

ESTUDIO DE POLIENOS POR MEDIO DE LA CROMATOGRAFIA
Y DEL ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO.

I.-FITOFLUENO

II.-ISOMERIZACION DEL DIFENIL 1,4 BUTADIENO.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
PRESENTA EL ALUMNO

ALBERTO SANDOVAL LANDAZURI

ESCUELA DE GRADUADOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO .

-1947-



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico el presente trabajo a mi maestro,
Dr. László Zechmeister que dirigió las
investigaciones llevadas a cabo en el
California Institute of Technology y
a mis maestros Dr. Fernando Orozco D y
Dr. Antonio Madinaveitia por su dirección
en el Instituto de Química de la Univer-
sidad Nacional Autónoma de México.

CAPITULOS.

Parte I.- Fitoflueno	iv
Introducción	1
Fitoflueno	3
Distribución en la Naturaleza	12
Parte Experimental	19
Análisis	43
Conclusión	49
Parte II.- Isomerización del Difenil 1,4	
Butadieno	53
Introducción	54
Isomerización	62
Parte Experimental	73
Conclusiones	83
Bibliografía	88

P A R T E I .

FITOFLENO.

INTRODUCCION.

Al inspeccionar con luz ultravioleta algunos cromatogramas de extractos de frutas o flores, se observó una zona fluorescente, incolora a la luz del día, que se encontraba situada en la misma región que el α -caroteno (61). Cuando esta zona se purificó y se analizó espectrofotométricamente, se encontró que mostraba una curva de absorción con tres máximos finos y agudos a 367, 348 y 332 m μ en hexano o en éter de petróleo.

Aunque anteriormente Strain (45,47) había observado algunas zonas fluorescentes en los extractos de hojas verdes y de zanahorias, dicho autor las había caracterizado en la forma siguiente: " Cada sustancia fluorescente, disuelta en ciclohexano, exhibe una fuerte absorción en luz ultravioleta, particularmente en las longitudes de onda más cortas, pero no se observaron ni máximos ni mínimos".

En vista de que la sustancia fluorescente mencionada al principio se había observado en extractos de diversas plantas, siempre acompañando a los carotenoides, se pensó que podía tener cierta importancia, entre otras causas, porque su curva de absorción mostraba cierta similitud con la de la vitamina A₂.

Cuando este compuesto se aisló en una forma pura, se determinaron sus propiedades y se aclaró en parte su fórmula, se propuso llamarlo " Fitoflueno" (63,64).

En las siguientes páginas se intenta dar una descripción de las investigaciones llevadas a cabo tratando de aclarar la fórmula, las propiedades y el papel bioquímico de este compuesto que por primera vez se había aislado.

FITOFLUENO.

Al comenzar a estudiar este nuevo compuesto, el hecho de que se encontrara acompañando a los carotenoides, hizo pensar que tal vez el fitoflueno fuera un precursor de éstos y que, por lo tanto, debería haber una concentración mayor en frutos no maduros que en los que estaban en plena madurez. Para comprobar si esta suposición era correcta, se hicieron estudios con los frutos de Pyracantha angustifolia Schneid., en los que ya se había observado la presencia de fitoflueno, (70), cuando tenían un color amarillo pálido, antes de la maduración y cuando estaban completamente maduros, con color anaranjado intenso.

Determinando el fitoflueno y cada uno de los pigmentos encontrados en estos frutos y relacionando los valores encontrados a miligramos de pigmento por kilogramo de material fresco, se encontró que no había acumulación de fitoflueno en los frutos no maduros, como se ve en la Tabla 1 (página 4).

En esta tabla se ve que aun cuando la suma de polienos no se conoce exactamente debido a que uno de los polienos no se determinó, el aumento en el contenido de éstos, fue de 260% aproximadamente. El aumento de fitoflueno durante la maduración fue del mismo orden de magnitud que en los demás pigmentos con excepción de tres. Es curioso que la cantidad de β -caroteno, permaneció prácticamente constante.

Tabla 1.

Contenido de polienos en los frutos no maduros y maduros de *Pyracantha angustifolia* Schneid.

Polieno	Frutos no maduros mg./kg.	Frutos maduros mg./kg.	Aumento en % durante la maduración.
Licobeno	11.4	24.0	218
Un poli-cis-licobeno	1.9	3.2	431
No identificado'	3.7	9.0	243
Prolicobeno	8.2	19.4	236
γ-Caroteno	5.3	17.6	303
Neo-γ-caroteno	6.7	13.8	280
No identificado*	0.9	* *	---
Pro-γ-caroteno	1.9	11.2	589
No identificado	0.9	2.6	289
Neo-β-caroteno-U	1.6	3.6	225
β-Caroteno	15.0	16.0	106
α-Caroteno	trazas	3 a 4	---
Fitoflueno	6.6	14.7	223
Suma de polienos	58.0	155.1	260

* calculados como β-caroteno.

* * no determinado.

Para estudiar el fitoflueno, al principio se trató de aislarlo de los frutos de *Pyracantha*. Sin embargo, todos los datos obtenidos con el fitoflueno proveniente de este material, tuvieron que ser desechados, al comprobarse que a pesar de haber sido purificado por numerosas separaciones

Propiedades del fitoflueno y comportamiento en la adsorción.

La característica más definida de este compuesto, es su curva de extinción. En las Figuras 1 y 2 (página 7) se dan estas curvas en dos disolventes: hexano y benceno.

Las muestras más puras no se pudieron hacer cristalizar. Formaban un aceite viscoso que cuando se enfriaba fuertemente, se solidificaba dando una masa vítrea, que al parecer carecía de estructura cristalina. El aceite es de color anaranjado pálido en luz del día; bajo la acción de la luz ultravioleta, muestra una fluorescencia azul-verdosa lo mismo que sus disoluciones o adsorbatos. Cuando se disuelve en éter de petróleo, en una concentración de 1%, la disolución aparece completamente incolora bajo la acción de la luz directa, pero muestra una fluorescencia azul pálida con luz reflejada.

Una muestra de fitoflueno ($E_{1\text{ cm.}}^{1\%} = 1080$) fue destilada al alto vacío. La fracción destilada mostró igual color que la muestra original y un valor de extinción de 1047. El residuo dió un valor de extinción igual a 359.

El aceite disuelto en cloroformo se da reacción positiva con el reactivo de Carr-Frice (tricloruro de antimonio disuelto en cloroformo). Cuando esta reacción se efectuó en presencia de anhídrido acético, se observaron los siguientes fenómenos: primero apareció un color transitorio azul oscuro, que observado en un espectroscopio Zeiss de

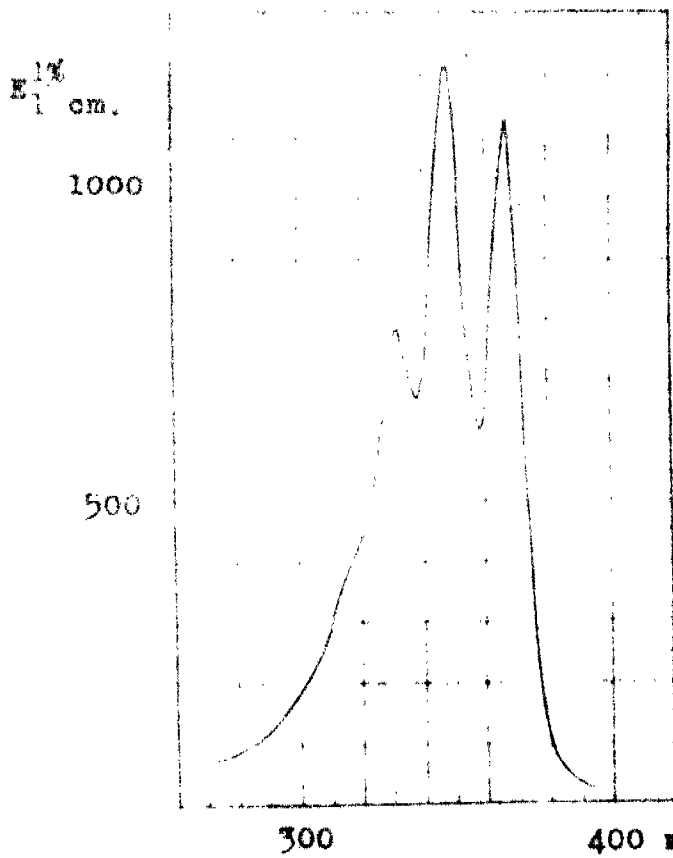


Figura 1.

Curva de extinción del fitoflueno en hexano.

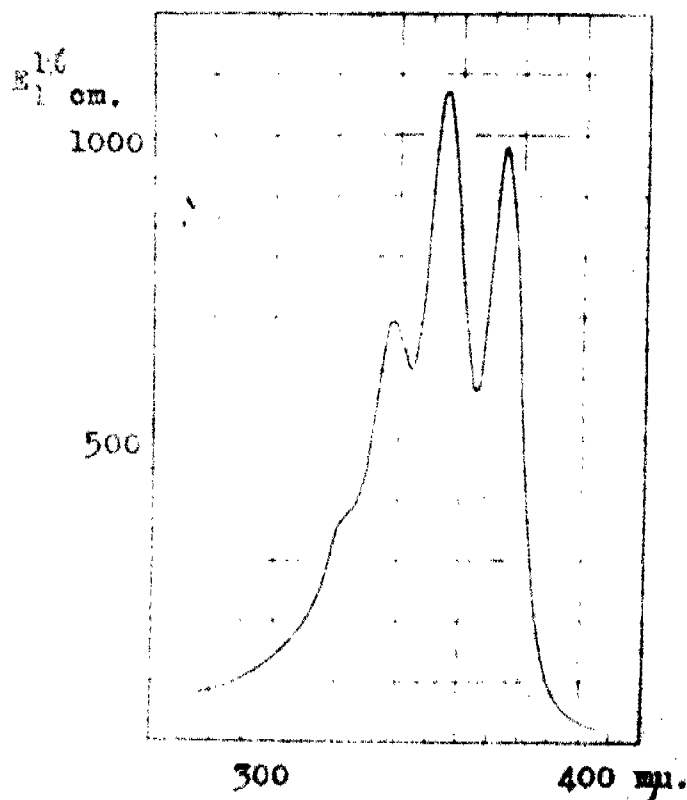


Figura 2.

Curva de extinción del fitoflueno en benceno.

retícula, mostró dos bandas de absorción localizadas a 615 y 570 μ ($\pm 2 \mu$) respectivamente. Después, a los 30 segundos, el color de la disolución cambió a púrpura y un poco más tarde semejaba al del permanganato. Simultáneamente, la banda a 615 μ desapareció y se aclaró aproximadamente la mitad de la banda a 570 μ que miraba hacia las longitudes de onda más cortas. Gradualmente el máximo de la única banda que quedaba, emigró a 535 μ , en donde pudo ser observado por varios minutos mientras se iba debilitando. Finalmente el líquido tomó un color pardo y no se pudo ver ninguna banda definida en el espectro.

Este comportamiento es, en general, opuesto al del epóxido de la vitamina A (hepaxantina) en la reacción de Carr-Price. Karrer y Jucker (18), observaron primero una banda a 575 μ , la cual desapareció en pocos minutos, apareciendo una nueva banda a 620 μ . Este cambio fue explicado por dichos autores como debido a la pérdida del oxígeno epoxilico y la regeneración del doble enlace correspondiente.

El fitoflueno es insoluble en alcohol metílico o etílico, pero es muy soluble en éter de petróleo, benceno o éter etílico. Si se sacude con volúmenes iguales de éter de petróleo y alcohol etílico al 83%, la relación de distribución entre la epifase y la hipofase es de 100 : 0. En experimentos paralelos con otras sustancias, se obtuvieron los siguientes resultados: anhidro-vitamina A o iso-anhidro-vitamina A, 99 : 1 y vitamina A, 62 : 38.

El aceite es sumamente sensible al aire y a la luz. Si en forma pura se le deja expuesto al aire durante dos horas, se destruye un 80% si está en la oscuridad y casi el 100% si está en luz difusa. Cuando se encuentra en disolución esta sensibilidad disminuye bastante.

Por su tendencia a la auto-oxidación y su carácter oleoso, el fitoflueno se semeja a algunos productos obtenidos por reducción artificial de los carotenoides (19,29,44).

Una disolución muy diluida de fitoflueno en alcohol absoluto que contenía 0.02% de ácido clorhídrico y que se dejó estar en el espectrofotómetro mientras se medían continuamente los máximos y mínimos, disminuyó rápidamente en sus valores de extinción. En 10 minutos el máximo principal disminuyó en un 20%. Después de 90 minutos, éste había desaparecido completamente. En una experiencia paralela con vitamina A, se observó la producción rápida del espectro de la anhidro-vitamina A, con una estructura fina, de conformidad con lo que observaron diversos autores (5,11,33, 43).

Cuando se desarrolla el cromatograma con éter de petróleo, el fitoflueno es adsorbido un poco más débilmente que el α -caroteno en hidróxido de calcio, alumina activada, óxido de magnesio o hidróxido de magnesio. En ácido silícico este orden se invierte y la zona del α -caroteno aparece directamente por debajo de la del fitoflueno. Adsorbiendo en alumina activada de 150-200 mallas, y usando como revelador éter de petróleo con 0.25% de acetona, el fitoflueno

forma una zona angosta bien definida la cual, en presencia de α -caroteno, se sobrepone a la zona de adsorción de éste. Cuando se emplean mezclas de alúmina e hidróxido de calcio, la diferencia de adsorbabilidad entre el fitoflueno y el α -caroteno es algo mayor. En este caso, la zona del fitoflueno es marcadamente más ancha y se sobrepone menos con la del α -caroteno. En hidróxido de calcio, la zona del fitoflueno se extiende aun más. Al mismo tiempo se puede observar la separación de algunos estereocisómeros.

En cromatogramas mixtos, usando hidróxido de calcio como adsorbente y éter de petróleo como revelador, se observó el siguiente orden de zonas de arriba a abajo: Vitamina A, fitoflueno, anhidro-vitamina A, e iso-anhidro-vitamina A. La zona del fitoflueno se encontraba entre dos zonas anchas no fluorescentes. La fluorescencia en luz ultravioleta de la vitamina A era azul, la del fitoflueno azul-verdosa, la de la anhidro-vitamina A amarilla y la de la iso-anhidro-vitamina A, anaranjado rojiza.

Cuando se adsorbe fitoflueno disuelto en éter de petróleo en ciertas tierras ácidas, se produce una coloración azul oscura (63). Esta reacción fue descrita como característica para los carotenoides y la vitamina A por Emmerie y Engel (7). Dichos autores dicen: "Los carotenoides son adsorbidos por la tierra Floridin XS con color azul verdoso. La vitamina A, reacciona con color azul oscuro". Esta reacción ha sido comprobada por diversos autores (4,22,30,31,32).

Isomerización.- Cuando se cromatografían extractos de flores o frutos que contienen fitoflueno, normalmente se observan dos o tres zonas fluorescentes que difieren ligeramente en afinidad de adsorción, pero que muestran la misma curva de extinción. Al determinar que la molécula del fitoflueno contenía varios dobles enlaces, se comprobó que las tres zonas observadas en los cromatogramas correspondían a tres isómeros cis-trans.

Se trató de hacer un estudio del equilibrio de isomerización; sin embargo las dificultades encontradas hicieron que no se pudiera terminar este estudio cuantitativamente.

Utilizando una disolución fresca de fitoflueno que se había obtenido de una zona homogénea en un cromatograma previo y volviendo a cromatografiar, se observaron nuevamente tres zonas bien definidas. Este fué el mismo caso cuando se trató de purificar cada una de las zonas obtenidas. Al mismo tiempo, había una destrucción que variaba del 13 al 30%. Cuando a una disolución obtenida de una zona homogénea se le añadió yodo para catalizar la isomerización (véase la introducción de la Parte II), se observaron 4 zonas, acompañadas esta vez, por una destrucción que era generalmente superior al 50%. Las curvas espectrales de cada zona eran prácticamente iguales. Debido a que la mezcla de isómeros se producía aun en ausencia de catalizadores como el yodo, no se pudo establecer cual de los isómeros era el "todo"-trans. Sin embargo, la conclusión es que el fitoflueno presenta isomería cis-trans y que a diferencia de los carotenoides, el equilibrio se producía aun en ausencia de catalizadores.

DISTRIBUCION EN LA NATURALEZA.

Para estudiar la distribución del fitoflueno en el reino vegetal, se tomaron muestras de flores, frutos, ramas y raíces en cantidades tales que bastaran para hacer los análisis cuantitativos. Los resultados de estos análisis se dan en la Tabla 2 (página 13).

Se encontraron resultados negativos en materiales que no contenían ni carotenos ni clorofila, tales como en el maíz fresco blanco, pulpa de toronja, pétalos de margarita blanca, pulpa de plátanos, pulpa de manzana, pulpa de rábanos, papas y harina de trigo.

En general, no se encontró fitoflueno en productos que contenían una gran cantidad de clorofila. Entre éstos, se estudiaron las hojas de naranjo, brotes tiernos de chicharro, hojas de cedro y pasto inglés. Se obtuvo resultado negativo al estudiar las hojas de Cinnamomum camphorum Nees. En tres etapas de su vida: las hojas jóvenes, aún rojas, las maduras y las que estaban amarillas, antes de la necrosis.

Se observaron trazas de fitoflueno en las hojas de una avena silvestre. En las hojas de espinaca, se obtuvo primero un resultado negativo, pero al repetir el análisis con cantidades mayores de hojas, se encontraron trazas de fitoflueno (menos de 0.1 mg. por kg.).

En los pétalos de cempazúchil (Tagetes erecta L.) se encontró otra sustancia fluorescente que se adsorbía en la misma región que el fitoflueno y que mostraba un espectro

Tabla 2.

Ejemplos de la presencia del fitoflueno en las plantas.

