

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

## Estudio sobre bioquímica de insectos

### X. Datos sobre el metabolismo protídico en la metamorfosis de la *Calliphora erythrocephala*

por

M. Sapag-Hagar y M.<sup>a</sup> D. Stamm-Menéndez

---

(Recibido para publicar el 14 de junio de 1961)

En trabajos anteriores (31, 32, 33 y 34) se estudió el metabolismo de aminoácidos aromáticos en algunos lepidópteros, coleópteros, hemípteros y ortópteros. En la actualidad se ha querido ampliar estos estudios al díptero *Calliphora erythrocephala*, dada la importancia que ha adquirido este insecto en los estudios de valoración de hormonas de invertebrados y por estar además los fenómenos de pigmentación y formación de la cutícula, sujetos a procesos hormonales en los que intervienen los aminoácidos fenilalanina, tirosina (formación de melaninas y derivados dihidroxifenólicos fundamentales en el endurecimiento de la cutícula) y triptófano (formación de omocromos).

Se estudian además por el método de microkjeldahl y el fotocolorimétrico de Lowry las proteínas totales en las diferentes etapas de la metamorfosis, y se analizan por electroforesis sobre papel las variaciones de las fracciones proteicas, revelándose la presencia de dos fracciones que se conservan a través de todo el desarrollo, pero cuyas fluctuaciones son características en cada etapa y sugieren la influencia de actividades básicas de crecimiento.

Los estudios electroforéticos de fracciones proteicas en insectos son escasos. La mayoría están representados por el aná-

lisis de una sola etapa de la metamorfosis y las más de las veces es la hemolinfa el principal fluido estudiado.

WUNDERLY y CLOOR (40) determinaron electroforéticamente, sobre papel, el punto isoeléctrico de la proteína sanguínea de la larva de *Drosophila hidei*, así como el curso cronológico de la coagulación de dicha proteína, y su dependencia de la temperatura.

DENUCÉ y RABAEY (10) han separado, por electroforesis sobre papel y por microelectroforesis sobre agar, los componentes proteicos de la hemolinfa de algunas larvas de insectos (*Galleria*, *Macrothylacia*, *Tenebrio* y otros). PO-CHEDLEY (25), ha realizado recientemente un estudio de las variaciones de los componentes proteicos en el *Tenebrio molitor*, durante su desarrollo.

### Material y métodos

#### 1. Recogida de muestras.

Se utilizaron los huevos, larvas, pupas, imagos y cutículas pupales de la *Calliphora erythrocephala*, Meigg (Familia taquíidos, suborden ciclorrafos, orden dípteros).

#### 2. Preparación del material.

a) Se desecó previamente, determinando los pesos promedios de los individuos en cada fase.

b) Para las determinaciones electroforéticas se hicieron homogenados utilizando el homogeneizador de POOTER-ELVHJEM (24), empleando 100 mg de sustancia y 1 ml de agua destilada para los huevos y 500 mg y 2 ml de agua para las larvas, pupas y adultos. Todos los homogenados se centrifugaron a 1200 R.P.M. durante 1 hora, utilizando para la electroforesis los líquidos sobrenadantes. En el caso de las pupas se analizaron pupas recientes de 5 horas y pupas de cerca de una semana.

#### 3. Determinación global de proteidos.

Se llevó a cabo mediante el método microkjeldhal de PARNAS-WAGNER (22) por arrastre de vapor con las modificaciones propuestas por SHEPARD y JACOBS (28) y utilizando una mezcla catalítica ideada por nosotros (26). Paralelamente se comprobaron dichas determinaciones con el método de LOWRY (19).

#### 4. *Determinación de fracciones proteicas por electroforesis sobre papel.*

Para la electroforesis utilizamos un aparato Jouan y papel Arches 804. Empleándose 30  $\mu$ l del sobrenadante obtenido, como ya se indicó anteriormente, y 40  $\mu$ l para los huevos. Voltaje: 400 voltios; tiempo: 3 horas; distancia: 16 centímetros del cátodo; Buffer: tampón glicina, pH 10,5. Este tampón de glicina permite determinar también al ultravioleta las proteínas no modificadas. Se preparó siguiendo las normas de MILLER y GOLDBER (21), modificándolo para obtener una fuerza iónica de 0,05. La fórmula en cuestión quedó como sigue:

37,5 ml de NaCl 1M  
11,6 ml de una solución 1M de glicina-1M NaCl  
4,2 ml NaOH 2H  
Agua destilada c.s.p. 1 litro.

