

Departamento de Bioquímica del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Farmacia
Madrid

Hormonas en crustáceos *

por

Pedro Marcos Gallego y M.^a Dolores Stamm Menéndez

En un trabajo anterior (1) uno de nosotros consiguió aislar las dos hormonas que regulan la metamorfosis de los insectos α y β -ecdisona en el ortóptero *Doclostaurus maroccanus* y anteriormente (2 y 3) en los imagos del lepidóptero *Bombyx mori*. Ambas hormonas fueron aisladas por primera vez por BUTENANDT y KARLSON (4 y 5) de un extracto de crisálidas de este último insecto en el año 1954.

Al año siguiente e inducido por las investigaciones de GABE (6) y de sus colaboradores ARVY y ECHALIER comprobó KARLSON que los extractos del crustáceo *Crangon vulgaris* fraccionados por el método empleado en el aislamiento de hormonas de insectos, resultaban activos cuando se valoraban mediante el test *Calliphora*, es decir, en el extracto de crustáceos existen sustancias capaces de transformar en pupas las larvas de *Calliphora*.

Partiendo de estos hechos, hemos pretendido aislar de un extracto del crustáceo *Astacus Pallipes*, las sustancias responsables de esta actividad biológica. Como resultado de nuestro trabajo hemos conseguido obtener en forma cristalina una sustancia débilmente activa.

El material de partida fue 10 Kg. del cangrejo de río *Astacus Pallipes* los cuales se conservaron en metanol. Los ex-

* Comunicación 4-21 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo 1959.

tractos metanólicos obtenidos después de una purificación previa se valoraron biológicamente, comprobándose que eran activos.

La extracción del material de partida, así como la purificación de los extractos obtenidos fundándose en la solubilidad de las impurezas en éter y acetato de etilo, fue realizada de la misma manera indicada en el trabajo de BUTENANDT y KARLSON (4). Las últimas purificaciones se realizaron por cromatografía sobre columna de óxido aluminico y por distribución contracorriente.

En el curso de nuestras experiencias hemos obtenido 13 mg. de una sustancia cristalizada, la cual en el microscopio con platina calentable de Kofler con calefacción rápida, experimenta entre 118 y 121° una modificación, posiblemente pérdida del agua de cristalización, recrystaliza después al enfriar y finalmente funde entre 155 y 160°. El espectro infrarrojo que ha sido determinado por el Profesor Barceló del Instituto de Optica «Daza de Valdés» indica una fuerte banda de absorción en la región de 1700 K. seguramente debida a la presencia en la molécula de uno o varios grupos C-O. En la región de los 3000 K. no aparece absorción manifiesta, lo que hace suponer ausencia de grupos metilo. En la región correspondiente al grupo OH (stretching) aparece una banda ancha que posiblemente se debe a grupos OH asociados (enlace de hidrógeno). El espectro ultravioleta muestra un descenso brusco a partir de 210 m μ en etanol y no aparece ningún máximo; en etanol-ClH sigue una marcha semejante y en etanol-NaOH presenta un máximo muy poco pronunciado en el límite de la zona ultravioleta y visible.

En la cromatografía de papel en el sistema agua saturada de butanol/agua, presenta un R_f de 0,85 y el eluato obtenido de la mancha muestra una actividad biológica determinada mediante el test Calliphora del 40 % para una dosis de 2 γ . Como no nos ha sido posible valorar su actividad sobre crustáceos, ignoramos si la sustancia aislada por nosotros del *Astacus Pallipes*, es idéntica a la hormona de mudas de crustáceos ya que además KARLSON (7) en el trabajo que hace referencia a ella, se limita a decir solamente que es mucho más polar y mucho menos activa en el test Calliphora que las hormonas de metamorfosis de insectos α y β -ecdisona.

Parte experimental

El material conservado en metanol constituido por 10 Kg del crustáceo *Astacus Pallipes*, fue triturado convenientemente; se

