



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA
BIBLIOTECA

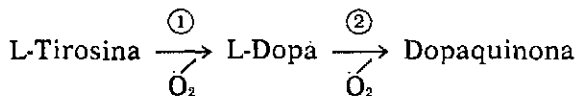
Estabilización de un intermediario de la ruta biosintética de las melaninas, el dopacromo

POR

JESUS D. GALINDO y
FRANCISCO A. BERNABEU

INTRODUCCION

La melanización es el proceso por el que las células de numerosos organismos fabrican una serie de pigmentos, cuya coloración varía desde el amarillo al negro, conocidos globalmente con el nombre de Melaninas, cuyo papel de protección de las estructuras celulares frente a la incidencia de la radiación electromagnética, aparte de otras misiones más controvertidas, está claramente establecido. Por ello, el estudio de la vía por la que dichos productos son sintetizados, a partir de sus precursores químicos naturales, ha tenido mucho interés como lo demuestran los trabajos de Raper (1), Mason (2) y Lerner (3). El único enzima que se sabe participa, como catalizador, en la biosíntesis de melaninas es Tirosinasa (E C 1.14.18.1), cuya actuación posibilita los dos primeros pasos universalmente reconocidos como parte de la ruta biosintética:

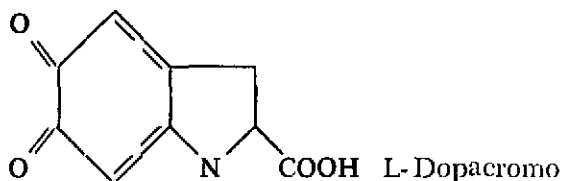


A partir de Dopaquinona, el resto de los pasos se desarrollan espontáneamente, de forma química, y la vía sintética sigue un camino esta-



blecido por Lerner y Fitzpatrick (4), del que, recientemente, miembros del Departamento Interfacultativo de Bioquímica han hecho un detenido estudio, proponiendo diversas modificaciones en función del pH (5).

Sin embargo, en todas las alternativas propuestas aparece como intermediario Dopacromo, compuesto coloreado, que absorbe a 305 y 475 nm, muy inestable a pH fisiológico, pues espontáneamente se transforma en compuestos de naturaleza polimérica. Dicha inestabilidad, precisamente, ha sido un obstáculo para su aislamiento y posterior utilización en experimentos tendentes a aclarar las dudas aún existentes en la vía biosintética de melaninas, así como en otro tipo de experimentos dirigidos a dilucidar el mecanismo de actuación del enzima responsable de su síntesis, Tirosinasa.



Este trabajo describe un método de obtención, aislamiento y almacenamiento, en condiciones de notable incremento de estabilidad respecto a las normales, de este importante intermediario de la ruta biosintética de las melaninas

EXPERIMENTAL

MATERIAL.

A partir de sus precursores, L-Tirosina o L-Dopa, Dopacromo puede sintetizarse química o enzimológicamente. Nosotros hemos elegido la segunda posibilidad por la fácil disponibilidad del enzima, además de que se elimina así la aparición, como subproductos, de compuestos químicos indeseables que inevitablemente aparecen en el medio si la síntesis se realiza químicamente, utilizando IO_3H , según el método de Graham y Jeffs (6).

Como fuente de enzima se empleó epidermis de *Rana Esculenta Ridibunda* obtenida de suministradores locales. Su reparación se llevó a cabo por el método de McGuire (7), ligeramente modificado por Lozano y colaboradores (8). Las epidermis, para su almacenamiento y utilización continuadas, eran liofilizadas en pequeñas fracciones, en un aparato «Telstar-Crioblac», y almacenadas en bolsas de plástico en congelador,

a -24°C , lo que permitió mantener su actividad enzimática, sin merma notable, durante períodos de más de un año.

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL ENZIMA

La extracción, de alícuotas de epidermis, del enzima, se efectuó de acuerdo con Lozano y col. (8). La purificación también se realizó por el mismo procedimiento descrito en el trabajo de Lozano y col., lo que llevó a una purificación de unas 4 veces.

La preparación obtenida y purificada de esta forma tenía a la proteína en forma de pro-enzima o zimógeno, inactiva. Para poder utilizarlo como catalizador, era necesario activar pro-Tirosinasa, lo que se logró pasando la disolución purificada por una columna de Pharmacia en la que la proteinasa Tripsina se encontraba inmovilizada, unida a un soporte de Sepharosa 6B, según el método de Iborra y col. (9). El paso de la disolución proenzimática, para lograr una actividad del 95-99 % de la actividad potencial, se realizó a una velocidad no mayor de 13 ml/h.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Se realizó espectrofotométricamente, siguiendo la aparición de Dopacromo a 475 nm ($\epsilon = 3.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que transforma 1 μ mol de L-Dopa/min, a 25°C .

La determinación de la actividad enzimática, en U.E./mg de proteína, fue posible tras calcular la concentración en proteínas de las diferentes disoluciones, lo que se consiguió empleando el método colorimétrico de Lowry (10), modificado por Hartree (11), o, alternativamente, el método de absorbancia, en U.V., de Kalb (12).

DESPROTEINIZACIÓN DE LAS DISOLUCIONES.

La eliminación de proteínas de elevado peso molecular (mayor de 25.000) se efectuó de la siguiente manera: 5 ml de la solución se colocaron en tubos de Amicón CF-25, centrifugándose a continuación a 4.000 g en una centrífuga Sorvall, durante un periodo que varió entre 1 y 2 h. El líquido del tubo se recogió después. Para eliminar péptidos de menor peso molecular se recurrió al paso de la disolución a desproteínizar por columnas de enzima inmovilizado en diferentes soportes.

SÍNTESIS DE DOPACROMO.

Esta síntesis se llevó a cabo, alternativamente, con enzima soluble, presente en el medio de reacción, o por el paso reiterado de una disolución del precursor químico utilizado, L-Tirosina, por una columna con enzima inmovilizado en diferentes soportes. En todos los casos se partió de disoluciones de L-Tirosina $2 \cdot 10^{-3}$ M.

