

Estudio de la actividad amilásica de la patata en presencia de inosita y hexaclorociclohexano

J. Moreno Calvo *

(Recibido para publicar el 20 el marzo de 1956)

Introducción

SLADE (23) creó la hipótesis de que la acción insecticida del γ -hexaclorociclohexano (abr.: γ HCCH) se explica por la analogía estructural con la meso-inosita y atribuyó al isómero gamma una configuración idéntica a la de dicha ciclita. De este modo dicho autor interpretaba la mayor actividad tóxica a favor del «gammexano» y con respecto a los isómeros α , β y δ . Por ello se propuso que el γ -HCCH interfiere con la mesoinosita, a la que se considera constitutiva de algún cofermento de importancia vital (Bios I) para el metabolismo intermediario (inhibición competitiva funcional).

Los estudios de VAN VLOTEN y colabs. (24) han demostrado que la estructura configurativa del isómero γ del HCCH no se corresponde con la del Bios I. Sin embargo, la idea de SLADE ha originado un abundante material de observaciones del que se desprende que la acción tóxica del γ -HCCH puede ser neutralizada por la mesoinosita, es decir, que la acción tóxica depende de la concurrencia en la célula entre la concentración del γ -HCCH y la inosita.

El problema de la toxicidad del γ -HCCH se intentó explicar luego mediante acciones inhibitoras a través de los más diversos sistemas enzimáticos. Así, por ejemplo, LANE y WILLIAMS (12) observan que el γ -HCCH inhibe «in vitro» la actividad enzimática de una muestra de α -amilasa pancreática, la

* Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica, con la ayuda del Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo).

que a su vez, purificada, parece contener un elevado tanto por ciento de inosita. Observan, además, los mencionados autores que la inhibición se impide competitivamente adicionando meso-inosita. Sin embargo, FISHER y BERNFELD (7), al intentar reproducir el trabajo de LANE y WILLIAMS, no sólo no lo consiguen, sino que obtienen resultados contradictorios, sugiriendo que la amilasa debe contener inosita de modo accidental y porque no estaba totalmente purificada.

El presente trabajo se realizó con la idea de obtener resultados que aclararan el problema en relación con la actividad amilásica. Para ello se utilizó la cromatografía sobre papel y en vez de utilizar una amilasa purificada se ha creído más oportuno manejar un extracto reciente de patata con actividad amilásica, ya que así nos encontraremos con una conducta bioquímica más natural, sin exponernos a los peligros que supone la desnaturalización espontánea que se presenta durante las manipulaciones de la purificación. Con ello, al variar las circunstancias experimentales, presentamos nueva luz dirigida al esclarecimiento del problema de las interacciones entre los enzimas amilásicos, el γ -HCCH y la meso-inosita. Al mismo tiempo presentamos resultados que pueden ser útiles para la Biología de la patata en relación con un insecticida como es el γ -HCCH.

Material y métodos

Engrudo de almidón. — Se preparó al 2 %, hirviendo previamente 90 c. c. de agua destilada y añadiendo 2 g. de almidón (almidón soluble Merck). El almidón se tiene pesado ya de antemano y suspendido en agua destilada y se vierte sobre la que se tenía en ebullición. La operación de verter el almidón con agua destilada se repite varias veces hasta limpiar por completo el pesasubstancia. Obtenida la solución coloidal se deja enfriar y se completa con agua destilada a 100. Como control se determina el pH (=5'0).

Los azúcares testigos se manejan en disoluciones al 1 % (p:v). La solución de maltosa se preparó con azúcar de procedencia Merck. La glucosa se adquirió de Gehe.

La *disolución amortiguadora* a pH 7 se preparó mezclando 37 c.c. y 63 c.c. respectivamente de disoluciones recientes de fosfato monopotásico y fosfato disódico M/15.

Se utilizó también cloroformo y una disolución de cloruro sódico 0.2 N.

Para la cromatografía se utilizó como *disolvente* la mezcla ternaria acetato de etilo-piridina-agua (2:1:2. Jermyn-Isherwood), *papel* Whatmann n.º 1 y los *reveladores* ftalato de anilina según PARTRIDGE para los azúcares y yodo 0'01 N para el almidón.

Para la inactivación del sistema enzimático sobre el papel Whatmann se empleó cianuro mercúrico 0.01 M.

Aparatos. — Una estufa graduada a 37° y otra de 115° para el revelado.

Un aparato para cromatografía dispositivo cilíndrico-ascendente.