Las proteínas se fijaron por el calor a una temperatura de 80-100° durante 5-10'. Como revelador se usó el azul de bromofenol (13).

El fraccionamiento y trazado de curvas se realizó por el procedimiento de lectura directa (14) en el aparato Jouan.

Se obtuvieron también diagramas electroforéticos a otros pH diferentes de 10,5, pero la determinación del punto isoeléctrico de una de las fracciones nos indicó que era más conveniente trabajar en la zona alcalina, a un pH superior al del punto isoeléctrico, ya que de este modo las proteínas se cargan negativamente, y entonces no son tan enérgicamente adsorbidas por el papel (15, 16).

#### 5. *Determinación del punto isoeléctrico de la fracción 1.*

De las dos fracciones proteicas, que nítidamente se separaron, se determinó, aproximadamente, el punto isoeléctrico (pHi) de la de peso molecular más bajo, o sea, la que migró más (fracción 1). Se hizo la determinación buscando el pH de movilidad nula. Se ensayaron los siguiente pH: 5,0; 7,0; 8,0; 8,5; 9,0; 10,5 y 12,0. Los tampones correspondientes se prepararon según MILLER y GOLDBER (21), pero modificándolos para darles una fuerza iónica aproximadamente de 0,05.

Todos los tampones se controlaron con el potenciómetro «Radiometer-22».

#### 6. *Determinación de fracciones lipoproteicas*

Se siguió, exactamente, todo el procedimiento indicado anteriormente hasta el momento de la fijación. Como fijador de las lipoproteínas y proteínas totales se utilizó la solución de etanol al 30 % saturado con sulfato de cinc, introducida por D. CASTRO (5), que capacita para una buena tinción. Como solución colorante de tinción se usó el negro Sudán B Merck al 1 por mil en etanol al 60 %. Las bandas, ya fijadas, se mantienen en esta solución durante 1 hora; se pasan luego, 10 minutos cada vez, por dos baños de lavado con etanol al 50 %. Se siguió la técnica original descrita por CASTRO, que permite disminuir el tiempo de inmersión de las bandas en el baño colorante a un tercio de la mejor técnica conocida hasta hoy, que es la de SWAEN (35).

#### 7. *Hidrólisis proteídica*

A fin de conseguir menores pérdidas en la determinación de los aminoácidos aromáticos utilizamos la hidrólisis alcalina siguiendo la técnica de MILLON-LUGG, modificada por BLOCK y BOLLING (1) utilizando 2 ml de NaOH 5N por cada 100 mg de sustancia seca.

#### 8. *Determinación cuantitativa de aminoácidos aromáticos*

Las determinaciones se realizaron en cada caso por triplicado.

##### a) *Fenilalanina*

Se utilizó la técnica de BLOCK y BOLLING adaptada al método de KAPPELLER-ADLER-KUHN (1) tomando 3 ml de hidrolizado alcalino en cada determinación.

##### b) *Tirosina*

El procedimiento seguido fue la técnica de MILLON-LUGG, modificada por BLOCK y BOLLING (1) tomando 2 ml del hidrolizado alcalino (excepto en las cutículas en que se tomaron 3 ml) en cada determinación.

##### c) *Triptófano*

Se siguió el método de SPIES y CHAMBERS (30), utilizando 0,5 ml de hidrolizado para cada determinación.

d) *Tirosina y triptófano en huevos*

Dada la pequeña cantidad de material de que se disponía se realizó la determinación simultánea de estos dos aminoácidos por absorción al ultravioleta, valiéndonos del espectrofotómetro Beckman D. U. Se preparó un homogenado de huevos al 0,1 % en NaOH 0,1N, utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem. Conforme a las investigaciones de HOLADY (12 y 13) se hicieron las lecturas de extinción a 280 ( $E_{280}$ ) y 305 ( $E_{305}$ )  $m\mu$ .