En la síntesis realizada empleando enzima soluble se prepararon medios de reacción de las siguientes características: A 1.35 ml de disolución de L-Tirosina, $2 \cdot 10^{-3}$ M, se le añadieron 2 ml de disolución de Tirosinasa (0,5 mg/ml), y se diluyó hasta 25 ml. Tras la obtención del Dopacromo, el enzima era eliminado por desproteización.

La síntesis con enzima inmovilizado se llevó a cabo pasando por una placa porosa con Tirosinasa inmovilizada mediante diferentes soportes, 25 ml de la disolución de L-Tirosina $2 \cdot 10^{-3}$ M, hasta lograr su total conversión en Dopacromo. Los soportes empleados fueron Sepharosa 4B y Enzacril AA, y la inmovilización del enzima en dichos soportes se hizo de acuerdo con Manjón (13) y Cortés (14), aunque fuese almacenado en empujado de placa porosa en lugar de en columnas.

La determinación de la concentración de Dopacromo obtenido se logró espectrofotométricamente, empleando el máximo de absorción del producto en la zona del U.V., 305 nm, que presenta un valor de ϵ de $9.360 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 2,6 veces mayor que el ϵ del visible a 475 nm, según García-Carmona (15).

Las variaciones en las concentraciones de Dopacromo presentes en los medios se han seguido mediante la realización de barridos a longitudes de onda comprendidas entre 350 y 250 nm. La no presencia de restos de L-Tirosina al final de la reacción de obtención de Dopacromo se comprobó analizando una alícuota del medio final de reacción en un autoanalizador de aminoácidos Rank-Hilger.

Al degradarse el Dopacromo, su máximo a 305 nm desaparece, mientras aparece un máximo a 250 nm, propio del producto que empieza a formarse a partir de él. Así pues, los datos obtenidos de estabilidad de las disoluciones de Dopacromo se han conseguido por la determinación de la relación A_{305}/A_{250} .

DESCUPRIZACIÓN DE DISOLVENTES.

La eliminación de trazas de Cu^{+2} presentes como impurezas en productos empleados para la fabricación de buffers se logró pasando las disoluciones a descuprizar por una columna de Chelex-100, obtenido de

Bio-Rad, inmovilizado. La preparación de dicha columna se llevó a cabo embebiendo 20 g del producto comercial liofilizado en un volumen de 200 ml de agua durante 2 h, tras de lo cual se pasaron 200 ml de tampón fosfato, 0.1 M, pH 7, para ajustar el pH. El producto fue luego almacenado en tampón fosfato, 0.01 M, pH 7, hasta su utilización.

RESULTADOS

INFLUENCIA DE LA LUZ.

La luz tiene mucha importancia como factor acelerador de la síntesis de las melaninas. Riley (16) demostró que la luz produce un notable incremento en la actividad polimerizadora de los intermedios de naturaleza quinónica. Por otra parte, es también muy conocido (17, 18) que la luz activa pro-Tirosinasa «in vitro», transformándolo en enzima activo. Por ello, entre los factores a estudiar estaba el acceso de la luz a las muestras de Dopacromo, pues cabía esperar que influyera en la estabilidad de los intermediarios en la síntesis de melaninas.

Así pues, tras preparar una disolución de Dopacromo, se dividió ésta en dos alícuotas, una de las cuales se almacenó en un medio totalmente protegido de la incidencia de la luz, mientras la otra se mantuvo en contacto con ella. En la fig. 1 se muestra el diferente comportamiento de la estabilidad de ambas alícuotas (medidas por la evolución de la relación A_{305}/A_{250}). Como puede verse, la alícuota que permaneció en la oscuridad perdió un 28 % de la concentración inicial en Dopacromo al cabo de 27 h, mientras la expuesta a la luz, en sólo 8 h había perdido ya un 39 % de la suya.

PRESENCIA DE PROTEÍNAS EN EL MEDIO.

La formación de melaninas es una consecuencia del entramado molecular entre los polímeros de naturaleza indólica y moléculas de proteínas (2). Al tratar de conseguir un medio lo más estabilizador posible para un precursor de esa naturaleza, era necesario estudiar la estabilidad diferencial de Dopacromo en medios con presencia o ausencia de proteínas.

La fig. 2 muestra los resultados del experimento diseñado con este fin. Como puede verse, la estabilidad del compuesto es inversamente proporcional a la presencia de proteínas en el medio. Por otra parte, y dentro de aquellas disoluciones de Dopacromo obtenidas empleando enzima

inmovilizado, la más estable resultó ser la que se obtuvo con Tirosinasa unida al soporte Enzacril-AA, que fue el que se utilizó en todas las síntesis de Dopacromo posteriores.

CONCENTRACIÓN DE ALMACENAMIENTO.

Según Mason (2), las melaninas son el producto de la polimerización de intermediarios de tipo indólico, debido a su alta reactividad. Por ello cabe esperar que cuanto mayor sea la concentración de estos productos, tanto más rápido será el proceso; por consiguiente, nos propusimos estudiar el posible efecto desestabilizador de grandes concentraciones de Dopacromo sobre el propio compuesto.

La fig. 3 muestra la diferente estabilidad de disoluciones de Dopacromo de distinta concentración; la velocidad de desaparición del producto es mayor a medida que su concentración aumenta. El aparente aumento de la relación de absorbancias que puede observarse a tiempos cortos puede deberse a lo que propone Mason (19) de que, en determinadas condiciones, inmediatamente tras de su síntesis, Dopacromo puede evolucionar hacia su derivado descarboxilado, lo que desplazaría el máximo desde 305 hasta 298 nm.

TEMPERATURA.

Procesos químicos de similares características a las de nuestro problema apuntaban a la temperatura como factor acelerador del proceso degradativo. Se planteó, pues, una serie de experimentos tendentes a demostrar la influencia de la temperatura en la desestabilización del Dopacromo.

Fabricado Dopacromo en ausencia de proteínas, se dividió en 7 alícuotas, que se almacenaron, durante 6 h, a varias temperaturas entre 4 y 50°C, período durante el cual se midió la evolución de sus estabilidades. La fig. 4 muestra los resultados obtenidos: a temperaturas superiores a 25°C, la cinética de la transformación del Dopacromo fue de primer orden, mientras a las inferiores el proceso fue mucho más lento (desaparición menor al 2 %).

