

ESTUDIO DE LA COMPOSICION LIPIDICA DE ESPORAS Y MICELIO DE 48 HORAS DE *Hemispora Stellata*.

Por Antonio López Pérez

INDICE

CAPITULO I.—1. *Hemispora stellata*.—2. *Lípidos en general*.—3. *Los lípidos fúngicos*.—4. *Localización celular y función de los lípidos en los hongos*.—I.1.—*Hemispora stellata*.—I.2.—*Lípidos en general*. 1. Definición y caracteres generales.—2. Clasificación.—I.3.—*Los lípidos fúngicos*.—1. Generalidades.—2. Contenido lipídico total.—3. Hidrocarburos.—4. Poliprenoles.—5. Ácidos grasos.—6. Ceras.—7. Glicéridos.—8. Coenzima Q (Ubiquinona) y otras quinonas.—9. Esteroides.—10. Carotenoides.—11. Fosfolípidos.—12. Glicolípidos.—13. Acilglicosas. 1) Azúcares acilados. 2) Glicósidos de hidroxiácidos grasos.—14. Glicosfingolípidos. 1) Hexósidos de ceramidas. 2) Gangliósidos.—15. Lipopolisacáridos.—16. Derivados N-acilados de los aminoácidos.—17. Sulfolípidos.—I.4.—*Localización celular y función de los lípidos en los hongos*.—1. Distribución de los lípidos neutros.—2. Lípidos de la pared celular.—3. Lípidos en la membrana citoplasmática.—4. Lípidos de las mitocondrias.—CAPITULO II.—MATERIAL Y METODOS.—II.1.—Productos.—1. Reactivos.—2. Soportes cromatográficos.—3. Disolventes.—4. Disolventes para espectrofotometría.—5. Gases.—II.2.—MATERIAL.—1. Material general.—2. Cromatografías. a) Columna. b) Lámina fina. c) Papel. d) Gaseosa.—3. Liofilizaciones.—4. Microsublimaciones.—5. Microscopía.—6. Concentraciones de volumen.—II.3.—PROCEDEDENCIA DE LA CEPA UTILIZADA.—II.4.—METODOS.—1. Obtención y almacenamiento del producto biológico. 1. Esterilización del material. 2. Medio de cultivo de salvado. 3. Medio líquido de Vaisey. 4. Siembras. 5. Recogida de esporas. 6. Obtención del micelio cultivado en profundidad.—2.—Métodos analíticos.—1. Liofilización y obtención del extracto seco.—2. Método general de obtención de extractos lipídicos. a) Extracción con cloroformo-metanol (2/1). b) Extracción con metanol a reflujo. c) Extracción con acetona-etanol-ClH.—3. Eliminación de disolventes.—4. Purificación del extracto lipídico.—5. Fraccionamiento con ácido silícico-celita del extracto lipídico purificado. a) Preparación de la columna. b) Colocación de la muestra. c) Desarrollo de la cromatografía.—6. Fraccionamiento de los lípidos apolares en columna de sílica gel. a) Preparación de la columna. b) Colocación de la muestra. c) Desarrollo de la cromatografía.—7. Cromatografía en columna de alúmina. a) Preparación de la columna. b) Colocación de la muestra. c) Desarrollo de la cromatografía.—8. Cromatografía de absorción en capa fina de sílica gel. a) Preparación de las placas. b) Colocación de la muestra. c) Desarrollo de la cromatografía.—9. Cromatografía de partición en capa fina de sílica gel. a) Impregnación de las placas. b) Colocación de la muestra. c) Desarrollo de la cromatografía.—10. Reactivos empleados para el revelado en lámina fina. A.—Reactivos generales. 1- Ácido sulfúrico. 2- Rodamina 6G. 3- Iodo.—B.—Reactivos específicos. 1- Reactivo de ninhidrina. 2- Reactivo de iodo-ioduro potásico. 3- Reactivo de difenilamina. 4- Reactivo periodato-Schiff. 5- Reactivo leuco-azul de metileno. 6- Reactivo azul de molibdeno.—11. Reactivos empleados en la cromatografía en papel. a) Detección de serina, etanolamina y aminoazúcares. b) Detección de colina. c) Identificación de azúcares. 1- Reactivo anilina-ácido-oxalato 2- Reactivo periodato-bencidina.—12. Hidrólisis de los fosfolípidos, glicolípidos y esterol glicósidos, para la caracterización de los com-

ponentes no lipídicos.—13. Saponificación y obtención de los ácidos grasos de los ésteres de los esteróles.—14. Formación de ésteres metílicos de ácidos grasos libres.—15. Transesterificación y formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman glicéridos y fosfolípidos.—16. Microsublimación.—17. Determinación cuantitativa de hidratos de carbono.—18. Determinación cuantitativa de fósforo.—19. Determinación de nitrógeno por nesslerización.—20. Cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.—21. Condiciones empleadas en el desarrollo de las cromatografías.—22. Cálculo de los porcentajes de los ácidos grasos identificados. 1.-Operaciones de comprobación. 23.-Cuantificación de los diferentes componentes lipídicos. 1. Triglicéridos. 2. Ubiquinona. 3. Ácidos grasos libres. 4. Ergosterol. 5. Fosfolípidos.—CAPITULO III.—RESULTADOS.—III.1.—MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.—1. Extracción con cloroformo-metanol, metanol en caliente y acetona-etanol-ClH. a) Cloroformo-metanol. b) Metanol en caliente. c) Acetona-etanol-ClH.—1. Ubiquinona y lípidos neutros totales de los extractos combinados de cloroformo-metanol y metanol en caliente. 2. Ubiquinona y lípidos neutros del extracto acetona-etanol ClH.—2. Extracción con cloroformo-metanol, metanol en caliente y trituración con alúmina.—3. Extracción con los disolventes del método de Peck. a) Eter etílico-etanol. b) Cloroformo. c) Eter etílico-etanol-ClH.—1. Ubiquinona y lípidos neutros totales de los extractos éter etílico-etanol y cloroformo. 2. Ubiquinona y lípidos neutros totales del extracto éter etílico-etanol-ClH.—4. Extracto insaponificable y efectos de la ebullición con acetona-etanol-ClH. 1. Extracto insaponificable. 2. Efectos de la ebullición con acetona-etanol-ClH sobre la ubiquinona.—III.2.—LÍPIDOS FACILMENTE EXTRACTIBLES DE ESPORAS.—1. Extracto seco.—2. Extracto lipídico bruto.—3. Extracto lipídico purificado.—4. Fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con cloroformo-metanol y metanol en caliente, en columna de ácido silílico.—5. Fraccionamiento de los lípidos apolares eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (98/2).—6. Identificación definitiva y cuantificación de algunos componentes.—7. Fraccionamiento de los lípidos eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4; 95/5) e identificación de sus componentes.—8. Fraccionamiento de los lípidos eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (90/10; 85/15; 80/20) y metanol.—9. Confirmación de la naturaleza de los distintos fosfolípidos, glicolípidos y esterol glicósidos, provisionalmente identificados en lámina fina. a) glicolípidos y esterol glicósidos. b) fosfolípidos.—10. Ácidos grasos de los lípidos identificados en esporas de *H. stellata*.—11. Obtención y preparación de las muestras para la metilación.—12. Formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los distintos componentes lipídicos identificados en esporas de *H. stellata*.—1. Ácidos grasos libres. 2. Triglicéridos. 3. Esteros de esteróles. 4. Fosfolípidos.—13. Cromatografía en columna de alúmina de la fracción soluble en éter de petróleo. 1. Identificación de la ubiquinona.—14. Cuantificación de los distintos componentes identificados.—III.3. LÍPIDOS FACILMENTE EXTRACTIBLES DEL MICELIO.—1. Extracto seco.—2. Extracto lipídico bruto.—3. Extracto lipídico purificado.—4. Fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con cloroformo-metanol y metanol en caliente, de micelio de *H. stellata*, en columna de ácido silílico.—5. Fraccionamiento de los lípidos apolares eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (98/2).—6. Identificación definitiva y cuantificación de algunos componentes.—7. Cromatografía de los lípidos apolares del micelio de *H. stellata*, eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (98/2), en columna de alúmina. 1. Identificación de la ubiquinona.—8. Fraccionamiento de los lípidos eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4; 95/5) e identificación de sus componentes.—9. Fraccionamiento de los lípidos eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (90/10; 85/15; 80/20) y metanol.—10. Confirmación de la naturaleza de los distintos fosfolípidos y esterol glicósidos provisionalmente identificados en lámina fina.—11. Ácidos grasos de los lípidos identificados en micelio de *H. stellata*. 1. Obtención y preparación de las muestras para la metilación.—12. Cuantificación de los distintos componentes identificados en el micelio de *H. stellata*.—III.4.—LÍPIDOS LIGADOS DE ESPORAS.—1. Fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con acetona-etanol-ClH, en columna de ácido silílico.—2. Fraccionamiento en columna de sílica gel 1. Naturaleza de la mancha de Rf 0,66.—3. Ácidos grasos del extracto acetona-etanol-ClH.—III.5.—LÍPIDOS LIGADOS DE MICELIO.—1. Fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con acetona-etanol-ClH, en columna de ácido silílico.—2. Fraccionamiento en columna de sílica gel G.—3. Ácidos grasos del extracto acetona-etanol-ClH.—IV.—DISCUSIÓN.—1. Extracciones. 1. Necesidad de la selección de un método adecuado de extracción. 2. Comparación de la eficacia de los distintos métodos de extracción. 3. Validez de los datos de UQ total.—2. Contenido lipídico.—3. Lípidos fácilmente extractibles. 1. Lípidos apolares. 1. Ergosterol. 2. Ubiquinona. 3. Triglicéridos. 4.—Ácidos grasos libres.—2. Lípidos polares. 1. Fosfolípidos. 2. Glicolípidos. 3. Esterol glicósidos.—3. Ácidos grasos. 1. Características generales. 2. Lípidos apolares. 3. Fosfolípidos.—IV.4.—Lípidos ligados.—V.—CONCLUSIONES.—VI.—BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

I. 1. HEMISPORA STELLATA

Entre los microorganismos halófilos se encuentran ciertos hongos. Un buen número de alimentos salados (carnes y pescados) adquieren con frecuencia, y especialmente en las estaciones cálidas, manchas de color marrón. Esta alteración es conocida en la bibliografía inglesa con los nombres de «dun» o «mite», que se corresponden en la terminología española, con el vocablo «empolvado» y en la de algunos países suramericanos con el de «mosqueado» o desarrollo de «pecas».

Las citadas manchas no son otra cosa que colonias fuertemente coloreadas de hongos halófilos.

HØYE (1902, 1905, 1907, 1909) identificó los hongos productores de estas colonias como *Torula epizoa* (Corda) y *Torula minutum*.

En la bibliografía más reciente suele referirse a los hongos productores del «empolvado» con el nombre *Sporendonema epizoum* (JARVIS, 1950; FRANK y HESS, 1941).

La especie *Sporendonema epizoum* fue creada por CIFERRI y REDAElli (1934) para agrupar diversos hongos previamente clasificados como *Torula*, *Oospora*, *Penicillium*, *Caternularia*, *Scopulariopsis*, *Hemispora* y *Sporendonema*, basándose para ello en la formación de esporas «pseudoendogénicas» que había servido a OUDEMANS (1885) para enmendar el significado del género *Sporendonema*, creado inicialmente por DESMAZIERES (1827).

Entre los hongos incluidos por CIFERRI y REDAElli en la nueva especie *Sporendonema epizoum*, se encuentra el inicialmente descrito por VUILLEMIN (1931) con el nombre de *Hemispora stellata*, denominación basada en sus observaciones sobre el sistema de producción de conidios (formación inicial de protoconidios y posteriormente deuteroconidios) y el crecimiento radial de sus colonias.

Hoy, los términos de *Sporendonema epizoum* y *Hemispora stellata* son considerados como sinónimos. El trabajo descrito en esta tesis ha sido realizado sobre la cepa de *Hemispora stellata* conservada en el Central-Bureau voor Schimmelcultures (Baarn-Holanda). La biología de esta cepa ha sido profundamente estudiada en este laboratorio (SALA, 1969).

Hemispora stellata es un hongo imperfecto, perteneciente al orden *Moniliales*, familia *Dematiaceas*, muy aeróbico que ofrece una temperatura óptima de crecimiento de 25-27° C. Se desarrolla en medios sólidos (agar-malta) donde forma colonias redondeadas y abultadas, de aspecto algodonoso y tonalidad marrón, variable, según las condiciones de cultivo; a medida que la concentración salina desciende, el color se acentúa. El envejecimiento de las colonias acentúa la rugosidad de su superficie.

Para su crecimiento en medio líquido suele utilizarse el medio de Vaisey (VAISEY, 1954), en el que con una agitación adecuada y a la temperatura óptima comienza a manifestarse el desarrollo hacia los 12-18 horas; si al cabo de este tiempo se interrumpe la agitación se forma en unos días una gruesa capa superficial constituida por micelio aéreo.

La velocidad de crecimiento, tanto en medios sólidos como líquidos, se ve fuertemente influída por la concentración salina. Tolera concentraciones salinas de hasta el 20 %. El crecimiento máximo se observa, en agar-malta, a concentraciones de ClNa del 7,5 %.

Para la recogida de conidios resulta sumamente útil el cultivo en salvado humedecido, sobre el que se desarrolla una abundante esporulación al cabo de 3-5 días; el rendimiento en conidios se ve poderosamente afectado por la concentración salina, obteniéndose el máximo rendimiento humedeciendo el salvado con una disolución de ClNa al 4,5 %, en la proporción de 66 mls. de la disolución salina por cada 100 gramos de salvado.

Para cierto tipo de estudios bioquímicos siempre es conveniente lograr una sincronización de la germinación; SALA (1969) ha realizado varios intentos de sincronización de su crecimiento.

En contraposición con lo que ocurre con otros hongos (WELSFORD, 1907; DODGE, 1912; KREITLOV, 1934), el shock térmico no activa sino que retrasa la germinación y no logra la sincronización.

I.2. LIPIDOS EN GENERAL

El interés por los lípidos en general ha experimentado un notable incremento durante los últimos años, que se ha reflejado en la aparición de diversas revistas dedicadas exclusivamente a cubrir este campo, numerosas revisiones y un sinfín de artículos en revistas bioquímicas, microbiológicas, etc., de carácter general. Este renovado interés deriva del reconocimiento del papel fundamental que los lípidos representan tanto desde un punto de vista metabólico como estructural. Particular atención se ha venido prestando a los lípidos de los vegetales superiores, bacterias y hongos, porque a las razones generales arriba apuntadas, ha venido a añadirse el intento de utilizar la composición lipídica como organización taxonómica, más funcional que las hasta ahora utilizadas.

I.2.1. Definición y caracteres generales.

Con el nombre de lípidos se designan hoy, de acuerdo con la definición de BLOOR, aquellos compuestos orgánicos insolubles en agua, solubles en disolventes orgánicos (éter etílico, éter de petróleo, cloroformo, acetona, etc.), que son ésteres reales o potenciales de los ácidos grasos y utilizables por el organismo animal.

Esta definición, pese a ser tan compleja, debe interpretarse con cierta elastici-

dad si no se quiere excluir del grupo de los lípidos ciertas sustancias habitualmente consideradas como miembros del mismo; así, por ejemplo, las lecitinas son solubles en agua (al menos en cierta extensión) e insolubles en acetona, las cefalinas son insolubles en etanol y los cerebrósidos no se disuelven en éter etílico; muchas sustancias, generalmente incluidas en los lípidos, no son tampoco ésteres reales ni potenciales de los ácidos grasos: hidrocarburos, tocoferoles, vitamina K, ubiquinona, etc.

Son compuestos sumamente abundantes en los sistemas biológicos, donde desempeñan papeles energéticos y estructurales de considerable importancia.

I.2.2. Clasificación.

Si su definición es difícil, no lo es menos su clasificación. En el pasado solían clasificarse (BLOOR, 1925) en:

- a) Lípidos simples: glicéridos, ceras, esteroides.
- b) Lípidos complejos: fosfolípidos, cerebrósidos y sulfolípidos.
- c) Derivados de los lípidos: ácidos grasos, alcoholes de cadena lineal, esteroles, alcoholes con el anillo de la β -ionona, hidrocarburos alifáticos, carotenoides, esencialeno, vitaminas E, D y K.

El creciente interés por los lípidos, que llevó consigo el advenimiento de nuevas técnicas analíticas y el consecuente descubrimiento de nuevas sustancias que reúnen los requisitos generales exigidos por la definición inicial, ha forzado al establecimiento de clasificaciones más *ad-hoc*.

Hoy suelen distinguirse tres grandes grupos de lípidos: lípidos apolares (impropriamente denominados con frecuencia neutros, porque no todos lo son), fosfolípidos y glicolípidos y otros dos menos numerosos: N-acil derivados de aminoácidos y sulfolípidos.

Los lípidos pertenecientes al primer grupo no contienen sustituyentes muy polares y son por tanto fácilmente solubles en éter de petróleo y otros hidrocarburos. Dentro de este grupo se incluyen hidrocarburos, poliprenoles, ácidos grasos libres, ceras, glicéridos (mono, di y tri), alkoxiglicéridos, dioléteres, ubiquinona, carotenoides, esteroides, vitaminas A, D, E y K.

En el grupo de los fosfolípidos, de carácter considerablemente más polar, se distinguen los diacilfosfolípidos, plasmógenos y alkoxi análogos de fosfátidos y fosfonolípidos; en él se incluyen algunas sustancias recientemente descubiertas en vegetales y microorganismos como la N-acilfosfatidiletanolamina (DEBUCH y WENDT, 1967), la fosfatidil-N-(2-hidroxietil) alanina (KEMP y DAWSON, 1969) y el glucosaminil fosfatidilglicerol (BERTSCH y col., 1969; Op de KAMP y col., 1969; MACDOUGALL y col., 1969).

Los glicolípidos incluyen también algunos de los lípidos más recientemente descubiertos; se agrupan en glicosildiglicéridos (aislados por primera vez por CARTER y col., 1966), acilglicósidos (descritos por primera vez por BIEMANN y col., 1963)

glicoesfingolípidos (cerámida hexósidos, gangliósidos, fitoglicolípidos), esterolglícidos y lipopolisacáridos.

Los N-acil derivados de los aminoácidos y sulfolípidos son grupos menos numerosos y de un interés general más limitado.

I. 3. LOS LIPIDOS FUNGICOS

I.3.1. Generalidades

Pese a que los hongos son capaces de almacenar cantidades considerables de lípidos, su estudio ha atraído, en los tiempos recientes, considerablemente menos atención que el de otros grupos microbianos, como las bacterias, la mayor parte de los cuales acumulan muchos menos lípidos.

I.3.2. Contenido lipídico total.

El contenido lipídico total de los hongos varía mucho con la especie y fase de crecimiento que se considere.

En general las esporas no ofrecen un contenido lipídico muy elevado, con excepción de las esclerotías de *Claviceps purpurea* que contienen hasta un 43 % de lípidos (SCHÖNBORN, 1955) y los ureodosporos de *Puccinia graminis tritici* SHU col., 1954). En esporas de *Aspergillus oryzae* se han citado cifras que representan el 2,20 % del peso seco (SUMI, 1928). HARTMAN y col. (1962) dan valores que suponen el 1,39 % del peso seco de las esporas de *Pithomyces chartarum*.

El micelio, en cambio, suele acumular grandes cantidades de lípidos. Se han citado contenidos lipídicos de hasta el 50 % del peso seco (BERNHAUER, 1943; MURRAY y col., 1953). Para el micelio de *Penicillium griseofulvum* SMITHIES (1952) da cifras de 34,5 % sobre peso seco. SHU y THORN (1952) citan valores del 22,4 % del peso seco en el micelio de *Gliocladium roseum*. Valores del orden del 20 % se han detectado también en diversas especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Endomyces*, *Fusarium*, *Mucor*, *Oospora*, *Penicillium* y *Tórrula* (BERNHAUER, 1943; FINK y col., 1937; MURRAY y col., 1953; PRILL y col., 1935; PRUESS y col., 1934; SINGH y WALKER, 1956; SINGH y col., 1955; WARD y col., 1935; WOODBINE y col. 1951; etc.).

En el micelio de muchos otros hongos suelen detectarse, sin embargo, valores considerablemente inferiores. LIM (1935) obtiene del micelio de *Rhizopus japonicus* extractos lipídicos que representan el 9,72 % del peso seco y SHU y THORN (1952) sólo obtienen 1,4 % de lípidos en el residuo seco del micelio de *Penicillium chisogenum*. HARTMAN y col. (1959) citan valores de 4-6 % en *Phytomices chartarum* que consideran muy bajo para un hongo perteneciente al orden de las *Moniliales*.

Estas cifras deben, en cualquier caso, considerarse como meramente indicativas dado que el contenido lipídico de los hongos se ve fuertemente influido por la edad (ZALOKAR, 1965), la composición del medio de cultivo (COCHRANE, 1958; GARRIDO

y WALKER, 1956), los métodos de extracción empleados (PECK, 1947), la disponibilidad de oxígeno, etc.

I.3.3. Hidrocarburos.

Los hidrocarburos han constituido durante mucho tiempo un grupo de lípidos muy poco conocido. A su estudio se le concede hoy una atención especial en los vegetales, por considerarlo como uno de los grupos de lípidos útiles para el establecimiento de nuevos criterios taxonómicos (EGLINTON y HAMILTON, 1967). En los microorganismos apenas si han sido estudiados con detalle excepto en *Sarcina lutea* (ALBRO y HUSTON, 1964; ALBRO y DITTMER, 1969), aunque se han identificado varios en *Vibrio marinus*, varias algas marinas y en la acuática *Anacystis nidulans* (ORÓ y col., 1967). En todos estos casos se encuentran sobre todo especies de número impar de átomos de carbono (especialmente C 17 y C 17 monoeno).

I.3.4. Poliprenoles

Los alcoholes poliisoprenoides de cadena larga constituyen un grupo de lípidos al que se ha prestado gran interés desde que ROWLAND y col. (1956) descubrieron el solanesol. Su presencia en algunos hongos (*Aspergillus fumigatus*) ha sido repetidas veces establecida (STONE y col., 1967; STONE y HEMMING, 1968), estando definitivamente probado que en este hongo existe una mezcla de hexahidroprenoles de C 19 a C 24. También se ha demostrado su presencia en las levaduras. BURGOS y col. (datos no publicados) probaron en 1963 la presencia en *S. cerevisiae* de alcoholes poliisoprenoides del tipo del dolicol.

I.3.5. Ácidos grasos.

Los hongos son en general muy ricos en ácidos grasos libres, que en ocasiones suponen hasta el 88 % del total de los lípidos (RAVEUX, 1948). HARTMAN y col. (1962) dan cifras del orden del 20 % para el micelio de *Pithomyces chartarum*, 15 % para *Stemphylium dendriticum* y 11 % para *Cylindrocarpon radicicola*.

Al igual que el contenido lipídico total, el porcentaje del mismo constituido por los ácidos grasos se ve fuertemente influido por las condiciones culturales. Así en *Penicillium javanicum* el porcentaje de grasos ácidos libres se multiplica aproximadamente por cinco al subir la concentración de glucosa en el medio desde un 20 % a un 40 % (WARD y col., 1935). En general cuantos factores tienden a aumentar el contenido lipídico total descenderán al porcentaje de los mismos constituido por los ácidos grasos libres. Pese a todo, es un hecho reconocido que el porcentaje de ácidos grasos libres presentes en algunos hongos, como el micelio de *Aspergillus nidulans* o las esclerotías de *Claviceps purpurea*, es extremadamente bajo (SINGH y col., 1955; ZELLNER, 1907).

Son muy pocas las ocasiones en que se ha intentado averiguar la composición de la fracción de ácidos grasos libres de los hongos. La mayor parte de los estudios sobre los ácidos grasos de los hongos están realizados sobre extractos obtenidos tras una hidrólisis previa o sobre el producto de la hidrólisis alcalina de extractos lipídicos totales. Suelen encontrarse ácidos grasos de 14 a 18 átomos de carbono, de cadena lineal, saturados o con uno, dos o tres dobles enlaces y raras veces miembros de la serie ramificada.

HARTMAN y col. (1962) encuentran en la fracción de ácidos grasos libres de *Pithomyces chartarum* los siguientes: cadena lineal C-11 : 0, 12 : 0, 14 : 0, 15 : 0, 16 : 0, 16 : 1, 18 : 0, 18 : 1, 18 : 2 y 18 : 3; serie iso ramificada 17 : 0. Predominan el C-18 : 2 (50 % aproximadamente), el C-16 : 0 (25 % aproximadamente) y el C-18 : 1 (8 % aproximadamente). En *Stemphylium dendriticum* y *Cylindrocarpon radicicola* siguen siendo mayoritarios C-18 : 2, C-16 : 0 y C-18 : 1 (aunque el porcentaje representado por cada uno de estos ácidos grasos se desvía considerablemente del citado para *Pithomyces chartarum*) y faltan C-15 : 0 y C-17 : 0 iso.

En algunos se han identificado también hidroxiácidos. MORRIS (1968) observó, por ejemplo, la presencia de ácido ricinoleico y ácido treo-9, 10 hidroxiesteárico en cinco especies de *Claviceps*. En ciertos hongos se encuentran otros hidroxiácidos grasos considerablemente más complejos, como el agárico, espiculospórico y mineoluteico (RAISTRICK, 1950). *Ustilago zae* posee dos hidroxiácidos denominados ácidos ustílicos, con 16 átomos de carbono que poseen 2 y 3 grupos hidroxilo (LAMIEX, 1953).

I.3.6. Ceras

Las ceras son componentes poco habituales de los hongos y escasamente estudiados. Algunas especies, sin embargo, sí las forman; entre ellas se encuentra el *Actinomyces flavus* que sintetiza un ester dodecélico del ácido 5 cetooctadecanoico (HIRATA y NAKANISHI, 1949).

I.3.7. Glicéridos.

Los glicéridos constituyen una de las fracciones más abundantes de los lípidos en casi todos los sistemas biológicos. En los hongos es frecuente que representen hasta el 50 % de los lípidos totales del micelio (COCHRANE, 1958). HARTMAN y col. (1962) dan para *Pithomyces chartarum*, *Stemphylium dendriticum* y *Cylindrocarpon radicicola* cifras que van del 54 al 65 % de los lípidos totales. NOMBELLA y col. (1971) señalan igualmente que en *Fusarium culmorum*, los glicéridos constituyen el componente mayoritario de su fracción lipídica.

No son demasiado abundantes los casos en que se han fraccionado los glicéridos totales de los hongos, cuando se han fraccionado han podido detectarse junto a

triglicéridos (casi siempre la fracción más abundante), mono y diglicéridos (JACK, 1966; NOMBELLA y col., 1971; etc.).

En los glicéridos suelen encontrarse los mismos ácidos grasos citados para la fracción ácidos grasos libres (HARTMAN y col., 1962; BENTLEY y col., 1964).

I.3.8. Coenzima Q (*Ubiquinona*) y otras quinonas.

La ubiquinona es un lípido independiente y simultáneamente descubierto por los equipos de MORTON y col. (1957) y CRANE y col. (1957). Muy pronto se puso de manifiesto que se trataba de toda una familia de benzoquinonas liposolubles, con una cadena lateral polisoprenoide formada por un número de unidades de isopreno que oscila entre 6 y 10 (LESTER y col., 1958), por lo que habitualmente se les designa con el símbolo de Q y un subíndice que indica el número de unidades de isopreno de que consta la cadena lateral, según las recomendaciones de la International Union of Pure and Applied Chemistry (MORTON, 1965). La demostración de su participación en la cadena transportadora de electrones de diversos sistemas biológicos (LESTER y FLEISCHER, 1959; AMBE y CRANE, 1960; GREEN y col., 1959; PUMPHREY y REDFEARN, 1959), estimuló considerablemente el estudio sobre su distribución en la naturaleza.

La mayoría de los hongos contienen un solo tipo de ubiquinona, aunque en algunos se han detectado varios. LESTER y CRANE (1959) aislaron Q₆ en *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cavalieri* y *S. fragilis*, Q₉ en *Mucor corymbifer* y *Candida utilis*, Q₁₀ en *Neurospora crassa*, especies en las que no fue detectado ningún tipo de menaquinona. No encuentran ubiquinona en *Streptomyces griseus*, pero sí filoquinona. PAGE y col. (1960) detectaron Q₆ y Q₇ en *S. cerevisiae*, Q₆ en *S. ludwigii*, *Ashbya gossypii* y *Zigosaccharomyces barkerii* y Q₇ en *Endomyces lindneri*, *Endomycopsis fibuliger* y *Mycoderma monoza*; pero en ninguno de ellos observaron menaquinona. ERIKSON y col. (1960) detectaron Q₉ en *Agaricus campestris* y una mezcla de Q₉ y Q₁₀ en *Ustilago zae*, donde tampoco se detectaron otras quinonas. GALE y col. (1963) observaron la presencia de Q₁₀ en *Gibrella fuckasoi*. PACKTER y GLOVER (1960), detectaron Q₁₀ junto con un derivado de la misma, ubichromenol, (LAIDMAN y col. 1959) en *Aspergillus fumigatus fresenius*, un hongo que también sintetiza otra quinona, fumigatina (ANSLOW y RAISTRICK, 1938).

LAVATE y col. (1962 y 1964) demostraron la presencia de Q₁₀ en *A. fumigatus* y *C. fulvum*, Q₉ en *Aspergillus niger*, *Mucor abundans*, *P. brevicompactus*, *P. chrysogenum* y *P. notaum* y dehidro-Q₁₀ en *A. flavus*, *A. orizae*, *A. quadrilineatus*, *A. terrus*, *P. stipitatum*, *Neurospora crassa*, *Alternaria solani*, *Curvularia lunata* y *Gibberella fujikuroi*.

La participación de la ubiquinona en la cadena respiratoria de los hongos ha sido demostrada en *Claviceps purpurea* (ANDERSON, 1964).

I.3.9. Esteroides.

Puede afirmarse sin temor a grandes errores que todos los hongos forman esteroides. El contenido total de estos y el porcentaje que representan sobre los lípidos totales varía dentro de amplios límites, siendo función, fundamentalmente, de la especie y en menor grado de las condiciones culturales. De acuerdo con APPLETON y col. (1955) el porcentaje del peso seco representado por los esteroides varía de 0 en *Colletotrichum graminicolum* a 2,2 en *Penicillium westlingii*, aunque lo más frecuente es que estas cifras oscilen entre el 1 y el 2 %.

En las levaduras pueden hallarse cantidades considerablemente más elevadas. BIANCHI (1966) obtiene valores que representan hasta un 10,5 % del peso seco en *Candida albicans*.

La fracción esteroides de los lípidos fúngicos suele valorarse en términos de ergosterol, por ser éste el principal esterol fúngico y por lo fácil que es su determinación espectrofotométrica; la presencia de otros esteroides en menor cuantía (dehidroergosterol, etc.) ha sido, sin embargo, repetidas veces probada (TANRET, 1908; GRUBER y col., 1951; GUIDER y col., 1954; SAITO, 1953; PETIT y KNIGHI, 1962).

Los esteroides se presentan como alcoholes libres y en forma de ésteres de los ácidos grasos. En *Candida albicans* alrededor del 95 % de los esteroides se hallan formando ésteres y sólo el 5 % restante se halla como alcohol libre (BIANCHI, 1966). En cambio de los datos de STONE y HEMMING (1968), deduce que en *Aspergillus fumigatus* el 78 % se encuentra en forma libre y sólo el 22 % está esterificado.

I.3.10. Carotenoides.

Los carotenoides constituyen un grupo de sustancias lipídicas de presentación frecuente en los hongos, pero en ellos el β -caroteno es menos corriente que en los vegetales superiores; en los hongos, son en cambio mucho más abundantes los carotenoides ácidos.

En general los hongos suelen contener mezclas muy complejas de carotenoides; así por ejemplo en *Allomyces javanicus* se encuentran γ -caroteno, β -caroteno, lycopeno, y fitoflueno (EMERSON y FOX, 1940; TURIAN y HAXO, 1954); en *Phycomyces blakesleanus* γ -caroteno, α -caroteno, β -caroteno, ξ -caroteno, lycopeno, neurosporeno, fitoflueno, y fitoeno (GOODWIN, 1952b; KARRER y col., 1948).

Las condiciones que gobiernan la carotenogénesis constituyen características específicas; la síntesis de carotenoides es independiente de la de los demás lípidos y suele verse afectada por las disponibilidades de carbono, nitrógeno y oxígeno y por la temperatura (FRIEND y GOODWIN, 1954; GOODWIN y WILLMER, 1952; NAKAYAMA y col., 1954; ZALOKAR, 1954).

La síntesis de carotenoides se halla en los hongos estimulada siempre por la luz, aunque en algunos casos puede transcurrir también en la oscuridad (ZALOKAR, 1954; ZALOKAR, 1955; GARTON y col., 1951; CHICHESTER y col., 1954).

I.3.11. Fosfolípidos.

Los fosfolípidos no suelen representar en los hongos más de un 10 % (COCHRANE, 1958) de los lípidos totales, aunque existen algunas excepciones. En *Blastomyces dermatitidis* puede llegar a representar hasta 1/3 del extracto lipídico total (PECK, 1947), en *Pithomyces chartarum*, *Stemphylium dentriticum* y *Ciliocarpus radicicola* vienen a suponer alrededor del 20 % (HARTMAN y col., 1962).

Los componentes de esta fracción más frecuentes en los hongos son fosfatidocolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. En *Aspergillus sidowi* (WOOLLEY y col., 1935) y *Blastomyces dermatitidis* (PECK, 1947) se han identificado lecitina y céfalinas. En *Neurospora crassa* se han detectado las dos céfalinas, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (ELLMAN y MITCHEL, 1954); fosfatidiletanolamina (o serina) y fosfatidicolina fueron también identificados por BENTLEY y col., 1964 en *Calvatia gigantea* y *Clitocybe illudens*. JACK (1966) observa en *Phycomyces blakesleanus*, *Lypomices lipoferus*, *Glomerella cingulata* y *Coprinus comatus*, la presencia de fosfatidicolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.

Sin embargo, repetidas veces se han aislado otros; fosfatidilinositol en *Neurospora crassa* (FULLER y TATUM, 1956), fosfatidilinositol y ácido fosfatídico en *Fusarium culmorum* (NOMBELLA y col., 1971); también se han descrito en los hongos la presencia de fosfolípidos que contienen carbohidratos (PECK, 1947).

Pocas veces se han hecho estimaciones cuantitativas que permiten establecer en los hongos la proporción relativa de cada uno de los fosfolípidos. ANDERSON y col. (1964) dan la siguiente composición de fosfolípidos de fragmentos mitocondriales de *Claviceps purpurea*: fosfatidilinositol 28 %, fosfatidicolina 27 %, fosfatidilserina 13 %, fosfatidiletanolamina 8 % y fosfatidilglicerol 7 %.

I.3.12. Glicolípidos.

Son lípidos extraordinariamente extendidos entre las bacterias y los vegetales superiores (SHAW y BADDILEY, 1968) pero no descritos en los hongos.

Descubiertos originalmente en la harina de trigo (CARTER y col., 1956), fueron pronto puestos de manifiesto en las *Micobacterias* y en otras especies por MACFARLANE (1961), POLONOVSKI y col. (1962), etc.

Los glicolípidos más importantes encontrados son los diglicosil diglicéridos. Están formados por una molécula de disacárido y una de diglicérido. Se han dividido en cinco grupos de acuerdo con la naturaleza del disacárido:

a) α -glucosilglucosil, encontrado en *S. fecalis NCIB 8191* (BRUNDISH y col., 1966), *S. pyogenes* (COHEN y PANOS, 1966) y en *Mycoplasma laidlawii* (SHAW y SMITH, 1967).

b) β -glucosilglucosil, en *Stafilococcus lactis aureus*, *Stafilococcus lactis* y *Bacillus subtilis* (BRUNDISH y col., 1967).

c) α -galactosilglucosil descubierto en diversas especies de los géneros *Lacto-*

bacillus (SHAW y BADDILEY, 1968; BRUNDISH y col., 1966; LE ROUX, 1967) y *Pneumococcus* (BRUNDISH y col., 1965; KAUFMAN y col., 1965).

d) β -galactosilgalactosil encontrado en *Arthrobacter globiformis* (WALKER y BASTL, 1967).

e) α -manosilmanosil descubierto en *Microbacterium lacticum* (SHAW, 1968) y *Micrococcus lysodeikticus* (LENNARZ y TALAMO 1966) y *Arthrobacter globiformis* (WALKER y BASTL, 1967).

Además de los diglicosil diglicéridos también se han encontrado monoglicosil diglicéridos en algunas bacterias como *Arthrobacter globiformis* (WALKER y BASTL, 1967) y *Mycoplasma laidlawii* (SHAW y SMITH, 1967) y en otras triglicosil diglicéridos como en *Lactobacillus plantarum* (BRUNDISH y col., 1966).

Como puede verse en ninguno de estos glicolípidos interviene un azúcar aminado. La primera vez que se descubrió un glicolípido que lo contuviera, lo fue hace un par de años en un microorganismo destacable por la complejidad de sus fracciones glicolipídicas.

Recientemente ISHIZUKA y YAMAKABA (1969) aislaron de *Streptococcus hemolyticus*, cuatro fracciones glicolipídicas tres de las cuales fueron identificadas como α -kojibios 1-(1-1')-diglicérido, α -kojitrioso 1-(1-1')-diglicérido, y di-o-acylated α -kojibiosyl-(1-1')-glicerilfosforil-1"-glicerol. La cuarta resultó estar compuesta por ácidos grasos esterificados, α -glucopiranósil-(1-1')-glicerol y N-acetilglucosaminil-(1,1') y N-acetilgalactosaminil-(1-1')-glicerol. Aún más recientemente PHIZA KERLEY y col. (1972) han puesto de manifiesto en *Bacillus megaterium* un 1-(0- β glucosaminil)-2-3-diglicérido.

Hasta el presente no se ha descrito ningún glicosil diglicérido en los hongos.

La importancia cuantitativa de los glicolípidos de las bacterias es muy variable; en algunas llegan a suponer hasta un 40 % sobre el total de lípidos como en *Microbacterium lacticum* y *Mycoplasma laidlawii* (SHAW y BADDILEY, 1968), aunque es posible que las condiciones culturales influyan mucho sobre este porcentaje.

Se admite que los ácidos grasos que integran los glicolípidos no difieren de los presentes en otros componenentes lipídicos.

I.3.13. Acilglicosas.

Pertenecen a dos grupos: 1) azúcares acilados y 2) glicósidos de hidroxiácidos grasos.

1) *Azúcares acilados*.—Esta nueva clase de lípidos naturales está muy extendida entre los microorganismos. Se han obtenido diversos tipos de azúcares acilados a partir de *Micoplasmas*. *Streptococcus fecalis*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *A. aerogenus* y *Propionibacterium shermani* (SMITH y MAYBERRY, 1968; WELSH y col., 1968; BRENNAN y LEHANE, 1969; PROTTEY y BALLON, 1968; SHAW y DIGLINGER, 1969).

2) *Glicósidos de hidroxiácidos grasos*.—Se han obtenido de diversas especies de levaduras, *Candida bogoriensis* (TULLOCH y col., 1968), *Torulopsis apicola* (TULLOCH y col., 1968).

En los hongos no se sabe que se hayan detectado nunca, ninguno de los dos tipos de acilglicosas.

I.3.14. Glicosfingolípidos.

1) *Hexósidos de ceramidas*.—Aunque han sido aislados de diversas fuentes naturales (hojas vegetales, tejidos animales, membrana de glóbulo graso de la leche, etcétera), no se sabe de su existencia en los hongos.

2) *Gangliósidos*.—Parecen ser exclusivos de los tejidos animales. Su presencia en los hongos no parece haber sido descrita.

I.3.15. Lipopolisacáridos.

Son lípidos propios de las paredes celulares de las bacterias Gram—; en los hongos no se han detectado compuestos de este tipo.

I.3.16. Derivados N-acilados de los aminoácidos.

Se han aislado en algunas bacterias: *Thiobacillus thiooxidans* y *Rhodospirillum rubrum* (GORCHEIN, 1968; SHIVELY y KNOCHE, 1969), así como de *Streptomyces sioyaensis* (KAWANAMI y col., 1968) donde se encuentran ésteres de N-acil-L-lisina y N-acil-L-ornitina con un polialcohol de cadena larga.

I.3.17. Sulfolípidos.

BLIX (1933) fue el primero que encontró un sulfolípido procedente de tejidos de mamíferos al que caracterizó como un sulfato cerebrósido. Este tipo de lípidos ha sido aislado posteriormente de muchas otras fuentes. BENSON y col. (1959) identificaron en cloroplastos un sulfonolípido (6-sulfo-D-quinovopiranósil-(1-1')-2', 3'-di-o-acil-D-glicerol). HAINES (1965) encontró 1,14-docosyl disulfato en bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. MAYER y col. (1969) aislaron de *Ochromonas danica* un sulfolípido que caracterizaron como 1,14 S-docosanediol-1,14-disulfato. En los hongos parece ser que no han sido detectados compuestos parecidos.

I. 4. LOCALIZACION CELULAR Y FUNCION DE LOS LIPIDOS EN LOS HONGOS.

Los lípidos fúngicos se hallan formando gránulos protoplasmáticos (liposomas) que se tiñen con Sudan III (o IV) y otros colorantes lipídicos, o formando parte de las estructuras membranosas.

I. 4.1. Distribución de los lípidos neutros.

Los liposomas o esferosomas contienen la mayor parte de los lípidos neutros (especialmente glicéridos) y son particularmente abundantes en las células viejas y en las que crecen en condiciones anormales; se trata de un fenómeno en cierto sentido similar al de las degeneraciones grasas de las células animales. Algunos lípidos neutros deben encontrarse, sin embargo, asociados también a las estructuras membranosas; tal debe ser el caso del ergosterol, los carotenoides y los alcoholes poliprenoides.

Se poseen pocos datos que demuestren con carácter definitivo que el ergosterol forme parte de las estructuras membranosas, pero tradicionalmente ha venido admitiéndose este hecho, basándose en la función que el colesterol desempeña en las células de los animales y de su capacidad de interaccionar con la nistatina (LAMPEN y col., 1962) y recientemente se ha demostrado en algunos casos.

STONE y HEMMING (1968) estudiaron la distribución del ergosterol y los hexahidropoliprenoles en distintas fracciones subcelulares de *Aspergillus fumigatus*, observando que los proliprenoles esterificados se hallaban homogéneamente distribuidos en las mitocondrias, los microsomas y la fracción soluble, en tanto que los poliprenoles libres estaban concentrados en las mitocondrias, y el ergosterol libre y esterificado se hallaban asociados a las mitocondrias y microsomas. Debe señalarse, sin embargo, que en *Neurospora* se han observado cristales hexagonales aislados de ergosterol, de alrededor de 1 μ de diámetro (TSUDA y TATUM, 1961).

Los carotenoides se acumulan también en las mitocondrias, especialmente durante la maduración del micelio, lo que se interpreta, precisamente, como indicio de que éste es el lugar de su síntesis (HEIN, 1964 a, b); sin embargo, también se encuentran carotenoides, con frecuencia, en los liposomas (GUILLIERMOND, 1941) e incluso en formaciones cristalinas independientes (HEIN, 1964 a, b).

I. 4.2. Lípidos de la pared celular.

Se ha discutido ampliamente si los lípidos entran o no a formar parte de la pared celular de los hongos. Las observaciones iniciales parecían mostrar que al igual que en las bacterias, en las que puede señalarse una diferencia clara entre el contenido lipídico de la pared celular de las Gram positivas (casi nulo con excepción de las micobacterias donde puede llegar a alcanzar cifras del orden del 60 %) y las Gram negativas, el contenido lipídico de las paredes de hongos y levaduras varía considerablemente. ARONSON y MACHILIS (1959), por ejemplo, no encuentran lípidos en las paredes de *Allomyces macrogynus*, en cambio NORCOTHE y HORNE (1952) dan cifras de 8,5 % del peso seco en *Saccharomyces cerevisiae* y BARTNICKI GARCÍA y NICKERSON (1962) observan un 7,8 % en la forma filamentosa de *Mucor rouxii*. KREGER (1954) cita valores de material lipídico en la pared del esporangióforo de *Phycomyces* que llegan hasta el 25 % del extracto seco.

Al interpretar estos datos, sin embargo, surgieron serias dudas respecto a si los lípidos observados en las correspondientes fracciones formaban realmente parte de la pared celular.

Recientemente DYKE (1964) puso de manifiesto que al menos en *Nadsodia elongata*, la fracción lipídica aislada de su pared celular era un componente auténtico de la misma y no un contaminante, observando que los lípidos de la pared celular carecían de ácido palmitoleico y se hallaban compuestos fundamentalmente por ácidos grasos saturados al contrario de lo que ocurría en los lípidos citoplasmáticos.

