

BOLETIN DEL INSTITUTO DE QUIMICA

U. N. A. M.

EDITORES:

DR. ALBERTO SANDOVAL L.

DR. JOSÉ LUIS MATEOS G.

Dirección Torre de Ciencias, Piso 11, Ciudad Universitaria.
México 20, D. F.

*Este boletín se publicó con la ayuda económica del Instituto Nacional
de la Investigación Científica.*

VOL. XI

1959

Bol. inst. quim. univ. nal. auton. Mex. XI, pág. 3-14 (1959).

ESTUDIO DEL METILGLIOXAL Y LA GLIOXALASA.*

B. Arreguín

Contribución N° 104 del Instituto de Química de la Universidad Nacional
Autónoma de México.

La conversión enzimática del metilglioal (I) a ácido láctico (II) fue observada por primera vez en tejidos animales por Neuberger (12) y por Dakin y Dudley (3, 4). En este proceso de óxido-reducción los elementos del agua se agregan a los glioales. Lohmann (11) reportó posteriormente que el glutatión reducido actúa como coenzima. La fig. 1 representa la reacción en su forma más simple.



II

Fig. 1

* Traducido del Fiton IV, 53 (1958), con permiso de los editores.

Lohmann (11) y Jowett y Quastel (10) suponen la formación enzimática de un complejo entre el metilglioxal y el glutation, el cual actúa como intermediario en la formación del ácido láctico. Yamazoe (16) demostró la formación biológica de este complejo entre glioxal y glutation en presencia de glioxalasa, lo aisló y probó que es diferente del compuesto químico formado por la simple adición del metilglioxal al glutation. El compuesto biológico es estable en solución ácida pero se descompone lentamente arriba de pH 5.0 y también arriba de los 160° C., produciendo ácido láctico.

El compuesto químico en soluciones acuosas se disocia en sus componentes. Yamazoe (16) demostró también que la forma reducida de glutation es la coenzima activa y que no se convierte a la forma de disulfuro, ya que esta última no participa en la reacción biológica.

Más recientemente Hopkins y Morgan (9) encontraron en el corazón de res una substancia de naturaleza proteica que acelera la formación de ácido láctico por la glioxalasa. Crook y Law (2) demostraron, trabajando también con preparaciones de corazón de res, que la conversión de glioxalasa a los correspondientes hidroxiacidos se efectúa por la acción de dos enzimas que reunidas constituyen la glioxalasa. También Racker (14) probó la existencia de estas dos enzimas trabajando con preparaciones de levadura y corazón de res. Agregando la enzima de levadura de pan, que llama enzima I, a la mezcla de metilglioxal y glutation reducido, obtuvo un producto de condensación que tiene una absorción aumentada en el espectro ultravioleta. La velocidad del aumento de absorción a 240 m μ es proporcional a la cantidad de enzima I. El producto obtenido en esta forma es atacado por otra enzima, obtenida de hígado de res, y llamada glioxalasa II, que lo convierte en ácido láctico, regenerando el glutation reducido, el cual queda libre para actuar continuamente como coenzima.

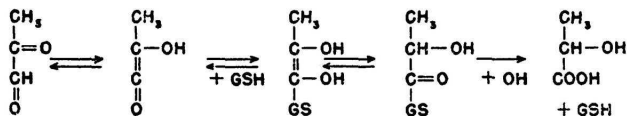


Fig. 2

En la fig. 2 se dan las reacciones propuestas por Racker (14). También se ha reportado la presencia de la glioxalasa en algunas plantas superiores (8).

METODOS

Obtención de glioxalasa de frutas del género *Capsicum*.

Se usaron las siguientes variedades de chiles: *Capsicum annum acuminatum* y *Capsicum annum grossum*. Estos se obtuvieron en el comercio en la forma más fresca posible. Toda la preparación se hizo en frío (5° C.). Se abrieron los frutos, se eliminaron las semillas y se cortaron en pedazos pequeños que fueron desintegrados en una licuadora en presencia de una solución de sacarosa (0.2 M). Se coló el material homogeneizado por una tela y se centrifugó el líquido durante varios minutos a 3000 rpm. Se eliminó el precipitado formado principalmente por células intactas y restos de membrana celular. El color del sobrenadante, depende del estado de madurez de los chiles. Se centrifugó una vez más este sobrenadante en frío durante 20-25 min. a 11,000 rpm. El sedimento que contenía los mitocondrios fue suspendido en agua o en sacarosa 0.2 M y fue dializada en frío usando agua destilada en equipo de vidrio, después de lo cual, el material quedó listo para probar su actividad.

