

EVIDENCIA ELECTROFORETICA DE LA FORMACION DE COMPUESTOS DE ASOCIACION ENTRE OSAS Y ω -AMINOACIDOS

F. SANCHEZ-MEDINA y F. MAYOR

*Departamento de Bioquímica, Universidad de Granada,
Granada, España.*

1.—INTRODUCCION

Al investigar electroforéticamente la 4-aminobutirato: 2-oxoglutarato aminotransferasa

se observó la aparición de manchas positivas a la ninhidrina que se localizaban inmediatamente por debajo de las correspondientes al ácido 4-am

Estas manchas aparecían siempre —y únicamente— en los ensayos donde se había agregado 4-AB y su velocidad de desplazamiento era característica, no coincidiendo con la de los aminoácidos desarrollados simultáneamente como patrones ni con los contenidos en los ensayos de referencia.

Para la interpretación de este interesante resultado se disponía de las siguientes bases: a) su formación estaba condicionada a la presencia de 4-aminobutirato; b) era precisa la existencia de un grupo amino reactivo; c) dada su situación en el desarrollo electroforético, poseía un carácter ligeramente básico y escaso peso molecular; y, d) su producción no era enzimática, ya que también aparecía en los controles adicionados de 4-aminobutirato y detenidos a tiempo cero. Esta última circunstancia descartaba la posibilidad de un origen metabólico e indicaba que esta transformación —no observada trabajando con otros materiales biológicos— tenía una base estrictamente química.

En el presente trabajo se describe la identificación del compuesto, así como el ulterior estudio de algunos aspectos en las condiciones experimentales utilizadas.

2.—MATERIAL Y METODOS

La obtención de los extractos empleados en los ensayos de actividades aminotransferásicas ha sido descrita previamente (1). Los aminoácidos se han identificado zándose eventualmente las oportunas tinciones específicas (2). La identificación de azúcares se ha realizado por cromatografía sobre papel, utilizando ftalato ácido de anilina como reactivo de tinción (3). Los espectros infrarrojos se han obtenido en un espectrofotómetro Perkin-Elmer IR 137, utilizando células de espesor fijo con ventana de D_2O como disolvente.

3.—RESULTADOS Y DISCUSION

1.—Identificación del compuesto problema.

La identificación del compuesto problema presentó muchas dificultades, ya que era altamente inestable en la solución acuosa obtenida al eluirlo, apareciendo en la misma únicamente 4-AB libre como producto positivo a la ninhidrina. Tampoco era positivo a las reacciones diferenciales de aminoácidos ensayadas ni coincidía en su movilidad cromatográfica con la de los aminoácidos de comportamiento electroforético similar (σ -aminobutírico y σ -aminoisobutírico, especialmente). Por otra parte, las manchas obtenidas en diferentes desarrollos de una misma experiencia tinta intensidad, no existía y la temperatura de incubación.

El compuesto no se detectó en los ensayos de extractos vegetales (tallo de *Opuntia vulgaris* y *Cereus tortuosus*). Parecía evidente, por tanto, que en el fruto de *Opuntia vulgaris* existía cierta sustancia, en mayor cantidad que en los otros orígenes, directamente con la formación del problema. Para fraccionar un extracto de fruto de *Opuntia vulgaris* en varias alícuotas recibieron los siguientes tratamientos: a) desproteinización; b) desproteinización; c) desproteinización con ácido perclórico (concentración final: 10%); d) diálisis frente a acetato de amonio (concentraciones finales de aminoácidos por una columna de resina de poliestireno sulfonada

(Lewatit S 100). A todas las alícuotas y a otra sin tratamiento previo se les adicionó 4-AB (concentración final: 0.4 mM) y se dejaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente.