La concentración molar de tirosina y triptófano se calculó mediante las siguientes ecuaciones propuestas por el autor citado:

$$M \text{ tirosina} = (1,0 E_{305} - 0,092 E_{280}) 10^{-3}$$

$$M \text{ triptófano} = (0,21 E_{280} - 0,288 E_{305}) 10^{-3}$$

donde M son los moles por litro y E la extinción. Cuando las soluciones son muy coloreadas no es aplicable la técnica indicada y por ello su aplicación se circunscribió a los huevos.

## Resultados

a) *Proteidos totales*

Los resultados obtenidos se resumen en los cuadros siguientes, siendo los valores consignados en ellos, la media de las tres determinaciones realizadas en cada caso.

CUADRO I

*Proteidos por el método de Kjeldahl*

	Mg./unidad	%	
		en sust. fresca	en sust. seca
Larvas	14,25	15,60	56,60
Pupas	11,30	15,50	52,20
Imagos	8,76	17,70	41,50
Cutículas	1,76	58,63	64,21

CUADRO II

*Proteidos por el método de Lowry*

	Mg./unidad	%	
		en sust. fresca	en sust. seca
Huevos	0,03465	21,20	31,90
Larvas	13,88	15,20	55,20
Pupas	9,84	13,50	45,04
Imagos	8,36	16,90	39,60

## CUADRO III

(Cuadro comparativo)

*Proteidos por los métodos de Lowry y Kjeldahl*

	% en sustancia seca		% de diferencia
	Lowry	Kjeldahl	
Larvas	55,20	46,60	1,40
Pupas	45,04	52,20	7,16
Imagos	39,60	41,50	1,90

b) *Fracciones proteicas identificadas por electroforesis*

Trabajando en las condiciones señaladas logramos identificar 2 fracciones perfectamente definidas. La más rápida (fracción I) alcanza buena resolución entre los 4 y 5,5 cm. del punto de aplicación. La fracción más lenta (fracción II), se presenta también como una banda definida entre 0 y 1,5 cm. a partir del punto de origen.

## CUADRO IV

	% relativos de las fracciones electroforéticas	
	Fracción I	Fracción II
Huevos	40	60
Larvas	63,2	36,8
Pupas	5 horas	46,2
	1 semana	54,5
Imagos	48	52

c) *Determinación del punto isoeléctrico de la fracción I*

## CUADRO V

pH	Movilidad
5,0	+
7,0	+
8,0	+
8,5	escasa
8,6	escasa
9,0	escasa
9,5	+
10,5	+
12,0	+

d) *Determinación de fracciones lipoproteicas*

Se obtuvieron sólo indicios de la presencia de lipoproteínas en la fracción I de huevos y larvas.

e) *Determinación simultánea de tirosina y triptófano en huevos: Extinciones al ultravioleta*

CUADRO VI

(m $\mu$ )	Extinción (Beckman DU) (Promedio de 3 determinaciones)
280	1,175
305	0,625

f) *Fenilalanina, tirosina y triptófano por unidad y por 100 g de sustancia seca*

CUADRO VII

	Fenilalanina		Tirosina		Triptófano	
	Mg./unidad	%	Mg./unidad	%	Mg./unidad	%
Huevos	—	—	0,0155	14,27	0,00204	1,89
Larvas	1,050	4,13	1,460	5,76	0,177	0,70
Pupas	1,062	4,92	0,870	4,02	0,130	0,60
Imagos	0,950	4,50	0,885	4,20	0,137	0,65
Cutículas	0,066	2,42	0,052	1,90	0,0066	0,24

g) *Fenilalanina, tirosina y triptófano por 100 g de productos*

CUADRO VIII

	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano
Larvas	7,37	10,25	1,24
Pupas	9,40	7,70	1,15
Imagos	10,85	10,10	1,565
Cutículas	3,75	2,96	0,375