A continuación, y con objeto de determinar los parámetros termodinámicos de la desaparición del Dopacromo, se procedió a analizar el proceso a las temperaturas más altas. Se calcularon las constantes de velocidad (las pendientes de las rectas resultantes al representar $\ln A_{305}/A_{250}$ frente al tiempo, fig. 5), pues en las reacciones de primer orden:

$$-dC/dt = K \cdot C \quad ; \quad -dC/C = K \cdot dt,$$

$$\ln C = -K \cdot t + c \Rightarrow \ln A_{305}/A_{250} = -K \cdot t + c'$$

A partir de estas constantes de velocidad y empleando la fórmula de Arrhenius:

$$\ln K = -E_a/R \cdot 1/T + c$$

se calculó E_a representando $\ln K$ frente a $1/T$, y de acuerdo con las expresiones

$$\Delta G = RT [\ln K \cdot T/h - \ln k_1] \quad ; \quad \Delta H = E_a - RT \quad ;$$

$$\Delta S = \Delta H - \Delta G/T,$$

donde R es la constante universal de los gases; T , temperatura absoluta; K , constante de Boltzman; h , constante de Planck; k_1 , constante de velocidad del proceso a cada temperatura, en s^{-1} . Los valores obtenidos para los parámetros termodinámicos aparecen agrupados en la tabla 1. El cálculo del Q_{10} dio un valor de 2,5, típico de un proceso químico.

PRESENCIA DE DIVERSOS IONES EN EL MEDIO.

Mason (19) determinó que la velocidad de transformación de L-Dopa hacia productos de oxidación venía considerablemente influida por la fuerza iónica del medio: a mayor fuerza iónica, mayor velocidad. En nuestro Departamento se ha comprobado también que la fuerza iónica influía en las dos actividades del enzima Tirosinasa (18, 20).

En fig. 6 se observan los resultados de una primera aproximación experimental al problema, modificándose la fuerza iónica del medio al variar la concentración del buffer fosfato que tamponaba el medio de reacción: a mayor fuerza iónica, más rápido descenso en la relación de absorbancias, observándose, además, aparición de precipitados negros de carácter melanínico en las de mayor fuerza iónica.

Para comprobar el efecto que pudieran tener, a una misma fuerza iónica, diferentes especies químicas, se diseñó otra serie de experimentos resumidos en la fig. 7. Mientras que en las series en que la fuerza iónica era suministrada por NaCl y buffer acético/acetato el comportamiento es totalmente similar, la serie llevada a cabo con buffer fosfato mostraba un comportamiento totalmente diferente, incluso con aparición de melaninas en las disoluciones de mayor fuerza iónica a las 2 h. Cabe hablar, pues, más que de efectos de la fuerza iónica, de efectos

diferenciados producidos por los diferentes aniones o cationes presentes en el medio. Acetato y Cl^- no parecen influir: fosfato sí lo hace, lo que quizá pudiera imputarse a interacciones con este intermediario melanogénico, tal como ya había sido sugerido anteriormente (21). El tampón fosfato, pues, no volvió a ser utilizado en los medios de síntesis y almacenamiento de Dopacromo.

Mención aparte merece la acción desestabilizadora del ión Cu^{+2} . Las otras especies estudiadas, incluso los fosfatos, provocan una desestabilización paulatina del Dopacromo. Por contra (tabla 2), el Cu^{+2} , incluso a fuerzas iónicas muy bajas, produce una inmediata desestabilización del Dopacromo, incluso con cambio total del aspecto físico de la disolución: variación de color rojo a gris, aparición inmediata de pigmentos melanínicos, etc. Posiblemente estos fulminantes efectos puedan atribuirse a que el poder quelatante del Cu^{+2} sobre compuestos quinónicos, como el Dopacromo, facilitaría el ataque de esos compuestos por el O_2 ; en este sentido, hay que indicar que el Cu^{+2} , formando parte de medios oxidantes, ha sido utilizado en la oxidación de L-Tirosina y de péptidos que poseen dicho aminoácido en el extremo aminoterminal, a aminocromos (22).

El Dopacromo, pues, es mucho más estable en medios de baja fuerza iónica (el medio acuoso es el más estable), y en aquellas ocasiones que haya que emplear una cierta fuerza iónica, debe eliminarse cualquier presencia residual de Cu^{+2} .

INFLUENCIA DEL pH.

También el pH del medio debe tener una influencia notable en la estabilidad de los compuestos melanogénicos. Mason (19) ya había propuesto que, en medio ácido, Dopacromo evoluciona a otro compuesto en el que los grupos quinónicos han sido reducidos, mientras en medio básico, se produce la descarboxilación. De hecho, nosotros efectuamos una comprobación de este hecho, pues analizando cualitativamente, mediante un cromatograma en capa fina, Dopacromo en medio acuoso (pH 7), y otras muestras a pH ácido y básico, aparecían especies químicas diferentes.

La fig. 8 muestra los resultados obtenidos al someter a Dopacromo a un amplio espectro de pH. Puede observarse que, en el intervalo 5-8, Dopacromo es bastante estable, mientras que los pH extremos provocan rápidos descensos de la estabilidad.

En tiempos cortos, las transformaciones del Dopacromo por efecto del pH parecen reversibles, pues los cromatogramas, en capa fina, obte-

nidos de las mezclas: Dopacromo + ácido + base y Dopacromo + base + ácido, fueron totalmente equivalentes.

Por último, la aparición de puntos isosbéticos a 245 y 282 nm en el espectro de seguimiento de la degradación del Dopacromo en medio ácido y básico, respectivamente, apunta a que, en cada caso, el compuesto se transforma en un solo producto.

LIOFILIZACIÓN.

Puesto que el oxígeno es el agente oxidante fundamental que oxida al Dopacromo hacia los productos posteriores en la vía melanogénica, se pensó que eliminándolo del entorno, se conseguiría aumentar la estabilidad del producto; la liofilización del producto se juzgó como lo más interesante para conseguir este fin.

Sintetizado Dopacromo con enzima inmovilizado en Enzacril-AA actuando sobre L-Tirosina, una alícuota de él se conservó a 0-4° C y en la oscuridad, mientras el resto se liofilizó, en varios tubos, de forma que cada uno de ellos sirviera para un ensayo, en un liofilizador «Telstar-Crioblac», almacenando luego el material liofilizado en una cámara de vacío, a 0-4° C y en la oscuridad, hasta el momento de ser analizado.