El papel desempeñado por los lípidos en las paredes celulares no ha sido aún aclarado; cualquier afirmación al respecto debe considerarse hoy como meramente especulativa.

Las investigaciones de HURST (1952) sobre la orientación de los lípidos en las paredes celulares de las levaduras han sugerido su contribución directa a la arquitectura celular; tal contribución no ha sido, sin embargo, convenientemente estudiada y lo único que se sabe al respecto es que las células de levadura completamente deshidratadas mantienen su conformación normal y que se aplastan si son extraídos con disolventes orgánicos.

BARTNICKI GARCÍA (1962) sugiere que el papel desempeñado por los lípidos en algunas estructuras celulares, como esporas y esporangióforos, es el de conferir cierta hidrofobicidad.

I. 4.3. Lípidos de la membrana citoplasmática.

La membrana citoplasmática de los hongos contiene también cantidades variables de lípidos. Los datos de que se dispone para juzgar su composición no corresponden a hongos filamentosos sino a levaduras. GARCÍA MENDOZA y VILLANUEVA (1965) dan cifras de lípidos que representan el 40 % del peso seco en *Candida utilis*. Cifras similares dan BOLTON y EDY (1962) y LONGLEY y col. (1968).

El papel que los lípidos desempeñan aquí es más claro. Los lípidos forman una doble capa con las porciones hidrofóbicas de ambas ocupando una posición central y las hidrofílicas proyectándose hacia el exterior interaccionando con una capa de proteína a ambos lados de la membrana.

La composición de los lípidos de la membrana es, en líneas generales, muy semejante a la de los de la célula entera; en la membrana de *Saccharomyces cerevisiae* LONGLEY y col. (1968) observan la presencia de mono y diglicéridos, triglicéridos, ácidos grasos libres, esteroles, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina y ácido fosfatídico. Las proporciones de cada uno de ellos son similares en la membrana protoplasmática y las células enteras, pero las membranas contienen algo más de fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. Su composición en ácidos grasos resulta prácticamente idéntica.

I.4.4. Lípidos de las mitocondrias.

Los hongos se encuentran entre los primeros organismos en los que se desmostró la presencia de mitocondrias. Pese a ello apenas si se conoce la composición de las mitocondrias fúngicas salvo por extrapolación de los datos obtenidos de las mitocondrias de los mamíferos donde los lípidos constituyen alrededor de un 30 % del peso seco total.

La fracción lipídica de las mismas se halla constituida por fosfolípidos en un 90-95 %, especialmente lecitina y cefalinas; contiene además esteroles (1-2 %), ubiquinona (0,5 %) y carotenoides.

En mitocondrias de levaduras, LESTER (1963) demostró que el 10 % de los fosfolípidos está representado por la cardiolipina y ANDERSON y col. (1964) observaron la siguiente composición fosfolipídica de las partículas submitocondriales de *Claviceps purpurea*: fosfatidilinositol 28 %, fosfatidilcolina 27 %, fosfatidilserina 13 %, fosfatidiletanolamina 18 %, poliglicerol fosfátidos 7 % y un 7 % de residuos.

STONE y HEMMING (1968) ponen de manifiesto la presencia de diversos lípidos neutros en las mitocondrias de *Aspergillus fumigatus* en concentraciones muy elevadas en términos de porcentajes del total de los mismos presentes en las células enteras. Observan que la ubiquinona mitocondrial representa el 77 % del contenido total de la célula, los ésteres de alcoholes poliprenoides el 24 %, los alcoholes poliprenoides libres el 77 %, el ergosterol libre el 61,3 % y los ésteres de ergosterol el 54 %.

La composición lipídica de *Hemispora stellata* y otros hongos afines es totalmente desconocida, si se exceptúan los escasos datos aportados por SALA (1969).

En la presente tesis se pretende efectuar un estudio de la misma, tanto en el aspecto cualitativo como cuantitativo y aclarar las posibles variaciones de los ácidos grasos que forman parte de cada una de las fracciones que se obtengan.

II

MATERIAL Y METODOS

II.1. PRODUCTOS

II.1.1. *Reactivos.*

Todos los productos químicos utilizados en las diversas reacciones a que se alude a lo largo de esta tesis fueron de calidad reactivo, suministrados por Merck, Schuchardt y British Drug House.

En la preparación de los medios de cultivo se emplearon productos Oxoid, salvo los componentes minerales suministrados por Probus.

Todas las disoluciones acuosas se efectuaron en agua desionizada (Desmineralizador «Seta») o destilada en vidrio.

II.1.2. *Sopores cromatográficos.*

Todos los sopores cromatográficos empleados fueron suministrados por la British Drug House, menos la sílica gel que fue suministrada por Merck.

La sílica gel empleada fue necesario lavarla con el fin de eliminar el material orgánico que contenía, siguiendo la técnica descrita por HARDY y MACKIE (1969), para lo cual se empaquetó en una columna cromatográfica y se lavó con una mezcla de cloroformo-metanol (2/1). Los restos de cloroformo-metanol se eliminaron con benceno y éste, a su vez, por calentamiento a 110º C.

II.1.3. *Disolventes.*

Los disolventes empleados en las extracciones y cromatografías fueron de calidad Merck, redestilados en el laboratorio, con excepción del éter etílico y el éter de petróleo.

El éter etílico se deshidrató con alambre de sodio, preparado por extrusión en una prensa, y se liberó de peróxidos por destilación sobre polvo de hierro reducido.

El éter de petróleo (40-60º C), se preparó por destilación fraccionada de gasolina-éter (C. A. M. P. S. A.) utilizando una columna de Hempel, con una camisa de vacío recubierta de baño de mercurio, aislada externamente con amianto y rellena de anillos de Rasching.

II.1.4. Disolventes para espectrofotometría.

Los disolventes utilizados para los análisis espetrofotométricos fueron purificados en el laboratorio a partir de muestras comerciales relativamente puras.

El etanol fue purificado hirviendo a reflujo, durante seis horas, dos litros de etanol absoluto (Alcoholera Española), con 80 gramos de Na OH y 20 gramos de granalla de zinc, y destilando a continuación con columna de fraccionamiento.

El ciclohexano se purificó siguiendo una modificación del método empleado por B. VAN DER VEN y A. P. JONGE (1957), para la preparación de éter de petróleo espetrofotométricamente puro. Para ello se hirvió a reflujo, durante siete horas,

una mezcla de (10/1/1) de ciclohexano, ácido sulfúrico concentrado y nítrico fumante; se preparó el agente de nitración con ayuda de un embudo de decantación y se lavó dos veces ciclohexano con un décimo de su volumen de agua destilada en un embudo de decantación y ocho veces con 1/10 de su volumen de una solución de KOH al 20 %. Luego se sometió a una destilación fraccionada utilizando una columna de Vigreux; se agitó a continuación con carbón activado y el carbón se eliminó por centrifugación durante cinco minutos a 1.500 g. El ciclohexano se pasó luego, primero por una columna de sílica gel y después por otra de alúmina; finalmente se redestiló fraccionadamente con ayuda de una columna de Vigreux. El ciclohexano así obtenido tiene una absorbancia de 0,03 a 220 m μ s.

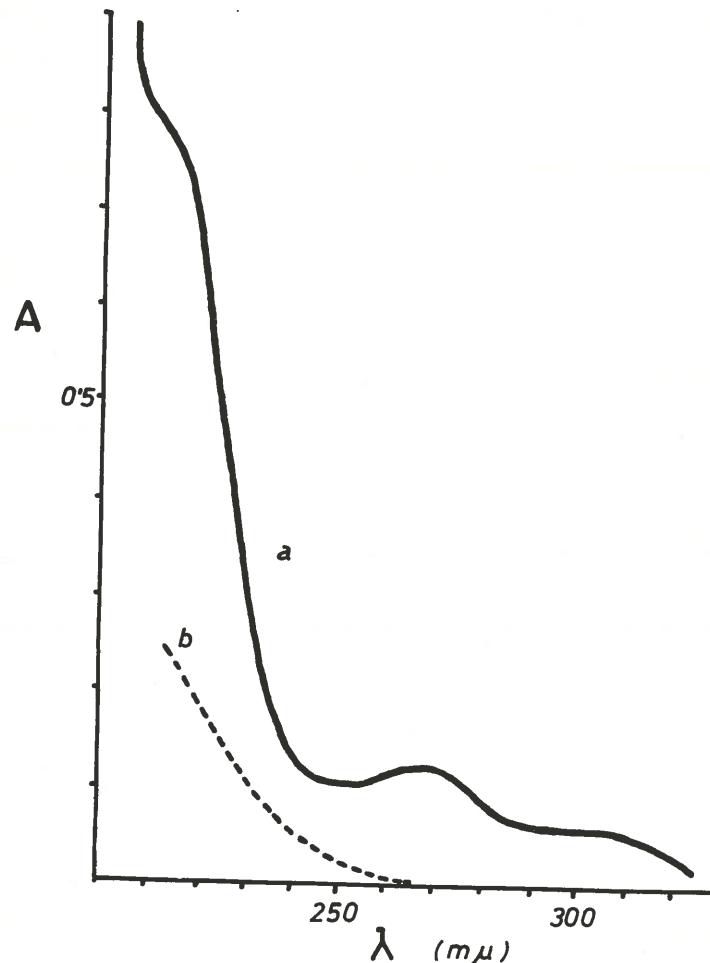


Figura 1.—Pureza espetrofotométrica del etanol. Referencia: agua.
(a) espectro del etanol antes de la purificación.
(b) espectro del etanol purificado.

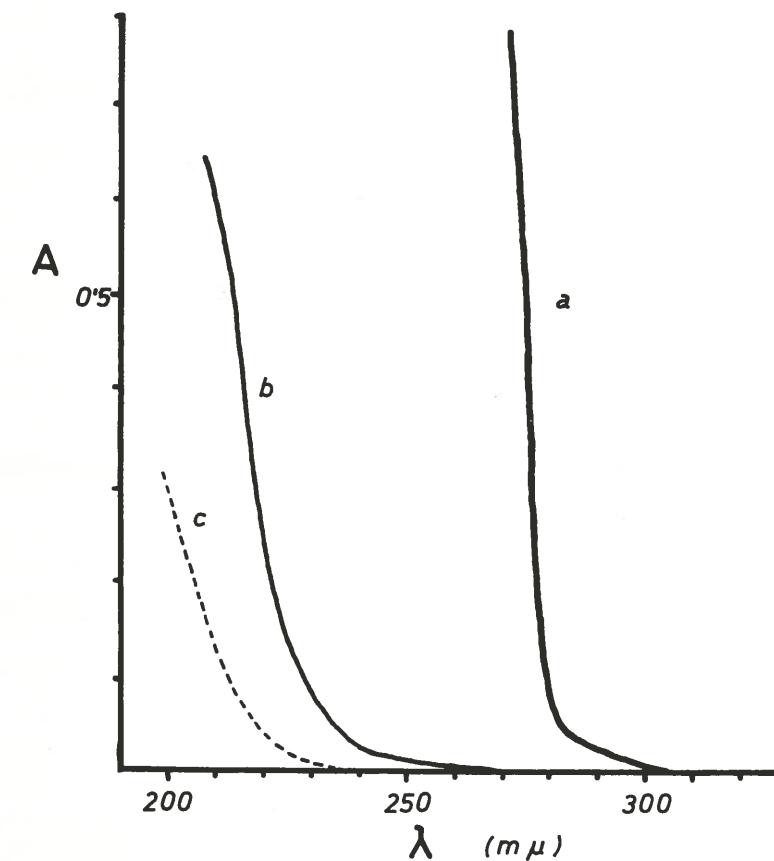


Figura 2.—Pureza espetrofotométrica del ciclohexano.
(a) espectro del ciclohexano Schuchardt, del que se partió.
(b) espectro del ciclohexano espetrofotométricamente puro, Merck.
(c) espectro del ciclohexano purificado.

II.1.5. Gases.

Para eliminar los disolventes orgánicos se empleó nitrógeno suministrado por Oxígeno y Acetileno de León. Para la cromatografía en fase gaseosa se usaron nitrógeno, hidrógeno y aire, de alto grado de pureza, suministrados por la Sociedad Española de Oxígeno.

II.2. MATERIAL

II.2.1. Material general.

Las pesadas de precisión se efectuaron en una balanza analítica «Sartorius» mod. 2.400. Las pesadas más groseras se efectuaron en un granatario «Ohaus».

La esterilización de pequeñas cantidades de medio se llevaron a cabo en una olla a presión «Laster» de 14 litros. Los medios y el material más voluminosos se esterilizaron en una autoclave «Averly» serie «Nova» n.º 5.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga «Martin Christ» Universal Junior I, modelo 33.000.

Para las incubaciones de los cultivos sólidos utilizados para la obtención de esporas, se empleó una cámara de incubación provista de termostato y radiador de calor negro «Tymesa» de 750 watos. Para la obtención de micelio en medio líquido se empleó un agitador incubador «New-Brunswick», modelo G-25.

El almacenamiento de esporas y micelio en espera de ser liofilizados y del extracto seco liofilizado se efectuó a -25°C en un congelador «Helios» modelo «Helifrost», donde se guardaron también los extractos lipídicos y los lípidos purificados cuando el período de almacenamiento excedía de un día. Para el almacenamiento a plazo corto se empleó un frigorífico «Odag».

Las siembras y recogidas de esporas y micelio se efectuaron en una cámara de siembra equipada con lámparas U. V. «Phillips» de 15 watos.

Las determinaciones colorimétricas se realizaron en un colorímetro «Bauch & Lomb», modelo «Spectronic-20».

Los registros espectrofotométricos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro «Beckman», modelo DB, equipado con registrador «lin-log» y expensor de escala.

Las mediciones de vacío se efectuaron con un vacuómetro compresión «Centesima» Afora.

II.2.2. Cromatografías.

a) *Columna*.—Las cromatografías en columna se efectuaron en columnas «Afora» provistas de placa filtrante de vidrio y llave de teflón.

b) *Lámina fina*.—Las láminas empleadas en la cromatografía en lámina fina

se prepararon con un aparato «Desaga». La cubeta en la que se desarrollaron era de la misma marca.

c) *Papel*.—Para las cromatografías en papel se utilizó papel de Watman n.º 1. Se empleó un tanque cromatográfico «Shandon».

d) *Gaseosa*.—Para la cromatografía en fase gaseosa se empleó un cromatógrafo de gases «Perkin-Elmer», modelo F-11, provisto de ionizador de llama y programador de temperaturas. Las columnas empleadas fueron de vidrio y como fase estacionaria se utilizó Dietilenglicol succinato al 10 % sobre soporte Cromosorb 80-100 mallas lavado al ácido y tratado con hexametildisilazano.

II.2.3. Liofilizaciones.

Las liofilizaciones se efectuaron en un aparato «Quickfit» equipado con una bomba de alto vacío «Edward» modelo, «ED-35» y dos condensadores de acetona-nieve carbónica.

II.2.4. Microsublimaciones

Las microsublimaciones realizadas para purificar los ácidos grasos se realizaron siguiendo la técnica de STOFFEL y col. (1959), para lo cual se utilizó una bomba de alto vacío «Edward», modelo «ED-35», un baño termostático «Braun», modelo «Thermomix-II» y un vacuómetro «Afora» «Centesima».

II.2.5. Microscopia.

Las observaciones microscópicas se realizaron con un microscopio «Ernst-Leitz». Los recuentos de las esporas se efectuaron en una cámara de «Neubauer».

II.2.6. Concentraciones de volumen.

Las concentraciones de grandes volúmenes se efectuaron en un Roto-vapor «Büchi» equipado con bomba de vacío de paletas «Speedvac».

II.3. PROCEDENCIA DE LA CEPA UTILIZADA

A lo largo de este trabajo se ha empleado una cepa de *Hemispora stellata* (VUILLEMIN; sin. *Sporendonema epizoum*, CIFERRI y REDAElli), suministrada por el «Centraal-Bureau voor Schimmel-cultures» (Baarn-Holanda), única colección en el mundo en que figura.

II.4. METODOS

II.4.1. Obtención y almacenamiento del producto biológico.

II.4.1.1. Esterilización del material

El material de vidrio fue esterilizado al autoclave 15 minutos a 1 atmósfera.

II.4.1.2. Medio de cultivo de salvado.

Para la obtención de esporas se empleó un medio de cultivo constituido por salvado de trigo y una disolución de ClNa, pobre en proteínas, excelente para la obtención de esporas. Su composición es la siguiente:

- salvado de trigo: 100 grs. (cribado para eliminar las partículas menores).
- solución de ClNa al 10 % 65 mls.

Este medio de cultivo se preparó cribando el salvado a través de una tela metálica de unas 40 mallas/cm²; adicionando por cada 100 grs. de salvado así preparado, 66 mls. de una solución al 10 % de ClNa, y removiendo la mezcla a medida que se adicionaba la solución de ClNa, para lograr una perfecta distribución de la sal. El medio de cultivo así preparado se distribuyó en los erlenmeyer y frascos de Roux en las siguientes cantidades:

—erlenmeyer de 2 litros	135 grs.
—erlenmeyer de 1 litro	65-70 grs.
—frascos de Roux	65-70 grs.

Los recipientes se taparon luego con algodón hidrófilo y se esterilizaron en el autoclave, durante 20 min., a dos atmósferas.

II.4.1.3. Medio líquido de Vaisey.

Para la producción de micelio a partir de conidios recogidos de medio de salvado, se ha utilizado un medio líquido basado en el descrito por VAISEY (1954), preparado con los siguientes reactivos en las proporciones que se indican:

—hidrolizado de caseína	10 grs.
—dextrosa	10 grs.
—sulfato de magnesio.	200 mgrs.
—sulfato ferroso	20 mgrs.
—fosfato bipotásico	1 grs.
—cloruro sódico	75 grs.
—agua desionizada hasta volumen total de 1 litro.	

El medio de cultivo de Vaisey se distribuyó en fracciones de 100 mls. en erlenmeyer de 500 mls. y se esterilizó en el autoclave 15 minutos a 1 atmósfera.

II.4.1.4. Siembras.

Las siembras se efectuaron siempre en la cámara estéril, sometida a la acción de los rayos ultravioleta, salvo durante el trabajo.

a) *En frascos de Roux y Erlenmeyer.*—Los frascos de Roux y Erlenmeyer se sembraron con una suspensión de esporas contenido alrededor de $1 \text{ ó } 2 \times 10^9$ con./ml. Se distribuyó homogéneamente en el salvado con la ayuda de una varilla de vidrio, esterilizada a la llama, y agitando a mano. Los recipientes así sembrados se incubaron a 25º C.

b) *En medio de Vaisey.*—Los erlenmeyer de una capacidad de 500 mls. conteniendo 100 mls. de medio de cultivo de Vaisey se sembraron con ayuda de pipetas estériles, con 4 mls. de inóculo, de una suspensión de conidios de una concentración de 10^9 con./ml...

II.4.1.5. Recogida de esporas.

Las esporas producidas en los recipientes con medio de cultivo de salvado se recogieron tras un período de incubación de 3-5 días a 25º C, en la cámara de siembra.

Para ello se agitó el contenido de los recipientes con una suspensión de ClNa estéril al 15-20 %, que se pasó de uno a otro frasco utilizando la mínima cantidad posible, con objeto de concentrar al máximo la suspensión de esporas para facilitar la operación y el posterior almacenamiento. Efectuado así una primera extracción de todos los recipientes se repitió con nuevas cantidades de la disolución de ClNa hasta que la solución salina sólo tomaba tenue color marrón (2-3 extracciones), al objeto de efectuar una extracción eficaz. La recogida resulta más eficaz permitiendo en la primera extracción de cada recipiente, que la disolución salina empape durante unos minutos (3-5) el cultivo con agitación intermitente.

Para garantizar la esterilidad al iniciar las extracciones se cambió el tapón de algodón de los recipientes por un papel de aluminio que es de fácil manejo y puede ser esterilizado a la llama del mechero. El paso de las suspensiones de esporas de unos recipientes a otros se efectuó bajo la campana de un embudo estéril con objeto de evitar contaminaciones.

De esta forma se obtiene una suspensión marrón (de color tanto más intenso cuánto mayor es la concentración de esporas) que, además de esporas y fragmentos de hifas, contiene cierta cantidad de salvado. Parte del salvado se eliminó de la suspensión, por filtración a través de varias capas de gasa hidrófila y pasó a través de un cedazo de 0,012 mm. de luz. La suspensión parcialmente purificada se centrifugó, el sedimento constituido por una pasta que contenía las esporas se resuspendió en agua destilada estéril y se centrifugó de nuevo para eliminar el almidón que se deposita en la superficie del sedimento. Esta operación se repitió las veces necesarias para obtener una pasta de color negruzco, constituida únicamente por esporas.

La limpia de las esporas se confirmó mediante el examen microscópico; cuando la suspensión no resultó suficientemente pura se repitieron las centrifugaciones. Las esporas así obtenidas se almacenaron a -25°C hasta su liofilización.

II.4.1.6. *Obtención del micelio cultivado en profundidad.*

Se sembraron como se describe en II.4.1.4.b, erlenmeyers de 500 mls., con 100 mls. de medio de cultivo. Los erlenmeyers fueron incubados a 25°C y 230 agit./min., durante 48 horas. Al cabo de este tiempo se procedió a la recogida que se efectuó centrifugando el medio durante 5 minutos a 3.000 revoluciones/minuto. El micelio sedimentado se conservó a -25°C hasta su liofilización.

II.4.2. *Métodos analíticos.*

II.4.2.1. *Liofilización y obtención de extracto seco.*

Las esporas y el micelio obtenido en forma de pasta se repartieron en los matraces necesarios, con la ayuda de una espátula, formando una capa fina y uniforme; se congelaron en nieve carbónica-acetona y se liofilizaron, utilizando también la citada mezcla para enfriar los condensadores. El producto de la liofilización se pesó y el peso así obtenido es el considerado como extracto seco. El producto liofilizado se almacenó a -25°C hasta su extracción.

Como preparación para la extracción con disolventes los extractos secos así obtenidos, de esporas y micelio, se trituraron en un mortero con alúmina hasta la obtención de un polvo finísimo.

II.4.2.2. *Método general de obtención de extractos lipídicos.*

a) *Extracción con cloroformo-metanol (2/1).*—El producto de la liofilización se extrajo con una mezcla de cloroformo-metanol (2/1) (v/v), durante tres horas, a la temperatura ambiente y en agitación continua, con 10 mls. por cada gramo de peso seco. Durante este tiempo se mantuvo protegido de la luz. Esta operación se repitió dos veces más.

b) *Extracción con metanol a reflujo.*—Después de la extracción con cloroformo-metanol (2/1) se extrajo el residuo con metanol en caliente (5 mls. por cada gramo de peso seco original) durante dos horas. En todo momento se mantuvo el sistema protegido de la luz. Esta operación se repitió dos veces más.

c) *Extracción con acetona-etanol (1/1) (v/v) y ClH al 1 %.*—El residuo seco, previamente extraído con cloroformo-metanol y metanol en caliente, se extrajo de nuevo con una mezcla de acetona-etanol (1/1) (v/v), acidificada con 1 % de ácido clorhídrico, mediante ebullición a reflujo durante dos horas, con 10 mls. de disolvente por cada gramo de peso seco. Esta operación se repitió dos veces más.

II.4.2.3. *Eliminación de disolventes.*

Los extractos voluminosos se concentraron en el Roto-vapor hasta alcanzar un volumen de 25-50 mls.; los restos de disolventes se eliminaron por evaporación bajo corriente de nitrógeno y evacuación final a vacío durante 1-2 horas.

Los extractos lipídicos brutos, así obtenidos, se pesaron y fueron posteriormente purificados antes de su fraccionamiento.

II.4.2.4. *Purificación del extracto lipídico.*

La eliminación del material no lipídico presenta en los extractos brutos obtenidos con cloroformo-metanol (2/1), metanol en caliente y acetona-etanol (1/1) acidificado con ácido clorhídrico (1 %), se realizó siguiendo el método de Folch.

Los extractos, desprovistos de los disolventes que se obtuvieron, se disolvieron ahora en cloroformo-metanol (2/1) y se lavaron, por agitación en un embudo de separación, con 0,2 volúmenes de una disolución acuosa conteniendo:

—cloruro magnésico	0,017 %
—cloruro sódico	0,29 %
—cloruro cálcico	0,02 %
—cloruro potásico	0,37 %

Para acelerar y completar la separación de las fases se pasaron las muestras a tubos de centrifuga (de vidrio) de 100 mls. y se centrifugaron a 1.500 r. p. m. durante 15 minutos. Se desechó la fase acuosa y la inferior, constituida por el material soluble en cloroformo-metanol, se emulsionó de nuevo con un volumen de una mezcla de:

—cloroformo	3 volúmenes
—metanol	48 volúmenes
—disolución anterior	47 volúmenes

agitando otra vez intensamente en un embudo de separación. Se centrifugó de nuevo para separar las dos fases formadas, conservando la inferior que contiene el material lipídico. Esta operación se repitió varias veces, hasta que en la fase superior no se aprecia color alguno (3-4 veces).

Las fases inferiores, que contenían el material lipídico purificado, se concentraron y los restos de disolventes se eliminaron en corriente de nitrógeno al abrigo de la luz. Los extractos purificados se pesaron independientemente.

Para su posterior fraccionamiento se mezclaron, sin embargo, los extractos obtenidos con cloroformo-metanol y metanol en caliente, a cuya suma se considera como lípidos fácilmente extractibles.

II.4.2.5. Fraccionamiento con ácido silílico-celita del extracto lipídico purificado.

a) Preparación de la columna.

Se depositaron sobre un mortero contenido una mezcla de cloroformo-metanol (98/2) (v/v), ácido silílico y celita mezclados en las proporciones 4-1; se homogeneizó la mezcla con objeto de lograr una distribución perfecta del ácido silílico y la celita; la suspensión así formada se vertió, con ayuda de nuevas cantidades de la citada mezcla de cloroformo-metanol, sobre la columna cromatográfica adecuada. La relación altura/diámetro se estableció, en todos los casos, en un valor 12.5.

El ácido silílico fue calentado, antes de su empleo, durante 12 horas a una temperatura de 110° C.

b) Colocación de la muestra.

Los extractos a cromatografiar se disolvieron en la mínima cantidad posible de una mezcla de cloroformo-metanol (98/2) (v/v) y se depositaron cuidadosamente sobre la superficie del lecho cromatográfico, protegido por una capa de un centímetro de la mezcla de disolventes.

c) Desarrollo de la cromatografía.

La columna se desarrolló con una serie eluotrópica constituida por las siguientes mezclas de disolventes (cloroformo y metanol):

Fracción 1 cloroformo 98 % metanol	2 %
Fracción 2 cloroformo 97 % metanol	3 %
Fracción 3 cloroformo 96 % metanol	4 %
Fracción 4 cloroformo 95 % metanol	5 %
Fracción 5 cloroformo 90 % metanol	10 %
Fracción 6 cloroformo 85 % metanol	15 %
Fracción 7 cloroformo 80 % metanol	20 %
Fracción 8 metanol 100 %	

Durante todo el desarrollo de la cromatografía se protegieron de la luz tanto la columna como las fracciones recogidas.

II.4.2.6. Fraccionamiento de los lípidos apolares en columna de sílica gel.

Para el fraccionamiento de los lípidos apolares, obtenidos de la columna anterior, se utilizó un método de cromatografía en columna de sílica gel que se ajusta en lo esencial al descrito por SMITH y col. (1969).

a) Preparación de la columna.

Se prepararon columnas, con un cociente altura/diámetro 7, con sílica gel G lavada con mezclas de cloroformo-metanol en la proporción 2/1 y activada después por calentamiento durante 30 minutos a 110° C.

Para la preparación de las columnas se homogeneizó en un mortero la cantidad necesaria de sílica gel G con unos mililitros de benceno, hasta formar una suspensión homogénea, y se vertió, con ayuda de un embudo y más benceno, sobre la columna apropiada.

b) Colocación de la muestra.

Las muestras a cromatografiar se disolvieron en 2-4 mls. de benceno y se depositaron con cuidado sobre el lecho cromatográfico. Las columnas se cargaron con 100-125 mgrs. de lípidos neutros por cada 20 grs. de sílica gel.

c) Desarrollo de la cromatografía.

La cromatografía se desarrolló con mezclas de benceno, éter, etanol y metanol, recogiéndose 15 fracciones de acuerdo con el siguiente esquema:

Facción	Disolvente	Volumen
1	benceno	20 mls.
2	»	10 »
3	»	20
4	»	10 »
5	benceno / éter / etanol (80/19/1)	10 »
6	» » »	40
7	» » »	50 »
8	» » »	40 »
9	» » »	30 »
10	benceno / éter / etanol (30/67/3)	70 »
11	éter	40 »
12	»	30 »
13	metanol	10 »
14	»	40 »
15	»	10 »

Los volúmenes que figuran en el esquema fueron los empleados en columnas con 20 gramos de sílica gel. Cuando fue necesario usar cantidades distintas de soporte, se alteraron proporcionalmente las cantidades de disolventes.

El flujo se ajustó siempre a 1,6 mls./min., utilizando para ello, cuando fue necesario, sobrepresión con ayuda de nitrógeno. El mantenimiento de este flujo resultó imprescindible para lograr resultados reproductibles.

II.4.2.7. Cromatografías en columna de alúmina.

a) Preparación de la columna.

Se pesó una determinada cantidad de alúmina y se vertió en un mortero que contenía éter de petróleo (40-60° C). Se añadió la cantidad de agua necesaria para

ajustar la actividad del absorbente al grado tres de Brockman y se homogeneizó con objeto de lograr la perfecta distribución del agua. La alúmina así preparada se vertió con más éter de petróleo sobre la columna cromatográfica adecuada.

b) *Colocación de la muestra.*

Las muestras a cromatografiar se disolvieron en una pequeña cantidad de éter de petróleo (40-60° C) y se depositaron cuidadosamente sobre la superficie del lecho cromatográfico, protegido por 1-2 cms. de éter de petróleo.

c) *Desarrollo de la cromatografía.*

Una vez depositada la muestra, se desarrolló con series eluotrópicas constituidas por mezclas de éter etílico, deshidratado y libre de peróxidos, y éter de petróleo (40-60° C).

Tanto en la colocación de la muestra como durante el desarrollo de la cromatografía y la obtención de fracciones, se puso especial cuidado en proteger el sistema contra la luz con el objeto de evitar la destrucción de las sustancias fotolábiles cromatografiadas.

II.4.2.8. Cromatografía de absorción en capa fina de sílica gel G.

a) *Preparación de las capas.*

Las placas de vidrio se lavaron con detergente y se aclararon primero con agua del grifo y luego con agua desionizada; después de secas se almacenaron entre hojas de papel de filtro.

Las capas finas se formaron con sílica gel G para cromatografía en lámina fina, 10-40 μ de diámetro, previamente sometida al procedimiento de lavado con disolventes descritos en II.1.2.; para ello se mezclaron, en un erlenmeyer de 500 mls., 30 grs. de sílica gel con 40 mls. de agua destilada; al cabo de 10-20 segundos se añadieron 20 mls. más de agua destilada; se formó así una pasta que se agitó energicamente durante 1 $\frac{1}{4}$ — 1 $\frac{1}{2}$ minutos y se extendió rápidamente sobre las placas de vidrio; el espesor de las capas usadas fue invariablemente de 250 micras.

Durante cinco minutos se mantuvieron al aire con el fin de evaporar parte del agua y no dañar la superficie de la capa durante su manipulación. Luego se introdujeron en una estufa a 110° C y se mantuvieron en ella durante 30 minutos; una vez secas se guardaron, hasta su empleo, en un desecador sobre Cl₂Ca.

b) *Colocación de la muestra.*

Las muestras se depositaron sobre las capas finas mediante un capilar o pipeta micrométrica, disueltas en los disolventes apropiados, procurando no dañar las superficies de las capas.

c) *Desarrollo de la cromatografía.*

La cromatografía se desarrolló con las mezclas de disolventes que en cada caso se indica, recubriendo la parte interna del tanque con una hoja de papel de filtro empapado en el disolvente, al objeto de acelerar el equilibrio.

II.4.2.9. Cromatografía de partición en capa fina de sílica gel.

Se usó para la caracterización de la ubiquinona.

a) *Impregnación de las placas.*

Se prepararon las placas por el procedimiento descrito para las cromatografías de absorción; se introdujeron verticalmente, con el extremo que iba a colocarse la muestra hacia abajo, en una bandeja que contenía 5 % de parafina líquida en éter de petróleo (60-80° C), sumergiendo el extremo inferior aproximadamente 1 cm. Se inclinó lentamente la placa con la lámina de gel de sílice hacia abajo, hasta que la parafina llegase al extremo superior de la placa. Se retiró la placa después invirtiendo el proceso y se dejó secar a temperatura ambiente unos 60 segundos.

b) *Colocación de la muestra.*

Se efectuó disuelta en ciclohexano con la ayuda de un capilar.

c) *Desarrollo de la cromatografía.*

Se utilizó como fase móvil una mezcla de acetona-agua (95/5) (v/v).

II.4.2.10. Reactivos empleados para el revelado en lámina fina.

El revelado de las placas se efectuó rociándolas con reactivos generales capaces de poner de manifiesto todos los lípidos y con reactivos específicos destinados a visualizar determinados componentes.

A.—*Reactivos generales.*

1) *Ácido sulfúrico.*—Se rociaron las placas con una disolución de ácido sulfúrico al 50 % y se sometieron luego, durante 1/2-1 hora, a una temperatura de 100° C.

2) *Rodamina 6G.*—Disolución al 0,005 % de rodamina 6G en agua. Los lípidos se ponen inmediatamente de manifiesto al exponer las placas a la acción de los rayos de la lámpara U. V.

3) *Iodo.*—Se pulverizaron las placas con una disolución al 1 % de iodo en cloroformo. Inicialmente toda la placa se tiñe aunque con mayor intensidad en las zonas donde se hallan las manchas de lípidos; la coloración de fondo desaparece pronto.

B.—*Reactivos específicos.*

1) *Reactivio de ninhidrina.*—Para identificar la presencia de grupos amina, se empleó el reactivo de ninhidrina (WAGNER y col., 1961), constituido por una disolución de ninhidrina al 0,2 % en una mezcla de 95 mls. de butanol y 5 mls. de ácido acético al 10 %. Las placas impregnadas con este reactivo se calentaron a 110° C, durante unos minutos, hasta la aparición de un color rojo-violeta, demostrativo de la presencia de grupos amina.

2) *Reactivio de iodo-ioduro potásico.*

Para la identificación de grupos colina se empleó un reactivo constituido por una disolución de iodo al 0,3 % en ioduro potásico al 5 %. Después de rociar las placas se mantiene a la temperatura ambiente durante unos minutos; aparece así un

color castaño sobre las manchas constituidas por fosfolípidos que contienen grupos colina.

3) *Reactivos de difenilamina.*

La presencia de lípidos que contienen hidratos de carbono, fue inicialmente detectada con el reactivo de difenilamina (DISCHE, 1929).

El reactivo se preparó mezclando 20 mls. de una disolución alcohólica al 10 % de difenilamina, 100 mls. de ácido clorhídrico concentrado y 80 mls. de ácido acético. Las placas pulverizadas con este reactivo se introdujeron en una estufa a 105° C durante 30 minutos; al cabo de este tiempo aparecen, donde existen glicolípidos, manchas de color azul-grisáceo sobre fondo casi incoloro.

4) *Reactivos periodato-Schiff.*

Posteriormente y con el mismo objeto se empleó el reactivo periodato-Schiff (SIIAW, 1968) utilizando los siguientes reactivos:

- disolución acuosa de periodato sódico al 1 %.
- dióxido de azufre, obtenido haciendo reaccionar ácido sulfúrico con bisulfato sódico, de acuerdo con la siguiente reacción:



c) reactivo de SCHIFF: disolución de clorhidrato de pararrosaanilina al 1 % en agua; antes de usarlo se decolora por saturación con dióxido de azufre, conectando el recipiente que contiene la disolución de pararrosaanilina con el reactor en que se produce el SO₂ y dejando burbujear éste durante 30-40 minutos.

Las placas tras el desarrollo de la cromatografía se mantuvieron al aire durante unos minutos, hasta que estuvieron secas; se pulverizaron luego con la disolución de periodato y se mantuvieron durante 5-10 minutos al medio ambiente; a continuación se trataron con dióxido de azufre para eliminar el exceso de periodato sódico; luego se pulverizaron, ligeramente, con el reactivo de Schiff.

Los glicolípidos se tiñen rápidamente de un color azulado, cuya intensidad aumenta a medida que pasa el tiempo.

5) *Leuco-azul de metíleno.*

Para el revelado de la ubiquinona se rociaron las placas con el reactivo de leuco-azul de metíleno, preparado añadiendo 1 ml. de ácido sulfúrico a 250 mgrs. de polvo de zinc, a 5 mls. de una disolución al 0,02 % de azul de metíleno en acetona.

Las quinonas se hacen inmediatamente evidentes como una mancha azul, pero poco después se oscurece la placa.

6) *Reactivos azul de molibdeno.*

Para la identificación de los ésteres fosfóricos se siguió la variante de la técnica de Zinzadze, descrita por DITTMER y LESTER (1964), utilizando los siguientes reactivos:

—Disolución I, preparada disolviendo 40,11 grs. de MoO₃ en un litro de ácido sulfúrico 25N. Para disolver todo el MoO₃ es necesario calentar.

—Disolución II, preparada disolviendo 1,78 grs. de molibdeno en polvo en 500 mls. de la disolución I, por calentamiento durante 15 minutos.

Para la preparación del reactivo final se mezclaron un volumen de cada una de las disoluciones citadas con dos volúmenes de agua. El reactivo es estable durante meses a la temperatura ambiente.

Al pulverizar las placas, las manchas que contienen ésteres fosfóricos adquieren de inmediato un color azul sobre fondo no coloreado.

II.4.2.11. *Reactivos empleados en la cromatografía en papel.*

a) *Detección de serina, etanolamina y aminoazúcares.*

Los cromatogramas se rociaron con el reactivo de ninhidrina (solución al 0,2 % de ninhidrina en etanol) y se calentaron durante 15 minutos a 110° C. Las sustancias conteniendo grupos amina dan coloraciones rojo-violáceo.

b) *Detección de colina.*

Se empleó un método, descrito por CLARK (1966), basado en la formación con el fosfomolibdato una sal insoluble de la colina, de color azul y en la reducción del fosfomolibdato por el cloruro estannoso.

Una pequeña gota de la muestra a ensayar se depositó sobre una tira de papel Watman n.º 1. Se introdujo luego en una disolución de ácido fosfomolibdico al 2 % durante un minuto. Pasado ese tiempo se lavó la tira, primero con n-butanol durante cinco minutos y después otros cinco minutos con agua. Una vez lavado se pasó lentamente a través de una solución recientemente preparada de cloruro estannoso al 0,4 % de ClH 3 N. La colina da manchas de color oscuro sobre fondo azul claro.

c) *Identificación de azúcares.*

Se usó para este fin el reactivo de anilina-ácido-oxalato y el reactivo periodato-bencidina.

1) *Reactivos anilina-ácido-oxalato.*

Se disolvieron 0,9 grs. de ácido oxálico en 200 mls. de agua; una vez disueltos se añadieron 1,8 mls. de anilina. Se pulverizó el cromatograma hasta humedecerlo y se calentó a 100-105° C durante 5-15 minutos. La presencia de azúcares se revela por la aparición de manchas coloreadas.

2.—*Reactivos periodato-bencidina.*

—Disolución de periodato sódico (0,5 % de periodato sódico en agua).

—Disolución de bencidina (0,5 % de bencidina en una mezcla de etanol-ácido acético 4/1, v/v).

Los cromatogramas se pulverizaron con la disolución de periodato y se dejaron

ron 5-10 minutos para que los hidratos de carbono lo consumieran. Se pulverizaron luego con el reactivo de bencidina. El periodato de las zonas donde no hay azúcares reductores reacciona con la bencidina dando un olor azul. Las áreas que lo contienen aparecen como manchas claras sobre fondo azul.

II.4.2.12. Hidrólisis de los fosfolípidos, glicolípidos y esterol glicósidos, para la caracterización de los componentes no lipídicos.

Se disolvieron las muestras en 2 mls. de etanol al 95 %, por calentamiento en baño de vapor. Se añadieron 2 mls. de ácido clohídrico 2 N y se sometieron a ebullición al baño de vapor durante 1 hora; al cabo de este tiempo se enfriaron las muestras y se extrajeron tres veces con 5 mls. de éter etílico libre de peróxidos. La fracción soluble en ácido se concentró a vacío hasta sequedad. De nuevo se añadieron 3 mls. de etanol al 95 % y se eliminaron concentrando hasta sequedad al vacío; esta operación tuvo por objeto asegurar la total eliminación del ácido clohídrico.

II.4.2.13. Saponificación y obtención de los ácidos grasos de los ésteres de los esteroles.

Para la obtención y posterior análisis de los ácidos grasos de los ésteres de esteroles, se tomó la muestra que los contenía y se le añadieron 1,5 mls. de una disolución de KOH 0,5 N en etanol al 95 %, conteniendo 0,25 % de pirogalol. Se hirivó la muestra a reflujo durante 30 minutos, desplazando el oxígeno antes de comenzar el calentamiento, con nitrógeno; se continuó pasando nitrógeno a lo largo de toda la saponificación al objeto de evitar los procesos oxidativos. Terminada la saponificación se añadieron 4,5 mls. de agua; se extrajo la mezcla tres veces con 3 mls. de éter de petróleo y se separaron las dos fases por centrifugación. La fase acuosa se acidificó con ClH 2 N hasta rojo Congo y se extrajo tres veces con éter etílico libre de peróxidos. La disolución se concentró hasta un volumen final de 3 mls. y se le añadió el metanol necesario para metilar con diazometano, según el método descrito en II.4.2.14., para los ácidos grasos libres.

II.4.2.14. Formación de ésteres metílicos de ácidos grasos libres.

Para la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres se siguió el procedimiento de metilación con diazometano, descrito por SCHLENK y GELLERMAN (1960), utilizando los siguientes reactivos:

—Reactivo de M. N. S. A., preparado disolviendo 2 milimoles de n-metil n-nitroso paratoluen sulfonamida por miliequivalente de ácido graso a metilar en 1 ml. de éter etílico libre de peróxidos.

—Disolución de carbitol, preparada mezclando 0,7 mls. de carbitol con 0,7 mls. de éter y 1 ml. de KOH al 60 %.

—Eter etílico libre de peróxidos.

—Eter etílico-metanol (9/1).

Distribuidos los reactivos en los tubos apropiados del dispositivo de SCHLENK y GELLERMAN, (véase figura 3), se hizo pasar por el sistema una corriente de nitrógeno con un flujo de 6 mls./min. Se puso luego el reactivo de M. N. S. A. en con-

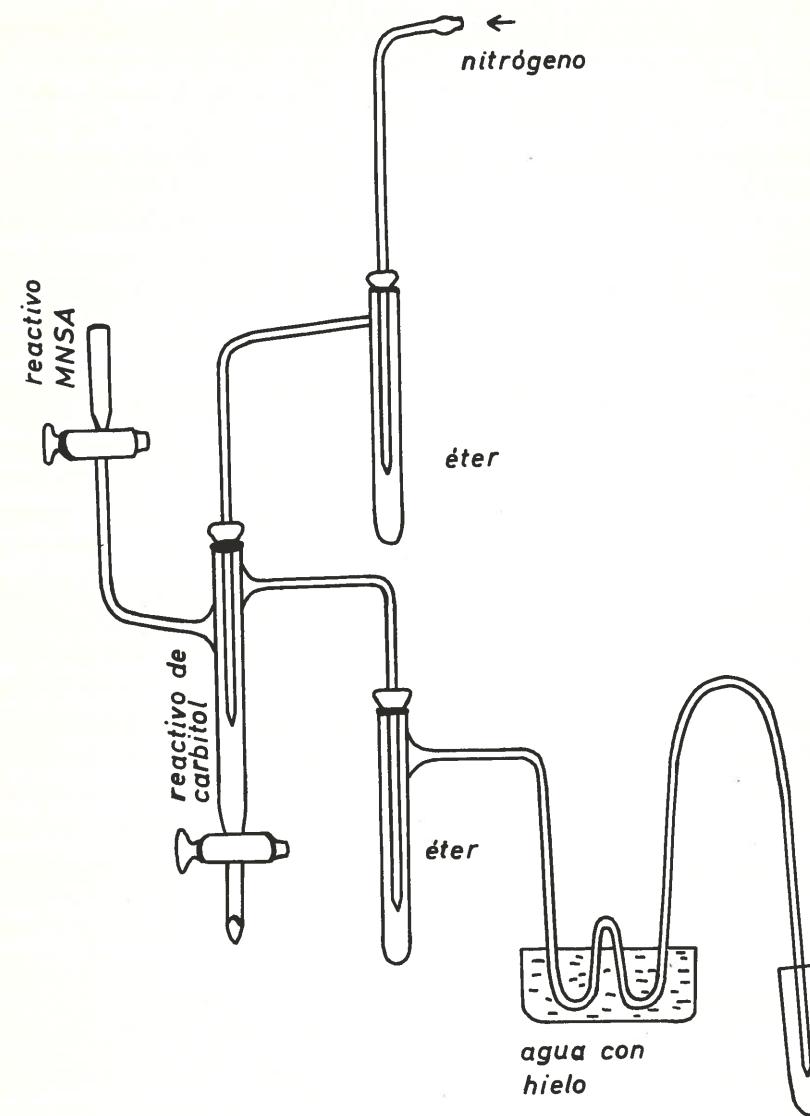


Figura 3.—Dispositivo empleado en la formación de ésteres metílicos de ácidos grasos libres, siguiendo el procedimiento de metilación con diazometano, descrito por SCHLENK y GELLERMAN (1960).

tacto con el reactivo de carbitol, para que reaccionaran y se desprendiera diazometano, que arrastrado por la corriente de nitrógeno satura el éter. Una vez que el diazometano hubo saturado el éter se le hizo circular, arrastrado por el nitrógeno, por un tubo en forma de W, sumergido en un recipiente que contenía mezcla de agua y hielo, y finalmente burbujear en el tubo en que tiene lugar la metilación, que contiene de 5 a 30 mgrs. de ácidos grasos disueltos en 3 mls. de la mezcla de éter-metanol (9/1).