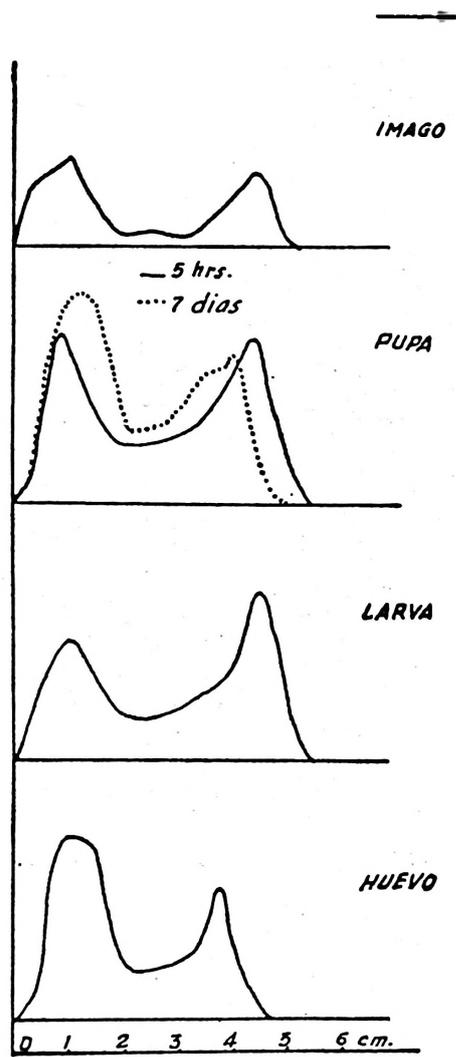


Figura 1

### Discusión

Los prótidos muestran un aumento notable desde la fase de huevo a larva y luego un descenso continuo desde la larva al imago como puede verse claramente en los cuadros I, II y III.

El cuadro III muestra la semejanza de resultados obtenidos por los dos métodos empleados, para las larvas o imagos, lo que permite asegurar la comparación con los valores obtenidos en los huevos, en los que sólo se aplicó el método de LOWRY. En las pupas, en cambio, es indispensable utilizar únicamente el método de KJELDAHL en la obtención del valor de proteidos totales, ya que la diferencia entre ambos métodos es del 7,16 %, hecho que se explica por la elevada insolubilidad de la cutícula (justamente la diferencia es por defecto), además de las posibles interferencias de sus componentes en el método de LOWRY.

El paso de huevo a larva representa un aumento de 24,70 % en los prótidos de la sustancia seca, es decir, casi en una cuarta parte. A continuación, de larva a pupa, se produce un descenso de 56,60 % a 52,20 % en la sustancia seca, es decir, una pérdida del orden del 7,77 % del valor en la larva. La transformación de pupa en imago significa un descenso mayor que el anterior, que alcanza 21,20 % de los prótidos de las pupas; justamente es tres veces mayor la disminución de pupa a imago que de larva a pupa. El porcentaje de descenso total en los prótidos en sustancia seca, desde la fase de larva a la de imago es de un 26,60 %.

Analizado desde otro punto de vista, cual es el de los miligramos de prótidos que se pierden por individuo al pasar de una fase a otra, se tiene que cada larva pierde al transformarse en pupa 2,95 mg de prótidos, lo que traducido en calorías pequeñas (4 calorías por mg de prótidos) significa 11,80 calorías. El paso de pupa a imago representa una pérdida de 2,54 mg de prótidos por individuo, es decir, 8,88 calorías.

El 64,21 % de la cutícula seca está constituido por prótidos, lo que significa el 58,63 % de la cutícula como tal y 1,76 mg de prótidos por cutícula de 3 mg, es decir, más de la mitad de la cutícula. Proyectando hacia la pupa total ello representa el 15,60 % de los prótidos totales de dicho estado, indicando que los prótidos son los componentes de la pupa que más se concentran en la cutícula en comparación a la pupa total.

La figura 1 muestra los diagramas electroforéticos obtenidos en los diferentes estados del desarrollo de la *C. erythrocephala*, y el cuadro IV los porcentajes relativos de las dos fracciones electroforéticas que se lograron separar en las 4 fases de la metamorfosis. Dichas fracciones no son comparables a las de la sangre de vertebrados y cremos, al igual que DENUCÉ y

