

## Acerca de la dismutación del metil y fenilglioxal por la enzima de las hojas verdes. Experiencias con hojas de tilo.

POR

C. PI-SUÑER BAYO

La dismutación de substancias de naturaleza aldehídica por materiales del reino vegetal se llevó a cabo primeramente con levaduras. Su proceso básico de óxido-reducción ha adquirido especial importancia para la comprensión del tercer esquema fermentativo.

Inicialmente se origina una descomposición de la molécula de azúcar, en acetaldehido más anhídrido carbónico (eslabón oxidativo), y glicerina (eslabón de reducción), produciéndose en seguida un segundo proceso de óxido-reducción, que conduce a la estabilización del acetaldehido, que pasa por dismutación a ácido acético y alcohol etílico (C. Neuberg y J. Hirsch).

Pertenece al mismo tipo de dismutación la que tiene lugar, no entre dos moléculas sencillas de aldehido, sino intramolecularmente, en una sola de aldehido cetónico. Como substratos para estas experiencias se han usado generalmente el metil y el fenilglioxal. Puede considerarse como demostrado que todas las células, sea cualquiera su clase, provistas de un sistema desmolísico análogo a la zimasa alcohólica o a la láctica, producen la dismutación del metil y fenilglioxal. Y como un complejo enzimásico de esta índole es, en general, inmanente a todas las células, se ha observado este proceso de óxido-reducción — que en muchos casos representa el final de la glucólisis (1) — en todas aquellas células, animales o vegetales con que se ha experimentado.

Es digno de atención el hecho de que las plantas que ocupan lugares elevados en la escala vegetal presentan, a su vez, este enzima de la dismutación en diversas partes de su organismo. Fué comprobado de un modo cierto, en primer lugar, en las semillas (guisantes, alubias, altramuces y cereales) (2); observándose luego en las hojas verdes (tabaco de Corrientes y de Latakia) (3).

Ahora bien, no siempre se observa una acumulación de lactato en las partes verdes de los vegetales, pero sí la capacidad de producir ácido láctico a partir del metilglioxal, capacidad que parece concedida a todos los seres vivientes. No debemos, pues, considerar este fenómeno como un hecho casual; la circunstancia de que el ácido láctico sólo sea acumulado raramente puede ser debida a las más diversas causas; tales como su ulterior consumo, la síntesis de las resinas y otras muchas. Asimismo las relaciones y semejanzas de metabolismo en distintas células nos muestran en todas ellas un mecanismo idéntico en la descomposición de los glúcidos, o por lo menos en su disposición (4).

El aislamiento de metilglioxal, logrado incluso en los vegetales superiores, es una prueba más a esta afirmación.

Las experiencias de C. Neuberg y M. Kobel (5) han indicado que la dismutación de los aldehidos sencillos y la de los cetónicos no presentan tan sólo analogías de forma, sino también cinéticas; sin que, a pesar de ello, pueda pretenderse hoy día considerar ambos procesos en un todo idénticos.

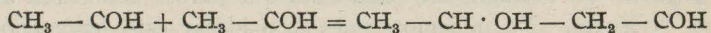
Además, la observación de la dismutación en aldehidos cetónicos presenta una ventaja sobre la efectuada con aldehidos sencillos (sin átomo de carbono asimétrico), consistente en que con los primeros, la dismutación es *estereoquímicamente dirigida*, originando un *proceso asimétrico unilateral*. Este hecho fué ya observado por Neuberg en 1913, viendo que con la levadura obtenía un ácido láctico inactivo, y en cambio con tejido muscular, una mezcla del racémico y del levogiro. Data también de entonces la observación de cómo se favorecía la formación del ácido láctico con un ligero aumento de hidroxiliones, por ejemplo, fosfatos que neutralizaban luego el ácido formado (6).

Con el hidrato de fenilglioxal se ha observado, sin excepción, la formación de ácido amigdalico ópticamente activo (7).

El ángulo de desviación de la luz polarizada depende de la naturaleza del material enzimático, y sin esfuerzo podemos atribuir a la acción de factores biológicos específicos el paso, casi en un 100 por 100, de una substancia inactiva a otra ópticamente activa.

Todo esto es hoy en día tanto más interesante cuanto recientemente J. Bodnar y C. Bernauer (8) sostienen que la desaparición del aldehido acético en las diversas partes de las plantas no debe atribuirse necesari-

mente a un proceso enzimático, sino que puede ser debida a una aldol-condensación de causas puramente químicas, no siendo esta reacción influenciada por ningún catalizador biológico. (Estos investigadores han observado que en el puré de guisantes, que actúa activísimamente sobre el acetaldehído, no era posible demostrar luego la presencia del ácido acético y el alcohol etílico a que aquél debía dar lugar según la reacción de Cannizzaro. En cambio se producía acetaldol, según la condensación:



no siendo esta reacción de naturaleza enzimática, pues se presentaba igualmente si se sometía el puré de guisantes a la acción del calor).