Análisis basados en $E_{1\text{ cm.}}^{1\%} = 1200 \text{ a } 348 \text{ m}\mu$ en éter de petróleo

Familia de plantas	Plantas	mg. de fitoflueno en 1 kg.
	<u>Pétalos</u>	
Bignoniaceae	Bignonia sp.	presente
Bignoniaceae	Tecomaria capensis (Thbg) Fenzl	presente
Cannaceae	Canna sp. Platanillo, variedad Rey Humberto	0.2
Compositae	Gazania rigens r R. Br.	32.5
Compositae	Zinnia elegans Jacq.	3.6
Loganiaceae	Gelsemium sempervirens Ait.	presente
Papaveraceae	Eschscholtzia californica Cham	
	Amapola de california	5.0
Papilionatae	Spartium junceum L. Retama	0.1
Scrophulariaceae	Mimulus longiflorus Grant.	27.8
Spiraeoideae	Photinia sp.	0.5
Sterculiaceae	Fremontia californica Torr.	presente
	<u>Frutos</u>	
Araceae	Zantedeschia aethiopica (L) Spreng.	1.1
Cucurbitaceae	Cucumis citrullus L. Sandía	2.2
Cucurbitaceae	Cucumis melo L. Melón	0.6
Cucurbitaceae	Cucumis melo L. Melón persa	presente
Cucurbitaceae	Cucurbita maxima Duch. Calabaza	presente
Ebenaceae	Diospyros kaki L.	1.0
Ericaceae	Arbutus unedo L. (no maduro)	0.8
Ericaceae	Arbutus unedo L. (maduro)	1.5
Gramineae	Zea mays L. Harina de maíz amarillo	0.6
Myrtaceae	Eugenia uniflora Berg.	0.7
Palmae	Butia eriopatha Becc. Sin semillas	0.3
Rosaceae	Pyracantha yunanensis Schneid	0.4
Rosaceae	Pyracantha angustifolia Schneid.	22.1, 23.0 14.7, 27.7
Rosaceae	Rosa canina L. Sin semillas	1.8
Rosaceae	Prunus domestica L. Ciruelas	1.0
Rosaceae	Prunus persica Sieb. Zucc. durazno	0.8
Rutaceae	Citrus aurantium Risso Naranja, jugo	0.3
Rutaceae	Citrus aurantium Risso Naranja, corteza pigmentada	1.5
Rutaceae	Citrus aurantium Risso Naranja, corteza blanca	2.3

Continúa en la siguiente página

Tabla 2 (continuación).

Familia de plantas	Plantas	mg. de fitoflueno en 1 kg.
	<u>Frutos</u>	
Solanaceae	Capsicum annuum L. Pimiento rojo sin semillas	4.6
Solanaceae	Capsicum annuum L. Pimiento anaranjado	presente
Solanaceae	Lycopersicum esculentum Mill. Tomate, no maduro	2.0
Solanaceae	Lycopersicum esculentum Mill. Madurado a 19°C.	10.6
Solanaceae	Lycopersicum esculentum Mill. Variedad "San Marxano"	6.0
Solanaceae	Lycopersicum esculentum Mill. Pasta de tomate enlatada	19.0, 28.5 16.5, 14.5 21.5, 18.4
	<u>Ramas y raíces</u>	
Convolvulaceae	Cuscuta californica Choisy	2.3
Umbelliferae	Daucus carota L. Zanahoria	7.3, 8.3

de absorción diferente. Esta nueva sustancia fue estudiada más tarde por Zechmeister y Sease (67), resultando ser un derivado del tiofeno. Este producto fue sintetizado por dichos autores (68).

Se trató de ver si el fitoflueno se encontraba en microorganismos que contenían carotenoides. En algunos de ellos se obtuvieron resultados negativos, como en el Spirillum rubrum, Rhodospseudomona (capsulatus o spheroides) y Corynebacteria. Sin embargo, en dos casos se encontró fitoflueno: en Neurospora (30 mg. por kg. de hongos secos)(55) y en Rhodotorula rubra (6 a 13 mg. por kg. de levaduras secas)(1).

En las levaduras Rhodotorula rubra, se habían obtenido siete cepas mutantes obtenidas por irradiación de las células con luz ultravioleta, en las que se había afectado la producción de pigmentos poliénicos, diferenciándose macroscó-

picamente por la intensidad de color que adquieren los cultivos desarrollados, que varía desde más intenso que en la cepa original, hasta cultivos completamente incoloros. Tratando de aclarar el mecanismo de la síntesis del fitoflueno y de los carotenoides, se hicieron análisis cuantitativos de los polienos sintetizados por los siete mutantes y la cepa original.

Al determinar cada uno de los polienos contenidos en las ocho cepas, se encontró que éstas se podían dividir en tres categorías.

a.- En las cepas IV, VI, y VII, la acumulación de polienos era mayor que en la cepa original. El contenido de toruleno aumentó de 15 a 25% y el de γ -caroteno y β -caroteno, de dos a cuatro veces. El contenido de fitoflueno aumentó aproximadamente dos veces.

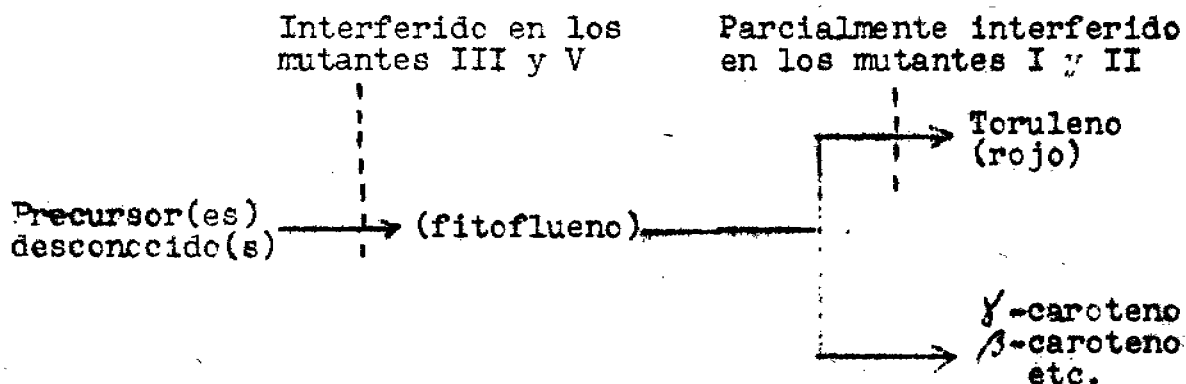
b.- En las cepas I y II, la cantidad de carotenoides amarillos era igual o ligeramente más alta que en la cepa original, pero la cantidad de toruleno se encontraba fuertemente disminuida. La cantidad de fitoflueno era igual que en la cepa original.

c.- En los mutantes III y V, había solamente trazas de pigmentos o nada. No se encontró fitoflueno.

Parece ser que en los mutantes incoloros, el proceso que lleva a la formación de pigmentos poliénicos a partir de un precursor común desconocido, fué interferido en un estado primario. En los mutantes I y II la incapacidad de sin-

tetizar pigmentos está limitada a un pigmento específico (toruleno), mientras que los demás se formaban normalmente. La causa del aumento en la capacidad de sintetizar pigmentos, observada en los mutantes IV, VI y VII, no se conoce actualmente. Es interesante el hecho de que en todas las cebas en que había una cantidad apreciable de polienos, se encontró fitoflueno.

El resultado de estos análisis puede expresarse, en una forma provisional, como sigue:



Faltaba por investigar si el fitoflueno era susceptible de ser acumulado, como ciertos carotenoides, en algunos órganos y depósitos de grasa de animales superiores.

Analizando la yema de huevos de gallina, en una ocasión se encontró un resultado negativo. Sin embargo, en otro análisis se encontró un mg. por kg. de yema fresca. Por lo tanto, se suocuso que el contenido de fitoflueno era dependiente de la alimentación a que se sujetaran los animales y

que alimentando gallinas con algun producto que contuviera bastante fitoflueno, las yemas de los huévos que éstas pusieran deberían contener mas fitoflueno.

Dos gallinas se alimentaron durante dos meses con pasta de tomate que contenía aproximadamente 20 mg. de fitoflueno por kg. Los huevos que pusieron durante el primer mes fueron desechados. Durante el segundo, cada gallina puso 24 huevos que se analizaron por separado.

Los valores encontrados fueron de 0.04 y 0.06 mg. de fitoflueno como contenido promedio de cada yema, que corresponden a 2.2 y 3.2 mg. por kg. de yema fresca. En las claras no se encontró fitoflueno.

Al analizar los depósitos de grasa de esas gallinas no se encontró fitoflueno. En los hígados, se encontró cerca de 0.1 mg., que corresponde a 1.8 mg. por kg. de hígado fresco.

Se hicieron experimentos semejantes con conejos. A dos conejos se les alimentó por períodos de dos y de cuatro semanas respectivamente con 6 y 12 kg. de pasta de tomate. Al analizar los órganos, excremento y orina de cada uno de ellos, se encontró que la mayor parte del fitoflueno suministrado había sido destruido. En el hígado de uno de ellos se encontró 0.7 mg. de fitoflueno. En los riñones y bazos de ambos animales, se encontraron aproximadamente 0.01 mg. en cada uno. Los cerebros estaban libres de fitoflueno, igual que la orina (antes y después de hidrólisis ácida). Cerca del

10% de la cantidad suministrada se encontró en los excrementos (41)

En un experimento paralelo en que un conejo se alimentó con alimento especial para conejos, no se encontró fitoflueno en ninguno de los órganos ni en los excrementos.

Evidentemente hay una cierta capacidad en los animales superiores para acumular fitoflueno, aunque la mayor parte de éste se destruye sin conocerse cual es el mecanismo de destrucción ni en que parte del organismo ocurre.

Finalmente, se ensayaron en ratas, muestras de fitoflueno puro, para ver si tenía potencia como compuesto con acción de pro-vitamina A. El resultado fué negativo aun en dosis diarias de 40 μ g.

PARTE EXPERIMENTAL.

Adsorbentes y disolventes. Como adsorbentes se utilizaron: hidróxido de calcio (Shell Brand, cal hidratada, 98% pasa a través de 325 mallas); alúmina activada (Alorco, Grado F, -80 mallas, mezclada con hidróxido de calcio y Alorco, Grado A, 150-200 mallas, mezclada con Celite); Celite o Supercelite (Johns-Manville, tierra silícea que se empleó como ayuda filtrante). La alúmina activada (Grado A) mezclada con Celite se regeneraba después de usarla, lavándola con alcohol y luego calcinándola hasta que no desprendiera más vapores de agua y alcohol.

Para las extracciones se utilizaron como disolventes, mezclas de metanol y éter de petróleo o metanol y benceno. Como reveladores, se empleó éter de petróleo o mezclas de éter de petróleo y acetona en proporciones que variaban con cada caso. El éter de petróleo que generalmente se empleó tenían punto de ebullición de 60-70° (Skellysolve B). Algunas veces se empleó éter de petróleo 28-38° (Skellysolve A) o de 100-120 (Skellysolve C).

Para las eluciones, se empleó alcohol etílico o acetona.

Para determinar las curvas de extinción en el espectrofotómetro, se empleó éter de petróleo, benceno y hexano. Este último (Eastman Kodak, técnico) se purificó por destilación, tratamiento con ácido sulfúrico fumante y redestilación hasta que comparado con agua destilada no dio ningún

espectro de absorción en la región ultravioleta.

Aparatos. Los tubos para cromatografiar empleados, fueron los que se encuentran comercialmente (Scientific Glass Apparatus Co. Bloomfield N.J.) que se numeran según sus tamaños en la siguiente forma:

No. 1, 11 mm. de diámetro x 180 mm. de largo; No. 2 19 x 200; No. 3, 38 x 230; No. 4, 48 x 270; No. 5, 58 x 300; No. 6, 80 x 320. Frecuentemente se utilizan tubos de diámetros intermedios, principalmente uno de 30 x 215 que se designa como No. 2.5 .

Para cromatografiar, los tubos se llenan con el adsorbente en tal forma, que una vez que éste se ha comprimido uniformemente, quede un espacio libre de unos 2 a 3 cm. de alto en donde se pueda colocar la sustancia por cromatografiar y luego el revelador. Cuando el cromatograma ha quedado terminado, la columna de adsorbente se empuja fuera del tubo por medio de un pistilo de madera. Las zonas formadas por cada sustancia adsorbida, se cortan lo más cuidadosamente posible con un bisturí.

Para producir el vacío necesario para cromatografiar, se emplea una trompa de agua. Para secar las muestras hasta peso constante, se empleó un aparato de Abderhalden cargado con pentóxido de fósforo y rebanadas de parafina, empleando una bomba Cenco para producir un vacío de aproximadamente 0.1 mm. En general, las muestras se secaban a temperatura ambiente. Cuando era necesario calentar se emplearon

vapores de acetona

Para medir los espectros visuales, se empleaba un espectrómetro Zeiss de retícula. Cuando se trataba de identificar pigmentos, una vez determinadas las bandas de absorción, se añadían unas gotas de disolución de yodo en el mismo disolvente que se hubiera empleado y se volvían a medir las bandas para determinar si había un desplazamiento en longitudes de onda.

Los análisis colorimétricos se hicieron en un fotocolorímetro de Pulfrich (Zeiss, con filtro S-47), comparando los valores obtenidos con curvas obtenidas para cada pigmento. Cuando se encontraban pigmentos no identificados, generalmente se calculaban como α o β -carotenos.

Las curvas de extinción se determinaron en un espectrofotómetro de Beckman (3). La concentración de las disoluciones se ajustaba generalmente hasta que el punto de máxima extinción diera un valor entre 10 y 20% de transmisión en el espectrofotómetro.

Para concentrar disoluciones, los disolventes se evaporaban bajo presión reducida, en aparatos con conexiones de vidrio esmerilado. Cuando la sustancia que se estaba concentrando era sensible al aire, se pasaba nitrógeno o dióxido de carbono a través del capilar. En el caso del fitoflueno, además de ésta precaución, todas las operaciones se llevaban a cabo en la oscuridad. Para observar fluorescencias, se utilizaron focos de luz ultravioleta G.E. o Wonderlite o una lámpara ultravioleta portátil (Minerallight Q-31).

Fitoflueno de los frutos de *Pyracantha angustifolia*.

Para el análisis de los polienos presentes en los frutos no maduros y maduros, se tomaron 100 g. de cada tipo. Las muestras se molieron y deshidrataron con 250 cc. de metanol. Se filtró, desechando el filtrado. Los residuos se extrajeron en la siguiente forma:

1a. extracción, 150 cc. de metanol y 50 cc. de éter de petróleo. 2a., 100 y 100 cc. 3a., 100 y 150, 4a., 50 y 200. Después de la tercera y cuarta extracción, el residuo se lavó con 50 cc de éter de petróleo.

Los extractos de cada una de las muestras se combinaron y el alcohol se eliminó por adición de agua y luego lavando la capa de éter de petróleo en un embudo de separación con un aparato de lavado continuo (28). La disolución en éter de petróleo se saponificó con 50 cc. de potasa alcohólica (en metanol) al 20%. Después de unas 12 horas, la capa de éter de petróleo se lavó hasta no dar reacción de álcali y se concentró al vacío hasta 30 cc. Esta disolución se cromatografió en una columna No. 4 cargada con hidróxido de calcio, revelando con éter de petróleo que contenía 2% de acetona. La descripción de los cromatogramas y la identificación de las zonas, se dan en las Tablas 3 y 4 (páginas 23 y 24).

Aun cuando los frutos de *Pyracantha* no sirvieron porque el fitoflueno obtenido de ellos no se podía purificar más allá de cierto grado, es conveniente explicar el método empleado y las dificultades con que se tropezaron.

Tabla 2.

Descripción del cromatograma obtenido de los frutos no maduros de Pyreantha angustifolia y caracterización de las zonas.

Ancho en mm.	Color de la zona	Espectro visual en éter de petróleo en μ .	Polieno
6	inoloro		
3	rojo intenso	503.7, 472.1, 444.4	Licopeno
1	café rojizo		
2	inoloro		
3	anaranjado intenso	475.5, 471.7, 443.5 (501.8, 470.6, 443.0)	Un poli-cis-licopeno
5	inoloro		
7	amarillo pálido	472.6, 445.1 (471.0, 442.6)	No identificado
3	anaranjado pálido	471.9, 441.5 (501.2, 470.1, 440.6)	Prolicopeno
5	inoloro		
5	anaranjado pálido	495.9, 466.1, 437.1	"Todo"-trans- γ -caroteno
14	inoloro		
5	anaranjado	493.6, 461.5, 434.0 (495.1)	Neo- γ -caroteno
5	inoloro		
2	amarillo pálido	430	No identificado
14	amarillo verdoso		
5	inoloro		
4	anaranjado pálido	461.1, 430.6 (493.0, 459.6, 428.3)	Pro- γ -caroteno
10	inoloro		
3	amarillo pálido	453.8, 430.0 (confuzo)	No identificado
7	inoloro		
3	anaranjado pálido	482.6, 450.5 (484.6)	Neo- β -caroteno-U
5	inoloro		
9	amarillo pálido	485.3, 452.6 (disminuye)	β -Caroteno
3	inoloro		
4	amarillo pálido	434.4, 456.7	Neo- β -caroteno
20	inoloro		
15	fluorescente		Fitoflueno

Los números entre paréntesis indican la posición de las bandas de absorción después de catalizar con yodo.

Tabla 3.

Descripción del cromatograma obtenido de los frutos maduros de Pyracantha angustifolia y caracterización de las zonas.

Ancho en mm.	Color de la zona	Espectro visual en éter de petróleo en m μ	Polieno
6	inoloro	502.9, 471.7, 443.5	Licopeno
6	rojo intenso		
2	café rojizo		
1	inoloro	474.5, 446.1 (501.0, 472.5)	Un poli-cis-licopeno
5	anaranjado rojizo		
3	inoloro	472.5, 446.1 (471.0, 442.6)	No identificado
10	amarillo pálido		
5	anaranjado	472.2, 443.4 (501.7, 470.8, 440.0)	Prolicopeno
3	inoloro	496.7, 454.9, 436.5	"Todo"-trans- γ -caroteno
11	anaranjado		
12	inoloro	492.3, 463.2 (496.4)	Neo- γ -caroteno
20	anaranjado rojizo		
10	inoloro	461.8 (493.6, 460.6)	Pro- γ -caroteno
5	amarillo verdoso		
15	inoloro		
11	anaranjado	458.4, 430.0	No identificado
3	inoloro		
4	amarillo verdoso		
3	inoloro		
5	amarillo verdoso		
10	inoloro	482.8, 450.0 (485.5)	Neo- β -caroteno-U
4	anaranjado		
20	anaranjado intenso	435.9, 453.0	β -Caroteno
5	inoloro	484.4, 457.7	Neo- β -caroteno
8	amarillo		
Filtrado	fluorescente, amarillo		Fitoflueno, -caroteno

Los números entre paréntesis indican la posición de las bandas de absorción después de catalizar con yodo.

