

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

## Estudios sobre bioquímica de insectos

### XIV. Hormonas de metamorfosis en insectos

por

M.<sup>a</sup> Dolores Stamm

---

(Recibido para publicar el 11 de enero de 1962)

En trabajos anteriores se procedió al aislamiento de hormonas de metamorfosis en diferentes especies de lepidópteros (3, 4 y 5) ortópteros (6), coleópteros (7 y 8), así como en el crustáceo *Astacus pallipes* (2). Actualmente se han ampliado estos estudios al himenóptero *Vespa vulgaris*, valorando los extractos obtenidos sobre larvas de *Calliphora*. En determinadas dosis la pigmentación obtenida es normal, pero falta el endurecimiento de la cutícula que es característico de la pupación y en otros casos la pigmentación de la larva es más oscura de lo corriente, a veces casi negra, con formación de melaninas. La actividad se modifica con el tiempo.

Aparecen aquí otras sustancias activas; una que también fue aislada de los extractos de *Doryphora decemlineata* (8), cuyo coeficiente de distribución en el sistema ciclohexano-butanol-agua 6:4:10, es de 2,33, y otra que observada en el microscopio con platina calentable de KOFLEER experimenta a 150° una modificación, se descompone parte de la molécula a 205° y funde después entre 229 y 238°. El espectro infrarrojo de la misma (figura 1) indica la presencia de grupos NH u OH parcialmente asociados por puentes de H. De ser grupos OH son de tipo alcohólico. No aparecen grupos —COOH, éster, amida, ni CO y probablemente existe una cadena carbonada de cuatro o más

átomos de carbono. También parece contener un doble enlace muy asimétrico o más bien varios conjugados.

Probablemente el compuesto cristalizado es una cenapsa, que engloba la sustancia activa, la cual *in vitro* queda en libertad por el calor al descomponerse la parte externa. *In vivo*, esta liberación la realizan las enzimas, por esto la actividad se modifica con el tiempo.

El material de partida fueron 2.137 avispas, las cuales se conservaron en metanol. El extracto metanólico obtenido se purificó de manera semejante a la indicada en trabajos anteriores (4, 5, 6, 7 y 8), es decir por extracción con diferentes disolventes (butanol, éter, acetato de etilo y agua) por cromatografía de columna sobre  $Al_2O_3$  y por distribución contracorriente en el sistema ciclohexano-butanol-agua, 6:4:10.

La identificación de las sustancias aisladas se realizó por cromatografía de papel y la valoración de la actividad biológica inyectando los extractos a larvas de *Calliphora* en las que se había interrumpido la pupación natural mediante ligadura.

### Material y métodos

El material utilizado, 2.137 avispas fue homogeneizado con metanol, el homogenado se centrifugó para separar las sustancias insolubles y la solución metanólica se evaporó a sequedad obteniéndose 9,35 g. de extracto. Este fue extraído con agua, la solución obtenida con butanol y el extracto butanólico convenientemente lavado fue filtrado por columna de  $Al_2O_3$ , obteniéndose después dos eluatos, uno butanólico (0,58 g.) y otro metanólico (0,43 g.). Este último inyectado en larvas de *Calliphora* presentó una actividad del 55 % para una dosis de 10 Y. A continuación fue distribuido entre éter/agua, acetato de etilo/agua y butanol/agua, cromatografiándose seguidamente sobre el papel cada una de las fracciones obtenidas en el sistema agua saturada de butanol/agua.

El extracto etéreo sólo dio una mancha fluorescente en el origen; en el acuoso apareció además una mancha de  $R_f = 0,78$ ; en el éster acético otra de  $R_f = 0,35$  fluorescente a la luz ultravioleta y en el butanólico otra también fluorescente al U. V. de  $R_f = 0,29$ .

El eluato butanólico fue distribuido como el anterior y el extracto acuoso obtenido a la dosis de 5 Y presentó una actividad del 41 %; ahora bien, la pigmentación de las larvas fue en este caso más oscura de lo normal.

El extracto etéreo, que estaba en parte cristalizado, dio en la cromatografía de papel en el mismo sistema anteriormente indi-

cado una mancha de  $R_f = 0,2$  y otra fluorescente al U.V. en el origen. La fracción cristalizada a la dosis de 10 Y presentó una actividad melanógena del 42 %.

