

INVESTIGACIONES PRELIMINARES SOBRE LA PRESENCIA DE TIROSINASA Y TIROSINA EN EL PACHYCEREUS MARGINATUS

Por JUAN ROCA,
del Instituto de Biología.

AL estudiar los componentes químicos de *Pachycereus marginatus*, entre los cuales logré aislar principios de naturaleza alcaloídica, pude observar un hecho sumamente interesante, para el que no logré, por aquel entonces, explicación adecuada. Los extractos de dicha planta obtenidos en determinadas condiciones, eran incoloros, pero al abandonarlos para su cristalización, empezaban por oscurecerse al poco tiempo y terminaban por ser completamente negros. A pesar de los diversos tratamientos a que sujeté los extractos, siempre se oscurecían, y si al fin pude aislar los alcaloides en suficiente estado de pureza no logré evitar por completo que se oscureciese un poco el producto obtenido.

Desde luego supuse que era debido a la acción de una cimasa oxidante, y en efecto, demostré que el *Pachycereus marginatus* contiene una cimasa que descompone el agua oxigenada y transforma el ácido guayacónico en guayaco azul. Como el primer extracto que obtenía de la planta era alcohólico, supuse que se trataba de una cimasa soluble en alcohol, pero era inexplicable para mí que resistiese a la acción de los distintos precipitantes que utilizaba durante el largo proceso de la obtención de los alcaloides respectivos.

Al obtener hace poco tiempo, algunos aminoácidos de la caseína y estudiar su relación con algunos fermentos, se me ocurrió que podía tener alguna relación con lo que había observado en el *Pachycereus marginatus* y decidí estudiar detenidamente el fenómeno mencionado. Es bien conocido el uso vulgar que se hace del *Pachycereus*, esto es, del órgano, para ennegrecer el cabello. En este trabajo voy a describir los resultados a que he llegado actualmente en mis observaciones, en la seguridad de que

han de prestar alguna utilidad en el conocimiento del interesante problema de la formación de las melaninas.

Como quiera que las cimasas necesitan para su acción la presencia de coencimas, traté unos pedazos de *Pachycereus marginatus* recién cortados, con una solución que precipitase las sales de calcio y a la vez con otras soluciones de índole distinta. Hice la experiencia en la forma siguiente: en otras tantas cápsulas puse alcohol, agua destilada y ácido oxálico, respectivamente, sumergiendo en dichos líquidos unos pedazos de órgano recién cortado. Los dos primeros se ennegrecieron rápidamente. El líquido alcohólico ennegreció completamente a los 30 minutos. El trozo sumergido en agua destilada tardó más en presentar dichas transformaciones pero acabó por ser igual al anterior. Los pedazos sumergidos en la solución de ácido oxálico no presentaron ningún cambio de coloración. A las 72 horas estaban igual que al principio y el líquido permaneció incoloro.

Repetí la experiencia sumergiendo otros pedazos recién cortados en acetona, solución de oxalato neutro de potasio, oxalato de sodio, ácido tartárico, ácido cítrico y ácidos clorhídrico y sulfúrico diluidos, respectivamente. Los pedazos sumergidos en acetona ennegrecieron inmediatamente y el líquido lo mismo: todos los restantes no experimentaron ningún cambio de coloración. De esto deduje que, si bien podía inactivarse la cimasa por la acción de los precipitantes de las sales de calcio, también se conseguía el mismo efecto por la presencia de un ácido, no importando la disociación real del mismo. Por último, un pedazo sumergido en agua alcalina se coloreó inmediatamente y a los 30° tenía color negro intenso.

El siguiente punto fue naturalmente tratar de separar el fermento. Para ello determiné previamente el pH del jugo fresco de la planta por el procedimiento potenciométrico. Hechas las debidas correcciones resultó un pH de 4.2. Con este dato procedí a la separación de la encima, siguiendo distintos procedimientos que describiré ligeramente, para seleccionar después el que resultase más apropiado.

Dada la importancia que tienen actualmente los adsorbentes por su acción selectiva, perfectamente demostrada en numerosos casos, ya que con ellos es posible separarlos de numerosas impurezas, preparé cuidadosamente algunos para utilizarlos inmediatamente. Describo su preparación porque estimo ha de prestar alguna utilidad a los que se dedican a estos estudios, ya que de su preparación correcta depende el éxito que se busca.