Como
cha problema en el caso de la alícu
que el compuesto responsable de su formación no es una proteína, ni un metal ni un aminoácido, sino alguna otra sustancia dializable.
además

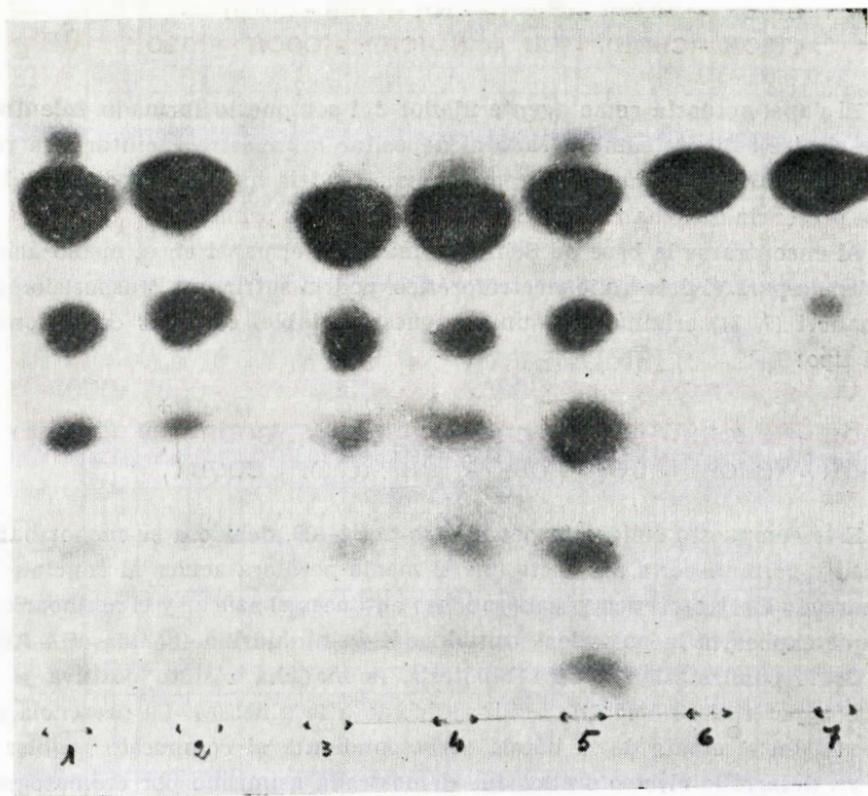
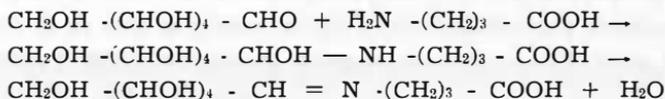


Fig. I.—Electroforograma de diversas fracciones alícuotas de un extracto crudo procedente de fruto de *Opuntia vulgaris*, 1) sin tratar; 2) hervido cinco minutos; 3) tratado con ácido tricloroacético, concentración final del 10%; 4) tratado con ácido perclórico, concentración final del 10%; 5) tratado con EDTA, 10.² M; 6) dializado; 7) libre de aminoácidos, por separación en columna de resina Lewatit S 100. A todas las fracciones se les adicionó 4-AB (concentración final 0,4mM) y se dejaron 30 minutos a la temperatura ambiente, antes de realizar el desarrollo electroforético.

rollo

habitual. Ello demostraba que no se formaba durante la incubación sino en el transcurso del proceso analítico.

Dado que el fruto de *Opuntia vulgaris* es muy rico en glucosa (4) y que se necesitaba calor para que la reacción tuviera lugar, se pensó en la posibilidad de que en el momento de depositar las muestras, el 4-AB reaccionará con la glucosa, según el esquema propuesto por Maillard (5,6):

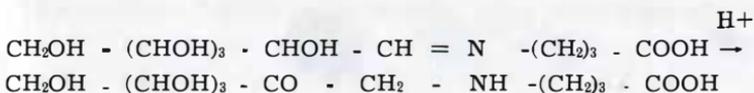


El papel actuaría como agente fijador del compuesto formado, mientras que el aire caliente suministrado al depositar la muestra facilitaría la rápida desaparición de agua.

y la presencia de agua restablecería los compuestos primitivos.