Se usó el mismo método para la cebolla. Los bulbos se desintegraron en una licuadora con solución de sacarosa 0.2 M, se colaron y fraccionaron en una centrifuga en la forma antes descrita.

La actividad enzimática de los mitocondrios fue medida manométricamente (2, 11, 13).

Uno o dos mg. de glutation reducido se colocaron en el brazo lateral de un matraz Warburg, junto con cantidades variables de metilglioxal, previamente ajustado a pH 7.2-7.4. El substrato se obtuvo de firmas comerciales o fue sintetizado según (7, 15). En seguida se introdujeron con una pipeta en el cuerpo principal del matraz de 0.2 a 0.3 ml. de bicarbonato de sodio 1M seguidos de la cantidad adecuada de la preparación enzimática. Se ajustó el volumen del líquido a 3.0 ml. La temperatura del baño se mantuvo a 25° C, mientras una corriente de dióxido de carbono mezclada con nitrógeno se pasaba a través del matraz durante 10 min. Después

de equilibrar la temperatura se inclinaron los matraces mezclándose las sustancias y se abrieron las llaves al aire durante 4 min. después de los cuales se cerraron y se tomaron lecturas. Se sabe por observaciones anteriores (10, 13) que hay una rápida liberación inicial de gas cuando los componentes de la reacción se mezclan. En esta investigación se encontró que esto ocurre porque el glioxal no neutralizado contiene una sustancia ácida aun estando acabado de preparar. Posteriormente presentaremos un estudio cinético de la liberación inicial.

El metilglioxal es un líquido amarillento bastante inestable que en un medio alcalino se dismuta a ácido láctico. En fase de vapor existe como el monómero (7) y a temperatura ambiente se encuentra principalmente como el dímero. En las soluciones acuosas esta presente el metilglioxal en forma monómera, y es así como generalmente se vende en el comercio. El metilglioxal acabado de preparar (5) tiene un índice de refracción de $n_D^{20} = 1.3951$ que se eleva a 1.4733 en unas cuantas horas.

El metilglioxal, puro o en solución, se oxida lentamente, produciendo ácido pirúvico que es el contaminante que produce la reacción ácida como se demostrará posteriormente. Se ha reportado (7) que en tres meses 24% del metilglioxal se convierte en ácido pirúvico. El pH de las preparaciones hechas con metilglioxal acuoso es de cerca de 3.0 y esta acidez no puede ser atribuida exclusivamente a la forma enólica.

RESULTADOS

Liberación de CO_2 del metil glioxal en ausencia de glioxalasa.
La acción de tampones alcalinos a un pH 8.0 sobre el metilglioxal (1) produce (2.6%) de ácido láctico después de 6 horas. Esta reacción es monomolecular. La conversión es cuantitativa solamente a pH 12.5. Todas las reacciones se verificaron a pH 8 y en estas condiciones el error es pequeño.

Se estudió manométricamente la liberación de CO_2 del metilglioxal en ausencia de enzima; para ello se usó metilglioxal sin neutralizar, con un exceso de bicarbonato y manteniendo los manómetros cerrados desde el principio. La velocidad de agitación fue

