

Laboratorio de Bioquímica.
Facultad de Farmacia. — Madrid

Estudios sobre bioquímica de insectos

VIII. Derivados quinónicos de la cutícula de pupas de *Calliphora erythrocephala*

por

M. Sapag-Hagar, M.ª P. González-González y M.ª D. Stamm-Menéndez

(Recibido para publicar el 3 de mayo de 1961)

Desde que Wigglesworth sugirió que la cutícula de los insectos tiene mucha materia viva, se hace cada vez más evidente que ésta debe ser estudiada con detenimiento. Algunos trabajos publicados nos dan a conocer (1, 2, 3) los estudios realizados anteriormente.

Dada la importancia que tiene el conocimiento de la composición de la cutícula y siendo la *Calliphora erythrocephala* el insecto actualmente utilizado para la valoración de hormonas de invertebrados hemos querido aportar algunos datos más con el fin de contribuir a esclarecer estos conocimientos.

En el presente trabajo hacemos un estudio cromatográfico de algunos derivados quinónicos y dihidroxifenólicos de la cutícula.

Material y métodos

1. Recogida de muestras

Una vez que las larvas de *Calliphora erythrocephala* Meigg (familia taquínidos, suborden ciclorrafos, orden dípteros) se separan de la carne y se comprueba que no contienen nada de

aquella sin digerir, se lavan repetidamente con agua y se mantienen en recipientes de cristal a unos 20° C hasta que pasan a pupas y a imagos ; entonces se recolectan cuidadosamente las cutículas, se limpian y pulverizan en morteros de cristal y éste es el material utilizado para los estudios posteriores.

2. Preparación del material

Se desecó y se extrajo con etanol absoluto, en caliente, en Soxhlet durante seis horas y a continuación se concentró al vacío hasta pequeño volumen.

3. Determinación cualitativa de derivados quinónicos

Se hizo mediante técnicas cromatográficas unidimensionales utilizando papel Whatman n.º 1 y papel Whatman n.º 1 silicatado preparado siguiendo la técnica de Roberts (4).

a) Solventes

Se utilizó el sistema benceno-ácido acético-agua (125 :72 :3) y el sistema butanol-etanol-agua (4 :1 :1). Los solventes fenólicos que han demostrado ser tan valiosos para la cromatografía de muchas otras familias de compuestos, no son utilizados aquí, ya que los «Rf» son casi todos superiores a 0,70 y, además, el fenol reacciona con muchos de los reactivos utilizados para localizar los ácidos fenólicos.

b) Soluciones tipo

Sólo pudimos disponer de los siguientes compuestos, químicamente puros, pirocatecol, p-quinona, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxifenil-acético y 4-metilcatecol. Las soluciones se hicieron al 1 % en etanol de 95°.

c) Reactivos de localización

Se utilizan los reactivos siguientes (5) :

— Reactivo de Pauly, éste es particularmente útil porque muchos ácidos fenólicos dan coloraciones intensas y características.

— Reactivo de nitrato de plata.

— Reactivo de cloruro férrico ; con éste el ácido fenil-pirúvico da una mancha verde característica.

Para el análisis se utilizaron los extractos alcohólicos de los cuales se aplicó alrededor de 40 µl, con un diámetro en el papel no superior a 0,5 cm y de las soluciones tipo se aplicó

5 μ l de cada una. Los papeles así preparados se dejaron en la cámara 4 horas en saturación antes de sumergirlos en la fase móvil del sistema butanol-etanol-agua o del benceno-ácido acético-agua.

Resultados

Sistemas de solventes. — El sistema butanol-etanol-agua (4:1:1) se mostró muy superior al constituido por benceno-ácido acético-agua (125:72:3), tanto en rapidez como en poder de separación de los compuestos estudiados. Por ello los resultados que se exponen sólo se refieren al sistema butanol-etanol-agua, que es el que utilizamos para los ensayos correspondientes.

Reactivos de localización. — Los más eficaces resultaron ser el de Pauly y el de FeCl_3 . Con el de AgNO_3 se dificulta un tanto la interpretación, especialmente por la precipitación del AgNO_3 con la acetona.

Papel utilizado. — El papel Whatman n.º 1 silicatado mostró varias ventajas con respecto al sin silicar :

a) Las manchas de varios de los compuestos estudiados aparecen, aunque débilmente, sin necesidad de aplicar los reactivos de localización, debido a la adsorción en la sílice.

b) Al revelar con reactivo de Pauly la nitidez crece gradualmente.

c) Los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético y 3,4-dihidroxibenzoico se distancian mucho más de la quinona y el 4-metilcatecol, en el papel silicatado que en el sin silicar, lo cual permite una mejor y más fácil interpretación de los cromatogramas.

Una diferencia notable entre ambos tipos de papel es que en el sin silicar los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético y 3,4-dihidroxibenzoico se desplazan mucho más que en el papel silicatado, como lo demuestran los R_f obtenidos y representados en el siguiente cuadro :

	R_f	
	Papel sin silic.	Papel silic.
Ac. 3,4-dihidroxifenilacético	0,580	0,209
Ac. 3,4-dihidroxibenzoico	0,688	0,123

El ascenso del solvente es más lento en el papel silicatado, llegando el frente a 19 cm en 24 horas y a 33 cm en el sin silicar. La quinona, el 4-metilcatecol y el pirocatecol no se sepa-

ran entre sí más en el papel silicatado que en el sin silicatar y sus Rf se mantienen.

Compuestos hallados. — Se encontraron, con gran nitidez, los compuestos siguientes: p-quinona, 4-metilcatecol y ácido 3,4-dihidroxibenzoico.