Porciones de 8 kg. de los frutos limpios, se molieron tres veces en un molino de navajas. La masa se cubrió con 3 l. de metanol, se agitó y se dejó reposar varias horas. El líquido se extrajo en un prensa frutas. Aunque el líquido filtrado en esta forma era amarillo, no contenía fitoflueno y fué desechado. El residuo se extrajo cuatro veces con partes iguales de metanol-éter de petróleo agitando en un sacudidor mecánico durante unos 20 minutos cada vez, filtrando el extracto en el prensa frutas. Al final de las cuatro extracciones, el residuo se lavó con 1 l. de éter de petróleo. Los extractos combinados consistían en 16 l. de metanol y 17 l. de éter de petróleo. En un embudo de separación de 12 l. , el alcohol se fué eliminando en partes, por adición de agua y luego lavando la capa de éter de petróleo hasta quedar libre de alcohol. Entonces la capa de éter de petróleo se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a 2 l. bajo presión reducida. El concentrado se saponificó durante 4 horas con 1 l. de potasa alcohólica al 20%, agitando de vez en cuando. El álcali se eliminó lavando con agua y la disolución en éter de petróleo se secó y concentró a 0.5l. Se separó una gran cantidad de gomas que impedirían cromatografiar. Para eliminarlas, la suspensión se filtró a través de una capa de hidróxido de calcio colocada en un embudo Buchner con fondo de vidrio poroso. Los carotenos y fitoflueno se eluyeron con metanol hasta que el líquido pasaba casi incoloro. Las gomas quedaron adsorbidas en la cal. El filtrado se transfirió a

un embudo de separación, añadiendo 1 l. de éter de petróleo y luego agua hasta eliminar todo el alcohol. Se volvió a concentrar al vacío hasta 120 cc. dividiendo esta disolución en cuatro partes que se colocaron en tubos para centrifugar de 50 cc. Estos se colocaron en un baño de hielo seco-acetona (-80°) por media hora. Se separó una gran cantidad de cristales incoloros (probablemente esteroides) que se centrifugaron rápidamente. El líquido claro se decantó y los cristales se lavaron por disolución en la menor cantidad de éter de petróleo recristalizando por enfriamiento y volviendolos a separar por centrifugación. Este procedimiento se repitió hasta que los cristales quedaron prácticamente incoloros. Estos se desecharon y la disolución se cromatografió en seis columnas No. 6 utilizando hidróxido de calcio como adsorbente y éter de petróleo con 2% de acetona como revelador. Como en este caso los carotenoides no interesaban, el revelado se continuó hasta obtener una buena separación entre los carotenoides y las tres zonas de estereoisómeros del fitoflueno. Estas se cortaron y eluyeron con alcohol, hasta que el líquido que pasaba a través de los embudos Büchner dejó de ser fluorescente. Los eluatos de las 6 columnas se combinaron, se añadió éter de petróleo y agua hasta transferir el fitoflueno a la capa superior etérea. Después de lavar hasta eliminación total del alcohol, la capa de éter de petróleo se secó y concentró hasta 20 cc. Esta disolución se cromatografió en una columna No. 6 cargada con hidróxido de calcio utilizando éter de petróleo

como revelador. Al cortar las zonas fluorescentes, se eliminó la mayor parte del β -caroteno que se encontraba como impureza. El fitoflueno, que aun contenía neo- β -carotenos y α -caroteno, se eluyó y trató en igual forma que la descrita anteriormente. La disolución obtenida se cromatografió dos veces en una columna No. 5 cargada con alúmina activada conteniendo 10% de Celite. En cada cromatograma se fué eliminando una pequeña porción de carotenos. En igual forma, se cromatografió dos veces más en una columna No. 4 (hidróxido de calcio) y dos veces en alúmina-Celite, revelando con éter de petróleo que contenía 1 y 0.25% de acetona respectivamente.

Después de estas operaciones, se evaporó a sequedad y se analizó el residuo para determinar el valor de extinción a 348 mu. El resultado fué que se tenía 64.3 mg. de fitoflueno con un valor para $E_{1\text{ cm.}}^{1\%} = 701$ y conteniendo 0.1 mg. de alfa caroteno como contaminante colorido. Este valor de extinción fué el más alto que se obtuvo de muchos experimentos, y cuando se trató de mejorarlo por medio de subsiguientes cromatogramas, empezó a disminuir: después de cromatografiar en una columna No. 3 (alúmina-Celite), el peso del residuo fué de 41.8 mg. con un valor de $E_{1\text{ cm.}}^{1\%} = 522$.; después de cromatografiar otra vez en una columna No. 2 con el mismo adsorbente, se encontraron 24 mg. con un valor de extinción igual a 365.

Evidentemente durante la purificación del fitoflueno había dos procesos distintos: la eliminación de impurezas

que llegó a un máximo después de determinado número de separaciones cromatográficas, y la destrucción del fitoflueno por auto-oxidación, que se puede suponer constante. Una vez que el máximo de impurezas ha sido eliminado, la destrucción del fitoflueno hace que el valor de extinción sea cada vez menor.

Fitoflueno de la pasta de tomate.

La extracción de la pasta enlatada (Campania West Coast Packing Co., Long Beach, Calif.) y la primera parte de las operaciones ulteriores, se efectuaron con porciones de 3 kg. Cada porción se mezcló con 4 l. de metanol, conservándola en una botella cerrada durante 4 horas, sacudiéndola de vez en cuando. El residuo se separó en una centrifuga de canasta (diámetro 20 cm.). El líquido filtrado queda generalmente libre de fitoflueno, pero algunas veces contenía pequeñas cantidades de otras sustancias fluorescentes.

El residuo, intensamente colorido, se sacudió mecánicamente con 2 l. de metanol y 2 l. de éter de petróleo durante 10 minutos. Después de centrifugar para separar el residuo, éste se extrajo dos veces más con 1 l. de metanol y 1.5 l. de éter de petróleo. Si es necesario se extrae una vez más con 0.5 y 2 l. de cada disolvente. Los extractos combinados, formados por dos fases, se transfirieron a un embudo de separación de 15 l. añadiendo de 6 a 7 l. de agua para eliminar el alcohol. La capa roja superior (6 a 7 l.) se lavó hasta eliminar completamente el metanol. Después se secó con sulfato de sodio y se concentró a unos 400 cc. Esta disolución se

trató con un volumen de potasa alcohólica al 20% en un matraz Erlenmeyer amplio, dejándolo estar durante la noche a 20° y después a 4° hasta que se pudieron reunir seis porciones, correspondientes a 18 kg. de pasta de tomate.

Las seis porciones se combinaron en un embudo de separación de 5 l. añadiendo 2.5 l. de agua. La ligera emulsión que se produce, se extrae sacudiendo cuidadosamente con éter de petróleo.

La capa de éter de petróleo, con color rojo oscuro, se lavó hasta quedar libre de álcali, se secó y se concentró hasta 150 cc. Se formó un precipitado espeso, gomoso, que se eliminó haciendo pasar la suspensión a través de una capa de 3 cm. de hidróxido de calcio colocada sobre un embudo Buchner con fondo de vidrio poroso, de 14 cm. de diámetro. El fitofluo y los carotenoides, se eluyeron con 1 a 2 l. de metanol.

De esta disolución, la porción principal del licopeno cristaliza espontáneamente; los cristales se filtraron y lavaron con un poco de alcohol. Los otros polienos se hicieron pasar a 1 l. de éter de petróleo por adición de agua. La capa de éter de petróleo se lavó, secó y concentró a 100 cc.

La disolución se cromatografió en una columna No. 6 cargada con una mezcla de hidróxido de calcio-alúmina, en una proporción de 4 : 1. Se requirieron de 30 a 45 minutos para revelar el cromatograma con éter de petróleo. La descripción del cromatograma obtenido, es la siguiente. Los números a la izquierda, que pueden variar considerablemente de

un experimento a otro, significan el ancho en mm. de las zonas

- | | | |
|---|---|-------------------------|
| 25, anaranjado intenso | } | Mezcla de carotenoides. |
| 5, rojo intenso | | |
| 5, anaranjado | | |
| 5, rojo intenso | | |
| 20, amarillo | | |
| 75, anaranjado, β -caroteno | | |
| 8, intensamente amarillo, neo- β -caroteno y α -caroteno con algo de fitoflueno. | | |
| 60, prácticamente incoloro, fuertemente fluorescente en luz ultravioleta, fitoflueno. | | |

La zona de fitoflueno y la parte baja de la zona de 8 mm., se cortaron juntas, guiándose con luz ultravioleta; eluyendo con alcohol metílico en un embudo Buchner amplió (14 cm. de diámetro, fondo de vidrio poroso), hasta que desapareció la fluorescencia en el líquido que estaba filtrando. Al eluato se le añadieron 200 cc. de potasa alcohólica al 20%. Al día siguiente se añadieron 250 cc. de éter de petróleo y un exceso de agua para separar las capas, extrayendo la emulsión que se forma en la capa inferior con un poco de éter de petróleo. Las disoluciones combinadas de éter de petróleo, que solamente tienen un ligero color anaranjado, después de lavarlas hasta quedar libres de álcali y se secarlas, se cromatografiaron en una columna No. 4 cargada con alúmina-Celite, revelando, en el curso de una media hora, con 1 a 2 l. de éter de petróleo con 0.25% de acetona.

- | | | |
|--|---|-------------------------|
| 1, intensamente rojo | } | mezcla de carotenoides. |
| 20, anaranjado | | |
| 20, prácticamente incoloro | | |
| 45, anaranjado, β -caroteno y en su parte inferior, fluorescente, fitoflueno | | |
| 15, anaranjado pálido, α -caroteno, neocaroteno y fitoflueno. | | |

Las zonas de fitoflueno y de carotenos se superponen hasta cierto grado, como lo demuestra la fluorescencia verde de una parte de la sección de carotenos. Esta intrusión es mayor si se emplea una alúmina de poder adsorbente mayor y en este caso, una parte de las zonas coloridas puede presentar una fluorescencia marcadamente amarilla. La columna se cortó por el borde superior de la sección fluorescente, sin tener en cuenta la presencia de pigmentos, y se eluyó, haciendo pasar los volúmenes del eluente: 15-20 cc. de éter de petróleo.

Esta disolución se cromatografió en una columna No. 5 de hidróxido de calcio-alúmina, revelando con éter de petróleo hasta que los pigmentos se extendieron notablemente.

150, anaranjado pálido	} carotenoides.
5, anaranjado intenso	
50, casi incoloro, fuertemente fluorescente, fitoflueno.	

En algunas experiencias se consiguió una buena separación entre las zonas de fitoflueno y de carotenoides, utilizando solamente hidróxido de calcio. Cuando no se lograba esta separación, como en el caso descrito antes, la porción principal de la zona de fitofluenos (sin pigmentos) se cortó separadamente de la parte superior, que por la irregularidad del borde de las capas, es imposible cartarla completamente libre de carotenos. Esta última fracción se volvió a cromatografiar en una columna No. 2.5 del mismo adsorbente. Se obtiene así un cromatograma semejante al descrito. La zona inferior de fitoflueno se eluye y se combina con la fracción

principal de fitoflueno, eliminando el resto. Finalmente se cromatografió en una columna No. 3 (alúmina-Celite) revelando con 0.4 l. de éter de petróleo con 0.25% de acetona. Se obtuvo una sola zona, fuertemente fluorescente, casi incolora, de 40 mm. de espesor. De ella se eluyó el fitoflueno, pasándolo luego a éter de petróleo ligero. El disolvente se evaporó en un tubo cónico tarado, con tapón de vidrio esmerilado. El residuo oleoso se secó en el aparato de Abdorhalden a temperatura ambiente durante 60-90 minutos.

Durante las distintas fases de estas operaciones, se tomaron muestras alícuotas para determinar extinciones y rendimientos. Por ejemplo: 18 kg. de pasta de tomate contienen aproximadamente 400 mg. de fitoflueno. En el extracto bruto, después de saponificar, se encontraron 364 mg. Esta cantidad decreció por la filtración a través de hidróxido de calcio y los tres cromatogramas sucesivos, quedando 272, 201 y 171 mg. respectivamente. Después de la segunda saponificación, la cantidad de fitoflueno era de 163 mg. y después de la última adsorción no quedaron más que 117 mg., es decir, 30% del contenido inicial.

Las mejores muestras de fitoflueno, obtenidas en cuatro procesos de aislamiento independientes, mostraron los siguientes valores de extinción a 348 m μ en hexano:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1160, 1230, 1164 \text{ y } 1080 .$$

Determinación de fitofluenc en plantas.

La cantidad de frutos, hojas, ramas o raíces empleadas para determinar el contenido de fitofluenc, variaban de acuerdo con el material. Por ejemplo, se utilizaron 500 g. de pulpa de sandía y en cambio solamente 10 g. de pétalos de Mimulus longiflorus. Las cantidades utilizadas dependían del grado de hidratación del producto y de la cantidad de fitofluenc que contuvieran. La muestra por investigar se pesaba después de haber sido molida. Cuando el contenido de agua era muy grande, la extracción era precedida por una deshidratación con 1 a 2 volúmenes de metanol. Este tratamiento, como se explicó antes, no implica pérdida de fitofluenc. Para extraer los pigmentos y el fitofluenc, el material se agitaba a mano, en una botella, con partes iguales de éter de petróleo y metanol, repitiendo la extracción tres veces. Después de cada extracción el residuo se separaba en un embudo Buchner, lavándolo con un poco de metanol. Los extractos se lavaban con agua para eliminar el alcohol, se saponificaban, se volvían a lavar para eliminar el álcali, se concentraban y cromatografiaban, cortando la zona fluorescente sin importar que contuviera trazas de carotenos. El fitofluenc se transfería a éter de petróleo y después de secarlo se diluía a un volumen conocido, determinando el contenido por medio del espectrofotómetro, multiplicando el valor de extinción obtenido a 348 m μ por el factor $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 1200. Además del punto máximo, se determinaban los máximos y mínimos para caracterizarlo.

Mutación artificial de levaduras *Rhodotorula rubra*.

Para producir la mutación artificial de las levaduras, una pequeña cantidad de ellas se suspendía en agua estéril, en un volumen tal, que resultara una concentración de 1000 levaduras por cc. aproximadamente. Muestras de 1 cc. se sometían a la irradiación de una lámpara de vapor de mercurio de 50 cm. ("Sterilamp", Westinghouse) en una caja de Petri a una distancia de 5 cm. Durante los 4 minutos de exposición, la capa delgada de células en suspensión, se agitaba con una varilla estéril para aumentar la uniformidad de exposición de las células individuales. Después de esta exposición, la suspensión en un medio sintético. Bajo estas condiciones resultaba un crecimiento de 10 a 20 colonias por placa, correspondiendo a una sobrevivencia de 1 a 2% de las células originales. Cuando las colonias habían adquirido un diámetro de 1 a 2 mm, las placas se inspeccionaban para ver si habían aparecido colonias que tuvieran un color diferente que el de la cepa original. De estas colonias, solamente se utilizaban aquellas que eran idénticas a la cepa original en morfología microscópica y en la forma y crecimiento característico de las colonias. De 600 placas expuestas a la irradiación (aproximadamente 9000 células individuales), se obtuvieron 7 nuevas cepas que diferían de la original en el color, que variaba del rojo, a través del amarillo a completamente incoloras.

Debido a que no hay pruebas genéticas para determinar la naturaleza mutante de estas nuevas cepas de Rhodotorula, se podría abrigar la sospecha de que se trataba de contaminantes casuales no relacionados con la cepa original. Sin embargo, el parecido que había entre cada especie aberrante, en detalles de los cultivos y condiciones bajo las cuales habían sido obtenidas, hizo que se clasificaran estas 7 cepas como mutantes.

Análisis de las cepas.

Cada una de las cepas se analizó siguiendo el procedimiento que a continuación se describe:

La levadura de 20 a 40 cultivos, se raspaba con una espátula de vidrio, teniendo cuidado de no arrastrar partículas del medio de cultivo. Cuando éste estaba ligeramente suave, las botellas se enfriaban con hielo. El material obtenido (Aproximadamente 100 g. de 40 botellas), se mezclaba hasta obtener una pasta homogénea. Se tomaba una muestra para determinar residuo seco. El resto se pesaba y transfería a un matraz Erlenmeyer con tapón de vidrio esmerilado, añadiendo luego 200 cc. de potasa alcohólica al 20% y 100 cc. de benceno. Esta mezcla se sacudía mecánicamente durante 1 a 1.5 horas, al cabo de las cuales las levaduras habían formado una fuerte suspensión. Se dejaba reposar durante unas 16 a 20 horas. Si para este tiempo la suspensión se había resuelto, bastaba un ligero sacudimiento para volverla a formar. Esta suspensión se centrifugaba en botellas de 250 cc a 2000

r.p.m. durante unos cuantos minutos. Después de este tratamiento aparecían en las botellas tres capas: una superior, clara, colorida de benceno, seguida por la de la potasa alcohólica y en el fondo el residuo de las levaduras, que a veces se encontraba formando la segunda capa. La capa de benceno se pipeteaba cuidadosamente y el resto se vertía al matraz, agregando benceno fresco y repitiendo toda la operación hasta que el residuo aparecía incoloro y se desechaba. La disolución bencénica (300 a 400 cc.) se colocaba en cuatro botellas de centrífuga de 250 cc. añadiendo a cada una, cuidadosamente, un volumen de agua. Al añadir el agua se formaba una espesa emulsión que arrastraba algo de los pigmentos. Se volvía a centrifugar, pipeteando después la capa clara de benceno y la emulsión se extraía en igual forma hasta que aparecía completamente blanca. La disolución bencénica no mostraba mas tendencia a formar emulsiones y se lavaba hasta quedar libre de álcalis en un embudo de separación con un aparato de lavado continuo, se secaba y evaporaba a sequedad bajo presión reducida. Se añadía un poco de éter de petróleo y se volvía a evaporar para eliminar todo el benceno. El residuo era plegoso, pero no convenía saponificar una segunda vez en este estado porque se formaban emulsiones de las que era muy difícil separar los pigmentos. El aceite se disolvía en 20 cc. de éter de petróleo y se cromatografiaba en una columna No. 2,5 con hidróxido de calcio y alúmina activada en una proporción de 4 : 1, revelando con éter de petróleo conteniendo 7.5% de

acetona. Bajo estas condiciones, el β -caroteno, un pigmento "B", fitoflueno y todo el aceite que se encontraba como impureza, pasaba al filtrado mientras que los otros pigmentos formaban un cromatograma bien definido. Cada una de estas zonas se analizaba por separado. El filtrado se evaporaba a sequedad, resaponificando el residuo en igual forma a la descrita. Después de esta segunda saponificación la disolución resultante se volvía a cromatografiar en igual forma, revelando con éter de petróleo con 2% de acetona. Las zonas de los tres polienos se analizaban por separado.