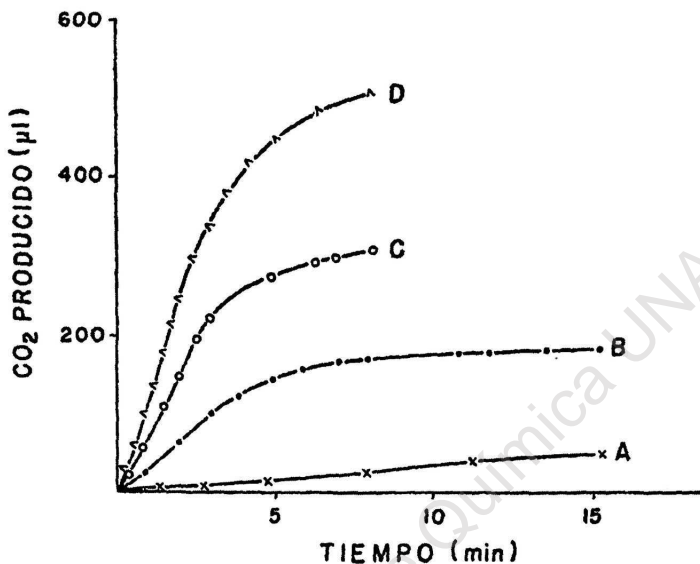


Fig. 3. Reacción no enzimática. Liberación de CO_2 de cantidades variables de metilgloxal en presencia de 0.2 ml. de bicarbonato de sodio 1.0 M y 2 mg. de glutatión reducido. El control no tiene bicarbonato. Volumen total 3.0 ml. A El control contiene 2 mg. de metilgloxal. B. 2 mg. de metilgloxal. C. 4 mg. de metilgloxal. D. 6 mg. de metilgloxal.

de 100 veces por minuto. En la fig. 3 se presentan los resultados obtenidos con tres diferentes concentraciones de metilgloxal; estos indican claramente que la cantidad de dióxido de carbono producida es proporcional a la cantidad de ácido presente en el metilgloxal.

Usando la ecuación de las reacciones de primer orden en su forma integrada y sustituyendo en ella los valores de la fig. 3, se obtiene para k un valor promedio de $8.9 \times 10^{-4} \pm 0.8$. El error queda dentro de un margen permisible, indicando que la reacción es de primer orden.

La muestra utilizada se obtuvo por destilación a 30° y 24 mm. de una solución comercial al 40% de metilgloxal en agua.

Con esta fracción se prepararon dos derivados. La bis-2,4-dini-

trofenilhidrazona con p. f. 301-303° (Kofler) [reportado: 297° (7)]. La bisfenilhidrazona, recristalizada dos veces de metanol-agua y de éter-metanol fundió a 152-153° [reportado: 153-154° (7)].

También se preparó el metilglioxal sintéticamente, según un método en el cual la acetona anhidra se oxidó con óxido de selenio (7, 15). El producto obtenido produjo una bisfenilhidrazona que fundió a 151-153° y no dio depresión con el derivado del producto comercial. La semicarbazona del metilglioxal, de color blanco, fundió a 268-270°, descomponiéndose.

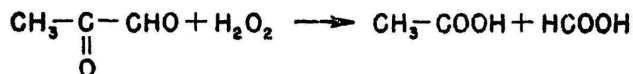
TABLA I.—Cromatografía en papel de metilglioxal y ácidos pirúvico y láctico.

Etanol-amoniaco-agua 90/5/5 v/v. Cromatografía descendente 7 horas. Reactivo: Cloruro férrico acuoso al 1% y secado en calor seco a 100° C.

Substancia	Manchas obtenidas	Color después de atomizar con cloruro férrico	R _f
Acido pirúvico	1	Amarillo	0.546
Metilglioxal	2	Amarillo café	0.81
		Verde grisáceo	0.56
Acido láctico	1	Verde grisáceo	0.55
Metilglioxal + NaHCO ₃	3	Café	0.30
		Amarillo	0.55
		Amarillo café	0.81

El índice de refracción del metilglioxal sintetizado, tomado después de una hora, fue de n_{23}^D 1.4560 y el pH del producto es de cerca de 3.2. Sin embargo, cuando se acaba de preparar, la cantidad de ácido contenido en el producto es mucho menor, como se confirmó por titulación con base antes y después de someterlo a una oxidación con peróxido de hidrógeno al 10% (6). Este procedimien-

to produce dos equivalentes de ácido por cada molécula de metilglioxal, según la siguiente ecuación:



El pKa del ácido presente en el metilglioxal, determinado por titulación con hidróxido de sodio 0.5 M, fue de 4.60. No se pudo usar este valor para identificar el ácido, puesto que los valores pKa para los ácidos láctico y pirúvico están muy cercanos.

Cromatografía en papel

Se cromatografiaron muestras de metilglioxal comercial y sintetizado junto con los ácidos pirúvico y láctico en papel Whatman Nº 1 usando etanol-amoniaco-agua a 90/5/5 v/v. Por cromatografía descendente se obtuvieron del metilglioxal dos manchas después de rociar con cloruro férrico acuoso o con nitrato de plata amoniacal. Las dos manchas tienen valores de R_f de 0.55 y 0.81 con la mezcla de disolventes indicada; el ácido pirúvico mostró un R_f de 0.546 y el ácido láctico 0.57 con la misma mezcla. Estos resultados parecen indicar que el ácido contenido en el metilglioxal es el ácido pirúvico. También se sometió a cromatografía en papel una muestra de metilglioxal a la que se le había agregado una pequeña cantidad de bicarbonato de sodio; se obtuvieron tres manchas visibles, después de rociar con cloruro férrico. En la tabla I se presentan los resultados obtenidos en un experimento típico de esta especie.