Para más detalles véase nuestra publicación anterior (MORENO CALVO y SANTOS RUIZ, (15).

TÉCNICAS REALIZADAS

Según DOBY y BURGER (6) el pH óptimo para la acción amilásica de la patata es de 6'95-7'00 [(MYRBACK y NEUMÜLLER (16)]

Extracción de la amilasa. — Se ha utilizado la técnica de NIELSEN (17): En un mortero muy limpio con agua destilada y seco se colocaron 19 g. de tubérculo de patata cortado en pequeños trozos, pulverizando con ayuda de una pequeña cantidad de arena lavada y seca. Se añade poco a poco la disolución de fosfato a pH 7 consumiéndose 16 c.c. Se esperan 20 minutos para permitir la difusión y el líquido sobrenadante (unos 20 c.c.) se centrifuga a 5.000 revoluciones durante 6 minutos. Se decanta y se centrifuga nuevamente 20 minutos.

Disposición del sistema para la reacción enzimática.

El fermento (disolución) se pone en contacto con el sustrato (almidón), se incuba a 37° C. y en fracciones sucesivas de tiempo se toman micromuestras que se colocan sobre el papel Whatmann según la técnica papirocromatográfica.

Cantidades múltiples de HCCH (Doesder) se suspenden por agitación en una parte del engrudo del que se toma 1 c.c. en cada caso. La suspensión, muy inestable, se estabiliza considerablemente al añadir los restantes componentes del sistema, lo que se debe fundamentalmente al descenso de la tensión superficial provocado por las proteínas de la patata.

En los casos en que hay inosita se disuelve ésta del mismo modo (la inosita utilizada procedió de Schering Kahlbaum A. G. Berlín). En la tabla adjunta figuran las cantidades totales

añadidas en cada uno de los ensayos realizados, siendo el volumen total el mismo para todos ellos, con lo que, si se desea, puede calcularse fácilmente la concentración final de cada sustancia.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Almidón al 2 % (c. c.)	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto con el enzima (pH = 7) (c. c.)	1	1	1	1	1	1	1	1
CINa 0'2 N (c. c.)	0'1	0'1	0'1	0'1	0'1	0'1	0'1	0'1
Cl ₅ CH (gotas)	3	3	3	3	3	3	3	3
HCCH (mg.)	0	0	4	9	13	4	9	13
Inosita (mg.)	0	1	0	0	0	4	3	1

El extracto con el enzima se añadió en el último momento y los tubos con el enzima se colocaron en la estufa a 37° C.

Disposición de las muestras sobre el papel Whatmann

En las figuras 1 y 2 se observa con toda claridad la distribución de las muestras y los tiempos sobre la línea de origen.

De almidón se cromatografían 30 µg (1.5 µl del engrudo a la concentración de 20 mg/c.c.), de maltosa y glucosa 15 µg de cada uno.

Las restantes indicaciones expresan minutos (de diez en diez) y horas. Estas fracciones corresponden a tiempos de hidrólisis enzimática. El volumen tomado cada vez, después de la hidrólisis es de 3 µl lo que equivale a 29 µg expresados en almidón inalterado. De este modo el color de las manchas de almidón al reaccionar con el yodo es perfectamente comparable, al estimar la marcha del proceso.

Como las muestras de 3 µl contienen todavía enzima activo,

se destruye su actividad colocando previamente sobre el papel Whatmann en los puntos de origen 4 μg de cianuro mercúrico en forma de disolución 0.01 M [BEALING y BACON (1) MORENO CALVO y SANTOS RUIZ (15)].

Resultados

El ensayo I, de la actividad amilásica de la patata, dió como resultado el cromatograma de la fig. 1. En este diagrama vemos la degradación sucesiva del almidón bajo el efecto amilásico (complejo enzimático de la patata) lo que se refleja en la formación de glucosa.

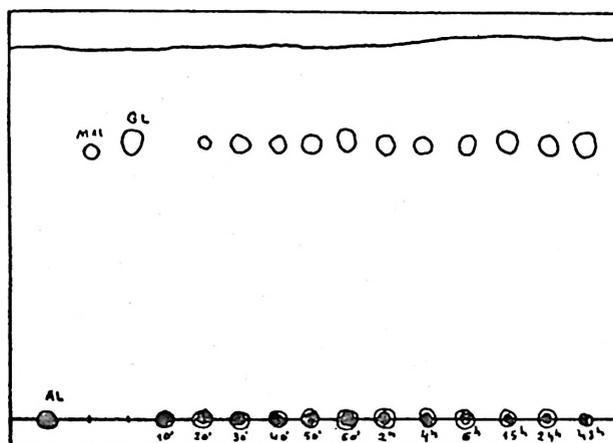


Fig. 1

CROMATOGRAMA DE LA ACTIVIDAD AMILÁSICA DE LA PATATA

AL = almidón, MAL = Maltosa, GL = glucosa.

