

+D-558

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

ESTUDIO ESTRUCTURAL Y DE BIODISPONIBILIDAD DE
COMPUESTOS DE REACCION ENTRE LISINA Y ALDEHIDOS
PROCEDENTES DE OXIDACION LIPIDICA

Memoria de la Tesis que presenta el Ldo. en
Biología Julio Girón Calle para optar al
grado de Doctor en Biología.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
REGISTRO CENTRAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
en el N.º 91 de fecha 15.7 del libro
de registro N.º 27 FEB. 1992
Sevilla.

En fecho de recepción de Tesis.

Sevilla, Febrero de 1992

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

V^oB^o

Director



Dr. Eduardo Vioque Pizarro

Profesor de Investigación

CSIC

V^oB^o

Directora



Dra. Valentina Ruiz Gutierrez

Colaboradora Científica

CSIC

V^oB^o

Tutor



Dr. Alberto Machado de la Quintana

Catedrático Numerario del Departamento de Bioquímica,

Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla

EDUARDO VIOQUE PIZARRO, PROFESOR DE INVESTIGACION, Y VALENTINA RUIZ GUTIERREZ, COLABORADORA CIENTIFICA, DEL INSTITUTO DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

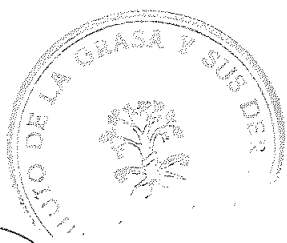
CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada "Estudio estructural y de biodisponibilidad de compuestos de reacción entre lisina y aldehidos procedentes de oxidación lipídica", presentada por el Ldo. Julio Girón Calle para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Instituto de la Grasa y sus Derivados del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo nuestra dirección, reuniendo los requisitos exigidos, por lo que autorizamos su presentación.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado con el V^o B^o de la directora del centro, en Sevilla, a 17 de Febrero de 1992.

Fdo. Eduardo Vioque Pizarro

Edo. Valentina Ruiz Gutierrez

V^oB^o



Dra. M^a del Carmen Dobarganes García
Directora del Instituto de la Grasa y sus Derivados
del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

ALBERTO MACHADO QUINTANA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada "Estudio estructural y de biodisponibilidad de compuestos de reacción entre lisina y aldehidos procedentes de oxidación lipídica", presentada por el Ldo. Julio Girón Calle para optar al grado de Doctor en Biología, y realizada en el Instituto de la Grasa y sus Derivados del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo la dirección de los Drs. Eduardo Vioque Pizarro y Valentina Ruiz Gutierrez, ha sido realizada siendo yo Tutor de la misma, reuniendo los requisitos exigidos, por lo que autorizo su presentación.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, a 17 de Febrero de 1992.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'A. Machado', is written over two horizontal lines. The signature is fluid and cursive.

Fdo. Alberto Machado de la Quintana

A mis padres

La Tesis Doctoral a la que corresponde esta memoria ha sido realizada desde Enero de 1988 a Diciembre de 1991 durante el disfrute de una beca de Formación de Postgrado del MEC, y como parte del proyecto titulado "Interacción proteína-lípido(oxidado)-carbohidrato" financiado por la CICYT (ALI88-0169) y la Junta de Andalucía, dirigido por el Dr. Eduardo Vioque Pizarro en el Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC). Al Dr. E. Vioque especialmente, y a todos los miembros de su equipo, quiero agradecer su ayuda, así como al resto de compañeros del Instituto que me han ayudado y asesorado en la realización de distintas técnicas.

Especial mención merecen la colaboración del Dr. Manuel Alaiz Barragán en la síntesis de reactivos y de derivados de lisina y en la revisión de los resultados de los estudios espectroscópicos, así como el asesoramiento de la Dra. Gloria Marquez Ruiz en la experimentación con ratas, y el prestado por el Dr. Isidro Hermosín Gutierrez en aspectos relacionados con la preparación y reactividad del MDA.

