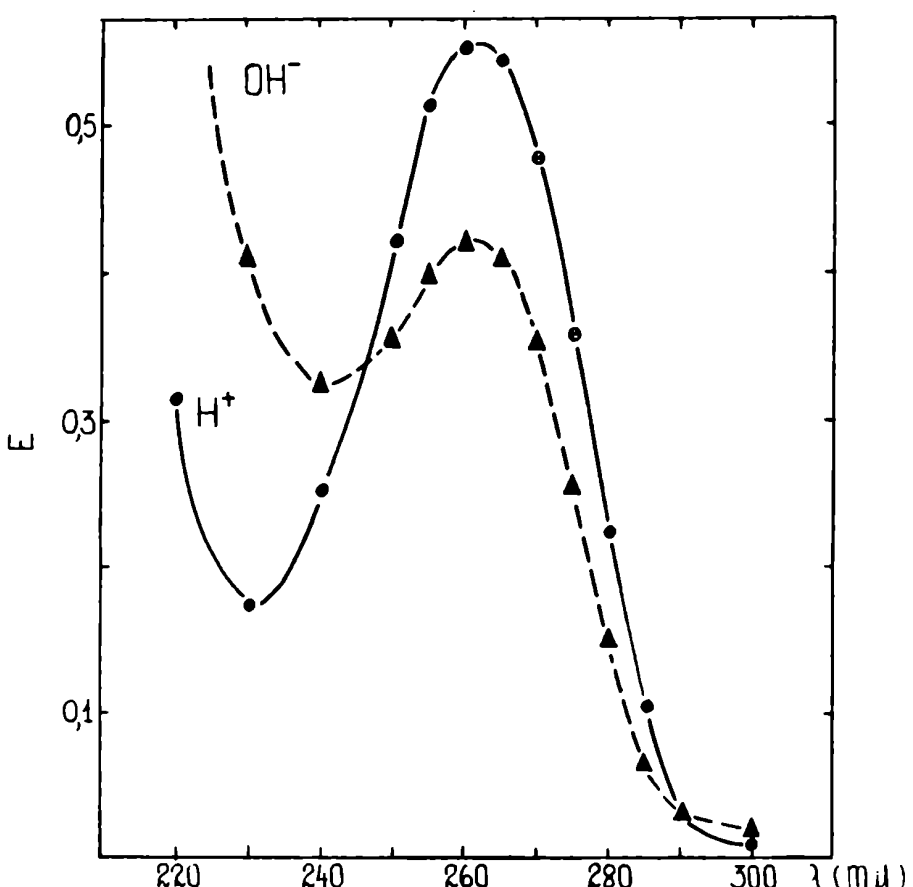


fig 8 espectro de absorcion en el u.v. de la fraccion udpag

Tabla 4 Cromatografía y electroforésis en papel de los azúcares de la fracción UDP-acetilglucosamina.

	R_{ribosa} butanol-piridina-agua	$R_{acetilglucosamina}$ butanol-piridina-agua sobre papel impregnado con borato	$R_{glucosa}$ electroforesis con papel impregnado en borato
Galactosa	0.496	-	0.898
Glucosa	0.615	-	1
Manosa	0.70	-	0.663
Fructosa	0.70	-	0.89
Acetilgalactosamina	0.79	1	0.32
Acetilglucosamina	0.90	0.334	0.204
Azúcares de la fracción de UDP-acetilglucosamina	0.785-0.88	1.02 - 0.346	0.21 - 0.338

Con el objeto de eliminar la posibilidad de que la sustancia que migraba como acetilgalactosamina se tratara de acetilmanosamina (97), se separaron los dos azúcares liberados por hidrólisis ácida por cromatografía en papel con tetraborato usando butanol-piridina-agua como solvente y se procedió a desacetilar independientemente ambas sustancias. Por cromatografía en el mismo solvente se pudo comprobar que las sustancias obtenidas migraban como glucosamina y galactosamina. Más aún por oxidación con ninhidrina según la técnica descripta por Gardell (93) y modificada por Pontis (8) se obtuvieron respectivamente arabinosa y lixosa. (Tabla 5)

Tabla 5 Cromatografía en papel de los productos de desacetilación y de oxidación de los azúcares de la fracción UDP-acetilglucosamina.

	$R_{glucosa}$ en butanol-piridina-agua
galactosa	0.852
ribosa	1.47
arabinosa	1.12
lixosa	1.38
xilosa	1.09
glucosamina	0.70
galactosamina	0.64
azúcares desacetilados	0.72 - 0.635
azúcares desacetilados y tratados con ninhidrina	1.4 - 1.12

La mitad nucleótido fué identificada sometiendo la fracción UDP-acetilglucosamina a hidrólisis ácida por 10 min. en ácido clorhídrico 0.01 N y por 30 min. en ácido clorhídrico 1 N a 100° C. En esta forma se identificaron UDP y UMP respectivamente por cromatografía en papel con los solventes de Paladini-Leloir. (Tabla 6)

Tabla 6 Cromatografía en papel de los productos de hidrólisis ácida de la fracción UDP-acetilglucosamina.