Disolvente = Acetato de etilo-piridina-agua 2:1:2).

Reveladores = Ftalato de amilina y yodo. Tiempo: 21 horas. Temperatura: 20° C.

Las manchas de almidón al revelar con yodo muestran la desaparición paulatina de la intensidad del color, que va desde el azul oscuro hasta el término final a las 48 horas con un núcleo violeta y una corona débilmente rojiza. El cambio sucesivo se explica sin ningún género de dudas por la degradación de las moléculas del substrato en amilosas, eritrodextrinas y dextrinas residuales.

El ensayo II corresponde a la acción amilásica en presencia de inosita. El diagrama obtenido no se ha dibujado porque coincide en todos sus detalles, así como los siguientes (II al VIII) con el de la fig. 1. Como detalle se ha dibujado el cromatograma correspondiente al ensayo VI (fig. 2) de la acción

amilásica en presencia de HCCH e inosita por el hecho de haberse revelado esta última sin haber tenido intención de ponerla de manifiesto. El reactivo de Partridge reveló esta sustancia presentándose en forma de manchas blancas fluorescentes a la luz ultravioleta. De la tabla anterior y teniendo en

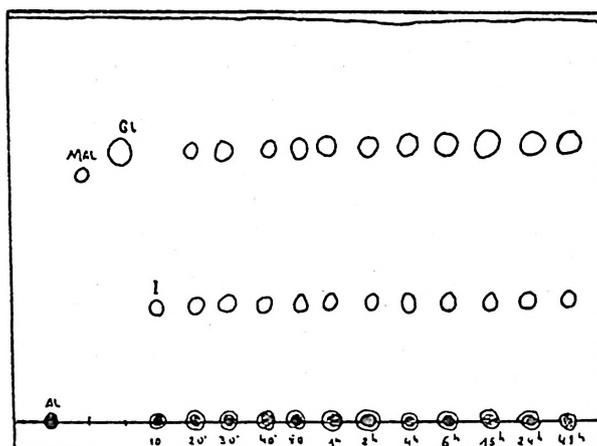


Fig. 2

GROMATOGRAMA DE LA ACTIVIDAD AMILASICA DE LA PATATA EN PRESENCIA DE HEXACLOROCICLOHEXANO E INUSITA

Características como la figura 1, salvo I = inosita y temperatura = 28'5° C.

cuenta los detalles de la técnica utilizada se puede deducir fácilmente que la cantidad puesta de inosita y revelada es de 3 μ g.

A continuación se insertan los R_f obtenidos en la fig. 2 a fin de dar el de la inosita con el disolvente utilizado (acetato de etilo-piridina-agua).

Maltosa	0'58
Glucosa	0'63
Inosita	0'29

Disolvente: Acetato de etilopi-ridina-agua.

Temperatura: 28'5°.

Tiempo: 21 horas.

Discusión

El problema de la acción del γ -HCCH sobre los organismos vivos y sobre los sistemas enzimáticos (amilásicos en particular, es una cuestión interesante que ha preocupado a los investigadores. Se ha dicho en forma general que la inosita impide

o neutraliza los efectos del γ -HCCH y otros inhibidores sobre las células vegetales y animales [PORTERNAK y cols. (19)]. Sin embargo, este probable antagonismo competitivo no parece ser rigurosamente cierto en todos los casos. Examinemos a continuación distintos resultados entresacados de la literatura que se relacionan de una manera u otra con el tema bioquímico que tratamos.

BUSTON y cols. (3) comprueban que el γ -HCCH inhibe por completo el crecimiento del *Nematospora gossypii* y KIRKWOOD y PHILLIPS (9) trabajando con ciertas levaduras que requieren 1 μ g de inosita por c.c. de medio para lograr un crecimiento máximo, completan la observación con el hecho de que el mencionado crecimiento máximo se inhibe con 60 μ g de HCCH. La inhibición es reversible y puede neutralizarse casi por completo añadiendo inosita.