Al encontrarse la base de Schiff

utilizado para el desarrollo electroforético, podría sufrir una trasposición de Amadori (7, 8), originándose un compuesto estable, en estas condiciones, del tipo:



Este compuesto emigraría por debajo del 4-AB, debido a su menor basicidad y permanecería así hasta que el medio perdiera acidez al concluir el desarrollo electroforético, regenerándose entonces el azúcar y el aminoácido, lo que explicaría la posterior positividad a la ninhidrina (debida al 4-AB).

Como confirmación a esta hipótesis, la mancha resultó positiva a la tinción por ftalato ácido de anilina (debido a la glucosa). La presencia de glucosa en el eluato de la banda correspondiente al compuesto problema en un desarrollo electroforético fue demostrada asimismo por cromatografía sobre papel. Por último, se consiguió reproducir la formación del compuesto de adición mezclando simplemente soluciones de glucosa y 4-AB y depositando la muestra correspondiente en el papel con ayuda de aire caliente.

Se realizó también la comparación de los espectros IR de las sustancias reaccionantes y del compuesto resultante.

2, en el espectro correspondiente al producto de la reacción ha desaparecido la banda de absorción d

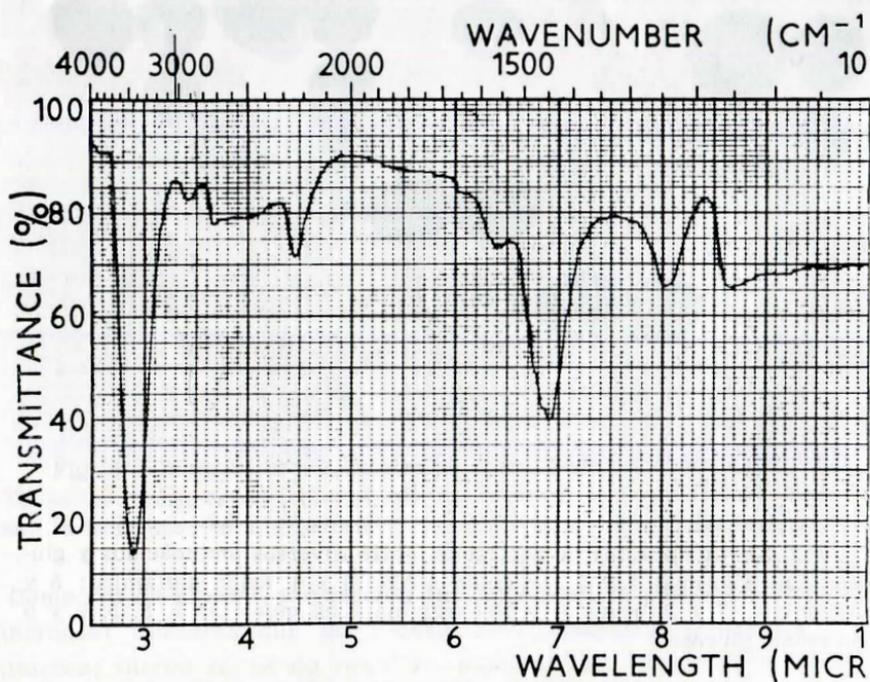
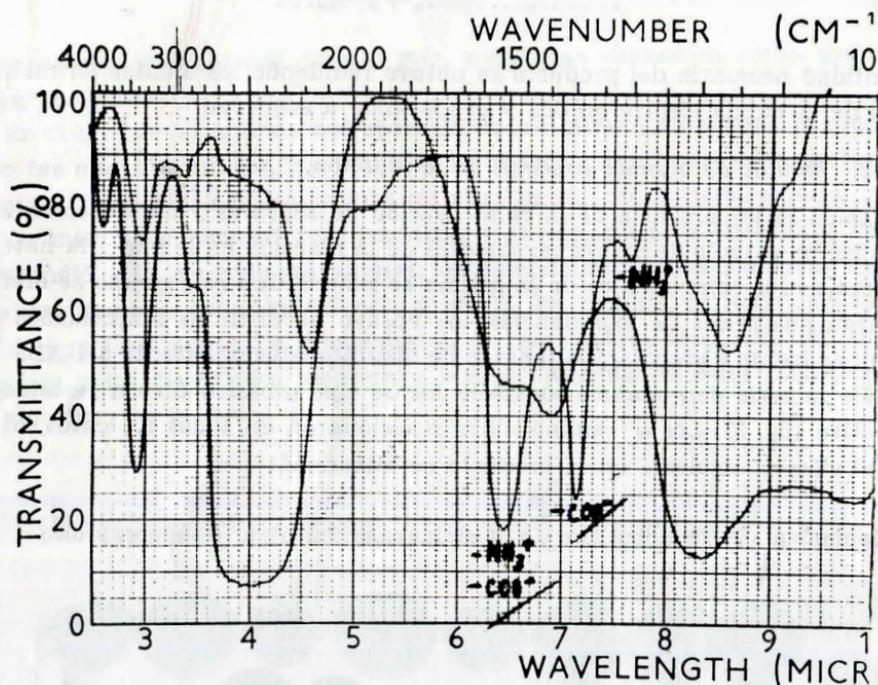