Al cabo de unos minutos la muestra a metilar adquiere un tono amarillento por la presencia de un exceso de diazometano, indicando que el proceso de metilación ha terminado y que la muestra se halla dispuesta para ser inyectada en el cromatógrafo.

II.4.2.15. Transesterificación y formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman glicéridos y fosfolípidos.

Para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de triglicéridos y fosfolípidos se ha utilizado el método de SHEIHATA y col. (1970) utilizando los siguientes reactivos.

—reactivo transesterificador, preparado mezclando 1,5 mls. de metilato sódico (CH_3ONa) 0,5 N (preparado disolviendo 0,0575 grs. de Na en 5 mls. de metanol), con 6 mls. de éter de petróleo y con 2,5 mls. de éter etílico libre de peróxidos. Este reactivo forma una sola fase a la temperatura ambiente. Debido a su elevada volatilidad se preparó en pequeñas cantidades y se mantuvo en tubos con tapón de teflón en un desecador a 2-4° C.

—éter de petróleo (40-60° C) y éter etílico libre de peróxidos.

Se tomó alrededor de 1 mgrs. de la muestra problema, se disolvió en 2 mls. de éter de petróleo y se depositó en un tubito de 30 × 3 mm. El disolvente se evapó bajo corriente de nitrógeno.

Con una microjeringa se añadieron 25 μl s. del reactivo transesterificador y se tapó inmediatamente el tubo. El contenido se agitó haciéndolo girar entre los dedos para lograr una buena mezcla. La reacción transcurre rápidamente a la temperatura ambiente.

Dos minutos después se agregaron 25 μl s. de éter de petróleo. Se tapó de nuevo el tubo, se agitó suavemente y se mantuvo dos minutos a la temperatura ambiente; al cabo de este tiempo se procedió a la inyección en el cromatógrafo.

II.4.2.16. Microsublimación.

Las microsublimaciones realizadas en esta tesis, para purificar los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se efectuaron siguiendo la técnica de STOFFEL y col. (1959).

Las muestras que contenían los ésteres metílicos de los ácidos grasos a puri-

ficar se disolvieron en éter de petróleo (40-60° C), se depositaron en un tubo con boca esmerilada y a continuación se eliminó, hasta sequedad, el disolvente bajo corriente de nitrógeno.

En el interior del tubo se introdujo otro provisto de un sistema de refrigeración y entrada de vacío (véase figura 4). El conjunto se colocó en un baño de aceite termostatado a $60 \pm 0,5^\circ \text{C}$ y se conectó a la bomba de alto vacío y al vacuómetro, con el fin de controlar el vacío mantenido a lo largo de todo el proceso; el sistema se mantuvo a una presión de 0,2 mm. de mercurio y la microsublimación se prolongó durante 1 hora. Al cabo de este tiempo se sacó el tubo refrigerante y se lavaron sus pa-

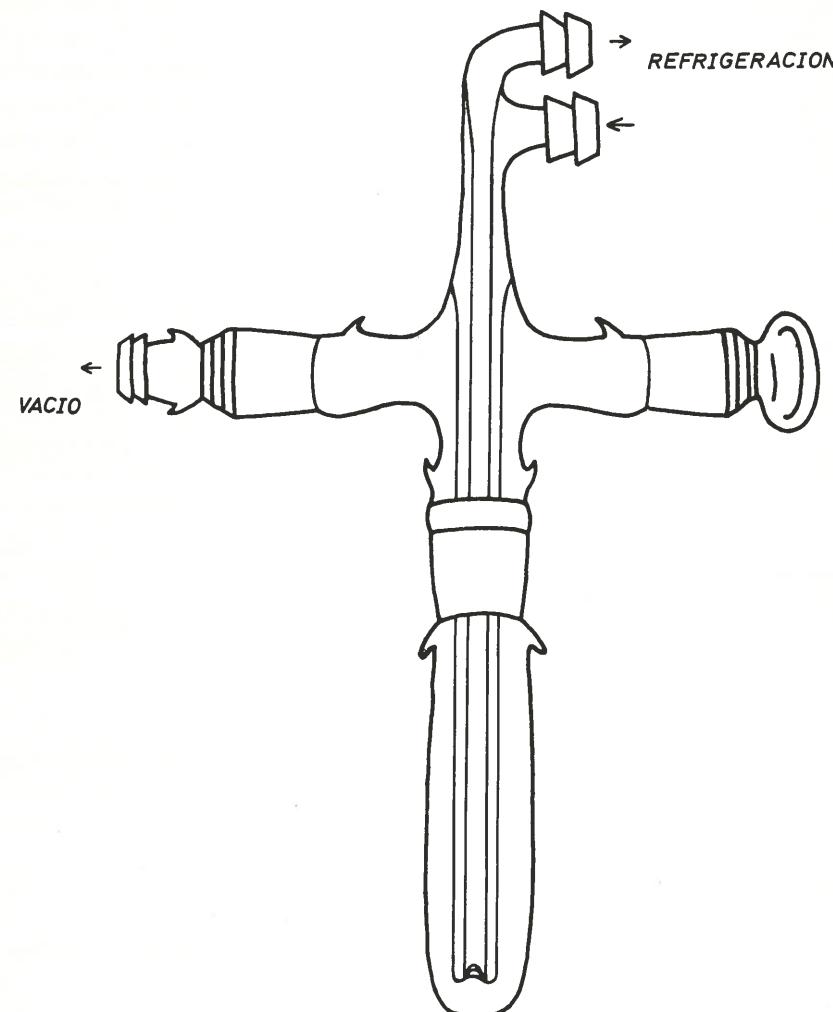


Figura 4.—Dispositivo utilizado en las microsublimaciones, realizadas siguiendo la técnica de STOFFEL y col. (1959).

redes con éter de petróleo para arrastrar los ácidos grasos sublimados. De esta forma se obtienen los ácidos grasos purificados.

II.4.2.17. Determinación cuantitativa de hidratos de carbono.

Las determinaciones de hidratos de carbono efectuadas a lo largo de este trabajo se realizaron utilizando la reacción de la antrona.

El reactivo de la antrona se preparó disolviendo 0,2 grs. de antrona en 100 mls. de ácido sulfúrico al 95 %. Este reactivo se utilizó durante la misma semana en que fue preparado, conservándolo durante ese tiempo en la nevera.

La técnica seguida consistió en tomar tres alícuotas de 3 mls. de solución problema que se depositaron en sendos tubos de ensayo. Se prepararon blancos con 3 mls. de los disolventes en que se encontraban disueltas las muestras a analizar. A cada tubo se le añadieron 6 mls. de reactivo de antrona, agitando inmediatamente después. Se mantuvieron los tubos durante tres minutos en un baño de agua hirviendo, se dejaron enfriar y se midió su absorbancia a 620 m μ s.

El cálculo de las cantidades de hidratos de carbono se verificó por referencia a una gráfica patrón (véase figura 5), que se preparó con glucosa, por lo que los datos cuantitativos de carbohidratos vienen expresados en términos de glucosa.

Para confirmar la bondad de los resultados se introdujeron además dos patrones en cada serie de análisis.

II.4.2.18. Determinación cuantitativa de fósforo.

Las determinaciones de fósforo efectuadas a lo largo de este trabajo se realizaron siguiendo el método Fiske-Subbarow modificado, descrito por CLARK (1966), utilizando los siguientes reactivos:

—ácido sulfúrico 10 N, preparado mezclando 27,8 mls. de ácido sulfúrico concentrado con 72,2 mls. de agua.

—disolución acuosa de molibdato amónico al 2,5 %.

—reactivo reductor, preparado disolviendo 1,5 grs de SO₃ HNa y 0,5 grs. de p-metil amino fenol (elon) en 100 mls. de agua destilada. Se conservó en frasco de topacio siendo estable así, solamente 10 días.

La técnica seguida fue ésta: se pusieron en sendos tubos de ensayo, tres alícuotas de cada muestra, se evaporaron los disolventes y se añadió 0,5 mls. de ácido sulfúrico 10 N a cada tubo. Se calentaron las mezclas en baño de arena a 130-160° C durante el tiempo suficiente para que se aclarasen las muestras. Se enfriaron los tubos y se añadieron lentamente 2 mls. de agua destilada. Se calentaron luego, 10 minutos en un baño de agua hirviendo, para hidrolizar los pirofosfatos formados durante la digestión. Se añadió después 1 ml. de molibdato amónico al 2,5 % a cada tubo y se agitaron éstos. A continuación se añadió 1 ml. de reactivo reductor y agua hasta 10 mls.

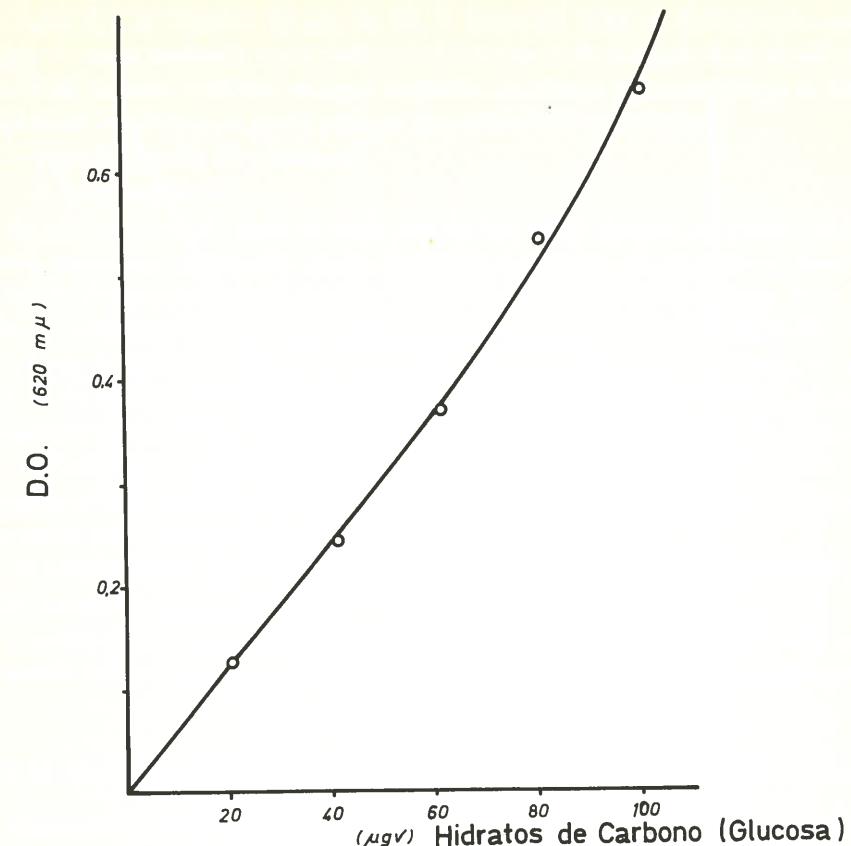


Figura 5.—Gráfica patrón para las determinaciones de hidratos de carbono utilizando la reacción de la antrona. Para la preparación de la gráfica patrón se empleó glucosa.

Se mantuvieron los tubos 20 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 660 m μ s contra blanco. El blanco se preparó tratando con molibdato amónico y reactivo reductor, igual que las muestras problemáticas hidrolizadas y diluidas, 0,5 mls. de ácido sulfúrico 10 N y 2 mls. de agua destilada.

Se preparó una gráfica patrón (véase figura 6) con cantidades diversas de fosfato monosódico, a la que se refirieron las lecturas. Para confirmar la veracidad de los resultados se introdujeron dos patrones en cada serie de análisis.

II.4.2.19. Determinación de nitrógeno por neslerización.

Las determinaciones de nitrógeno se realizaron siguiendo el método de determinación de nitrógeno de JOHNSON (1941). Se usaron los siguientes reactivos:

- ácido sulfúrico concentrado
- hidróxido sódico 4 N

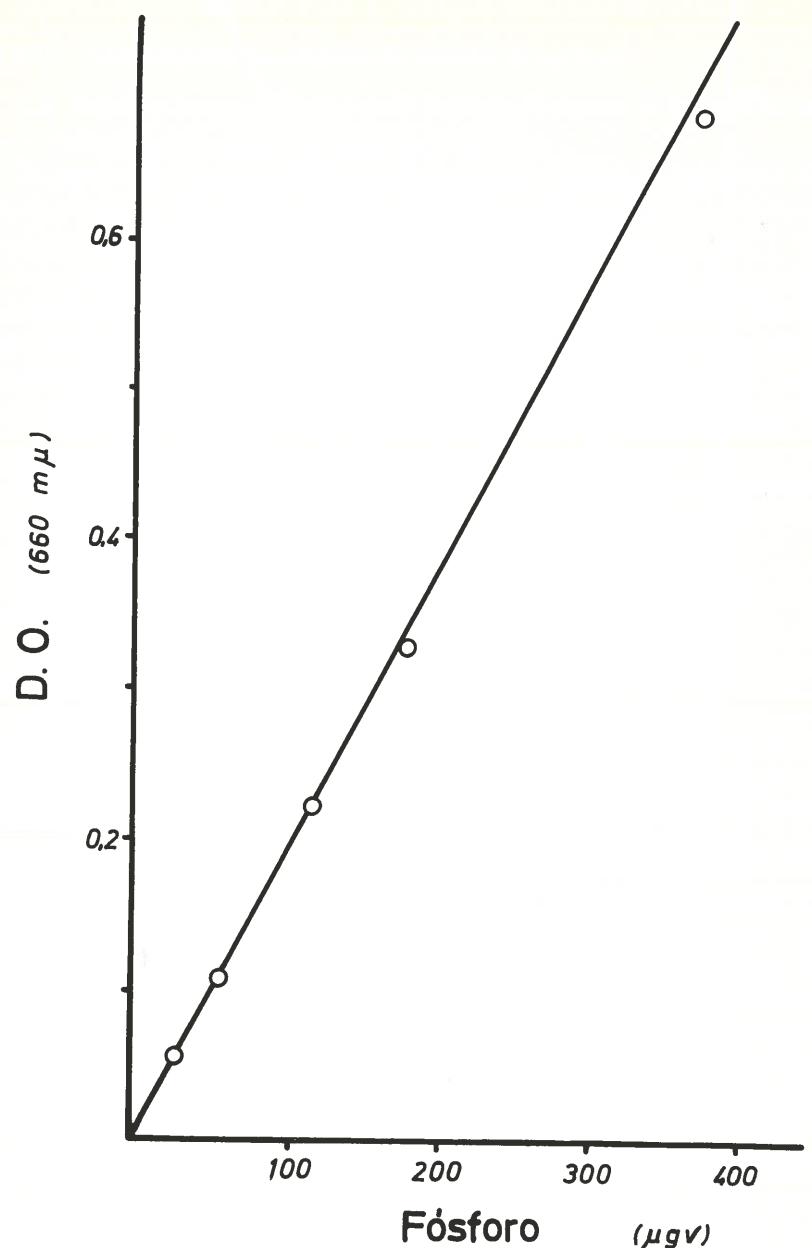


Figura 6.—Gráfica patrón para las determinaciones de fósforo siguiendo el método de Fiske-Subbarow modificado, descrito por CLARK (1966). Para la preparación de la gráfica patrón se empleó fosfato monosódico.

—reactivo de Nessler: (4 grs. de IK + 4 grs. de $\text{I}_2\text{Hg} + 1,75$ grs. de goma arábiga + agua destilada hasta volumen de un litro). Se preparó disolviendo primero el IK en unos mililitros de agua destilada. Se añadió y disolvió luego el I_2Hg y finalmente se adicionó la goma arábiga, que se disolvió a ebullición.

—agua oxigenada 30 volúmenes.

Se procedió así:

Se pipetaron en el fondo de cada uno de tres tubos de ensayo, perfectamente limpios, cantidades adecuadas de la disolución problema. Se prepararon blancos con los disolventes apropiados en cada caso. Los disolventes se eliminaron bajo corriente de nitrógeno. Las muestras se dirigieron a la llama de un mechero de Bünsen con 0,2 mls de ácido sulfúrico concentrado; se trajeron a continuación con 2-3 gotas de H_2O_2 de 30 volúmenes (o las gotas necesarias para que el digerido quedase transparente e incoloro), se añadieron 4,8 mls. de agua desionizada, se agitaron y se añadieron finalmente 3 mls. de Na OH 4 N y 2 mls. del reactivo de Nessler. El contenido se homogeneizó perfectamente después de cada operación y la absorban-cia se midió a 450 milimicras.

El color amarillo que se desarrolla tras la adición del reactivo de Nessler, es estable durante no menos de un día.

Los cálculos de contenido en nitrógeno se efectuaron por referencia a una grá-fica patrón (véase figura 7), que se preparó con cantidades diversas de fosfato amó-nico.

II.4.2.20. Cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

El estudio e identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo, basándose en los tiempos de retención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos analizados y su comparación con los tiempos de retención de los ésteres metílicos patrón, cromato-grafados en las mismas condiciones de programa de temperatura, flujo de nitró- geno y velocidad de la carta.

II.4.2.21. Condiciones empleadas en el desarrollo de las cromatografías.

Las condiciones de flujo de nitrógeno, velocidad de la carta, programa de tem- peraturas, etc., empleadas, fueron las siguientes:

—flujo de nitrógeno: 35 mls./minuto

—flujo de aire: 300 mls./minuto.

—flujo de hidrógeno: 32 mls./minuto.

—velocidad de la carta: 5 mm./minuto.

—programa de temperatura: 50-180° C, con un incremento de 8° C/minuto.

II.4.2.22. Cálculo de los porcentajes de los ácidos grasos identificados.

La determinación cuantitativa se efectuó basándose en el principio de que los

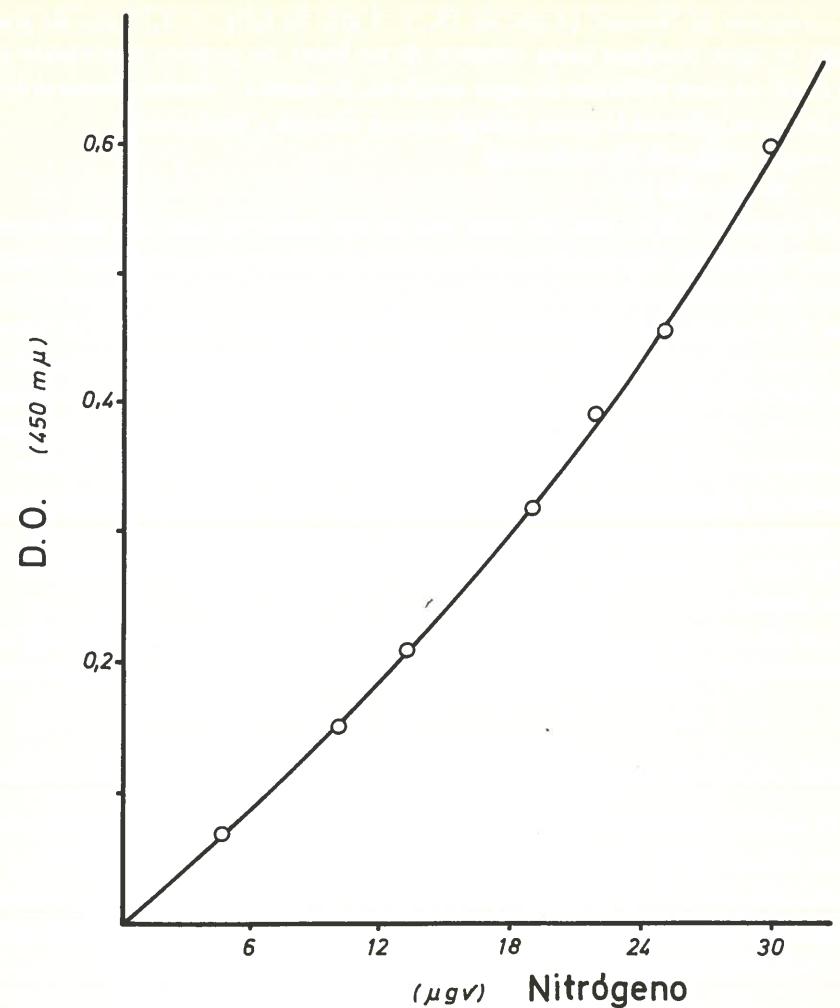


Figura 7.—Gráfica patrón para las determinaciones de nitrógeno por el método de Johnson.
Para la preparación de la gráfica patrón se empleó fosfato amónico.

pesos de cada uno de los componentes separados en la mezcla son proporcionales a las áreas comprendidas dentro de los picos correspondientes en el registro gráfico. Cuando se trabajó con atenuaciones diferentes para algún pico, se multiplicó el área de su pico por el factor de atenuación correspondiente.

1) Operaciones de comprobación.

Periódicamente se analizaron muestras patrones con el fin de comprobar el buen funcionamiento del aparato, para tener certeza de los análisis efectuados.

II.4.2.23. Cuantificación de los diferentes componentes lipídicos.

El cálculo de las cantidades representado por los diferentes componentes lipídicos identificados, se llevó a cabo por diferentes métodos.

1.—Triglicéridos

El contenido en triglicéridos de esporas y micelio se calculó por pesada, ya que este componente se aisló en estado puro en las cromatografías en columnas de sílica gel, tanto en las esporas como en el micelio.

2.—Ubiquinona.

La cantidad de ubiquinona se determinó en las fracciones obtenidas en las columnas de alúmina y sílica gel cuya polaridad y absorbancia en ciclohexano indicaban su presencia por el método de CRANE (CRANE, 1959) basándose en el E_{275} de la ubiquinona y ubiquinol; para ello se obtuvieron primero los espectros en etanol; luego se añadieron unos cristalitos de borohidruro potásico y se registró de nuevo el espectro. Para el cálculo de contenido en Q₉ se utilizó un $\Delta E \frac{1}{cm} 275$ de 159 (CRANE, 1965).

3

—Acidos grasos libres

El contenido en ácidos grasos libres de esporas y micelio de *Hemíspora stellata* se calculó, por titulación con potasa alcohólica N/100 de alícuotas de las fracciones que los contenían, obtenidos de las cromatografías en columna de sílica gel utilizando para el cálculo del peso, el peso molecular del ácido graso promedio de acuerdo con los datos obtenidos en la cromatografía en fase gaseosa, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso molecular del ácido graso promedio} = \frac{\Sigma \text{P. a. g.} \times \% \text{ a. g.}}{100} \quad \text{donde}$$

P. a. g. es igual al peso molecular de cada ácido graso y % a. g. es el porcentaje en peso que representa cada uno respecto del total de los ácidos grasos.

4.—Ergosterol

El ergosterol se calculó basándose en el espectro ultravioleta de las fracciones pertinentes, utilizando un $E \frac{1}{cm} 282 \text{ m}\mu\text{s}$ de 298 en etanol.

Para cálculo del ergosterol esterificado se utilizó el mismo procedimiento; cuando se dan cifras de ésteres de ergosterol se refieren al peso total de los ésteres calculados, teniendo en cuenta el peso molecular del ácido graso promedio.

5.—Fosfolípidos.

Para la cuantificación de cada fosfolípido se purificaron alícuotas de todas las fracciones de las cromatografías en sílica gel que los contenían, por cromatografía en lámina fina. Una vez detectada su localización, se extrajeron de las láminas por raspado del gel y repetidas extracciones con metanol. Se determinó luego el nitrógeno por neslerización según se describe en II.4.2.19. y se efectuó el correspondiente cálculo teniendo en cuenta el peso molecular del fosfolípido (para lo que se efectuó, como se describe para los ácidos grasos libres, el cálculo del peso molecular del ácido graso promedio) y la existencia de un solo átomo de nitrógeno por molécula.

CAPITULO III

RESULTADOS

III.1 METODOS DE EXTRACCION

Se comparó la eficacia de varios métodos de extracción, sobre 19,7 grs. de esporas liofilizadas obtenidas a partir de 62,5 grs. de pasta húmeda recogida según se describe en II.4.1.5.

III.1.1. *Extracción con cloroformo-metanol, metanol en caliente y acetona-etanol-ClH.*

a) *Cloroformo-metanol.*

Una alícuota del liofilizado, constituida por 5 grs., fue extraída tres veces con cloroformo-metanol (2/1) (v/v), según se describe en II.4.2.2. El extracto fue liberado del material no lipídico y disolvente y pesado. Sobre un alícuota del mismo se determinó fósforo y carbohidratos.

b) *Metanol en caliente.*

El residuo de la extracción con cloroformo-metanol fue reextraído con 5 mls. de metanol a la temperatura de ebullición, en presencia de pirogalol, durante dos horas. La operación se repitió tres veces. El extracto purificado y liberado de disolvente fue pesado y en una alícuota del mismo se determinó el contenido en fósforo e hidratos de carbono.

c) *Acetona-etanol-ClH.*

El residuo de las dos extracciones anteriores se extrajo de nuevo a temperatura de ebullición con 10 mls. de acetona-etanol (1/1) (v/v) acidificado con ClH al 1 % durante una hora. La operación se repitió tres veces. El extracto purificado y liberado de disolventes fue pesado y sobre una alícuota se determinó fósforo e hidratos de carbono.

III.1.1.1. *Ubiquinona y lípidos neutros totales de los extractos combinados de cloroformo-metanol y metanol en caliente.*

Los extractos cloroformo-metanol y metanol en caliente fueron mezclados y cromatografiados en columna de ácido silícico para la separación de los lípidos apolares, que fueron pesados y cromatografiados en columna de alúmina para la purificación parcial de la ubiquinona, que fue determinada luego por el método de CRANE. En la tabla 1 se recogen los resultados.

III.1.1.2. *Ubiquinona y lípidos neutros del extracto acetona-etanol-ClH.*

El extracto acetona-etanol-ClH., fue sometido al mismo proceso analítico

que los extractos cloroformo-metanol y metanol en caliente. La tabla 1 figuran los resultados obtenidos por este sistema de extracción en tres etapas.

III.1.2. Extracción con cloroformo-metanol, metanol en caliente y trituración con alúmina.

A otra alícuota de liofilizado, constituida también por 5 grs., se le añadieron unos 15 mls. de la mezcla de cloroformo-metanol (2/1) (v/v) para formar una pasta que fue triturada en un mortero, con 5 grs. de alúmina, durante 30 minutos. A partir de esta operación se siguió el procedimiento antes descrito, sobre la mezcla de esporas y alúmina. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 2.

III.1.3. Extracción con los disolventes del método Peck (1947).

a) Eter etílico-etanol.

Una nueva alícuota de liofilizado, constituida por 4,67 grs., fue extraída siguiendo una variante del método de Peck, con 10 volúmenes de una mezcla de éter etílico-etanol (1/1) (v/v), a la temperatura ambiente durante una hora. La operación se repitió tres veces. El extracto obtenido se pesó, tras liberarlo del material no lipídico y los disolventes. Sobre una alícuota del mismo se determinó fósforo y carbohidratos.

b) Cloroformo.

Siguiendo el método de Peck, se extrajo el residuo de la extracción anterior con 10 volúmenes de cloroformo a 25º C durante una hora. Esta operación se repitió dos veces más. El extracto obtenido fue liberado del material no lipídico y disolvente y se pesó. Sobre una alícuota del mismo se determinó su contenido en fósforo e hidratos de carbono.

c) Eter etílico-etanol-ClH.

El residuo de las dos extracciones anteriores se extrajo de nuevo con 10 volúmenes de una mezcla de éter etílico-etanol (1/1) (v/v) y ClH al 1% a reflujo en baño a 50º C durante una hora. Esta operación se repitió dos veces más. El extracto obtenido fue liberado del material no lipídico y disolvente, se pesó y sobre una alícuota del mismo se determinaron fósforo y carbohidratos.

III.1.3.1. Ubiquinona y lípidos neutros totales de los extractos éter etílico-etanol y cloroformo.

Los extractos éter etílico-etanol y cloroformo fueron mezclados y sometidos al

mismo análisis que el efectuado con los extractos cloroformo-metanol y metanol en caliente. En la tabla 3 figuran los resultados.

III.1.3.2. Ubiquinona y lípidos neutros totales del extracto éter etílico-etanol-ClH.

El extracto éter etílico-etanol-ClH fue sometido al mismo proceso de análisis que en el caso de los extractos anteriores. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 3.

III.1.4. Extracto insaponificable y efectos de la ebullición con la acetona-etanol-ClH.

Al objeto de conocer en qué extensión son fidedignos los datos relativos al contenido en ubiquinona, que en esta tesis se describen, se intentó:

1.º—Determinar el contenido total de ubiquinona de las esporas por digestión de las mismas con potasa alcohólica, extracción del insaponificable y determinación del contenido en Uq del extracto.

2.º—Averiguar la extensión del posible daño causado por el tratamiento con acetona-etanol-ClH. en las condiciones experimentales utilizadas en la técnica de extracción definitivamente empleada.

III.1.4.1. Extracto insaponificable.

5 grs. de esporas liofilizadas fueron hervidos a reflujo con 20 mls. de metanol (conteniendo 0,25 % de pirogalol) y 10 mls. de KOH al 60 %, durante tres horas.

En la técnica habitualmente utilizada para este fin, la ebullición se lleva a efecto durante 45 minutos con 1 ml. de la disolución de pirogalol en metanol y 0,5 mls. de KOH al 60 %; las esporas de *Hemispora stellata* liofilizadas forman, en estas condiciones, una pasta intratable y durante la ebullición no se digieren ni cambian en absoluto de aspecto, por lo que resultó imprescindible modificar la técnica en el sentido citado.

Transcurrido este tiempo, se añadieron 3 volúmenes de agua y se extrajo el insaponificable con éter etílico libre de peróxidos. El residuo (las esporas no habían sido diferidas todavía) se trató de nuevo por el mismo procedimiento, sin que se lograra la completa digestión del mismo.

La mezcla de los extractos insaponificables fue cromatografiada en alúmina y la ubiquinina determinada por las técnicas escritas. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 4.

III.1.3.2. Efectos de la ebullición con acetona-etanol-ClH sobre la ubiquinona.

Una muestra de lípidos neutros contenido 250 µgrs. de Uq, fue hervida a reflujo con 10 mls. de acetona-etanol (1/1) (v/v) acidificada con ClH al 1% durante una hora. Se eliminó el disolvente en corriente de nitrógeno y evacuación final a

vacio y se obtuvo su espectro ultravioleta en etanol antes y después de la reducción con borohidruro.

La figura 8 muestra los espectros oxidado y reducido de la muestra original y después de sometida al citado tratamiento.

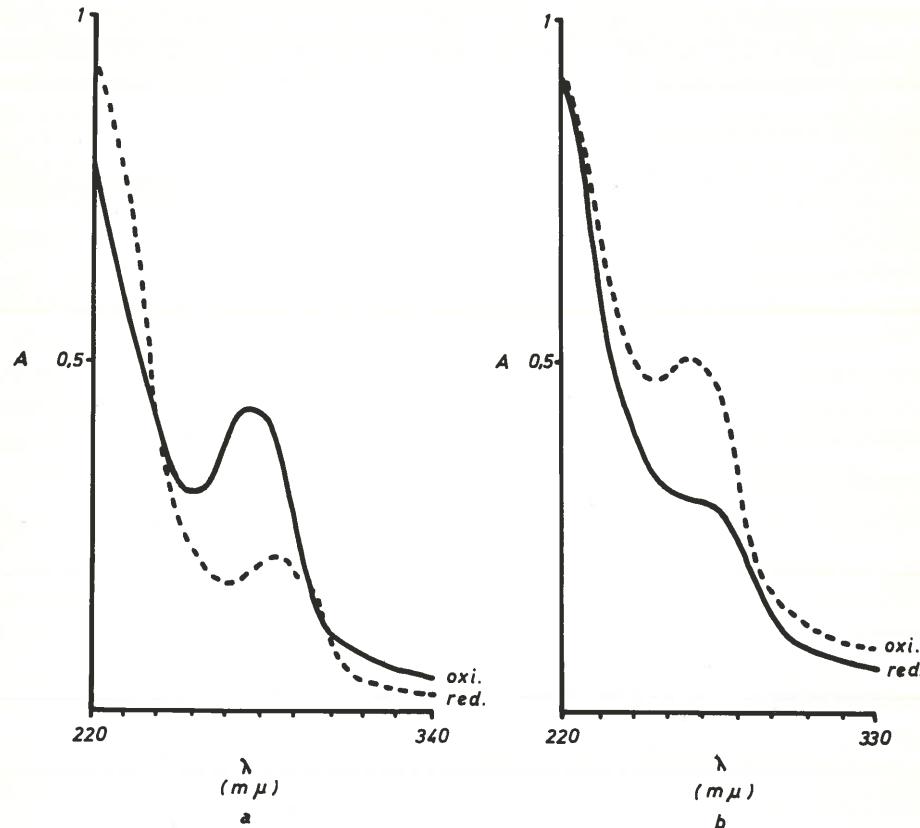


Figura 8.—Espectros ultravioletas de una muestra de ubiquinona, oxidada y reducida, antes y después del tratamiento con acetona-ethanol- ClH mediante ebullición. Disolvente: etanol.

- a) Muestra de ubiquinona sin someter a tratamiento.
- b) Muestra de ubiquinona tratada con acetona-ethanol- ClH .

TABLA 1

Extracción de esporas de *Hemispora stellata* (5 grs. de liofilizado) con cloroformo-metanol, metanol en caliente y acetona-ethanol- ClH

	Extracto lipídico bruto	Extracto lipídico puro	Fósforo	Hidratos de carbonos	% lípidos neutros (μgr)	Uq ($\mu\text{gr}/\text{gr}$ de peso seco)	Uq ($\mu\text{gr}/\text{gr}$ de peso seco)
	mgr.	% sobre peso seco	mgr.	% sobre peso seco	$\mu\text{gr}/\text{gr}$ de peso seco	$\mu\text{gr}/\text{gr}$ de peso seco	
Cloroformo-metanol	524	10,4	76,4	1,52	215,6	561,4	65,9
Metanol en caliente	256,5	5,1	73,9	1,4	—	—	79,7
Acetona-ethanol- ClH .	732	14,6	37,2	0,7	—	—	15,9
					98	33,5	6,7

TABLA 2

Extracción de esporas de *Hemispora stellata* (5 grs. de liofilizado) con cloroformo-metanol y metanol en caliente y trituración con aluminio.

	Extracto lipídico puro	Extracto lipídico puro	Fósforo	Hidratos de carbono	% lípidos neutros (μgr)	Uq ($\mu\text{gr}/\text{gr}$ de peso seco)	Uq ($\mu\text{gr}/\text{gr}$ de peso seco)
	mgr.	% sobre peso seco	mgr.	% sobre peso seco	$\mu\text{gr}/\text{gr}$ de peso seco	$\mu\text{gr}/\text{gr}$ de peso seco	
Cloroformo-Metanol	209,8	5,2	63,2	1,26	190	317,5	66,7
Metanol en caliente	531,6	10,6	27,3	0,54	64,5	12,9	

TABLA 3

Extracción de esporas de *Hemispora stellata* (4,67 grs. de liofilizado) por el método de Peck (éter etílico-étanol, cloroformo y éter etílico-étanol-CIH.)

	Extracto lipídico bruto	Extracto lipídico puro	Fósforo	Hidratos de carbono	% lípidos neutros (μgr)	Uq	Uq (μgr./ gr de peso seco)
	mgr.	% sobre peso seco	mgr.	% sobre peso seco	μgr/gr de peso seco	μgr/gr de peso seco	
Eter Etílico-Etanol	77,1	1,5	51,5	1,09			
				187	183	59,3	28,4
Cloroformo	30	0,6	12,8	0,20			
Eter Etílico- Etanol-CIH	397,7	8,5	21	0,4	—	99	49,4
							10,6

TABLA 4

Extracto insaponificable obtenido a partir de 5 grs. de esporas de *Hemispora stellata*.

Etapas	Tiempo de ebullición (horas)	Insaponificable (mgr)	Uq (μgr)	Uq (μgr/gr de peso seco)
1	3	109,1	5,69	1,13
2	3			

III.2. LÍPIDOS FACILMENTE EXTRACTIBLES DE ESPORAS

III.2.1. Extracto seco.

Siguiendo los métodos descritos en II.4.1., se obtuvieron a partir de medio de salvado humedecido 236 gramos de pasta de esporas, limpia de impurezas, a lo largo de tres meses, que fueron almacenados a -25°C hasta su liofilización.

La liofilización se realizó en cuatro partidas. En la primera a partir de 110 gramos de pasta se obtuvieron 30 gramos de extracto seco (27,3 %); en la segunda se liofilizaron 46 gramos que rindieron 17 de extracto seco (37 %); en la tercera se obtuvieron 9 gramos de extracto seco a partir de 30 gramos de pasta (30 %) y en la última se liofilizaron 50 gramos que rindieron 16,5 de extracto seco (33 %).

III.2.2. Extracto lipídico bruto

Los 72,5 gramos de extracto seco obtenido de los 236 gramos de pasta (30,8 %) fueron sometidos en tres fracciones al procedimiento de extracción en tres etapas: cloroformo-metanol (2/1) a la temperatura ambiente; metanol en caliente y ebullición en acetona-étanol acidificados según se describe en el capítulo de Métodos, que resultó el más eficaz según se desprende de la sección III.1.

Los extractos obtenidos con metanol en caliente, dieron al ser concentrados y enfriados un precipitado blanquecino que al ser sometido a análisis reveló ser ClNa. Fue retirado por decantación y lavado con pequeñas cantidades de metanol hasta que la sal quedó desprovista de color; el extracto así obtenido se añadió al sobrenadante de la decantación.

En la tabla n.º 5 figuran los pesos de los extractos brutos así obtenidos.

III.2.3. Extracto lipídico purificado.

El peso de los extractos lipídicos liberados de contaminantes hidrosolubles por el método de FOLCH (1957) según se describe en la metodología general, figura en la tabla n.º 6, junto con su contenido en fósforo, nitrógeno e hidratos de carbono.

III.2.4. Fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con cloroformo/metanol y metanol en caliente, en columna de ácido silícico.

El fraccionamiento de los extractos lipídicos obtenidos con cloroformo-metanol y metanol en caliente, se realizó sobre columna de ácido silícico-celita, siguiendo la técnica de BRUNDISH y col (1965).

Se disolvieron 340 mgrs. del extracto lipídico purificado en tres mls. de una mezcla de cloroformo-metanol (98/2) y se depositó sobre el lecho cromatográfico de una columna de ácido silícico-celita de 18 cm./1,6 cm.

TABLA 5

Producto bruto de la extracción por el método de Folch de esporas de *Hemispora stellata*

Partida n.º	Esporas liofilizadas (grs.)	Cloroformo-metanol		Metanol en caliente		Acetona-Etanol-CIH	
		Peso extraído (grs.)	% sobre peso seco	Peso extraído (grs.)	sobre peso seco	Peso extraído (grs.)	% sobre pe- so seco
1	30	1,0934	3,6	3,5259	11,7	8,2	14,6
2	26	1,0502	4,03	2,0512	7,8		
3	16	0,6066	3,7	1,9600	12,2		

TABLA 6

Extractos lipídicos purificados por el método de Folch de esporas de *Hemispora stellata* y su contenido en fósforo, nitrógeno e hidratos de carbono.

% sobre peso seco de lípidos purificados	Fósforo $\mu\text{gr}/\text{mgr}$ de extracto L. puro	Nitrógeno $\mu\text{gr}/\text{mgr}$ de extracto L. puro	Hidratos de carbono $\mu\text{gr}/\text{mgr}$ de extracto L. puro
Cloroformo metanol (2/1)	1,5	6,8	9,5
Metanol en caliente	1,4	7,6	29,3

La cromatografía se desarrolló eluyendo sucesivamente con 300 mls. de cloroformo/metanol (98/2); 150 mls. de cloroformo/metanol (97/3); 150 mls. de cloroformo/metanol (96/4); 100 mls. de cloroformo/metanol (95/5); 200 mls. de cloroformo/metanol (90/10); 200 mls. de cloroformo/metanol (85/15); 200 mls. de cloroformo/metanol (80/20) y 200 mls. de metanol.

Inicialmente se recogieron fracciones de 12 mls. de los que se fue eliminando el disolvente en corriente de nitrógeno y registrado el peso. La fracción eluida con la primera mezcla de disolventes (cloroformo/metanol, 98/2) mostraba un pico claro en el tubo 3 y una larga cola que se prolongaba hasta el último tubo. Las otras mezclas disolventes no permitían apreciar picos claros.

Unos cuantos μls . de cada una de las fracciones obtenidas se chromatografiaron en lámina fina de sílica gel G. Para el desarrollo de la cromatografía se utilizaron las siguientes mezclas de disolventes:

Fracciones eluidas de la columna de ácido silílico con cloroformo/metanol, éter de petróleo-éter etílico-acido acético (80/20/1) (v/v/v).

Fracciones eluidas de la columna de ácido silílico con mezclas de cloroformo/metanol (97/3), (96/4), (95/5), (90/10), (85/15), (80/20) y metanol, cloroformo-metanol-agua (65/25/4) (v/v/v).

El revelado de las placas se efectuó con ácido sulfúrico al 50 %.

El análisis de las placas demostró que todos los tubos que recogían fracciones eluidas de la columna de ácido silílico con idéntica mezcla de disolventes contenían, aunque en proporciones distintas, los mismos componenentes. Se consideró conveniente por tanto, agruparlos y tratar conjuntamente las fracciones obtenidas con idénticos eluyentes.

En la tabla 7 figuran los pesos y porcentajes representados por cada una de estas fracciones y en la n.º 8 su contenido en hidratos de carbono, fósforo y nitrógeno.

El análisis de estos datos demostraba que:

La fracción eluida con cloroformo-metanol (98/2) estaba constituida exclusivamente por lípidos neutros; la eluida con cloroformo-metanol (97/3; 96/4

y 95/5) contenían hidratos de carbono y grupos nitrogenados, aunque éstos no podían hallarse formando parte de fosfolípidos dada la ausencia de fósforo.

Las fracciones eluidas con mezclas de disolventes más polares contenían la totalidad de los fosfolípidos. La presencia en ellas de hidratos de carbono, podía interpretarse como indicio de la existencia de fosfolípidos conteniendo glúcidos o de una mezcla de fosfolípidos y glicolípidos.

TABLA 7

Fracciones obtenidas en la cromatografía en ácido silílico del extracto cloroformo-metanol y metanol en caliente a partir de esporas de *H. stellata*.

Ácido silílico: 18 grs.; Celita: 4,5 grs.; Flujo: 1,6 mls/min. Extracto lipídico: 340 mgrs.; Altura de la columna: 18 cms. Diámetro de la columna: 1,6 cms.

Fracción	Disolvente	Mls.	Peso (mgr)	% del extra lipídico
I	98/2	Cloroformo-metanol	300	207,4
II	97/3	»	150	9,7
III	96/4	»	150	4,9
IV	95/5	»	100	3,7
V	90/10	»	200	18,7
VI	85/15	»	200	7,9
VII	80/20	»	200	10,6
VIII	Metanol	200	36,4	12,04

Rendimiento 98,84
% lípidos apolares 68,6; % lípidos polares 30,2

TABLA 8

Contenido en fósforo, nitrógeno e hidratos de carbono en cada una de las diferentes fracciones de la cromatografía en ácido silílico de los extractos cloroformo-metanol y metanol en caliente de esporas de *H. stellata*.