Estas observaciones confirman claramente el antagonismo biológico que existe entre ambas sustancias. Sin embargo MEILLON (13) logra observar que la sangre de conejo inyectado con HCCH es tóxica para ciertos artrópodos pero esta toxicidad no se puede neutralizar con inyecciones simultáneas de inosita.

Por otra lado [RHYMER y cols. (2)], el lipositol que contiene inosita inhibe la acción antibacteriana de la estreptomina, lo que se puede comparar al efecto del ácido para-amino-benzóico frente a la acción bacteriostática de las sulfanilamidas.

Otra acción antimetabólica había sido ya observada por SCHOPFER y cols. (22) puesto que el γ -HCCH inhibe la flavinogénesis en el *Eremothecium ashbyi var gossypii*, siendo neutralizadas 800 μ g de HCCH por 5 de mesoinosita. Para interpretar cierto material contradictorio, dichos autores alegan que los fenómenos de toxicidad por el HCCH observados en la vida de los hongos, así como su neutralización son casi inapreciables los que se explicaría por la biosíntesis del Bios I en dichos hongos.

Por otra parte comunica RAKE (20) que el lipositol es ligeramente activo y puede substituir a la estreptomina en el mutante de *Escherichia coli* que necesita estreptomina.

A favor del antagonismo en cuestión pudiera citarse también el hallazgo de CHARGAFF y cols. (5) de que los tumores provocados en el *Allium cepa* por la colchicina y el HCCH, se pueden neutralizar y hacer desaparecer mediante la inosita.

Más recientemente, LANE y WILLIAMS (12), llegan a la conclusión de que la inosita es un componente activo de la α -amilasa pancreática observando que el γ -HCCH después de un período de incubación de 16 horas, a la temperatura de 0°, inac-

tiva por completo la acción amilásica y esta inhibición se puede neutralizar adicionando meso-inosita.

Posteriormente, FISHER y BERNFELD (7) al reproducir el trabajo anterior no obtienen el mismo resultado, realizando inclusive una incubación a 20° y a pesar de la intensa inactivación que ejerce el dioxano, utilizado como componente del sistema, no se observa una inactivación mayor en presencia del HCCH, ni se modifica la actividad por la acción de la inosita. Dichos autores alegan contra la hipótesis de SLADE el que el δ -HCCH que es el compuesto más tóxico para el *Saccharomyces cerevisiae* no puede hacerse inocuo añadiendo inosita y concluyen que las α -amilasas de páncreas de cerdo y de saliva humana no contienen inosita. Ésta última substancia no ejerce ningún efecto ni sobre la actividad ni sobre la estabilidad de los preparados α -amilásicos.

A la luz de estas ideas se pensó en el estudio de la acción amilásica de la patata (var Sergen, española) para comparar los resultados con los anteriores. Al mismo tiempo se recurrió a la cromatografía sobre papel que representa grandes ventajas aplicada en la forma tal y como se describe en este trabajo. La incubación la realizamos nosotros a 37° con lo que siendo mayor la temperatura el efecto inhibitor del HCCH debería ser mayor. También hemos rehusado el empleo del dioxano ya que como se ha dicho disminuye la actividad amilásica. Al repetir de este modo las experiencias bajo circunstancias tan distintas hemos creído obtener una mayor eficacia en los resultados obtenidos a fin de contribuir en un sentido u otro al esclarecimiento de tan importante problema.

Conclusiones

1.° — Al parecer el complejo amiloenzimático de la patata se comporta como la α -amilasa pancreática en las experiencias de FISCHER y BERNFELD frente al HCCH y la inosita.

2.° — La amilasa de patata no debe contener inosita en el grupo activo.

3.° — La actividad amilásica de la patata no se inhibe por el HCCH.

4.° — La inosita no ejerce ningún efecto ni acelera la actividad amilásica de la patata.

Resumen

Se practica la hidrólisis enzimática en presencia de las substancias indicadas, registrándose los resultados mediante la cromatografía en papel. Se

observa que el complejo amilo-enzimático de la patata se comporta como la alfa amilasa pancreática en presencia de tales substancias. La amilasa de patata no se inhibe por el hexaclorociclohexano, ni la inosita ejerce ningún efecto sobre aquélla. De acuerdo con los resultados obtenidos, la amilasa de patata no debe contener inosita en el grupo activo.