	R_{Ad} de las manchas absorbentes en el U.V. etanol-acetato de amonio	
	pH 7,2	pH 3,8
Uridina-5'-fosfato	0.488	0.845
Uridina difosfato	0.292	0.532
UDP-acetilglucosamina	0.73	0.735
Nucleótido calentado durante 15 min. a pH 2 a 100° C	0.295	0.55
Nucleótido calentado durante 30 min. en ClH 1 N a 100° C	0.49	0.83

Estudio de la fracción UDP-glucosa

Todas las fracciones de UDP-glucosa aisladas por los distintos procedimientos usados, se caracterizaron por liberar durante la hidrólisis en ácido diluído azúcares reductores que, sometidos a cromatografía en papel con butanol-piridina-agua, este mismo solvente con papel impregnado en tetraborato de potasio 0.01 M, y fenol-agua se comportaban como glucosa, galactosa y fructosa. Resultados similares se obtuvieron por electroforésis con papel impregnado en tetraborato de potasio 0.05 M. (Tabla 7)

Tabla 7 Cromatografía y electroforésis en papel de los azúcares de la fracción de UDP-glucosa.

	R_{ribosa} butanol-piridina-agua	fenol-agua	electroforésis en buffer borato
Manosa	-	0.708	0.90
Fructosa	0.785	0.86	1.10
Galactosa	0.597	0.653	-
Glucosa	0.687	0.582	1.30
Azúcares de la fracción de UDP-glucosa	0.58-0.672-0.774	0.592-0.681-0.86	1.13 - 1.32

Fructosa se caracterizó además, después de separada de los otros azúcares por cromatografía en fenol-agua, por su reacción con resorcinol-ácido clorhídrico. El espectro de absorción del color desarrollado en presencia de la fructosa proveniente de los nucleótidos de los tubérculos se comparó con el obtenido con fructosa pura. (Fig. 9)

Más aún, sorbitol y manitol fueron los únicos productos que se observaron por cromatografía en papel impregnado con molibdato de amonio, después de hidrogenar con borohidruro de sodio la fructosa previamente separada de glucosa y galactosa como en la experiencia anterior. (Tabla 8)

Tabla 8 Cromatografía en papel de los productos de reducción con borohidruro de sodio de la fructosa de la fracción UDP-glucosa.

	$R_{glucosa}$ butanol-piridina-agua en papel impregnado en molibdato
Sorbitol	0.416
Galactitol	0.482
Manitol	0.61
Arabitol	0.73
Galactosa	0.70
Fructosa	0.72
Arabinosa	1.06
Productos de reducción	0.471 - 0.615

El espectro de absorción de la fracción de UDP-glucosa era indistinguible del de uridina y mostraba los mismos cambios con el pH. (Fig. 10)

Se encontraban presentes dos moléculas de fosfato por molécula de uridina, siendo uno de ellos liberable como fosfato inorgánico por hidrólisis de 20 min. en ácido clorhídrico 1 N a 100° C.

La hidrólisis en ácido clorhídrico 0.01 N durante 15 min. a 100° C produjo UDP , mientras que una hidrólisis en ácido más concentrado permitió determinar la formación de UMP. (Tabla 9)

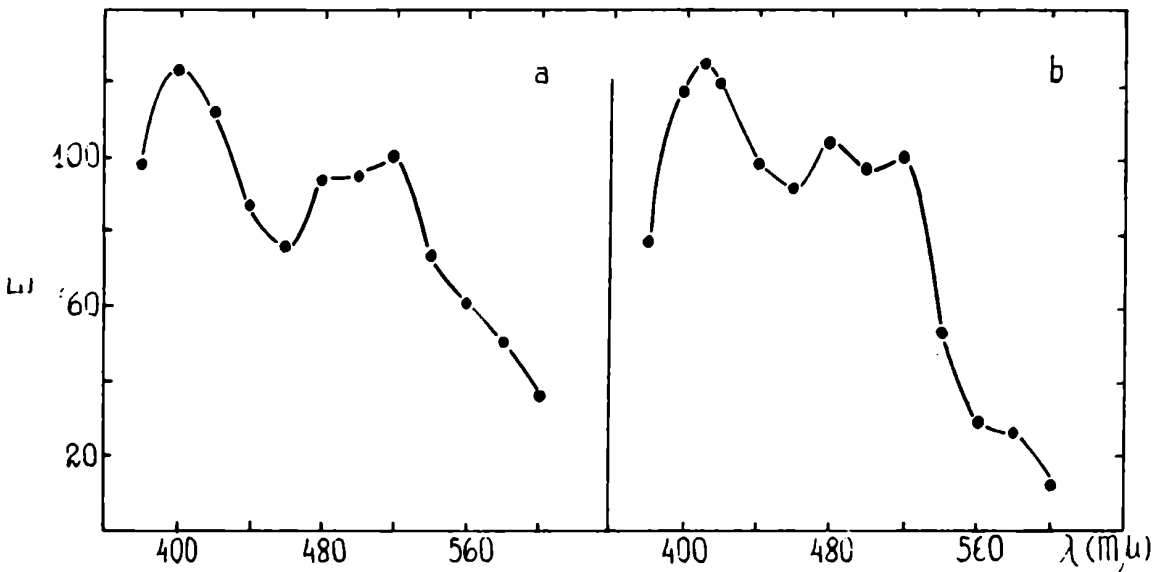


fig 9 espectro de absorcion del resto fructosa de la fraccion udpg y de fructosa pura tratados con resorcinol-clH. a) fructosa b) hidrolizado de la fraccion udpg.