La descripción de los cromatogramas más típicos de las 8 cepas se da en la Tabla 5. La caracterización de cada

Tabla 5

Cromatogramas característicos de la mezcla de polienos contenidos en la cepa original y las 7 mutantes de Rhodotorula rubra. Los números indican ancho en mm. de las zonas obtenidas de aproximadamente 100 g. de levaduras frescas, al cromatografiar en una columna No. 2.5 cargada con hidróxido de calcio-alúmina.

Cepas original y mutantes								Descripción del color de la zona y pigmento que la forma.
Original	I	II	III	IV	V	VI	VII	
30	24 ^a	10 ^a	20 ^b	20		30	30	Rojo pálido, trazas de toruleno
15	10	5	3 ^c	12		10	10	rojo intenso, toruleno
6	5	4		5		4	10	rojo, neo-toruleno
0	3	1		0		0	0	incolore, inter-zona
8	15	12		8		6	10	amarillo, pigmento "A"
30	10	0		30		20	0	incolore, inter-zona
30	20	25		35		20	22	anaranjado, γ -caroteno
		50						incolore, inter-zona
		15						amarillo pálido, pigmento "B"
si	si	si		si		si	si	filtrado, amarillo, fluorescente, β -caroteno, fitoflueno.

a.- casi incolore, b.- incolore. c.- rojo pálido.

pigmento, en la Tabla 6. Los pigmentos de cada cepa que correspondían a los de las otras, se mezclaron y cromatografiaron hasta obtener zonas homogéneas, que se analizaron espec-

Tabla 6.

Caracterización de los polienos encontrados en las cepas de Rhodotorula rubra.

Los números entre paréntesis indican máximos después de catálisis con yodo. Los números subrayados indican máximos.

	Máximos observados visualmente.		Máximos y mínimos observados en el espectrofotómetro, en éter de petróleo
	CS ₂	Eter de petróleo.	
Torulenc	564, 522, 488	520, 486, 454.5 (517.5, 484, 452)	<u>519, 505, 486, 466, 460</u>
Neo-toruleno			<u>516, 502, 483, 464, 458</u>
γ -Carotenc	522.5, 495, 460	495, 461.5, 433.5 (492, 485.5)	<u>493, 479, 462, 444, 437</u>
β -Caroteno	519, 484, 452	485, 453, (483, 450)	<u>480, 469, 453</u>
Pigmento "A"	503, 470, 440	469.5, 441.5 (468.5, 439)	<u>470, 457, 440, 425, 415</u>
Pigmento "B"	455, 424,	425.5	<u>424, 411, 399, 386, 377</u>
Fitoflueno			<u>367, 358, 348, 338, 332</u>

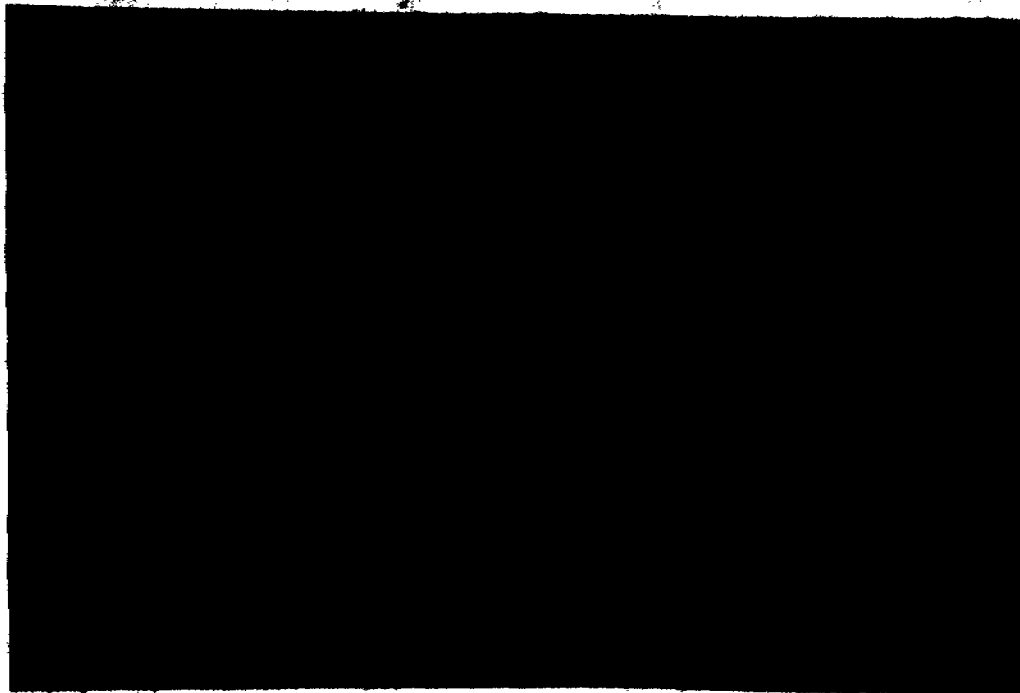
Todos los números indican longitud de onda en m μ .

trifotométricamente. Las curvas características de cada pigmento se dan en la Figura 2a (página 39). El resultado de los análisis cuantitativos de los pigmentos de cada cepa, se da en la Tabla 7 (página 40).

Todos los pigmentos encontrados en las cepas de Rhodotorula rubra mostraron un comportamiento epifásico cuando se hicieron pruebas para determinar el coeficiente de distribución

Figura 2a.

Curvas de extinción de los polienos sintetizados por las levaduras Modotorula rubra (en éter de petróleo)



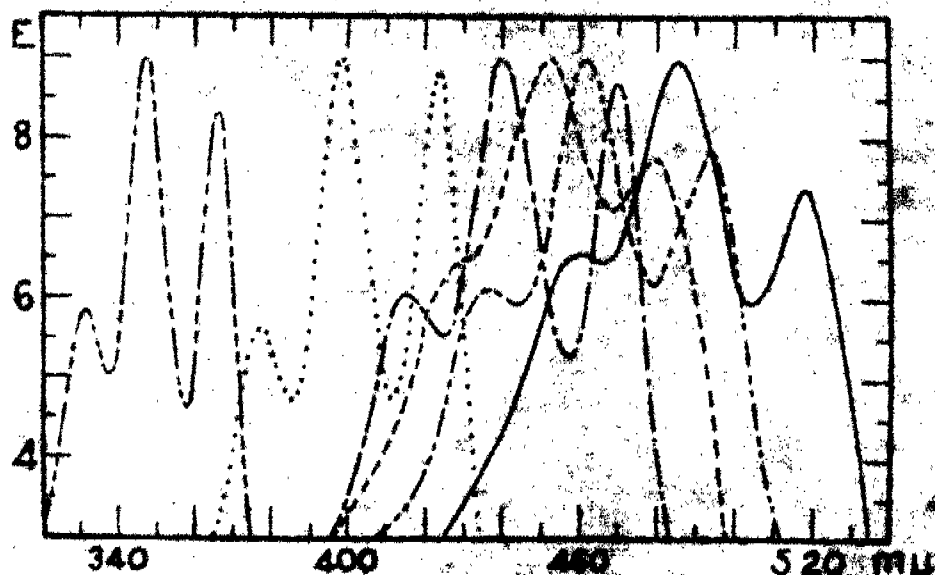
-----, Toruleno; - - - - - , 3-Caroteno - - - - - , 3-Caroteno;
 no; - - - - - , Pigmento "A"; , Pigmento "B";
 - - - - - , Fitoflueno.

entre éter de petróleo y metanol de 90 o 95%. En cada una de las cepas mutantes, se encontraron los mismos cuatro pigmentos principales que en la cepa original con excepción de los mutantes albinos. Solamente en el mutante II se encontró un pigmento adicional (Pigmento "B") en pequeña cantidad. Probablemente este pigmento se encontraba también en todas las otras cepas, aunque en cantidades tan pequeñas que no se observaron en los análisis cromatográficos.

En ninguna de las cepas se encontró el carotenoido

Figura 2.

Curvas de extinción de los polímeros sintetizados por las levaduras Rhodotorula rubra (en éter de petróleo)



—, Torulone; , Caroteno; ---, β -Caroteno;
 - · - · - , Pigmento "A"; · · · · · , Pigmento "B";
 - - - - - , Fator "uano".

entre éter de petróleo y metanol de 90 o 95%. En cada una de las cepas mutantes, se encontraron los mismos cuatro pigmentos principales que en la cepa original con excepción de los mutantes albinos. Salvo en el mutante II se encontró un pigmento adicional (Pigmento "B") en pequeña cantidad. Probablemente este pigmento se encontraba también en todas las otras cepas, aunque en cantidades tan pequeñas que no se observaron en los análisis cromatográficos.

En ninguno de las cepas se encontró el carotenoide

Tabla 7.

Cantidades aproximadas de polienos contenidos en la ceba original y los 7 mutantes de Rhodotorula rubra.
(En mg. por *100 g. de levaduras secas.

Ceba	Color del cultivo	Toruleno (a)	Pigmento "A" (b)	β -Caroteno	Pigmento "P"	β -Caroteno	Fito flueno	Suma de polienos
Original	Rojo	5.20	0.40	0.74		0.76	0.63	7.73
Original	Rojo	5.20	0.16	0.55		0.71	0.63	7.37
I	(c)	0.13	0.22	0.80		0.34	1.00	2.87
II	(d)	0.30	0.83	2.90	0.30	0.95	0.75	6.38
III	Incoloro	0.02						0.02
IV	Rojo	6.60	0.56	3.10		2.40	1.20	13.86
V	Incoloro							0.00
VI	Rojo	6.00	0.51	2.20		2.00	1.30	12.01
VII	Rojo	6.40	0.44	2.10		1.30	1.10	11.34

a.- basado en la curva de extinción dada por Lederer (29) en la que da un valor para $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 16.0 \times 10^4$ a 484 m μ en hexano.

b.- Calculados como α -caroteno.

c.- Anaranjado pálido.

d.- Anaranjado-café.

de carácter ácido encontrado por Lederer (27) como componente de los pigmentos de la levadura Rhodotorula rubra. Karrer y Rutschmann (20), trabajando con gran cantidad de levaduras Rhodotorula, lograron aislar y cristalizar el pigmento ácido, al que llamaron Torularrodina con una fórmula probable igual a $C_{37}H_{48}O_2$ y que constituía el principal pigmento en sus cultivos.

Todos los pigmentos estudiados se caracterizaron por sus espectros. En el caso del fitoflueno, el comportamiento en la adsorción y la curva de extinción típica, eran con-

clusivos. Con el γ -caroteno y β -caroteno obtenidos de las levaduras, se hicieron cromatogramas mixtos con muestras auténticas obtenidas de otros materiales, no habiéndose encontrado ninguna separación entre ambas muestras.

El Pigmento "A" muestra máximos a longitudes de onda más cortas que el α -caroteno, pero su afinidad de adsorción sobrepasa hasta a la del γ -caroteno. Sus máximos en sulfuro de carbono corresponderían a los del diepóxido del β -caroteno descritos por Karrer y Jucker (17), pero se obtuvo un resultado negativo al tratar de reproducir la reacción que dichos autores dan como característica para el diepóxido del β -caroteno y que consiste en un corrimiento en longitud de onda de los máximos cuando se trata la muestra con cloroformo que contenga ácido clorhídrico.

El pigmento "B", posee un espectro en longitudes de onda excepcionalmente cortas. En sulfuro de carbono los máximos se encuentran en longitudes de onda parecidas a las de la auroxantina descrita por Karrer (454,423 m μ)(14). Sin embargo, la cantidad muy pequeña que de este pigmento se tenía, hizo que no se pudiera identificar este pigmento, no pudiéndose afirmar, por lo tanto, que se tratara de la auroxantina.

Determinación de fitoflueno en la yema de huevo.

La muestra pesada, formada por la yema de 24 huevos se añadió lentamente a 3.5 l. de metanol mientras éste se agitaba fuertemente en un agitador mecánico ("licuador", Warring Blender). La yema se coaguló en forma de grumos finos que per

manecían en suspensión. Se añadió un volumen de éter de petróleo y después de sacudir la mezcla mecánicamente durante unos 20 minutos, se centrifugó en una centrifuga de canasta para separar la parte sólida. Esta se extrajo una vez más en igual forma, quedando el sólido como un polvo completamente blanco. El líquido filtrado, con color intensamente amarillo y con un volumen de aproximadamente 3.5 l. se lavó hasta dejarlo libre de alcohol y se concentró al vacío hasta 100 cc. Esta disolución se sacudió mecánicamente con un volumen igual de potasa alcohólica al 20% durante media hora. Los jabones formados precipitan arrastrando parte de los pigmentos. Se añadió acetona hasta disolver todo el precipitado, quedando una disolución clara. Se añadió agua, dejándola resbalar cuidadosamente por las paredes del embudo de separación. Los jabones vuelven a precipitar, pero esta vez prácticamente incoloros. El precipitado se eliminó y la disolución en éter de petróleo se lavó hasta quedar libre de álcalis. Después de secarla, se evaporó hasta 50 cc., resaponificando en igual forma a la descrita. La disolución resultante se cromatografió.

Determinación de fitoflueno en órganos de animales superiores. Todos los órganos de conejos y gallinas que se estudiaron, se pulverizaron después de congelados en hielo seco y se extrajeron en igual forma a la descrita para las plantas.

La grasa de las gallinas se disolvió en potasa alcohólica caliente, procediendo después a la extracción en la forma usual.

Análisis.

Con las mejores muestras de fitoflueno se llevaron a cabo los análisis. Los que en seguida se reportan, son los que se consideraron más exactos. Casi todos los análisis fueron hechos con muestras independientes que se conservaban al vacío y en la oscuridad hasta el comienzo de los análisis.

Todas las muestras estuvieron libres de cenizas.

Carbono e Hidrógeno. Se determinó siguiendo el micro-método de Pregl (40).

Calculado para $C_{40}H_{64}$: C, 88.15; H, 11.85 .

Encontrado: C, 88.66; H, 12.07%. En una muestra destilada: C, 87.24; H, 12.06%; después de corregir por 0.7% de oxígeno, este último análisis daría los siguientes valores: C, 87.85; H, 12.14%.

Peso molecular. (a) Micrométodo de Rast: 0.291 mg. de sustancia disuelta en 2.539 mg. de exaltona ($k = 21.3^\circ$). $\Delta = 4.7^\circ$; 0.630 mg. en 3.441 mg. $\Delta = 7.7^\circ$; 0.774 mg. en 4.115 mg. $\Delta = 8.0^\circ$. (b) Macrométodo crioscópico: 47.1 mg. de sustancia en 6.121 g. de benceno ($k = 5.1^\circ$); $\Delta = 0.078^\circ$; 104.9 mg. en 6.121 g. $\Delta = 0.175^\circ$.

Calculado para $C_{40}H_{64}$, peso molecular: 544.5

Pesos moleculares encontrados: 520, 506, 501, 503, 500 .

Muestras hidrogenadas: (a) 0.315 mg. en 1.730 mg. de exaltona; $\Delta = 7.6^\circ$; (b) 35.2 mg. en 6.121 g. de benceno: $\Delta = 0.057^\circ$

Pesos moleculares encontrados: 510 y 515 .

Dobles ligaduras. Determinadas en el aparato de Prater y Haagen-Smit (39). 46.27 mg. de sustancia adicionó en presencia de 21.2 mg. de catalizador de óxido de platino y ácido acético glacial, 17.70 cc. de hidrógeno (0° y 760 mm.); 44.5 mg. con 17.3 mg. de óxido de platino adicionaron 12.41 cc. de hidrógeno. Dobles ligaduras encontradas: 6.7 y 6.8 .

Grupos metílicos (28). 15.23 mg. de sustancia requirieron para la neutralización del ácido acético formado, 14.22 cc. de hidróxido de sodio 0.01 N. Después de sustraer el valor obtenido en una prueba en blanco, 13.5 cc.; 17.83 mg. requirieron 15.8 cc. (corregido). Grupos metílicos encontrados: 4.8 y 5.0 .

Coefficientes de extinción de los máximos (subrayados) y mínimos del fitoflueno, determinados en el espectrofotómetro de Beckman.

En Hexano		En Benceno	
μ	$E_{1\text{ cm.}}^{1\%}$	μ	$E_{1\text{ cm.}}^{1\%}$
<u>332</u>	737	<u>338</u>	696
338	667	334	612
<u>343</u>	1210	<u>355</u>	1060
358	610	365	577
<u>367</u>	1130	<u>374</u>	972

Destilación. Una muestra de fitoflueno puro ($E_{1\text{ cm.}}^{1\%} = 1080$) se colocaron en un aparato para destilación al alto vacío. El condensador, enfriado por una mezcla de hielo seco y acetona, se encontraba a 3 mm. de la superficie

del aceite. La presión era aproximadamente de 10^{-4} mm. de mercurio, producida por una bomba Hi-vac y una trompa de mercurio. La muestra se calentó sumergiendo el aparato en un baño de aceite. La temperatura subió lentamente de 140 a 185° en el transcurso de dos horas. Cuando se enfrió todo el sistema se encontró que de los 100 mg. que pesaba la muestra original, 79 se encontraban en el condensador, mostrando un valor de extinción igual a 1047; el residuo (13 mg.) presentó un valor de extinción igual a 359.

Estabilidad de muestras de fitoflueno puro, medida por los valores de extinción a 343 m μ .

<u>Sin disolventes</u>	Extinción en % con relación al material original
Expuesto al aire en película delgada en la oscuridad durante dos horas	18
Lo mismo en luz del día difusa	1.5
Conservado en una corriente lenta de CO ₂ en la oscuridad durante dos horas	92
Lo mismo en luz del día difusa	42

Disuelto en éter de petróleo.

Conservado bajo CO ₂ en la oscuridad por 24 horas	99
Lo mismo sin CO ₂	99
En una botella blanca, bajo CO ₂ iluminado con una lámpara fluorescente Mazda 35000 a 60 cm. durante 7 horas	82
Barboteando aire a través de la disolución 1 h. en luz del día difusa	99
Expuesto al aire en una cápsula plana durante 24 h. (se produce solo evaporación parcial)	16
Hervido a reflujo bajo luz del día difusa durante 30 minutos	100
Conservado sobre hidróxido de potasio en metanol al 20% durante una noche	97

Capacidad de adsorción de los adsorbentes.