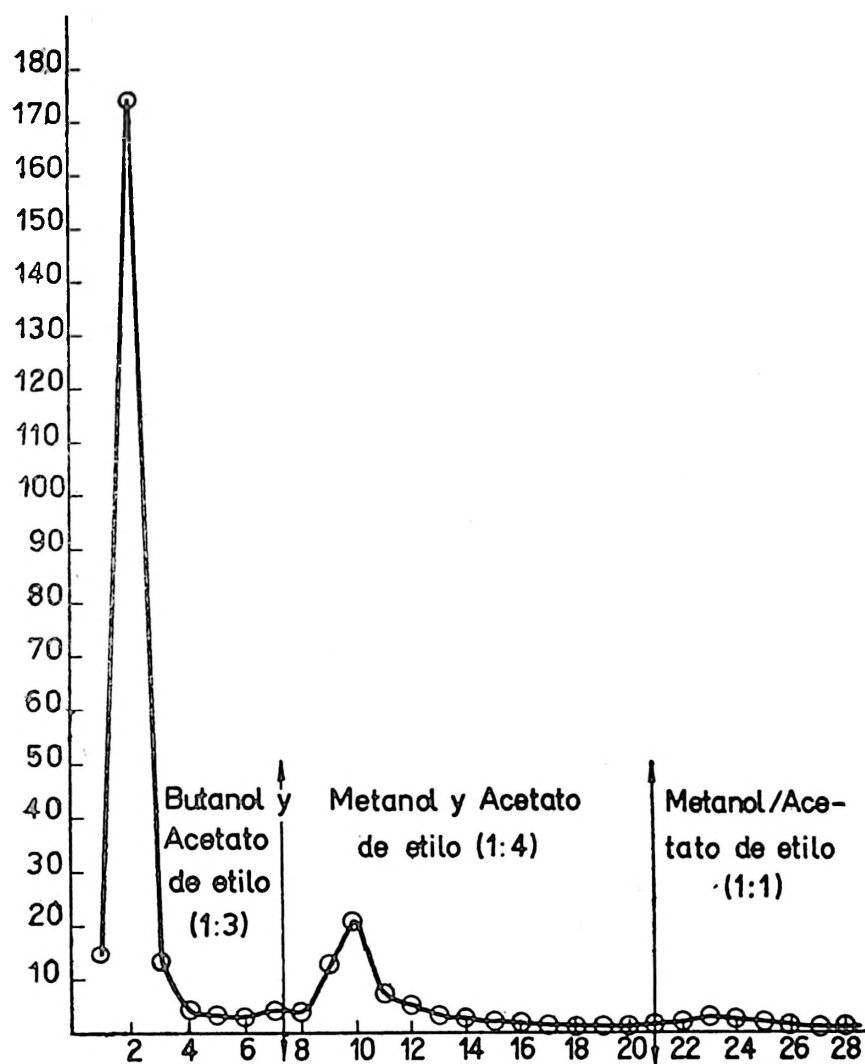


Figura 1

filtró la suspensión obtenida y se evaporó al vacío la solución metanólica obteniéndose así 500 gr. de extracto.

200 gr. de dicho extracto fueron tratados con 4 veces su peso de agua y la solución acuosa fue extraída con butanol. La capa butanólica después de lavar como se indica en el trabajo de BUTENANDT y KARLSON (4) se evaporó a sequedad obteniéndose un aceite de color marrón, el cual fue filtrado por columna de óxido aluminico y las dos zonas que aparecen en la columna se

eluyeron con butanol y metanol, respectivamente. El eluato butanólico (13, 5 gr.) se distribuyó entre agua/éter y acetato de etilo/agua, obteniéndose, después de evaporar, 0,4721 gr. de un aceite que en la valoración biológica presentó actividad.

1.^a — CROMATOGRAFÍA FRACCIONADA DEL CONCENTRADO ACTIVO

Los 0,4721 gr. de concentrado se cromatografiaron a través de óxido aluminico de actividad 4, según BROCKMAN y SCHODDEN (9) y se recogieron fraccionadamente los eluatos, utilizando como eluyentes :

Butanol-Acetato de etilo (1 :3).	. . .	Fracciones 1-7
Metanol-Acetato de etilo (1 :4).	. . .	» 8-21
Metanol-Acetato de etilo (1 :1).	. . .	» 22-29

La representación gráfica de esta cromatografía se indica en la figura 1.

Seguidamente se valoró mediante el test *Calliphora* la actividad biológica de algunas de las fracciones de la curva. La fracción 3 a la dosis de 7 γ presentó una actividad del 25 % y la 11 para 14 γ , 10 % de actividad.