RABAEY (10), que la primitiva clasificación de las proteínas de los insectos en albúminas y globulinas, debe ser modificada. Las fracciones electroforéticas obtenidas por nosotros son análogas a las dos conseguidas por PO-CHEDLEY (25) en el *Tenebrio molitor*, pero sus fluctuaciones a través del desarrollo son diferentes. No existen trabajos electroforéticos sobre la *Calliphora*, por lo que no nos es posible hacer comparaciones directas. La fracción lenta, que es más o menos uniforme en las cuatro etapas del *Tenebrio*, lo es en menor grado en la *Calliphora*. En el *T. molitor* esta fracción decrece en cada fase a medida que se progresa hacia la madurez. En nuestro caso sólo hay un descenso, y apreciable, al pasar de huevo a larva para luego subir al formarse la pupa. En este estado se observa un aumento de la fracción en cuestión en la pupa de una semana, con respecto a la de 5 horas. El paso a imago se traduce en un discreto descenso de esta fracción lenta. En cambio, en la fracción más rápida se nota un descenso de larva a pupa, y en el paso de pupa a imago, prácticamente, permanece estacionario el porcentaje de dicha fracción o aumenta muy poco. Se observa que en la fase de pupa hay un predominio, cuantitativamente hablando, de la fracción más rápida con respecto a la lenta, pero ello sólo en la larva que acaba de pupar (5 horas), pues en la pupa de una semana el cuadro se invierte, predominando la fracción lenta. La figura n.º 1 muestra también que los máximos son relativamente bajos en los imagos, en la fracción lenta de las larvas y en la rápida de los huevos. La fracción más rápida mostró tener su punto isoeléctrico entre los pH 8,5 y 9 (cuadro V). Se obtuvieron sólo indicios de la presencia de lipoproteínas en la fracción más rápida de huevos y larvas. Sin embargo, estas evidencias no son concluyentes y pensamos que la aplicación de las técnicas microelectroforéticas de KOHN (15, 16) en tiras de acetato de celulosa, la ultra microelectroforesis sobre agar (10) o bien una separación cromatográfica en columnas con polvo de vidrio (5) nos ofrecerá más adelante la posibilidad de continuar estos trabajos y separar, no sólo fracciones lipoproteicas, sino un número de fracciones superior al que hemos logrado con el método electroforético tradicional.

En resumen, los resultados muestran, generalmente, la dirección de los cambios para cada etapa del desarrollo y sugieren la influencia de actividades básicas de crecimiento. También los datos obtenidos exhiben el mismo tipo de variación que sufren los factores morfológicos y fisiológicos, en cuanto a los cambios proteicos, como respuesta a una modificación de los tejidos no maduros para la subsecuente elaboración de las estructuras maduras. Se sugiere así el valor de la electroforesis sobre papel para revelar las características de las proteínas de

los insectos e investigar la fisiología comparada de los ciclos vitales. Los diagramas electroforéticos podrían ser de gran utilidad con fines sistemáticos en entomología, especialmente en aquellos casos dudosos, como ocurre con las variedades, cooperando con el estudio morfológico y hasta quizás sustituyéndolo en ciertas circunstancias por su exactitud, ya que deben existir diferencias bioquímicas detectables por métodos electroforéticos.

Con respecto a los aminoácidos aromáticos, el cuadro VII muestra las variaciones en los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano en las diferentes etapas de la metamorfosis, expresados por 100 g de sustancia seca. Llama la atención lo elevado de los valores de tirosina y triptófano en los huevos, los cuales, a pesar de haber sido obtenidos mediante análisis triplicado, hacen pensar en alguna interferencia al ser aplicado el método por absorción al ultravioleta al estudio de esta fase, única en la que se aplicó. Por ello pensamos que dicho par de valores es discutible.

El aminoácido aromático que predomina en la sustancia seca de todas las fases es la fenilalanina; le sigue la tirosina y por último el triptófano. La única excepción se produce en la larva, estado en que la tirosina supera a la fenilalanina, sugiriendo una mayor síntesis de tirosina a partir de este aminoácido en esta fase, hecho que está de acuerdo con las necesidades de la etapa en cuestión, en la cual debe hacerse acopio de tirosina para la formación de pigmentos y derivados dihidroxifenólicos en el momento de la pupación. El probable origen bioquímico de estos últimos, a partir de la tirosina, ha sido señalado por HACKMAN (11). Tanto la tirosina como el complejo fenolasa están presentes en la sangre de los insectos y no cabe duda de que hay aumento en la concentración de la tirosina a medida que se acerca la pupación. El cuadro VII revela un descenso superior al 30 % en el contenido de tirosina en la sustancia seca de la larva al pasar ésta a pupa. El triptófano también desciende, para subir ligeramente al pasar a imago. La fenilalanina, en cambio, aumenta en un 20 % al pasar la larva a pupa, lo que señala un aumento en la síntesis de este aminoácido, ya sea por el insecto mismo o por sus simbiontes intestinales. Este aumento indica que la fenilalanina se utilizaría en las últimas etapas para formar tirosina, la cual sube en el paso de pupa a imago, en tanto que la fenilalanina desciende en dicha etapa. La cantidad de tirosina en la cutícula es un 20 % inferior a la de la fenilalanina. Cada cutícula de 3 mg representa 0,066 mg de fenilalanina y 0,052 de tirosina, lo que, proyectado hacia la pupa total, significa un 6,22 y un 6,0 %, respectivamente, de la fenilalanina y tirosina total de dicha fase. El triptófano desciende en un