Alúmina A.—Disuélvose 125 gramos de sulfato aluminico puro, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$, en 375 c. c. de agua; se calienta la solución a 55° y se vierte, agitando fuertemente, a 1,250 c. c. de una solución de amoníaco al 15%; calentada previamente a 55° . Agito fuertemente, por media hora, manteniendo la temperatura entre 55° y 60° . Después de este tiempo, caliente en refrigerante de reflujo por 48 horas, manteniendo una ebullición suave y regular; se diluye después con 6,000 c. c. de agua y dejando reposar lo suficiente, decanto el agua y lavo el residuo tres veces, separando el agua cada vez por sifonación. Trato de nuevo el residuo con 500 c. c. de una solución amoniacal al 15% y lavo el residuo sedimentado hasta que el coloide de hidróxido de aluminio se pueda separar fácilmente de las aguas del lavado, lo que conseguí a las siete veces.

Alúmina B.—La obtuve de modo semejante a la anterior, pero después de agitar por media hora a 58° se diluyó con 6 litros de agua y se lavó por sifonación varias veces hasta tener una pasta semejante a la anterior.

Alúmina C. alfa.—Para obtenerla se usa alumbre amoniacal. Disolví 22 gramos de sulfato amónico en 600 c. c. de agua, calentando la solución a 65° , añadiendo después 100 c. c. de amoníaco al 10%. Teniendo la solución a 58° , se añade de una vez, agitando fuertemente, 76.7 gramos de alumbre amoniacal, disueltos en 150 c. c. de agua y calentando la solución a 58° . Se mantiene la temperatura entre 58° y 61° , mientras se forma el coloide. Diez minutos después de formado, se separa el precipitado rápidamente y se vierte a 1,500 c. c. de agua que contiene 1.25 gramos de amoníaco. De nuevo se separa rápidamente el precipitado y se trata esta vez con 1,500 c. c. de agua que contiene 2.5 gramos de amoníaco. Se lava después por tres veces con agua destilada pura, en la misma forma. El coloide obtenido es muy inestable.

Alúmina C beta.—El coloide anterior se transforma en alúmina C. beta, espontáneamente, a las pocas horas de preparado, como se demuestra por ser menos soluble en los ácidos. Por lo tanto, dejando el coloide anterior en reposo por 12 horas se obtiene el deseado.

Alúmina C gamma.—La alúmina anterior se convierte, a su vez, con el tiempo, en otro coloide más estable. Se acelera su formación del siguiente modo: lavo el precipitado obtenido en C alfa, con 5 litros de agua, agitando fuertemente y separo el líquido por decantación: después de lavar el precipitado por segunda vez

se añaden 80 c. c. de solución amoniaca al 20%, se agita por 30', manteniendo la temperatura a 58° y al final de este tiempo se lava por tres veces con 5 litros de agua destilada, separándola por sifonación. El precipitado se vuelve más floculento y después de tres semanas fue completamente insoluble en HCl diluído y frío.

Alúmina D.—La obtuve disolviendo 65 gramos de hidróxido aluminico en 450 c. c. de una solución de potasa al 15%, completando el volumen a 500 c. c. con agua: filtrada la solución se diluyó con 5 litros de agua y se hizo pasar una corriente de CO₂ por 48 horas: separado el líquido acuoso por sifonación, se lavó por cinco veces con agua saturada de CO₂ y la última vez con agua destilada.

Obtuve otra alúmina coloide transformando el hidróxido en metahidróxido por medio del amoniaco y a presión por seis horas.

Se creía que al tratar una sal de aluminio por una base se formaba Al₂O₃. Se ha demostrado que la naturaleza del producto formado depende de las condiciones en que se verifica la reacción y de la presencia de soluciones buffer. Si bien es cierto que se forma en unos casos Al(OH)₃, en otras condiciones se forman hidróxidos polialumínicos y aun Al₂O₃.3 H₂O, como en la C gama y también metahidróxidos. El carácter diferencial y, por lo tanto, su selectividad, depende de la cantidad de agua que puede retener el coloide formado, que llega hasta 53° en la C alfa, mientras que la B tiene 35% y la A 22%. Depende, a su vez, del carácter ácido y básico que presentan las distintas variedades y finalmente del tamaño de las partículas coloidales.