A diferentes tiempos, se realizaron espectros del material liofilizado y del que se conservaba en disolución, con fines comparativos. El resultado, mostrado en la tabla 3, indica claramente que mientras el mantenido en disolución a los 28 días había disminuido su relación de absorancias en un 50 %, el liofilizado lo mantuvo invariable durante 106 días, sin que en los tubos cambiase el aspecto externo del producto, a diferencia de los que mantenían Dopacromo en disolución, en los que aparecieron pigmentos melanínicos a partir del día 28.

CONCLUSIONES

La finalidad de este trabajo era conseguir en las condiciones habituales que un compuesto de interés por su estratégica situación en la ruta biosintética de las melaninas pueda estabilizarse, aislarse y utilizarse en los estudios que sobre dicha ruta y el enzima que lo cataliza, se llevan a cabo por el grupo de investigación de melaninas de nuestro Departamento. Para lograrlo hemos ido estudiando, una a una, la influencia que sobre dicha estabilidad tienen cada una de las variables del medio de síntesis.

De lo hecho, podemos establecer que Dopacromo es más estable si se sintetiza enzimáticamente, con el enzima Tirosinasa inmovilizado sobre un soporte inerte (particularmente rentable es el soporte Enzacril-AA), en un medio de baja o nula fuerza iónica, en el que no debe haber presencia de ciertas especies químicas, como fosfatos o Cu^{+2} que, sobre todo el último, constituyen catalizadores de una rápida conversión del intermediario en pigmentos de tipo melanínico, y a pH neutro. Una vez sintetizado, su conservación es tanto más prolongada en el tiempo si se le mantiene en la oscuridad, a temperaturas bajas (inferiores a 20°C), y en concentraciones más bien diluidas en un medio exento de proteínas. La estabilidad se hace máxima si el producto es liofilizado tras su síntesis y mantenido en condiciones de vacío y baja temperatura hasta su uso.

En resumen, podemos afirmar que para obtener y conservar Dopacromo durante un período de tiempo amplio (106 días, al menos), lo mejor es proceder de la siguiente manera: síntesis a partir de L-Tirosina, de concentración $2 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ o menor, disuelto en agua a pH 7, haciéndolo pasar, hasta que no quede más sustrato, por un embudo de placa porosa con enzima Tirosinasa, purificado y activado, inmovilizado sobre Enzacril-AA. Para almacenarlo, se le introduce en un tubo adecuado y se le liofiliza, guardando el material liofilizado, hasta su uso, en ambiente de vacío, en la oscuridad y a una temperatura baja (mejor, en cámara fría, entre $0-4^{\circ}\text{C}$).

AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido posible, en parte, gracias a una ayuda de la «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica». Agradecemos también la ayuda y los consejos de los Doctores García Cánovas y García Carmona, compañeros del Departamento Interfacultativo de Bioquímica.

RESUMEN

En la ruta propuesta para la biosíntesis del grupo de pigmentos conocidos con el nombre de Melaninas aparece un intermediario, Dopacromo, inestable en las condiciones habituales de obtención, cuyo aislamiento y almacenamiento, en condiciones de estabilidad, resulta interesante para el estudio de la ruta biosintética, así como para el del mecanismo del único enzima que participa en ella, Tirosinasa. En el presente trabajo se han estudiado, una a una, todas las variables de la que depen-

día la estabilidad del compuesto, y se ha establecido en método de obtención y aislamiento del producto, que garantiza un notable periodo de tiempo, de más de cien días, en que el compuesto se mantiene estable, durante el cual puede ser utilizado sin problemas.

ABSTRACT

The biosynthesis of the pigments known as melanins involves an intermediate, Dopachrome, unstable at standard conditions. The isolation and storage of this compound was interesting for its use in a better study of the pathway and the main features of Tyrosinase, the only known enzyme involved in melanins biosynthesis. In this work, all variables affecting to the stability of Dopachrome have been studied, and a method of synthesis and isolation in conditions that assure a good time period (more than 100 days) of stability have been established. During this period, is possible to utilize it without any problem.

TABLA 1

CARACTERISTICAS TERMODINAMICAS DEL PROCESO DE DEGRADACION
TERMICA DEL DOPACROMO

E_a: ENERGIA DE ACTIVACION DEL PROCESO: 13.551 cal/mol

	25° C	30° C	37° C	50° C
K ₁ × 10 ⁻⁵ (seg ⁻¹)	1,5	2,3	3,5	9,3
ΔH(Kcal/mol)	12,9	12,9	12,9	12,9
ΔG(Kcal/mol)	24,0	24,1	24,4	24,9
ΔS(cal/mol °K)	-37,0	-37,0	-37,2	-37,1

TABLA 2

VARIACION DE LAS A₃₀₅, A₂₅₀ Y A₃₀₅/A₂₅₀ DEL DOPACROMO, ALMACENADO
EN CONCENTRACIONES 4 × 10⁻⁵ Y 8 × 10⁻⁵ M, AL PONERLO EN CONTACTO
CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Cu⁺²:

Dopacromo de partida 4 × 10⁻⁵ M: A₃₀₅ = 0,225; A₂₅₀ = 0,12; $\frac{A_{305}}{A_{250}} = 1,875$

Dopacromo de partida 8 × 10⁻⁵ M: A₃₀₅ = 0,51 ; A₂₅₀ = 0,23; $\frac{A_{305}}{A_{250}} = 2,217$

Dopacromo	4 × 10 ⁻⁵ M			8 × 10 ⁻⁵ M		
	ΔA ₃₀₅	ΔA ₂₅₀	Δ $\frac{A_{305}}{A_{250}}$	ΔA ₃₀₅	ΔA ₂₅₀	Δ $\frac{A_{305}}{A_{250}}$
Cu ⁺²						
1,6 × 10 ⁻⁴ M	+ 0,02	+ 0,06	- 0,51	+ 0,03	+ 0,15	- 0,79
8 × 10 ⁻⁵ M	+ 0,015	+ 0,05	- 0,46	+ 0,02	+ 0,11	- 0,65
4 × 10 ⁻⁵ M	+ 0,01	+ 0,04	- 0,40	+ 0,01	+ 0,08	- 0,53
2 × 10 ⁻⁵ M	0	+ 0,03	- 0,37	-	-	-
8 × 10 ⁻⁶ M	-	-	-	0	+ 0,04	- 0,32