14,3 % en el paso de larva a pupa para aumentar en un 7,7 % en la fase de imago, lo que habla en favor de una síntesis endógena apreciable de triptófano, pues no se explica de otro modo el que, teniendo que elaborar omocromos (2, 3, 4 y 17) a expensas de dicho aminoácido, su contenido en el paso de pupa a imago no descienda, sino que incluso aumente ligeramente.

El cuadro VIII muestra los porcentajes en que contribuyen los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano, en la formación de las proteínas de cada fase de la metamorfosis de la *Calliphora erythrocephala*. Llama la atención la poca cantidad en que están formando parte estos aminoácidos en las proteínas de la cutícula, si se compara con la de las larvas, pupas e imagos. La fenilalanina aumenta su porcentaje en las proteínas a medida que avanza la metamorfosis; en cambio, la tirosina desciende en el paso de larva a pupa para volver a alcanzar el mismo porcentaje en los imagos. Al triptófano le ocurre algo semejante, pero desciende proporcionalmente menos en el paso de larva a pupa y aumenta apreciablemente en la de pupa a imago, fase esta última en la que adquiere su porcentaje máximo en las proteínas.

En todas las etapas y también en la cutícula, es la fenilalanina, de los tres aminoácidos a que nos venimos refiriendo, el que entra en mayor proporción a formar parte de las proteínas correspondientes, excepto en las larvas, en que es la tirosina. El triptófano es, de los tres, el que está en menor proporción, generalmente entre 6 y 8 veces menos.

### Conclusiones

1. En el paso de huevo a larva, los prótidos de la sustancia seca aumentan en un 25 % para luego descender en un 7,77 % en el de larva a pupa y en un 21,20 %, o sea un descenso tres veces mayor, en el de pupa a imago.
2. El tanto por ciento de descenso total de los prótidos, expresados en sustancia seca, desde la fase de larva a la de imago, es de un 26,60 %.
3. El 58,63 % de la cutícula, como tal, está representado por prótidos, indicando así que son uno de los componentes preponderantes en ella.
4. Existen dos fracciones proteicas, separables electroforéticamente, que se conservan a lo largo de todo el desarrollo, pero cuyas fluctuaciones son características en cada etapa y sugieren la influencia de actividades básicas de crecimiento.
5. La fenilalanina es el aminoácido aromático que predomina en la sustancia seca de todas las fases, le sigue la tiro-

sina y luego el triptófano. La única excepción se produce en la larva en que predomina la tirosina, sugiriendo una mayor síntesis de este aminoácido a partir de la fenilalanina, para formar los pigmentos y derivados dihidroxifenólicos en el momento de la pupación.

6. Durante la fase de pupa desciende la tirosina y sube la fenilalanina, sugiriendo un acopio de este último aminoácido en las últimas etapas de la pupación para transformarlo en tirosina. Este aminoácido, efectivamente, está aumentando en el imago, en tanto que la fenilalanina está disminuida.

7. El triptófano desciende en el paso de larva a pupa para aumentar luego en la fase de imago, sugiriendo una apreciable síntesis endógena de este aminoácido durante la pupación.

8. La fenilalanina aumenta su tanto por ciento en las proteínas a medida que avanza la metamorfosis, en tanto que la tirosina y el triptófano sólo lo hacen en el imago.