Fig. 2.—Espectros IR en óxido de deuterio correspondientes al ácido 4-aminobutírico (A) y al compuesto problema (B)

cantidad necesaria del producto se obtuvo reuniendo los eluatos en metanol de la banda electroforética y evaporando a sequedad.

2. Estudio de algunos aspectos de la reacción.

Dada la importancia de la condensación de azúcares y aminoácidos, se realizó un estudio de los requerimientos de la reacción en lo que a la naturaleza de los componentes de la misma se refiere. Con este objeto se efectuaron dos series de experiencias: a) ensayo de distintos aminoácidos y aminas frente a glucosa, y b) ensayo de distintos azúcares frente a 4-AB.

De la serie de α -aminoácidos, sólo los de tipo dibásico dieron resultado positivo (fig. 3). Los ω -aminoácidos reaccionándose el siguiente orden creciente de intensidad:

β -alanina > a. γ -aminobutírico > a. δ -aminovaleriánico > a. ϵ -aminocaproico

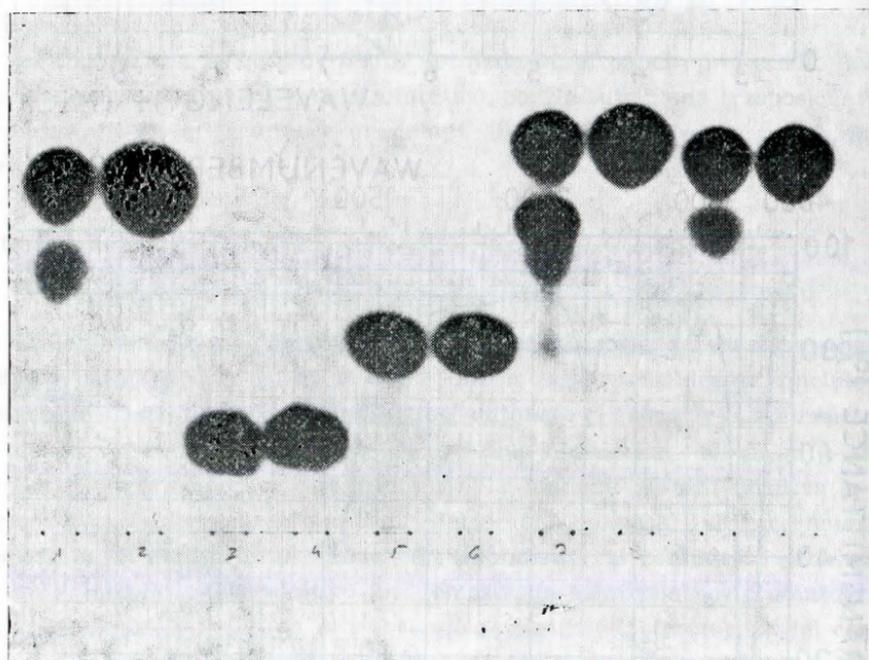


Fig. 3.—Compuestos de asociación entre diversos aminoácidos y glucosa. Las muestras 1 y 2 contenían 4-AB; 3 y 4, ácido glutámico; 5 y 6, alanina; 7 y 8 lisina, 9 y 10, arginina. Las muestras 1, 3, 5, 7 y 9 contenían glucosa.

De estos resultados se deduce claramente que en las condiciones experimentales la condensación se produce únicamente con el grupo ω -amino.