Fracción *	Fósforo ($\mu\text{gr}/\text{mgr}$ de extr. lipídico)	Nitrógeno ($\mu\text{gr}/\text{mgr}$ de extr. lipídico)	Hidratos de carbono & ($\mu\text{gr}/\text{mgr}$ de extracto lipídico)
I	0	0	0
II	0	6,4	13,3
III	0	4	4
IV	0	5,5	17,5
V	10,5	8,6	40,7
VI	3,3	12	5,7
VII	22,7	14,8	0
VIII	18,5	17	0

* Véase tabla n.º 7
& Expresado en términos de glucosa

III.2.5. Fraccionamiento de los lípidos neutros eluidos de la columna de ácido silícico con cloroformo-metanol (98/2)

Una alícuota de 159,3 mgrs. de la fracción eluida con cloroformo-metanol (98/2) se cromatógrafió en una columna de sílica gel G, lavada con cloroformo-metanol (2/1) siguiendo la técnica descrita en la metodología general.

Se recogieron las fracciones que figuran en la tabla 9, donde también se dan los pesos de los lípidos contenidos, que se obtuvieron tras eliminar el disolvente en corriente de nitrógeno.

De acuerdo con SMITH y col. (1969) este sistema cromatográfico permite separar perfectamente los ésteres de esteroles que él obtiene en la fracción 3, triglicéridos (en la 6), diglicéridos y esteroles (en la 8) y ácidos grasos (en la 14). El simple examen de los pesos registrados en la tabla 9 demostraba que el fraccionamiento no

TABLA 9

Fraccionamiento de los lípidos apolares de esporas de *H. stellata* en columna de sílica gel

Sílica gel: 20 grs.; Diámetro de la columnan: 1,6 cms.; Extracto lipídico cromatografiado: 159,3 mgr.; Altura: 18 cms.; Flujo: 1,6 mls./minuto.

Fracción	Disolvente	Mls.	Peso (mgr)	% del extracto lipídico
1	Benceno	20	4,3	3,1
2	"	10	3,2	2,3
3	"	20	5,2	3,1
4	"	10	0	0
5	Benceno/éter E/etanol (80/19/1)	10	7,2	5,2
6	" " "	40	48,5	35,4
7	" " "	50	18,7	13,6
8	" " "	40	9,4	6,8
9	" " "	30	2,6	1,8
10	Benceno/éter E/etanol (30/67/3)	70	8,3	5,9
11	Eter etílico	40	3,0	2,1
12	" "	30	1,7	1,2
13	Metanol	10	11,55	8,3
14	"	40	12,0	8,6
15	"	10	1,2	0,86

había tenido lugar con tanta perfección como indica el autor del método, ya que se recogieron cantidades de lípidos en todas las fracciones a excepción de la 4.^a

Al objeto de contrastar el comportamiento de la columna e identificar los lípidos que componían cada fracción eluida de la columna de sílica gel G, se cromatógrafiaron alícuotas de todos ellos, en lámina fina de sílica gel G, junto con marcadores: tripalmitina, ubiquinona, ácidos esteárico y oleico, monoestearato de glicerol y diglicéridos, utilizando para el desarrollo de los mismos éter de petróleo-éter

etílico-ácido acético (80/20/1) (v/v/v). El revelado se efectuó con ácido sulfúrico al 50 %. La figura n.^o 9 es la copia de una de las láminas así reveladas.

1.—La fracción n.^o 1 de la cromatografía sílica gel, eluida con 20 mls. de benceno, se mostró homogénea; dio un Rf de 0,75.

2.—Las fracciones 2 y 3, eluidas con 10 y 20 mls. de benceno respectivamente, mostraron también en este sistema un comportamiento cromatográfico homogéneo; ambas dieron un Rf de 0,56, idéntico al de la tripalmitina.

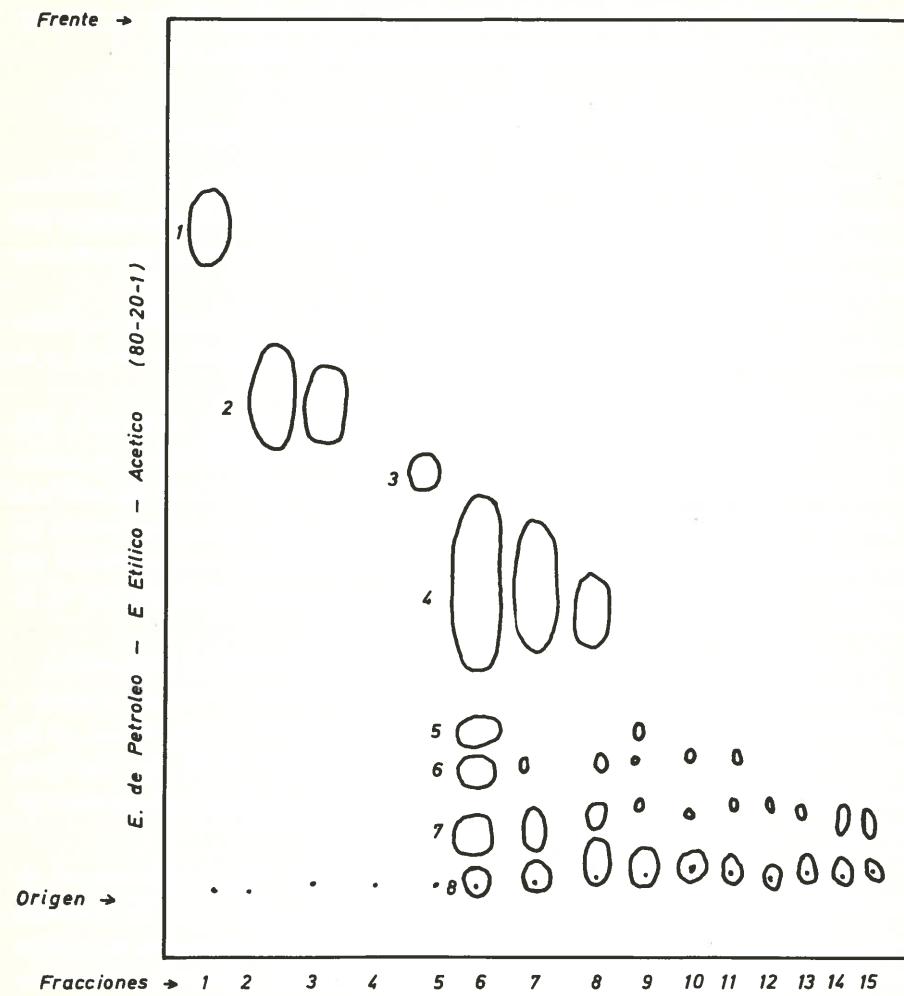


Figura 9.—Cromatografía en lámina fina de las fracciones de los lípidos apolares de esporas de *H. stellata* eluidas de la columna de sílica gel.

Revelador: ácido sulfúrico al 50 %.

Rf: mancha n.^o 1.0,75; mancha n.^o 2.0,56; mancha n.^o 3.0,46; mancha n.^o 4.0,34; mancha n.^o 5..0,17; mancha n.^o 6..0,12; mancha n.^o 7..0,06 y mancha n.^o 8.0.

3.—La fracción n.^o 5, eluida con benceno-éter etílico-etanol en las proporciones 80/19/1 (v/v/v), mostraba igualmente un comportamiento homogéneo y dio un Rf de 0,46, idéntico al de la ubiquinona.

4.—Las fracciones 6, 7 y 8, eluidas con 40,50 y 40 mls. respectivamente de una mezcla de benceno-éter etílico-etanol en las proporciones 80/19/1 (v/v/v), resultaron ser muy heterogéneas. Dieron cinco manchas, una de Rf 0,34 (idéntico al de los ácidos grasos marcadores) y otras cuatro de Rf 0,17, 0,12, 0,06 y 0.

Las de Rf 0,17, 0,12, 0,06 y 0, mostraban en las placas reveladas con ácido sulfúrico un color rojizo de variable intensidad, especialmente manifiesto en la de Rf 0,17, típico de los 3-hidroxiesteroides con doble enlace en posición Δ^5 .

III.2.6. Identificación definitiva y cuantificación de algunos componentes.

Reveladas las placas con rodamina 6G y examinadas bajo la luz ultravioleta, se observaron las mismas manchas; las de Rf 0,34 mostraban una fluorescencia mucho más intensa, características de los ácidos grasos libres, y como tal se consideraron, en virtud de este hecho y de su Rf.

Las fracciones de comportamiento homogéneo en las cromatografías en lámina fina fueron sometidas directamente a análisis espectrofotométricos en etanol y ciclohexano.

La fracción n.^o 1 presentaba el espectro de la figura 10, con máximos a 262, 271,282 y 293 característicos de los esteroides 5 : 7 dieno y considerando la posibilidad de que se tratase de un esterol esterificado, su polaridad no corresponde a la de un esterol libre, se saponificó una alícuota de la misma, se extrajo la fracción insaponificable y se cristalizó cinco veces en metanol. Los cristales examinados al microscopio mostraban forma de agujas y se obtuvo su punto de fusión de 162° C. Se identificó, pues, como éster de ergosterol.

Las fracciones n.^o 2 y 3 mostraban un espectro ultravioleta inespecífico.

La fracción n.^o 5 presentaba los espectros de la figura 11, con un máximo a 272 m μ s en ciclohexano y 275 m μ s en etanol, característico de la ubiquinona. Al ser reducida con borohidruro el máximo disminuyó y se desplazó a 290 m μ s. Las cifras de ubiquinona que figuran en la tabla 15 fueron calculadas basándose en los datos así obtenidos.

Las fracciones 6 a 15 se cromatografiaron en lámina fina preparativa, se observaron las placas a la luz ultravioleta y por raspado se obtuvieron de la lámina de sílica gel las zonas ocupadas por las manchas que se trajeron con éter etílico libre de peróxidos, obteniéndose así los ácidos grasos libres y las cuatro fracciones de esteroides. Se eliminó el disolvente por corriente de nitrógeno y se registró el peso.

Las fracciones provisionalmente identificadas como esteroides, por su comportamiento frente al ácido sulfúrico, fueron analizadas espectrofotométricamente. Las de Rf. 0,17 mostraban el mismo espectro que la de Rf 0,75 que aparece en la figura

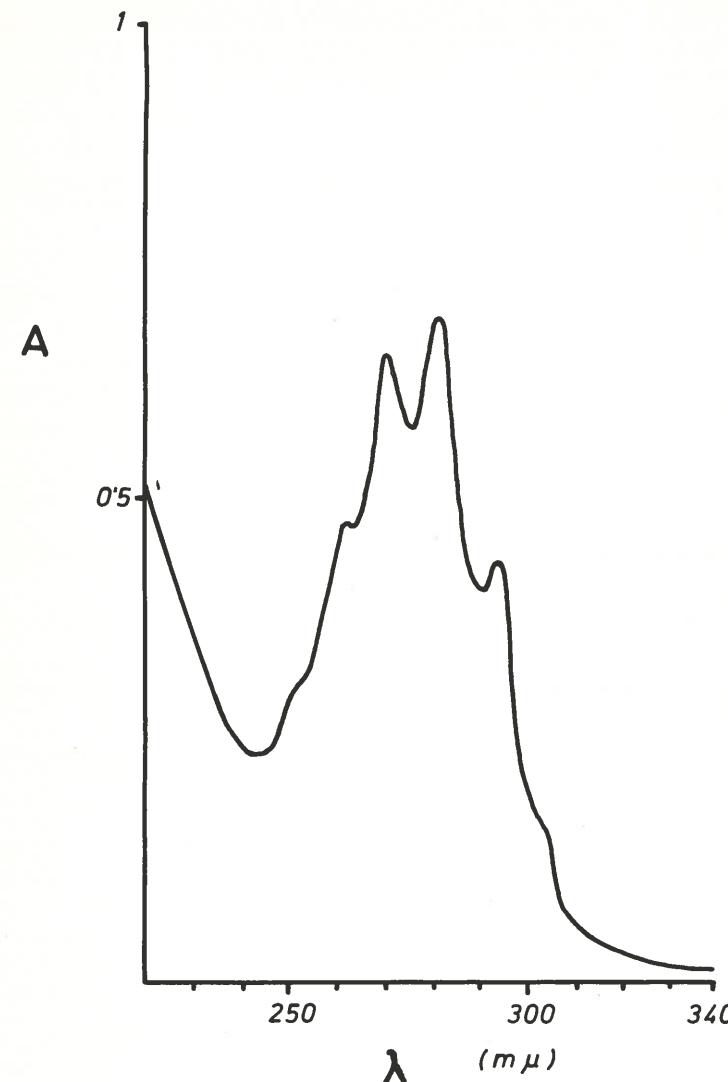


Figura 10.—Espectro ultravioleta de la fracción n.^o 1 (eluida con 20 mls. de benceno) obtenida por cromatografía en columna de sílica gel de los lípidos apolares de esporas de *H. stellata*. Disolvente: etanol; concentración 0,14 mgs./mls.; $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 282 m μ s.

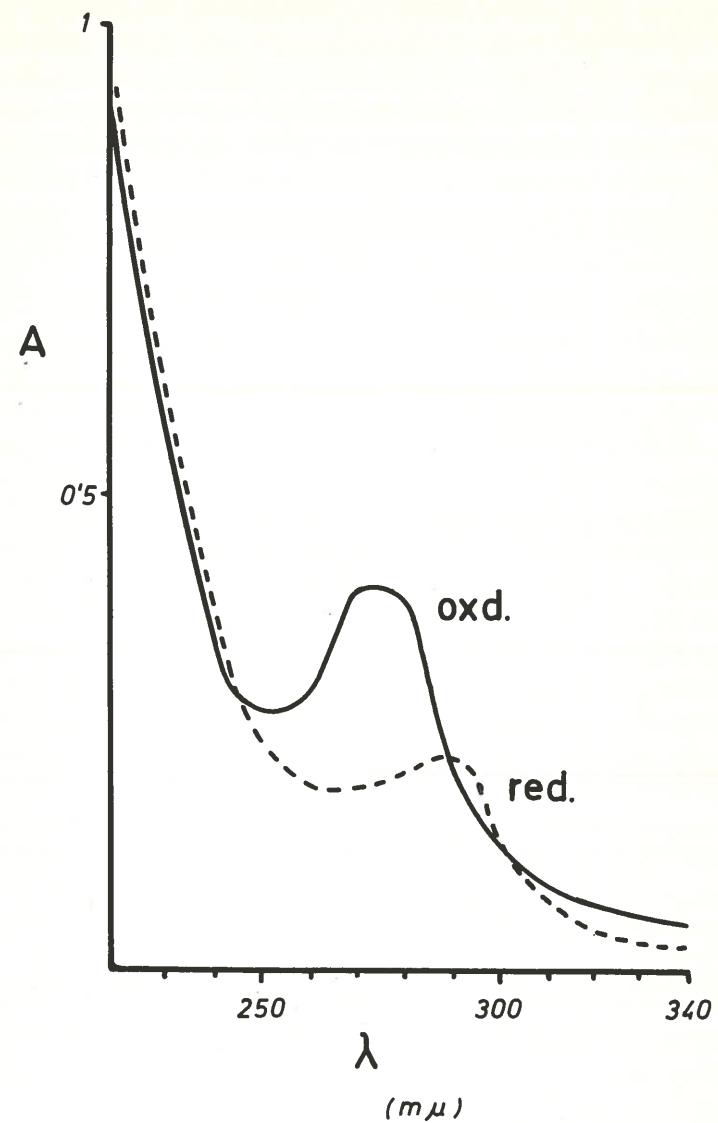


Figura 11.—Espectro ultravioleta de la fracción n.º 5 (eluida con 10 mls. de benceno-éter etílico-etanol en las proporciones 80/19/1) obtenida por cromatografía en columna de sílica gel, de los lípidos apolares de esporas de *H. stellata*. Disolvente: etanol.
oxd.: según fue extraído de la columna.
red.: reducido con unos cristales de borohidruro potásico.

— 668 —

10. Se cristalizó cinco veces en metanol y se obtuvo su punto de fusión que resultó ser de 162° C. Se consideró, pues, como ergosterol.

Las manchas 6, 7 y 8 cuyos espectros aparecen en la figura 12 no fueron caracterizados.

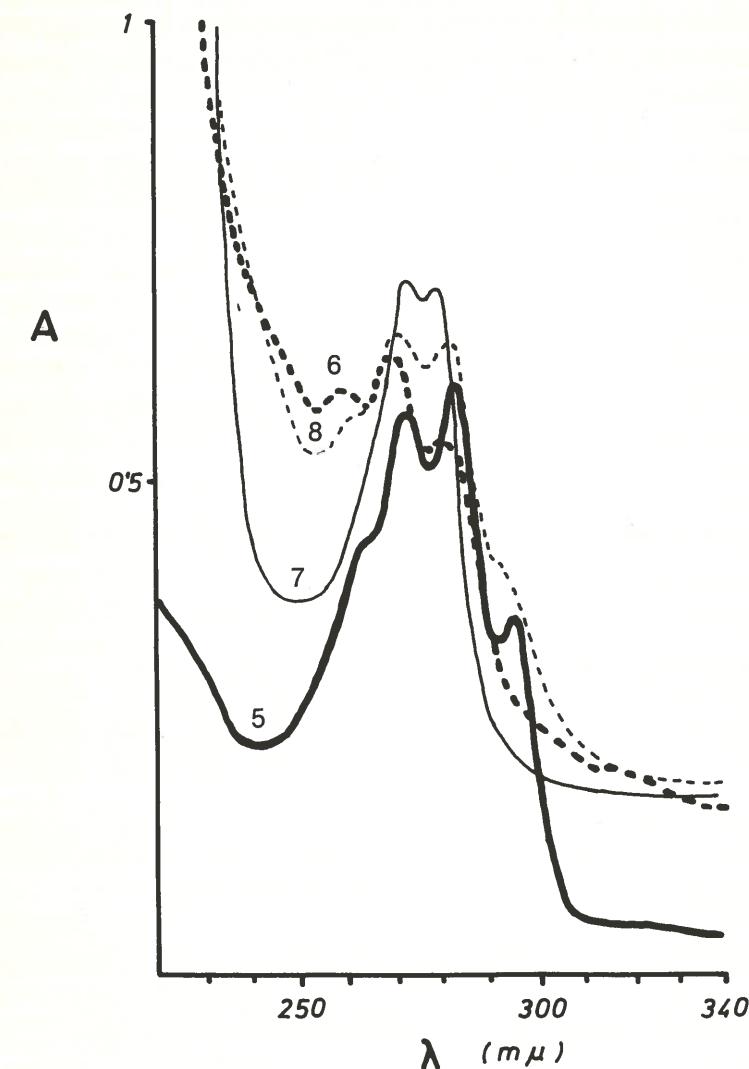


Figura 12.—Espectros ultravioletas de las manchas núms. 5, 6, 7 y 8 (véase figura 9) pertenecientes a las fracciones 6 a 15, obtenidas por cromatografía en columna de sílica gel, de los lípidos apolares de esporas de *H. stellata*. Disolvente: etanol.

— 669 —

III.2.7. Fraccionamiento de los lípidos eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4; 95/5) e identificación de sus componentes.

Las fracciones eluidas de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4 y 95/5), que representan el 3,2 %, 1,6 % y el 1,2 % respectivamente del extracto lipídico de las esporas y que carecían de fósforo, contenían nitrógeno y daban una reacción fuertemente positiva a la antrona, fueron analizadas en cromatografía en lámina fina de sílice gel G. Los cromatogramas se desarrollaron con cloroformo-metanol-agua (65/25/4) (v/v/v) y se revelaron con ácido sulfúrico al 50 %, demostrándose la presencia de tres manchas (véase figura 13); la n.º 2 de la figura mostraba el color característico de los 3-hidroxiesteroides con doble enlace en posición Δ 5 (Reacción de Liebermann-Burchard); las demás no presentaban coloraciones específicas.

Para la identificación de la naturaleza de las mismas, se cromatografiaron del mismo modo nuevas alícuotas en cuatro placas y se reveló una de ellas con el reactivo específico para grupos colina (reactivo I + IK), otra con el reactivo específico para grupos amina (reactivo de ninhidrina), otra con el reactivo específico para ésteres fosfóricos (reactivo azul de molibdeno), otra con el reactivo específico para glicolípidos (reactivo de difenilamina) y una cuarta con el reactivo de Schiff, específico también para glicolípidos (véase tabla n.º 10).

La mancha n.º 1 de la figura 13, presente en las tres fracciones, no dió reacción alguna frente a ninguno de los reactivos específicos y se consideró como restos de lípidos neutros.

La mancha n.º 2, también presente en las tres fracciones, Liebermann-Burchard positiva, dio, además, una reacción fuertemente positiva frente a la difenilamina y al reactivo de Schiff y débilmente positiva frente a la ninhidrina y no reaccionó con los reactivos específicos para los ésteres fosfóricos ni los grupos colina.

TABLA 10

Comportamiento frente a los distintos reactivos de las manchas obtenidas por cromatografía en lámina fina (véase figura 13) a partir de las fracciones lipídicas eluidas de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4 y 95/5).

Mancha n.º	Rf	Reactivos a. sulfúrico 50 %	Reactivos de difenila- mina	Reactivos azul de mo- libdeno	Reactivos de Schiff	Reactivos de ninhi- drina	Reactivos de I + IK	Identificación
1	0,99	+	-	-	-	-	-	Lípidos neutros
2	0,71	+ *	+	-	+	+	-	Esterol glicósido
3	0,60	+	+	-	+	+	-	Glicosilglicérido

* Mostraba el color característico de los 3-hidroxiesteroides con doble enlace en posición Δ 5 (Reacción de Liebermann-Burchard).

FRENTE →

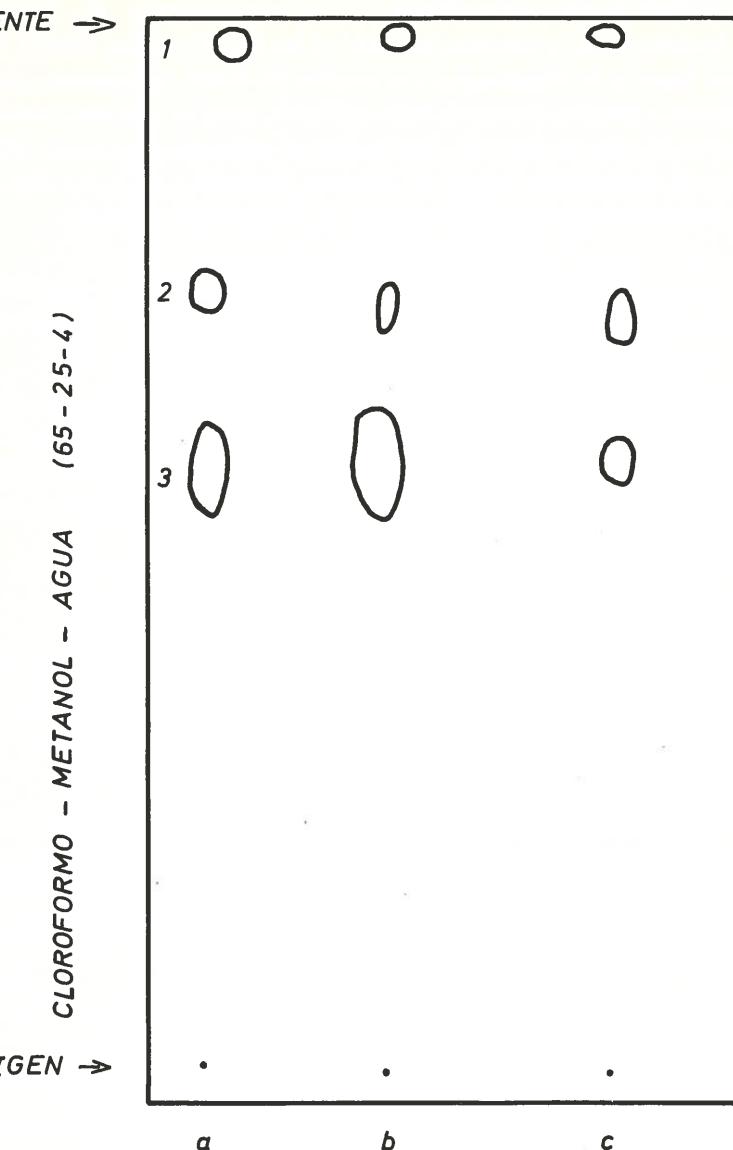


Figura 13.—Cromatografía en lámina fina de las fracciones de los lípidos de esporas de *H. stellata* eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4 y 95/5). Revelador: ácido sulfúrico al 50 %. (a)..(97/3); (b)..(96/4); (c)..(95/5). Rf: mancha n.º 1.. 0,98; mancha n.º 2.. 0,71; mancha n.º 3... 0,57.

Su Rf era 0,71. La citada sustancia fue en este estado provisionalmente considerada como un esterol glicósido, sin que pudiera claramente explicarse la razón de su reacción positiva frente a la ninhidrina.

La mancha n.^o 3, igualmente presente en las tres fracciones, resultó fuertemente positiva frente a la difenilamina y el reactivo de Schiff, ligeramente positiva ante la ninhidrina y positiva frente al ácido sulfúrico, pero no dio color específico con este reactivo. Su Rf era de 0,60, muy similar al señalado por LE'AGE (1964) para los diglicosil diglicéridos aislados de diversos vegetales y al de los diglicosildiglicéridos obtenidos por SHAW (1968) a partir de *Mycoplasma laidlawii*.

III.2.8. Fraccionamiento de los lípidos eluidos de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (90/10; 85/15; 80/20) y metanol (Fracciones V, VI, VII y VIII)

Las fracciones eluidas de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol en las proporciones (90/10; 85/15; 80/20) y metanol, que representan el 6,1 %, 2,6 %, 3,5 % y el 12,04 % respectivamente del extracto lipídico total de las esporas de *Hemispora stellata*, todas las cuales contienen fósforo y nitrógeno y las fraccio-

TABLA 11

Comportamiento frente a los distintos reactivos de las manchas obtenidas por cromatografía en lámina fina (véase figura 14) a partir de las fracciones lipídicas eluidas de la columna de ácido silílico con cloroformo-metanol (90/10; 85/15 y 80/20) y metanol.

Mancha n. ^o	Rf	Reactivos a. sulfúrico	Reactivos de difenila- mina	Reactivos azul de mo- libdeno	Reactivos de Schiff	Reactivos de ninhi- drina	Reactivos de I + IK	Identificación
1	0,71 *	+	+	-	+	+	-	Esterol glicósido
2	0,60	+	-	+	-	+	-	Fosfatidiletanolam- ina.
3	0,38	+	-	+	-	-	+	Fosfatidilcolina.
4	0,29	+	-	+	-	+	-	Lisofosfatidil-eta- nolamina.
5	0,17	+	-	+	-	+	-	Fosfatidilserina.

mes 90/10 y 85/15 además contienen hidratos de carbono, fueron sometidas a cromatografía analítica en lámina fina.

Una alícuota de cada fracción se depositó en cinco placas de sílica gel G; las placas se desarrollaron con una mezcla de cloroformo-metanol y agua en las pro-

* Mostraba el color característico de los 3-hidroxiesteroides con doble enlace en posición Δ 5 (Reacción Liebermann-Burchard).

FRENTE →

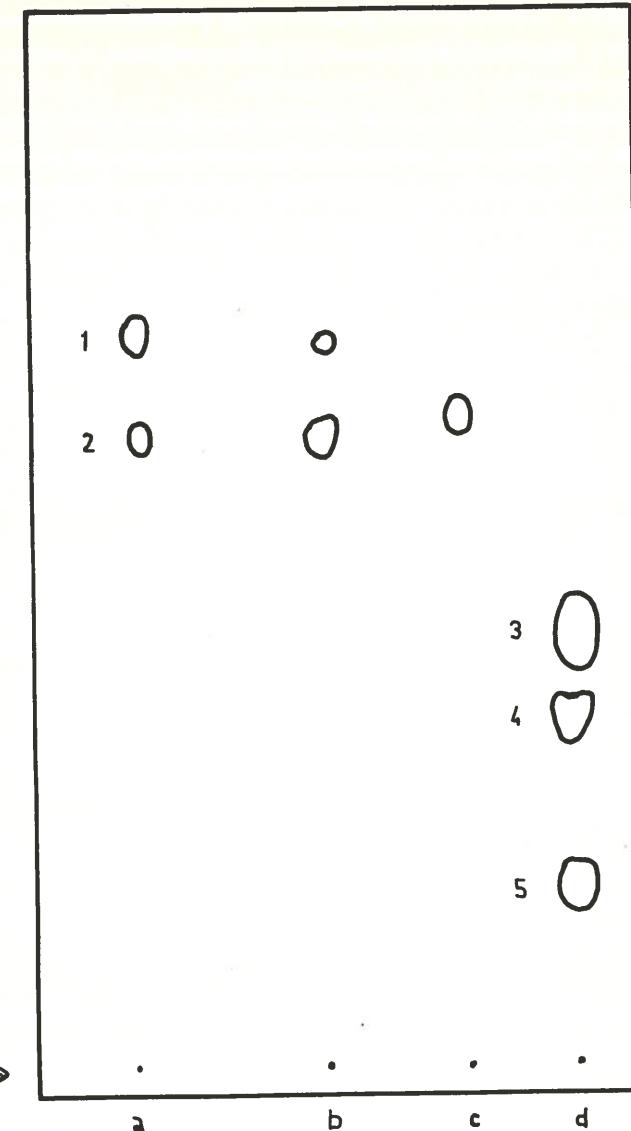


Figura 14.—Cromatografía en lámina fina de las fracciones de los lípidos de esporas de *H. stellata* eluidos de la columna de ácidos silílico con cloroformo-metanol (90/10; 85/15 y 80/20) y metanol.

Revelador: ácido sulfúrico al 50 %.

(a)...(90/10); (b)...(85/15); (c)...(80/20) y (d)...metanol.

Rf: mancha n.^o 1..0,71; mancha n.^o 2..0,60; mancha n.^o 3..0,38 mancha n.^o 4..0,29- mancha n.^o 5..0,17.

porciones 65/25/4 (v/v/v) y se revelaron con los mismos reactivos empleados en la caracterización de los componentes de las fracciones anteriores (III.2.7.).

La figura 14 es una copia de una de las placas reveladas con ácido sulfúrico, donde puede apreciarse la presencia de cinco manchas y la tabla n.^o 11 un resumen de su comportamiento frente a estos reactivos.

La mancha n.^o 1, presente en las fracciones V y VI, dio al ser revelada la placa con ácido sulfúrico una coloración característica de los 3-hidroxiesteroides con doble enlace en posición Δ^5 (reacción de Liebermann-Burchard) y reacción fuertemente positiva frente a la difenilamina y al reactivo de Schiff y débilmente positiva frente a la ninhidrina; no reaccionó en cambio con los reactivos específicos para los ésteres fosfóricos y grupos colina; su R_f de 0,71 presenta, pues, las mismas características que la n.^o 2 de las fracciones II, III y IV de la columna de ácido silílico; se identificó provisionalmente, por tanto, como un esterol glicósido.

La mancha n.^o 2 de R_f 0,60, presente en las fracciones V, VI y VII, obtenidas de la columna de ácido silílico, dio reacción positiva frente a la ninhidrina y al reactivo de molibdeno y negativa frente al resto de los reactivos específicos. Su R_f (0,58) fue idéntico al de una muestra patrón de fosfatidiletanolamina cromatografiada con ella.

La mancha n.^o 3 de R_f 0,38, presente en la fracción eluida con metanol, se mostró positiva frente al reactivo de I + IK para grupos colina y al de azul de molibdeno, y negativa frente al resto de los reactivos específicos. Desarrollada con una muestra patrón de lecitina mostró idéntico R_f. Se identificó como lecitina.

La mancha n.^o 4 de R_f 0,29 resultó positiva frente al reactivo de ninhidrina y al reactivo azul de molibdeno y negativa frente al reactivo específico para grupos colina y los específicos para glicolípidos. Se caracterizó provisionalmente como lisofatidiletanolamina.

La mancha n.^o 5, presente también en la fracción eluida con metanol, de R_f 0,17, resultó positiva únicamente frente a la ninhidrina y al reactivo de molibdeno. Corrió en la lámina de sílica gel igual que la muestra patrón de fosfatidilserina. Se caracterizó provisionalmente como fosfatidilserina.

III.2.9. Confirmación de la naturaleza de los distintos fosfolípidos, glicolípidos y esterol glicósidos, provisionalmente identificados en lámina fina.

La confirmación de la identidad de los distintos fosfolípidos, glicolípidos y esterol glicósidos se realizó mediante la investigación de sus productos de hidrólisis, por cromatografía ascendente en papel de Whatman n.^o 1.

Se purificaron, por cromatografía preparativa en lámina fina siguiendo la técnica descrita en la cromatografía analítica, cada uno de los lípidos identificados y provisionalmente caracterizados. Una vez aislados se hidrolizaron, siguiendo la técnica descrita en II.4.2.12., y se obtuvieron y estudiaron las fracciones solubles en agua.

a.—Glicolípidos y esterol glicósidos.

La fracción hidrolizada soluble en agua, de ambos componentes, se concentró a sequedad a vacío, según se describe en II.4.2.12., con el fin de eliminar los posibles restos de ácido clorhídrico.

Ambas muestras se cromatógrafiaron ascendente en papel de Whatman n.^o 1, utilizando como fase móvil, iso-propanol / ácido acético / agua (3/1/1) (v/v/v) junto con los siguientes patrones: glucosa, galactosa, manosa, y fructosa. Se pulverizaron los cromatogramas con el reactivo de anilina-oxalato y el de periodato-bencidina. Las fracciones hidrolizadas de ambos glicolípidos dieron un R_f (0,29) diferente al de los azúcares patrones.

Nuevas alícuotas se cromatógrafiaron junto a patrones de hidroxi aldehídos de cadena más corta: glicolaldehído, gliceraldehído, eritrosa y ribosa y el disacárido trehalosa. Los cromatogramas se pulverizaron de nuevo con los reactivos: anilina-oxalato y periodato-bencidina. También en este segundo intento de identificación, las fracciones hidrolizadas de ambos glicolípidos dieron un R_f distinto al de los glúcidos patrones.

Finalmente en un nuevo intento de identificación de las fracciones hidrolizadas de los glicolípidos y recordando que esta fracción además de ser positiva a la antrona lo era a la ninhidrina, se cromatógrafiaron junto con patrones de azúcares aminados: glucosamina y galactosamina, con la misma fase móvil. Se revelaron los papeles con los reactivos anteriores y las fracciones hidrolizadas mostraron un R_f similar al de la glucosamina. Con el fin de confirmar su identidad, provisionalmente revelada por su similar polaridad en el desarrollo cromatográfico, se rociaron nuevos cromatogramas con el reactivo de ninhidrina. Las muestras patrón de los azúcares aminados como las ensayadas, se mostraron positivas frente al mismo. Se identificó, pues, como glucosamina.

Tanto en la fracción glucídica de los glicolípidos como la glucona de los esterol glicósidos quedó definitivamente identificada como glucosamina.

b.—Fosfolípidos.

Las fracciones hidrosolubles obtenidas por hidrólisis de los fosfolípidos provisionalmente identificados en lámina fina, se analizaron por distintos métodos:

1.—*Lecitina*.—Se depositó una gota en un papel de Whatman junto a una muestra patrón de colina y se roció con el reactivo ácido fosfomolibdico-cloruro estannoso. Ambas dieron una reacción positiva, demostrando que el fosfolípido problema contenía colina, confirmando así la identificación provisional de la muestra como lecitina, realizada en la cromatografía en lámina fina.

2.—*Fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina*.—Las fracciones hidrolizadas de estos tres fosfolípidos se cromatógrafiaron en papel de

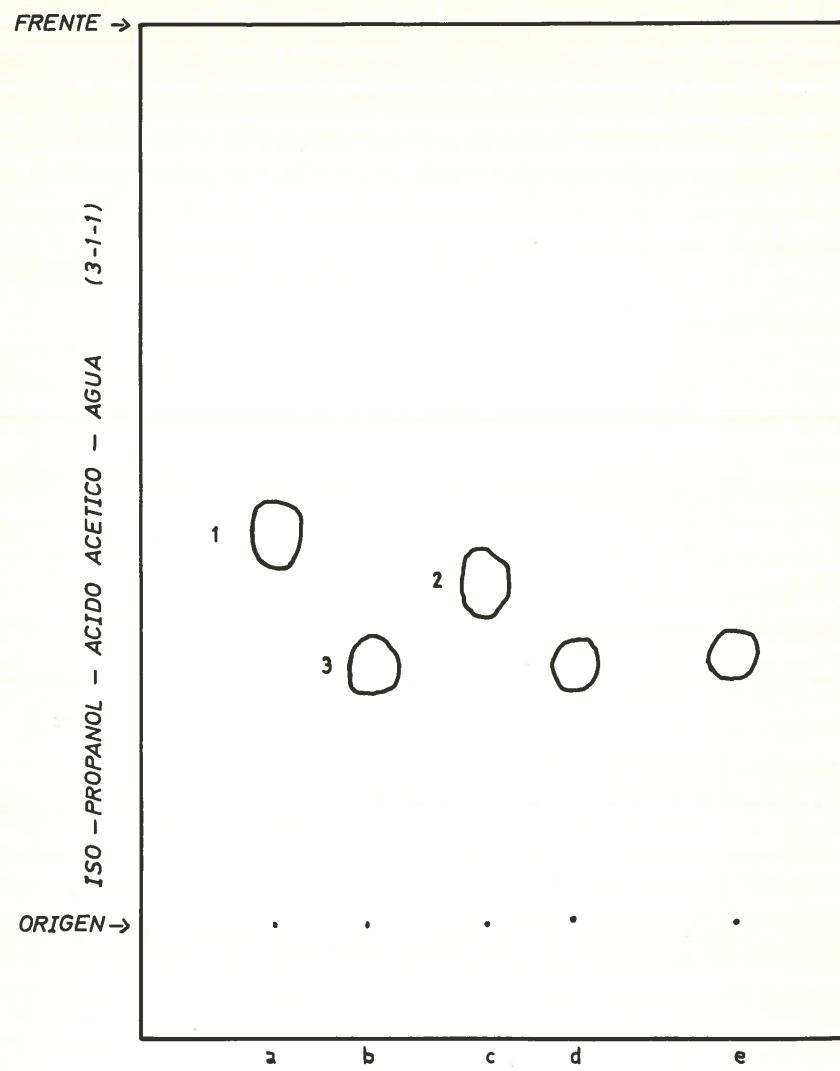


Figura 14a.—Cromatografía ascendente en papel de Whatman n.º 1 del producto soluble en agua de la hidrólisis ácida de esterol glicósidos y glicosil diglicéridos de esporas de *H. stellata* provisionalmente caracterizados en cromatografía en placa fina (véase figura 13 y tabla 10), junto con patrones de glucosa, glucosamina y galactosamina.

Revelador: reactivo de anilina-oxalato.

(a).. muestra patrón de glucosa; (b).. muestra patrón de glucosamina; (c).. muestra patrón de galactosamina (d).. fracción soluble en agua de esterol glicósido; (e).. fracción soluble en agua de glicosil digicerido.

Rf: mancha n.º 1..0,44; mancha n.º 2..0,39; mancha n.º 3..0,29.

Whatman n.º 1, empleando como fase móvil una mezcla de butanol/dietilenglicol/agua (4/1/1) (v/v/v), junto con patrones de serina y etanolamina. Los cromatogramas (véase figura 15) se pulverizaron con nihidrina. La base nitrogenada de la fracción hidrolizada procedente de la sustancia provisionalmente caracterizada como serina dio un Rf (0,19) idéntico al de la serina. La procedente de los lípidos provisionalmente caracterizados como fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina dieron un Rf (0,34), idéntico al de la muestra patrón de etanolamina. Se confirmó así la caracterización provisional de los fosfolípidos.

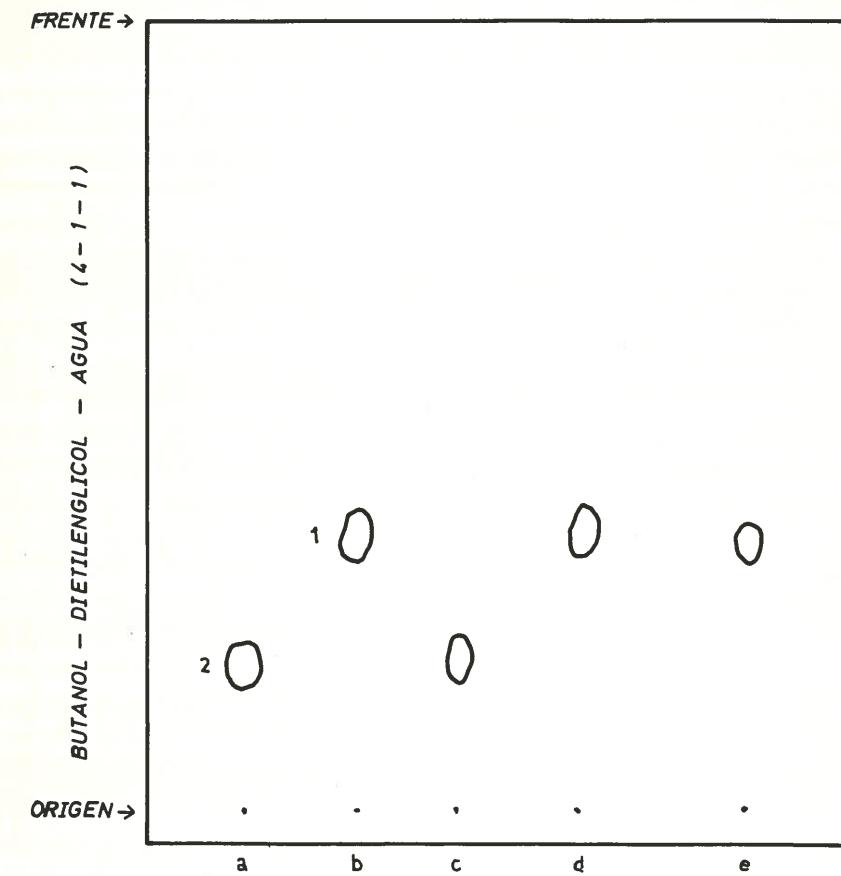


Figura 15.—Cromatografía en papel de Whatman n.º 1 de la fracción soluble en agua, obtenida por hidrólisis ácida a partir de los fosfolípidos de esporas de *H. stellata* provisionalmente caracterizados en cromatografía en placa fina (véase figura 14 y tabla 11).

Revelador: reactivo de nihidrina.

(a)..muestra patrón de serina; (b)..etanolamina; (c).. fracción soluble en agua de fosfatidilsérina; (d)..fracción soluble en agua de fosfatidiletanolamina; (e).. fracción soluble en agua de lisofosfatidiletanolamina.

Rf: mancha n.º 1..0,34; mancha n.º 2..0,19.

III.2.10.—*Ácidos grasos de los lípidos identificados en esporas de Hemispora stellata.*

El análisis de los ácidos grasos contenidos en las distintas fracciones identificadas: ácidos grasos libres, triglicéridos, esteroides y los fosfolípidos: lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y lisofosfatidiletanolamina, se realizó por cromatografía en fase gaseosa, para lo que se aislaron los distintos componentes lipídicos, se metilaron sus ácidos grasos y se microsublimaron por las técnicas descritas en II.4.2.14, 15 y 16.

III.2.11. *Obtención y preparación de las muestras para la metilación.*

Los ésteres de esteroles y los triglicéridos, aislados en estado de pureza en los tubos 1, 2 y 3 respectivamente de la cromatografía en columna de sílica gel (véase figura 9), no precisaron ninguna purificación posterior. Los ácidos grasos libres presentes en los tubos 6, 7 y 8 de la misma columna tampoco fueron sometidos a tratamiento previo alguno, dado que la única sustancia contaminante eran esteroles libres, y tras la metilación podían separarse de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por microsublimación.

Cada uno de los fosfolípidos fue purificado por cromatografía en lámina fina preparativa, utilizando las mismas condiciones cromatográficas empleadas para su identificación (véase III.2.8.).

Se distribuyeron en dos láminas, para ello, sendas bandas de las fracciones obtenidas de la columna de ácido silícico, que contenían fosfolípidos y se desarrollaron con cloroformo-metanol-agua (65/25/4) (v/v/v). Se reveló un extremo de la misma con iodo y se rascó con una espátula la sílica gel que contenía la zona correspondiente a las bandas detectadas. Las porciones de sílica gel así obtenidas se extrajeron con metanol durante 15 minutos y se separó por centrifugación la sílica gel del extracto lipídico.

Eliminado el disolvente bajo corriente de nitrógeno, se volvió a chromatografiar una alícuota de cada fosfolípido en las mismas condiciones que las empleadas para su separación, revelándose las placas con ácido sulfúrico al 50 % con el fin de confirmar el estado de pureza de cada uno de los fosfolípidos aislados.