No vamos a discutir ahora en qué medida puede aceptarse este hecho para otros materiales vegetales en que se observa también un consumo de aldehído (g), no viéndose, en cambio, la producción de las cantidades equivalentes de alcohol y ácido.

C. Neuberger y M. Kobel (10) han indicado ya que en la dismutación del metilglioxal por el enzima de las hojas verdes, se produce ácido láctico racémico, lo que coincide en absoluto con el hecho de que hasta ahora el ácido láctico preformado y aislado de las partes verdes de los vegetales ha sido siempre de la forma *d* - *l*.

En lo que atañe a la acción de la zimasa de los vegetales superiores sobre el hidrato de fenilglioxal, han observado los mismos autores el paso de aldehído cetónico aromático a ácido amigdalico levogiro; pudiéndose obtener con bacterias dextro o levogiro a elección. En mis experiencias con las hojas verdes de tilo (*Tillia Grandifolia*) he conseguido el paso, en un 83 por 100 aproximadamente a *d* ( - ) ácido amigdalico, de un poder rotatorio de - 146,5°, constando, por lo tanto, en un 96 por 100 del componente levogiro.

De todo esto deducimos, pues, que en el caso del fenilglioxal no puede quedarnos ninguna duda acerca del carácter enzimático de la reacción. En cuanto al metilglioxal, bastará indicar que con el líquido resultante de cocer el extracto de hojas de tilo no logré ninguna dismutación, lo que nos demuestra que es también una acción biológica, a pesar de haberse producido lactato inactivo a la luz polarizada.

## Parte experimental

A continuación exponemos algunos detalles de las experiencias efectuadas.

### I. EXPERIENCIAS CON METILGLIOXAL

Para esta investigación preparamos las siguientes mezclas:

- 1.<sup>a</sup> 250 gr. de papilla, de hojas verdes y frescas de tilo.  
740 cc. de agua.  
10 cc. de solución de metilglioaxal al 10 por 100.  
10 gr. de carbonato cálcico.  
10 cc. de tolueno.
- 2.<sup>a</sup> 250 gr. de papilla de hojas de tilo.  
640 cc. de agua.  
100 cc. de jugo de levadura cocido (como *cofermento*).  
10 cc. de solución de metilglioaxal al 10 por 100.  
10 gr. de carbonato cálcico.  
10 cc. de tolueno.
- 3.<sup>a</sup> 250 gr. de papilla de hojas de tilo.  
750 cc. de agua.  
10 gr. de carbonato cálcico.  
10 cc. de tolueno.

Todas estas mezclas, colocadas en sendas botellas, fueron agitadas enérgicamente durante seis horas, a una temperatura de 40°, y luego, colocadas a 37° en la estufa de cultivos. Como la papilla de hojas, en contacto con el agua, se había hinchado, absorbiéndola en gran cantidad, añadimos, al cabo de veinticuatro horas, 750 cc. de agua a cada mezcla. Al principio de la experiencia, a las veinticuatro y a las cuarenta y ocho horas, tomamos de cada una 15 cc. de líquido, en los que procedimos a la determinación del metilglioaxal. Para ello centrifugamos dichos líquidos, y como no se depositasen bien, les añadimos el mismo volumen de alcohol, filtramos el precipitado obtenido, y al líquido claro que filtraba lo tratamos con solución alcohólica de paranitrofenilhidracina; evaporándolo, luego, en parte.

De esta manera observamos que, a las cuarenta y ocho horas, había desaparecido en absoluto el aldehído cetónico. Entonces tomamos las mezclas de las botellas, guardamos la parte líquida y tratamos dos veces consecutivas el residuo sólido con agua, en la centrífuga. Los líquidos resultantes de estos lavados los junté a los primitivamente separados y los evaporé hasta pequeño volumen, precipitando luego con la misma cantidad de alcohol metílico y filtrando. Los residuos separados de esta

filtración fueron disueltos en 125 cc. de agua hirviendo, y de nuevo precipitados con la misma cantidad de alcohol.

Reuní todos los líquidos resultantes que contenían el lactato y les añadí ácido oxálico en exceso para separar el Ca; filtré el precipitado y herví con la cantidad necesaria de carbonato de plomo hasta que no dieran reacción ácida al papel de tornasol. Una vez enfriados, filtré los líquidos y lavé el precipitado, y el líquido con agua fría. Entonces desalojamos el plomo con una corriente de ácido sulfhídrico y la parte de éste que podía haberse disuelto en el líquido, a su vez, con otra de aire. Añadí ZnO en exceso, herví hasta la absoluta neutralización, filtré en caliente para separar ZnO no disuelto y concentré la solución de lactato hasta pequeño volumen.