El kaolín que utilicé en mis experiencias fue tratado previamente con ácido, en la proporción de 125 granos de kaolín por 375 c. c. de HCl concentrado, calentado suavemente por 24 horas y a la ebullición por 12 horas. Se lavó después fuertemente, hasta que las aguas del lavado no dieron reacción ácida al tornasol, pero el kaolín húmedo sí era ácido al tornasol.

También preparé hidróxido férrico coloide, que no describo por no presentar su preparación ninguna dificultad.

Finalmente purifiqué tierra de infusorios, siguiendo procedimiento semejante al del kaolín.

A medida que iba obteniendo los adsorbentes anteriores, traté el jugo de la planta, obtenido por expresión en prensa apropiada, con cada uno de dichos adsorbentes, añadiendo previamente solución buffer para mantener un pH constante de 4.2, en unos casos, y 3.8, en otros.

La precipitación o adsorción con los hidróxidos de aluminio fue muy abundante, pero después de la elución correspondiente se obtuvieron soluciones de escasa actividad cimásica, excepto la alúmica C gamma en que fue mayor. Con el hidróxido férrico fue casi nula y lo mismo sucedió con la tierra de infusorios. Obtuve la máxima actividad con la encima adsorbida por el kaolín, a un pH de 3.8. En todos los casos, las soluciones eluidas dieron reacciones de proteínas y las eluciones de los hidróxidos de aluminio se alteraron más fácilmente al aire que las restantes.

Para obtener la cimasa del *Pachycereus marginatus*, seguí también el procedimiento de Raper. Sumergí pedazos de órgano recién cortados, en agua clorofórmica, se desmenuzaron en molino de mano y se exprimieron en prensa, filtrando inmediatamente en tela de manta. Se filtró después por papel, lavando el residuo con agua saturada de cloroformo y débilmente acidulada con acético, hasta que las aguas del lavado se enturbiaron ligeramente con acetato de plomo y amoníaco. El residuo recogido en el papel se desmenuzó en mortero con un poco de agua clorofórmica y amoníaco hasta ligera reacción alcalina al tornasol. No me dió buen resultado, pues fue inactiva.

Finalmente seguí el procedimiento de G. Bertrand, ligeramente modificado, en la forma siguiente:

Maceración por 10' de pedazos pequeños de órgano recién cortados, en agua acidulada con sulfúrico a un pH de 2.5. Se desmenuzaron los pedazos en molino y se exprimieron en prensa para obtener el jugo limpio y filtrado por tela de manta. Inmediatamente se trató con tres volúmenes de alcohol de 96°, centrifugando, para separar el precipitado que se lavó con un poco de alcohol y volvió a centrifugar: se disolvió después el precipitado con un poco de agua y se precipitó de nuevo con cuatro volúmenes de alcohol de 96°; separado el precipitado, después de nueva centrifugación rápida, se desecó al vacío sulfúrico.

El precipitado fue soluble en agua, dando un líquido ligeramente opalino.

La actividad de las cimastas obtenidas por todos los anteriores procedimientos, se estudió en la forma siguiente: desléida en agua una pequeña cantidad del producto, medio gramo en 5 c. c., mezclé 1 c. c. con 1 miligramo de tirosina pura, disuelta en 5 c. c. de agua débilmente acidulada y poniendo la mezcla final a un pH de 6.2: apareció color rojo a los diez minutos, con la cimasa obtenida por el procedimiento de Bertrand y con la eluida del kaolín; a los 20' con la de la alúmina C gamma, a los 60' con

las demás alúminas y con la de tierra de infusorios; apenas se coloreó con la de tierra de infusorios y no se observó ningún cambio con la obtenida por el procedimiento de Raper.

Repetí la experiencia a un pH de 8.5, obteniendo rápidamente color negro en los dos primeros casos y, en los demás, tardó como dos horas y aún más en las dos últimas mencionadas.

Se ofreció después estudiar detenidamente la naturaleza de la substancia que existe en el *Pachicereus marginatus* y sobre la cual obra indudablemente la cimasa separada de dicha planta, esto es, traté de repetir en el laboratorio lo que pasa en el órgano.

El jugo de órgano fresco se trató con oxalato de potasio para precipitar las sales de calcio al mismo pH del jugo, 4.2, concentrado por evaporación en B. de M. El extracto se oscureció poco a poco y tomó finalmente color negro, no obteniendo ninguna substancia cristalizada.

