

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Departamento de Bioquímica. - Madrid
(Prof. Dr. A. Santos-Ruiz)

Estudio sobre bioquímica de insectos

I. Aminoácidos aromáticos y triptófano en la metamorfosis de *Saturnia Pyri*

M.^a D. Stamm y L. Aguirre

(Recibido para publicar el 25 de febrero de 1955)

En trabajos anteriores, uno de nosotros (M.^a D. S.), en colaboración con Santos Ruiz, Villar Palasí y Comenge (10, 11, 12), hizo un estudio sobre los aminoácidos acromáticos y el triptófano en el metabolismo del gusano de seda (*Bombix Mori*). En la actualidad hemos querido ampliar estos trabajos aplicándolos a otras especies de insectos. El escogido para nuestro propósito ha sido el gran pavón de noche (*Saturnia Pyri*).

Con este fin, se ha determinado el contenido de los aminoácidos ya indicados en sus distintas fases de evolución (larvas, crisálidas e insecto adulto), así como en el capullo, excrementos y mudas. Se han valorado también las albúminas y globulinas y se han identificado por cromatografía de papel los mon péptidos que contienen los hidrolizados.

Material y métodos

1. *Recogida de muestras.* — Las muestras de larvas se recogieron en Almadén. De éstas una parte se sacrificó por inmersión en éter y el resto se dejó para obtener las crisálidas y mariposas, que se sacrificaron después por el mismo procedimiento.

2. *Desengrasado.* — En el material obtenido se extrajeron totalmente los lípidos con el aparato de Soxhlet, empleado como disolvente del éter sulfúrico de 65°.

3. *Determinación global de proteidos.* — Se llevó a cabo valorando el N por el semimicrométodo de Parnas (1) con la modificación introducida por Cabo (4). Dada la relativamente pequeña cantidad del N no proteico, se utilizó el valor N total como guía de la proteína total multiplicándolo por 6.25.

4. *Determinación de fracciones proteicas.* — Se valoraron aminoácidos libres, albúminas y globulinas.

Las albúminas se determinaron extrayendo la muestra con agua destilada neutra, tres veces consecutivas; determinando después el N. total de esta disolución acuosa y restando del número obtenido el correspondiente a aminoácidos libres, que se valoraron en la misma disolución por el método de Van Slyke (13).

La extracción de globulinas se realizó de la misma manera, pero empleando solución de ClNa al 10 % en lugar de agua destilada (5).

5. *Hidrólisis proteídica.* — Se realizó en tubo cerrado, a 2.5 atmósferas de presión, durante cinco horas y utilizando la NaOH 5N como agente hidrolizante en la proporción de 100 cc. de aquélla por cada 5 g. de muestra hidrolizada.

6. *Determinación del N amínico.* — En cada hidrolizado se determinó el N amínico por el método de Van Slyke (13). Dividiendo la cifra de N amínico por la de N total se obtuvo el porcentaje de hidrólisis.

7. *Determinación de monopeptidos.* — Los métodos utilizados fueron: el de cromatografía de papel monodimensional para la identificación de monopeptidos empleando como disolvente el butanol-acético-agua (4:1:5) y como revelador solución de ninhidrina en butanol al 0.1 %. La determinación cuantitativa se realizó por métodos colorimétricos: la adaptación de Block y Bolling (3) al método de Kapeller-Adler (7) Kuhn (8) para la fenilalanina; la de Bernhart (2) al de Millon-Lugg (9) para la tirosina y el del p-dimetilaminobenzaldehído (6) para el triptófano.

Resultados

En los cuadros y gráficas que siguen se resumen los resultados obtenidos:

CUADRO I

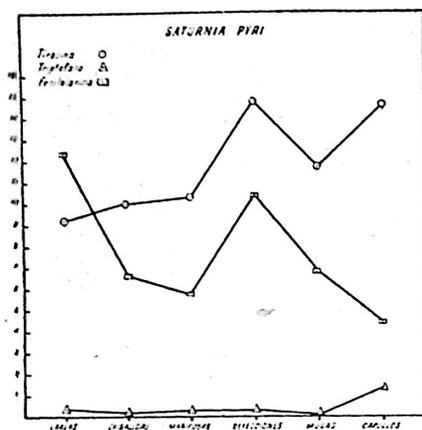
Fase de la metamorfosis o producto segregado o excretado por el insecto	Proteidos contenidos en 100 g. de materia seca	Tirosina en 100 g. de proteidos	Triptofano en 100 g. proteidos	Fenilalanina en 100 grs. de proteidos
Larvas	63	9'17	0'38	12'42
Crisálidas	81'62	10'01	0'22	6'66
Mariposas	76'62	10'3	0'27	4'85
Deyecciones	16'18	14'75	0'27	10'43
Mudas larvales	66'06	12'67	0'14	6'75
Capullos	99'81	14'58	1'33	4'41

CUADRO II

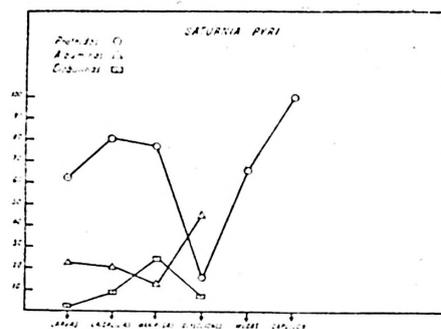
Fase de la metamorfosis	% de N correspondiente a aminoácidos libres.	Albúminas en 100 g. de proteidos	Globulinas en 100 g. de proteidos
Larvas	0'73	22'87	2'42
Crisálidas	0'62	21'50	9'02
Mariposas	1'60	13'00	25'20

CUADRO III

Fase de la metamorfosis	Monopéptidos identificados por cromatografía
Larvas	Glicocola, serina, valina, lisina, prolina, tirosina, triptófano, fenilalanina.
Crisálidas	Glicocola, serina, valina, lisina, prolina, tirosina, triptófano, fenilalanina.
Mariposas	Glicocola, serina, valina, lisina, prolina, tirosina, triptófano, fenilalanina.