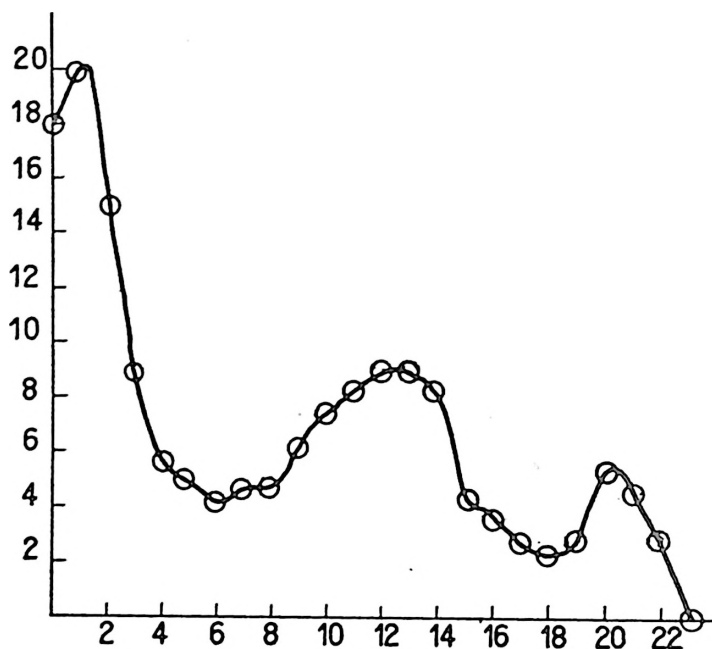


Figura 2

2.^a — DISTRIBUCIÓN EN CONTRACORRIENTE

Los 173 mg de la fracción segunda de la cromatografía anterior se sometieron a una distribución en contracorriente según CRAIG en el sistema :cicloexano :butanol :agua (6 :4 :10). La relación de volúmenes entre ambas fases superior e inferior fue 1/1 y se realizó en 24 etapas. La curva de distribución se representa en la figura 2. La fracción 1.^a de dicha distribución estaba cristalizada. La fracción 3.^a se cromatografió sobre papel Whatman n.º 1 en el sistema agua saturada de butanol/agua, obteniéndose una mancha de $R_f = 0,82$, la cual después de eluida presentó una actividad biológica del 34 % para una dosis de 2 γ .

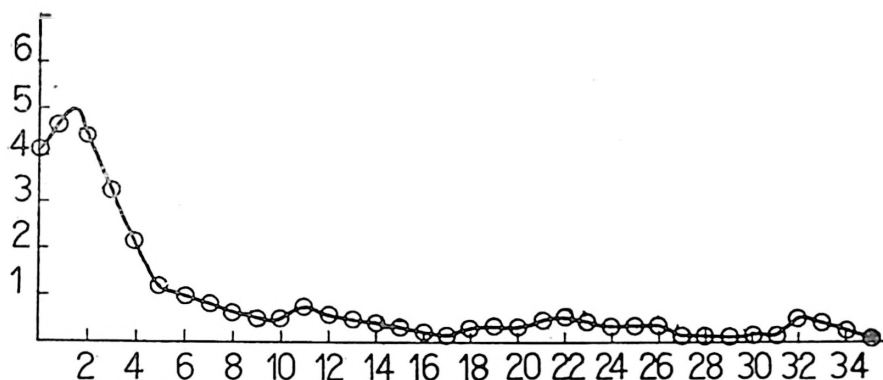


Figura 3

3.^a — DISTRIBUCIÓN EN CONTRACORRIENTE

Para purificar aún más los cristales contenidos en la fracción 1.^a de la distribución anterior (20 mg.), se distribuyeron nuevamente en el mismo sistema empleado anteriormente. La relación de volúmenes entre ambas fases superior e inferior fue también de 1/1, pero ésta se realizó en 36 etapas. La curva de distribución se representa en la figura 3. Los cristales contenidos en las tres primeras fracciones sufren en el microscopio con platina calentable de Kofler la transformación que ya indicamos entre 118 y 121°, recrystalizan al enfriar y funden después entre 155 y 160°. El análisis elemental de los mismos dio un 48,7 % de C y un 6,95 % de H. El espectro infrarrojo se registró desde 4000 a 6000 K. La muestra fue preparada según el método de la pastilla de bromuro potásico a la concentración del 0,4 %. Para la determinación del espectro ultravioleta se utilizaron tres soluciones : en etanol, en etanol-ClH 0,1N (1 :1) y en etanol-NaOH 0,1N (1 :1).

Resumen

Aplicando la técnica de extracción de hormonas de insectos de BUTENANDT y KARLSON a un extracto del crustáceo *Actacus Pallipes*, se han obtenido sustancias activas al «test Calliphora».

Summary

Hormones of crustacea

Applying Butenandt's and Karlson's technique for the extraction of hormones from insects to an extract from the crustaceous *Astacus Pallipes*, substances which are active to the «Calliphora test» have been obtained.

Bibliografía

- (1) STAMM, M.^a D. : *Anal. Fis. Quím. B.*, **55** (B), 171, 1959.
- (2) KARLSON, P. y STAMM, M.^a D. : *Hoppe-Seyler's physiol. Chem.*, **306**, 109, 1956.
- (3) KARLSON, P. y STAMM, M.^a D. : *Anal. Fis. Quím. B.* **53** (B), 243, 1957.
- (4) BUTENANDT, A. y KARLSON, F. : *Z. Naturforschg*, **9b**, 389, 1954.
- (5) KARLSON, P. : *Vitamins and Hormones*, **14**, 227, 1956.
- (6) GABE, M. : *C. R. Acad. Sci.* **4**, 237, 1953 ; *Bull. Soc. Fr.* **79**, 166, 1954.
- (7) KARLSON, P. y HANSER, G. : *Z. Naturforsch.* **7b**, 80, 1952.
- (8) KARLSON, P. : *Symposium XII núm. 9, IV Congreso Internacional de Bioquímica*. Viena, 1958.
- (9) BROCKMANN, H. y SCHODDER, B. : *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **74**, 73, 1942.