Se repitió, utilizando como precipitante del calcio, el ácido oxálico, con los mismos resultados.

Un tercer extracto se trató con acetato de plomo y el filtrado se trató con sulfhídrico. Al evaporar el filtrado en B. de M. y neutralizando el líquido resultante, se obtuvo una pequeña cantidad de cristales de tirosina, que dieron la reacción de Millon, muy intensa, pero la cantidad de impurezas de la solución fue muy grande.

En otra porción, tratada por un modo semejante, se añadió un poco de sulfúrico al concentrar en B. de M. Se obtuvo un residuo impuro, con mayor cantidad de cristales de tirosina y reacción de Millon fuertemente positiva.

En vista de esto determiné seguir en otra porción el procedimiento siguiente: eliminación de cimasa y demás materias precipitables con kaolín a un pH de 2.0, concentración del filtrado, primero al vacío y a 25°, y luego en atmósfera de nitrógeno. He obtenido por este procedimiento un residuo negro, viscoso, con pequeña cantidad de cristales de tirosina y gran cantidad de cristales en forma de prismas, incolóros y fácilmente solubles en agua, así como todo el residuo.

El estudio químico de esta substancia cristalizada será objeto de otro trabajo posterior, que indudablemente ha de ser muy interesante, porque al parecer debe tratarse de la substancia madre de la tirosina o del primer producto de su transformación por la tirosinasa. Sin embargo, debo decir, que el jugo de órgano es un líquido muy inestable, ya que sin precauciones extraordinarias ennegrece muy pronto, pues aun con todas las pre-

cauciones explicadas y otras que no menciono, por no hacerme pesado, no es posible evitar completamente la alteración del líquido, ya que el filtrado, incoloro, separado de las cimasas por adsorción, se obscurecen más o menos después de cierto tiempo.

Otra porción de jugo de órgano al pH de 5.8, se trató con kaolín, y el líquido, separado a los 5' por filtración al vacío tomó color rojo intenso. Una pequeña porción se puso después al pH de 8.5 y cambió casi instantáneamente a negro. El resto de líquido rojo se concentró al vacío y a 25°. El residuo se está estudiando actualmente.

Por otra parte, consideré interesante estudiar la naturaleza del residuo negro que se obtiene en todos los extractos mencionados. Es insoluble en agua y en ácidos diluïdos, soluble parcialmente en carbonatos alcalinos, así como en álcalis en caliente, de cuyas soluciones precipita por los ácidos. La mayor parte de la substancia permanece insoluble. Purifiqué regular cantidad por redisolución del precipitado mencionado, en líquido alcalino y nuevo tratamiento del filtrado con ácido acético y el precipitado se lavó primero con agua destilada y luego con alcohol, y finalmente con éter sulfúrico. Resultó un polvo amorfo de color pardo negruzco.

Traté una pequeña cantidad con solución de potasa concentrada, en presencia de acetato de plomo. No se formó sulfuro de plomo, reconocible fácilmente por la formación de sulfhídrico. Oxidada con oxidantes enérgicos no dió reacción de sulfatos con BaCl₂. La investigación del nitrógeno fue positiva, así como la del carbono, demostrado éste por la formación de CO₂ al calentar fuertemente una pequeña cantidad con óxido cúprico en probeta cerrada y con tubo de desprendimiento sumergido en solución de hidróxido bórico. Se dosificó el nitrógeno por el método de Kjeldahl, encontrando 8.10%. Se trata por lo tanto de melanina no sulfurada, advirtiéndole que no toda la substancia de color negro que se forma en los extractos de órgano es verdadera melanina, sino tan solo una pequeña porción.

El *Pachycereus marginatus*, contiene, por lo tanto, tirosinasa. He obtenido, además, tirosina en determinadas circunstancias. En los extractos de órgano abandonados al aire, se produce melanina y otra substancia de color negro intenso, que no es de las melaninas conocidas, ya que es insoluble en los álcalis. Modificando el pH normal de la planta a 6.0, toma color rojo intenso, y poniéndolo a 8.5, toma color negro y la substancia roja toma espontáneamente color negro después de algún tiempo. He

aislado además, en el jugo de órgano otra substancia cristalizada, que debe tener íntima conexión con la tirosina.