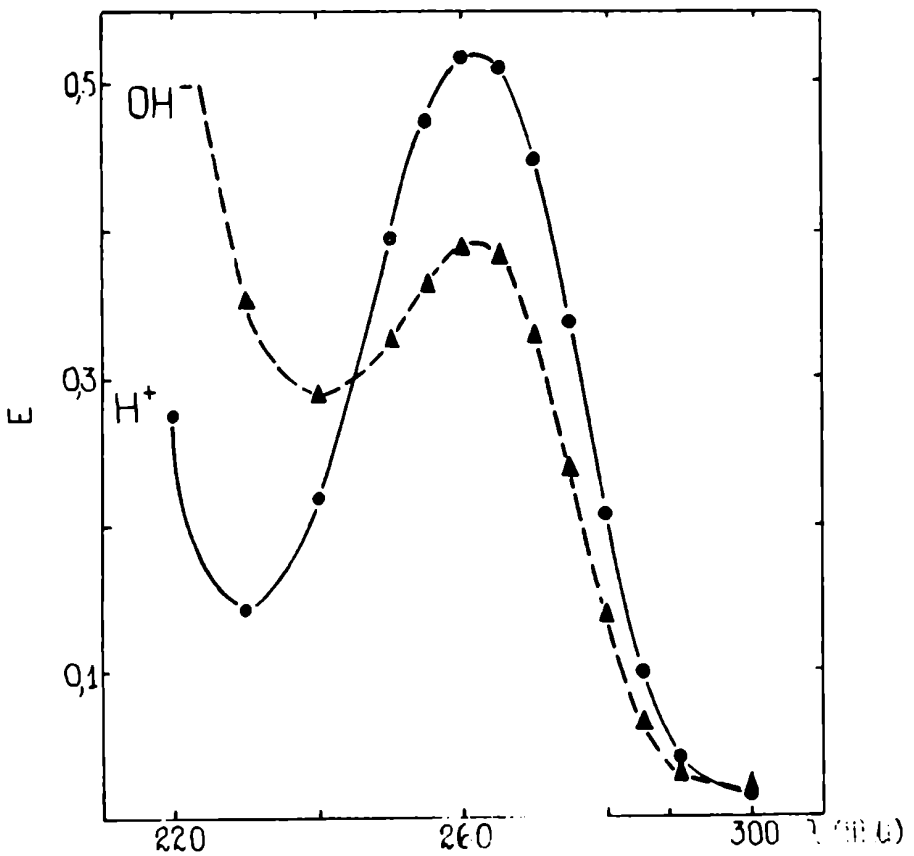


fig 10 espectro de absorcion en el uv de la fraccion udpg

Tabla 9 Cromatografía en papel de los productos de hidrólisis ácida de la fracción UDP-glucosa.

	R_{Ad} de las manchas absorbentes en el U.V. etanol-acetato de amonio.	
	pH 7,2	pH 3,8
Uridina difosfato	0.626	0.67
UDP-glucosa	0.88	0.718
Uridina-5'-fosfato	0.75	0.855
Nucleótido calentado durante 15 min. a pH 2 a 100° C	0.612	0.68
Nucleótido calentado durante 30 min. en ClH 1 N a 100° C	0.74	0.86

La ubicación de las dos moléculas de fosfato en el nucleótido, así como la presencia de fructosa en la mezcla, fué confirmada por estudios con veneno de Crotalus adamanteus.

La cromatografía de los productos de hidrólisis enzimática, en dos solventes distintos indicó la formación de una mezcla de fosfatos orgánicos y de una sustancia que presentaba absorción en el ultravioleta y que migraba como uridina.

Esta fué identificada por recromatografía en papel y electroforésis sobre papel impregnado con buffer de pH 2. (Tabla 10)

Tabla 10 Cromatografía en papel y electroforésis del nucleósido.

	$R_{Adenina}$ de las manchas absorbentes en el U.V.		
	butanol-amoníaco-agua	isopropanol-ácido-clorhídrico-Agua	electroforésis en buffer ClK-ClH pH 2.
Uridina	0.662	1.78	0.125
Uracilo	0.55	1.80	0.121
Timidina	-	2.17	0.121
Guanina	0.382	0.79	0.60
Adenosina	-	-	0.637
Nucleósido de la fracción UDP-glucosa	0.68	1.73	0.117

Los fosfatos orgánicos producidos se separaron del fosfato inorgánico formado durante la acción de la 5'-nucleotidasa, presente también en el veneno, sobre el UMP-5', por precipitación con acetato de bario de acuerdo a la técnica descripta por Cabib et al. (94)

Los ésteres fosfóricos así purificados se sometieron a electroforésis sobre papel impregnado en buffer tetraborato de potasio 0.05 M y de cetil-trimetil-amonio 0.1 M (Fig. 11).