Los resultados de la cromatografía indican que el metilglioxal ajustado a un pH ligeramente alcalino forma sustancias con un R_f más bajo. Las sustancias con R_f de 0.55 producidas por el metilglioxal solo y después de ser tratado con bicarbonato, reaccionan con indicadores como el verde bromo-cresol lo mismo que con cloruro férrico y los colores amarillos producidos con este último reactivo son idénticos en ambos casos al color producido por el ácido pirúvico puro, mientras que el ácido láctico produce un color verde grisáceo con este mismo reactivo. Las sustancias a que nos hemos referido, reaccionan también con clorhidrato de semicarbazida. Si

acaso se formase ácido láctico por la acción alcalina del bicarbonato sobre el metilglioxal, este quedaría oculto por el ácido pirúvico existente en el metilglioxal. Por lo tanto, según los resultados de los experimentos, se puede llegar a la conclusión de que el metilglioxal se convierte espontáneamente a temperatura ambiente y hasta cierto grado en ácido pirúvico y que en cambio por la acción de un álcali suave como bicarbonato de sodio se transforma probablemente en ácido láctico (1) y en otra sustancia no identificada con R₁ de cerca de 0.30. La muestra comercial de metilglioxal contenía cerca de 12.5% de ácido pirúvico y la muestra acabada de sintetizar cerca de 3.6. Estos cálculos están basados en las medidas manométricas del CO₂ liberado.

Reacción enzimática. En la fig. 4 se sintetizan los resultados obtenidos con el *Capsicum annum grossum* Sendt. En esta operación

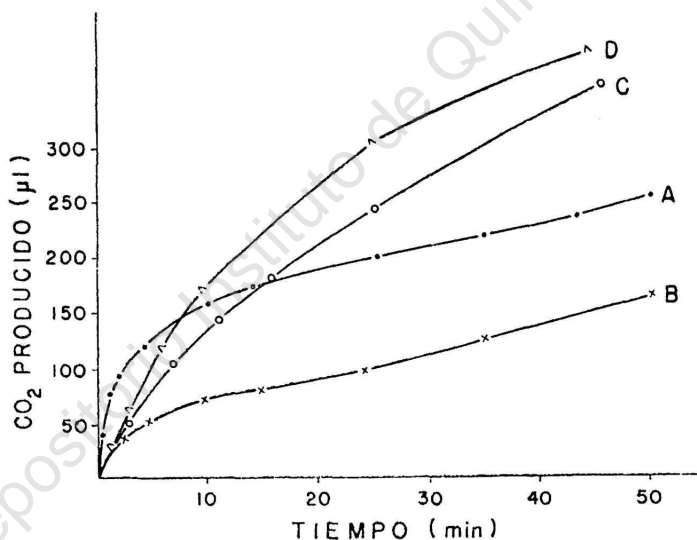


Fig. 4. Actividad de la glicoxalasa de los mitocondrios del *Capsicum annum grossum* Sendt.

Cada mezcla de reacción contiene 1 mg. de metilglioxal, 0.3 ml. de bicarbonato de sodio 1 M y 2 mg. de glutatión reducido. A y B contienen además 1.0 y 0.5 ml. de la misma preparación enzimática y 1 ml. de metilglioxal. C y D contienen 1.0 ml. y 0.5 ml. de otras dos preparaciones enzimáticas y 2 mg. de metilglioxal. Volumen total en cada frasco: 3.0 ml.

se usaron dos controles. Uno que contenía la enzima, bicarbonato de sodio y glutatión reducido y el otro metilglioxal ajustado a pH 7.2-7.4, bicarbonato de sodio y glutatión reducido.