Con el fin de poder interpretar estos resultados, veamos ahora un ligero resumen sobre el estado actual de nuestros conocimientos acerca de la formación de las melaninas animales, para ver si tiene alguna relación con lo que hemos estudiado.

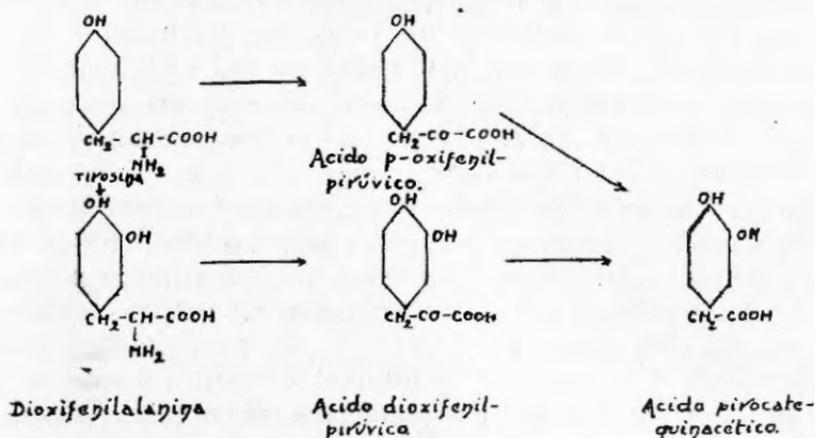
Indudablemente se considera de interés primordial, como factor predominante, lo que se refiere a la tirosina.

Según Baumann, presenta la tirosina el siguiente proceso de transformación regresiva, en el que puede observarse la desintegración de la cadena lateral, subsistiendo intacto el núcleo cíclico.

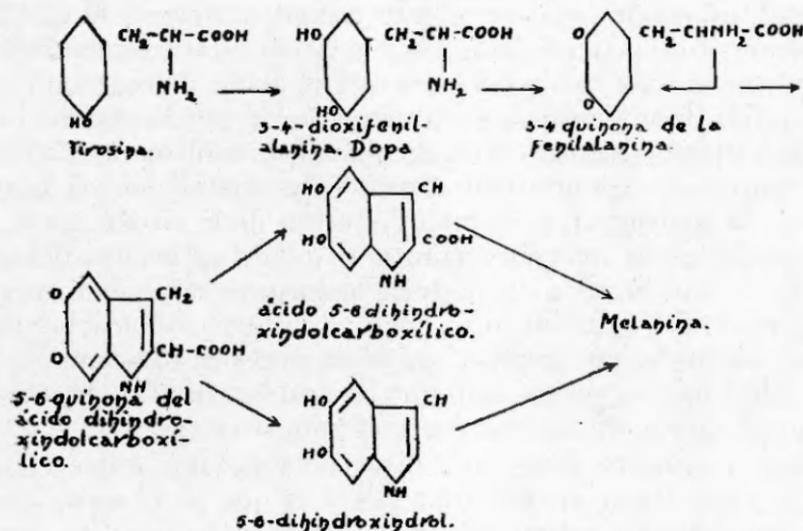
Tirosina	$C_6H_4.OH-CH_2-CHNH_2-COOH$
Acido hidroparacumárico	$C_6H_4.OH-CH_2-CH_2-COOH$
Paraetilfenol	$C_6H_4.OH-CH_2-CH_3$
Acido paraoxifenilacético	
Paracresol	$C_6H_4.OH-CH_3$
Acido paraoxifenilacético	$C_6H_4.OH-CH_2-COOH$
Fenol	$C_6H_5.OH$

Todos estos cuerpos han sido precisados en la orina, excepto el paraetilfenol, pero este proceso no puede ser el que sigue el órgano, ya que el producto final no es precisamente fenol, sino materia de naturaleza melanínica. Hemos de buscar, por lo tanto, la semejanza en otros procesos de desaminación más en consonancia con lo observado en *Pachycereus marginatus*.