El extracto acuoso obtenido (17,4 mgs) fue cromatografiado sobre  $Al_2O_3$  de actividad IV según BROCKMAN y SCHODDEN (1) recogiendo el eluato fraccionadamente. Los eluyentes utilizados fueron :

Acetato de etilo-butanol (3 : 1) : Fracciones 1-3  
 » » metanol (4 : 1) » 4-6  
 » » » (1 : 1) » 7-9

Seguidamente se valoró biológicamente la actividad de algunas de las fracciones. Los valores obtenidos aparecen en la tabla I.

El extracto acuoso obtenido del eluato metanólico (52 mgs) fue distribuido en contracorriente en el sistema ciclohexano-butanol-agua, 6 : 4 : 10, utilizándose 24 elementos de distribución y una relación de volúmenes entre ambas fases de 1/1. Seguidamente se valoró la actividad biológica de algunas de las fracciones obtenidas. Los valores encontrados se representan en la tabla II. Entre las fracciones 14 y 19 de esta distribución aparece uno de los compuestos activos con un máximo en la fracción 17, el cual anteriormente fue aislado también de los imagos de *Doryphora decemlineata* (8).

La sustancia contenida en el elemento cero estaba cristalizada. Los cristales observados en el microscopio con platina ca-

TABLA I

Fracción	Dosis % en Y	% Actividad	Tiempo	
			Larvas ligadas: Días antes de la pupación	Observadas: Días después de inyectar
2.*	1	41*	1	1
5.*	0,1	0	4	1
7.*	0,1	10**	4	1
8.*	0,1	28**	4	1
8.*	0,01	13**	3	1
8.*	0,005	10	3	1

\* = Pigmentación marrón pero no hay endurecimiento de la cutícula.

\*\* = Pigmentación más oscura de lo normal.

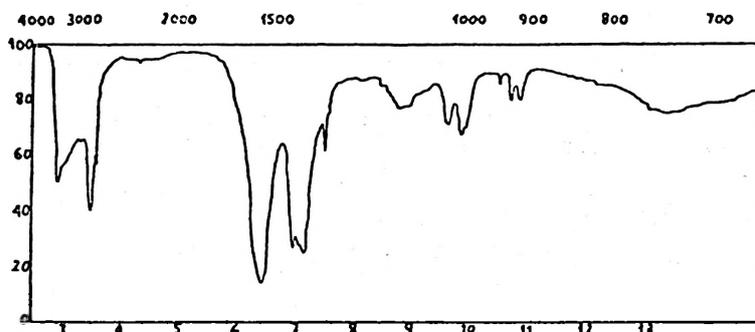


Figura 1

lente de KOFLER presentan los siguientes caracteres: A 150° experimentan una modificación y se descomponen en parte a 205°, funden después definitivamente entre 229° y 238°. El espectro infrarrojo de éstos se determinó interponiendo la sustancia en nujol.

TABLA II

Fracción	Dosis % en Y	% Actividad	Tiempo	
			Larvas ligadas: Días antes de la pupación	Observadas: Días después de inyectar
0	1	0	4	1
0	1	25*	4	4
0	1,325	11**	1	1
0	0,1325	35*	1	1
0	0,0132	3	3	1
3. <sup>a</sup>	0,1	9	3	1
17. <sup>a</sup>	0,16	58***	—	1

\* = Pigmentación marrón pero no hay endurecimiento de la cutícula.

\*\* = Pigmentación más oscura de lo normal.

\*\*\* = Pigmentación casi negra.

### Discusión

Aplicando los métodos de extracción de hormonas de metamorfosis a un extracto de *Vespa vulgaris*, se ha podido compro-

bar que éstos son activos, sobre larvas de *Calliphora*. En determinadas dosis la pigmentación obtenida es normal, pero falta el endurecimiento de la cutícula que es característico de la pupación y en otros casos la pigmentación de la larva es más oscura de lo corriente, a veces casi negra, hay pues formación de melaninas.