Como al cabo de unos días no se produjese ninguna cristalización, acidulamos cada uno de los líquidos con ácido fosfórico, lo mezclamos íntimamente, en un mortero, con sulfato sódico recientemente calcinado, hasta obtener un polvo harinoso, y lo extrajimos con éter, hasta agotamiento, en aparatos de Soxhlet. Una vez evaporado el éter, disolví el residuo resultante en agua y sometí de nuevo la solución con carbonato de plomo, etc., a un tratamiento en un todo idéntico al ya descrito.

Finalmente, en la solución de lactato de cinc obtenida, luego de concentrada y de guardarla durante largo tiempo, se presentó una cristalización. Traté la sal con arcilla, le añadí un poco de carbón animal y la recrystalicé dos veces en agua.

Residuo obtenido en la experiencia primera....	0'8 gr.
Residuo obtenido en la experiencia segunda....	0'65 gr.

Como se ve, comparando los resultados anteriores, la adición de cofermento no ha mejorado en nada la reacción. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los líquidos extractivos de las hojas se encuentran muchas substancias que entorpecen la cristalización, no siendo por eso la cantidad final obtenida satisfactoria.

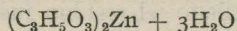
La observación polarimétrica nos indicó que se trataba de una sal ópticamente inactiva, lo que fué comprobado por la determinación del agua de cristalización.

#### *Análisis*

Con 0'1007 gr. de la substancia obtenida de la mezcla primera, desecada, obtuvimos : al deshidratar, 0'0184 gr. de agua, y al incinerar, 0'0275 gr. de ZnO.

Con 0'1001 gr. de la substancia obtenida de la mezcla segunda, desecada, obtuvimos : al deshidratar, 0'0183 gr. de agua, y al incinerar, 0'0276 gr. de óxido de Zn.

Las cantidades, expresadas en tanto por ciento, que produce una molécula de lactato de cinc y las obtenidas en nuestras experiencias, son:



Calculado: Agua = 18'18 por 100; ZnO = 27'35 por 100  
Encontrado : Mezcla primera : Agua = 18'27 por 100; ZnO = 27'35 por 100  
Encontrado : Mezcla segunda : Agua = 18'28 por 100; ZnO = 27'42 por 100

No nos fué posible encontrar ácido láctico preformado en el líquido de la mezcla tercera, que tratamos, en un todo, de un modo análogo a los otros dos (ni siquiera con la reacción coloreada del tiofeno). Por lo tanto, las hojas, a lo menos en el período de vegetación en que fueron recogidas, no contenían ácido láctico, ni aun en indicios.

## II. EXPERIENCIAS CON FENILGLIOXAL

Análogamente a lo hecho con el metilgloxal, preparamos las siguientes mezclas:

- 1.<sup>a</sup> 250 gr. de papilla de hojas verdes y frescas de tilo.  
1,500 cc. de agua.  
1 gr. de hidrato de fenilgloxal.  
10 gr. de carbonato cálcico.  
10 cc. de tolueno.
- 2.<sup>a</sup> 250 gr. de papilla de hojas de tilo.  
1,500 cc. de agua.  
10 gr. de carbonato cálcico.  
10 cc. de tolueno.

Las experiencias se llevaron a cabo a una temperatura de 37°, y fué observada la presencia del fenilgloxal, al principio de la experiencia, a las veinticuatro horas y a los dos días, en una parte alícuota de líquido, por la precipitación con solución acética de paranitrofenilhidrazina. En la mezcla primera había desaparecido el aldehído cetónico a los dos días. Entonces centrifugamos y lavamos el residuo, en la centrífuga, dos veces consecutivas, con 450 cc. de agua cada una. Una vez reunidos todos los líquidos obtenidos y concentrados por evaporación, los precipité con acetona, filtré y disolví los precipitados obtenidos en 125 cc. de agua hirviendo, volviendo a precipitar con 125 cc. de acetona, y filtrando. Este tratamiento fué aún repetido otra vez.

Reunimos en uno solo estos diversos líquidos acetónicos, desalojamos la acetona por evaporación, filtramos y acidulamos con ácido fosfórico.

Las soluciones ácidas resultantes las agitamos con éter en embudo de separación, seis veces consecutivas; y los líquidos etéreos obtenidos los tratamos con sulfato sódico, recientemente calcinado, para desecarlos. El éter fué totalmente destilado; el residuo fué disuelto en pequeña cantidad de agua hirviendo, hervido con carbón animal y filtrado.