siendo tanto más intensa cuanto más alejado se encuentra dicho grupo del grupo carboxilo.

En el caso de las aminas, corroborando los resultados anteriores, la reacción fue muy intensa con las diaminas de cadena larga (putrescina, isoleucamina) y negativa con las aminas sencillas (metil amina, fenil amina).

La máxima capacidad reactiva dentro de los azúcares ensayados correspondió a la serie de las aldosas, obteniendo resultados similares con glucosa, manosa, galactosa, ribosa, y xilosa. En cambio, la actividad fue mínima con arabinosa. La intensidad de la reacción fue muy reducida con fructos

se muestran en la figura 4.

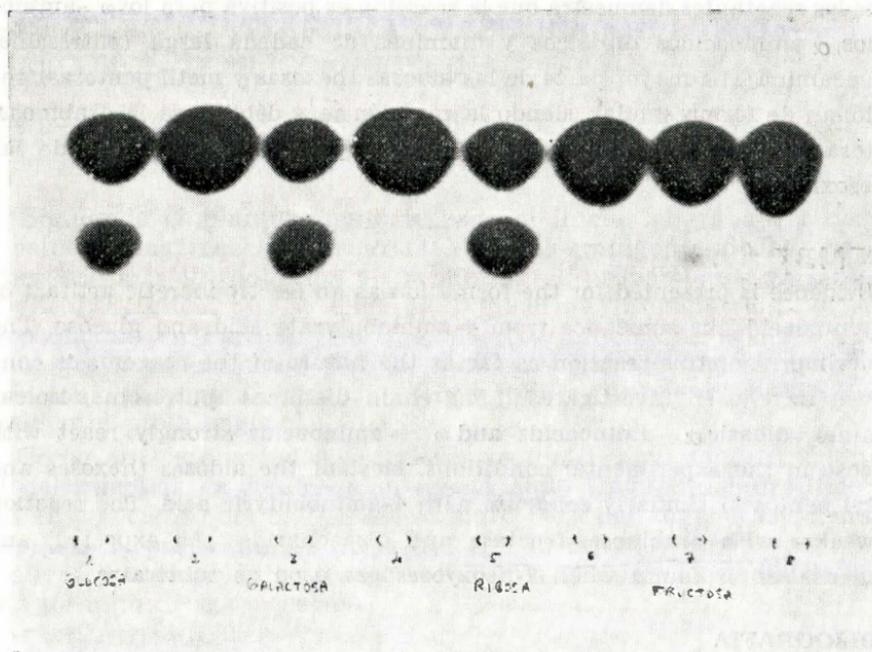


Fig. 4.—Compuestos de asociación entre diversos azúcares y 4-AB. Todas las muestras contenían 4-AB. La muestra 1, glucosa; la 3, manosa; la 5, ribosa; la 7, fructosa.

Como era de esperar, la reacción fue muy positiva con las 6-desoxiosas (rhamnosa) mientras que las 2-desoxiosas ensayadas (2-desoxiglucosa, digitoxosa) dieron resultado negativo, observándose disminución de 4-AB con relación al control, pero sin aparecer mancha positiva a la ninhidrina. Dado que los sustituyentes del C_2 del azúcar intervendrían, según el meca-