TABLA 3

COMPARACION ENTRE LOS COCIENTES A₃₀₅/A₂₅₀ DEL DOPACROMO
CONSERVADO LIQUIDO Y LIOFILIZADO

Tiempo dias	Líquido A ₃₀₅ /A ₂₅₀	Liofilizado A ₃₀₅ /A ₂₅₀
0	2	2
2	1,44	2,04
7	1,10	2,18
11	1,05	2,02
28	1,05	2,11
85	-	2
106	-	2,16

REFERENCIAS

1. RAPER, H. S. (1928), *Physiol. Review*, 8, 245-282.
2. MASON, H. S. (1948), *The Journal of Biological Chemistry*, 172, 83-99.
3. LERNER, A. B.; FITZPATRICK, T. B.; CALKINS, E., y SUMMERSON, W. H. (1949), *The Journal of Biological Chemistry*, 178, 185-195.
4. LERNER, A. B., y FITZPATRICK, T. B. (1950), *Physiol. Review*, 30, 91-123.
5. GARCÍA CÁNOVAS, F.; GARCÍA CARMONA, F.; VERA, J.; IBORRA, J. L., y LOZANO, J. A. (1982), *The J. of Biol. Chem.*, 257, 8738-8744.
6. GRAHAM, D. G., y JEFFS, P. W. (1977), *The J. of Biol. Chem.*, 252, 5729-5734.
7. MCGUIRE, J. S. (1970), *Biochemical Biophysical Research Communications*, 40, 1084-1088.
8. LOZANO, J. A.; MONTSERRAT, F.; GALINDO, J. D., y PEDREÑO, E. (1975), *Revista Española de Fisiología*, 31, 21-28.
9. IBORRA, J. L.; MANJÓN, A., y LOZANO, J. A. (1977), *The Journal of Solid-Phase Biochemistry*, 2, 85-96.
10. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J. (1951), *The J. of Biol. Chem.*, 193, 265-275.
11. HARTREE, E. (1972), *Analytical Biochemistry*, 48, 422-427.
12. KALB, V. F., Jr., y BERNLOHR, R. W. (1977), *Anal. Biochem.*, 82, 362-371.
13. MANJÓN, A. (1978), en «Inmovilización de Tirosinasa de epidermis de rana en Soportes sólidos insolubles en agua». Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, págs. 27-31.
14. CORTÉS, E. (1978), en «La Cromatografía de afinidad en la purificación de Tirosinasa de epidermis de rana». Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, páginas 27-32.
15. GARCÍA CARMONA, F.; PEDREÑO, E.; GALINDO, J. D., y GARCÍA CÁNOVAS F. (1979), *Anal. Biochem.*, 95, 433-435.
16. RILEY, P. A. (1977), *Symposium zoological Society London*, 39, 77-95.
17. MIKKELSEN, R. B.; TANG, D. H., y TRIPLETT, E. L. (1975), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 63, 980-985.
18. GALINDO, J. D. (1976), en «Extracción y Propiedades Generales de Dopa-oxidasa de epidermis de Rana Esculenta Ridibunda». Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, págs. 187-198.
19. MASON, H. S., y WRIGHT, C. I. (1949), *The J. of Biol. Chem.*, 180, 235-247.
20. GARCÍA CARMONA, F. (1980), en «Propiedades cinéticas de la actividad hidroxilante de Tirosinasa». Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, págs. 115-117.
21. SHIMIZU, O., e IMAKUBO, K. (1977), *Photochemistry and Photobiology*, 26, 541-543.
22. DEASY, C. L.; WALLING, L. H., y ALEXANDER, S. A. (1976), *The Journal of Organic Chemistry*, 39, 1429-1436.



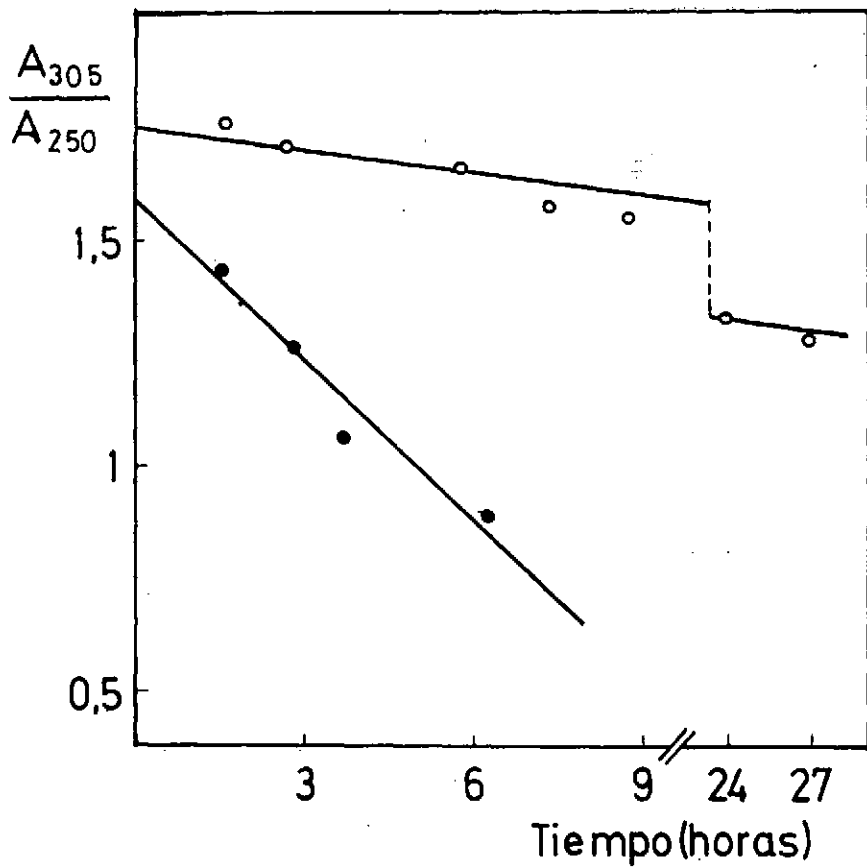


FIGURA 1 INFLUENCIA DE LA LUZ EN LA ESTABILIDAD DEL DOPACROMO.