Una columna No. 4 cargada con alúmina puede adsorber hasta 200 mg. de fitoflueno. En cambio, en una columna No. 6 cargada con hidróxido de calcio, solamente se pueden adsorber hasta 100 mg.

Isomerización del fitoflueno.

Una disolución de fitoflueno puro se cromatografió en una columna No. 3 (hidróxido de calcio como adsorbente, y éter de petróleo como revelador). Se separaron tres zonas que se analizaron por separado:

Zona 1 , Vol 100 cc., extinción 10.22	54.43%
Zona 2 , " " " " 4.11	21.85
Zona 3 " " " " <u>4.47</u>	<u>23.77</u>
Total 18.80	100.00%

La zona 1 se cromatografió inmediatamente en una columna No. 3 . Se encontraron dos zonas:

Zona 1A, Vol 100 cc., extinción 6.90	95.28%
Zona 1B, " " " " <u>0.34</u>	4.72
	<u>7.24</u>
Pérdida 2.98	29.17%

La zona 2 al recromatografiarla en una columna No. 2.5, dió dos zonas:

Zona 2A, Vol. 100 cc., extinción 2.53	72.60%
Zona 2B, " " " " <u>0.95</u>	27.40
	<u>3.48</u>
Pérdida 0.63	15.27%

La zona 3 también dió dos zonas al recromatografiar

en una columna No. 2.5:

Zona 3A, Vol 100 cc., extinción	0.72	13.75%
Zona 3B, " " " "	<u>3.12</u>	31.25
	3.34	
Pérdida	0.62	13.77%

Al volver a trabajar con una zona homogénea de fitoflueno, esta fué catalizada con yodo, iluminando durante 5 minutos con una lámpara Mazda 3500^o a 60 cm. de distancia. Entonces se cromatografió en una columna No. 2.5, en iguales condiciones que las explicadas. Se observaron tres zonas; la disolución original tenía un valor de extinción igual a 9.43.

Zona I , Vol 100 cc., extinción	2.43	62.5%
Zona II " " " "	1.24	33.3
Zona III " " " "	<u>0.15</u>	3.7
	3.97	
Pérdida	5.45	57.8%

Al cromatografiar cada zona después de catalizar en iguales condiciones, se obtuvo:

Zona IA Vol. 100 cc., extinción	2.40	87.0%
Zona IB " " " "	0.28	10.0
Zona IC " " " "	<u>0.06</u>	3.0
	2.74	

Este experimento dió un valor absurdo.

Zona IIA Vol. 100 cc., extinción	0.36	46.7%
Zona IIB " " " "	0.06	7.8
Zona IIC " " " "	0.27	35.1
Zona IID " " " "	<u>0.68</u>	10.4
	0.77	
-Pérdida	0.57	42.5%

Zona IIIA, Vol 100 cc., extinción	0.02	25.0%
Zona IIIB, " " "	0.02	25.0
Zona IIIC, " " "	<u>0.04</u>	50.0
	0.08	
Pérdida	0.07	46.6%

Como se ve de estos experimentos, fue imposible, con los métodos que se usaron establecer un equilibrio de isomerización como en el caso de los carotenoides. Cada zona se isomerizaba rápidamente pero no daba, sin embargo, un % definido de cada isómero. Además, la destrucción era tan grande en cada experimento que muy pronto fué imposible seguir trabajando debido a la pequeña cantidad de fitoflueno que quedaba.

CONCLUSION.

La estrecha relación entre los carotenos y el fitoflueno, se demuestra no solamente porque se encuentran siempre juntos, sino especialmente, por la estructura isoprénica del fitoflueno, como se demuestra por la presencia de carbonos metílicos y dobles enlaces, y además por dar reacciones positivas los reactivos de los carotenoides (reacción de Carr-Price y coloración con ciertas tierras ácidas). Los pesos moleculares obtenidos, dieron valores entre 500 y 520. El promedio, 505, es solamente 6% más bajo que el peso molecular del β -caroteno. Por lo tanto, actualmente se puede suponer que la molécula de fitoflueno contiene un esqueleto de 40 átomos de carbono.

En los análisis elementales, casi siempre se encontró de 1 a 2 % de oxígeno como resultado de una rápida autooxidación. Sin embargo, en dos casos se encontraron 0.7 y 0.0% de oxígeno. Con los datos encontrados, la mejor fórmula empírica es $C_{40}H_{64}$ ($C_{20}H_{32}$).

Se puede asumir que el hidrocarburo fitoflueno es el primer representante encontrado en la naturaleza, de los polienos C_{40} , en el que el grado de hidrogenación es mayor que en los carotenoides comunes. Por reducción catalítica se encontraron solamente 7 dobles enlaces.

Llama la atención la fuerte afinidad de adsorción del fitoflueno que es solamente un poco menor que la del α -caroteno, coincidiendo con la de algunos de sus estereoisómeros.

isómeros que se adscriben directamente abajo de su forma "todo"-trans (62). Posiblemente las mismas propiedades que hacen al fitoflueno extremadamente sensible al aire y a la luz, sean las responsables de la fuerte adsorción anormal.

Considerando las características de la curva de extinción del fitoflueno, en la que los máximos están localizados a 332, 348 y 367 $m\mu$ (en hexano), es probable que sólomente cinco de las dobles ligaduras se encuentren conjugadas en una cadena abierta. La longitud de onda del principal máximo de extinción (348 $m\mu$) es ligeramente diferente del de la vitamina A₂ que de acuerdo con Karrer y Bretscher (15), muestra un máximo aplanado a 345 $m\mu$ (en alcohol). Para la vitamina A₂, dichos autores asumen una estructura completamente abierta, conteniendo una doble ligadura aislada y cinco conjugadas. Basándose en los espectros, se puede postular la presencia de un sistema conjugado semejante para la molécula del fitoflueno en la cual, sin embargo, se encuentran largas porciones saturadas, en contraste con las vitaminas A₁ y A₂.

El espectro del fitoflueno presenta también cierta analogía con el de la iso-anhidro-vitamina A, cuya estructura no se conoce, que posee tres máximos a 330, 349 y 370 $m\mu$ (43) que da un valor para $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = 1320 a 349 $m\mu$ en alcohol absoluto, o con el de la anhidro-sub-vitamina A (6) que presenta tres máximos a 332, 348 y 367 $m\mu$. Aunque los máximos de este compuesto están situados exactamente en las mismas longitudes de onda que el fitoflueno, difieren en que los máximos

principales están a 332 y 248 μ y tienen casi la misma altura, en contraste con los del fitoflueno, y en que el valor máximo obtenido para $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (a 248 μ) fué de solamente 255. Aunque la curva de la anhidro-vitamina A es muy semejante a la del fitoflueno, se encuentra desplazada hacia longitudes de onda mayores, quedando sus máximos a 351, 371 y 392 μ (5,11,22,42).

Aunque no se determinó si los extremos de la molécula de fitoflueno eran completamente alifáticos (como en el licopeno) o formaban ciclos como en uno de los extremos del α -caroteno, el resultado negativo al ensayarse su acción de Provitamina A, excluye la posibilidad de que existan anillos de β -ionona (como en el β -caroteno).

La formación del fitoflueno en las plantas, está indudablemente conectada con la biosíntesis de los pigmentos carotenóideos y la hipótesis más sencilla consistiría en admitir que este hidrocarburo incoloro constituye un producto intermedio. Esto quiere decir que primeramente se forma un sistema conjugado relativamente corto, el cual no parece estar estabilizado ni por su propia longitud ni por algunos grupos terminales adyacentes. Esta hipótesis estaría de acuerdo con el hecho bien conocido de que durante la maduración del tomate, pimientos, etc. se necesita oxígeno para terminar la síntesis de los carotenoides. Por otra parte, no se puede excluir que el fitoflueno y los pigmentos xanténicos tengan un precursor común; el fitoflueno se podría formar por un proce-

so de hidrogenación simultáneo con la dehidrogenación que produce el desarrollo gradual del color intenso en el tejido.

El que el fitoflueno se sintetiza siguiendo el mismo mecanismo de biosíntesis que para los carotenoides, quedó demostrado al encontrar que en algunas cepas mutantes de la levadura Rhodotorula rubra el mecanismo de biosíntesis de los carotenoides había quedado inhibido siéndolo también el del fitoflueno.

No se pudo aclarar cual es el papel bioquímico del fitoflueno. Como se ha dicho, resultó inactivo en las ratas como compuesto con acción de pro-vitamina A. Pudiera ser que tuviera alguna acción en los animales superiores, ya que se encontró que se podía acumular (aunque con pérdidas considerables), por ejemplo, en la yema de los huevos de gallina. Aunque también se encontró fitoflueno en algunos órganos de los conejos, la cantidad era tan pequeña que no se puede hacer ninguna suposición acerca de su papel probable. Su función en las plantas tal vez esté conectada con la acción de los carotenoides, que se cree que actúan en conjunto con la clorofila en el mecanismo de biosíntesis.

P A R T E I I .

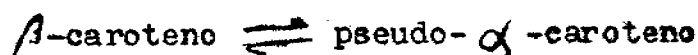
ISOMERIZACION DEL DIFENIL 1,4 BUTADIENO.

INTRODUCCION.

Hasta hace relativamente poco tiempo, se suponía que no era posible que existieran isómeros cis-trans en compuestos en que hubiera sistemas de dobles ligaduras conjugadas. Así, por ejemplo, se encuentra el trabajo de Witting y Wiemer (50) en el que se niega la posibilidad de estereoisomería en los polienos (término que implica una naturaleza alifática y sistemas de dobles ligaduras conjugadas). Sin embargo, por el mismo tiempo Kuhn (23) opinó en una forma contraria, haciendo la siguiente aclaración: "De acuerdo con la evidencia actual, una fuerte acumulación de dobles ligaduras conjugadas, no excluye la posibilidad de isomería cis-trans. El que los diferentes polienos se conozcan solamente en una forma espacial, se debe a la deficiencia de los métodos preparativos".

El primer caso en que se encontró que los polienos sí podían presentarse en diversas formas estereoisoméricas, fue cuando Herzig y Faltis (13) encontraron en 1923 una segunda forma de metil-bixina. Seis años más tarde, Karrer, Helfenstein, Widmer y van Itallie (16) interpretaron esta segunda forma como un rearrreglo cis-trans. Poco más tarde, Gillam y El Ridi (8) encontraron una sustancia que se formaba a partir del β -caroteno, con bandas de absorción diferentes que las de la sustancia madre, a la cual llamaron Pseudo- α -caroteno y que después se aclaró que era un estereoisómero del β -caroteno. Al seguir estudiando este compuesto, Gillam y sus cola-

beradores (9,10) confirmaron que existía una completa reversibilidad en el proceso



dando como explicación de este fenómeno una emigración de dobles ligaduras y una isomerización geométrica, atribuyendo como causa para la formación de este nuevo compuesto, la acción del adsorbente en el que lo separaban siguiendo un método cromatográfico.

En 1937, Zechmeister y Cholnoky (52) observaron que la capsantina, cuando se encontraba disuelta, sufría una isomerización reversible. Al trabajar casi simultáneamente con licopeno, β -caroteno y criptoxantina, Zechmeister y Tuzson (72,73) demostraron que este fenómeno era independiente del proceso de adsorción y que en casos favorables, se podía seguir por medio de mediciones ópticas, sin necesidad de recurrir a la cromatografía (71).

Con el estudio cada vez más intenso de la isomería cis-trans en el campo de los carotenoides, se probó que los polienos podían sufrir estereoisomerizaciones e investigando los agentes que la producían se encontraron cinco métodos distintos para lograrla. Estos son:

1.- Isomerización cis-trans de disoluciones por medios térmicos.

A esta categoría pertenecen la isomerización a temperatura ambiente y por calentamiento o reflujo de disoluciones en ausencia de luz o catalizadores. (46,47,53,54,71,72 etc).

Este método es relativamente lento a temperatura ambiente pero la velocidad de isomerización aumenta con la temperatura. Carter y Gillam (2) encontraron que una disolución de β -caroteno a 20° , se isomeriza en 49 días 11.1%, mientras que a 40° , se produce la misma isomerización en 24 horas, y a 80° se isomeriza en un 34.1% en 24 horas.

2.- Isomerización cis-trans por fusión de cristales.

La sustancia se funde en una ampollita evacuada o conteniendo nitrógeno o bióxido de carbono. Se mantiene fundida de 1 a 5 minutos. Al mismo tiempo que el proceso de isomerización, ocurre un proceso irreversible que a veces es muy considerable. Este último disminuye si se añaden sustancias para abatir el punto de fusión (por ejemplo, naftalina) (36,38,56,62).

3.- Isomerización cis-trans por catálisis con yodo a temperatura ambiente.

Es bien sabido que el yodo es un poderoso catalizador que afecta fuertemente la estructura espacial de los derivados del etileno. Al utilizarse en el campo de los polienos se vió que tenía el mismo efecto, con la característica muy especial, de que siempre se produce un equilibrio casi constante de isómeros aunque se parta de cualquiera de ellos. Esta notable propiedad se utiliza para hacer análisis cuantitativos de isómeros que no cristalizan ya que se puede suponer que las curvas de absorción de las mezclas de isómeros producidos, son constantes.

Las cantidades de yodo que se usan, son del orden de magnitud de 1 a 3% del peso del compuesto por catalizar. El equilibrio se acelera bajo la influencia de la luz y se puede obtener en estas condiciones, en 10 a 20 minutos, dependiendo del compuesto que se esté isomerizando. Sin embargo, en algunos casos como en el prolicopeno (29), se produce una destrucción que llega a veces hasta el 30% y en el fitoflueno (página 47) en el que la destrucción era de más de 40%.

4.- Isomerización cis-trans por catálisis ácida.

La cantidad de isómeros producidos por este medio, depende de las condiciones usadas. Si se emplea una concentración de ácido muy alta, puede ocurrir una destrucción total. Cuando se emplean condiciones moderadas pueden ocurrir cambios estructurales (como la formación de desoxi-luteinas (al fundir luteína con ácido bórico)(66). Pero bajo condiciones aún más suaves, se producen estereoisomerizaciones.

Usualmente este tipo de isomerizaciones se lleva a cabo agitando una disolución en éter de petróleo o benceno con otra acuosa del ácido (37,69).

5.- Isomerización cis-trans fotoquímica .

La luz del sol produce entre otros procesos, una fuerte estereoisomerización. Frecuentemente ocurren reacciones no reversibles, que en general ocasionan la decoloración de la disolución. Cuando se exponen a la luz del sol, por ejemplo, disoluciones de prolicopeno ligeramente amarillas, se ve que primero su color aumenta al formarse, entre otros,

el "todo"-trans-licopeno, demostrándose que se ha producido una estereoisomerización (59). Si el tiempo de insolación se aumenta, entonces la disolución se decolora gradualmente.

Hay que considerar que por la acción de la luz del sol, la temperatura de las disoluciones aumenta y que por lo tanto, se podría también producir una isomerización térmica.

Los isómeros obtenidos con cada uno de estos métodos, no son necesariamente los mismos. Cuando el número de estereoisómeros posibles es muy grande (por ejemplo 20 en el β -caroteno, 32 en el α -caroteno y 72 en el licopeno) solamente dos o tres de los isómeros formados son comunes en todos los métodos.

Se trató de ver si los métodos de isomerización aplicados a los carotenoides, se podían generalizar en otros polienos. Como ejemplo se utilizó el difenil 1,8 octatetraeno (57). En esta serie de polienos $C_6H_5(CH=CH)_n C_6H_5$, solamente se habían obtenido isómeros cuando n era menor que 3 (65) ya que Hengstenberg y Kuhn (12) demostraron por medio de rayos X que todas las preparaciones de Kuhn y Winterstein (26) representaban la forma "todo"-trans en los casos en que n era mayor que 3.

Por medio de rayos X, midiendo las distancias y radios atómicos se había llegado a la conclusión de que en la serie de los difenil-polienos, las dobles ligaduras adyacentes a los núcleos bencénicos, estaban incapacitadas para formar isómeros cis debido a conflictos espaciales que ocasionarían

de 52.5° en los grupos terminales de la molécula. Por este motivo, de las cuatro dobles ligaduras de la cadena alifática solamente dos quedan disponibles para formar estereoisómeros (que serían: una forma trans-trans-trans-trans, otra trans-trans-cis-trans y otra trans-cis-cis-trans).

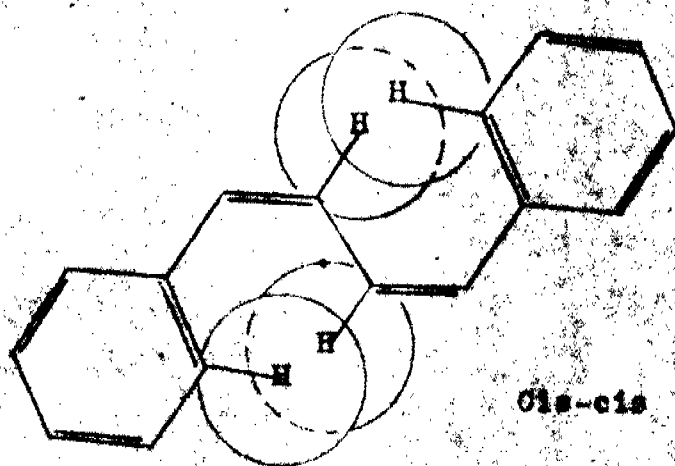
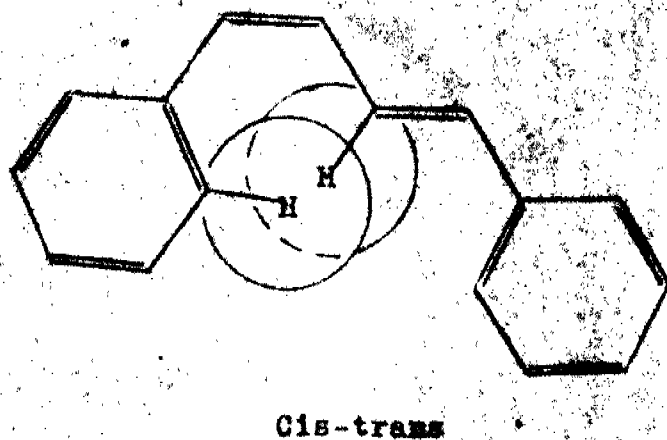
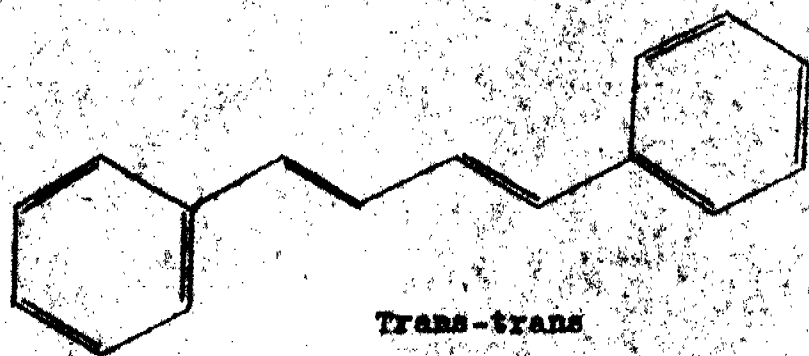
Cuando Zechmeister y LeRosen (57) isomerizaron el difenil 1,8 octatetraeno, encontraron que aplicando todos los métodos de isomerización se observaban tres zonas en los cromatogramas y solamente cuando se hizo la isomerización fotoquímica se observaron además de las tres zonas, trazas de otros dos isómeros que probablemente fueran representantes de los casos en que hay conflictos espaciales.