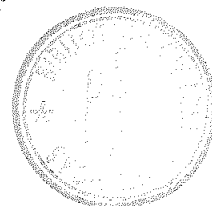
También quiero agradecer al Dep. de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Fac. de Farmacia de la Universidad de Sevilla, especialmente al Dr. Juan Bautista Palomas, el asesoramiento y ayudas recibidos; y al Dep. de Química Orgánica de la Fac. de Química de la Universidad de Sevilla la utilización de las técnicas espectroscópicas IR y RMN y el haber facilitado los análisis elementales.

INDICE DE MATERIAS

Indice de materias	i
Abreviaturas	v
Indice de figuras	vii
Indice de tablas	ix
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	5
2.1. Interacción proteína-lípido oxidado en los alimentos	
2.1.1. Oxidación lipídica	8
2.1.2. Interacción de proteínas con productos de oxidación lipídica	11
2.1.2.1. Interacciones no covalentes	13
2.1.2.2. Interacciones covalentes	
2.1.2.2.1. Reacciones radicalarias	14
2.1.2.2.2. Reacciones con productos secundarios	17
2.1.2.3. Estudios globales de interacción	22
2.1.3. Repercusiones nutricionales	
2.1.3.1. Generalidades	24
2.1.3.2. Disponibilidad biológica de aminoácidos modifi- cados	28
2.1.3.3. Disponibilidad de aminoácidos y digestibilidad de proteína tratada con lípido oxidado	28

2.2. Estructuras caracterizadas en reacciones modelo entre lisina y aldehidos	31
2.2.1. Estructuras por reacción con MDA	33
2.2.2. Estructuras en las que intervienen otros aldehidos	36
2.3. Estudios metabólicos de las estructuras anteriores	40
2.3.1. Metabolismo <i>in vivo</i> de la N-ε-(2-propenal)lisina	41
2.3.2. Metabolización de dihidropiridinas por microsomas hepáticos	44
3. MATERIALES Y METODOS	47
3.1. Productos, aparatos y animales	
3.1.1. Productos comerciales	49
3.1.2. Productos sintetizados	51
3.1.3. Aparatos	54
3.1.4. Animales de experimentación	56
3.2. Métodos	
3.2.1. Técnicas cromatográficas	
3.2.1.1. Cromatografía de adsorción en gel de sílice	
3.2.1.1.1. Cromatografía en columna	57
3.2.1.1.2. Cromatografía en capa fina	58
3.2.1.2. Cromatografía de exclusión molecular en Sepha- dex LH-20	59
3.2.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución	
3.2.1.3.1. HPLC de los productos de la reacción EPL: MDA:propanal	60
3.2.1.3.2. HPLC de los derivados 2,2-bis(etoxicarbo- nil)vinil de aminoácidos	62

3.2.2. Técnicas de caracterización de compuestos orgánicos	64
3.2.3. Reacciones	
3.2.3.1. Reacción EFL:MDA:propanal	65
3.2.3.2. Síntesis de las lisinas modificadas a utilizar en los estudios de metabolismo	
3.2.3.2.1. N-2-propenales de la lisina	67
3.2.3.2.2. 4-Metil dihidropiridinas	67
3.2.4. Mediciones de radiactividad	
3.2.4.1. Contador de centelleo líquido	68
3.2.4.2. Análisis lineal de placas de TLC	70
3.2.5. Experimentos con animales	
3.2.5.1. Dosificación a los animales de experimentación	72
3.2.5.2. Extracción de órganos y tejidos para medición de incorporación de radiactividad	72
3.2.5.3. Obtención de microsomas hepáticos	73
3.2.5.4. Obtención de homogenados totales de órganos	74
3.2.5.5. Incubación de los derivados de lisina con homogenados totales	75
4. RESULTADOS Y DISCUSION	77
4.1. Estudio del modelo de interacción consistente en la reac- ción EFL:MDA:propanal	
4.1.1. Introducción	79
4.1.2. Productos de la reacción	
4.1.2.1. Cromatografía de adsorción	82
4.1.2.2. Cromatografía de exclusión molecular	88
4.1.3. Estudio de la reacción por HPLC	92
4.1.4. Discusión	98