III.2.12. *Formación de los ésteres metílicos y análisis de los ácidos grasos de los distintos componentes lipídicos identificados en esporas de Hemispora stellata.*

1.—*Acidos grasos libres.*

Los ácidos grasos libres se metilaron siguiendo el procedimiento con diazometano, según la técnica de SCHLENK y GELLERMAN (1960), descrita en II.4.2.14. Formados los ésteres metílicos, se eliminaron las impurezas presentes, constituidas por

esteroles (véase página 110), mediante una microsublimación, siguiendo el método de STOFFEL y col. (1959) descrito en II.4.2.16.

En la figura 16 puede verse un cromatograma de los ácidos grasos de esta fracción y en la tabla 12 el porcentaje que cada uno de ellos supone del total.

2.—*Triglicéridos.*

Para la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los triglicéridos (eluidos de la columna de sílica gel con benceno) se siguió un proceso

TABLA 12

Porcentaje de ácidos grasos presentes en las fracciones ácidos grasos libres, triglicéridos, ésteres de esteroles de esporas de *H. stellata*.

	Acidos grasos libres	Triglicéridos	Esteres de esteroles
C-8	—	0,01	1,2
C-10	—	0,02	0,17
C-12	0,18	0,03	5,65
C-14	0,59	0,02	3,46
C-16	25,60	16,80	32,12
C-16 : 1	0,93	0,02	1,4
C-16 : 2	1,16	0,30	1,4
C-18	1,78	1,20	7,53
C-18 : 1	23,85	19,70	11,77
C-18 : 2	45,20	54,80	24,48
C-18 : 3	0,51	4,20	—
No identificado		—	11,3

de transesterificación rápido y sencillo, descrito por SHIHATA y col. (1970), citado en II.4.2.15.

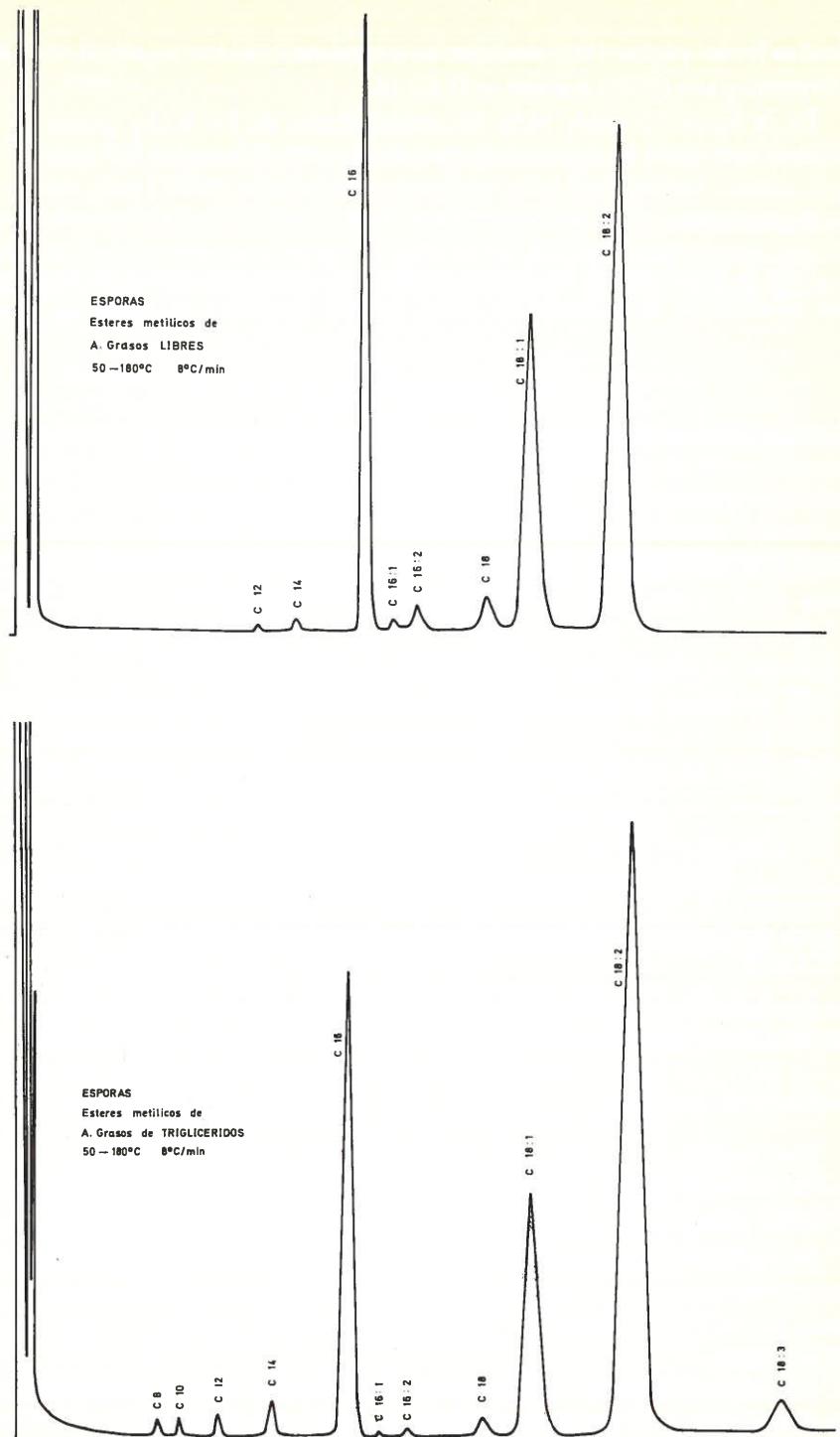
En la figura 17 puede verse un cromatograma con los ácidos grasos de esta fracción y en la tabla 12 el porcentaje representado por cada uno de los ácidos grasos.

3.—*Esteres de esteroles.*

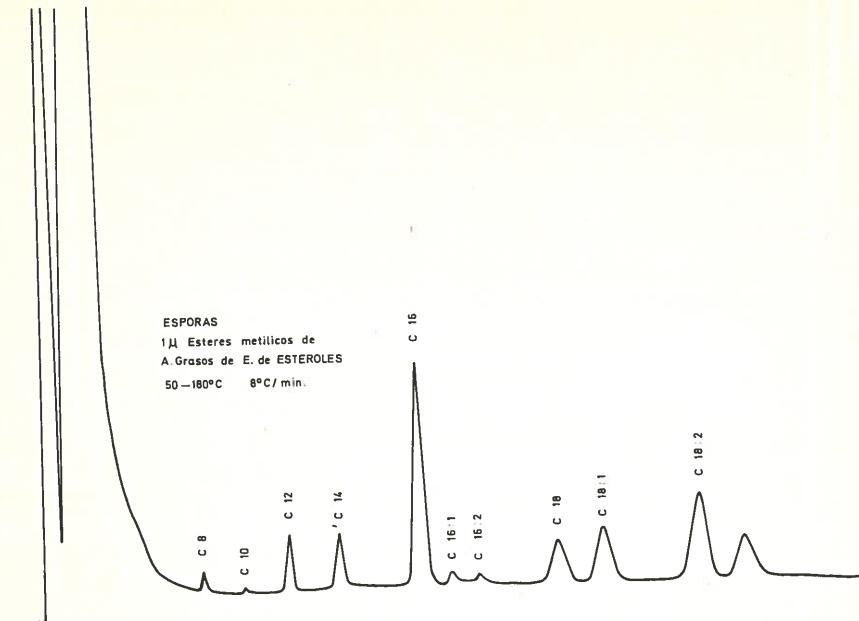
Para analizar los ácidos grasos de los ésteres de esteroles (obtenidos en el tubo n.º 1 de la cromatografía en columna de sílice gel), se saponificaron, se obtuvieron los ácidos grasos según se describe en II.4.2.13., y se metilaron con diazometano.

Se siguió este procedimiento (HORNSTEIN y col., 1967) y no el de transesterificación rápida, porque en ensayos preliminares se mostró poco adecuado, para este objeto, por las interferencias que en el desarrollo del cromatograma producían los esteroles libres.

En la figura 18 puede verse un cromatograma de los ácidos grasos de esta fracción y en la tabla 12 el porcentaje representado por cada uno de ellos.



— 680 —



4.—Fosfolípidos.

Para la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y lisofosfatidiletanolamina, se siguió la técnica de transesterificación rápida, ya citada, seguida de microsublimación.

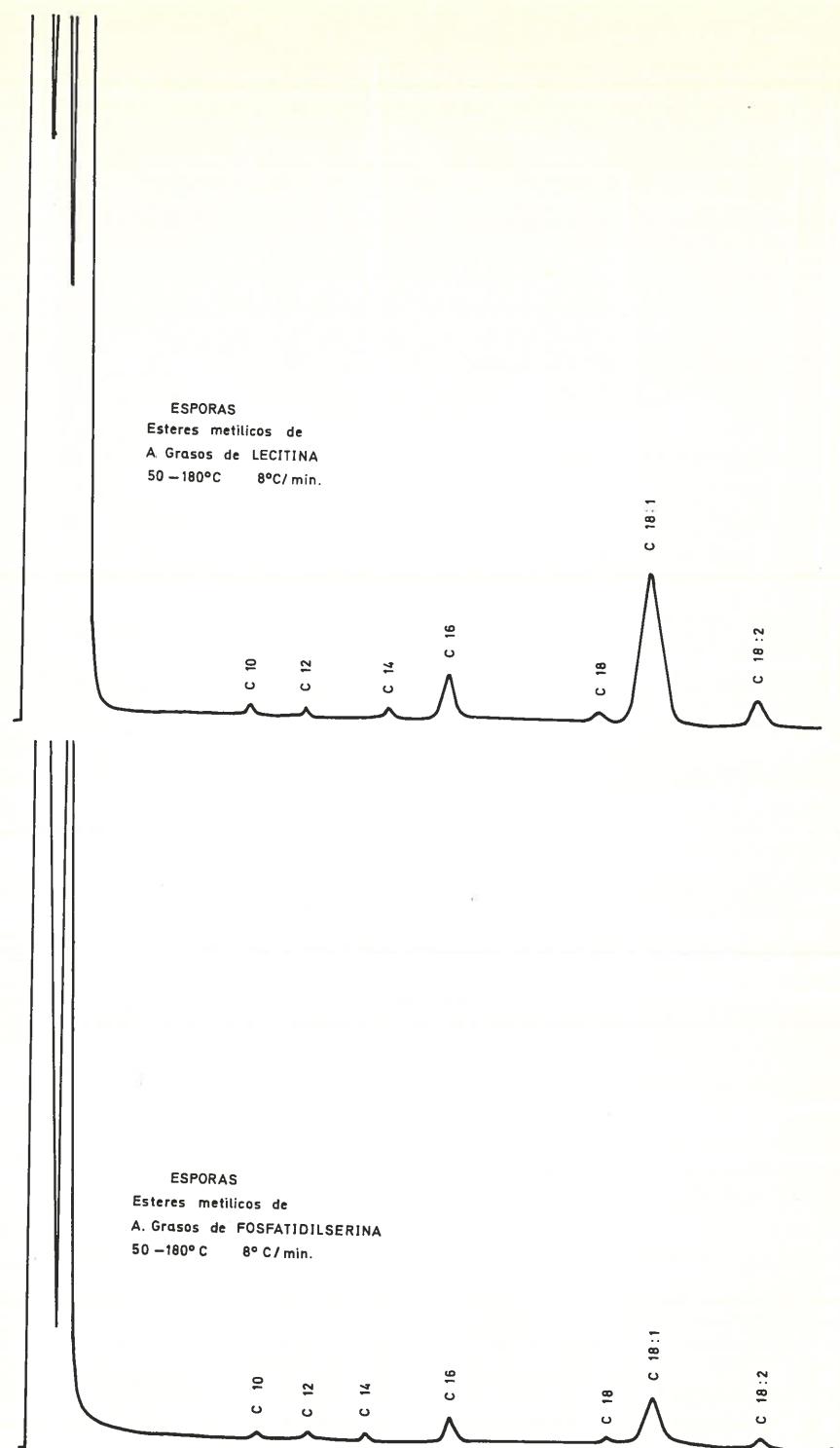
En las figuras 19, 20, 21 y 22, pueden verse los cromatogramas obtenidos aparte, de cada uno de los fosfolípidos y en la tabla 13 los porcentajes en que se encuentran los distintos ácidos grasos.

TABLA 13

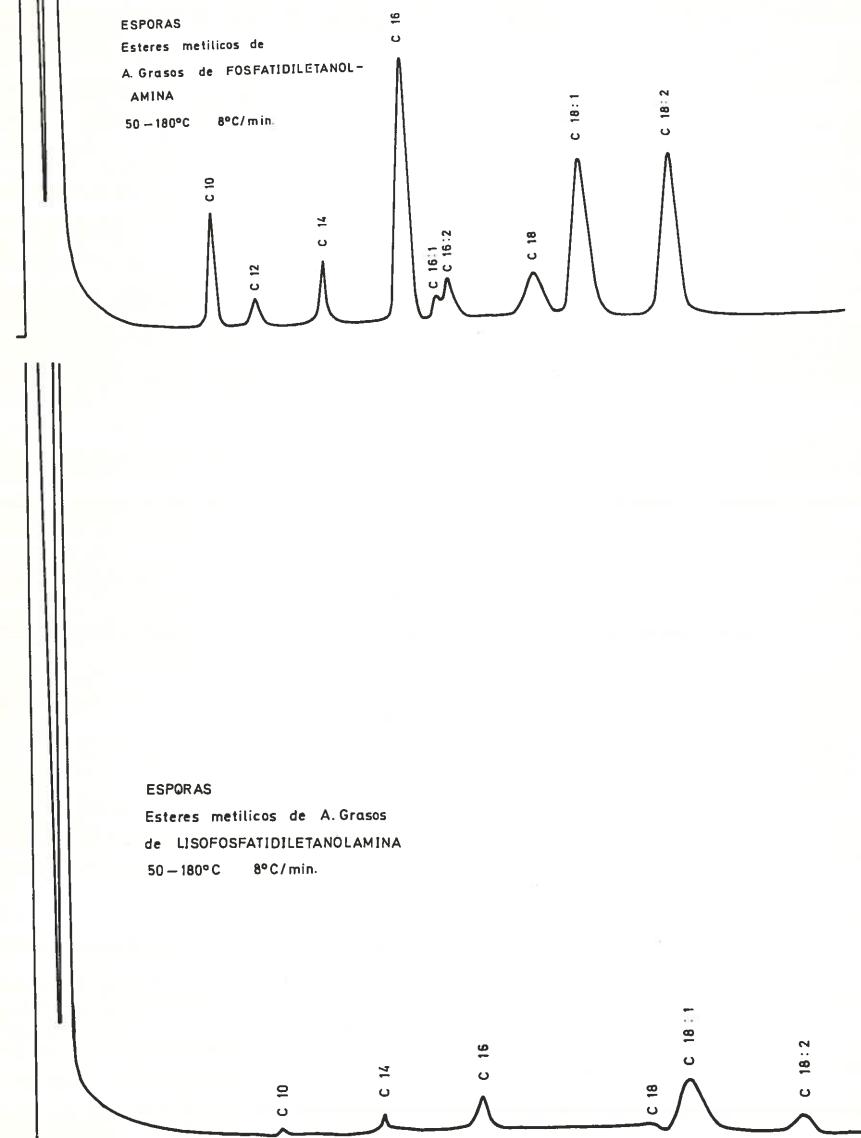
Porcentaje de ácidos grasos presentes en las fracciones lecitina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina y fosfatidilserina de esporas de *H. stellata*.

	Lecitina	Fosfatidil diletanolamina	Lisofosfati-Etanolamina	Fosfatidil serina
C-10	0,28	10,80	2,00	1,10
C-12	0,85	3,00	—	2,20
C-14	1,72	3,60	2,00	2,20
C-16	10,30	24,00	12,00	13,30
C-16 : 1	3,42	0,40	0,40	—
C-16 : 2	—	2,10	—	—
C-18	5,98	6,00	0,40	1,10
C-18 : 1	65,56	22,00	72,00	72,70
C-18 : 2	11,90	27,50	12,00	6,60

— 681 —



— 682 —



— 683 —

III.2.13. Cromatografía en columna de alúmina de la fracción soluble en éter de petróleo.

Una alícuota de 354,7 mgrs., obtenida mediante lavado con éter de petróleo (20 mls., tres veces) del extracto lipídico bruto cloroformo-metanol y metanol a ebullición, se cromatógrafió en una columna de alúmina, activada previamente, preparada según se describe en la metodología general.

Se recogieron las fracciones que figuran en la tabla 14, donde también figuran los pesos y aspectos de los lípidos contenidos, que se obtuvieron tras eliminar el disolvente mediante destilación y resto final bajo corriente de nitrógeno.

Cada una de las fracciones obtenidas se sometió al análisis espectrofotométrico. Los espectros obtenidos son los de las figuras 23 y 24.

La fracción del 2 % de éter etílico, mostraba un espectro (véase figura 23) con máximos a 262, 271, 282 y 293 típicos de los esteroideos $\Delta 5 : 7$ dienos. Una alícuota de esta fracción se saponificó y la fracción insaponificable extraída se cristalizó cinco veces en etanol. Se obtuvo su punto de fusión, que resultó ser de 162º C y se examinaron los cristales al microscopio mostrando forma de agujas, por lo que se identificó como éster de ergosterol.

TABLA 14

Cromatografía en columna de alúmina de la fracción soluble en éter de petróleo obtenida a partir del extracto lipídico bruto (cloroformo-metanol y metanol en caliente) de las esporas de *H. stellata*.

Alúmina: 20 grs. (1 % de agua); Extracto lipídico cromatografiado: 354,7 mgrs.

Fracción	Mls.	Peso (mgr)	Aspecto
Eter de petróleo	200	8,8	Oleoso
2 % E. E./E. de P.	"	16,8	Oleoso
4 %	"	127,4	Oleoso amarillento
6 %	"	32,2	Oleoso amarillento
8 %	"	2,8	Oleoso rojizo-amarillento
10 %	"	8,4	Céreo blanquecino
15 %	"	6,0	Céreo blanquecino
30 %	"	8,0	Oleoso blanquecino
Eter etílico	"	3,7	Oleoso transparente

Las fracciones más polares del 15 y 30 % de éter etílico, mostraban también un espectro (véase figura 24) con máximos a 262, 271, 282 y 293, característicos de los esteroideos $\Delta 5 : 7$ dienos. Se cristalizaron cinco veces en metanol y se obtuvieron sus puntos de fusión que resultaron ser de 162º C. Se consideraron, pues, como ergosterol.

La fracción del 4 % de éter etílico mostraba un espectro con un máximo a 272 m μ s en ciclohexano y 275 m μ s en etanol, característico de la ubiquinona. Se redujo con borohidruro y el máximo disminuyó y se desplazó a 290 m μ s.

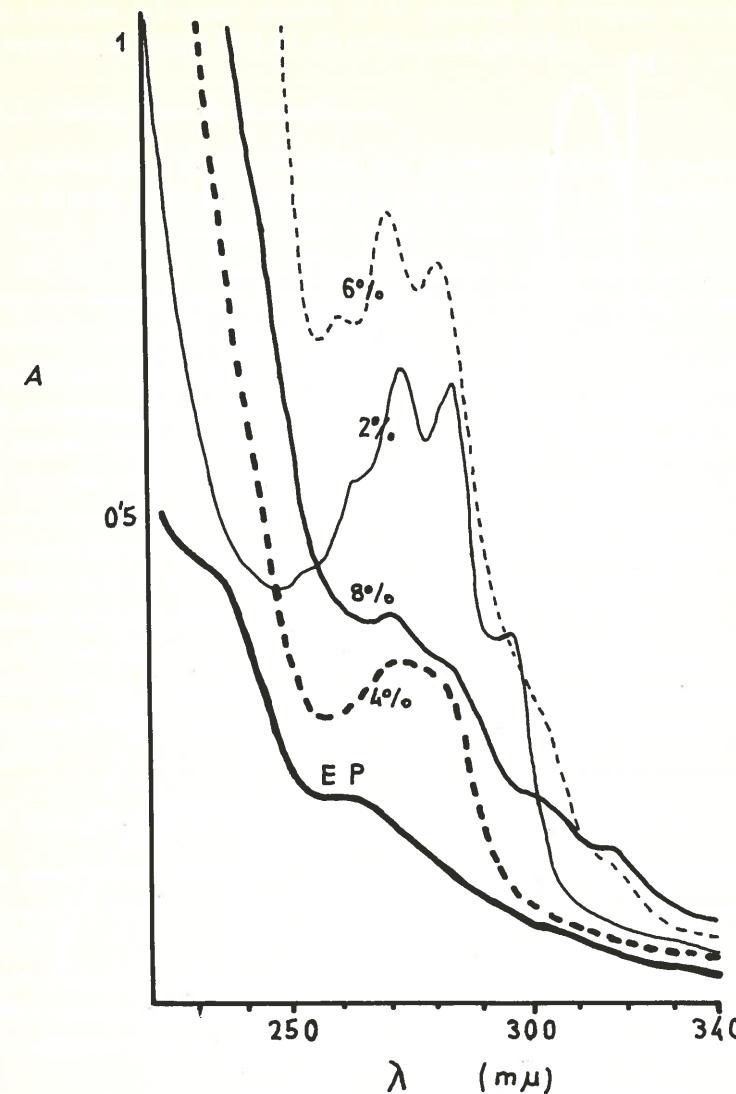


Figura 23.—Espectros ultravioletas (en etanol) de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de alúmina de la fracción lipídica obtenida por lavado con éter de petróleo del extracto bruto cloroformo-metanol y metanol a ebullición de esporas de *H. stellata*.

Fracción	mls.
E. de P.	100
2 % de E. E.	30
4 % de E. E.	30
6 % de E. E.	7,5
8 % de E. E.	5

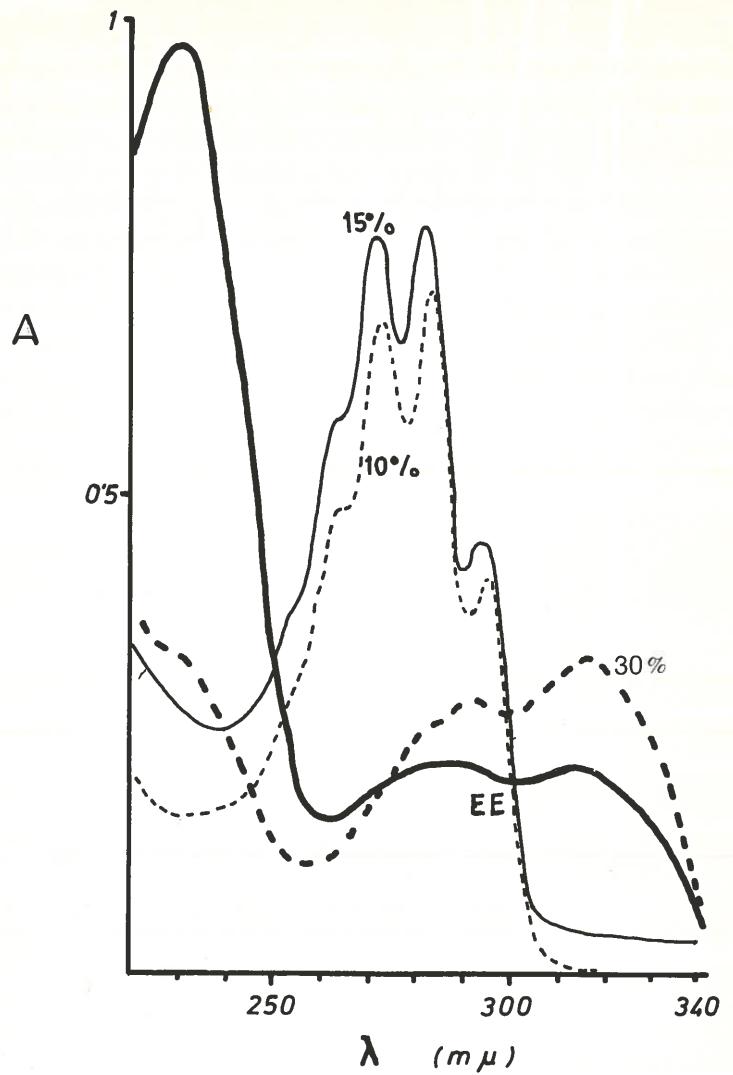


Figura 24.—Espectros ultravioletas (en etanol) de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de alúmina de la fracción lipídica obtenida por lavado con éter de petróleo del extracto bruto cloroformo-metanol y metanol a ebullición de esporas de *H. stellata*.

Fracción	mls.
10 % de E. E.	72,5
15 % de E. E.	77
30 % de E. E.	150
E. E.	30

Las restantes fracciones eluidas de la columna de alúmina, cuyos espectros pueden verse en las figuras 23 y 24, no fueron caracterizadas.

III.2.13.1. Identificación de la ubiquinona.

La fracción del 4 % de éter etílico que contenía ubiquinona se cromatógrafió en lámina fina de sílica gel (preparada según se describe en la metodología general) utilizando como disolventes una mezcla de éter de petróleo-éter etílico-acido acético (80/20/1) (v/v/v), con el fin de purificar la ubiquinona perfectamente visible. Una vez desarrollada la placa, se extrajo con éter etílico libre de peróxidos la banda amarilla constituida por la ubiquinona.

Una alícuota de la ubiquinona, así purificada, fue cromatografiada en lámina fina de sílica gel impregnada en parafina líquida preparada según se describe en la metodología general, junto con patrones de Q₄₅, Q₅₀ y Q₂₅. El cromatograma se desarrolló con una mezcla de acetona-agua (9/1) (v/v) y se reveló con el reactivo leuco-azul de metileno, preparado según se describe en el capítulo de Métodos.

En la figura 25, puede verse una copia del cromatograma en el que la ubiquinona de la fracción 4 % de éter etílico posee un R_f igual al de la muestra patrón de Q₄₅, demostrando así que es el único Q homólogo presente.

En la figura 26, puede verse el espectro en etanol de la muestra de ubiquinona purificada, oxidada y reducida con borohidruro, que sirvió para la cuantificación de la ubiquinona presente en los lípidos fácilmente extractables de las esporas de *Hemispora stellata*.

III.2.14. Cuantificación de los distintos componentes identificados.

Los distintos componentes de la fracción lípidos apolares y fosfolípidos identificados según se ha descrito, fueron cuantificados por los métodos que se detallan en II.4.2.23.

En las tablas 15 y 16 aparecen las tasas de los mismos en términos de µgrs./mgr. de extracto lipídico, porcentaje respecto del peso seco y % que representan de la fracción de lípidos neutros y lípidos polares, según el grupo a que pertenezcan.

III.3. LIPIDOS FACILMENTE EXTRACTIBLES DEL MICELIO

III.3.1. Extracto seco.

Mediante siembras de esporas de *Hemispora stellata* en medio líquido de Vaisey e incubación posterior durante 48 horas, se obtuvieron 323,5 gramos de pasta de micelio, que se almacenaron a -25° C hasta la obtención de su extracto seco, siguiendo los métodos descritos en II.4.1.6.

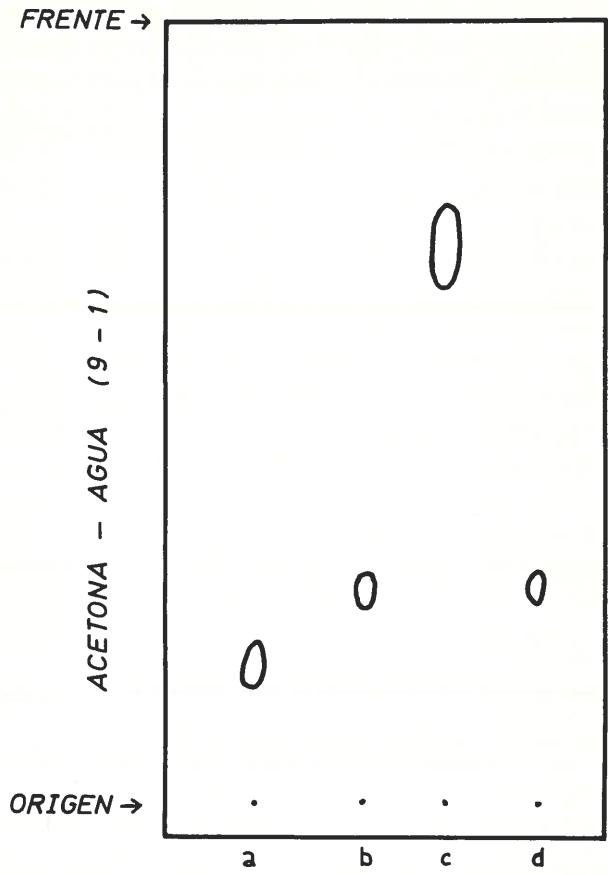


Figura 25.—Cromatografía en lámina fina de sílica gel impregnada en vaselina de las muestras de ubiquinona de esporas de *H. stellata* junto con muestras patrones de Q₂₅, Q₄₅ y Q₅₀. Revelador: reactivo leuco-azul de metileno.

(a)..Q₅₀; (b).. Q₄₅; (c).. Q₂₅; (d).. muestra de ubiquinona de esporas de *H. stellata* purificada.

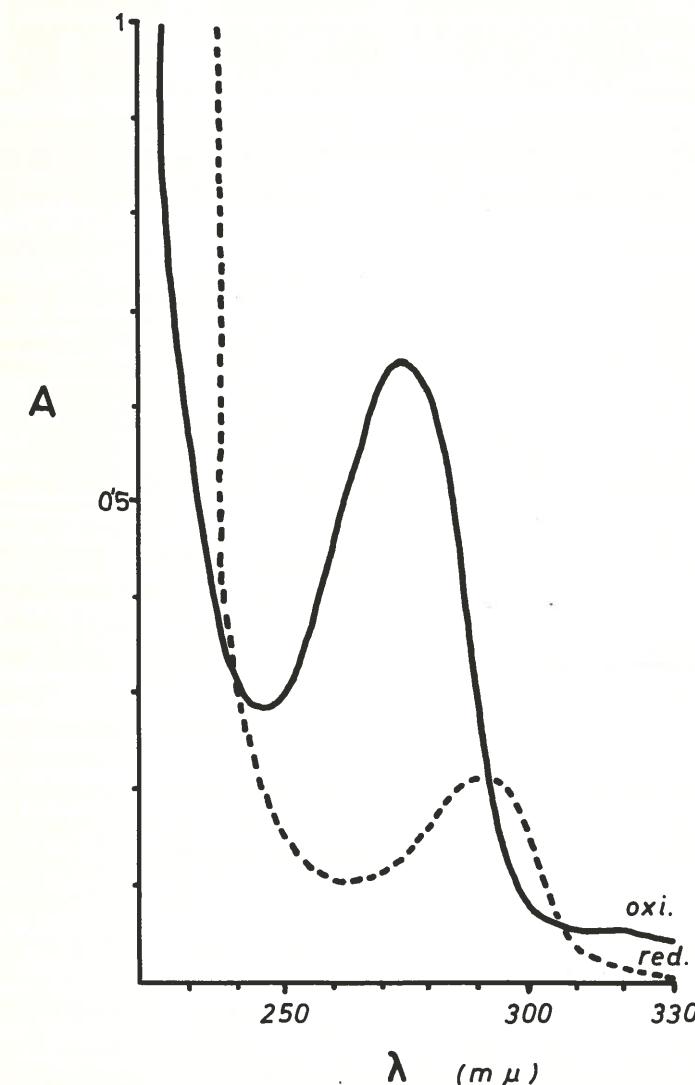


Figura 26.—Espectro ultravioleta (en etanol) de la muestra de ubiquinona purificada, oxidada y reducida con borohidruro.

TABLA 15

Lípidos identificados en la fracción lípidos apolares de esporas de *H. stellata* y tasa de los mismos en términos de lípidos totales, peso seco y lípidos apolares.

	μgr/mgr de extracto lipídico	% sobre peso seco	% sobre lípidos apolares
Ubiquinona	0,4	0,0009	0,059
Ester de ergosterol	1,6	0,0024	0,16
Ergosterol	4,8	0,0109	0,7
Triglicéridos	30,7	0,068	4,4
Acidos grasos libres	280,5	0,62	40,6

TABLA 16

Fosfolípidos identificados en esporas de *H. stellata* y tasa de los mismos en términos de lípidos totales, peso seco y lípidos polares.

	μgr/mgr de extracto lipídico	% sobre peso seco	% sobre las «fracciones lípidas polares»
Lecitina	28,9	0,084	11,5
Fosfatidiletanolina	24,5	0,07	9,8
Lisofosfatidiletanolina	35,9	0,1	14,3
Fosfatidilsérina	28	0,082	11,2

El proceso de liofilización de la pasta de micelio se realizó en diversas etapas dado la cantidad de material obtenido.

En la primera a partir de 55 gramos de pasta de micelio se obtuvieron 10,1 gramos de extracto seco (18,1 %). En la segunda partida se liofilizaron 55 gramos que rindieron 10,5 gramos de extracto seco (19 %). En la tercera etapa se liofilizaron 47 gramos de los que se obtuvieron 8,8 gramos de extracto seco (18,7 %). En la cuarta a partir de 72 gramos de pasta de micelio se obtuvieron 15 gramos de extracto seco (20,8 %). En la quinta y sexta se liofilizaron 62 y 32,5 gramos de pasta de micelio, que rindieron 13(20,9 %) y 6,3 (19,3 %) gramos respectivamente.

III.3.2. Extracto lipídico bruto.

El extracto seco del micelio, 63,7 gramos obtenidos a partir de 323,5 de pasta de micelio, fue sometido en dos fracciones al procedimiento de extracción descrito en II.4.2.2.

En la tabla 17 figuran los pesos de los extractos lipídicos brutos obtenidos;

III.3.3. Extracto lipídico purificado.

El peso de los extractos lipídicos purificados por el método de FOLCH (1957)

TABLA 17

Producto bruto de la extracción por el método de Folch de micelio de *Hemispora stellata*

Partida n.º	Miselio liofilizado (grs.)	Cloroformo-metanol		Metanol en caliente		Acetona-etanol-ClH	
		Peso extraído (grs.)	% sobre peso seco	Peso extraído (grs.)	% sobre peso seco	Peso extraído (grs.)	% sobre peso seco
1	30	3,6400	12,2	1,3970	4,6	3,1628	10,5
2	33	3,6827	11,1	2,1613	6,5		

TABLA 18

Extractos lipídicos purificados por el método de Folch de micelio *H. stellata* y su contenido en fósforo, nitrógeno e hidratos de carbono.

	% sobre peso seco de lípidos purificados	Fósforo μgr./mgr. de E. L. puro	Nitrógeno μgr./mgr. de E. L. puro	Hidratos de carbono μgr./mgr. de extracto lipídico puro
Cloroformo metanol (2/1)	2,8	1,38	4,5	8,7
Metanol en caliente.	0,8	7	9,4	18

figura en la tabla 18, así como su contenido en fósforo, nitrógeno e hidratos de carbono.

III.3.4. Fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con cloroformo-metanol y metanol en caliente, de micelio *H. stellata*, en columna de ácido silícico.

El fraccionamiento de los extractos lipídicos obtenidos con cloroformo-metanol y metanol en caliente, se realizó en columna de ácido silícico-celita, siguiendo la técnica descrita en II.4.2.5.

En este caso también inicialmente se recogieron fracciones de 10 mls. y se sometieron al análisis por cromatografía en lámina fina empleando las mismas condiciones que en el fraccionamiento del extracto lipídico de las esporas, pero el análisis de las placas demostró que los tubos contenían las mismas sustancias dentro de cada fracción cloroformo-metanol, por lo que se consideró de nuevo conveniente agruparlos y estudiar conjuntamente las fracciones.

En la tabla 19 figura el contenido en fósforo, nitrógeno e hidratos de carbono de cada una de las fracciones obtenidas.

TABLA 19

Contenido en fósforo, nitrógeno e hidratos de carbono en cada una de las diferentes fracciones de la cromatografía en ácido sílico de los extractos cloroformo-metanol y metanol en caliente de micelio de *H. stellata*.

Fracción *	Fósforo ($\mu\text{gr}/\text{mgr}$ de extr. lipídico)	Nitrógeno ($\mu\text{gr}/\text{mgr}$ de extr. lipídico)	Hidratos de carbono & & ($\mu\text{gr}/\text{mgr}$ de extracto lipídico)
I	0	0	0
II	0	12,9	34,2
III	8,65	13,5	49,9
IV	2	6	28,2
V	7,9	11,8	11,8
VI	8,7	8,7	7,1
VII	15,6	11	8,5
VIII	19,9	13,5	0

TABLA 20

Fracciones obtenidas en la cromatografía en ácido sílico del extracto cloroformo-metanol y metanol en caliente a partir de micelio de *H. stellata*.

Fracción	Disolvente	Mls.	Peso (mgr)	% del extracto lipídico
I	98/2	Cloroformo-metanol	300	1.837,7
II	97/3	»	150	65,5
III	96/4	»	150	18,8
IV	95/5	»	100	35,8
V	90/10	»	200	64,9
VI	85/15	»	200	130
VII	80/20	»	200	24,9
VIII	Metanol	200	55,4	1,08

Rendimiento 99,43 %
% lípidos apolares 82,3; % lípidos polares 17,13 %

En la tabla 20 figuran las condiciones cromatográficas empleadas, así como los porcentajes representados por cada una de las fracciones obtenidas.

III.3.5 Fraccionamiento de los lípidos neutros eluidos de la columna de sílica gel con cloroformo-metanol (98/2)

Una alícuota de 220 mgrs. de la fracción eluida con cloroformo-metanol (98/2)

* Véase tabla 20.
& expresado anteriormente de glucosa.

se cromatógrafió en columna sílica gel G, siguiendo la técnica descrita en II. 4.2.6.

Los resultados del desarrollo de la cromatografía, así como las condiciones figuran en la tabla 21.

Al igual que en el fraccionamiento de los lípidos neutros de las esporas, en este caso también se recogieron lípidos en todas las fracciones a excepción de la 4.^a

Al objeto de contrastar el comportamiento de la columna e identificar los lípidos que componían cada fracción eluida de la columna de sílica gel, una alícuota de cada fracción se cromatógrafió en lámina fina de sílica gel y patrones. El revelado

TABLA 21

Fraccionamiento de los lípidos apolares de micelio de *H. stellata* en columna de sílica gel.

Sílica gel: 20 grs.; Diámetro de la columna: 1,6 cms.; Extracto lipídico cromatografiado: 220 mgrs.; Altura: 18 cms.; flujo 1,6 ml/min.

Fracción	Disolvente	Mls.	Peso (mgr)	% del extracto lipídico
1	Benceno	20	6,2	2,9
2	»	10	8,2	3,8
3	»	20	1,3	0,61
4	»	10	0	0
5	Benceno/éter E/etanol (80/19/1)	10	14,4	6,7
6	» » » »	40	55,7	26,1
7	» » » »	50	40	18,7
8	» » » »	40	25,2	11,8
9	» » » »	30	6,6	3,1
10	Benceno/éter E/etanol (30/67/3)	70	8,9	4,1
11	Eter etílico	40	8	3,7
12	» »	30	2	0,9
13	Metanol	10	2,3	1,08
14	»	40	28,2	13,2
15	»	10	6	2,8

se efectuó con ácido sulfúrico al 50 %. La figura 27 es una copia de una de las láminas así reveladas.

a) La fracción n.^o 1 de la cromatografía en sílica gel, se mostró homogénea, dio un Rf de 0,80.

b) Las fracciones 2 y 3 mostraron un comportamiento homogéneo, ambas dieron un Rf de 0,58, igual al de la tripalmitina.

c) La fracción n.^o 5 eluida de la columna de sílica gel, mostraba igualmente un comportamiento homogéneo y dio un Rf de 0,48, idéntico al de ubiquinona.

d) Las restantes fracciones dieron diversas manchas de Rf. la mancha n.^o 4 presente en las fracciones 6, 7 y 8 dio un Rf de 0,37, idéntico al de los ácidos gra-

sos. Las restantes manchas de Rf 0,18, 0,13, 0,06 y 0, respectivamente mostraron en las placas reveladas con sulfúrico un color rojizo de variable intensidad, especialmente manifiesto en la de Rf 0,18, típico de los tres hidroxiesteroides con doble enlace en posición 5.

III.3.6. Identificación definitiva y cuantificación de algunos componentes.

Reveladas las placas con rodamina 6G y examinadas bajo la luz ultravioleta se

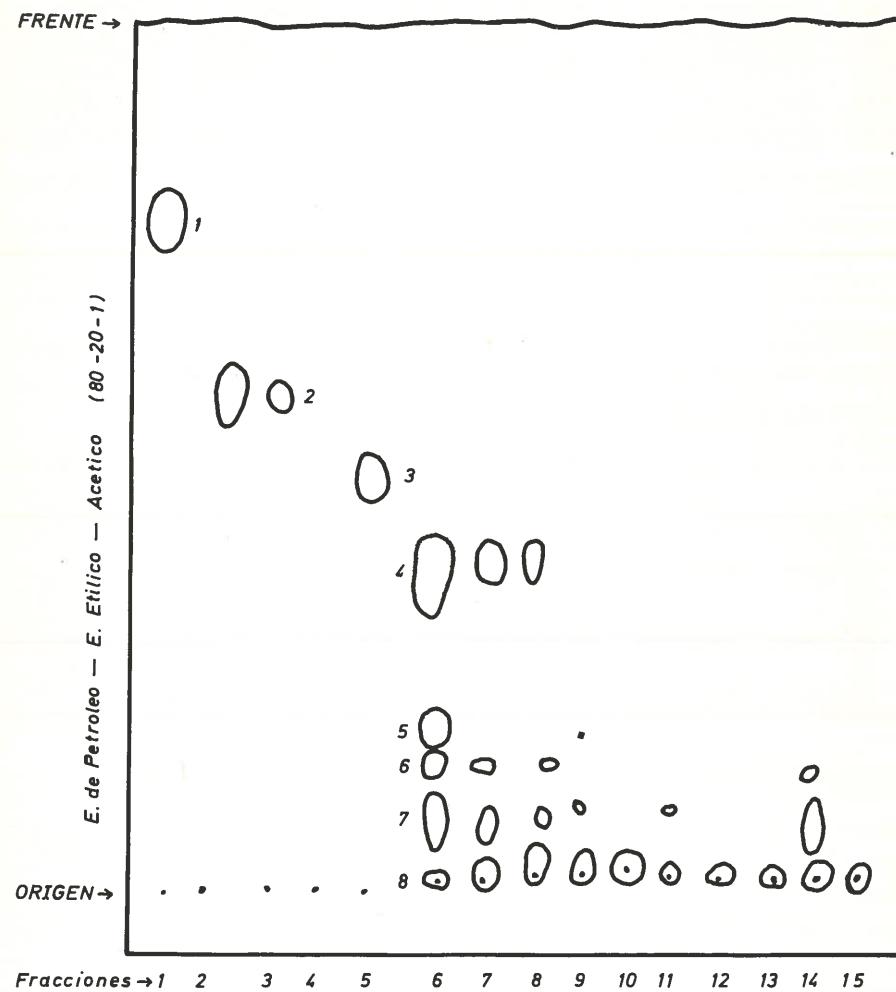


Figura 27.—Cromatografía en lámina fina de las fracciones de los lípidos apolares de micelio de *H. stellata* eluidas de la columna de sílica gel.

Revelador: ácido sulfúrico al 50 %.

Rf: mancha n.º 1..0,80; mancha n.º 2..0,58; mancha n.º 3..0,48; mancha n.º 4..0,37; mancha n.º 5..0,18; mancha n.º 6..0,13; mancha n.º 7..0,06 y mancha n.º 8..0.

observaron las mismas manchas; las de Rf 0,37 mostraban una fluorescencia más intensa, típica de los ácidos grasos libres y como tal se consideraron.

Las fracciones de comportamiento homogéneo, en cromatografía en lámina fina, fueron sometidas directamente a análisis espectrofotométrico en etanol y ciclohexano.