Con los antecedentes de isomerización actuales (51) se trató de ver si los mismos métodos de isomerización se podían aplicar a un término de la serie mucho más simple, el difenil 1,4 butadieno.

En este caso, por encontrarse dos dobles ligaduras, se pueden presentar tres isómeros: el trans-trans, el trans-cis y el cis-cis. En estos dos últimos se presentan los conflictos estéricos antes mencionados. (Figura 3 página 60). Sin embargo, los tres isómeros fueron obtenidos por medio de diferentes síntesis por Straus (49) quien encontró que los isómeros cis eran sumamente inestables y que tenían gran tendencia a formar el compuesto trans-trans que es el más estable.

La forma trans-trans se sintetizó a partir del aldehído cinámico y ácido fenil-acético. Se obtienen crista-

Modelos de los tres difenil 1,4 butadienos estereoisómeros.



Valores usados: C-C, 1.33 Å.; C-O, 1.46 Å.; C₆H₅-C, 1.44 Å.; C-H, 1.09 Å.; radio de H, 1.20 Å.; ángulos C-C-C y C-C-H, 124°20'. En los modelos cis-trans y cis-cis los círculos marcan los conflictos espaciales entre átomos de hidrógeno.

les ligeramente amarillos, con punto de fusión de 152-152.5°.

La forma trans-cis fué preparada por Straus y confirmada más tarde por Kelber y Schwarz (21) y por Ott y Schröter (24) a partir del difenil 1,4 buten 1 ino 3, por hidrogenación parcial con paladio en carbón animal. Este isómero se encontro en forma de aceite destilable al vacío sin descomposición.

La forma cis-cis fué preparada por los mismos autores reduciendo el difenil 1,4 butadiino en alcohol diluido con polvo de zinc cobrizado. Obtuvieron un producto cristalino con punto de fusión de 69-70° .

ISOMERIZACION.

Todos los trabajos preliminares para estudiar este fenómeno se basaron en las curvas de extinción molecular, empleando disoluciones de trans-trans difenil butadieno en concentración tal que se pudiera medir en el espectrofotómetro sin necesidad de hacer diluciones. Esta concentración es del orden de magnitud de 3 gamas (0.003 mg.) por centímetro cúbico. (42).

Las disoluciones se trataron por los métodos aplicados a los carotenoides, midiendo después de cada tratamiento, el efecto producido en la curva de absorción.

1.- Catálisis con yodo.

El efecto del yodo sobre el compuesto trans-trans fué muy pequeño en comparación con el producido en los carotenoides. Cuando a una disolución de β -caroteno se le añade una cantidad muy pequeña de yodo, la curva de absorción disminuye considerablemente en altura (aproximadamente un 20%) además de que los máximos y mínimos se desplazan en longitud de onda. Al tratar en forma semejante el trans-trans difenil butadieno, la curva espectral disminuyó en altura solamente el 3.5% sin que ocurrieran desplazamientos notables en la longitud de onda de los máximos o mínimos.

2.- Isomerización de disoluciones por medios térmicos.

En contra del comportamiento de las disoluciones

de los carotencoides, las del difenil butadieno no se afectaron absolutamente nada cuando se hirvieron a reflujo en la oscuridad. Se ensayó este tratamiento en éter de petróleo, en benceno y calentando a 100° una disolución en éter de petróleo (p.e. 100-120°). Las curvas espectrofotométricas permanecieron constantes tanto en altura de los máximos y mínimos como en su posición con respecto a las longitudes de onda.

3.- Isomerización por fusión de cristales.

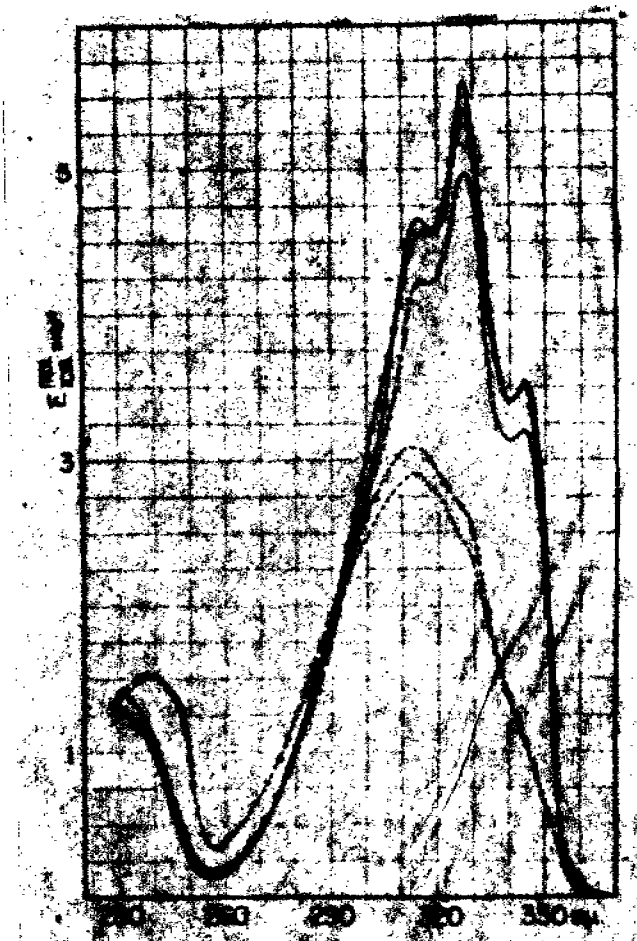
Cuando se fundieron los cristales en ausencia de luz, no se observó ningún cambio en el espectro de absorción aun cuando la temperatura se elevara por encima del punto de fusión y se prolongara el tiempo de calentamiento.

4.- Isomerización por insolación (fotoquímica).

Se sabía desde el trabajo de Straus que los isómeros cis, cuando se exponían a la luz del sol por un período de 14 días, se convertían casi cuantitativamente en el compuesto trans-trans.

Cuando se sometió una disolución del compuesto trans-trans a la acción de la luz del sol por un período de cuatro horas, se encontró que se habían formado productos irreversibles que afectaban la curva espectral en tal forma que no quedaba ninguna de las características originales. Al disminuir el tiempo de insolación se llegó a los siguientes resultados : una insolación de solamente 20 segundos, era suficiente para afectar notablemente la forma de la curva de extinción. Esta acción iba aumentando con el tiempo de inso-

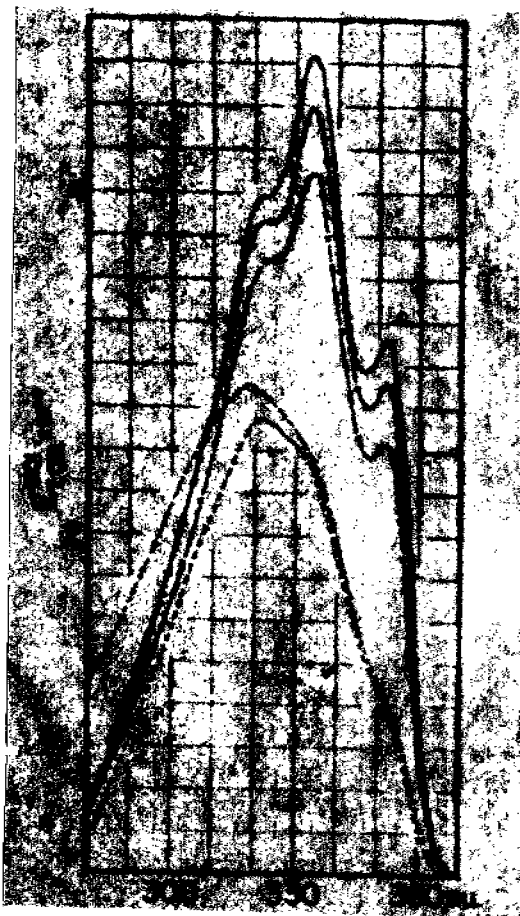
Figura 4.



Curvas de extinción molecular del Difenil 1,4 butadieno en hexano. ———, disolución fresca del compuesto trans-trans. - - - - - , después de 30 minutos en luz del día difusa. - · - · - · , después de catálisis con yodo de las dos disoluciones anteriores. - - - - - , después de 6 minutos de insolación de una disolución fresca del compuesto trans-trans. - x - x - x - , catalizado con yodo después de 6 minutos de insolación.

lación acompañada por reacciones secundarias de carácter irreversible. La insolación óptima era de 5 a 7 minutos. En este tiempo, la curva de extinción disminuía notablemente en altura. Dos de los máximos desaparecían, quedando uno en la re-

Figure 5.



Curvas de extinción del Difenil 1,4 butadieno en bencena.
 —————, disolución fresca del compuesto trans-trans.
 - - - - -, después de 30 minutos en luz del día difusa.
 , después de catalisis con yodo de las dos disolu-
 ciones anteriores. - · - · - , después de 6 minutos de insola-
 ción de una disolución fresca del compuesto trans-trans.
 - · x · - · x · - · , catalizado con yodo después de 6 minutos de insola-
 ción,

gión del ultravioleta mas corto y uno en la región en que an-
 tes se encontraban tres (Figura 4, página 34, y Figura 5)

Cuando el producto obtenido se catalizaba con yodo,
 se regeneraba la curva original, con una pérdida que variaba
 del 9 al 11%. Cuando el tiempo de insolation se prolongaba

la destrucción era cada vez mayor. En 80 minutos, llegaba a ser aproximadamente el 75% (Figura 6, página 67).

5.- Isomerización por acción de la luz del día difusa.

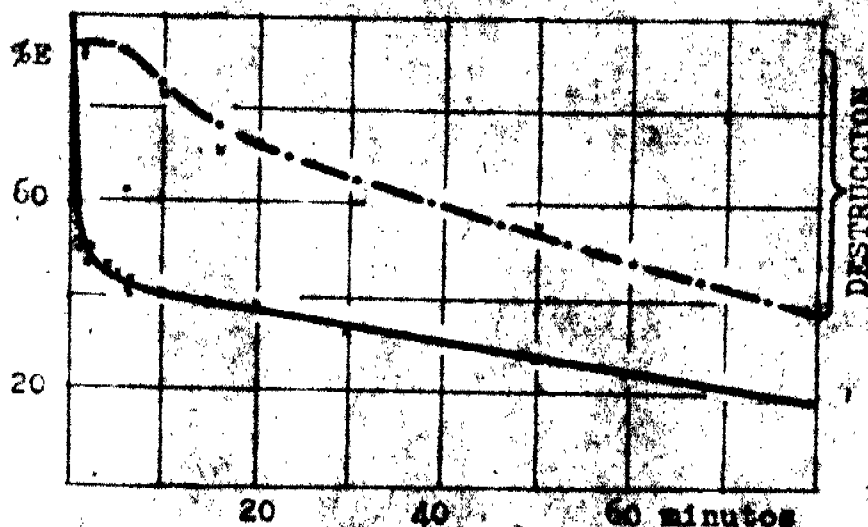
Se encontró que la sensibilidad del difenil butadieno a la acción de la luz era muy grande, no necesitándose exponer las disoluciones a la acción directa de los rayos del sol. Bastaba exponerlas a la luz del día, en la sombra, para que en 30 minutos se obtuviera el mismo efecto que el producido en 6 minutos de insolación. Además, en este caso, por catálisis con yodo, se obtuvo la misma curva que la obtenida tratando con yodo la disolución del compuesto original. Es decir, no ocurrían pérdidas causadas por procesos irreversibles.

Es curioso que habiéndose mostrado el difenil butadieno tan estable térmicamente y bajo la acción del yodo, fuera tan sensible a la acción de la luz. (Figura 4, página 64, Figura 5, página 65 y Figura 7, página 67).

6.- Isomerización producida por luz artificial.

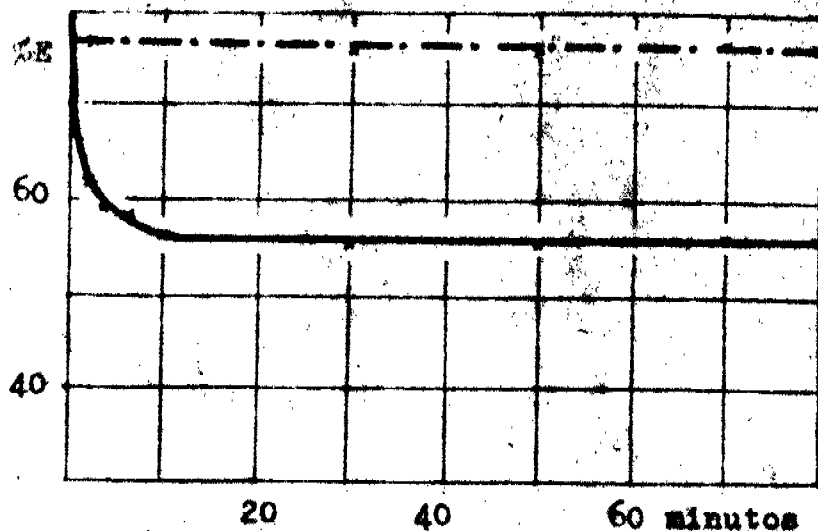
Puesto que la luz del sol y la luz del día habían afectado notablemente la curva de absorción en una forma reversible, era lógico suponer que la luz producida por un filamento de tungsteno, obraría en igual forma. Al iluminar las disoluciones con un foco de 250 W. se observó que se podía seguir el mecanismo de la conversión de la curva de absorción original a la curva producida por la acción de la luz (Figura 8, página 68) . En 50 minutos de iluminación prácticamente

Figura 6.



Acción de la luz del sol en el trans-trans difenil butadieno. ———, disminución en el valor de la extinción en el punto máximo a 328 mμ. (en éter de petróleo), - - - - -, catalizado con yodo despues de insolado. El proceso de destrucción muy pronto ocupa el primer lugar

Figura 7.



Acción de la luz del día difusa en el trans-trans difenil butadieno. ———, disminución en el valor de extinción en el punto máximo a 334 mμ. (en benceno), - - - - -, catalizado con yodo despues de iluminado. No hay destrucción.

Figura 8.



Curvas de extinción molecular del Difenil 1,4 butadieno en benceno. Desaparición gradual de la estructura fina de la curva de absorción en el curso de la iluminación de una disolución del compuesto trans-trans con un foco Mazda de 250 W. a una distancia de 10 cm. La disolución se enfriaba con agua.

—, disolución fresca del compuesto trans-trans.
 ---, después de 5 minutos de iluminación. ---, 10 minutos. - - - - -, 20 minutos. - - - - -, 30 minutos
 - - - - -, 40 minutos. - - - - -, 50 minutos. - - - - -, 390 minutos. ●—●—●—, después de 390 minutos de iluminación, catalizado con yodo. Esta curva tiene la misma altura y forma que la obtenida por catálisis con yodo de una disolución fresca del compuesto trans-trans.

se había llegado a una constancia, que se demuestra por la pequeña variación en la curva de absorción al prolongar la iluminación hasta 390 minutos. Además, no hubo destrucción, como se comprobó al catalizar con yodo,

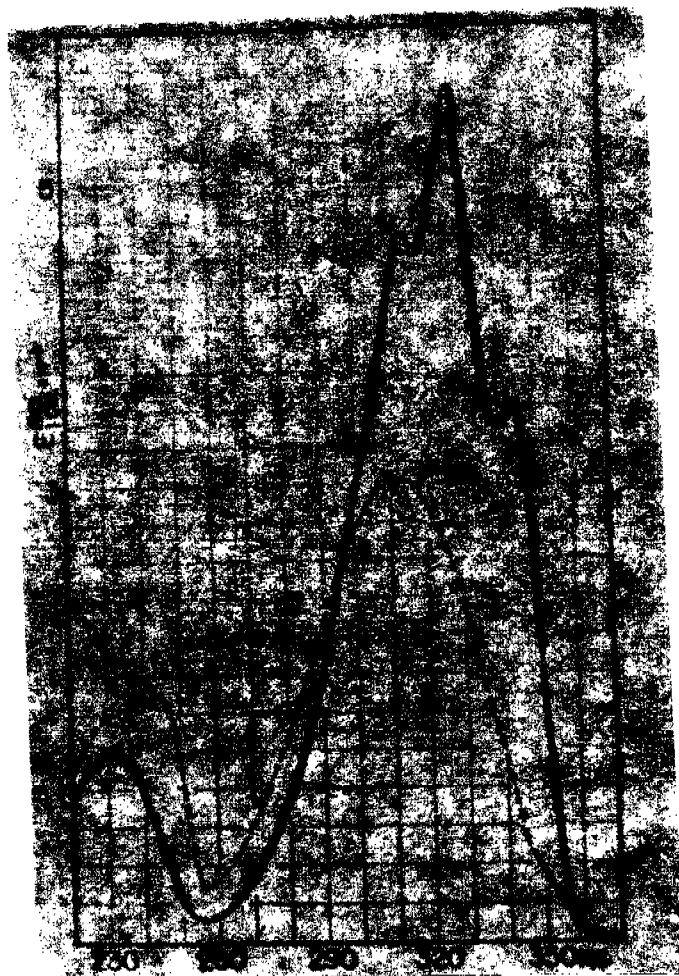
El resultado de estos experimentos, es que en diluciones sumamente grandes, el trans-trans difenil butadieno es muy sensible a la acción de la luz, produciéndose probablemente una isomerización.