Numerosos autores se han dedicado al estudio del proceso de pigmentación en los animales y especialmente en el hombre. Considera Bloch, que el pigmento de naturaleza melanínica es producido por la acción de un fermento especial sobre la dioxifenilalanina, substancia aislada por Guggenheim en la semilla de *Vicia faba*, que pasaría por oxigenación al ácido dioxifenilpirúvico y luego al término de ácido pirocatequinacético. Claro está que, de ser esto cierto, la misma hidroxifenilalanina o tirosina podría dar también el mismo ácido pirocatequinacético, pasando antes por ácido p-oxifenilpirúvico, en la siguiente forma:



De las diversas hipótesis que se han emitido, la más aceptada actualmente es la de Raper, sin que, a mi entender, deje de tener valor lo que acaba de exponerse.



Raper explica el proceso de formación de la melanina por la acción de la tirosinasa sobre la tirosina, que fija primero un OH en la posición 3 del núcleo benzénico, formando, por lo tanto, la dioxifenilalanina. Se deshidrogenan después los OH por oxi-

dación, dando la quinona correspondiente, denominada Dopa por Bloch, la que se cicliza posteriormente, produciendo la 5-6 quinona del ácido dihidroxindolcarboxílico, que es la materia colorante roja: esta substancia sin ayuda de encimas se transforma, por cambios intramoleculares, en cuerpos incoloros: Raper ha conseguido formar dos cuerpos por el simple vacío o por la acción del SO₂ sobre la substancia anterior y con el ácido 5-6 dihidroxindolcarboxílico y el 5-6 dihidroxindrol. Estas substancias, por la simple acción del oxígeno molecular o por cambiar el pH a 8, o bien por una fenolasa que puede acompañar a la tirosinasa, dan melanina.

Al recapacitar sobre estos admirables estudios que se han hecho principalmente con los productos de origen animal, se comprende que, por la semejanza biológica, deben suceder procesos análogos en los vegetales, con la ventaja, en este caso, de que la simplicidad funcional ha de favorecer grandemente su estudio.

En el *Pachycereus marginatus*, encontramos, pues, fenómenos enteramente semejantes a los que acabamos de describir: las oxidasas obran sobre los productos formados sintéticamente por el vegetal, especialmente sobre determinados aminoácidos. Conjuntamente obra la tirosinasa sobre la tirosina, transformándola en compuestos más oxidados, bien sea el ácido pirocatequinacético o la dioxifenilalanina o la quinona correspondiente. El estudio de la substancia que he aislado, dará, probablemente, la clave de la naturaleza del producto intermedio que se forma por la acción de la tirosinasa. Continúa la acción de la tirosinasa y, en cierto modo, es la más importante, esto es, su acción desaminante para dar lugar a la materia colorante roja, que, según Raper, es la 5-6-quinona del ácido dihidroxindolcarboxílico. Una vez formado este cuerpo, ya no se necesita la acción de cimasas, sino que el simple oxígeno molecular la transforma en otros productos y da finalmente melaninas.

Salta, a primera vista, una diferencia notable entre el proceso que tiene lugar en los animales y el que se observa en la planta que estamos estudiando y es, en nuestro caso, la acción rapidísima de la tirosinasa en presencia del oxígeno atmosférico para formar melaninas.

Esto supone que debe buscarse el medio para destruir o eliminar la acción de la cimasa antes de haber obrado en la planta, evitando así la formación extemporánea de la materia colorante roja.

CONCLUSIONES

1. El *Pachycereus marginatus* es abstracto muy apropiado para el estudio de la acción de la tirosinasa sobre la tirosina, y compuestos semejantes.
2. El *Pachycereus marginatus* contiene cimasas oxidantes, entre ellas tirosinasa, de acción muy enérgica.
3. Del *Pachycereus marginatus* he aislado tirosina en determinadas condiciones.
4. En circunstancias más suaves he obtenido cristales de una substancia que tiene íntima relación con la tirosina.
5. La materia negra en que se transforman los extractos de jugo de esta planta, contienen melanina, de naturaleza semejante a la melanina tipo, y en mayor cantidad, otra substancia distinta a las melaninas conocidas.
6. La tirosina no produce melanina en el interior del *Pachycereus marginatus* por tener un pH inapropiado para ello.
7. Cambiando el pH del jugo de esta planta, se obtiene rápidamente una materia colorante roja, probablemente la 5-6-quinona del ácido dihidroxindolcarboxílico.
8. Pasando al pH 8.5 o por el oxígeno, el producto formado es melanina y otra substancia.
9. El cofermento que hace activa la acción de las cimasas oxidantes del *Pachycereus marginatus*, puede ser una sal de calcio y en mayor grado la reacción del medio.