Una vez evaporada, en parte, el agua de la solución, no se observaba todavía ninguna cristalización de ácido amigdálico. Entonces neutralizamos exactamente esta solución concentrada con otra de sosa, filtramos y precipitamos con sulfato cádmico.

En el líquido procedente de la mezcla primera se produjo un abundante precipitado de amigdalato de cadmio, muy insoluble (11); en el correspondiente a la segunda, ninguno.

Este amigdalato cádmico, que al principio aparecía aún obscuramente coloreado, fué filtrado al vacío, lavado con agua, suspendido en ella y atacado por una corriente de ácido sulfhídrico. A las tres horas de este tratamiento suspendimos el precipitado en agua, nuevamente, luego de ser finísimamente pulverizado, y lo tratamos con sulfhídrico. Finalmente, transcurridas otras dos horas, volvimos a filtrar, y la solución obtenida, de una claridad casi de agua, la evaporamos hasta sequedad.

Cantidad de ácido amigdálico, en bruto, hallado.... 0'834 gr.

Luego de recristalizarlo en benceno, se presentaba en hermosísimos cristales blancos. Su punto de fusión era 130°.

Para llevar a cabo la determinación del poder rotatorio disolví 0'2338 gr. de ácido en 10 cc. de agua, y obtuve el siguiente resultado:

$$[\alpha]_D = -146'5^\circ \quad (\alpha = -6'85^\circ; l = 2; c = -2'338)$$

Además, 8 cc. de esta solución necesitaron para neutralizarse 12'2 cc. de solución  $\frac{N}{10}$  de KOH; siendo la cantidad calculada para el ácido amigdálico 12'3 cc.

Por todo esto, así como por el elevado poder de rotación que casi alcanza el de la forma ópticamente pura, se ve que el ácido que hemos obtenido, por la acción zimásica, es el levogiro. Y como, además, la cantidad de ácido amigdálico obtenida es mayor del 80 por 100 de la total que podía formarse a partir del fenilglioxal estructuralmente inactivo, *tenemos en esta experiencia un ejemplo más, del interesantísimo proceso de formación por la dismutación de una substancia asimétrica, a partir de otra que no lo era.*

Kaiser Wilhelm Institut f. Biochemie. Director, profesor C. Neuberg.

## BIBLIOGRAFÍA

1. C. Neuberg, *Der Zuckerumsatz der Zelle*. Jena, 1913. — *Handb. d. Biochem. de Oppenheimer*, segunda edición, 2, 442.
2. C. Neuberg y G. Gorr., *Bio. Ztsrft.*, 171-475, 192; 173-358, 1926. — G. Binder-Kotrba, *id.*, 174-443; 1926. — L. Klar, *id.*, 186-327; 1927.
3. C. Neuberg y M. Kobel, *Bio. Ztsrft.*, 179-459; 1926. — *Stoklasa-Festschrift*, 269; 1928.
4. W. Benecke y L. Jost, *Pflanzenphysiol.*, cuarta edición, 263; 1924.
5. C. Neuberg y M. Kobel, *Ztsrft. f. phys. chem.*, parte A, Haber-band, 139, 631; 1928.
6. C. Neuberg, *Bio. Zeits.*, 51, 484; 1913. — C. Neuberg y M. Kobel, *Bio. Zeits.*, 182, 470; 1927.
7. P. Mayer, *Bio. Zeits.*, 174, 420; 1926. — G. Binder-Kotrba, *loc. cit.* — L. Klar, *loc. cit.* — C. Neuberg y E. Simon, *Bio. Zeits.*, 186, 331; 1927. — A. Gualdi, *Bio. Zeits.*, 205, 318; 1929.
8. J. Bodnar y C. Bernauer, *Bio. Zeits.*, 209, 458; 1929.
9. W. Zalewski y E. Schatalowa-Zaleskaja, *Bio. Zeits.*, 201, 190; 1928. — Hans v. Euler y E. Grabe, *Chem. Centralbl.*, II, 2410; 1928. — Z. J. Kertesz, *H.*, 176, 144; 1928.
10. C. Neuberg y M. Kobel, *loc. cit.* *Stoklasa-Festschrift*.
11. A. Mc. Kenzie, *Chem. Centralbl.*, II, 1048; 1899. — H. Thierfelder y K. Daiber, *H.*, 130-138; 1923.

Publicado en el *Biochemische Zeitschrift*, t. CCXIII, fascículos 4-6, pág. 495, y en los *Anales de la Soc. Esp. de Física y Química*, t. XXVIII, abril de 1930.