Para comprobar que ocurría este fenómeno y para estudiar el nuevo compuesto formado, era necesario producir el mismo efecto en cantidades de aproximadamente 100 miligramos.

Después de varios intentos con resultados negativos, se encontró que iluminando con un filamento de tungstenc sobrecalentado, se podía producir el mismo fenómeno, aún cuando la concentración fuera muy grande (1 mg. por cc.).

En esta forma se iluminó una cantidad apreciable del compuesto trans-trans. Cuando se encontró que la curva de las muestras tomadas periódicamente, se parecía a la obtenida después de la iluminación (Figuras 4 o 5), se suspendió la iluminación y se cromatografió inmediatamente, encontrándose que además de una pequeña cantidad del compuesto trans-trans no alterado (aproximadamente 20%), había una segunda zona no fluorescente que mostraba el espectro con un solo máximo. Esta zona se purificó recromatografiando hasta eliminar completamente el compuesto trans-trans no alterado, determinando la

Figura 9.



Curvas de extinción molecular del Difenil 1,4 butadieno en hexano. ———, disolución fresca del compuesto trans-trans. - - - - -, isómero puro, separado por cromatografía. ·····, isómero puro después de catalizar con yodo.

curva de extinción molecular del isómero. Al catalizar con yodo se obtuvo exactamente la misma curva que la obtenida al catalizar con yodo una disolución del compuesto trans-trans. Estas curvas se encuentran en la Figura 9.

Comportamiento del isómero.

El isómero puro se encontró en forma de un aceite que no se pudo cristalizar. Iluminando con luz ultravioleta al isómero puro o a sus disoluciones, no se observó ninguna fluorescencia. En hexano, el isómero presenta dos máximos de absorción a 238-40 y 313 μ . En benceno, el único máximo que se puede observar, se encuentra situado a 319-20 μ .

Cuando se encuentra disuelto, el isómero es térmicamente estable, lo mismo que cuando se ilumina con luz del día difusa. En ausencia de disolventes, el aceite es estable en presencia del aire, siempre que se le mantenga en la oscuridad. Cuando se expone a la luz del sol por un minuto o a la luz difusa por un tiempo un poco mayor, empiezan a aparecer cristales y en muy poco tiempo, parece que todo el aceite ha cristalizado.

Para estudiar el efecto de la luz en el isómero puro, se iluminaron muestras contenidas en tubos de vidrio evacuados con un foco de 250 W. Se observó que a los 90 segundos aparecieron los primeros cristales. A los 5 minutos parecía que todo el aceite había cristalizado, tomándose entonces la curva de absorción. Otra muestra se iluminó durante 90 minutos exponiendo a la luz toda la superficie. Se tomó la curva espectral. Los resultados obtenidos se encuentran en la figura 10, página 72.

Los cristales obtenidos por iluminación del isómero, se purificaron por cristalizaciones sucesivas. Al determinar

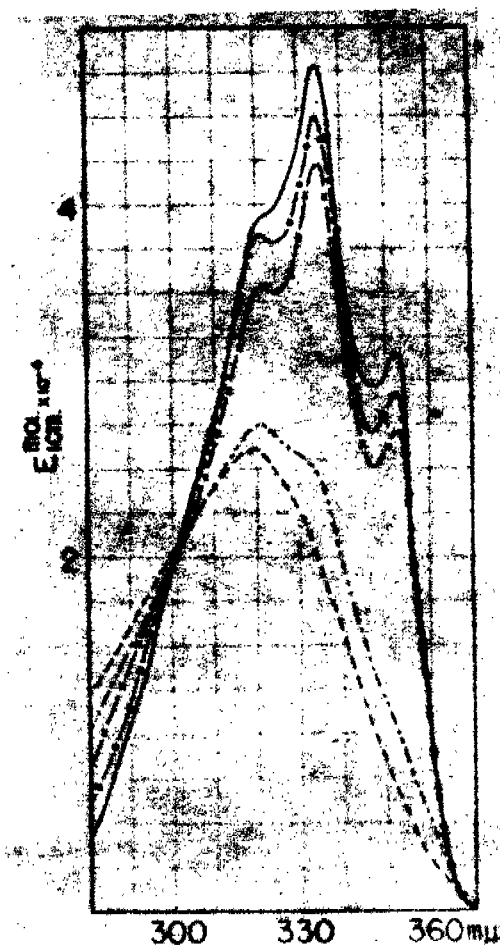
Figura 10.



Curvas de extinción molecular del Difenil 1,4 butadieno en benceno. Comportamiento del isómero cromatográficamente puro al iluminarlo con una lámpara Mazda de 250 W. en ausencia de disolventes. — — —, antes de la iluminación; — · — · — después de 5 minutos; — x — x — después de 90 minutos; — • — • —, catalizado con yodo después de 90 minutos de iluminación; — — — — —, disolución fresca del compuesto trans-trans.

el punto de fusión, se encontró que correspondían al compuesto trans-trans. Al determinar el punto de fusión de una mezcla de estos cristales con los del trans-trans, el punto de fusión permaneció constante.

Figura 10.



Curvas de extinción molecular del Difenil 1,4 butadieno en benceno. Comportamiento del isómero cromatográficamente puro al iluminarlo con una lámpara Mazda de 250 W. en ausencia de disolventes. — — —, antes de la iluminación; — • — — después de 5 minutos; — x — — después de 90 minutos; — • — —, catalizado con yodo después de 90 minutos de iluminación; — Δ — —, disolución fresca del compuesto trans-trans.

el punto de fusión, se encontró que correspondían al compuesto trans-trans. Al determinar el punto de fusión de una mezcla de estos cristales con los del trans-trans, el punto de fusión permaneció constante.

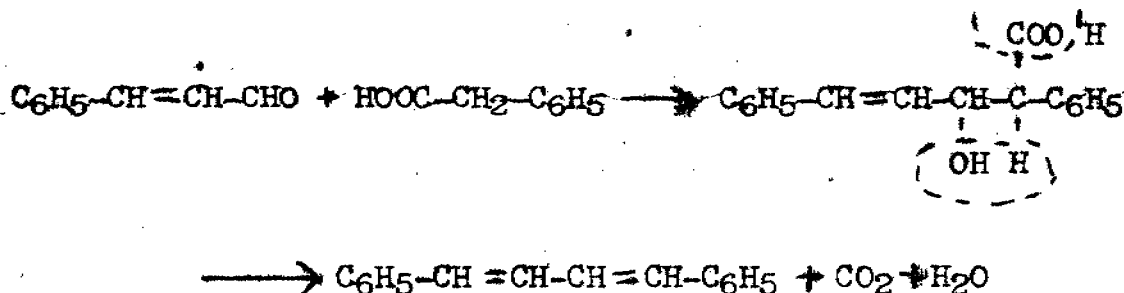
PARTE EXPERIMENTAL.

Adsorbentes y disolventes. Como adsorbentes se utilizaron: Alúmina activada (Alorco, Grado A, 200 mallas) y cuando ésta se agoto, se utilizó alúmina activada (Alorco, Grado F, -80 mallas molida hasta -200). Ambas clases se mezclaron con 20 a 25% de Celite (Johns-Manville).

Como disolventes, éter de petróleo p.e. 60-70° (Skellysolve B), p.e. 28-38° (Skellysolve A), acetona, alcohol etílico y metílico, benceno libre de tiofeno y hexano purificado con ácido sulfúrico fumante.

Trans-trans difenil 1,4, butadieno.

Se preparó de acuerdo con el método de Kuhn y Winterstein (67) a partir de aldehído cinámico y ácido fenil acético en presencia de anhídrido acético y óxido de plomo:



El rendimiento es de 34% del teórico. Con respecto al método de síntesis, Kuhn y Winterstein dicen: " A pesar de varias recristalizaciones de ácido acético y de benceno-alcohol (1:4), la muestra no era completamente incolora. En capas gruesas aparece amarillenta; en capas delgadas el color es sobrepasado por la fluorescencia de color azul-violeta que poseén los cristales".

Puesto que el producto obtenido siguiendo el método de Kuhn y Winterstein tenía iguales características, se modificó la técnica de purificación:

Después de tres recristalizaciones, el producto, en porciones de 1 g. disueltas en 250 cc. de éter de petróleo se cromatografiaron en una columna No. 3 cargada con alúmina, revelando con 1 l. de éter de petróleo con 3% de acetona. En estas condiciones, una zona fluorescente en luz ultravioleta (producida por una lámpara portátil Minerallight Q-31 equipada con dos filtros violetas), emigraba casi hasta la base de la columna. Otras pequeñas zonas fluorescentes, ligeramente amarillas en luz del día, permanecían en la parte alta de la columna y no emigraban durante el revelado. La zona fluorescente se eluyó con acetona. A esta disolución se le añadieron 200 cc. de éter de petróleo y agua hasta transferir toda la sustancia fluorescente a la capa superior. Esta se lavó hasta dejarla libre de acetona y se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo se cristalizó de alcohol metílico. Se obtuvieron así, cristales completamente blancos, en forma de placas hexagonales que funden a 152-3° (corregido, block de Berl). Presentan una fuerte fluorescencia azul en luz reflejada y casi blanca bajo luz ultravioleta. Cuando están disueltos en hexano o éter de petróleo, presentan una fluorescencia azul-blanca en luz ultravioleta. En benceno, la fluorescencia es azul violeta. Cuando se disuelven en acetona o alcohol metílico, no producen ninguna fluorescencia.

Análisis elemental: Calculado para $C_{16}H_{14}$, C, 93.37, H, 6.63 . Encontrado, C, 93.35, H, 7.04% .

No se pudo determinar el peso molecular por ser insoluble en exaltolona o alcanfor. (Kuhn y Winterstein lo determinaron formando el derivado bromado y cuanteadando entonces el bromo).

Isomerización.

Para seguir el proceso de isomerización por el efecto que ésta producía en el espectro de absorción, se hizo uso de un espectrofotómetro fotoeléctrico de Beckman.

Catálisis con yodo. Muestras de aproximadamente 0.075 mg. disueltas en 25 cc (hexano o benceno), se catalizaron con 0.004 mg. de yodo disueltos en el mismo disolvente. (aproximadamente 5% de yodo con respecto al peso de la muestra). La disolución contenida en un matraz volumétrico de 25 cc. se iluminó con una lámpara fluorescente (Mazda, 3500°, longitud de los tubos 120 cm., distancia de la lámpara al matraz, 60 cm.) durante 10 a 20 minutos. Sin embargo, si el tiempo de iluminación se prolongaba hasta 90 minutos, el equilibrio no se afectaba, ya fuera por una isomerización mayor o por procesos secundarios irreversibles.

Insolación. Todas las muestras se exponían a la luz del sol en matraces volumétricos de 10 cc. conteniendo aproximadamente 0.03 mg. Las insolaciones se hicieron por duplicado, teniendo uno de los matraces un poco menos de 10 cc. de disolvente. Después de expuestos, al que estaba ligeramente vacío

se le añadió yodo y se iluminó para determinar el % de destrucción. Una vez insolados, los matraces se guardaron en la oscuridad hasta el momento de analizarlos espectrofotométricamente. Los tiempos de insolación variaron desde 10 segundos hasta 80 minutos. El % de destrucción se calculó por la relación de la extinción después de insolado y catalizado con yodo, con la extinción que se obtenía de una muestra fresca del compuesto trans-trans después de catalizada con yodo. Haciendo la tabla de estas relaciones se tiene:

Extinción a 328 μ (en hexano) después de catálisis con yodo

Tiempo de insolación (min)	0	1/3	2/3	1	5	6	35	80
% de extinción a 328 μ :	100	100	98	95	91	87	71	33

Durante el tiempo de insolación de 1 segundo a 6 minutos, el cambio en la curva de absorción consiste en la desaparición gradual, primero, del máximo localizado a 344 μ y luego el localizado a 328 μ . Al mismo tiempo, la altura del máximo que queda, a 320 μ disminuye. Junto con estos cambios va ocurriendo una destrucción que al final de los 6 minutos, es de 13%. Después de 6 minutos, la curva no se afecta en forma, pero disminuye más en altura a consecuencia de la destrucción creciente. En 80 minutos, ésta llega a representar el 67%.

Isomerización producida por luz difusa. Las muestras contenidas en matraces volumétricos de 25 cc. se dejaron estar en el dintel de una ventana sin sol directo. De tiempo en tiempo se tomaban muestras de los matraces y se analizaban antes

y después de catalizar con yodo. La velocidad de isomerización no se afectaba cuando el cielo estaba nublado, obteniéndose casi los mismos resultados que cuando estaba perfectamente claro.

Isomerización producida por luz artificial. Se empleó un foco G.E. Mazda (vidrio translúcido) de 250 W. La muestra contenida en un matraz volumétrico de 100 cc. se encontraba a 10 cm. de distancia. Para evitar el calentamiento de la disolución causada por la irradiación del foco, el matraz se enfriaba con una película de agua fría que circulaba constantemente por las paredes del matraz. Se tomaron muestras de vez en cuando y se analizaron en la forma descrita.

Isomerización de disoluciones concentradas. Al tratar de isomerizar una disolución de 20 mg. en 100 cc. utilizando el mismo foco de 250 W. se vió que en 40 horas de iluminación se producía menos de la mitad de la isomerización esperada. Esto quería decir que la fuente de luz no era suficientemente fuerte. Se utilizó entonces una lámpara con filamento de tungsteno sobrecalentado (Lámpara para proyección G.E. Mazda, de vidrio claro, de 250 W.) encontrando que en muy corto tiempo se producía el efecto deseado. Hay el inconveniente de que estas lámparas producen una irradiación muy fuerte que hace hervir a los disolventes. Para evitar el calentamiento de las disoluciones, la lámpara se colocó dentro de un tubo de vidrio Pyrex de 80 x 270 mm. sujetándola con un tapón de corcho que tenía una entrada para agua. En el otro extremo se

colocó otro tapón con una salida y se hizo circular agua por dentro del tubo. Este procedimiento eliminó la mayor parte de la irradiación. Alrededor del tubo se colocaron 6 matraces de 100 cc. conteniendo cada uno 75 mg. de difenil butadieno, disueltos en éter de petróleo. Todo el conjunto se cubrió con una campana de vidrio dentro de la cual se hizo pasar una corriente de aire. Para controlar el experimento se iban tomando muestras (cada vez de un matraz distinto) continuando la iluminación hasta que se encontró que la curva espectral no contenía mas que un máximo, semejándose a las curvas obtenidas por iluminación de muestras muy diluídas. El tiempo necesario fué 24 horas de iluminación continua.

Se suspendió entonces la iluminación y el contenido de los 6 matraces se mezcló, evaporando el disolvente en la oscuridad bajo presión reducida. Quedó un residuo parcialmente cristalino que se disolvió en 10 cc. de éter de petróleo y se cromatografió en una columna No. 4 cargada con alúmina activada, revelando con éter de petróleo. Al inspeccionar el cromatograma con luz ultravioleta, se observaron las siguientes zona:

- 1 mm. intensamente fluorescente (azul); contaminante
- 2 mm. varias zonas angostas fluorescentes (amarillas contaminantes)
- 25 mm. interzona vacía, ligeramente fluorescente
- 28 mm. fluorescente (azul); compuesto trans-trans no alterado
- 22 mm. interzona vacía, ligeramente fluorescente
- 110 mm. no fluorescente; isómero
- 62 mm. interzona vacía ligeramente fluorescente.

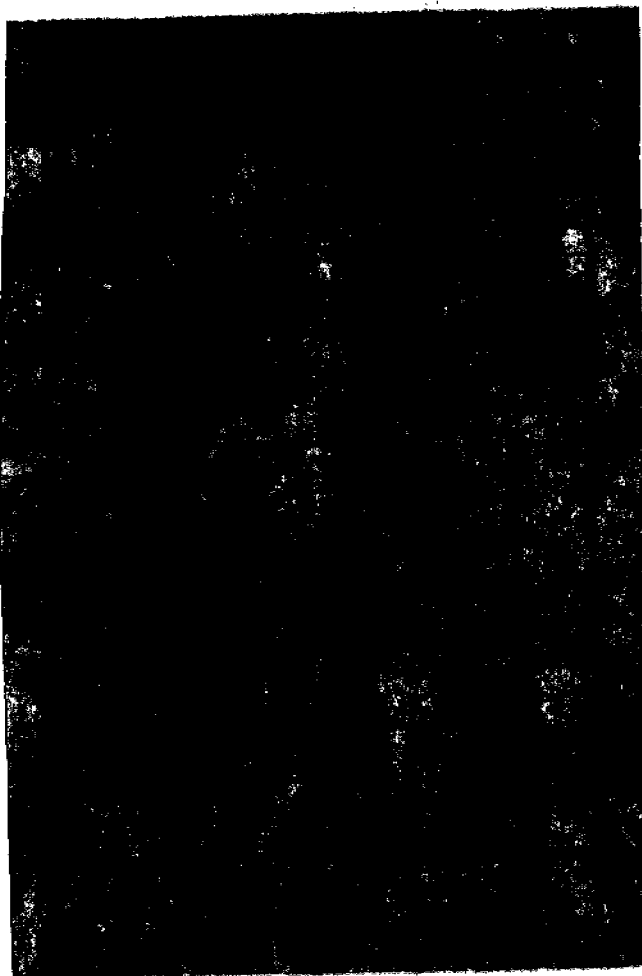
Debido a que la alúmina presentaba una ligera fluo-

rescencia y ésta desapareció en la región en que se encontraba adsorbido el isómero, esta zona, no fluorescente e incolora, era fácilmente localizada, ya que aparecía como una zona "negra".

Las dos zonas principales se eluyeron por separado determinando la concentración de cada una de ellas por medio de catálisis con yodo. Quedó un 16% del compuesto trans-trans inalterado. El resto fué el isómero. Hubo un 10% de pérdida que probablemente se debió a cierta destrucción provocada por la lámpara de proyección.

Cuando la relación isómero-sustancia no alterada se determinó, la disolución del isómero se recromatografió hasta obtener una zona homogénea, separando pequeñas porciones del compuesto trans-trans que se encontraban como impureza. La zona homogénea del isómero se eluyó, se transfirió a éter de petróleo y se evaporó a sequedad. El residuo fué un aceite no fluorescente. Pesando una pequeña cantidad de éste, se determinó la curva de extinción molecular. Al determinar la curva correspondiente al equilibrio de isómeros producido por catálisis con yodo, se encontró que era exactamente igual al obtenido a partir del compuesto trans-trans, comprobándose que, como en el caso de los carotenoides, el yodo producía un equilibrio constante de isómeros, aunque se partiera de cualquiera de ellos. Debido a esta constancia, se comprobó que los análisis basados en las curvas obtenidas después de catalizar con yodo, eran correctos.