Los resultados obtenidos indicaron la presencia de glucosa-1-fosfato, galactosa-1-fosfato y de otro ester cuya movilidad era semejante a la de fructosa-1-fosfato. Se obtuvo una mayor evidencia acerca de la naturaleza de la unión entre los azúcares y el nucleótido respectivo, por la acción del amoníaco. Por cromatografía de la fracción de UDP-glucosa en isopropanol-amoníaco-agua, se formó UMP y ésteres cíclicos.

Estos ésteres cíclicos se aislaron y sometieron a hidrólisis ácida seguida de cromatografía en papel impregnado en tetraborato de potasio 0.01 M usando

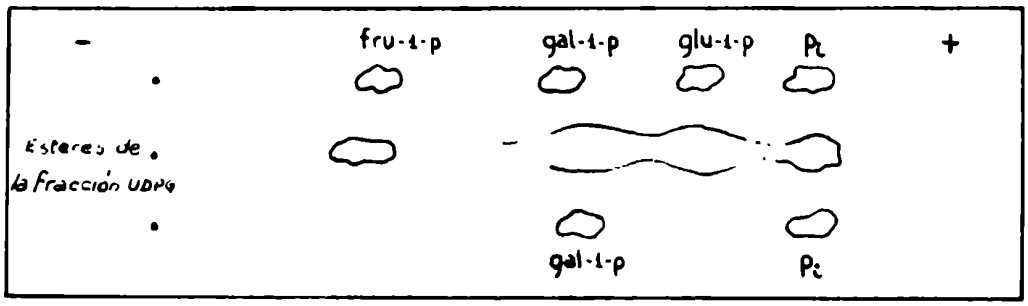
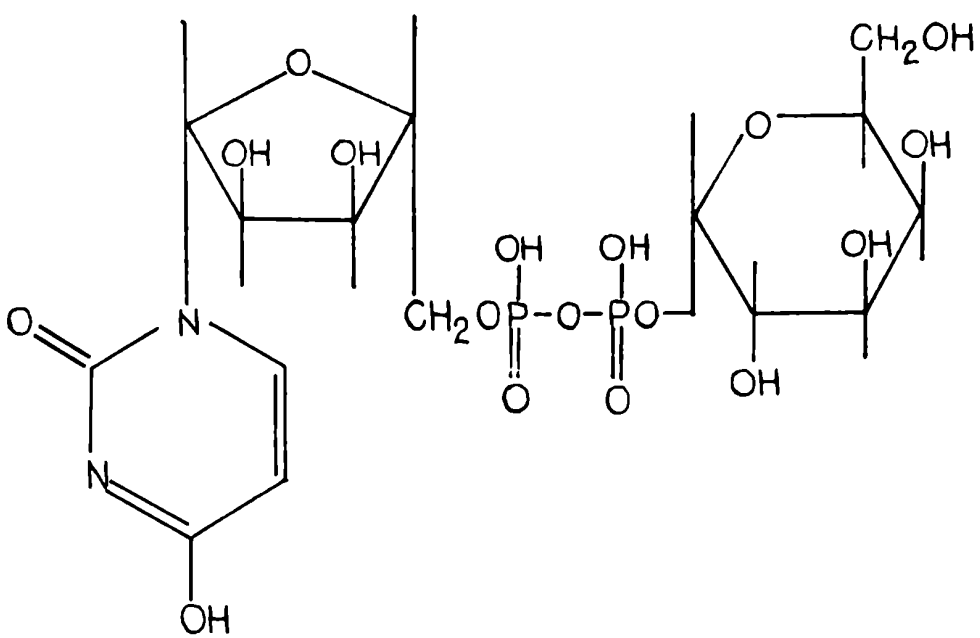


fig 11 electroforesis en borato de cetil-trimetilamonio de los esteres fosforicos de la fraccion udpg



UDP_galactosa

butanol-piridina-agua como solvente. (Tabla 11)

Tabla 11 Cromatografía en papel de los ésteres cíclicos hidrolizados en ácido.

	$R_{glucosa}$ butanol-piridina-agua en papel impregnado con borato.
Sorbosa	0.22
Fructosa	0.286
Galactosa	0.748
Xilosa	0.995
Arabinosa	1.07
Manosa	1.2
Fucosa	1.76
Esteres cíclicos de la fracción UDP-glucosa hidrolizados	0.275-0.79-0.99

Después de revelar el papel con el reactivo de nitrato de plata alcalino, se observaron tres sustancias con los mismos valores de R_f que glucosa, galactosa y fructosa.