O-O-O Tubo almacenado en la oscuridad

●-●-● Tubo sometido a la acción de la luz

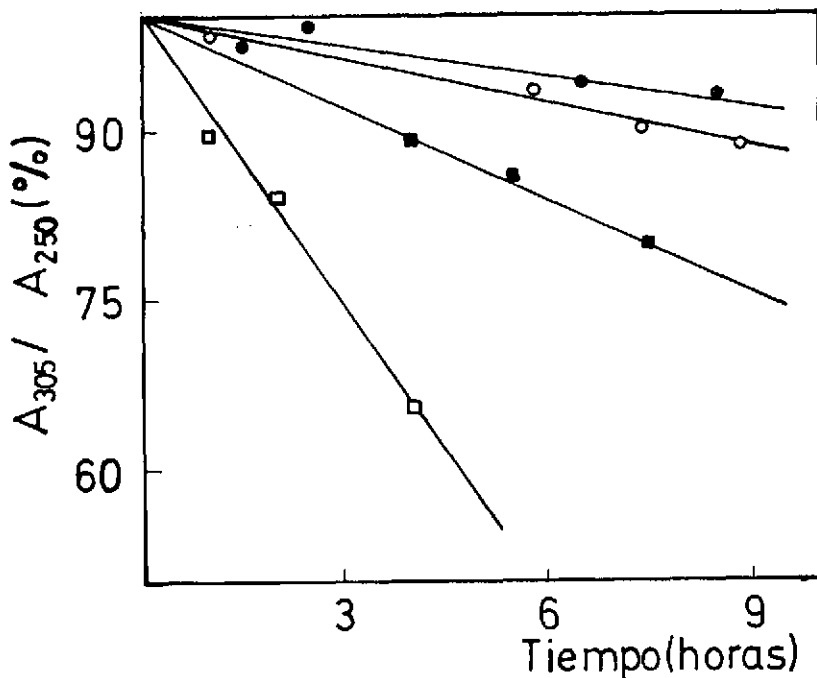


FIGURA 2 ESTABILIDAD DEL DOPACROMO EN FUNCION DE LA PRESENCIA DE PROTEINAS EN EL MEDIO.

- Dopacromo sintetizado con enzima soluble, sin desproteinizar.
- Dopacromo sintetizado con enzima inmovilizado en Sepharosa 4 B.
- Dopacromo sintetizado con enzima soluble, desproteinizado con conos de Amicón.
- Dopacromo sintetizado con enzima inmovilizado en Enzacril AA.

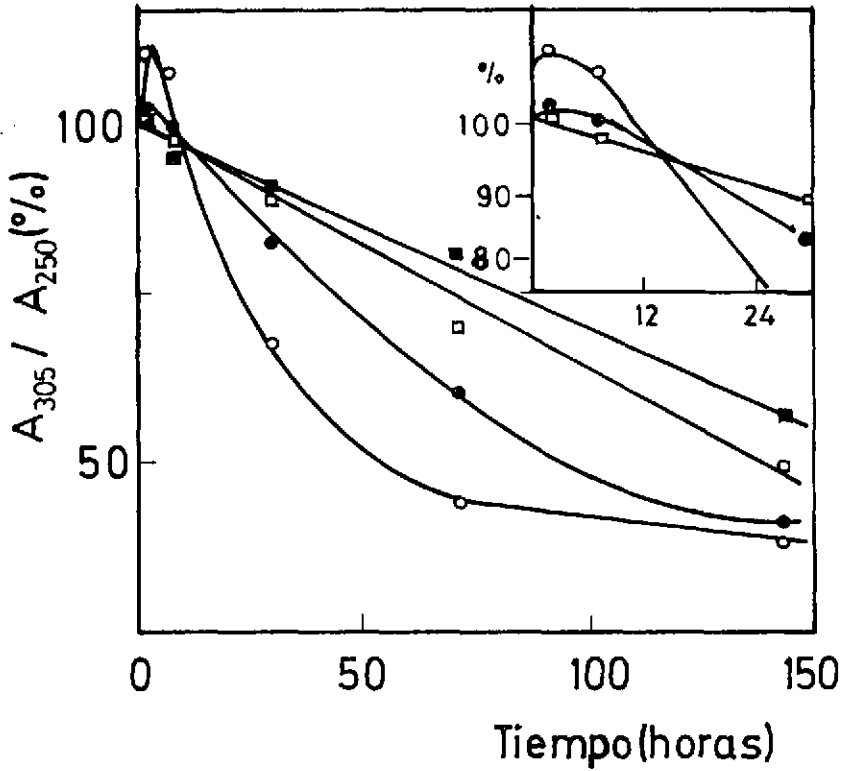


FIGURA 3 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA ESTABILIDAD DEL DOPACROMO. RECUADRO SUPERIOR DERECHO: DETALLE A TIEMPOS CORTOS.