Aparecen aquí dos sustancias activas ; una que también fue aislada del coleóptero *Doriphora decemlineata* cuyo coeficiente de distribución en el sistema ciclohexano-butanol-agua (6:4:10) es de 2,33 y otra que observada en el microscopio con platina calentable de Kofler experimenta a 150° una modificación, se descompone parte de la molécula a 205° y funde después entre 229° y 238°. El espectro infrarrojo de la misma indica la presencia de grupos NH u OH parcialmente asociados por puentes de H. De ser grupos OH son de tipo alcohólico. No aparecen grupos —COOH éster, amida, ni CO y probablemente existe una cadena carbonada de cuatro o más átomos de carbono. También parece contener un doble enlace muy asimétrico o más bien varios conjugados.

Probablemente el compuesto cristalizado es una cenapsa que engloba la sustancia activa, la cual, *in vitro*, queda en libertad por el calor al descomponerse la parte externa. *In vivo* esta liberación la realizan las enzimas, por esto la actividad se modifica con el tiempo.

### Resumen

Aplicando las técnicas de extracción de hormonas de metamorfosis a un extracto de *Vespa vulgaris* se han obtenido fracciones activas que en determinadas dosis producen una pigmentación normal pero no el endurecimiento de la cutícula que es característico de la pupación ; en otros casos la pigmentación es más oscura de lo corriente, a veces casi negra con formación de melaninas. Entre estas sustancias se ha aislado una cristalizada que experimenta a 150° una modificación, se descompone parte de la molécula a 205° y funde después entre 229 y 238°. El espectro infrarrojo de la misma indica la presencia de grupos NH u OH parcialmente asociados por puentes de H. De ser grupos OH son de tipo alcohólico. No aparecen grupos —COOH, éster, amida, ni CO y probablemente existe una cadena carbonada de cuatro o más átomos de carbono. También parece contener un doble enlace muy asimétrico o más bien varios conjugados.

El compuesto debe ser una cenapsa, que engloba la sustancia activa, la cual *in vitro* queda en libertad por el calor al descomponerse la parte externa. *In vivo*, esta liberación la realizan las enzimas, por esto la actividad se modifica con el tiempo.

### Summary

#### Studies on the Biochemistry of Insects. XIV. Hormones in metamorphosis of insects.

Applyin the techniques of the extraction of metamorphosis hormones to an extract of *Vespa vulgaris*, active fractions have been obtained, which in determined dose produce a normal pigmentation but do not produce the hardeness of the cuticle which is characteristic in the pupation; in other cases the pigmentation is darker then usually, sometimes nearly black with melanines formation. Among these substances one has been isolated crystallized which experiences a modification at 150°, part of the molecule is decomposed at 205° C and fuses afterwards between 229° C and 238° C. The infra-red spectre in the same indicates the presence of groupes NH or OH — associated partially by bridges of H. If the proups are OH they are alcoholic. The groups — COOH do not appear either as ester or amida or CO and there is probably a carboned chain with four or more atoms of carbon. They also seem to contain a double connection very asimetric or, better several-conjugates.

The compound must be a cenapsa, which includes the active substance, — which *in vitro* is put on liberty by the heat when the outer part is decomposing. *In vivo*, this liberation is realized by the enzymes, thus the activity is modified by time.

### Bibliografia

- (1) BROCKMAN, H. y SCHODDEN, B.: *Ber. Dtsch. Chem. Cef.*, **74**, 73, 1942.
- (2) MARCOS-GALLEGO, P. y STAMM-MENÉNDEZ, M.<sup>a</sup> D.: *R. esp. Fisiol.*, **15**, 263, 1959.
- (3) KARLSON, P. y STAMM-MENÉNDEZ, M.<sup>a</sup> D.: *Hoppe-Seyler's Physioll. Chem.*, **306**, 109, 1950.
- (4) KARLSON, P. y STAMM-MENÉNDEZ, M.<sup>a</sup> D.: *Anal. Fis. Quim.*, **53-b**, 243, 1957.
- (5) STAMM-MENÉNDEZ, M.<sup>a</sup> D.: *Anal. Fis. Quim.* (En prensa.)
- (6) STAMM-MENÉNDEZ, M.<sup>a</sup> D.: *Anal. Fis. Quim.*, **55-b**, 171, 1959. *R. esp. Fisiol.*, **14**, 263, 1958.
- (7) STAMM-MENÉNDEZ, M.<sup>a</sup> D.: *Anal. R. Acad. Farm.* (En prensa.)
- (8) STAMM-MENÉNDEZ, M.<sup>a</sup> D.: *Anal. R. Acad. Farm.* (En prensa.)