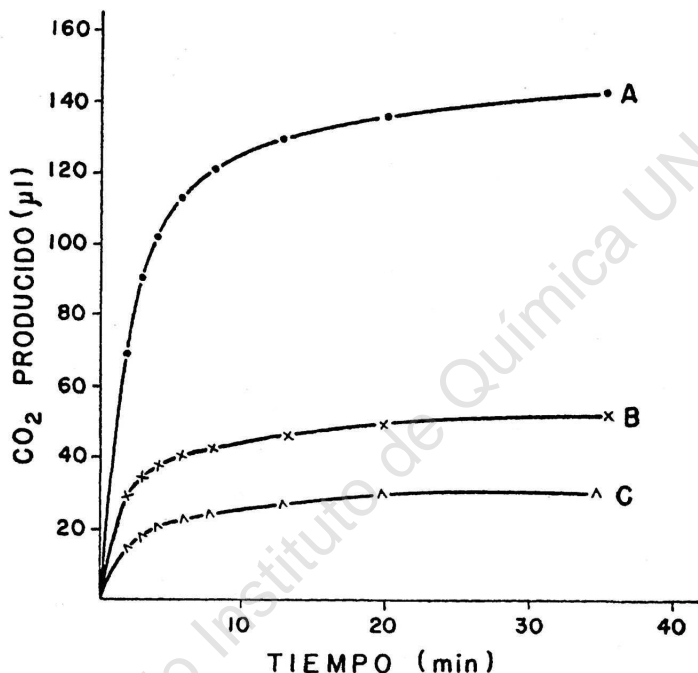


Fig. 5. Glioxalasa del *Capsicum annum acuminatum*.

Cada frasco contiene 1 ml. de preparación enzimática, 1 ml. de bicarbonato de sodio 0.2 M, 2 mg. de glutatión reducido y metilglioxal en las siguientes cantidades: A, 0.6 mg.; B, 0.3 mg.; C, 0.15 mg. El volumen líquido total en cada frasco está ajustado a 3.0 ml.

Las curvas A y B muestran que la velocidad de la reacción es proporcional a la cantidad de enzima presente en la mezcla de la reacción. Las curvas C y D representan datos tomados de otras dos preparaciones enzimáticas e indican las variaciones de actividad enzimática que se producen usando procedimientos de preparación idénticos.

Las figs. 5 y 6 representan resultados experimentales típicos con

Capsicum annum acuminatum. Los datos indican que el CO_2 producido es proporcional a la cantidad de metilgloxal agregado.

Se hicieron experimentos similares usando mitocondria obtenida de cebollas, en la forma que se ha descrito para los chiles y se presentan los datos en la fig. 7. Las cebollas contienen también una glioalasa activa.

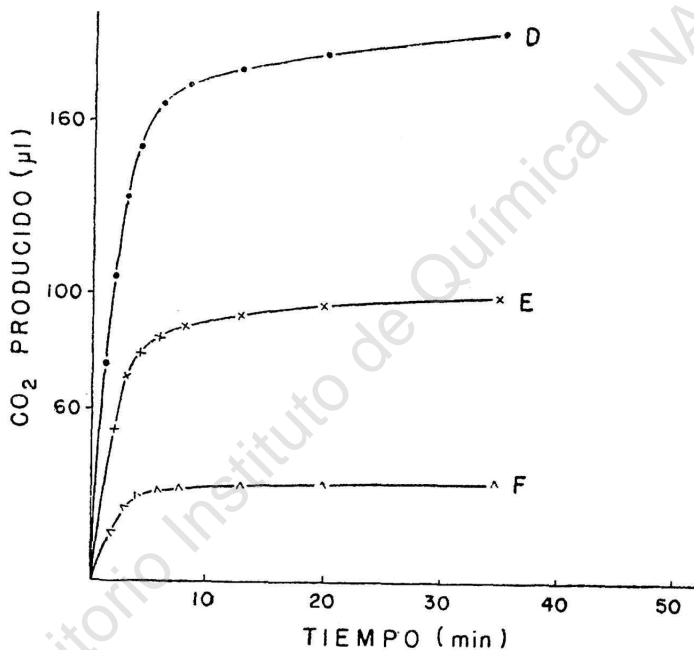


Fig. 6. Glioalasa del *Capsicum annum acuminatum*.

Cada frasco contiene 1 ml. de preparación enzimática, 1.0 ml. de bicarbonato de sodio 0.2 M, 2 mg. de glutatión reducido y las siguientes cantidades de metilgloxal: D, 1.0 mg.; E, 0.5 mg. y F, 0.25. El volumen del fluido está ajustado a 3.0 ml.