La fracción n.º 1 presentaba el espectro de la figura 27, con máximos a 262,

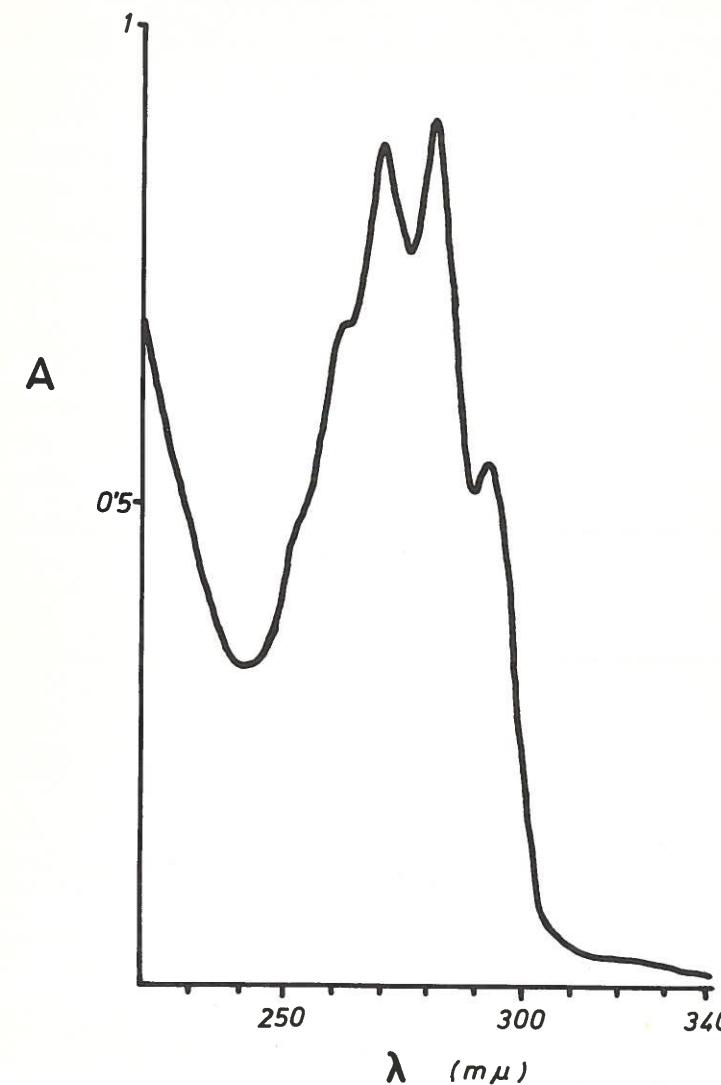


Figura 27a.—Espectro ultravioleta de la fracción n.º 1 (eluida con 20 mls. de benceno) obtenida por cromatografía en columna de sílica gel. de los lípidos apolares de micelio de *H. stellata*. Disolvente: etanol; concentración mgs./ml. E $\frac{1}{cm}$ a 282 mls.

271, 282 y 293 característicos de los esteroides 5 : 7 dieno. En virtud de los datos que se citan en la sección de esporas, se identificó como constituida primordialmente por ésteres de ergosterol.

Las fracciones 2 y 3 mostraban espectros ultravioletas inespecíficos.

La fracción n.^o 5 presentaba el espectro de la figura 28, con un máximo a 275 m μ s

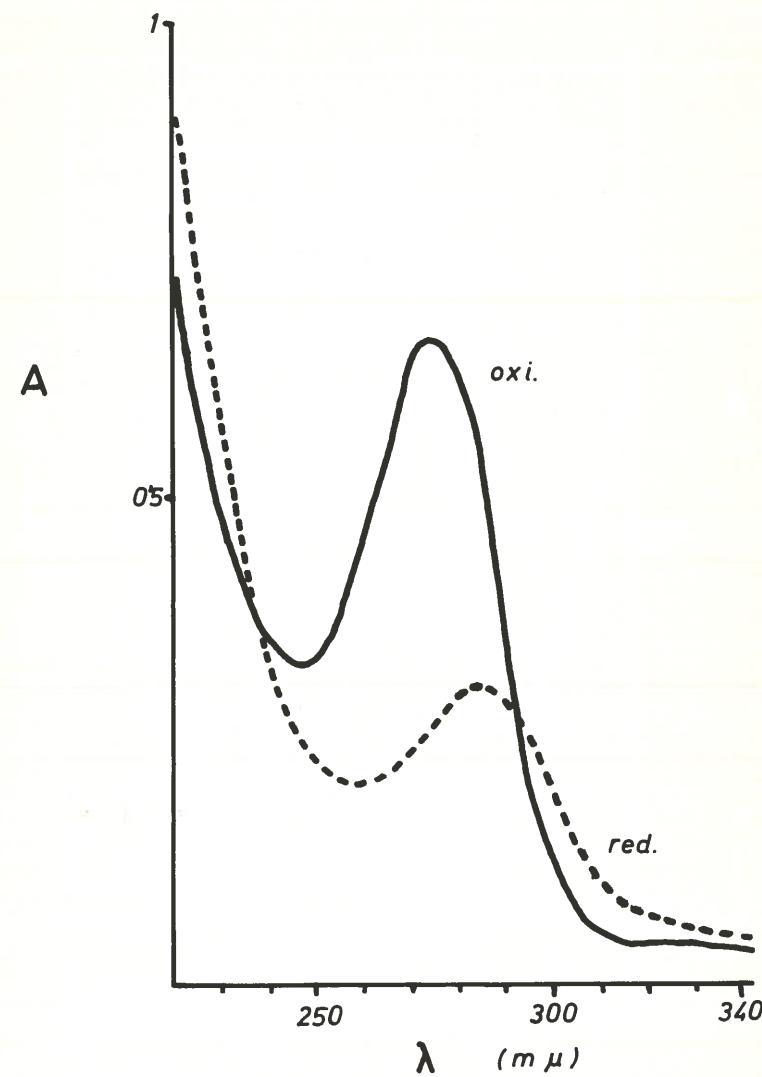


Figura 28.—Espectro ultravioleta de la fracción n.^o 5 (eluida con 10 mls de benceno-éter etílico-ethanol en las proporciones 80/19/1) obtenida por cromatografía en columna de sílica gel. de los lípidos apolares de micelio de *H. stellata*. Disolvente: etanol.

oxd.: según fue extraído de la columna.

red.: reducido con unos cristales de borohidruro potásico.

en etanol, característico de la ubiquinona. Al ser reducida con borohidruro el máximo disminuyó y se desplazó a 290 m μ s. Las cifras de ubiquinona que figuran en la tabla 25 fueron calculadas basándose en los datos así obtenidos.

Los espectros de las restantes fracciones están en la figura 29.

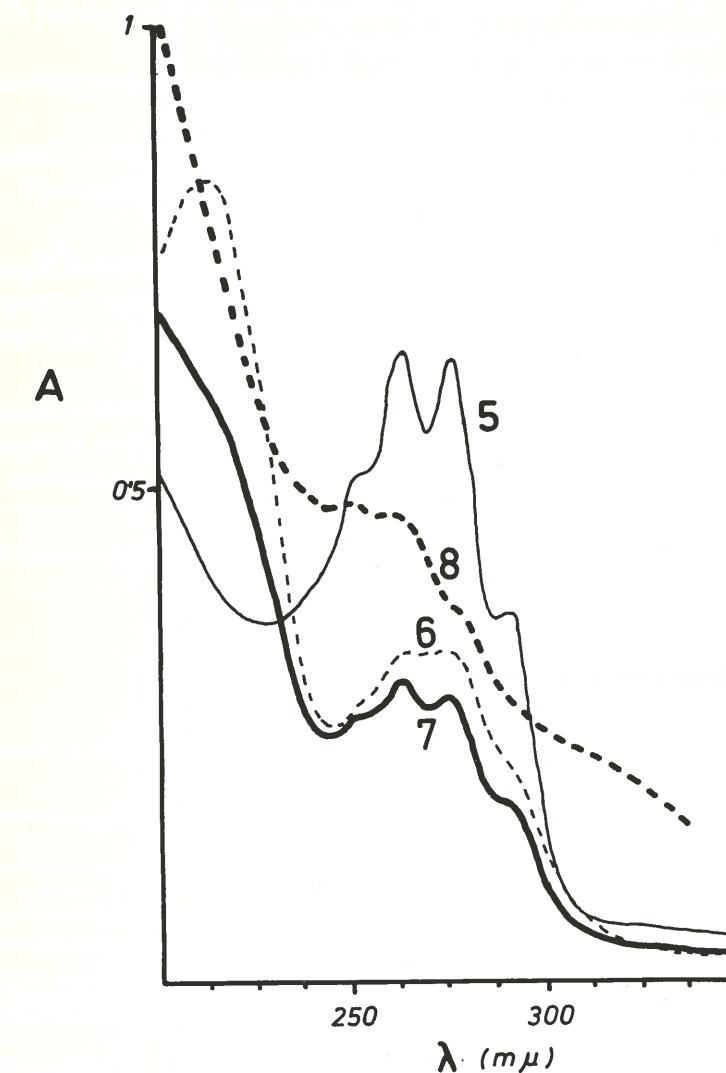


Figura 29.—Espectros ultravioletas de las manchas n.ºs. 5, 6, 7 y 8 (véase figura 27) pertenecientes a las fracciones 6 a 15, obtenidas por cromatografía en columna de sílica gel, de los lípidos apolares de micelio de *H. stellata*. Disolvente: etanol.

III.3.7. Cromatografía de los lípidos neutros del micelio de *Hemispora stellata*, eluidos de la columna de ácido silícico con cloroformo-metanol (98/2), en columna de alúmina.

Una alícuota de 255,8 mgrs. de la fracción eluida de cloroformo-metanol (98/2) se cromatógrafió en una columna de alúmina, según se describe en la metodología general. Se recogieron las fracciones que figuran en la tabla 22, donde también se dan los pesos y aspectos de los lípidos contenidos, que se obtuvieron tras eliminar el disolvente por destilación y corriente de nitrógeno.

Cada una de las fracciones obtenidas se sometió al análisis espectrofotométrico. Los espectros obtenidos son los de las figuras 29 y 30.

Las fracciones del 2 y 4 % de éter etílico, mostraban un espectro (véase figura 29) con máximos a 262, 271, 282 y 293 característicos de los esteroides 5 : 7 dienos. Se identificó como éster de ergosterol.

La fracción del 6 % de éter etílico presentaba un espectro (véase figura 29) con un máximo a 272 m μ s en ciclohexano y 275 m μ s en etanol, característico de la ubiquinona. Se redujo con borohidruro y el máximo disminuyó y se desplazó a 290 m μ s.

Las fracciones de 15 y 30 % de éter etílico, más polares que la ubiquinona, mostraron un espectro con máximos a 262, 271, 282 y 293, característicos de los esteroides 5 : 7 dieno. Se consideraron, pues, como constituidos fundamentalmente como ergosterol.

Las restantes fracciones eluidas de la columna de alúmina cuyos espectros pueden verse en las figuras 29 y 30 no fueron caracterizados.

TABLA 22

Cromatografía en columna de alúmina de los lípidos apolares de micelio de *Hemispora stellata*

Alúmina: 20 grs. (1 % de agua); Extracto lipídico cromatografiado: 255,8 mgrs.

fracción	Mls.	Peso (mgr)	Aspecto
Eter de petróleo	200	2,2	Céreo incoloro.
2 % E. E./E. de P.	200	6,3	Céreo
4 % "	"	4,4	Oleoso amarillento
6 % "	"	35,7	Oleoso amarillento
8 % "	"	11,2	Oleoso
10 % "	"	13,5	Céreo blanquecino
15 % "	"	23,6	Céreo blanquecino
30 % "	"	37,7	Céreo blanquecino
Eter etílico	"	48,3	Céreo amarillento

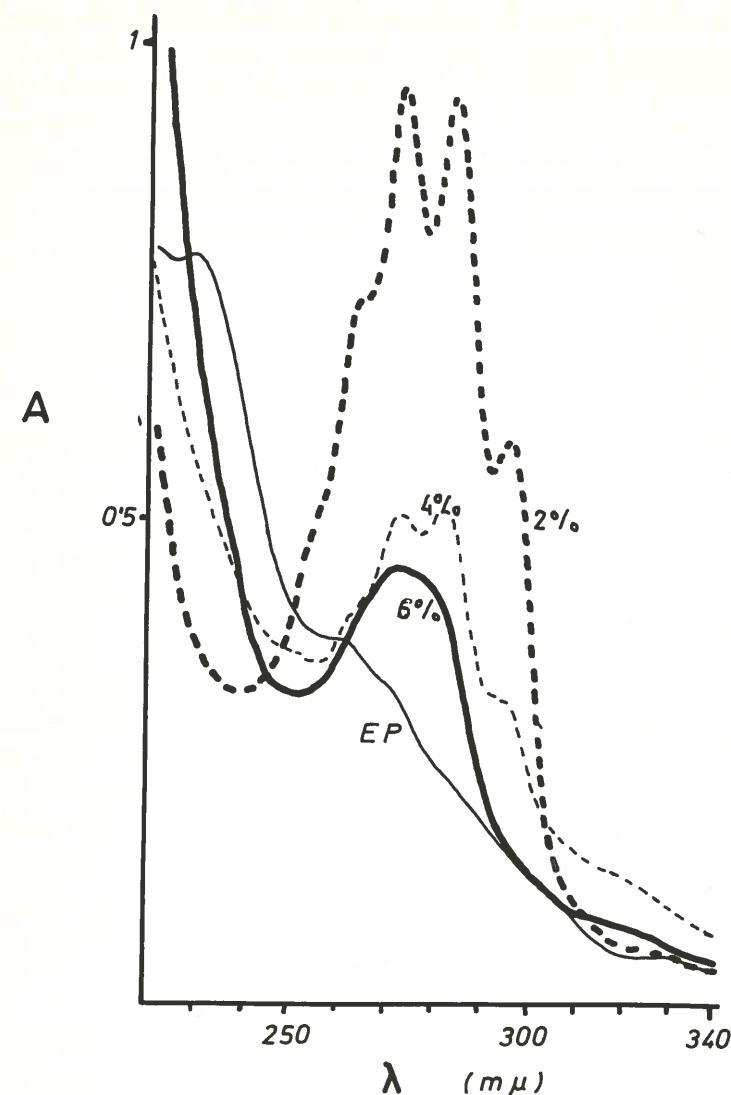


Figura 29a.—Espectros ultravioletas (en etanol) de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de alúmina de los lípidos apolares del micelio de *H. stellata*.

Fracción	mls.
E. de P.	21
2 % de E. E.	27
4 % de E. E.	36
6 % de E. E.	45

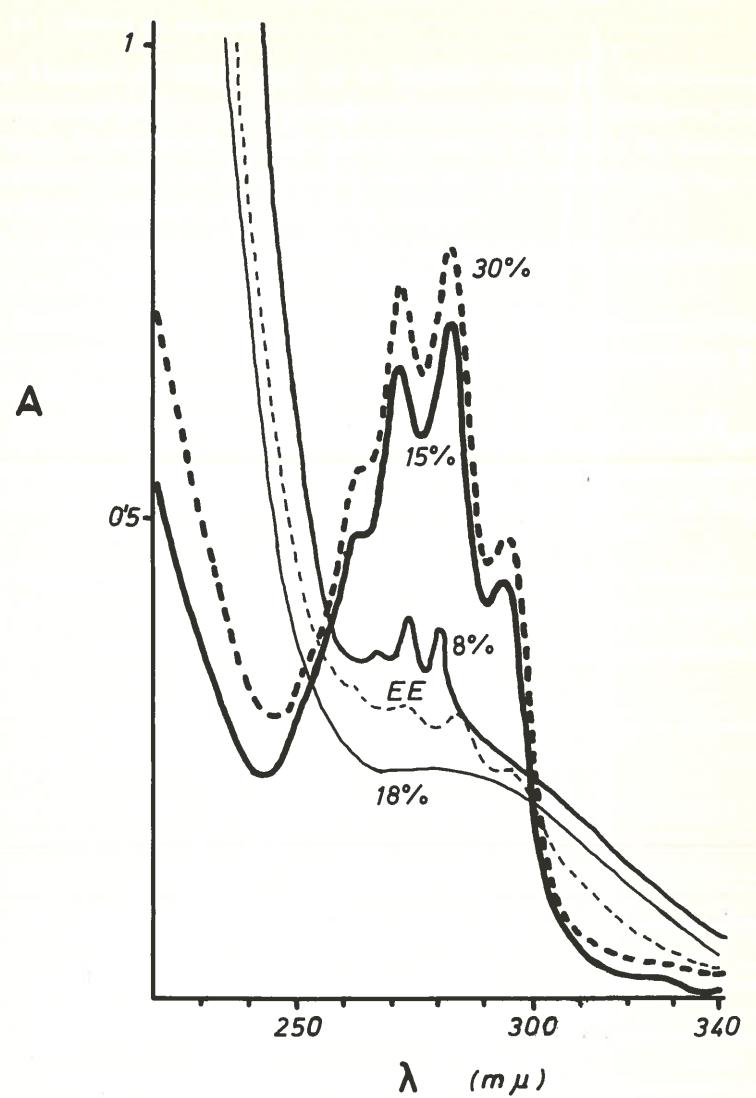


Figura 30.—Espectros ultravioletas (en etanol) de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de alúmina de los lípidos apolares del micelio de *H. stellata*.

Fracción	mls.
8 % de E. E.	18
10 % de E. E.	36
15 % de E. E.	270
30 % de E. E.	270
E. E.	90

III.3.7.1. Identificación de la ubiqüinona.

La fracción del 6 % de éter etílico que contenía ubiqüinona se cromatógrafió en lámina fina de sílica gel, empleando las mismas condiciones que en el caso de las esporas (véase III.2.13.1.) con el fin de purificarlas.

Una alícuota de la ubiqüinona purificada se cromatógrafió en lámina de sílica gel impregnada en parafina líquida, preparada siguiendo la técnica descrita en II.4.2.9. Para el desarrollo de la cromatografía se empleó una mezcla de acetona-agua (9/1) (v/v) y se reveló la placa con el reactivo leuco-azul de metileno, preparado según se describe en II.4.2.10.(B.5.).

Los cromatogramas obtenidos fueron idénticos a los ya descritos para las esporas, demostrando sólo la presencia de Q₄₅.

III.3.8. Fraccionamiento de los lípidos eluidos de la columna de ácido silícico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4 y 95/5) e identificación de sus componentes

Las fracciones eluidas de la columna de ácido silícico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4 y 95/5), que representan el 2,84 %, 0,81 % y el 1,6 %, respectivamente del extracto lipídico del micelio y que carecían de fósforo, contenían nitrógeno e hidratos de carbono, fueron analizadas en cromatografía en lámina fina de sílica gel G. Los cromatogramas se desarrollaron con cloroformo-metanol-agua (65/25/4) (v/v/v) y se revelaron con ácido sulfúrico al 50 %, demostrándose la presencia de tres manchas (véase figura 31). La mancha n.º 2 de la figura mostraba el color característico de los 3-hidroxiesteroides con doble enlace en posición Δ⁵ (reacción de Liebermann-Burchard).

Para la identificación de la naturaleza de las mismas se empleó el mismo sistema y reactivo usados con las mismas fracciones de las esporas (véase III.2.7.).

La mancha de la figura n.º 31, presente en las tres fracciones, no dio reacción alguna frente a los reactivos específicos y se identificó como restos de lípidos neutros.

TABLA 22a

Comportamiento frente a los distintos reactivos de las manchas obtenidas por cromatografía en lámina fina (véase figura 31) a partir de las fracciones lipídicas eluidas de la columna de ácido silícico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4 y 95/5).

Mancha n.º	Rf	Reactivos a. sulfúrico nitramina	Reactivos de dife- molibdeno	Reactivos azul de metileno	Reactivos de Schiff drina	Reactivos de ninhi- drina	Reactivos de I + IK	Identificación
1	0,98	+	-	-	-	-	-	Lípidos neutros
2	0,70 *	+	+	-	+	+	-	Esterol glicósido
3	0,59	+	-	+	-	+	-	Fosfatidiletanol- amina

* Mostraba el color característico de los 3-hidroxiesteroides con doble enlace en posición Δ⁵ (Reacción Liebermann-Burchard).

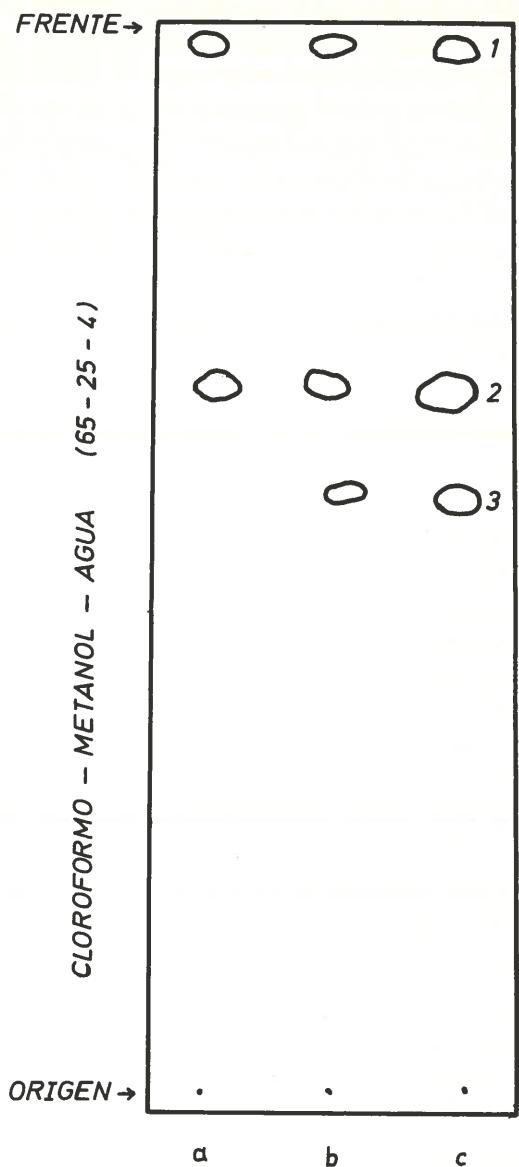


Figura 31.—Cromatografía en lámina fina de las fracciones de los lípidos del micelio de *H. stellata* eluidos de la columna de ácido silícico con cloroformo-metanol (97/3; 96/4 y 95/5). Revelador: ácido sulfúrico al 50 %.
 (a)..(97/3); (b)..(96/4); (c)..(95/5).
 Rf: mancha n.º 1..0,98; mancha n.º 2..0,66; mancha n.º 3..0,55.

— 702 —

La mancha n.º 2, también presente en las tres fracciones, dio una reacción fuertemente positiva frente a la difenilamina y al reactivo de Schiff y débilmente positiva frente a la ninhidrina y no reaccionó con los reactivos específicos para los ésteres fosfóricos, ni los grupos colina. Su Rf es de 0,70. La citada sustancia fue en este estado provisionalmente considerada como un esterol glicósido.

La mancha n.º 3, de Rf 0,59, presente en la fracción III y IV se mostró positiva frente a los reactivos de ninhidrina y azul de molibdeno y negativa frente al resto de los reactivos específicos. Su Rf fue similar al de una muestra patrón de fosfatidiletanolamina, por lo que se caracterizó provisionalmente como fosfatidiletanolamina.

III.3.9. Fraccionamiento de los lípidos eluidos de la columna de ácido silícico con cloroformo-metanol (90/10; 85/15; 80/20) y metanol (fracciones V, VI, VII y VIII).

Las fracciones eluidas de la columna de ácido silícico con cloroformo-metanol en las proporciones (90/10; 85/15 y 80/20) y metanol, todas las cuales contienen fósforo y nitrógeno y las fracciones (90/10, 85/15 y 80/20) que contienen además hidratos de carbono, fueron sometidas a cromatografía analítica en lámina fina.

Se depositaron alícuotas de cada fracción en cinco placas de sílica gel G; las placas se desarrollaron con una mezcla de cloroformo-metanol y agua en las proporciones 65/25/4 (v/v/v) y se revelaron con los mismos reactivos empleados en la caracterización de las mismas fracciones de las esporas (véase III.2.8). En la figura n.º 32 es una copia de una de las placas reveladas con ácido sulfúrico, donde puede apreciarse la presencia de cinco manchas.

La mancha n.º 1, presente en las fracciones V, VI y VII, dio al ser revelada la placa con ácido sulfúrico, una coloración característica de los 3-hidroxiesteroides con doble enlace con posición 5 (reacción de Liebermann-Burchard), reacción fuertemente positiva frente a la difenilamina y al reactivo de Schiff y débilmente positiva frente a la ninhidrina y no reaccionó con los reactivos específicos de los ésteres fosfóricos y grupos colina; su Rf fue de 0,69; presentaba, pues, las mismas características que la n.º 2 de las fracciones II, III y IV, se identificó provisionalmente como un esterol glicósido.

La mancha n.º 2 de Rf 0,59 presente en las fracciones V, VI y VII, dio reacción positiva frente a la ninhidrina y al reactivo azul de molibdeno y negativa frente al resto de reactivos específicos. Su Rf es idéntico al de una muestra patrón de fosfatidiletanolamina cromatografiada con ella.

La mancha n.º 3 presente en las fracciones VII y VIII, de Rf 0,38, se mostró positiva frente al reactivo de I + IK para grupos colina y al de azul de molibdeno y negativa frente al resto de reactivos específicos. Su Rf fue similar a las muestras patrones de lecitina, por lo que se caracterizó.

— 703 —

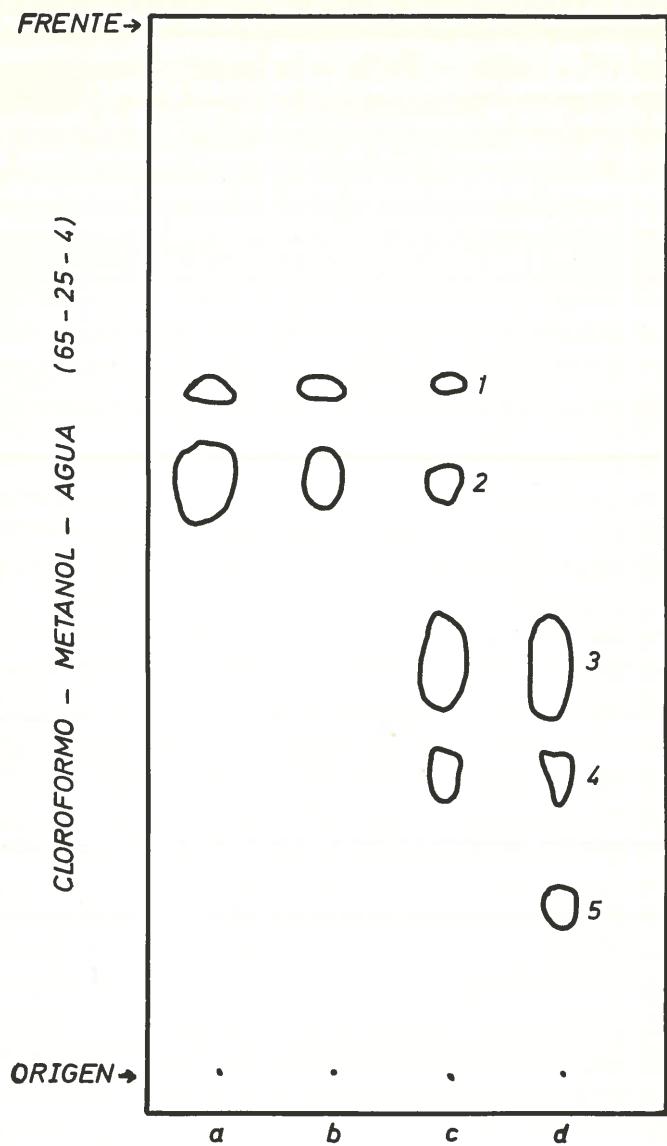


Figura 32.—Cromatografía en lámina fina de las fracciones de los lípidos del micelio de *H. stellata* cluidos de la columna de ácido silícico con cloroformo-metanol (90/10 85/15 y 80/20) y metanol.

Revelador: ácido sulfúrico al 50 %.

(a) ..(90/10); (b)..(85/15); (c)..(80/20); (d)..metanol.

Rf: Mancha n.º 1..0,69; mancha n.º 2..0,59; mancha n.º 3..0,38 mancha n.º 4..0,28 y mancha n.º 5..0,15.

La mancha n.º 4 presente en las fracciones VII y VIII, de Rf 0,28, resultó positiva frente al reactivo de ninhidrina y el reactivo azul de molibdeno, y negativa frente al resto de los reactivos específicos. Se caracterizó provisionalmente como lisofosfatidiletanolamina.

La mancha n.º 5 presente en la fracción eluida con metanol, de Rf 0,15, resultó ser positiva frente a los mismos reactivos que la mancha n.º 4 y negativa frente al resto de reactivos específicos. Su Rf fue similar al de una muestra patrón de fosfatidilserina, caracterizándose provisionalmente como fosfatidilserina.

III.3.10. Confirmación de la naturaleza de los distintos fosfolípidos y esterol glicósidos provisionalmente identificados en lámina fina.

La confirmación de la identidad de los distintos fosfolípidos y esterol glicósidos se realizó mediante la investigación de sus productos de hidrólisis, por cromatografía ascendente en papel de Whatman n.º 1, igual que las fracciones homólogas procedentes de las esporas.

Cuando fue necesario se purificaron previamente las fracciones por cromatografía en lámina fina preparativa. Al igual que las esporas se confirmó la identidad de los diversos fosfolípidos y se precisó que la glucona de los esteroles glicósidos era glucosamina.

III.3.11. Ácidos grasos de los lípidos identificados en micelio de *Hemispora stellata*.

El análisis de los ácidos grasos contenidos en las distintas fracciones identificadas: ácidos grasos libres, triglicéridos, esteroides y los fosfolípidos: lecitina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y lisofosfatidil-ethanolamina, se realizó por cromatografía en fase gaseosa, para lo que se aislaron los distintos componentes lipídicos, se metilaron sus ácidos grasos y se microsublimaron, por las técnicas descritas en II.4.2.14, 15 y 16.

III.3.11.1. Obtención y preparación de las muestras para la metilación.

Los esteroides y triglicéridos aislados sin contaminación por otros componentes lipídicos, en los tubos 1, 2 y 3 respectivamente de la cromatografía en columna sílica gel, no precisaron ninguna purificación posterior. Los ácidos grasos libres presentes en los tubos 6, 7 y 8 de la misma cromatografía tampoco fueron sometidos a tratamiento previo alguno, como en el caso de las esporas.

Los fosfolípidos se purificaron por cromatografía en lámina fina preparativa, al igual que en las muestras procedentes de las esporas y se confirmó su pureza por idénticos procedimientos.

Los ésteres metílicos se prepararon también del mismo modo que en las corres-

TABLA 23

Porcentaje de ácidos grasos, presentes en las fracciones ácidos grasos libres, triglicéridos, ésteres de esterolos de micelio de *H. stellata*.

	Acidos grasos libres	Triglicéridos	Esteres de esterolos
C-8	—	—	1,47
C-10	—	—	0,17
C-12	—	—	1,33
C-14	0,51	0,42	1,07
C-16	17,8	18,20	10,80
C-16 : 1	0,85	0,25	0,98
C-16 : 2	0,04	0,30	0,88
C-18	3,52	2,30	5,82
C-18 : 1	11,53	10,10	14,82
C-18 : 2	65,12	68,20	61,11

TABLA 24

Porcentaje de ácidos grasos presentes en las fracciones lecitina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina y fosfatidilserina de micelio de *H. stellata*.

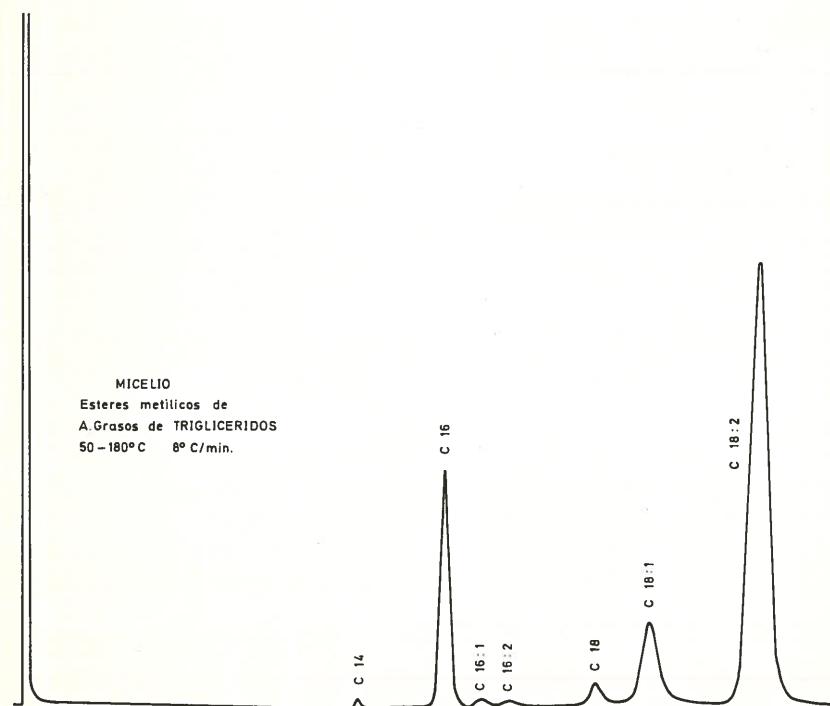
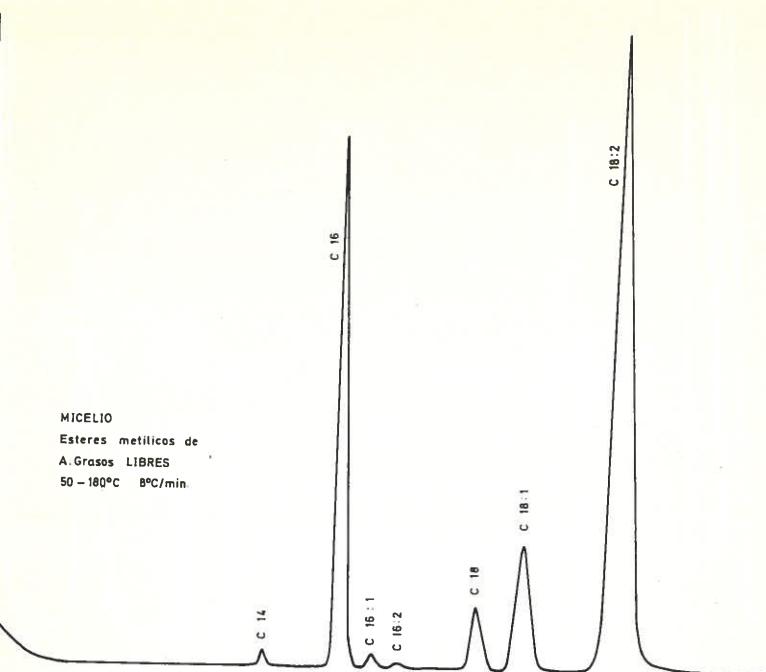
	Lecitina	Fosfatidil Etanolamina	Lisofosfatidiletanolama- mina	Fosfatidilserina
C-8	0,22	—	—	—
C-10	4,81	—	0,97	4,80
C-12	5,73	—	1,50	5,30
C-14	5,19	—	4,00	5,25
C-16	6,41	21,30	7,70	9,50
C-16 : 1	3,81	1,41	1,08	2,55
C-16 : 2	—	1,41	—	—
C-18	4,96	7,55	4,85	2,30
C-18 : 1	64,98	35,40	35,00	62,00
C-18 : 2	3,44	33,30	44,50	7,60

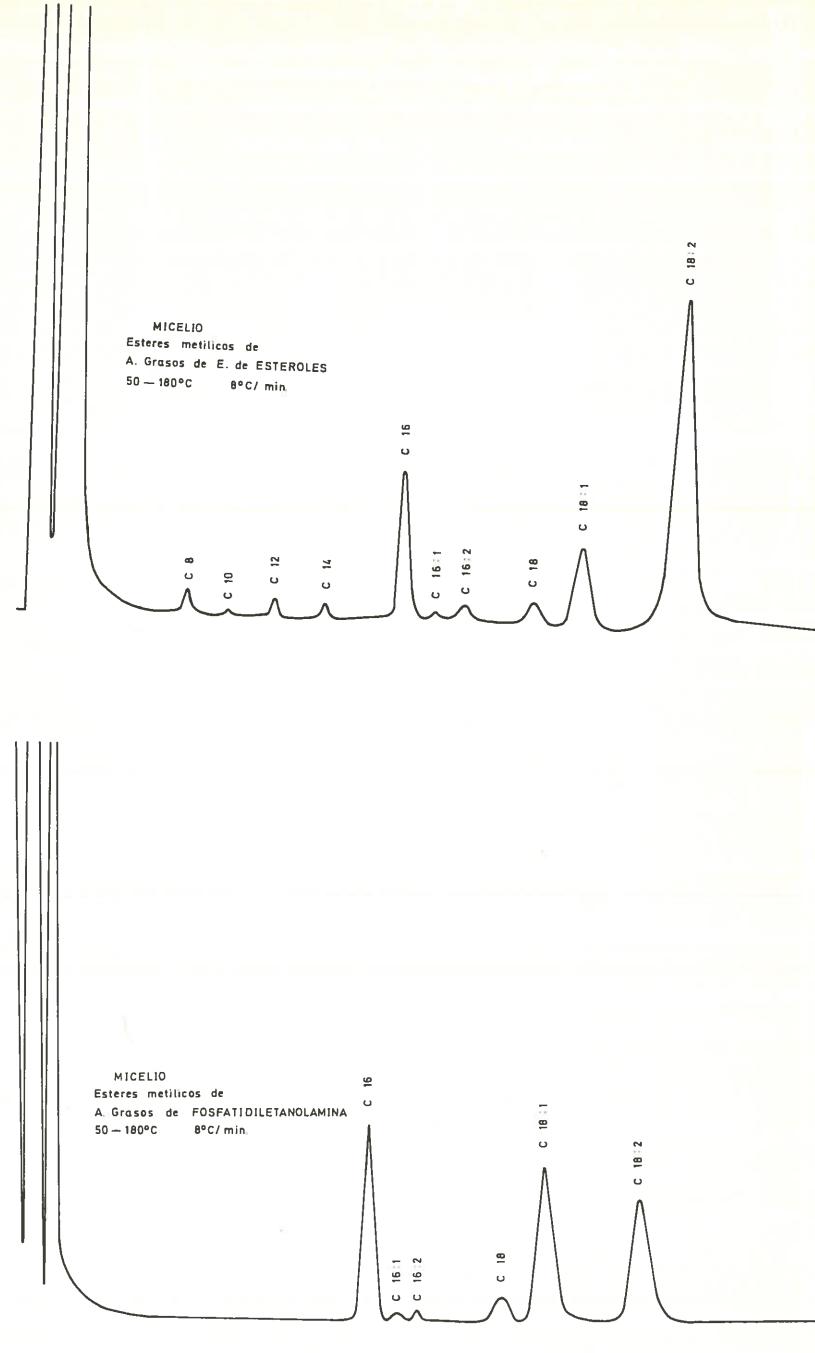
pondientes fracciones de las esporas. En las figuras 33 a 39 puede verse los cromatogramas correspondientes a las distintas fracciones lipídicas y en las tablas 23 y 24 el porcentaje que cada uno de ellos supone del total.

III.3.12. Cuantificación de los distintos componentes identificados en el micelio de *Hemispora stellata*.

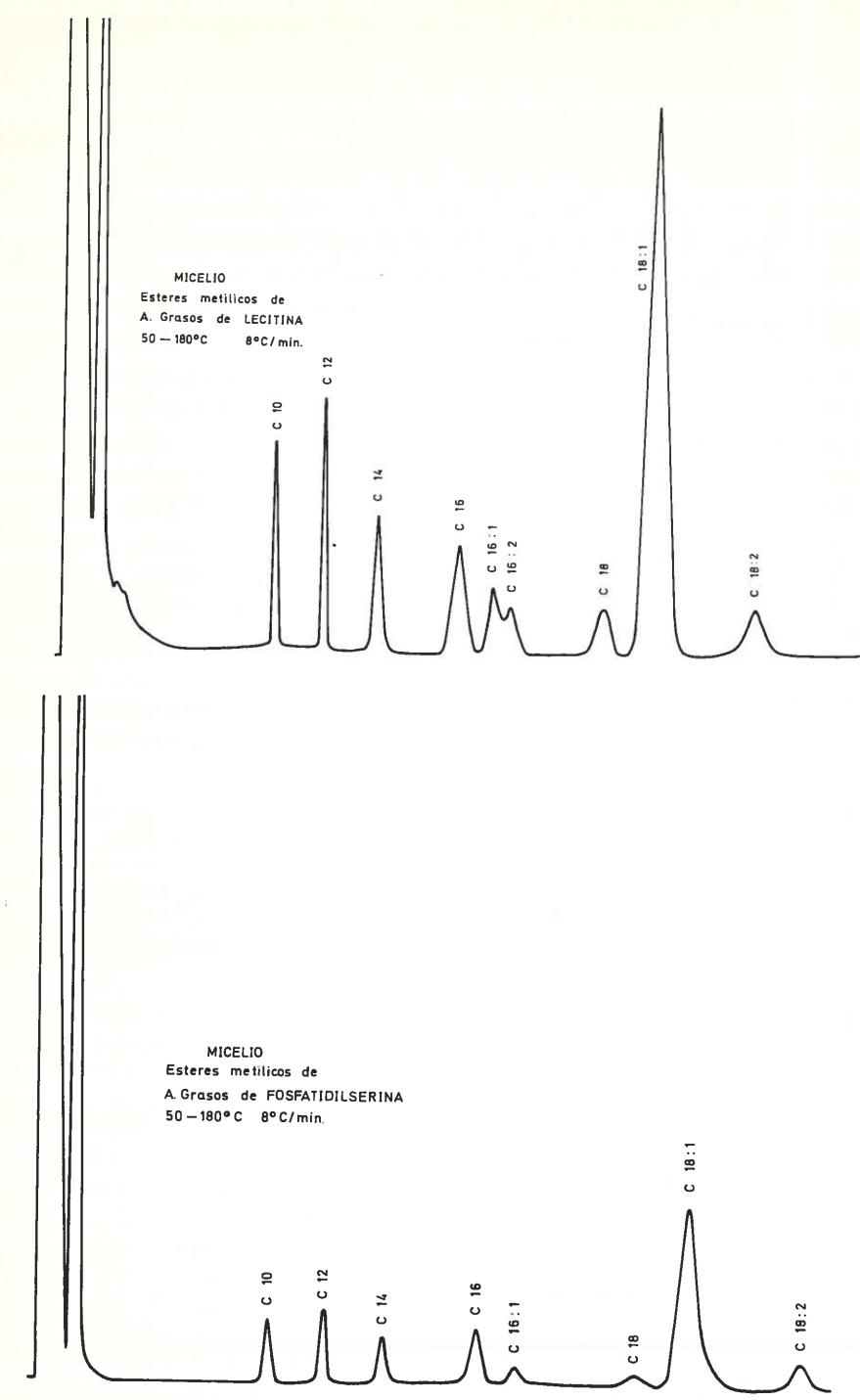
Los distintos componentes de la fracción lípidos apolares y fosfolípidos, identificados según se ha descrito, fueron cuantificados por los métodos que se detallan en II.4.2.23.

En las tablas 25 y 26 aparecen las tasas de los mismos en términos de $\mu\text{grs.}/\text{mgr.}$ de extracto lipídico, porcentaje respecto del peso seco y % que representan de la fracción de lípidos neutros y lípidos polares, según el grupo a que pertenezcan.





— 708 —



— 709 —

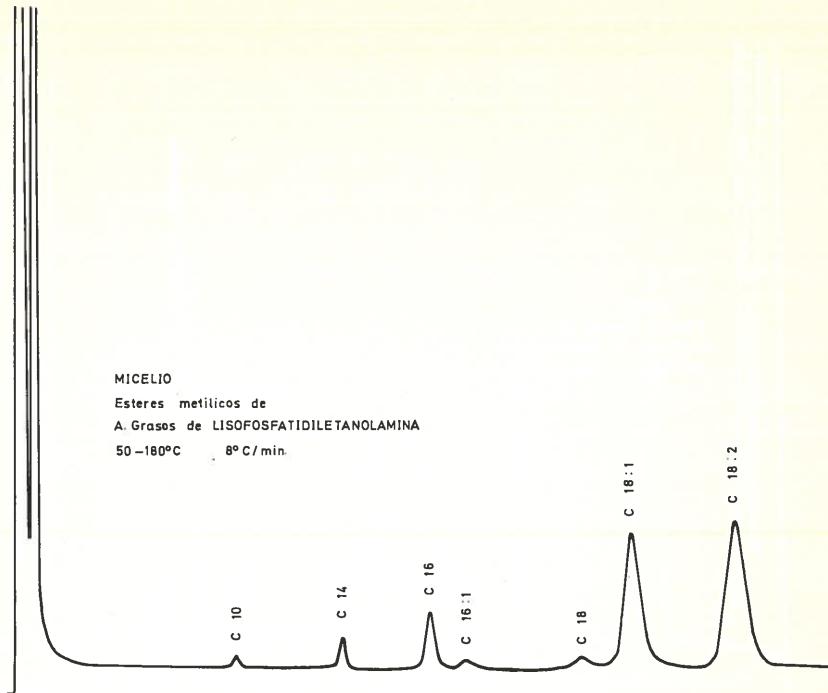


TABLA 25

Lípidos identificados en la fracción lípidos apolares de micelio de *H. stellata* y tasa de los mismos en términos de lípidos totales, peso seco y lípidos apolares.