Finalmente se demostró en la mezcla, la presencia de un compuesto con fructosa luego de oxidar la fracción de UDP-glucosa con la UDP-glucosa-dehidrogenasa de hígado. El UDP-ácido glucurónico formado por acción de la enzima sobre el UDP-glucosa, se separó de los restantes componentes de la mezcla por cromatografía en columna de Dowex-1-formiato. (Fig. 12)

Una vez separado el ácido UDP-urónico formado, se determinó la relación entre los tres azúcares antes y después de la oxidación enzimática. Los valores obtenidos indican claramente que la fructosa comprendía aproximadamente un 3.4 % de la mezcla original y que después de eliminar parte del UDP-glucosa esa relación subió a 9.4 %. (Tabla 12)

Tabla 12 Porcentaje de fructosa, galactosa y glucosa en la fracción UDP-glucosa antes y después de la oxidación enzimática con UDP-glucosa-deshidrogenasa.

	fracción UDP-glucosa sin oxidar	fracción UDP-glucosa oxidada
glucosa	85.4	66.7
galactosa	11.35	25
fructosa	3.4	9.4

discusion

Los resultados obtenidos durante el aislamiento de los nucleósido-difosfato azúcares presentes en tubérculo de Dalia indican que en ellos se encuentran presentes UDP-acetilglucosamina acompañado de UDP-acetilgalactosamina. Esta mezcla es semejante a la encontrada anteriormente en hígado (8) y señala la existencia en plantas de sustancias y, probablemente de sistemas enzimáticos, que hasta ahora se habían encontrado solamente en bacterias y animales.

Muy poco se conoce sobre el papel que desempeñan los nucleótidos de acetilhexosaminas en plantas, pero es probable que ellos actúen como dadores del resto acetilhexosamina durante la formación de acetilhexosamina-péptidos, cuya presencia se ha demostrado en plantas (98).

Se dirigió particular atención sobre la fracción que se comportaba como UDP-glucosa.

Los resultados obtenidos indican la presencia de un nucleótido que contiene fructosa y que acompaña a UDP-glucosa y UDP-galactosa. El hecho de que, a pesar de los distintos métodos de extracción y purificación usados no haya sido posible separar el nucleótido de fructosa de los restantes, sugiere que ellos poseen una gran similitud estructural. La formación de una mezcla de azúcares fosfato durante la hidrólisis enzimática con veneno de serpiente, así como la formación de los respectivos ésteres cíclicos en medio amoniacal, son evidencia de la existencia de una unión pirofosfato entre la fructosa y el nucleótido. Más aún, los tres nucleótido-azúcares dan UDP y 5'-UMP bajo idénticas condiciones de hidrólisis, por lo que se concluye que la fructosa se encuentra unida a la uridina por un grupo

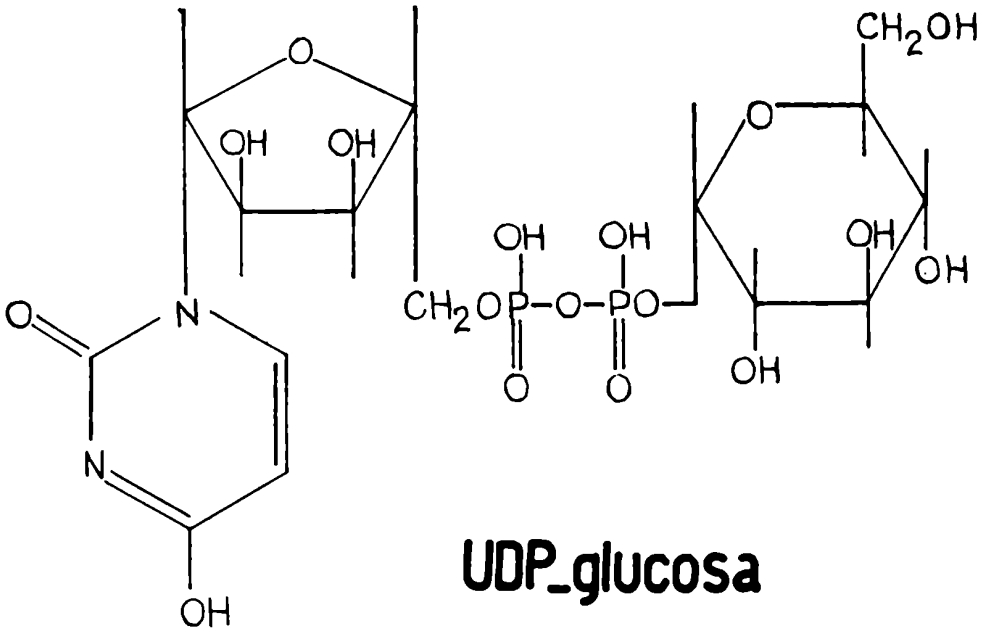
5'- pirofosfato.

No es posible, en base a los datos experimentales obtenidos, identificar la posición de la unión entre la fructosa y el grupo pirofosfato.