Summary

«STUDY OF THE AMILASE ACTIVITY OF THE POTATO IN THE PRESENCE OF INOSITE AND HEXACHLOROCYCLOHEXANE»

An effort has been made to clear up some discrepancies (12,7) on the behaviour of amilase activity in the presence of hexachlorocyclohexane (HCCH) and inosite.

Amilase was extracted from the potato by the Nielsen technique (17). A 2 % starch paste was prepared, the buffer solution (pH 7) being of phosphates M/15. Ascending chromatography was performed with Whatmann paper no. 1, with a mixture of ethyl-pyridine-water (2:1:2) acetate as solvent, developing the sugars with aniline phthallate and the starch with iodine 0'01 N. Inactivation of the enzyme on the paper was done with 0'01 M (CN) Hp.

HCCH and inosite were dissolved in the starch paste.

Incubation and chromatography were verified as in a previous publication (15).

The chromatograms reveal that the amilase activity of the potato is not inhibited by HCCH or by inosite. This confirms the results obtained by Fischer and Bernfeld with pancreatic amilase.

Potato amilase must not contain inosite in the active group.

The values of Rf obtained for maltose, glucose and inosite are 0'58, 0'63 and 0'29, respectively.

Bibliografía

- (1) BEALING, F. J. y BACON, J. S. D. : *Bioch. J.*, **2**, 227, 1953.
- (2) BERVOETS, W. P. : *Hydrobiología*, **4**, 214, 1952.
- (3) BUSTON, H. W., JACOBS, S. E. y GOLDSTEIN, A. : *Nature*, **158**, 22, 1946.
- (4) CHAIX, P. y LACROIX, L. : *Bioch. et Biophys. Acta.*, **2**, 86, 1948.
- (5) CHARGAFF, E., STEWART, R. N. y MAGASANIK : *Science*, **108**, 556, 1948.
- (6) DOBY y BURGÉ : *Fermentforschung*, **13**, 209, 1932.
- (7) FISCHER, E. H. y BERNFELD, P. : *Helv. Chim. Acta.*, **32**, 1946, 1949.
- (8) FROMAGEOT, C. y CONFINO, M. : *Bioch. et Biophys. Acta.*, **2**, 142, 1948.
- (9) KIRKWOOD, S. y PHILLIPS, P. H. : *J. Biol. Chem.*, **163**, 251, 1946.
- (10) KNIAGUINITCHEF, BOLKHOVITINA y MAKSAKOWA : *Biochimia.*, **1**, 116, 1955.
- (11) KÜHNNAU, J. : *Physiologie der Vitamine Lang Schoen. Die Ernährung.* Springer, 1952.
- (12) LANE, R. L. y WILLIAMS, R. J. : *Arch. Biochem.*, **19**, 329, 1948.
- (13) MEILLON, B. DE : *Nature*, **158**, 839, 1946.
- (14) MORENO CALVO, J. : *Anales de Bromatología*, **7**, 95, 1955 ; **7**, 107, 1955 ; otro (en prensa)

- (15) MORENO CALVO, J. y SANTOS RUIZ, A. : III Congr. Int. Bioch. Bruxelles, 1955.
- (16) MYRBACK, K., NEUMÜLLER, G. y SUMMER-MYRBACK, V. : *The Enzymes*. Vol. 1, I. 668. Academic Press. New York, 1950.
- (17) NIELSEN, J. P. : *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 15, 177, 1943.
- (18) NYBOM, N. y KUNSTSSON, B. : *Hereditas*, 33, 220, 1947.
- (19) POSTERNAK, T. y SCHOFFER, W. H. : III Congreso Int. Bioquímica, Bruselas, 1955.
- (20) RAKE, G. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 67, 249, 1948.
- (21) RHYMER, I., WALLACE, G. I., BYERS, L. W. y CARTER, H. E. : *J. Biol. Chem.*, 169, 457, 1947.
- (22) SCHOFFER, W. H., POSTERNAK, T. y BOSS, M. L. : *Schweiz. Z. Path. und Bakt.*, 10, 443, 1947.
- (23) SLADE, R. E. : *Chem. Ind.*, 64, 314, 1945.
- (24) VOTEN, G. W. VAN, KRNISSINK C. A., STRIJK, B. y BIJVOET, J. M. : *Nature*, 162, 771, 1948.
- (25) WILLIAMS, R. J., EAKIN, R. E., BEERSTOCHER, E. y SHIVEE, W. : *The Biochemistry of B Vitamins*. Reinhold, New York, 1950.