	μ gr/mgr de extracto lipídico	% sobre peso seco	% sobre lípidos apolares
Ubiquinona	2,9	0,01	0,36
Ester de ergosterol	6,1	0,022	0,74
Ergosterol	38,5	0,13	4,6
Triglicéridos	43,1	0,15	5,2
Acidos grasos libres	288,05	1,04	34,9

TABLA 26

Fosfolípidos identificados en micelio de *H. stellata* y tasa de los mismos en términos de lípidos totales, peso seco y lípidos polares.

	μ gr/mgr de extracto lipídico	% sobre peso seco	% sobre la «fracción lípidos polares»
Lecitina	14	0,05	10,7
Fosfatidiletanolamina	13,5	0,048	10,3
Lisofosfatidiletanolamina	6,4	0,02	4,9
Fosfatidilserina	5,8	0,0209	4,4

III.4. LÍPIDOS LIGADOS DE ESPORAS

III.4.1. Fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con acetona-etanol-ClH, en columna de ácido silícico.

El fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con acetona-etanol-ClH, se realizó sobre una columna de ácido silícico-celita, siguiendo las técnicas ya citadas.

Se disolvieron 80 mgrs. del extracto lipídico purificado en 2 mls. de cloroformo-metanol (98/2) y se depositó sobre el lecho cromatográfico de una columna de ácido silícico-celita de 18/1,6 cms.

La cromatografía se desarrolló con mezclas de cloroformo-metanol y metanol (véase II.4.2.5.c). Se recogieron las fracciones globales de cada una de las fracciones obtenidas. Se determinó el contenido en fósforo, nitrógeno e hidratos de carbono de cada una de las fracciones, pero no se registró en ningún caso la presencia de estos componentes.

Unos μls. de cada una de las fracciones obtenidas se cromatografiaron en lámina fina de sílica gel, empleando como fase móvil los siguientes disolventes:

TABLA 25a

Extracto lipídico obtenido con acetona-etanol-ClH, a partir de esporas de *H. stellata* (previamente extraídas con cloroformo-metanol y metanol en caliente).

Esporas liofilizadas (grs.)	Extracto lipídico bruto (grs.)	Extracto lipídico purificado (mgrs.)	% sobre peso seco
56	8,2	417	0,74

TABLA 26 a

Fracciones obtenidas en la cromatografía en ácido silícico del extracto acetona-etanol-ClH a partir de esporas de *H. stellata*.

Ácido silícico: 18 grs.; Celita: 4,5 grs.; Flujo: 1,9 mls./min. Extracto lipídico cromatografiado: 80 mgrs.

Fracción	Disolvente	Mls.	Peso (mgrs)	% del extracto lipídico
I	98/2	Cloroformo-metanol	150	55,7
II	97/3	»	75	4,3
III	96/4	»	75	4,9
IV	95/5	»	50	1,1
V	90/10	»	100	2,3
VI	85/15	»	100	2,2
VII	80/20	»	100	5,4
VIII		Metanol	100	1,8

la fracción eluida con cloroformo-metanol (98/2) se desarrolló con una mezcla de éter de petróleo-éter etílico-acético (80/20/1).

las restantes fracciones se desarrollaron con una mezcla de cloroformo-metanol-agua (65/25/4). El revelado de las placas se efectuó con ácido sulfúrico al 50 %.

El análisis de las placas demostró que la totalidad de las fracciones estaban constituidas por lípidos apolares. En la tabla 26 a figuran los pesos de cada una de las fracciones obtenidas.

III.4.2. Fraccionamiento en columna de sílica gel

Una alícuota de 55,7 mg se cromatógrafió en una columna de sílica gel G, siguiendo la técnica descrita en la metodología general. Se recogieron las fracciones que figuran en la tabla 27, donde también se dan los pesos de los lípidos contenidos tras eliminar el disolvente en corriente de nitrógeno.

Al objeto de contrastar el comportamiento de la columna e identificar los lípidos que componían cada fracción eluida de la columna de sílica gel G se cromatógrafiaron alícuotas de todos ellos, en lámina fina de sílica gel G, junto con marcadores: hidrocarburos, tripalmitina, ubiqüinona, ácido oleico y esteárico, monoestearato de glicerol y diglicérido, utilizando para el desarrollo de los mismos éter de petróleo-éter etílico-acético (80/20/1). El revelado se efectuó con ácido sulfúrico al 50 %. La figura 40 es una copia de una de las láminas reveladas.

Las fracciones núms. 1 y 2 de la cromatografía en sílica gel, se mostraron homogéneas, dieron un Rf 0,84, idéntico al de una muestra patrón de hidrocarburos.

La fracción n.^o 3 mostró dos manchas. La menos polar dio un Rf similar al de las manchas núms. 1 y 2, e idéntico a la vez al de la muestra patrón de hidrocarburos. La mancha de mayor polaridad mostró un Rf 0,66.

La fracción n.^o 4 se mostró homogénea, dio un Rf de 0,66.

La fracción n.^o 5 mostraba igualmente un comportamiento homogéneo y dio un Rf idéntico al de la ubiqüinona.

Las fracciones núms. 6 y 7 resultaron ser muy heterogéneas. Dieron tres manchas, una de Rf 0,17 y dos más de Rf 0,12 y 0 idénticas a las de diglicérido y monoestearato de glicerol.

La fracción n.^o 8 mostró dos manchas de Rf 0,0,12v y 0, similares a las muestras patrones de mono y diglicéridos.

Las restantes fracciones mostraban una sola mancha en el origen igual que el patrón de monoestearato de glicerol.

La totalidad de las fracciones se sometieron al análisis espectrofotométrico en etanol y solamente la fracción n.^o 5 mostró un espectro específico (el característico de la ubiqüinona). Se redujo con borohidruro y se calculó el contenido en ubiqüinona. Las cifras de ubiqüinona que figuran en la tabla 28 se calcularon con los datos así obtenidos.

TABLA 27

Fraccionamiento en columna de sílica gel de los lípidos ligados de esporas de *H. stellata*.

Sílica gel: 10 grs; Extracto lipídico cromatógrafiado: 55,5 mgrs; Flujo 1,6 mls./min.

Fracción	Disolvente	Mls.	Peso (mgr)	% del extracto lipídico
1	Benceno	10	3,1	6,9
2	»	5	3,5	7,8
3	»	10	3,7	8,2
4	»	5	0,1	0,2
5	Benceno/E. E./etanol (80/19/1)	5	4,8	10,7
6	» » »	20	12,7	28,4
7	» » »	25	6,3	14,00
8	» » »	20	1,4	3,1
9	» » »	15	1,0	2,2
10	Benceno/E. E./etanol (30/67/3)	35	2,5	5,9
11	Eter etílico	20	1,2	2,6
12	» »	15	0,8	1,8
13	Metanol	5	0,6	1,3
14	»	20	0,8	1,8
15	»	5	1,2	2,6

TABLA 28

Contenido en ubiqüinona de los lípidos ligados de esporas de *H. stellata*.

	μgr/mgr de extracto lipídico	% sobre peso seco	% sobre la «fracción lípidos polares»
Ubiqüinona	0,85	0,0006	0,016

III.4.2.1. Naturaleza de la mancha de Rf 0,66.

Una alícuota del extracto total de lípidos ligados fue sometida a cromatografía preparativa en láminas de sílica gel, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la cromatografía analítica. Por raspado y extracción con éter de petróleo se obtuvo la sustancia responsable de la mancha de Rf 0,66, que fue sometida a ebullición a reflujo en presencia de KOH y extracción con éter siguiendo la técnica descrita en II.4.2.13., para la obtención de los ácidos grasos de los ésteres de los esterolos. El extracto fue sometido a cromatografía analítica por el sistema generalmente utilizado en esta tesis para los lípidos apolares. Se obtuvo al revelar con ácido sulfúrico una sola mancha con el mismo Rf 0,34, que muestran patrones de ácidos grasos.

III.4.3. Ácidos grasos del extracto acetona-etanol-ClH

Una alícuota del extracto acetona-etanol-ClH, libre de sustancias no lipídicas, se saponificó, siguiendo la técnica descrita en II.4.2.13 y se obtuvieron los ácidos

TABLAS 29 y 33

Acidos grasos identificados y porcentaje de los mismos presentes en los lípidos ligados de esporas y micelio de *H. stellata*.

	Porcentaje de ácidos grasos de los lípidos ligados de esporas.	Porcentaje de ácidos grasos de los lípidos ligados de micelio.
C-8	0,30	1,5
C-10	1,55	7,5
C-12	0,19	1,9
C-14	1,8	0,8
C-14 : 1	0,019	0,62
C-14 : 2	0,019	1,2
C-15	0,06	—
C-16	10,00	16,5
C-16 : 1	1,28	1,2
C-16 : 2	0,51	0,15
C-17	0,51	3,78
C-18	12,1	2,3
C-18 : 1	65,7	35,9
C-18 : 2	4,6	5,6
C-18 : 3	0,57	19,8
No identificado		3,7

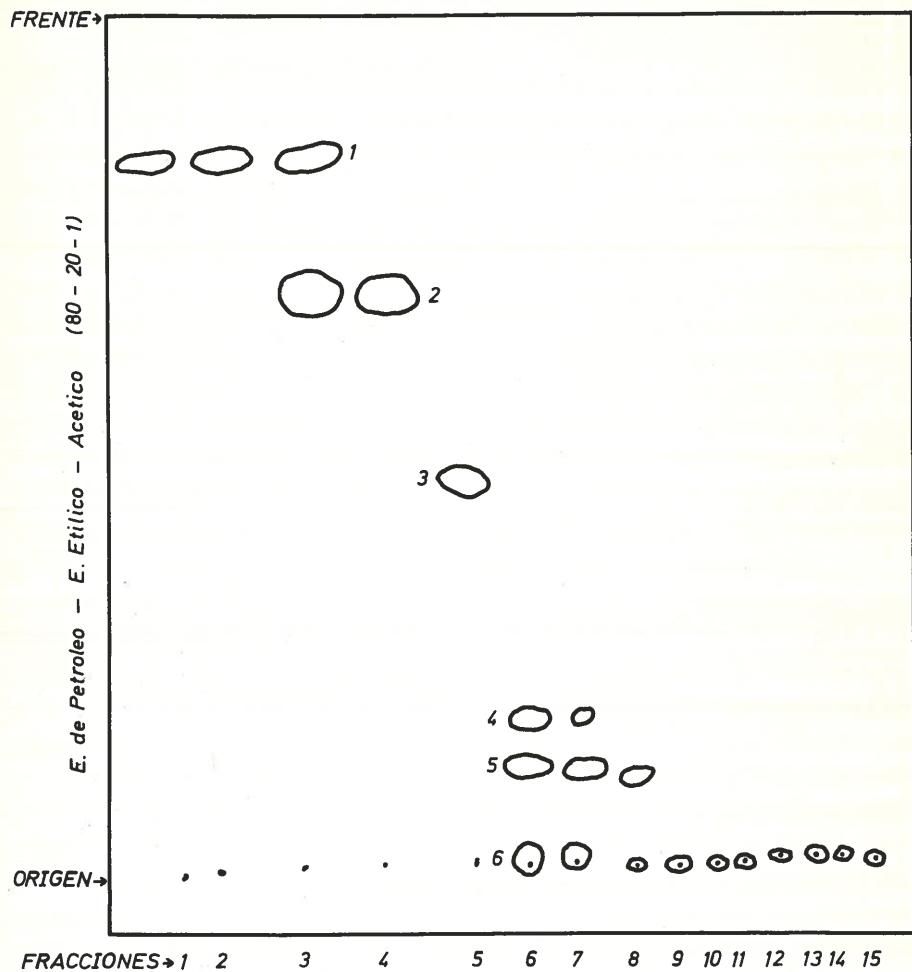
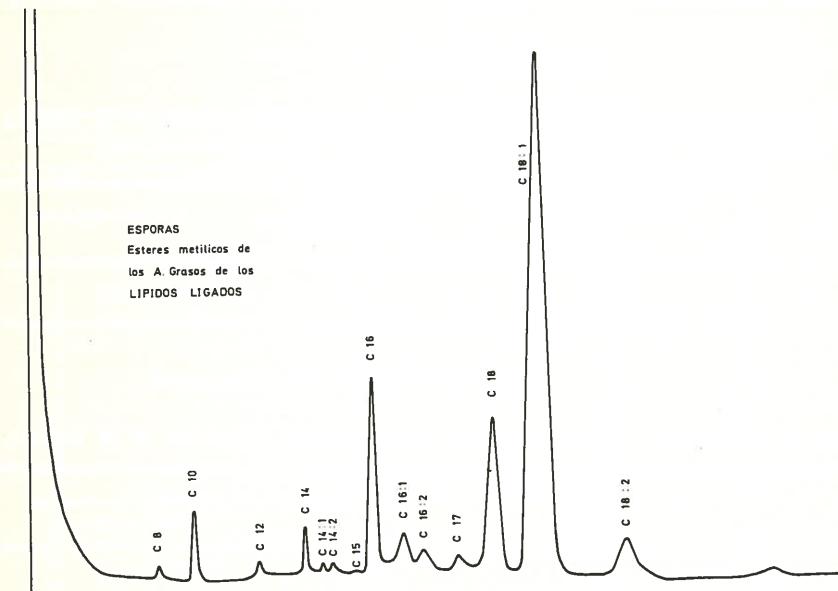


Figura 40.—Cromatografía en lámina fina de sílica gel de las fracciones de lípidos ligados de esporas de *H. stellata*, eluidas de la columna de sílica gel G.

Revelador: ácido sulfúrico al 50 %.

Rf: mancha n.º 1..0,84; mancha n.º 2..0,66.; mancha n.º 3..0,47; mancha n.º 4..0,17; mancha n.º 5..0,12; mancha n.º 6..0.



grasos totales presentes, que se metilaron por el procedimiento del diazometano y se sometieron al análisis por cromatografía gaseosa. En la tabla 29 figuran los porcentajes que representan cada uno de los ácidos grasos y en la figura 41 puede verse una copia del chromatograma obtenido.

III.5. LIPIDOS LIGADOS DE MICELIO

III.5.1. Fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con acetona-etanol-ClH en columna de ácido silílico.

El fraccionamiento del extracto lipídico obtenido con acetona-etanol-ClH, se realizó sobre una columna de ácido silílico-celita siguiendo la técnica descrita en II.4.2.5.

Se utilizó para ello una alícuota de 303 mgrs. del extracto lipídico purificado disuelta en dos mls. de cloroformo-metanol (98/2).

Se recogieron, al igual que en la cromatografía correspondiente a las esporas, sólo fracciones globales de cada una de las mezclas de los disolventes empleados. En la tabla 30 figuran los pesos de cada una de las fracciones obtenidas. En ninguna de las fracciones obtenidas se registró la presencia de fósforo, nitrógeno o hidratos de carbono.

Una alícuota de cada una de las fracciones obtenidas, se cromatógrafió en lámina fina de sílica gel G empleando como fase móvil éter de petróleo-éter etílico-acido acético (80/20/1) (v/v/v) en la fracción obtenida con cloroformo-metanol (98/2) y cloroformo-metanol-agua- (65/25/4) para las restantes fracciones. El análisis de las placas reveladas con ácido sulfúrico al 50 %, demostró que la totalidad de las fracciones estaban constituidas por lípidos apolares.

TABLA 30

Fracciones obtenidas en la cromatografía en ácido silílico del extracto acetona-etanol-ClH a partir de micelio de *H. stellata*.

Ácido silílico: 18 grs.; Celita: 4,5 grs.; Flujo: 1,9 mls./min. Extracto lipídico: 303,7 mgrs.; Altura de la columna: 18 cms. Diámetro de la columna: 1,6 cms.

Fracción	Disolvente	Mls.	Peso (mgr)	% del extracto lipídico
I	98/2	Cloroformo-metanol	300	211,7
II	97/3	»	150	8,2
III	96/4	»	150	12,0
IV	95/5	»	100	11,6
V	90/10	»	200	12,0
VI	85/15	»	200	10,5
VII	80/20	»	200	9,0
VIII	Metanol	200	19,5	6,1

nol (98/2) y cloroformo-metanol-agua- (65/25/4) para las restantes fracciones. El análisis de las placas reveladas con ácido sulfúrico al 50 %, demostró que la totalidad de las fracciones estaban constituidas por lípidos apolares.

III.5.2. Fraccionamiento en columna de sílica gel G

105,5 mgrs. se fraccionaron por cromatografía en columna de sílica gel G, siguiendo las técnicas ya descritas. Se recogieron las fracciones que figuran en la

TABLA 29a

Extracto lipídico obtenido con acetona-etanol-ClH, a partir de micelio de *H. stellata* (previamente extraído con cloroformo-metanol y metanol en caliente).

Micelio liofilizado (grs.)	Extracto lipídico bruto (grs.)	Extracto lipídico purificado (mgrs.)	% sobre peso seco
30	3,16	303,7	1,01

TABLA 32

Contenido en ubiquinona y ergosterol de los lípidos ligados de micelio de *H. stellata*.

	μgr/mgr de extracto lipídico	% sobre peso seco	% sobre la «fracción lípidos polares»
Ubiquinona	5,1	0,0057	0,57
Ergosterol	0,65	0,00065	0,06

TABLA 31

Fraccionamiento en columna de sílica gel de los lípidos ligados de micelio de *H. stellata*.

Sílica gel: 10 grs.; Extracto lipídico cromatógrafo: 55,5 mgrs.; Flujo: 1,6 mls./min.

Fracción	Disolvente	Mls.	Peso (mgr)	% del extracto lipídico
1	Benceno	10	2,4	2,7
2	»	5	7,2	8,2
3	»	10	14,6	16,8
4	»	5	0,4	0,4
5	Benceno/E. E./etanol (80/19/1)	5	0,8	0,9
6	» » »	20	21,0	24,2
7	» » »	25	20,0	23,0
8	» » »	20	7,0	8,0
9	» » »	15	1,8	2,0
10	Benceno/E. E./etanol (30/67/3)	35	0,5	0,57
11	Eter etílico	20	2,1	2,4
12	» »	15	0,7	0,8
13	Metanol	5	1,6	1,8
14	»	20	6,3	7,2
15	»	5	0,2	0,2

tabla 31 donde también se dan los pesos de los lípidos contenidos, tras eliminar el disolvente en corriente de nitrógeno.

Alícuotas de todas ellas se cromatografiaron en lámina fina de sílica gel G, junto con los marcadores citados en la correspondiente sección de esporas utilizando las mismas técnicas. La figura 42 es una copia de la lámina revelada con SO_4H_2 al 50 %.

El número de manchas detectadas y sus Rf resultaron similares a los ya descritos para las esporas. También aquí se sometieron todas las fracciones al análisis,

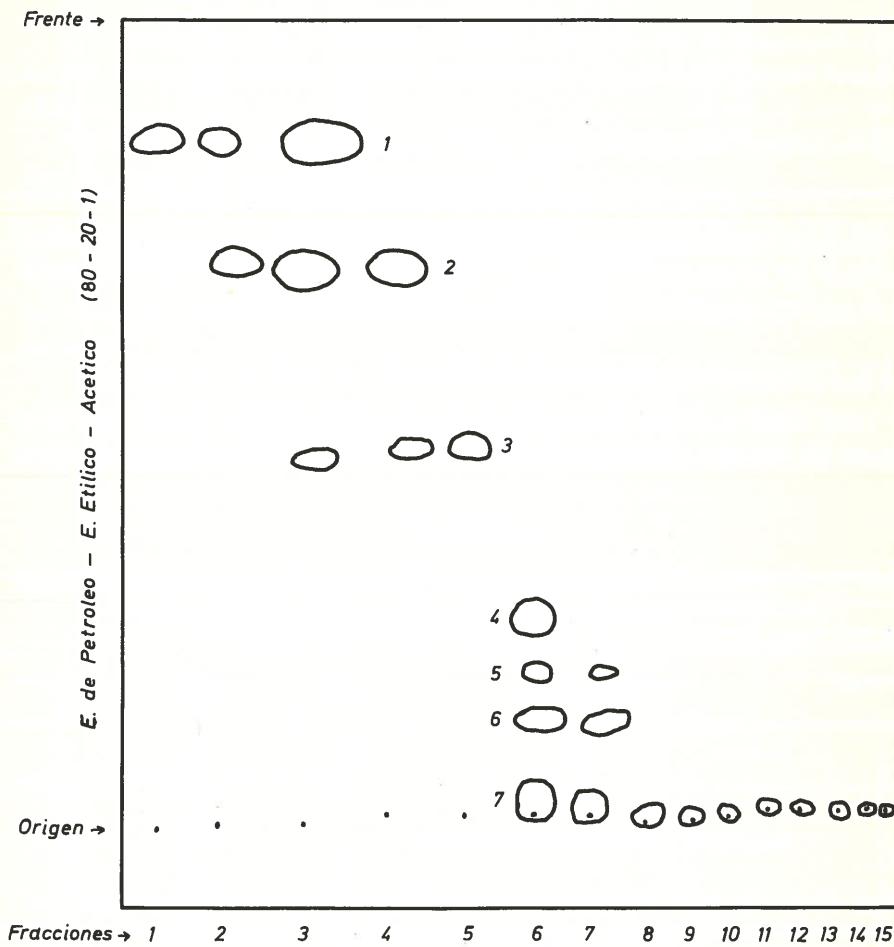


Figura 42.—Cromatografía en lámina fina de sílica gel de las fracciones de lípidos ligados de micelio de *H. stellata*, eluidas de la columna de sílica gel G.

Revelador: ácido sulfúrico al 50 %.

Rf: mancha n.º 1.0,83; mancha n.º 2.0,67; mancha n.º 3.0,46; mancha n.º 4.0,25; mancha n.º 5.0,17; mancha n.º 6.0,12 y mancha n.º 7.0.

espectrofotométrico en etanol. Las fracciones 3, 4 y 5 mostraron un máximo a 275 m μ s., típico de la μ biquinona. Se redujo con borohidruro y el máximo se trasladó a 290 m μ s. Las cifras de ubiqinona que figuran en la tabla 32 se calcularon con los datos así obtenidos.

Las fracciones 6 y 7 mostraron los espectros que figuran en la página 201 con máximos a 262, 271, 282 y 293 m μ s., típicos de los esteroides 5:7 dieno. Los espectros así obtenidos corresponden a las manchas 4 y 5, ya que las restantes fracciones no

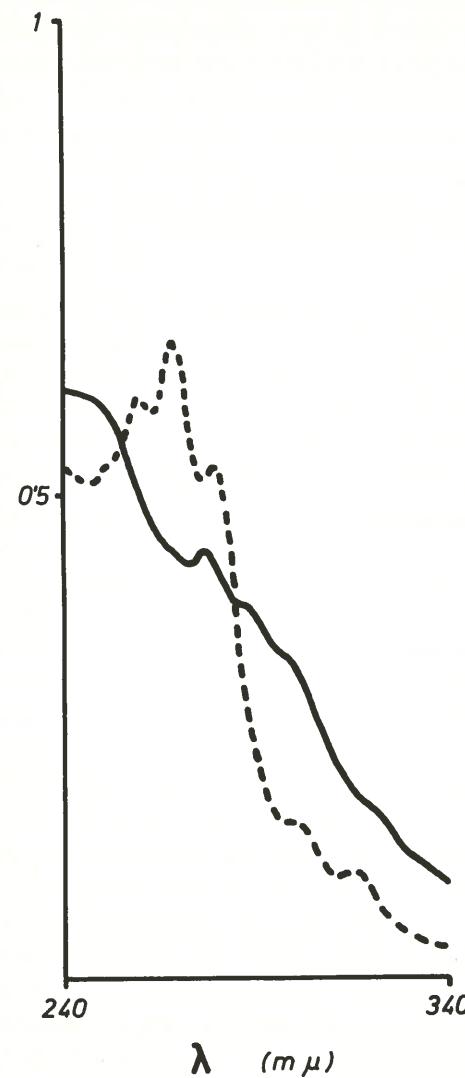
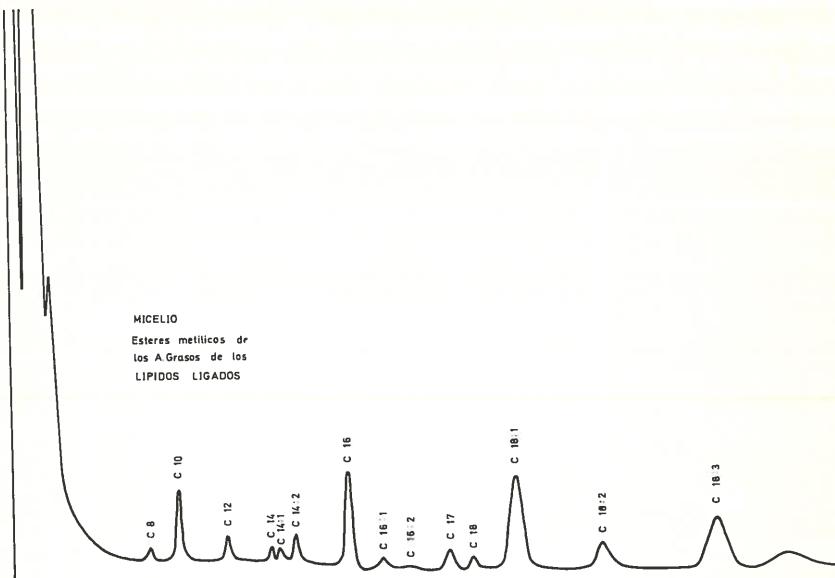


Figura 43.—Espectros ultravioletas de las manchas n.º 4 y 5 (véase figura 42) pertenecientes a las fracciones 5 y 6, obtenidas por cromatografía en columna de sílica gel G, de los lípidos ligados de micelio de *H. stellata*. Disolvente: etanol.

mostraron ninguna absorción y porque las manchas en la lámina fina mostraron una coloración típica de los esteroides 3-hidroxi con doble enlace en posición Δ^5 .



III.5.3. Ácidos grasos del extracto acetona-etanol-ClH

Una alícuota del extracto acetona-etanol-ClH libre de sustancias no lipídicas, se saponificó siguiendo la técnica descrita en II.4.2.13. y se obtuvieron los ácidos grasos presentes en el extracto. Se metilaron por el procedimiento del diazometano (véase II.4.2.14.) y se sometieron al análisis por cromatografía en fase gaseosa. En la tabla 33 figuran los porcentajes que representan cada uno de los ácidos grasos y en la figura 44 puede verse una copia del cromatograma.

CAPITULO IV

DISCUSION

IV.1. Extracciones.

IV.1.1. Necesidad de la selección de un método adecuado de extracción.

El estudio de la composición lipídica de los microorganismos ofrece (especialmente los hongos) la dificultad inicial que representa la extracción y que presumiblemente alcanza su cota más alta en las esporas. No es por ello extraño que, con frecuencia, distintos grupos de investigadores utilicen métodos de extracción diferentes, lo que de algún modo demuestra que ninguno de ellos es perfecto; ciertas variaciones en el contenido lipídico que para determinados microorganismos citan los diversos autores, son precisamente reflejo del empleo de técnicas distintas de extracción (véase por ejemplo PECK, 1947).

La técnica de extracción debe ser elegida de manera que cumpla dos requisitos fundamentales: 1.^o extraer la mayor cantidad de lípidos posible y 2.^o hacerlo de una manera suave que asegure que los lípidos no se alteren durante el proceso. Los dos citados requisitos son en cierto modo contradictorios; las técnicas más eficaces de extracción: ebullición en acetona o etanol-éter acidificados son, sin duda, excesivamente drásticas y capaces de alterar considerablemente el estado «nativo» de los lípidos; por el contrario, las extracciones con éter, mezclas de éter-etanol (no acidificado), etc., a la temperatura ambiente obtienen sin duda fracciones lipídicas menos modificadas, pero dejan gran cantidad de lípidos sin extraer.

Para obtener el mayor número de datos posibles relativos a la composición lipídica de un hongo, se suele recurrir por ello a métodos de extracción por etapas. En la primera se utilizan exclusivamente disolventes orgánicos y en la segunda se acidifican éstos, generalmente, con ácido clorhídrico. La primera extracción suele ir precedida de una deshidratación por liofilización o por ebullición con acetona (lo que indudablemente entraña un mayor riesgo de alteración).

Para la primera extracción se utiliza con frecuencia éter (HARTMAN y col., 1960) o éter-etanol (HARTMAN y col., 1962; PECK, 1947). Uno de los procedimientos más frecuentemente utilizados, recomendado por PECK (1947), consiste en una extracción en tres etapas: la primera con etanol-éter a 25° C, la segunda con cloroformo a la misma temperatura y la tercera con etanol-éter acidificado con ClH (1 %) a 50° C. Al producto de las dos primeras extracciones se le considera como «lípidos libres» o «fácilmente extractibles» y al de la tercera como «lípidos ligados».

En el estudio de los lípidos bacterianos y de los tejidos animales es frecuente que la extracción de los lípidos se lleve a efecto con mezclas de cloroformo-metanol a la temperatura ambiente (PARK y BERGER, 1967; WHITE y Cox, 1967; AMES, 1968; FOLCH, 1957); la obtención de los lípidos ligados de las células bacterianas se logra generalmente por tratamiento con acetona-etanol-ClH.

Si lo que aquí se pretendiera fuese estudiar exclusivamente los ácidos grasos de *H. stellata* y sus variaciones sin referencia alguna a los compuestos de que forman parte, como es frecuente en un buen número de estudios, hubiera sido recomendable la saponificación previa a la extracción, o la extracción tras la hidrólisis ácida, o por una técnica más o menos similar a la de PECK, y posterior saponificación.

Pretendiendo, como en este estudio, un conocimiento más profundo de la composición lipídica, resulta imprescindible una cuidadosa elección del método de extracción.

A tal efecto se comparó la eficacia de varios métodos de extracción entre los que se incluyó una variante del método de PECK; la modificación introducida en éste estaba destinada a obviar el inconveniente que frente a la posibilidad de una lipólisis enzimática representa mantener los tejidos durante cinco días a la temperatura ambiente. Como indicador del grado de extracción no sólo se utilizó el peso de los lípidos totales obtenido, sino también la ubiqüinona, como índice de la extracción de lípidos apolares y el contenido en fósforo e hidratos de carbono de los extractos.

IV.1.2. Comparación de la eficacia de los distintos métodos de extracción.

El análisis de los resultados que figuran en las tablas 1, 2, 3 y 4, demuestra:

1.^º Que el contenido en ubiqüinona del extracto insaponificable no puede utilizarse como patrón de referencia en el estudio de la eficacia de la extracción de ubiqüinona y otros lípidos apolares. Las peculiares condiciones reunidas por las esporas de *Hemispora stellata* obligan a una digestión muy prolongada en condiciones muy poco satisfactorias. Es posible que a pesar de no estar aún al final totalmente digerida la muestra, se haya obtenido todo el extracto insaponificable (la segunda etapa de la saponificación liberó todavía cantidades apreciables de lípidos, pero considerablemente inferiores a las liberadas por la primera), pero en tal caso, el prolongado contacto con la disolución alcalina debe haber llevado consigo, a pesar de presencia del pirogalol, una considerable destrucción de la ubiqüinona.

2.^º Que la extracción por el método en tres etapas finalmente seguido, supera considerablemente al método de PECK, tanto en lo que se refiere al rendimiento lipídico total como al de la eficacia de la extracción de la ubiqüinona y lípidos similares.

Las dos primeras etapas destinadas en ambos métodos a la extracción de «lípidos libres» o no muy fuertemente ligados, extraen en el proceder finalmente adoptado, cantidades 2,5 veces superiores a las obtenidas por el método de PECK. El menor rendimiento del método de PECK en términos de Uq, parece deberse a ineficacia de la extracción más que a la destrucción de la citada sustancia durante el proceso. Las diferencias observadas entre lo extraído por ambos procedimientos de extracción de los «lípidos libres» parecen referirse fundamentalmente a la fracción lípidos apolares, a juzgar por las cifras de fósforo (187 µgr/gr. de peso seco extraído, en el

método de PECK y 215 µgr/gr. de peso seco en la técnica finalmente utilizada); las cifras de glúcidos en los extractos lipídicos señalan igualmente diferencias muy considerables, en favor del método utilizado, en la extracción de glicolípidos.

2.^º Que la trituración con alúmina no mejora en absoluto los rendimientos, ni en términos de extracto lipídico total, ni en el de fosfolípidos, lípidos apolares o glicolípidos.

IV.1.3. Validez de los datos de UQ total

La figura 8 demuestra que el tratamiento con acetona-etanol-ClH, en las condiciones utilizadas para la tercera etapa del método de extracción empleado a lo largo de esta tesis, no destruye de un modo apreciable la ubiqüinona y que los datos relativos al contenido total de esporas y micelio en esta sustancia son por tanto fidedignos.

IV.2. Contenido lipídico.

El contenido lipídico total de las esporas representa el 3,6 % del peso seco, un poco más alto pero del mismo orden que la que SUMI (1928) da para *Aspergillus oryzae* y considerablemente más elevada que la que HARTMAN y col. (1962) obtienen en *Phytomyces chartarum*. La mayor parte alrededor del 80 %, son lípidos «fácilmente extractibles».

Sufre un ligero aumento tras la germinación, ascendiendo en el micelio de 48 horas a un 4,6 %. *Hemispora stellata* entra en este sentido dentro del relativamente restringido grupo, de hongos que apenas acumulan lípidos en su micelio. También en el micelio, la mayor parte de los lípidos (un 72 %) deben considerarse «fácilmente extractibles» y sólo un 28 % parece hallarse fuertemente ligado; entendemos, sin embargo, que así como los datos relativos al contenido en lípidos fácilmente extractibles son fidedignos, los que se refieren a lípidos ligados deben interpretarse con cautela; el tratamiento con ClH ha producido un cierto grado de hidrólisis a consecuencia de lo cual deben haberse perdido numerosas porciones hidrosolubles.

Las cifras dadas de lípidos totales contrastan con las que SALA (1969) cita para el mismo hongo; la razón de esta discrepancia radica sin duda en la metodología seguida; buena parte de lo que SALA contabiliza como lípidos es material de otra naturaleza arrastrado por los disolventes orgánicos, ya que no utiliza procedimiento alguno de purificación del extracto bruto; que ésta es la razón de la discrepancia, queda confirmado por el total acuerdo de sus cifras con las aquí citadas para el extracto lipídico no purificado.

IV.3. Lípidos fácilmente extractibles.

De las cifras relativas al peso extraído por cada uno de los disolventes y al con-

tenido en fósforo, nitrógeno e hidratos de carbono podía deducirse ya, que el incremento en el contenido lipídico tras la germinación tiene lugar a expensas de los lípidos apolares. Esta observación es corroborada por los datos que figuran en las tablas 7 y 20, donde puede verse que, tanto en las esporas como en el micelio, la mayor parte de los lípidos fácilmente extractables son lípidos apolares y que en las esporas estos representan el 68,6 % y en el micelio el 82,3 %.

IV.3.1. Lípidos apolares

En la fracción lípidos apolares se han identificado ubiqüinona, ergosterol libre, ergosterol esterificado, triglicéridos y ácidos grasos libres y se han detectado la presencia de otros esteroles no esterificados; no se detectan en cambio, mono ni diglicéridos.

Las cifras que se dan en las tablas 15 y 25 revelan que los componentes cuantificados no dan cuenta más que de alrededor del 50 % del total de lípidos apolares; la razón fundamental de que el balance no sea perfecto radica en los esteroles no identificados que cuantitativamente parecen constituir el componente mayoritario, como refleja el estudio de las tablas 9 y 21 y de las figuras 9 y 27. En la cromatografía en columna de sílica gel los esteroles libres dominan a partir de la fracción n.º 6 (inclusive), es decir en el 85,5 % del total de los lípidos apolares de las esporas recuperados de la columna y en el 86 % de los del micelio. Habida cuenta que estas fracciones no contienen otros contaminantes de los esteroles que los ácidos grasos libres, que éstos representan el 40,6 % de los lípidos apolares en las esporas y el 34,9 % en el micelio, se deduce que los esteroles libres deben constituir el 44,9 % de los lípidos apolares en las esporas y el 51,1 % en el micelio.

Para el cómputo de esteroles totales aún debe añadirse a esta cifra la que representan sus ésteres. La fracción n.º 1 de la columna de sílica gel representa en las esporas el 3,1 % del total de lípidos apolares recuperados; teniendo en cuenta que los ésteres de ergosterol, único elemento cuantificado en ella, no llegan a representar un 0,2 %, se deduce que en forma de éster hay otros esteroles que representan alrededor de un 3 % de lípidos apolares. En el micelio la citada fracción n.º 1 representa el 2,9 % del total de lípidos neutros recuperados y los ésteres de ergosterol el 0,73 %, luego los lípidos acompañantes suman un 2,2 % y dada la incapacidad del doble sistema cromatográfico empleado de resolver la mezcla, parece legítimo deducir que también se trata de ésteres de esteroles, aunque resulta en cierta medida sorprendente la ausencia de una confirmación espectral de su presencia.

No parece legítimo por ello tomar estas cifras sino como meramente especulativas y la proporción relativa entre esteroles libres y esterificados sólo puede establecerse con garantías en el caso del ergosterol.

IV.3.1.1. Ergosterol

El ergosterol libre representa en las esporas el 81 % y en el micelio el 91 % del ergosterol total. En cualquier caso el ergosterol libre y el esterificado sufren en el micelio un considerable aumento con respecto a las esporas, que supera en mucho al sufrido por el total de los lípidos apolares. El porcentaje que el éster representa, se multiplica por un factor de 3,7 y el ergosterol libre por un factor de 8.

IV.3.1.2. Ubiquinona.

Ni en las esporas ni en el micelio se ha identificado más que una quinona liposoluble: ubiqüinona identificada como Q₉. Este resultado confirma plenamente los datos aportados por BURGOS y SALA (1970) y colocan a *Hemispora stellata* dentro del amplio grupo de hongos provistos de una sola quinona liposoluble y al restringido que forman aquellas especies en la que ésta es Q₄₅, al que pertenece también la especie *Agaricus campestris* (ERICKSON y col. 1960).

Este lípido que tan importante papel juega en el transporte de electrones, sólo es parcialmente extraído con cloroformo-metanol y metanol en caliente (61 % del total en las esporas y 59 % en el micelio) lo que indica que alrededor de un 40 % debe hallarse ligado a estructuras complejas. Resulta hasta cierto punto sorprendente la constancia de este porcentaje en esporas y micelio, pues si bien es cierto que la relación entre lípidos ligados y lípidos libres es también constante en ambas fases de crecimiento, los ligados no suponen más que un 20 % de los lípidos totales.

Al pasar de la fase de espora a la de micelio se produce un notable incremento en el contenido en Q₄₅; en términos de extracto seco de 17,2 µgr./gr. a 139 µgr./gr. Nuestros datos también confirman en este sentido los resultados aportados por BURGOS y SALA (1970), aunque las cifras citadas por ellos no representan más que un 60 % del que aquí se da. La razón de esta discrepancia radica sin duda en que el método de extracción utilizado sólo lograba obtener la fracción «lípidos libres», como se deduce de la tabla n.º 1 y de que la proporción que guardan sus cifras y las aquí dadas sea idéntica a la quinona libre/quinona total.

El incremento de la tasa de UQ no puede ser reflejo de un acúmulo global de lípidos en el micelio, ya que tanto en términos de porcentaje sobre los lípidos fácilmente extractables como en el de % de líquidos totales (menos exacto) se multiplica por un factor de 7,1. Es muy posible que esta síntesis o acúmulo selectivo de UQ sea consecuencia del papel funcional que tiene y refleje el incremento en la actividad metabólica, que sin duda sufre el microorganismo tras la germinación.

La tasa de ubiqüinona (en términos de peso seco) en las esporas no puede compararse con las que aparecen en la bibliografía referida a otros hongos, ya que se refieren exclusivamente al micelio; la del micelio es superior a las citadas por LAVATE y BENTLEY (1964) para *Aspergillus niger*, *Mucor abundans* y *Penicillium chrysogenum* y del orden de las halladas en *Penicillium brevicompactum*.

IV.3.1.3. Triglicéridos

Los triglicéridos constituyen los únicos glicéridos encontrados tanto en esporas como en micelio. Representan un 3 % del total de lípidos fácilmente extractables (4,4 % de los lípidos apolares) en los primeros y un 4,3 % de los lípidos totales (5,2 % de los lípidos apolares) en el segundo. Estas cifras son extremadamente bajas para lo que es habitual en los hongos (véase, por ejemplo, COCHRANE, 1958; HARTMAN y col., 1962; etc.). La no detección de mono o diglicéridos es en cierta medida sorprendente, pero garantiza la ausencia de una actividad lipolítica acusada durante el almacenamiento.

IV.3.1.4. Ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres representan el porcentaje más alto de los lípidos apolares cuantificados: en las esporas el 40,6 % y en el micelio el 34,9 %. Sin embargo no sufren alteración alguna en su porcentaje sobre el total de los lípidos fácilmente extractables, tanto en las esporas como en el micelio, representan en ambos el 28 % del total, cifra similar, aunque algo superior, a las obtenidas por HARTMAN y col. (1962) en el micelio de *Phytonyces chartarum* (20 %) y *Sporidesmium bakeri* (25 %) y muy distinta del 88 % citado por RAVEUX (1948) para otros hongos.

IV.3.2. Lípidos polares

El cómputo de los lípidos polares (entendiendo como tales cuanto no es eluido por el 2 % de cloroformo en metanol de la columna de ácido silícico) representa en las esporas el 30,2 % del total de lípidos fácilmente extractables y el 17,13 % en el micelio, y expresado en términos de peso seco el 0,91 % en las esporas y el 0,63 % en el micelio. Es evidente, por tanto, un notable descenso del porcentaje en lípidos polares tras la germinación, por cuya justificación no basta con apelar al acúmulo de lípidos neutros durante la formación del micelio; hay que buscarla en una velocidad de síntesis relativamente más lenta que la generalidad del material orgánico constitutivo del micelio o en el superior contenido estructural de la espora, pues generalmente es admitido que son éstos los lípidos que fundamentalmente participan en la constitución de las estructuras celulares.

Los lípidos polares de la espora están constituidos por glicosildiglicéridos, esterol glicósidos, lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y lisofosfatidiletanolamina y en el micelio por esterol glicósidos, lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y lisofosfatidiletanolamina; tanto en las esporas como en el micelio se obtiene, además, un residuo de lípidos apolares que en los primeros representan un 16 % de la fracción y en el segundo el 20 %.

IV.3.2.1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos representan en conjunto en esporas y micelio el 11,73 % y el 3,9 %, respectivamente, de los lípidos fácilmente extractables, y en términos de peso seco el 0,34 % y el 0,14 %. Sufren, pues, en el paso de esporas a micelio el mismo cambio experimentado por la totalidad de los lípidos polares de los que constituyen el 46,8 % en las esporas y el 30,3 % en el micelio; considerando a los fosfolípidos como el tipo de lípidos primordialmente implicados en las estructuras membranosas, parece lógico, a la luz de lo ya expuesto al tratar el conjunto de los lípidos polares, este particular descenso de los fosfolípidos en el tránsito de esporas a micelio.

Los porcentajes del extracto lipídico total representado por el conjunto de los fosfolípidos en las esporas, caen dentro de los límites habituales en los hongos (COCHRANE, 1958), pero no así los del micelio que deben considerarse extremadamente bajos.

En el aspecto cualitativo debe considerarse normal la presencia de fosfatidiletanolina, fosfatidilserina y fosfatidicolina, que se encuentran prácticamente en todos los hongos (ELLMAN y MITCHEL, 1954; BENTLEY y col., 1964; JACK, 1966; etc.), pero en la bibliografía se hallan muy pocas citas (MATCHES y col., 1964; KATES y col., 1961, 1962) de la presencia en este tipo de microorganismos, de lisofosfatidiletanolina, frecuente en cambio en los tejidos animales, algo menos en los vegetales superiores (PRUTHI y BATHIA, 1970; BATHIA y col. 1970; etc.) y escasas veces hallada en las bacterias (MATCHES y col., 1964; KATES y col., 1961, 1962).

Dos grupos pueden hacerse con los fosfolípidos de *Hemispora stellata*:

El primero está constituido por lecitina y fosfatidiletanolina, que apenas cambian en términos de porcentaje de peso seco al pasar de una a otra fase de crecimiento (lecitina 0,084 % en esporas y 0,05 % en micelio; fosfatidiletanolina 0,07 % y 0,048 %); en términos de lípidos totales (fácilmente extractibles) pasan de 28,9 a 14 mgr./gr. (lecitina) y de 24,5 a 13,5 mgr./gr. (fosfatidiletanolina), descenso que es del mismo orden que el experimentado por el conjunto de los lípidos polares.