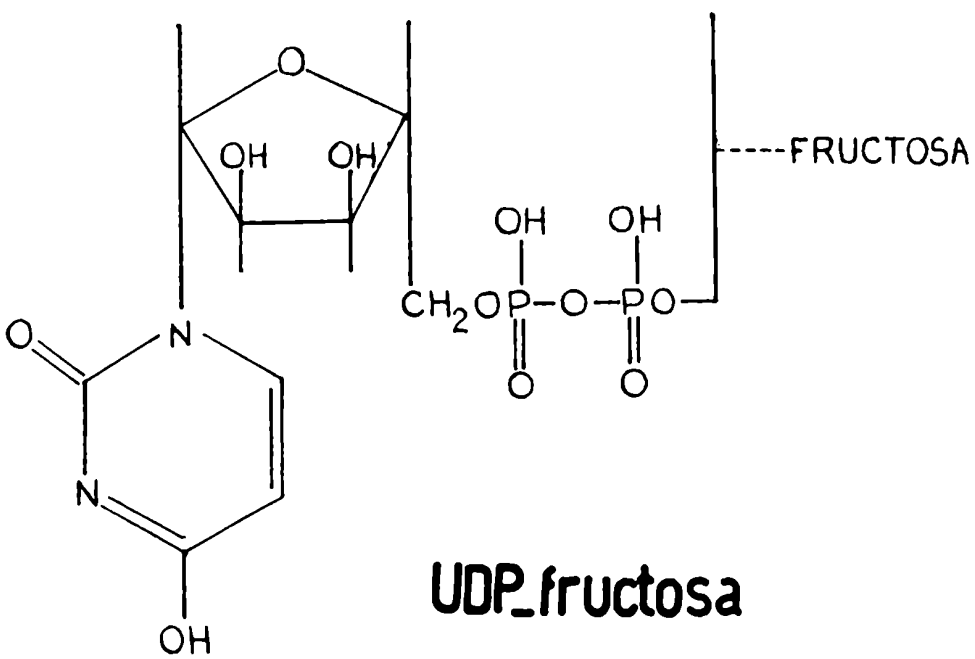
Sin embargo, una apreciación visual de los cromatogramas sugiere que la velocidad de liberación de la fructosa en medio ácido diluído es similar a la de la glucosa y galactosa. Por otra parte, la velocidad de liberación de fructosa en el UDP-fructosa sintético, preparado a partir de UMP-5'-morfolidato y fructosa-1-fosfato (99) es considerablemente más lenta que la de liberación de glucosa en el UDP-glucosa. Esto podría indicar que en el nucleótido natural, la fructosa no estaría unida a través del C-1, sino del C-2 involucrado en el anillo hemiacetálico. Los ésteres fosfóricos de fructosa de este tipo : fructopiranosa-2-fosfato y fructofuranosa-2-fosfato (100) son sumamente lábiles en medio ácido diluído, y así un compuesto de fructopiranosa o fructofuranosa-2-pirofosfato sería aún más lábil, de acuerdo con lo que se desprende de los estudios realizados por Caputto et al. (3) en relación a la velocidad de hidrólisis de glucosa-1-fosfato respecto de UDP-glucosa.

En consecuencia, es difícil visualizar como un nucleótido azúcar donde la fructosa sería sumamente lábil, pudiera aislarse sin hidrólisis considerable.

Las cantidades variables del nucleótido conteniendo fructosa encontrados en los distintos extractos, podrían explicarse en base a lo expresado anteriormente. Sin embargo, no es posible afirmar que la unión entre la fructosa y el nucleótido es a través del C-2. Este problema sólo podría solucionarse cuando se aisle UDP-fructosa puro y en cantidades que permitan determinar sin lugar a dudas la posición de esa unión.



UDP_glucosa



UDP_fructosa

BIBLIOGRAFIA

1.- Caputto, R., Leloir, L.F., Trucco, R.E., Cardini, C.E., Paladini, A., J. Biol. Chem. 179 (1949) 497

2.- Cardini, C.E., Caputto, R., Leloir, L.F., Paladini, A. Nature 165 (1950) 191.

3.- Caputto, R., Leloir, L.F., Cardini, C.E., Paladini, A. J. Biol. Chem. 184 (1950) 333.

4.- Leloir, L.F., Arch. Biochem. et Biophys., 33 (1951) 186.

5.- Dutton, G.J., Storey, I.D.E., Biochem. J., 57 (1954) 275.

6.- Smith, E.E.B., Mills, G.T., Harper, E.M., Biochim. et Biophys. Acta, 23 (1957) 662.

7.- Gabib, E., Leloir, L.F., Cardini, C.E., J.Biol.Chem. 203 (1953) 1055.

8.- Pontis, H.G., J.Biol.Chem., 216 (1955) 195.

9.- Ginsburg, V., Stumpf, P.K., Kassid, W.Z., J. Biol. Chem., 223 (1956) 977.

10.- Park, J.T., J. Biol. Chem., 194 (1952) 877, 885, 897.

11.- Park, J.T., Johnson, M.J., J. Biol. Chem., 179 (1949) 589.