Figura 11



Curvas de extinción molecular del Difenil 1,4 butadieno en hexano. Mezclas artificiales del isómero y del compuesto trans-trans (ambos cromatográficamente homogéneos). Los números indican el % de isómero contenido en la mezcla.

—————, 0%; - - - - -, 20%; - - - - -, 50%; —●—●—●—, 80%;
 -x-x-x-, 90%; -*-*-*-, 100%.

Para facilitar el diagnóstico de las curvas obtenidas, se hicieron mezclas artificiales del compuesto trans-trans y del isómero. Estas curvas se dan en la Figura 11.

Figura 11.



Curvas de extinción molecular del Difencil 1,4 butadieno en hexano. Mezclas artificiales del isómero y del compuesto trans-trans (ambos cromatográficamente homogéneos). Los números indican el % de isómero contenido en la mezcla.

—, 0%; - - - - , 20%; - · - · - · , 50%; —●—●—● , 80%;
 —x—x— , 90%; —*—*— , 100%.

Para facilitar el diagnóstico de las curvas obtenidas, se hicieron mezclas artificiales del compuesto trans-trans y del isómero. Estas curvas se dan en la Figura 11,

Comportamiento del isómero. Se trató de hacer cristalizar el aceite con resultados negativos a pesar de haberse empleado numerosos disolventes y temperaturas que variaban desde 20° hasta -80°C. A esta última temperatura el aceite solidificó dando una masa vítrea en la que no se observó ninguna estructura cristalina.

Expuesto a la luz del sol empieza a cristalizar. Si se observa entonces en luz ultravioleta, se puede ver que los cristales fluorescen.

Para estudiar este nuevo fenómeno de reisolomerización muestras de aproximadamente 50 mg. contenidas en tubos de vidrio Pyrex, cerrados al vacío, se iluminaron con un foco Mazda de 250 W. colocado a una distancia de 10 cm. de la muestra. Estas se enfriaron durante la iluminación con una película de agua que pasaba sobre la superficie del tubo. Los cristales formados al poco tiempo de haber iniciado la iluminación se purificaron dando el punto de fusión del isómero trans-trans. Cuando se cromatografiaron mezclados con el compuesto trans-trans original, se obtuvo una zona homogénea. Por lo tanto, el isómero, por iluminación, se reisolomeriza dando el producto original.

Los coeficientes de extinción molecular de los máximos y mínimos del compuesto trans-trans y del isómero, se dan en la Tabla 8 (página 82).

Tabla 8.

Coefficientes de extinción molecular de los difenil butadienos en los máximos (subrayados) y mínimos.

Forma trans-trans		Isómero, cromatográficamente homogéneo	Mezcla de estereoisómeros obtenida por catálisis con yodo		
mp	$E_{1\text{ cm.}}^{\text{mol.}} \times 10^{-4}$	mp	$E_{1\text{ cm.}}^{\text{mol.}} \times 10^{-4}$	mp	$E_{1\text{ cm.}}^{\text{mol.}} \times 10^{-4}$
<u>En Hexano.</u>					
<u>344</u>	3.53			<u>344</u>	3.49
340	3.41			340	3.40
<u>328</u>	5.61			<u>328</u>	5.40
318	4.58			317	4.53
<u>314-5</u>	4.65	<u>313</u>	3.04	<u>315-6</u>	4.55
256-7	0.15	256	0.36	255	0.16
<u>230-1</u>	1.26	<u>238-40</u>	1.72	<u>230-1</u>	1.39
<u>En Benceno.</u>					
<u>352</u>	3.15			<u>352</u>	2.89
348	2.98			348	2.76
<u>334</u>	4.79			<u>334</u>	4.49
		<u>319-20</u>	2.61		

CONCLUSIONES.

El trans-trans difenil 1,4 butadieno, por acción de la luz, se isomeriza en un 80% cuando se encuentra en disoluciones muy diluidas. Por catálisis con yodo, la isomerización, en contra de lo que ocurre en los carotenoides, llega a ser solamente de un 10% como se puede ver por comparación con la figura 11, página 80.

Por cromatografía se observó solamente un isómero. Probablemente éste es el isómero cis-trans. Los argumentos para hacer esta suposición son los siguientes:

1o.- Es el isómero más fácil de obtener, ya que solamente uno de los extremos de la molécula se encuentra bajo tensión causada por los conflictos espaciales entre dos átomos de hidrógeno, que hacen girar el grupo bencénico 52.5° en el espacio, dejando la molécula de ser coplanar. En el caso del isómero cis-cis, la tensión a que está sujeta la molécula es el doble que la del cis-trans.

2o.- Si se compara la curva de absorción del isómero con las de un carotenoide que poseé varias dobles ligaduras cis, se ve que los datos obtenidos concuerdan en los siguientes puntos:

a.- El pró-licopeno, en el que se supone que 6 de las 13 dobles ligaduras se encuentran en la forma cis, poseé una curva en la que el máximo principal está localizado en la misma longitud de onda en que está colocado un máximo secun-

dario de la curva del "todo"-trans-licopeno. Igual que en el caso de nuestro isómero, los dos máximos colocados en las longitudes de onda mayores, han desaparecido. El valor de extinción molecular en el punto máximo, baja de 18.6×10^4 que posee el "todo"-trans-licopeno, a 10.2×10^4 . Considerando estos datos en %, se tiene que al encontrarse 46.1% de los dobles enlaces en la forma cis, el valor de la extinción molecular baja en un 46.2% (58).

b.- En el caso del "todo"-cis-licopeno, se supone que 7 de las 13 dobles ligaduras se encuentran en forma cis. El máximo característico de su curva, se encuentra ligeramente corrido hacia longitudes de onda más cortas que el del proli-copeno. Como en el caso de éste, sólo queda un máximo donde había tres para la forma "todo"-trans, 53.8% de los dobles enlaces se encuentran en forma cis. La disminución en el valor de la extinción es de 53.3%.

c.- La curva del isómero obtenido del trans-trans difenil butadieno, presenta mucha analogía a las curvas de los compuestos antes mencionados. Si se supone que este isómero es el cis-trans, 50% de los dobles enlaces se encuentran en forma cis. La disminución en el valor de extinción es de 3.04×10^4 que en comparación con el del trans-trans cuyo valor es de 5.61×10^4 , ha disminuido en un 45.9%, valor muy semejante al producido en el caso de los isómeros cis del licopeno.

En investigaciones recientes Zechmeister y Pinckard (60) encontraron un tercer poli-cis-licopeno, con una curva

de absorción aún menor que la de los dos casos antes citados. Como se ha llegado a la conclusión por cálculos de distancias y volúmenes atómicos de que solamente 7 de las 13 dobles ligaduras del licopeno, pueden formar isómeros cis-trans (35) debido a conflictos espaciales, puede ser que este último posea las siete dobles ligaduras en forma cis y por lo tanto, que el isómero designado actualmente como "todo"-cis, tenga solamente 6. Si esto es así, los datos obtenidos con el difenil butadieno corresponden exactamente a los de un isómero del licopeno en el que 46.1% de las dobles ligaduras se encuentran en forma cis.

Puesto que actualmente no se encuentran curvas de extinción de los isómeros cis-cis y cis-trans del difenil butadieno, el esclarecimiento completo de si el isómero obtenido es el cis-trans o el cis-cis, no se podrá hacer sino hasta que siguiendo los métodos de Straus se sinteticen ambos isómeros y se determinen sus curvas de absorción.

En cuanto al mecanismo de la producción del isómero partiendo del trans-trans por iluminación, se puede suponer lo siguiente:

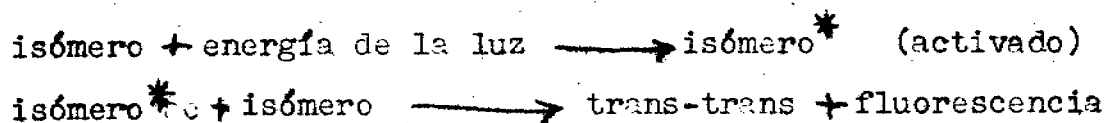
Trans-trans + energía de la luz \longrightarrow fluorescencia + isómero.

Esta reacción está mas o menos de acuerdo con las teorías de Perrin (35 a) que supone que cuando hay fluorescencia el compuesto se está destruyendo.

Es mucho más difícil de explicar el porqué cuando se ilumina el isómero, se regenera la forma trans-trans con

un rendimiento de más del 80%,

En forma provisional, se puede asumir que este fenómeno ocurre en la siguiente forma:



Estas ecuaciones explicarían varios de los hechos que se encontraron: La cantidad de energía suministrada por la luz es muy grande cuando se trabaja con disoluciones muy diluidas, siendo natural que la reacción vaya en un sentido hasta formar más del 80% del isómero. Además explicaría el porqué las disoluciones del isómero son estables cuando se exponen a la acción de la luz difusa. Cuando la concentración del producto original se aumentó, fué necesario aumentar la fuente de energía para competir con la reacción reversible.

Finalmente, en el caso del aceite, al iluminarlo en ausencia de disolventes, hay una gran posibilidad de que ocurra la reacción representada por la tercera ecuación y como el compuesto trans-trans cristaliza inmediatamente, ocurre una reacción semejante a la de una precipitación, desplazándose la reacción casi totalmente en ese sentido.

Solamente las investigaciones posteriores aclararán cual es el verdadero mecanismo de estas reacciones.

Agradecimientos.

Se agradece a las siguientes personas la cooperación que prestaron colaborando en el desarrollo de los presentes trabajos:

A la Dra. G. Oppenheimer y al Sr. Swinehart por los microanálisis. Al Dr. H.J. Deuel Jr. de la Universidad del Sur de California, por los ensayos en ratas y conejos. Al Dr. J. Bonner y al Sr. Y.W. Tang por los cultivos de levaduras y obtención de las cepas mutantes de Rhodotorula rubra. Al Dr. C. B. van Niel que proporcionó los cultivos de bacterias y hongos. Finalmente al Sr. W. Hertrich y al Sr. M. Gschwind que pusieron a nuestra disposición el Jardín Botánico Huntington para obtener las muestras de flores, frutos y plantas.

Se agradece también la cooperación de las siguientes instituciones por su ayuda financiera:

Institute of International Education

California Institute of Technology

Comisión Impulsora y Coordinadora de la Investigación científica.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) .- J. Bonner, A. Sandoval, Y.W. Tang y L. Zechmeister
Arch. Biochem. 10, 113 (1946)
- (2) .- G.R. Carter y A.F. Gillam, Biochem. J. 33, 1325 (1939)
- (3) .- H.H. Cary y A.O. Beckman, J. Optical Soc. Am. 31, 682 (1941)
- (4) .- H.B. Devlin y H.A. Mattill, J. Biol. Chem. 146, 123 (1942)
- (5) .- J.R. Edisbury, A.E. Gillam, I.M. Heilbron y R.A. Morton
Biochem. J. 26, 1164 (1932)
- (6) .- N.D. Embree y E.M. Schantz, J. Am. Chem. Soc. 65, 906 (1943)
- (7) .- A. Emmerie y C. Engel, Rec. trav. chim. 58, 283 (1939)
- (8) .- A.E. Gillam y M.S. El Ridi, Biochem. J. 30, 1735 (1936)
- (9) .- A. E. Gillam y M.S. El Ridi, Nature 136, 914 (1935)
- (10) .- A.E. Gillam, M.S. El Ridi y S.K. Kon, Biochem. J. 31
1605 (1937)
- (11) .- E.G.E. Hawkins y R.F. Hunter, Biochem J, 38, 34 (1944)
- (12) .- J. Hengstenberg y R. Kuhn, Z. Krystall. Miner, 75, 301
(1930)
- (13) .- J. Herzig y F. Faltis, Ann. 431, 40 (1923)
- (14) .- P. Karrer, Vierteljahrsschr. Naturforsch. Ges. Zurich, 90,
1, (1945)
- (15) .- P. Karrer y E. Bretscher, Helv. Chim. Acta, 26, 1758 (1943)
- (16) .- P. Karrer, A. Helfenstein, R. Widmer y Th.B. van Ita-
llie, Helv. Chim. Acta, 12, 741 (1929)
- (17) .- P. Karrer y E. Jucker, Helv. Chim. Acta, 28, 300, 427
(1945)
- (18) .- P. Karrer y E. Jucker, Helv. Chim. Acta, 28, 717 (1945)
- (19) .- P. Karrer y R. Morf, Helv. Chim. Acta, 14, 1033 (1931)
- (20) .- p. Karrer y j. Rutschmann, Helv. Chim. Acta, 26, 2109 (1943)
, 28, 795 (1945)
- (21) .- C. Kelber y A. Schwarz, Ber. 45, 1946 (1912)

- (22).- H.R. Kreider, Science, 101, 377 (1945)
- (23).- R. Kuhn, "Stereochemie" de Freudenberg, F. Deuticke, Viena, 1933, página 915
- (24).- R. Kuhn y H. Brockmann, Z. physiol.Chem, 213, 1, (1932)
- (25).- R. Kuhn y H. Roth, Ber. 66, 1274 (1933)
- (26).- R. Kuhn y A. Winterstein, Helv. Chim. Acta, 11, 87 (1928)
- (27).- E. Lederer, Tesis, Paris (1938). Compt. rend. 197, 1694 (1933)
- (28).- A. L. LeRosen, Ind.Eng.Chem.Anal.Ed. 14, 165 (1942)
- (29).- A.L. LeRosen y L. Zechmeister, J.Am.Chem.Soc. 64, 1075 (1942)
- (30).- A. Lowmann, Science, 101, 183 (1945)
- (31).- G.G. Mayer y H. Sobotka, J.Biol.Chem. 143, 695 (1942)
Science, 102, 158 (1945)
- (32).- P. Meunier, Compt.rend. 215, 470 (1942)
- (33).- P. Meunier, R. Dalou y A. Vinet, Bull,soc,chim,biol. 25, 371 (1943)
- (34).- E. Ott y R. Schröter, Ber. 60, 624 (1927)
- (35).- L. Pauling, Fortschr.Chem,organ.Naturstoffe, 3,203 (1939)
- (35a).-J. Perrin, Ann,phys. 10,133 (1918)
- (36).- A. Polgár y L. Zechmeister, J. Am. Chem. Soc. 64, 1856 (1942)
- (37).- A. Polgár y L. Zechmesiter, J.Am.Chem.Soc. 65,1528 (1943)
- (38).- A. Polgár y L. Zechmeister, J.Am.Chem.Soc. 66, 186 (1944)
- (39).- A.N. Prater y A.J. Haagen-Smit, Ind,Eng,Chem,Anal.Ed. 12, 704 (1940)
- (40).- F. Pregl y J. Grant, Quantitative Organic Microanalysis 1946, página 33

- (41).- A. Sandoval, E.R. Meserve, H.J. Deuel y L. Zechmeister
Arch. Biochem. 11, 373 (1946)
- (42).- A. Sandoval y L. Zechmeister, J. Am. Chem. Soc. en prensa
- (43).- E.M. Shantz, J.D. Cawley y N.D. Embree, J. Am. Chem. Soc.
65, 901 (1943)
- (44).- J.H.C. Smith, J. Biol. Chem. 90, 597 (1931)
- (45).- H.H. Strain, Leaf Xanthophylls, Carnegie Inst. of Wa-
shington, No. 490, 1938, páginas 41 y 123
- (46).- H.H. Strain, J. Biol. Chem. 123, 425 (1937)
- (47).- H.H. Strain, J. Biol. Chem. 127, 191 (1939)
- (48).- H.H. Strain, Nature, 137, 946 (1936)
- (49).- F. Straus, Ann. 342, 190 (1905)
- (50).- G. Witting y W. Wiemer, Ann. 483, 144 (1930)
- (51).- L. Zechmeister, Chem. Rev. 34, 267 (1944)
- (52).- L. Zechmeister y L. Cholnoky, Ann. 530, 291 (1937)
- (53).- L. Zechmeister, L. Cholnoky y A. Polgár, Ber. 72, 1678
(1939)
- (54).- L. Zechmeister, L. Cholnoky y A. Polgár, Ber. 72, 2039
(1939)
- (55).- L. Zechmeister y F. Haxo, Arch. Biochem. 11, 539 (1946)
- (56).- L. Zechmeister y R.M. Lemmon, J. Am. Chem. Soc. 66, 317
(1944)
- (57).- L. Zechmeister y A.L. LeRosen, J. Am. Chem. Soc. 64, 2755
(1942)
- (58).- L. Zechmeister, A.L. LeRosen, W.A. Schroeder, A. Polgár
y L. Pauling, J. Am. Chem. Soc. 65, 1940 (1943)
- (59).- L. Zechmeister, A.L. LeRosen, W.A. Schroeder, A. Polgár
y L. Pauling, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 27, 468 (1941)
- (60).- L. Zechmeister y J.H. Pinckard, J. Am. Chem. Soc. en prensa
- (61).- L. Zechmeister y A. Polgár, Science 100, 317 (1944)

- (62).- L. Zechmeister y A. Polgár, J. Am. Chem. Soc. 66, 137
(1944)
- (63).- L. Zechmeister y A. Sandoval, Arch. Biochem. 8, 425
(1945)
- (64).- L. Zechmeister y A. Sandoval, J. Am. Chem. Soc. 68, 197
(1946)
- (65).- L. Zechmeister y A. Sandoval, Science, 101, 585 (1945)
- (66).- L. Zechmeister y J. W. Sease, J. Am. Chem. Soc. 65, 1951 (1943)
- (67).- L. Zechmeister y J. W. Sease, J. Am. Chem. Soc. en prensa
- (68).- L. Zechmeister y J. W. Sease, J. Am. Chem. Soc. en prensa
- (69).- L. Zechmeister y W. A. Schroeder, J. Am. Chem. Soc. 64, 1173
(1942)
- (70).- L. Zechmeister y W. A. Schroeder, J. Biol. Chem. 144, 315
(1942)
- (71).- m. L. Zechmeister y P. Tuzson, Ber. 1340 (1939)
- (72).- L. Zechmeister y P. Tuzson, Biochem. J. 32, 1305 (1938)
- (73).- L. Zechmeister y P. Tuzson, Nature, 141, 259 (1938)