9. De los tres aminoácidos aromáticos en cuestión, es la fenilalanina la que entra en mayor cantidad a formar parte de las proteínas, en todas las etapas, excepto en las larvas en que lo es la tirosina. El triptófano es el que está siempre en menor proporción, generalmente entre 6 y 8 veces menos.

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).

### Resumen

Se estudian, por el método de microkjeldahl y el fotocolorimétrico de Lowry, las proteínas totales en todas las etapas de la metamorfosis de la *Calliphora erythrocephala*, observándose que, desde la fase de larva a la de imago, el descenso total alcanza al 26,60 %, siendo dicha disminución tres veces mayor en el paso de pupa a imago que en el de larva a pupa.

Se analizan también, por electroforesis sobre papel, las variaciones de las fracciones proteicas a lo largo de toda la metamorfosis, revelándose la presencia de dos fracciones que se conservan a través de todo el desarrollo, pero cuyas fluctuaciones son características en cada etapa y sugieren la influencia de actividades básicas de crecimiento. Se determinó el punto isoeléctrico de la fracción más rápida.

Mediante técnicas fotocolorimétricas se estudia también el metabolismo de la fenilalanina, tirosina y triptófano en las tres fases de la metamorfosis. De ellas la fenilalanina es la que predomina en todas las fases, siguiéndole en proporción la tirosina y luego el triptófano, excepto en la larva en que predomina la tirosina, sugiriendo una síntesis de este aminoácido a partir de la primera. El triptófano descien-

de en el paso de larva a pupa para aumentar luego en la fase de imago, lo que hace pensar en un síntesis endógena de este aminoácido durante la pupación.

### Summary

#### Studies on the Biochemistry of Insects.

#### X. Notes on Proteic Metabolism in the Metamorphosis of *Callyphora erythrocephala*

The total proteins in all the phases of the metamorphosis of *Calliphora erythrocephala*, are being studied here by the Microkjeldahl and Lowry photolorimetric methods. We have observed that from the larval phase to the imago, the total decrease is of 26.60 %, this diminution being three times higher when passing from pupa to imago than from larva to pupa.

We have also performed the analysis, by paper electrophoresis, of the proteic fractions through the metamorphosis, revealing the presence of two fractions remaining during all the development but the fluctuations of which are characteristic of each phase and suggest the influence of basic growth activities. We have also determined the isoelectric point of the quickest fraction.

By means of photolorimetric techniques we have also studied the metabolism of phenilalanine, tyrosine and triptophane in the three phases of the metamorphosis. Of these, phenilalanine is the one predominating in all phases, then comes in order of proportion, tyrosine and next triptophane, except in the larva where tyrosine predominates, which suggests the synthesis of this aminoacid from the first. Triptophane decreases on passing from larva to pupa and increases again in the imago which may be due to an endogenous synthesis of this aminoacid during pupation.

### Bibliografía

- (1) BLOCK, R. G. y BOLLING, D.: «The amino acid composition of Proteins and Foods». Charles C. Thomas, *Springfield III*, Sd. Ed. 1951.
- (2) BUTENANDT, A.: *Endeavour*, 11, 188, 1952.
- (3) BUTENANDT, A.: *Forsch. Fortsch. Dtsch. Wiss*, 21/23, 4, 5, 6, 1947.
- (4) BUTENANDT, A.: *A. Angew. Chem.*, 69, 16, 1957.
- (5) CASTRO, B. D.: «La electroforesis en papel aplicada al estudio de las lipoproteínas». *Tesis de Qui. Farmac. Univ. de Chile*, 8, 223, 1956.
- (6) CARLSON, L. A.: *Clin. Chim. Acta*, 5, 528, 1960.
- (7) COMENGE, M. y OJEDA, E.: *R. esp. Fisiol.*, 4, 117, 1948.
- (8) CONSDEN, R., GORDON, A. M. y MARTÍN, A. J. P.: *Biochem. J.*, 38, 224-32, 1944.