- o-o-o 2×10^{-3} M
- 10^{-3} M
- 7×10^{-4} M
- $3,125 \times 10^{-4}$ M

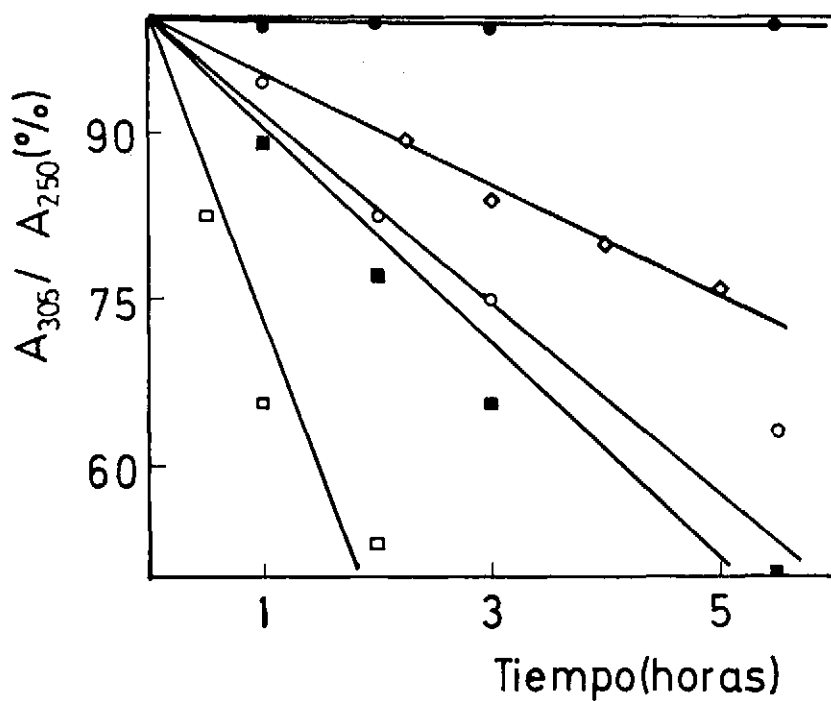


FIGURA 4. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DEL DOPACROMO.

□-□-□ 50°C
 ■-■-■ 37°C
 ○-○-○ 30°C

◇-◇-◇ 25°C
 ●-●-● 20;12;4°C

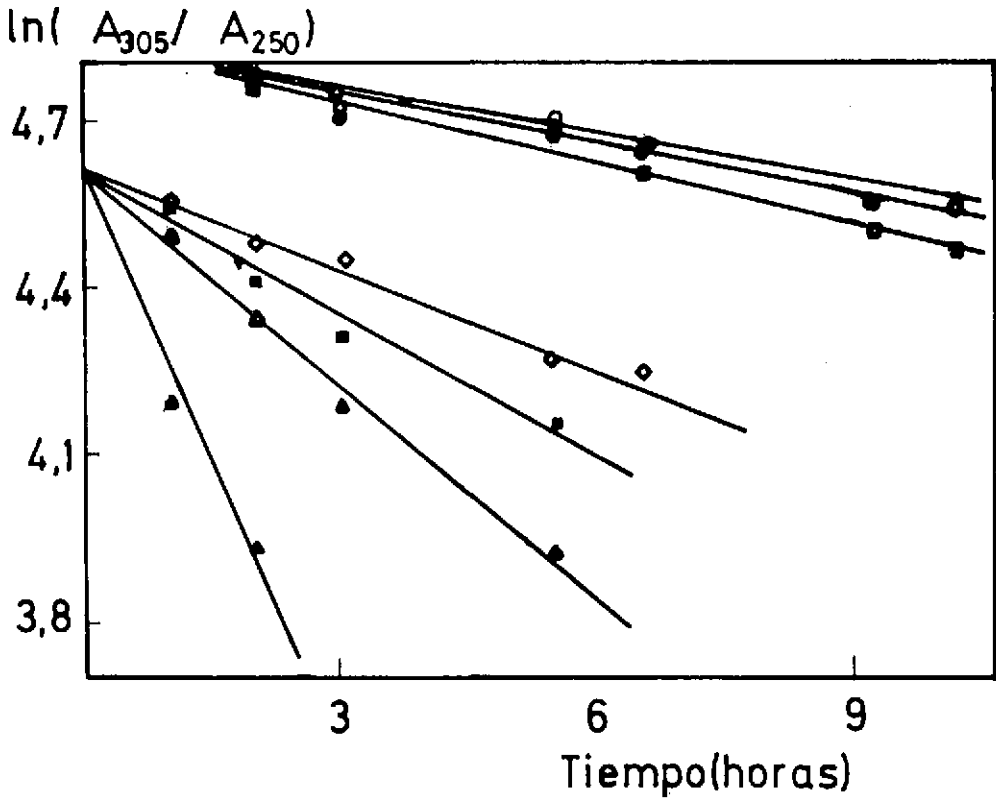


FIGURA 5. CALCULO DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE DEGRADACION CON LA TEMPERATURA.

- | | |
|------------|------------|
| ▲-▲-▲ 50°C | ◻-◻-◻ 20°C |
| △-△-△ 37°C | ●-●-● 12°C |
| ■-■-■ 30°C | ○-○-○ 4°C |
| ◇-◇-◇ 25°C | |



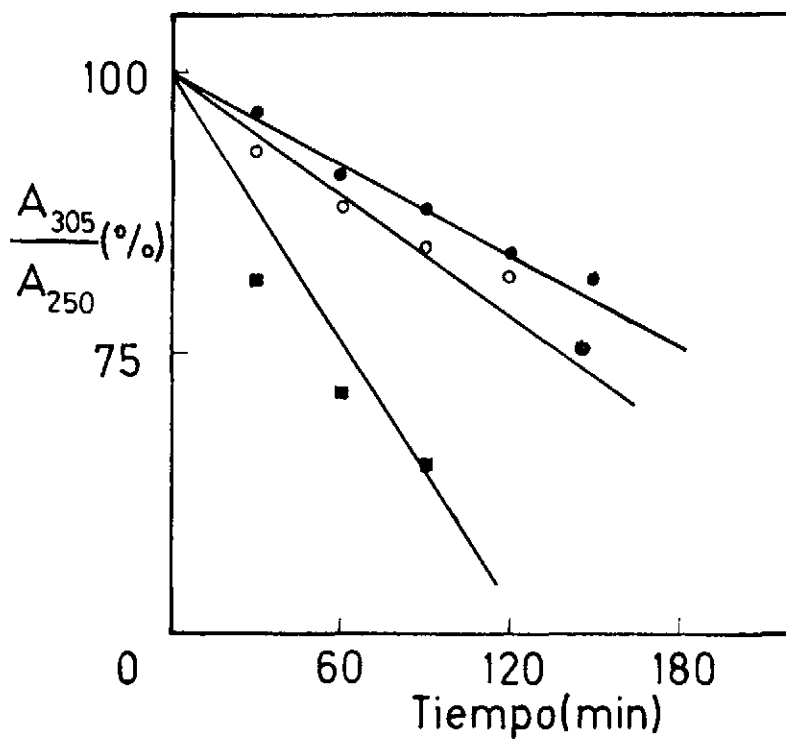


FIGURA 6. VARIACION DE LA ESTABILIDAD DEL DOPACROMO CON EL DISOLVENTE.