Se siguieron varios esquemas de fraccionamientos, para separar la enzima en dos componentes como ya se había logrado (14) con las enzimas de origen animal y de levadura. No se obtuvieron resultados positivos.

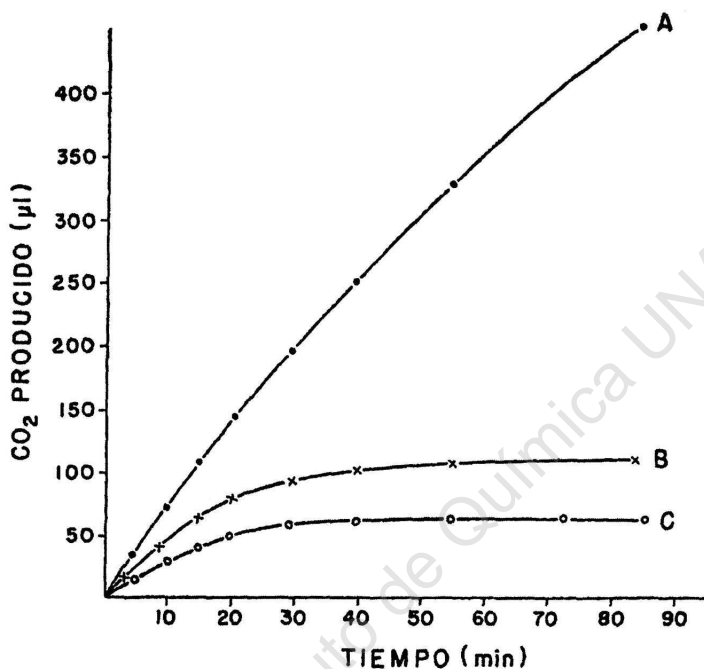


Fig. 7. Actividad de la glioxalasa de la mitocondria de la cebolla. La mezcla reaccionante contenía 0.2 ml. de bicarbonato de sodio 1 M, 1 mg. de suspensión enzimática, 1.8 mg. de glutatión reducido y metilglioxal ajustado a pH 7.2 en las cantidades siguientes:
 A, 1.5 mg.; B, 0.4 mg.; C, 0.2 mg. El volumen del fluido está ajustado a 3.0 ml.

RESUMEN

Se reportan las dificultades encontradas al trabajar con metilglioxal. Esta sustancia se convierte espontáneamente a ácido pirúvico.

La liberación química de CO₂ del bicarbonato de sodio y del ácido pirúvico es una reacción de primer orden.

Se ha establecido la existencia de glioxalasa en los frutos del género *Capsicum*. Hasta ahora no se han podido atribuir a esta enzima implicaciones fisiológicas en el metabolismo de las plantas superiores.

BIBLIOGRAFIA

1. N. Ariyama *J. Biol. Chem.* **77**, 359 (1928).
2. E. M. Crook y K. Law. *Biochem. J.* **52**, 492 (1952).
3. H. D. Dakin y H. W. Dudley. *J. Biol. Chem.*, **14**, 155 (1913).
4. H. D. Dakin y H. W. Dudley. *Ibid.*, **14**, 423 (1913).
5. H. O. L. Fischer y C. Taube. *Ber.* **57**, 1502 (1924).
6. J. O. Girsavicius. *Biochem. J.* **25**, 1807 (1931).
7. G. Hahn y O. Schales. *Ber.*, **67**, 1816 (1934).
8. F. G. Hopkins y E. J. Morgan. *Biochem. J.* **39**, 320 (1945).
9. F. G. Hopkins y E. J. Morgan. *Ibid.*, **42**, 23 (1948).
10. J. Jowett y J. H. Quastel, *Ibid.*, **27**, 486 (1933).
11. R. Lohmann. *Biochem. Z.* **254**, 332 (1952).
12. C. Neuberg, *Ibid.*, **49**, 502 (1913).
13. M. E. Platt y E. F. Schroeder, *J. Biol. Chem.*, **104**, 281 (1934).
14. E. Racker. *J. Biol. Chem.*, **190**, 685 (1951).
15. H. L. Riley y J. F. Morley. *J. Chem. Soc.*, **875**, (1932).
16. S. Yamazoye *J. Biochem. (Tokio)* **23**, 319 (1936).