- (9) CREMER, D. y TISELIUS, A.: *Biochem. Z.*, **320**, 273, 1950.
- (10) DENUCE, J. M. en RABAËY: «De Scheiding van Haemolymfhe Proteinen doorultramicroelectrophorese opagar». «Protides of the Biological Fluids». *Proceeding of the V<sup>th</sup> Colloquium Bruges*, 1957. Edit. by H. Peeters. Elsevier Pub. Co. Amsterdam, p. 154, 1958.
- (11) HACKMAN, R. H.: «Biochemistry of the Insect. Cuticle». IV. *International Congress of Biochem.* Viena. Sept. 1958.
- (12) HOLIDAY, E. R.: *Biochem. J.*, **30**, 1795, 1936.
- (13) HOLIDAY, E. R. y OGSTON: *Biochem. J.*, **32**, 1166, 1938.
- (14) KASTING, R. y MCGINNIS, A. J.: *Nature*, **182**, 1380, 1958.
- (15) KOHN, J.: *Clin. Chim. Acta*, **2**, 297, 1957.
- (16) KOHN, J.: *Nature*, **181**, 839, 1958.
- (17) KUHN, A.: *Nachr. Akad. Wiss. Gottingen*, **231**, 1941.
- (18) LEDEBER, M.: *Anal. Chim. Acta*, **6**, 521, 1952.
- (19) LOWRY, O. H. y col.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- (20) MAYOR, Z. F.: «Estudio de la descarboxilasa del ácido L-glutámico de origen vegetal». Tesis doctoral. *Fac. de Farmacia*. Madrid, 1958.
- (21) MILLER, G. L. y GOLDBER, R. H.: «Buffers of pH 2 to 12 for use in Electrophoresis». *Arch. Biochem.*, **29**, 420, 1950.
- (22) PARNAS, J. K. y WAGNER, R.: *Biochem. Z.*, **125**, 253, 1921.
- (23) PARTRIDGE, S. M.: *Biochem. J.*, **42**, 238, 1948.
- (24) PETTER, VAN R. y ELVEHJEM, C. A.: *J. Biol. Chem.*, **114**, 495, 1936.
- (25) PO-CHEDLEY, D. S.: *Nature*, **183**, 62, 1959.
- (26) SAPAG-HAGAR, M.: Tesis doctoral. *Fac. de Farmacia*. Madrid, 1960.
- (27) SEDES, J. W. y cols.: *Arch. Intern. Physiol. Bioch.*, **67**, 384, 1959.
- (28) SHEPARD, D. L. y JACOBS, M. B.: *J. Am. Ph. Assoc. (Sc. Ed.)*, **40**, 154, 1951.
- (29) SMITH, IVOR (Editor): «Chromatographie Techniques». William Heinemann, *Medical Books*. Ltd. London, 1958.
- (30) SPIES, J. R. y CHAMBERS, D. C.: *Analyt. Chem.*, **21**, 1249, 1949.
- (31) STAMM, M.<sup>a</sup> D. y SANTOS RUIZ, A. y VILLAR PALASI, V.: *Anal. Fis. Quim. R. XLV*, **595**, 1950.
- (32) STAMM, M.<sup>a</sup> D. y AGUIRRE, L.: *R. esp. Fisiol.*, **11**, 1, 63, 1955.
- (33) STAMM, M.<sup>a</sup> D. y AGUIRRE, L.: *R. esp. Fisiol.*, **11**, 1, 69, 1955.
- (34) STAMM, M.<sup>a</sup> D. y AGUIRRE L.: *R. esp. Fisiol.*, **11**, 1, 75, 1955.
- (35) SWAHN, B.: «Studies en Blood Lipide». *The Scand J. of Clin. and Lab. Invest.*, **5**, supp 9, 1953.
- (36) TISELIUS, A.: *Discursions Faraday Soc.* N.º 13, **29**, 1953.
- (37) TOSHIFUMI FUKUDA y cols.: «Formation of the Silkproteins during the growth of the silkworm larva» IV<sup>th</sup>. *Internat. Congress of Biochem.* Viena. 1st-Gth. Sept. 1958.

- (38) WIGGLESWORTH, V. B.: «The Principles of Insect Physiology». London: *Methuen & Co. Ltd.* 4<sup>th</sup> Ed., 1950.
- (39) WUNDERLY, CH.: «La electroforesis en papel». Trad. de la 1.<sup>a</sup> Ed. alemana. *Edit. Científica-Médica*. Barcelona, 1956.
- (40) WUNDERLY, CH. y GLOOR: *Protoplasma*, 62, 273, 1953.