Gráfica I



Gráfica II

Discusión

La gráfica I, trazada con las cantidades que de los tres aminoácidos estudiados se han encontrado en cada una de las fases del desarrollo, así como en los productos de excreción, nos permite deducir, entre otras, las siguientes consideraciones:

El contenido de triptófano es muy bajo, y, además, permanece casi invariable durante toda la metamorfosis. Únicamente en el capullo se encuentran valores relativamente altos en comparación con los anteriores, ya que son seis veces superiores a los de la crisálida.

La curva de tirosina muestra un ascenso poco pronunciado desde la larva hasta la mariposa. Las cantidades se elevan considerablemente en las deyecciones, descienden, sin embargo, en las mudas que dejó la larva al pasar a crisálida y vuelven a subir de nuevo en los capullos, encontrándose en éstos valores prácticamente iguales a los de las deyecciones; o sea: el insecto se desprende de la misma cantidad de tirosina durante toda su vida larval, aunque el medio de que se vale es diferente en la última época: primeramente utiliza las excretas y al terminar la empieza en la formación del capullo. Podría pensarse que el animal previene ya desde el principio la cantidad de aminoácido que va a necesitar después para la formación de la seda y ésta únicamente la emplea con ese fin en el momento oportuno.

La curva de fenilalanina desciende marcadamente desde la larva hasta la mariposa, presenta después un ascenso paralelo al de la tirosina en las deyecciones y vuelve a bajar después en las mudas y capullos. En ésta, sin embargo, no se aprecia el

ascenso final que presentaban las dos anteriores en los capullos.

Comparando las tres curvas entre sí, se puede apreciar que, excepto la larva que contiene más fenilalanina que tirosina, los valores de este último aminoácido son siempre superiores a los de fenilalanina y éstos a su vez a los de triptófano, que, como ya dejamos indicado anteriormente, aparece en cantidades muy reducidas.

La gráfica II representa las variaciones de los proteidos totales, así como las de albúminas y globulinas contenidas en 100 g. de éstos a través de toda la metamorfosis. En lo que respecta a los proteidos, se puede apreciar que aumentan de la larva a la crisálida, descienden después en el insecto adulto, o sea en la mariposa, bajan marcadamente en las deyecciones y vuelven a subir en las mudas y capullos, especialmente en estos últimos, que, como es sabido, excepto una pequeña cantidad de materia cérea, su composición es exclusivamente proteídica.

Las curvas de albúminas y globulinas siguen un camino inverso, es decir, mientras las cantidades de albúminas descienden desde la larva a la mariposa, las globulinas van aumentando. En las deyecciones, sin embargo, la curva cambia de dirección, descendiendo las globulinas y aumentando las albúminas.

Conclusiones

- 1.º De los tres monopéptidos estudiados es la tirosina la que se encuentra siempre en mayor cantidad, excepto en la larva.
- 2.º Las larvas de *Saturnia Pyri* contienen más cantidad de fenilalanina que de tirosina.
- 3.º El triptófano se encuentra siempre en cantidades muy pequeñas y éstas no varían durante la metamorfosis.
- 4.º Las cantidades de tirosina que contienen los proteidos que elimina la larva en las deyecciones y las que aparecen en el capullo son prácticamente iguales.
- 5.º Las cantidades de globulinas son inferiores a las de albúminas excepto en las mariposas, que ocurre lo contrario.
- 6.º Todas las fases de evolución contienen varios monopéptidos del grupo de los indispensables.

Summary

Total protein, albumin, globulin, tyrosine, tryptophan and phenylalanine in the lepidoptera *Saturnia Pyri* have been investigated along its metamorphosis. Aminoacids in hydrolysates were identified chromatographically in each phase of evolution. The amount of tryptophan is always very small, without appreciable changes throughout the metamorphosis.

Bibliografía

- (1) BELCHER, R. y GODBERT, A. L. : Semimicrocuantitativa organica. Analysis, 87. Londres, 1945.
- (2) BERNHART, F. W. : *J. Biol. Chem.*; **123**, 10, 1938.
- (3) BLOCK, R. J. y BOLLING, D. : The Determination of the Amino Acids Burgess Publishing C. Minneapolis. Minn. 1940.
- (4) CABO TORRES, J. : Estudio farmacognóstico de la hoja de ruda. Tesis doctoral. Madrid, 1950.
- (5) COMENGE, M. : Prácticas de Bioquímica, pág. 88, 1950.
- (6) GARCÍA DEL AMO, C. : Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, 1951.
- (7) KAPPELLER-ADLER, R. : *Biochem. Zeit.*; **252**, 185-200. 1932.
- (8) KUHN, R. y DESNUELLE, R. : *Ber.*; **70**, 1907, 1937.
- (9) LUGG, J. W. H. : *Biochem. Journ.*; **31**, 1423, 1937.
- (10) STAMM, M.^a D., COMENGE, M. y SANTOS RUIZ, A. : *R. esp. de Fisiol.*, **6**, 187, 1950.
- (11) STAMM, M.^a D., COMENGE, M. y SANTOS RUIZ, A. : *R. esp. de Fisiol.*, **6**, 187, 1950.
- (12) STAMM, M.^a D., SANTOS RUIZ, A. y VILLAR PALASÍ, V. : *Anal. Fis. Quím B.* XLVI, 595, 1950.
- (13) VAN SLYKE, D. D. : *Journ. of Biol. Chem.*; **16**, 121-124, 1913-1914.