- Tampón fosfato 0,1 M, pH 7
- Tampón fosfato 0,01 M, pH 7
- Agua bidestilada

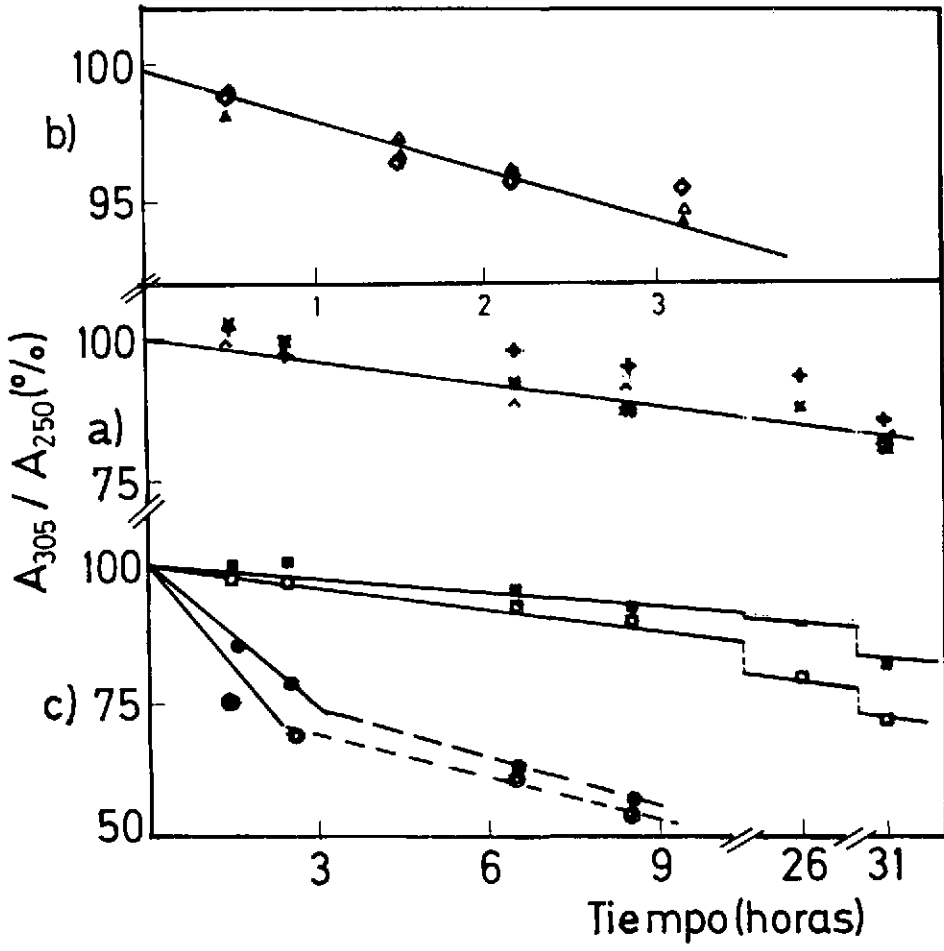


FIGURA 7. ACCION DE DIVERSOS ANIONES EN LA ESTABILIDAD DEL DOPACROMO.

Serie a)	{ <ul style="list-style-type: none"> ~ 0,1 M ◆ 0,01 M ■ 0,001 M (Cl⁻) 	{ <ul style="list-style-type: none"> ▲ 0,1 M ◇ 0,05 M ● 0,01 M 		
			Serie b)	{ <ul style="list-style-type: none"> ○ 0,5 M ● 0,1 M ■ 0,01 M ■ 0,001 M

(Fosfato)



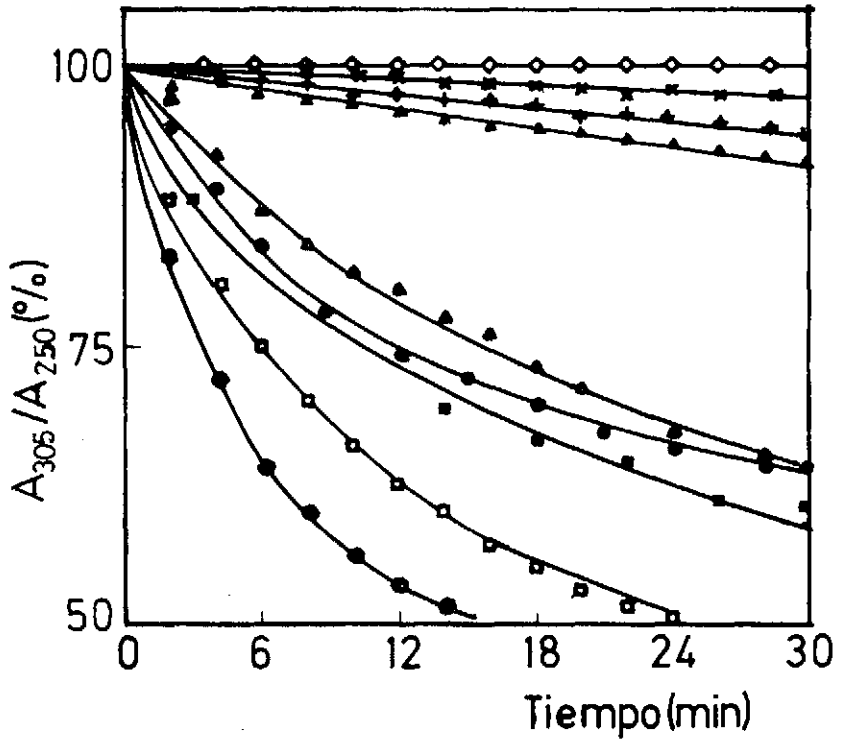


FIGURA 8. EFECTO DEL pH SOBRE LA ESTABILIDAD DEL DOPACROMO.

o-o-o	12,3	■-■-■	1,79	+--+	4,18
□-□-□	11,97	●-●-●	2,6	x-x-x	8,9
▲-▲-▲	11,3	▲-▲-▲	3,56	◇-◇-◇	6,5-7,5