El segundo está formado por la lisofosfatidiletanolina y la fosfatidilserina que manifiestan un notable descenso tras la germinación tanto en términos de peso seco (lisofosfatidiletanolina 0,1 % del extracto seco de esporas y 0,023 % en micelio; fosfatidilserina 0,082 % en esporas y 0,0209 % en micelio), como en términos de lípidos fácilmente extractibles, en los que ambos descienden en el micelio a 1/5-1/6 del valor alcanzado en las esporas.

IV.3.2.2. Glicolípidos.

La presencia de un glicosilglicerido en las esporas de *Hemispora stellata*, representa una de las aportaciones más interesantes de este trabajo por dos razones:

a) En la bibliografía, no se encuentra una sola cita de la presencia de un glicosilglicerido en un hongo (N. SHAW comunicación personal).

b) Es uno de los pocos glicosilglicéridos en cuya composición interviene un azúcar aminado. Sólo hay otros dos casos descritos hasta el presente (ISHIZUKA y YAMAKABA, 1969; PHIZAKERLEY y col., 1972) y en ambos se trata también de glucosamina.

No pueden darse cifras precisas del mismo por carecerse de un sistema fidedigno de cuantificación, hasta que no se conozca suficientemente bien su estructura. Basándose en el peso de las fracciones extraídas de las láminas finas, tras la cromatografía de diversas alícuotas, puede calcularse que se aproximan a un 5,55 % de los lípidos polares y un 0,037 % de peso seco.

Por el momento se desconoce el sentido que pueda tener la presencia de glicolípidos en las esporas y su ausencia en el micelio. Debe tenerse en cuenta que aunque se han sugerido dos papeles para ellos:

1) Sustitución de los fosfolípidos en su papel estructural (SHAW y col., 1968; WILKINSON, 1968).

2) Transferencia de residuos de azúcares a través de la membrana durante la biosíntesis de los polisacáridos (DISTLER y ROSEMAN, 1964), su papel aún no está aclarado.

Como se desconoce si el hongo aquí estudiado sintetiza algún polisacárido, no es posible ninguna especulación en torno a la segunda función sugerida para los glicosilglicéridos. Si su papel fuera estructural no sería aquí sustitutivo de los fosfolípidos, sino más bien complementario, puesto que fosfolípidos y glicolípidos coexisten en la espora y los fosfolípidos en mayor cuantía que en el micelio.

Su presencia en las esporas y su ausencia en el micelio podría, de otro lado, ser consistente con el desempeño de un papel de precursor de otras sustancias que contengan glucosamina.

En *Staphylococcus aureus* ha podido observarse un aumento en el contenido en fosfolípidos y glicolípidos (FERMAN y col., 1967), con el incremento del grado de aeróbiosis. Es evidente que las variaciones aquí observadas no pueden atribuirse a esta causa, pues el micelio fue crecido en condiciones de franca aeróbiosis y a juzgar por las variaciones experimentadas por la ubiquinona, no hay un descenso sino un incremento de los componentes de cadena respiratoria.

IV.3.2.3. Esterol, glicósidos

La presencia de esterol glicósidos, tanto en esporas como en micelio, es otro de los resultados más destacables en el análisis de los lípidos de *Hemispora stellata*. Su presencia, frecuente en hojas y semillas de vegetales superiores es excepcional en el mundo de los microorganismos.

Por las mismas razones que se apuntan en la discusión de los glicolípidos, no se dan cifras precisas de contenido en esterol glicósidos, pero sobre la base del peso de las fracciones extraídas de las láminas finas tras la cromatografía de diversas alícuotas, puede calcularse que se aproxima en las esporas al 31,5 % de la fracción

«lípidos polares» y al 0,213 % del peso seco y en el micelio al 50 % de los «lípidos polares» y al 0,23 % del peso seco.

Se desconoce por el momento cuál es el esterol o los esteroles que constituyen la «aglucona» del glicósido, pero la falta del espectro U.V., característico de los esteroides $\Delta 5 : 7$ dieno descarta al ergosterol y sus derivados.

IV.3.3. Ácidos grasos.

IV.3.3.1. Características generales

Al igual que en muchos otros hongos (JACK, 1966; HARTMAN y col., 1960, 1962; STONE y HEMMING, 1968), entre los ácidos grasos de *H. stellata* dominan netamente los no saturados, que representan en conjunto alrededor de los 2/3 del total de los ácidos grasos, tanto en esporas como en micelio. Con excepción de los ésteres de esteroles y fosfatidiletanolamina de las esporas, donde representan el 38,2 % y 52 % respectivamente, en todas las demás fracciones estudiadas superan el 70 %.

Los lípidos de *H. stellata* no contienen ácidos grasos de más de 18 átomos de carbono, pero sí cantidades apreciables de ácidos de menos de 14 átomos de carbono, que sólo faltan en las fracciones ácidos grasos libres y triglicéridos y en la fosfatidiletanolamina del micelio. Estos ácidos grasos poco frecuentes en los lípidos fúngicos son especialmente abundantes en la lecitina y fosfatilserina del micelio (10,54 y 10,1 % del total, respectivamente) y en fosfatidiletanolamina y éster de esteroles de esporas (13,8 y 7,02 % respectivamente).

No se detectan ácidos grasos de un número impar de átomos de carbono, que aunque en porcentajes reducidos, se han hallado en algunos otros hongos (HARTMAN y col., 1960, 1962; STONE y HEMMING, 1968) y que son relativamente abundantes en las bacterias; tampoco se han encontrado hidroxiácidos ni ácidos grasos de cadena ramificada, que tan abundantes son en algunas bacterias llegando a constituir por ejemplo el 40 % del total de ácidos grasos en *Sarcina lutea* (HUSTON y ALBRO, 1964) y el 100 % de los que forman parte de los fosfolípidos de *Bacillus megaterium* (SCANDELLA y KOMBERG, 1969).

Las diferencias cualitativas más importantes sufridas por los ácidos grasos, producidas al pasar las esporas a micelio son la desaparición de C-12 y C-18 : 3 de la fracción de ácidos grasos libres y C-10, C-12 y C-14 de la fosfatidiletanolamina; C-8, C-10, C-12 y C-18 : 3 de los triglicéridos y del C-8 de la lecitina; la aparición de C-8 en la lecitina; C-12 en la lisofosfatidiletanolamina y C-16 : 1 en la fosfatidilsérina y sobre todo la desaparición de un ácido graso no identificado de más de 18 átomos de carbono de la fracción éster de esteroles que supone hasta el 11,3 % de los ácidos grasos de esta fracción en las esporas.

En ninguno de los fosfolípidos se observa la presencia de C-18 : 3. En los lípidos neutros este ácido graso desaparece en el micelio y disminuye el % de C-16 : 2, pero en cambio aumenta considerablemente el C-18 : 2 de tal modo que el porcentaje

de ácidos grasos no saturados aumenta sobre todo en los ácidos grasos libres y éster de esteroles.

IV.3.3.2. *Lípidos apolares.*

Despreciando las diferencias en pesos moleculares de C-16 : 1, C-16 : 2, C-18 : 1, C-18 : 2 y C-18 : 3, con lo que apenas se comenten errores dada la escasa proporción de los dos primeros en todos los casos y la pequeña diferencia de peso molecular entre los tres últimos, se puede calcular que la relación dobles enlaces en los ácidos grasos libres de esporas/dobles enlaces en ácidos grasos libres de micelios de 119/142 y que esta relación es en los triglicéridos igual a 142/146, lo que dado el predominio de los ácidos grasos no saturados en ambas fases de crecimineto, supone un aumento de alrededor de un 20 % en el número de dobles enlaces por mol.

La desaparición del C-18 : 3 de los lípidos apolares al pasar a la fase de micelio, está en desacuerdo con lo que sucede en otros hongos como el *P. chartarum* (HARTMAN y col., 1962) en cuyas esporas no se encuentra y en cuyo micelio es en % de moles hasta del orden del 4 %. También contrasta la distribución de este ácido graso en las dos fracciones mayoritarias de los lípidos apolares: en las esporas de *H. stellata* es unas nueve veces más abundante en los triglicéridos que en los ácidos grasos libres. En *P. chartarum* parece abundar más en los triglicéridos. Del mismo modo, en tanto el C-18 : 3 falta en todos los fosfolípidos de *H. stellata* (esporas y micelio) en *P. chartarum*, *S. dendriticum* y *C. radicicola*, es relativamente abundante, representando porcentajes molares que oscilan entre el 2 % y el 17 %.

Resulta difícil interpretar estos hechos, en un estudio que no se orientó al esclarecimiento de las rutas metabólicas de los ácidos grasos en el microorganismo estudiado, sino al conocimiento de su composición lipídica, sobre todo teniendo en cuenta lo poco que se sabe sobre las características específicas de la biosíntesis de los lípidos en los hongos, si se compara con el conocimiento que de estas rutas metabólicas se tienen en otras formas vivas, pero parece destacable el hecho de que el incremento en C-18 : 2, que se observa en los lípidos apolares, sea groseramente paralelo al descenso en C-18 : 1, lo que resulta consistente con los estudios de BLOCH y col. (1962) sobre la procedencia del ácido linolénico en las levaduras. La franca aerobiosis en que el micelio de *H. stellata* se ha obtenido facilitaría este proceso que aparentemente es siempre un proceso oxidativo.

La fracción éster de esterol, al pasar de la fase de esporas a la de micelio, aumenta muy considerablemente en el porcentaje del total de los ácidos grasos constituidos por los no saturados, cualquiera sea la naturaleza del ácido no identificado. Este incremento en el grado de insaturación se debe fundamentalmente al extraordinario incremento sufrido por C-18 : 1 y C-18 : 2.

Por el momento se carece de todo género de datos relativo a la naturaleza del ácido graso no identificado y resulta imposible especular sobre su función en los ésteres de esteroles de las esporas y la razón de su desaparición en el micelio.

IV.3.3.3. *Fosfolípidos.*

En la composición de ninguno de los fosfolípidos intervienen ácidos grasos de más de dos dobles enlaces, ni siquiera en las esporas donde el C-18 : 3 constituye una fracción considerable de sus ácidos grasos.

Hay también escasez relativa (en relación con los lípidos neutros) del porcentaje de los lípidos totales constituido por C-18 : 2. Ambos hechos concordarían con un papel funcional (como participantes en la constitución de las membranas) de los fosfolípidos dadas las perturbaciones que en el ordenamiento de una bicapa lipídica (Fox, 1972) introducen los dobles enlaces.

Aunque el porcentaje del total de los ácidos grasos constituidos por los no saturados sea en los fosfolípidos (con la excepción de la lisofosfatidiletanolamina de las esporas) tan alto o aún más que en los lípidos neutros, el número de dobles enlaces por 100 moles de ácido graso es (calculándolo con las mismas licencias que fueron expuestas al tratar de los lípidos neutros) inferior; esporas: lecitina 92,8; fosfatidiletanolamina 81,6; lisofosfatidiletanolamina 96,4 y fosfatidilserina 85,9; micelio: lecitina 75,5; fosfatidiletanolamina 116,2; lisofosfatidiletanolamina 125,8 y fosfatidilserina 79,7.

En contra de lo que sucede en los lípidos neutros, el porcentaje del total de ácidos grasos constituido por los no saturados desciende en todos los fosfolípidos del micelio si se exceptúa a la fosfatidiletanolamina cuyo contenido en ácidos oleico y linoleico es muy bajo en las esporas.

La diferencia en la composición en ácidos grasos de los distintos fosfolípidos justifica la no admisión de un pool común de ácidos grasos como SCANDELLA y KOMBERG (1969) proponen para el *B. megaterium*. Sin embargo, dada la naturaleza del estudio realizado y los escasos datos de que se disponen sobre la biosíntesis de los fosfolípidos en esta especie y otras próximas, estaría fuera de lugar cualquier otro intento de interpretación de los datos aquí recogidos.

IV.4. *Lípidos ligados.*

Los lípidos ligados constituyen un porcentaje alto del total de los lípidos de *H. stellata*, alrededor del 20 %. Representan en el micelio el 1,01 % del peso seco y en las esporas el 0,74 %.

El estudio de sus componentes ofrece sólo un valor limitado, dadas las acciones del CIH sobre los mismos.

Los componentes aislados han sido hidrocarburos, ubiquinona, esteroles, monoglicéridos y diglicéridos, más un componente de Rf 0,66 que por hidrólisis alcalina se transforma en ácido graso y que parece indudable, a la luz de los experimentos descritos en III.4.2.1., se trata del éster etílico de los ácidos grasos libres y de los que puedan haberse liberado por la hidrólisis ácida a partir de triglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos etc.

El cálculo de mono y diglicéridos presentes no tiene sentido, por cuanto en una proporción incontrolada pueden proceder de la hidrólisis de fosfolípidos y triglicéridos.

La ubiquinona debe participar, de algún modo, en cierta extensión en la constitución de estructuras lipoproteicas, por cuánto una proporción considerable de la misma (el 29,5 % del total de ubiquinona en las esporas y el 37 % en el micelio) no puede ser extraída sin hidrólisis previa.

La ausencia de hidrocarburos de la fracción de lípidos fácilmente extractibles y su presencia en los lípidos ligados es en cierta medida sorprendente, dado que no pueden proceder de la descarboxilación de los ácidos grasos, teóricamente muy difícil en las circunstancias concurrentes en la técnica de extracción de los lípidos ligados; experimentalmente hemos comprobado además que no ocurre con muestras patrón de diversos ácidos grasos. A menos que sea un artefacto de otra naturaleza producido por la técnica experimental y puesto que no se halla entre los lípidos libres, hay que admitir que la totalidad de los mismos se encuentra formando complejos no liposolubles.

A diferencia de los ácidos grasos presentes en las fracciones de los lípidos fácilmente extractibles, en los ácidos grasos de los lípidos ligados, tanto de esporas como de micelio, hay ácidos grasos de número impar de átomos de carbono (C-15 y C-17 en las esporas y C-17 en el micelio), ácidos grasos insaturados de un número inferior a 16 átomos de carbono (C-14 : 1 y C-14 : 2). Es de señalar también la presencia de un ácido graso no identificado en la fracción de lípidos ligados del micelio, que representa el 3,7 %.

El C-18 : 1 representa en las esporas el 65 % de los ácidos grasos de esta fracción, mientras que en el micelio desciende hasta un 35 %. El C-18 : 3, presente en esporas y micelio, representa en las primeras el 0,57 % y en cambio en el micelio supone hasta un 20 % del total de los ácidos grasos de esta fracción.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1)

El contenido lipídico de las esporas y micelio de 48 horas, cultivado en profundidad, de *H. stellata* representa el 3,6 % y el 4,6 % del peso seco respectivamente. Tras el proceso de germinación sufre, pues, un ligero aumento, multiplicándose por un factor de 1,2 la tasa de lípidos.

2)

La mayor parte, alrededor del 80 %, de los lípidos de las esporas, son «lípidos fácilmente extractibles»; el 20 % restante se encuentra en forma ligada. En el micelio el 72 % son lípidos fácilmente extractibles y sólo el 28 % debe considerarse como lípidos ligados.

3)

La mayor parte de los lípidos fácilmente extractibles, en las esporas el 68,6 % y en el micelio el 82,3 %, son lípidos apolares. El incremento en el contenido lipídico, tras la germinación, tiene, pues, lugar a expensas de los lípidos apolares.

4)

La fracción lípidos apolares contiene, tanto en las esporas como en el micelio, ubiquinona, ergosterol libre, ergosterol esterificado, triglicéridos, ácidos grasos libres y otros esteroles no identificados.

5)

Tanto el ergosterol libre como el esterificado aumentan considerablemente tras la germinación, multiplicándose el porcentaje representado en las esporas por el ergosterol libre por 8 y el que representa el ergosterol esterificado por 3,7, al pasar a micelio.

Sólo existe en *H. stellata* un homólogo de la ubiquinona, identificado como Q₄₅, que sufre un notable incremento al pasar de esporas a micelio; en términos de peso seco se multiplica por un factor de 8,1.

6)

Los triglicéridos son los únicos glicéridos encontrados en los lípidos fácilmente extractibles, tanto de esporas como de micelio. Sufren un ligero aumento tras la germinación (en las esporas representan el 4,4 % de los lípidos apolares y en el micelio el 5,2 %).

Los ácidos grasos libres constituyen el componente mayoritario de los lípidos apolares, en una y otra fase de crecimiento.

7)

Al pasar de esporas a micelio disminuye la proporción de lípidos fácilmente extractibles representado por los lípidos polares (30,2 % en las esporas y 17,13 % en el micelio).

8)

Los lípidos polares de las esporas están constituidos por glicosilglicéridos, esterol glicósidos, fosfatidilcolina, fosfatidilsérina, fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina. El micelio contiene los mismos líquidos polares que las esporas a excepción de los glicosilglicéridos que faltan en esta fase de crecimiento.

9)

En conjunto los fosfolípidos sufren un descenso porcentual relativo al total de lípidos fácilmente extractables, similar al experimentado por la totalidad de los lípidos polares tras la germinación. El porcentaje del total de lípidos fácilmente extractables representado por los fosfolípidos en el micelio es excepcionalmente bajo. *H. stellata* es uno de los pocos hongos en que se ha detectado la presencia de lisofatidiletanolamina.

10)

En tanto que la lecitina y la fosfatidiletanolamina apenas varían, en términos de porcentaje de peso seco, tras la germinación, la fosfatidilsérina y lisofosfatidiletanolamina manifiestan un notable descenso hasta 1/5-1/6 del valor alcanzado en las esporas.

11)

Esta es la primera vez que se encuentra un glicosilglicérido en un hongo; el glicosilglicérido de las esporas de *H. stellata* contiene glucosamina, lo que constituye también un caso excepcional; hasta ahora sólo se han descrito muy recientemente, dos glicosilglicéridos en cuya molécula participe un azúcar aminado.

12)

La presencia de un esterolglícido, tanto en las esporas como en el micelio de *H. stellata*, constituye también un resultado excepcional; pocas o ninguna vez han sido detectados en el mundo de los microorganismos.

13)

Entre los ácidos grasos de *H. stellata*, tanto en esporas como en micelio domi-

nan netamente los no saturados, que representan en conjunto alrededor de los 2/3 del total de los ácidos grasos. *H. stellata* no contiene ácidos de más de 18 átomos de carbono, pero sí cantidades apreciables de ácidos grasos de menos de 14 átomos de carbono poco frecuentes en los lípidos fúngicos; los lípidos fácilmente extractables de *H. stellata* carecen de ácidos grasos de número impar de átomos de carbono, de hidroxiácidos grasos y de ácidos grasos de cadena ramificada.

14)

Las diferencias cualitativas más importantes sufridas por los ácidos grasos, tras la germinación, son la desaparición de C-12 y C-18 : 3 de la fracción de ácidos grasos libres; C-10, C-12 y C-14 de la fosfatidiletanolamina; C-8, C-10, C-12 y C-18 : 3 de los triglicéridos y la aparición de C-12 en la lisofosfatidiletanolamina, C-16 : 1 en la fosfatidilsérina y C-8 en la lecitina y sobre todo la desaparición de un ácido graso no identificado de la fracción ésteres de esteróles, que supone hasta el 11,3 % en las esporas. En ningún fosfolípido se observa C-18 : 3.

15)

En el aspecto cuantitativo se observa que en los lípidos apolares, al pasar de la fase de esporas a la de micelio hay un aumento considerable de C-18 : 2, mientras que en todos los fosfolípidos, a excepción de la fosfatidiletanolamina, desciende el porcentaje del total de ácidos grasos constituido por los no saturados.

16)

En la fracción lípidos ligados se han identificado hidrocarburos, ubiquinona y esteróles. En la de las esporas falta el ergosterol. La ubiquinona ligada constituye el 29,5 % del total en las esporas y el 37 % en el micelio. El ergosterol de los lípidos ligados del micelio representa solamente el 1 % del total presente en el micelio de *H. stellata*.

Aunque en el sistema analítico utilizado se han detectado también monoglicéridos y diglicéridos, no ha podido demostrarse que se trate de componentes auténticos de la fracción lipídica y no del resultado de la hidrólisis de triglicéridos o fosfolípidos.

No se han encontrado en los lípidos ligados ácidos grasos libres, pero sí una sustancia no detectada en los lípidos fácilmente extractables, que por hidrólisis alcalina los libera y que se ha considerado como el producto de su metilación durante el proceso de extracción.

En los ácidos grasos de los lípidos ligados dominan los no saturados tanto en esporas como en micelio. Se han detectado en ambas fases de crecimiento ácidos grasos de número impar de átomos de carbono (C-15 y C-17) en las esporas y C-17 en el micelio. También se han detectado en ambos casos, ácidos grasos no saturados de menos de 16 átomos de carbono (C-14 : 1 y C-14 : 2).

RESUMEN

Se han estudiado los componentes lipídicos y las variaciones de éstos en esporas y micelio de 48 horas de *H. stellata*, obtenidos por crecimiento en medio de salvado y de Vaisey respectivamente.

Las esporas contienen un 2,9 % de lípidos fácilmente extractibles y un 0,74 % de lípidos ligados. El micelio contiene un 3,6 % de lípidos fácilmente extractibles y el 1,01 % de lípidos ligados.

Los componentes identificados en la fracción apolar de los lípidos fácilmente extractibles de esporas y micelio está compuesta por esteroles libres y esterificados, triglicéridos, ácidos grasos libres y Q₄₅, siendo los ácidos grasos libres los componentes más abundantes. La fracción polar de los lípidos fácilmente extractibles, tanto en esporas como en el micelio, está compuesta por esterol glicosídos, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina. Glicosilglicéridos se encontraron también en la fracción polar de las esporas.

Hidrocarburos, ubiquinona y esteroles se identificaron en los lípidos ligados de esporas y micelio de *H. stellata*.

Se han investigado también los diferentes ácidos grasos y su variación durante el proceso de germinación, que forman parte de los distintos componentes lipídicos identificados, siendo los ácidos oleico, linoleico, esteárico y palmitico los representantes mayoritarios.

RESUME

On a étudié les composants lipidiques et leurs variations dans des spores et dans du mycélium de 48 heures de *H. stellata*, obtenus par accroissement dans du milieu de son et de Vaisay, respectivement.

Les spores contiennent un 2,9 % de lipides facilement extractibles et un 74 % de lipides liés. Le mycélium contient un 3,6 % de lipides facilement extractibles et 1,01 % de lipides liés.

Les composants identifiés dans la fraction apolaire des lipides facilement extractibles des spores et du mycélium sont composés de stérols libres et stérifiés, triglycérides, acides gras libres et Q₄₅; les acides gras libres sont les composants les plus abondants. La fraction polaire des lipides facilement extractibles dans des spores ainsi que dans le mycélium est composée de stérols-glycosides, de la phosphatidéthanolamine, phosphatidylsérine, phosphatidylcholine et lisophosphatidéthanolamine. On trouva aussi des glycosilglycérides dans la fraction polaire des spores.

On a identifié des hydrocarbures, de l'ubiquinone, et des stérols dans les lipides liés des spores et du mycélium de *H. stellata*.

On a étudié aussi les différents acides gras et leurs variations pendant le procés de germination, lesquels forment partie des divers composants lipidiques identifiés; les acides oléique, linoléique, stéarique et palmitique sont les plus abondants.

SUMMARY

A study has been carried out on the lipidic compounds and their variations in spores and in *H. stellata* mycellium, 48 hours old, obtained by growing in bran medium and Vaisay medium, respectively.

The spores contain 2.9 % of easily extractible lipids and 0.74 % of bound lipids. The mycellium contains 3.6 % of easily extractible lipids and 1.01 % of bound lipids.

The compounds identified in the apolar fraction of the lipids, easily extractible from the spores and from the mycellium are composed of free and sterified lipids, triglycerides, free aliphatic acids and Q₄₅; the free aliphatic acids are the most abundant compounds.

The polar fraction of easily extractible lipids in spores as well as in the mycellium is composed of sterol-glycosides, phosphatidylethano lamine, phosphatidilserin; phohspatidilcholine and lisophosphatidylethanolamine. Some glycosilglycides were also found in the polar fraction of spores.

Some hydrocarbons, ubiquinone and sterols were identified in the bound lipids from spores and from mycellium of *H. stellata*.

A study has also been carried out on the various aliphatic acids and their variations during the germinating process which form part of the different lipidic compounds identified. The main representative are oleic, linoleic, stearic and palmitic acids.

AGRADECIMIENTO

El autor de esta tesis quiere expresar su gratitud al Ilmo. Sr. Profesor Dr. D. Justino Burgos González, Catedrático de Tecnología de los Alimentos y Vicedecano de la Facultad de Veterinaria de León, por la dirección de la misma y por la ayuda y orientaciones recibidas durante su realización.

También desea manifestar su agradecimiento a todos aquellos que, directa o indirectamente, han contribuido al desarrollo de este trabajo.

B I B L I O G R A F I A

- ALBRO P. W. y DITTMER J. C. (1969). *Biochemistry*, **8**, 1913.
- ALBRO P. W. y HUSTON C. K. (1964). *J. Bacteriol.*, **88**, 981.
- AMBE K. S. y CRANE F. L. (1960). *Biochim. biophys. Acta*, **43**, 30.
- AMES G. F. (1968). *J. Bacteriol.*, **95**, 833-843.
- ANDERSON J. A. (1964). *Biochim. biophys. Acta*, **89**, 450.
- ANDERSON J. A., SUN F. K., McDONALD J. K. y CHEDELIN V. H. (1964). *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 37-50.
- ANSLOW W. K. y RAINSTRICK H. (1938). *Biochem. J.*, **32**, 687.
- APPLETON G. S., KIEBER R. J. y PAYNE W. J. (1955). *Appl. Microbiol.*, **3**, 249.
- ARONSON J. M. y MACHLIS L. (1959). *Am. J. Botany*, **46**, 292-300.
- BARTNICKI-GARCIA S. y NICKERSON W. J. (1963). *Biochim. biophys. Acta*, **58**, 102-119.
- BENSON A. A., DANIEL H. y WISER R. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 1582.
- BENTLEY R., LAVATE W. V. y SWEENEY C. C. (1964). *Comp. Biochem. Physiol.*, **11**, 263.
- BERNHAUER K. (1943). *Ergeb. Enzymforsch.*, **9**, 297-360.
- BERTSCH L. L., BONSEN P. M. y KORNBERG A. (1969). *J. Bacteriol.*, **98**, 75.
- BATHIA S., SIKANDER LAL, SUKHIJA P. S. y PRUTHI T. D. (1970). *J. Sci. Fd. Agric.*, **21**.
- BIANCHI D. E. (1966). *Nature*, **210**, 115.
- BIEMENN K., DEJONGH D. C. y SCHNOES H. K. (1963). *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 1763.
- BLIX G. (1933). *Z. Physiol. Chem.*, **219**, 82.
- BLOCH K., BARONOWSKY P., GOLFINE H., LENNARZ W. J., LIGHT R., NORRIS A. T. y SCHEUER-BRANDT G. (1962). *Fed. Proc.*, **20**, 921.
- BLOOR W. R. (1925-1926). *Chem. Revs.*, **2**, 243-300.
- BOLTON A. A. y EDDY A. A. (1962). *Biochem. J.*, **82**, 169-178.
- BRENNAN P. J. y LEHANE D. P. (1969). *Biochim. biophys. Acta*, **176**, 675.
- BRUNDISH D. E., SHAW N. y BADDILEY J. (1965). *Biochem. J.*, **97**, 158.
- BRUNDISH D. E., SHAW N. y BADDILEY J. (1966). *Biochem. J.*, **99**, 546.
- BRUNDISH D. E., SHAW N. y BADDILEY J. (1967). *Biochem. J.*, **105**, 885.
- BURGOS J. y SALA F. (1970). X Reunión S. E. B.
- BURGOS J. (1972). Comunicación personal.
- CARTER H. E., MCCLEER R. H. y SLIFER E. D. (1956). *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 3735.
- CIFERRI R. y REDAELLI P. (1934). *The Journ. of Trop. Med. and Hyg.*, **37**, n.º 11, 167.
- CLARK J. M. (1966). En «Bioquímica Experimental». Ed. Acribia (Zaragoza). Pág. 33, 88, 89 y 90.
- COCHRANE V. W. (1958). En «Physiology of Fungi». John Wiley & Sons, Inc., New York Páginas 45-49 y 148.
- COHEN M. y PANOS C. (1966). *Biochemistry*, **5**, 2385.
- CRANE F. L. (1959). *Plant Physiol.*, **34**, 128.
- CRANE F. L. (1965). En «Biochemistry of Quinones» Ed. R. A. Morton. Academic Press, Londres. Pág. ix.
- CRANE F. L., HATEFI Y., LESTER R. L. y WIDMER C. (1957). *Biochim. biophys. Acta*, **25**, 220.
- CHICHESTER C. O., WONG P. S. y MACKINNEY G. (1954). *Plant Physiol.*, **29**, 238.
- DEBUCH H. y WENDT G. (1967). *Z. Physiol.*, **348**, 471.
- DESMAZIERES J. B. H. S. (1827). *Ann. Sc. Nat. Bot.* xi 246
— (1827). *Rec. Trav. Soc. d'Anat. Sci. Agr. Arts.* (Lille) 185.
- DISCHE Z. (1929). *Mikrochemie*, **7**, 33.
- DISTLER J. y ROSEMAN S. (1964). *Biochem. J.*, **105**, 889.
- DITTMER J. C. y LESTER R. L. (1964). *Journal of Lipid Research*, **5**, 127.
- DODGE B. O. (1912). *Bull. Torrey Botan.*, **39**, 139.
- DYKE K. G. H. (1964). *Biochim. biophys. Acta*, **82**, 374.
- EGLINTON G. y HAMILTON R. J. (1967). *Science*, **156**, 1322.
- ELLMAN G. L. y MITCHELL H. K. (1954). *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4028.
- EMERSON R. y FOX D. L. (1940). *Proc. Roy. Soc. (Londres, B)*, **128**, 275.
- ERICKSON R. E., BROWN K. S., WOLF D. E. y FOLKERS K. (1960). *Archiv. Biochem. Biophys.*, **90**, 314.
- FERMAN y col., (1967). *J. of Bacteriology*, **94**, 1873.
- FINK H., HAEHN H., HOERBURGER W. (1937). *Chemiker-Ztg.*, **61**, 689, 723, 744.
- FOLCH J., LEES M. y STANLEY G. H. S. (1957). *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
- FRANK M. y HESS E. (1941 a, b). «Studies on salt Fish», V. Studies on *Sp. epizoum* from «Dun». *Salt. Fish. J. Fish. Re. Bd. Can.*, **5**(3), 276.
- FOX C. F. (1972). *Scientific American*, **226** (n.º 2), 31.
- FRIEND J. y GOODWIN T. W. (1954). *Biochem. J.*, **57**, 434.
- FULLER R. C. y TATUM E. L. (1956). *Am. J. Botany*, **43**, 361.
- GALE P. H., ANSON B. H., TRENNER N. R., PAGE A. C. y FOLKER K. (1963). *Biochemistry*, **2**, 196.
- GARCÍA MENDOZA C. y VILLANUEVA J. R. (1965). *Proc. 2nd Meeting Federation European Biochem. Soc.*, Viena, pág. 122.
- GARRIDO J. M. y WALKER T. K. (1956). *J. Sci. Fd. Agric.*, **7**, 233.
- GARTON, G. A., GOODWIN T. W. y LIJINSKY W. (1951). *Biochem. J.*, **48**, 154.
- GOODWIN T. W. y WILLMER J. S. (1952). *Biochem. J.*, **51**, 213.
- GOODWIN T. W. (1952, b). *Biochem. J.*, **50**, 550.
- GORCHEIN A. (1968). *Biochim. biophys. Acta*, **152**, 358.
- GREEN D. E., HATEFI Y. y FECHNER Y. S. (1959). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1**, 45.
- GRUBER W. y PROSKE G. (1951). *Monatsh. Chem.*, **82**, 255.
- GUIDER J. M., HALSALL T. G. y JONES E. R. H. (1954). *J. Chem. Soc. (Londres)*, **1954**, 4471.
- GUILLERMOND A. (1941). En «The citoplasm of the Plant Cell», Chronica Botanica, Waltham, Massachusetts, pág. 247.
- HINES T. H. (1965). *J. Protozool.*, **12**, 655.
- HARDY R. y MACKIE P. (1969). *J. Sci. Fd. Agric.*, **20**, 193.
- HARTMAN L., HAWKE J. C., MORICE I. L. y SHORLAND F. B. (1960). *Biochem. J.*, **75**, 274.
- HARTMAN L., MORICE I. L. y SHORLAND F. B. (1962). *Biochem. J.*, **82**, 76.
- HEIM P. (1946, a). *Compt. Rend.*, **222**, 1354.
- (1946, b). *Compt. Rend.*, **223**, 1170.
- HIRATA Y. y NAKANISHI K. (1949). *Bull. Chem. Soc. (Japón)*, **22**, 121.
- HØYÉ (1902). *Bergens Mus. Aarb.* 1901 (2), n.º 7, pág. 1.
- HØYÉ (1905). *Bergens Mus. Aarb.* 1904 (3), n.º 9, pág. 1.
- HØYÉ (1907). *Bergens Mus. Aarb.* 1906 (2), n.º 12, pág. 1.
- HØYÉ (1909). *Bergens Mus. Aarb.* 1908 (1), n.º 4, pág. 1.
- HURST H. (1952). *J. Exptl. Biol.*, **29**, 30.
- HUSTON CH. K. y ALBRO P. W. (1964). *J. of Bacteriol.*, **88**, n.º 2,425.
- ISHIZUKA I. y YAMAKAWA T. (1969). *J. Exp. Med. (Japón)*, **39**, 321.
- JACK R. C. M. (1966). *J. of Bacteriol.*, **91**, 2101.
- JARVIS N. (1950). Curing of Fishery Products. *Research Report* **18**, pág. 271.
- JOHNSON M. J. (1941). *J. Biol. Chem.*, **137**, 575.
- KARRER P. y KRUASE-VOITH E. (1948). *Helv. Chim. Acta*, **31**, 802.
- KATES M., SEHGAL N. y GIBBONS N. E. (1961). *Can. J. Microbiol.*, **7**, 427.
- KATES M., KUSHNER D. J. y JAMES A. T. (1962). *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 83.
- KAUFMAN B., KUNDIG F. D., DISTLER J. y ROSEMAN S. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **18**, 312.
- KAWANAMI J., KIMURA A. y OTSUKA H. (1968). *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 808.
- KEMP P. y DAWSON R. M. C. (1969). *Biochem. J.*, **113**, 55.
- KREGER D. R. (1954). *Biochim Biophys. Acta*, **13**, 1.
- KREITLOV K. W. (1934). *Phytopathology*, **33**, 1055.
- LAIDMAN D. L., MORTON R. A., PATERSON J. Y. y PENNOCK J. F. (1959). *Chem. and Ind.*, **1019**.
- LAMIEUX R. U. (1953). *Can. J. Chem.*, **31**, 396.
- LAMPEN J. O., ARNOW P. M., BOROWSKA Z. y LASKIN A. I. (1962). *J. Bacteriol.*, **84**, 1152.
- LAVATE W. V. y BENTLEY R. (1964). *Archiv. Biochem. Biophys.*, **108**, 287.
- LAVATE W. V., DYER J. R., SPRINGER C. M. y BENTLEY R. (1962). *Biochem. J.*, **237**, 2715.
- LENNARZ W. J. y TALAMO B. (1966). *J. Biol. Chem.*, **241**, 2707.
- LEPAGE M. (1964). *J. of Chromatography*, **13**, 99.
- LESTER R. L. (1963). *Federation Proc.*, **22**, 415.
- LESTER R. L. y CRANE F. L. (1959). *J. Biol. Chem.*, **234**, 2169.
- LESTER R. L., CRANE F. L. y HATEFI Y. (1958). *Chem. Soc.*, **80**, 4751.
- LESTER R. L. y FLEISCHER S. (1959). *Archiv. Biochem.*, **80**, 470.
- LIM H. (1935). *J. Fac. Agr. Hokkaido Imp. Univ. (Sapporo, Japón)*, **37**, 165.
- LONGLEY R. P., ROSE A. H. y KNIGHTS B. A. (1968). *Biochem. J.*, **108**, 41.

- LE ROUX N. (1967). Conferencia (Universidad de Newcastle upon Tyne).
- MACDOUGALL J. C. y PHIZACKERLEY P. J. R. (1969). *Biochem. J.*, **114**, 361.
- MACFARLANE M. G. (1961). *Biochem. J.*, **80**, 45 p.
- MATCHES J. R., WALKER H. W. y AYRES J. C. (1964). *J. Bacteriol.*, **87**, 16.
- MAYER G. L., POUSADA M. y HAINES T. M. (1969). *Biochemistry*, **8**, 2981.
- MORRIS L. J. (1968). *Lipids*, **3**, 260.
- MORTON R. A., WILSON G. M., LOWE F. S. y LEAT W. M. F. (1957). *Chem. & Ind.*, 1649.
- MORTON R. A. (1965). «*Biochemistry of Quinones*», Academic Press. Londres.
- MURRAY S., WOODBINE M. y WALKER T. K. (1953). *J. Exp. Botany*, **4**, 251.
- NAKAYAMA T., MACKINNEY G. y PHAFF H. J. (1954). *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **20**, 217.
- NOMBELA C., PEBERDY J. F. y VILLANUEVA J. R. (1971). Comunicación, 5º Congreso Nacional de Bioquímica.
- NORTHCOTE D. H. y HORNE R. W. (1952). *Biochem. J.*, **51**, 232.
- OP DEN KAMP J. A. F., BONSEN P. P. M. y VAN DEENEN L. L. M. (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 298.
- ORÓ J., TORNABENE T. G., NOONER D. W. y GELPI E. (1967). *J. Bacteriol.*, **93**, 1811.
- OUDEMANS C. A. J. (1885). *Mededel. d. Kon. Akad. van Neteush. Afd. Naturk.*, **3**, ii, 115.
- PARKER N. M. y GLOVER J. (1960). *Nature*, **187**, 43.
- PAGE A. C., GALE P., WALLICK J., WALTON R. B. y McDANIEL L. E. (1960). *Archiv Biochem. Biophys.*, **89**, 318.
- PARK C. H. y BERGER L. R. (1967). *J. Bacteriol.*, **93**, 221.
- PECK R. L. (1947). «*Biology of Pathogenic Fungi*». Ed. W. J. Nickerson. Waltham, Massachusetts. pág. 167.
- PETTIT G. R. y KNIGHT J. C. (1962). *J. Org. Chem.*, **27**, 2696.
- PHIZZACERLEY P. J. R., MACDOUGALL J. C. y MOORE R. A. (1972). *Biochem. J.*, **126**, 499.
- POLONOVSKI J., WALD R. y PAYSANT-DIAMENT M. (1962). *Ann. Inst. Pasteur*, **103**, 32.
- PRILL E. A., WENCK P. R. y PETERSON W. H. (1935). *Biochem. J.*, **29**, 21.
- PROTTÉY C. y BALLON C. E. (1968). *J. Biol. Chem.*, **243**, 6196.
- PRUESS L. M., EICHINGER E. C. y PETERSON W. H. (1934). *Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II*, **89**, 370.
- PRUTHI T. D. y BHATIA I. S. (1970). *J. Sci. Fd. Agric.*, **21**, 419.
- PUMPHREY A. M. y REDFEARN E. R. (1959). *Biochem. J.*, **72**, 2.
- RAISTRICK H. (1950). *Proc. Roy. Soc. (Londres)*, **136**, 481.
- RAVEUX R. (1948). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **30**, 357.
- ROWLAND R. L., LATIMER P. H. y GILES J. A. (1956). *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 4680.
- SAITO A. (1953). *J. Fermentation Technol.* (Japón), **31**, 140, 141, 328.
- SALA F. (1969). Tesis Doctoral. Fac. de Vet., León.
- SALA F. y BURGOS J. (1970). X Reunión S. E. B.
- SCANDELLA C. K. y KORNBERG A. (1969). *J. of Bacteriol.*, **98**, 82.
- SCOTT T. A. y MELVIN E. H. (1953). *Analyt. Chem.*, **25**, 1650.
- SCHLENK H. y GELLERMAN J. L. (1960). *Analyt. Chem.*, **32**, 1412.
- SCHÖNBORN W. (1955). *Arch. Mikrobiol.*, **22**, 408.
- SHAW N. (1972). Comunicación personal.
- SHAW N. (1968). *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 427.
- SHAW N. (1968). *Biochim. Biophys. Acta*, **164**, 435.
- SHAW N. y BADDILEY J. (1968). *Nature*, **217**, 142.
- SHAW N. y DIGLINGER (1969). *Biochem. J.*, **112**, 769.
- SHAW N. y SMITH P. F. (1967). *Bact. Proc.*, **108**.
- SHAW N., SMITH P. F. y KOOOSTRA W. L. (1968). *Biochem. J.*, **107**, 329.
- SHIVELY J. M. y KNOCHE H. W. (1969). *J. Bacteriol.*, **98**, 829.
- SHEHATA A. J., de MAN J. M. y ALEXANDER J. C. (1970). *Can. Inst. Food Technol. J.*, **3**, 85.
- SHU P. y THORN J. A. (1952). *Can. J. Botany*, **30**, 252.
- SHU P., TANNER K. G. y LEDINGHAM G. A. (1954). *Can. J. Botany*, **32**, 16.
- SINGH J. y WALKER T. K. (1956). *Biochem. J.*, **62**, 286.
- SINGH J., WALKER T. K. y MEARA M. C. (1955). *Biochem. J.*, **61**, 85.
- SMITH P. F. y MAYBERRY W. R. (1968). *Biochemistry*, **7**, 2706.
- SMITH J. G. M., HARDY R. y DAVIE K. (1969). TORRY RESEARCH Station Interin, Record n.º 23.
- SMITHIES W. R. (1952). *Biochem. J.*, **51**, 259.
- STOFFEL W., CHU F. y AHRENS E. H. (1959). *Analyt. Chemistry*, **31**, 307.
- STONE K. J., BUTTERWORTH P. H. W. y HEMMING F. W. (1967). *Biochem. J.*, **102**, 443.
- STONE K. J. y HEMMING F. W. (1968). *Biochem. J.*, **109**, 887.
- SUMI M. (1928). *Bioch. Z.*, **195**, 161.
- TANRET C. (1908). *Comp. Rend. (París)*, **147**, 75.
- TSUDA S. y TATUM E. L. (1961). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 171.
- TULLOCH A. P., HILL A. y SPENCER J. F. T. (1968). *Can. J. Chem.*, **46**, 435.
- TULLOCH A. P., SPENCER J. F. T. y DEINEMA M. H. (1968). *Can. J. Chem.*, **46**, 345.
- TURIAN G. y HAXO F. T. (1954). *Botan. Gaz.*, **115**, 254.
- VAISEY E. B. (1954, a). *Fisch. Res. Bd. of Canada, Progs. Repts. Pacific Coast Stas.*, **58**, 32.
- _____. (1954, b). *Fish. Res. Bd. of Canada, Progs. Repts. Pacific Coast Stas.*, **60**, 4.
- _____. (1954, c). *Fish. Res. Bd. of Canada, Progs. Repts. Pacific Coast Stas.*, **11**, 901.
- VAN DER VEN B. y JONGE A. P. (1957). *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, **76** n.º 2.
- VUILLEMEN P. (1931). «*Les Campignons Parasites et les Mycoses de l'Homme*». Lechevalier. París.
- WAGNER H., HÖRHAMMER L. y WOLFF P. (1961). *Biochim. Z.*, **334**, 175.
- WALKER R. W. y BASTL C. P. (1967). *Carbohydr. Res.*, **4**, 49.
- WARD G. E., LOCKWOOD L. B., MAY O. E. y HERRICK H. T. (1935). *Ind. Eng. Chem.*, **27**, 318.
- WELSFORD E. (1907). *New Phytologist*, **6**, 156.
- WELSH K., SHAW N. y BADDILEY J. (1968). *Biochem. J.*, **107**, 313.
- WHITE D. C. y COX R. H. (1967). *J. Bacteriol.*, **93**, 1079.
- WILKINSON S. G. (1968). *Biochim. Biophys. Acta*, **227**, 112.
- WOODBINE M., GREGORY M. E. y WALKER T. K. (1951). *J. Exp. Botany*, **2**, 204.
- WOOLLEY D. W., STRONG F. M., PETERSON W. H. y PRILL E. A. (1935). *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 2589.
- ZALOKAR M. (1954). *Arch. Biochem. Biophys.*, **50**, 71.
- ZALOKAR M. (1955). *Arch. Biochem. Biophys.*, **56**, 318.
- ZALOKAR M. (1965). *The Fungi I*. Cap. 14, pág. 386. Academic Press, New York.
- ZELLNER J. (1907). «*Chemie der Höheren Pilze*». Leipzig. Pág. 257.