Con el revelador del FeCl₃, se observó también una mancha verde intensa (Rf = 0,913) que podría ser el ácido fenilpirúvico o el derivado 3,4-dihidroxiado de éste. No fue posible su caracterización exacta por no disponer de solución tipo para calcular el Rf en el sistema utilizado.

Discusión

El estudio cromatográfico de los derivados quinónicos y dihidroxifenólicos de la cutícula, reveló con seguridad la presencia de p-quinona, 4-metilcatecol y ácido 3,4-dihidroxibenzoico.

Los trabajos recientes de MALEK (6) en la *Schistocerca gregaria* indujeron a este autor a afirmar que la exocutícula del insecto mencionado difiere marcadamente de la exocutícula ámbar de otros insectos, ya que en ella no son las p-quinonas, como sostiene DENNELL (7), las responsables del endurecimiento de la exocutícula, sino las ortoquinonas derivadas del catecol. MALEK identificó 4-metilcatecol (homocatecol) en las cutículas de *Schistocerca gregaria*, y DENNELL, por otra parte, estudiando la hidroxilación no específica de los aminoácidos aromáticos por la cutícula de la *Calliphora vomitoria* (3), halló hidroquinona y catecol. Nuestro hallazgo de p-quinona y homocatecol en la cutícula de la *Calliphora eritrocephala* tiende a confirmar que tanto la quinona en posición para como en orto pueden intervenir en el proceso de endurecimiento de la cutícula y que el 4-metilcatecol, no hallado antes en otros insectos, excepto por MALEK en la *Schistocerca gregaria*, existe en las cutículas de la *Calliphora* y debe desempeñar un papel importante en el proceso por el cual se endurece la cutícula.

Nuestra identificación del ácido 3-4-dihidroxibenzoico (ácido protocatéquico) confirmaría la suposición de DENNELL (8) de que la 3,4-dihidroxifenilalanina (dopa) formada en la sangre no sólo puede ser oxidada directamente para formar melanina, sino que también puede ser degradada para formar ácido protocatéquico que interviene en la reacción de endurecimiento.

La presencia de hidroxifenoles desaminados en la cutícula de la larva debe, pues, ser considerada como importante en el estudio del proceso de formación de la pupa.

Utilizando el sistema butanol-etanol-agua como fase móvil y el cloruro férrico como revelador, se observó la presencia de

un derivado con $R_f = 0,913$ que produce una mancha verde intensa con el revelador indicado, y que no fue posible identificar con seguridad.

El empleo de papel silicatado y el sistema butanol-etanol-agua mostraron varias ventajas para la separación de los compuestos fenólicos y quinónicos.

Conclusiones

1. En las cutículas se halló p-quinona, 4-metilcatecol y ácido 3,4-dihidroxibenzoico, además de un derivado no identificado. Esto confirma que las quinonas en posición «para» intervienen en las reacciones de endurecimiento de la cutícula y que el 4-metilcatecol, identificado hasta ahora sólo en la *Schitocerca gregaria*, interviene también en dicha reacción en la *Calliphora eritrocephala*.

2. La identificación del ácido 3,4-dihidroxibenzoico en las cutículas confirma la suposición de que la 3,4-dihidroxifenilalanina formada en la sangre no sólo puede sufrir una oxidación hasta melanina, sino que también puede ser degradada hasta ácido protocatéuico que interviene en la reacción de endurecimiento. La presencia de dihidroxifenoles desaminados en la cutícula de la larva debe, pues, ser considerada como importante en el estudio de la formación de la cutícula y de la pupación.

Resumen

Se hace un estudio cromatográfico de los derivados quinónicos de la cutícula del díptero «*Calliphora eritrocephala*» empleando papel silicatado y sin silicatar, así como distintos reveladores. Los compuestos quinónicos encontrados fueron: 4-metilcatecol, p-quinona y ácido 3,4-dihidroxibenzoico, además de otro no identificado y que puede ser el ácido fenilpirúvico o el derivado 3,4-dihidroxilado de éste.

Agradecemos al Prof. Dr. A. Santos Ruiz, Director del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica, por las facilidades y ayuda prestadas para la realización de este trabajo, y a la Dirección General de Relaciones Culturales de España por la beca concedida a uno de nosotros (M. Sapag).

Summary

Quinone derivatives in the cuticle of the pupae of *Calliphora eritrocephala*

We carry out the chromatographic study of the quinone derivatives from the cuticle of the Dipter *Calliphora eritroce-*

phala by using silicated and non-silicated paper, as well as different developers. The quinone compounds we found were: 4-methyl-cathecol, p-quinone, and 3,4-dihydroxybenzoic acid; another more was not yet identified and it could be phenylpyruvic acid or its 3,4-dihydroxylated derivative.

Bibliografía

- (1) FRAENKEL, G., y RUDALL, K. M.: *Proc. Roy. Soc. B.*, **134**, 111, 1947.
- (2) DENNELL, R.: *Proc. Roy. Soc.*, **148**, 270, 1958.
- (3) DENNELL, R.: *Nature*, **180**, 1070, 1957.
- (4) ROBERTS, J. B.: *Nature*, **181**, 338, 1958.
- (5) SMITH, IVOR (Editors): *Chromatographic Techniques*, William Heinemann, Medical Books, Ltd., London 1958.
- (6) MALEK, S. R. A.: *Nature*, **185**, 56, 1960.
- (7) DENNELL, R.: *Proc. Roy. Soc. B.*, **148**, 176, 1958.
- (8) DENNELL, R.: «The Hardening of Insect. Cuticles», *Biological Reviews*, **33**, 178, 1958.