12.- Smith, E.E.B., Galloway, B., Mills, G.T., Biochim. et Biophys.Acta, 33 (1959) 276.

13.- Smith, E.E.B., Galloway, B., Mills, G.T., Biochem. Biophys.Research Commun., 5 (1961) 148.

14.- Baddiley, J., Mathias, A. P., J. Chem. Soc., 2723 (1954).

15.- Baddiley, J., Buchanan, J.G., Carss, B., Mathias, A.P., Sanderson, A.R., Biochem. J., 64 (1956) 599.

16.- Baddiley, J., Buchanan, J.G., Mathias, A.P., Sanderson, A.R., J.Chem. Soc., 4186 (1956).

17.- Baddiley, J., Buchanan, J.G., Carss, B., Mathias, A.P., J. Chem. Soc., 4585 (1956).

18.- Kennedy, E.P., Weiss, S.B., J. Biol. Chem. 223 (1956) 193.

19.- Cabib, E., Leloir, L.F., J. Biol. Chem., 206 (1954) 779.

20.- Pontis, H.G., James, A.L., Baddiley, J, Biochem.J., 75 (1960) 428.

21.- Chassaky, R., Biochem. Biophys.Research Communs., 1 (1959) 34.

22.- Kornfeld, S., Glaser, L., Biochem. Biophys. Acta 42 (1960) 548.

23.- Baddiley, J., Blumson, N.L., Biochem. Biophys. Acta, 39 (1960) 376.

24.- Recondo, E., Dankert, M., Leloir, L.F., Biochem. Biophys.Research Communs., 12 (1963) 204.

25.- Hashimoto, T., Yoshikawa, H., Biochem. Biophys. Research Communs. 5 (1961) 71.

26.- Caputto, R., Leloir, L.F., Trucco, R.E., Cardini, C.E., Paladini, A., Arch. Biochem. Biophys., 18 (1948) 201.

27.- Kalckar, H.M., Maxwell, E.S., Physiol. Revs. 38 (1958) 77.

28.- Kalckar, H.M., Adv. in Enzym. Vol. 20 (1958).

29.- Feingold, D.S., Neufeld, E.F., Hassid, W.Z., J. Biol. Chem. 235 (1960) 910.

30.- Neufeld, E.F., Feingold, D.S., Hassid, W.Z., J. Am. Chem. Soc. 80 (1958) 4430.

31.- Smith, E.E.B., Mills, G.T., Bernheimer, H.P., Austrian, R., Biochem. Biophys. Acta 29 (1958) 640.

32.- Glaser, L., Biochem. Biophys. Acta, 31 (1959) 575.

33.- Maley, F., Maley, G.S., Biochem. Biophys. Acta, 31 (1959) 577.

34.- Neufeld, E.F., Feingold, D.S., Hassid, W.Z., J. Biol. Chem. 235 (1960) 906.

35.- Neufeld, E.F., Ginsburg, V., Putman, E.W., Fanshier, D., Hassid, W.Z., Arch. Biochem. Biophys., 69 (1957) 602.

36.- Strominger, J.L., Kalckar, H.M., Axelrod, J., Maxwell, E.S., J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 6411.

37.- Strominger, J.L., Maxwell, E.S., Axelrod, J., Kalckar, H.M., J.Biol. Chem. 224 (1957) 79.

38.- Strominger, J.L., Mapson, L.W., Biochem. J., 66 (1957) 567.

39.- Smith, E.E.B., Mills, G.T., Bernheimer, H.P., Austrian, R., Biochem. Biophys. Acta, 28 (1958) 211.

40.- Ginsburg, V., Kirkman, H.N., J.Am.Chem. Soc. 80 (1958) 3481.

41.- Cardini, C.E., Leloir, L.F., Chiribaga, J., J. Biol. Chem. 214, (1955) 149.

42.- Leloir, L.F., Cardini, C.E., J. Am. Chem. Soc., 75 (1953) 6084.

43.- Leloir, L.F., Cardini, C.E., J. Biol. Chem., 214 (1955) 157.

44.- Leloir, L.F., Cabib, E., J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 5445.

45.- Gander, J.E., Peterson, W.E., Bayer, P.D., Arch. Biochem.Biophys. 69 (1957) 85.

46.- Dutton, G.J., Storey, I.D.E., Biochem. J., 57 (1954) 275.

47.- Storey, I.D.E., Dutton, G.J., Biochem. J., 59 (1955) 279.

48.- Cardini, C.E., Leloir, L.F., Ciencia e Invest. (Buenos Aires) 13 (1957) 514.

49.- Cardini, C.E., Yamuha, T., Nature 182 (1958) 1446.

50.- Yamuha, T., Cardini, C.E., Arch. Biochem. Biophys. 86 (1960) 127.

51.- Burton, R.M., Sedd, M.A., Brady, R.O., Federation Proc. 16 (1957) 161.

52.- Burton, R.M., Sedd, M.A., Brady, R.O., J. Biol. Chem. 233 (1958) 1053.

53.- Cleland, W.W., Kennedy, E.P., Federation Proc. 17 (1958) 202.

54.- Cleland, W.W., Kennedy, E.P., J. Biol. Chem. 235 (1960) 45.

55.- de Fekete, M.A.R., Leloir, L.F., Cardini, C.E., Nature 187 (1960) 918.

56.- Leloir, L.F., Cardini, C.E., J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 6340.

57.- Leloir, L.F., Olavarría, J.M., Goldemberg, S.H., Carminatti, H., Arch. Biochem. Biophys. 81 (1959) 508.

58.- Glaser, L., Biochem. Biophys. Acta 25 (1957) 436.

59.- Glaser, L., J. Biol. Chem., 232 (1958) 627.

60.- Glaser, L., Brown, D.H., Biochem. Biophys. Acta 23 (1957) 449.

61.- Glaser, L., Brown, D.H., J. Biol. Chem. 228 (1957) 729.

62.- Glaser, L., Brown, D.H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 41 (1955) 253.

63.- Markovitz, A., Cifonelli, J.A., Dorfman, A., Biochem. Biophys. Acta, 28 (1958) 453.

64.- Markovitz, A., Cifonelli, J.A., Dorfman, A., J. Biol. Chem. 234 (1959) 2343.

65.- Feingold, D.S., Neufeld, E.F., Hassid, W.Z., J. Biol. Chem. 233 (1958) 783.

66.- Glaser, L., Biochem. Biophys. Acta 31 (1959) 575.

67.- Strominger, J.L., Biochem. Biophys. Acta. 17 (1955) 283.

68.- Pontis, H.G., Cabib, E., Leloir, L.F., Biochem. Biophys. Acta, 26 (1957) 146

69.- Fiske, C.H., SubbaRow, Y., J. Biol. Chem., 66 (1925) 375.

70.- Park, J.T., Johnson, M.J., J. Biol. Chem. 181 (1949) 149.

71.- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Anal. Chem. 28 (1956) 350.

72.- Roe, J.H., J. Biol. Chem., 107 (1934) 15.

73.- Hajdaun, W., Z.Physiol. Chem. 258 (1939) 117.

74.- Kalckar, J.L., Strominger, J.L., Leloir, L.F., J.Biol. Chem. 217 (1955) 959.

75.- Joanes, A., Wise, C.S., Dimler, R.J., Anal. Chem. 23 (1951) 415.

76.- Partridge, S.M., Biochem. J., 42 (1948) 238.

77.- Cuerra Salazar, G.M., Anales Asoc. Quím. Argentina 50 (1962) 59.

78.- Markham, R., Smith, J.D., Biochem. J., 49 (1951) 401.

79.- Paladini, A., Leloir, L.F., Biochem. J. 51 (1952) 426.

80.- Wyatt, G.R., Biochem. J., 48 (1951) 584.

81.- Markham, R., Smith, J.D., Biochem. J. 45 (1949) 294.

82.- Brown, D.M., Todd, A.R., J. Chem. Soc. (1953) 2040.

83.- Markham, R., Smith, J.D., Biochem. J. 52 (1952) 552.

84.- Comsden, R., Stanier, W.M., Nature 169 (1952) 785.

85.- Piras, R., Cabib, E., Anal. Chem. 35 (1963) 755.

86.- Trevelyan, W.E., Procter, D.P., Harrison, J.S., Nature 165 (1950) 444.

87.- Cabib, E., Leloir, L.F., J. Biol. Chem. 231 (1958) 259.

88.- Bacon, J.S.D., Edelman, J., Biochem. J. 48 (1951) 114.

89.- Burrows, S., Cryles, F.S.M., Harrison, J.S., Nature 170 (1952) 800.

90.- Smith, E.E.B., Mills, G.T., Biochem. Biophys. Acta 13 (1954) 386.

91.- Cohn, W.E., Bollum, F.J., Biochem. Biophys. Acta 48 (1961) 588.

92.- Zill, L.P., Khym, J.X., Chenise, G.M., J.Am. Chem. Soc. 75 (1953) 1339.

93.- Gardell, S., Heijkenskjöld, F., Hochnorlund, A.,
Acta Chem. Scand. 4 (1950) 970.

94.- Cabib, E., Carminatti, H., J. Biol. Chem. 236 (1961) 883.

95.- Euribert, R.B., Schmitz, H., Brunn, A.F., Potter, V.R., J.Biol.Chem. 209 (1954) 23.

96.- Berghvist, R., Acta Chem. Scand. , 10 (1956) 1303.

97.- Rosenman, S., Comb, D.G., Biochem. et Biophys. Acta 29 (1958) 653.

98.- Jaffé, W.G., Octavo Congreso Latinoamericano de Química. Edit.
Asoc. Quím. Argentina, pág. 123 (1962).

99.- Rosenman, S., Distler, J.J., Moffatt, J.G., Khorana, H.G.,
J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 659.

100.- Pontis, H.G., Fischer, C.L.,Biochem. J., en prensa.

- - - - - -