4.2. Estudio del tránsito metabólico de estructuras de interacción de lisina con MDA, y de lisina con MDA y acetaldehído	
4.2.1. Introducción	101
4.2.2. Síntesis de los derivados de lisina	104
4.2.2.1. N-2-propenales	105
4.2.2.2. Dihidropiridinas	109
4.2.3. Estudios de metabolismo <i>in vivo</i>	
4.2.3.1. Excreción e incorporación a órganos con dosis oral	117
4.2.3.1.1. N-2-propenales	121
4.2.3.1.2. Dihidropiridinas	123
4.2.3.2. Incorporación a microsomas hepáticos con dosis intraperitoneal	124
4.2.4. Estudio de metabolismo <i>in vitro</i> : regeneración de lisina en incubaciones con homogenados totales	
4.2.4.1. Introducción	128
4.2.4.2. Resultados y discusión	129
5. CONCLUSIONES	141
6. Apéndice: Espectros de RMN, MS e IR	147
7. BIBLIOGRAFIA	163

ABREVIATURAS

APL	N- α -Acetil-N- ϵ -(2-propenal)lisina
BHT	Butil hidroxitolueno
BSA	Seroalbúmina bovina
BV	Valor biológico
Dihidropiridina	1,4-Dihidropiridina-3,5-dicarbaldhido sustituida en posición 4
dDEFL	N,N'-di-(4-etil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldhido) del EFL
dDL	N,N'-di-(4-metil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldhido)-lisina
DMSO	Dimetilsulfóxido -
dPEFL	N,N'-di-(2-propenal) del EFL
dPL	N,N'-di-(2-propenal)lisina
DPM	Desintegraciones por minuto
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EFL	Ester 4-(fenilazo)fenacílico de la lisina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IR	Infrarrojo
LC	Líquido de centelleo
LL	Dipéptido de lisina
MDA	Malondialdehido
MS	Espectrometría de masas
mPL	mezcla de α PL y ϵ PL
OHF	alcohol 4-(fenilazo)fenacílico
PDEFL	N- α -(2-propenal)-N- ϵ -(4-etil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldhido) del EFL

Pf	Punto de fusión
α PL	N- α -(2-Propenal)lisina
ϵ PL	N- ϵ -(2-Propenal)lisina
POL1 y 2	Fracciones di- o poliméricas de la reacción EFL:MDA:propanal
Rf	Movilidad relativa en TLC
RMN	Resonancia magnética nuclear
RSE	Resonancia de spín electrónico
ST	Solubilizador de tejidos
TBA	Acido 2-tiobarbitúrico
TD	Digestibilidad real de nitrógeno
TLC	Cromatografía en capa fina
Tr	Tiempo de retención en HPLC
V	Coefficiente de variación
Ve	Volumen de elución

INDICE DE FIGURAS

1. Autoxidación de lípidos insaturados	9
2. Productos secundarios de peroxidación lipídica	10
3. Reacciones de proteínas con productos de oxidación lipídica	12
4. Mecanismo de oscurecimiento no enzimático por condensaciones aldólicas sobre una base de Schiff	21
5. Estructuras formadas en la reacción de aminoácidos con MDA	34
6. Sales de piridinio 1,2,3,5 y 1,3,4,5 sustituidas formadas en la reacción de aminoácidos con alcanales	36
7. 1,4-Dihidropiridina-3,5-dicarbaldéhidó sustituida en posición 4.	37
8. Estructuras formadas en la modificación de polilisinas por MDA	39
9. Aductos lisina-MDA encontrados en alimentos y orina	42
10. Degradación por microsomas hepáticos de la 4-metil dihidropiridina de la feniletilamina	46
11. Recta de calibrado Ve-log PM de la columna de Sephadex LH-20	61
12. Reactivos en la reacción modelo estudiada	66
13. Estructuras identificadas en la reacción EFL:MDA:propanal	87

14. Espectros de UV de dDEFL, PDEFL, dPEFL y POL1 y 2	90
15. Cromatogramas de HPLC de reacciones EFL:MDA:propanal	94
16. Espectros de UV de las reacciones EFL:MDA:propanal	96
17. Radiactividad medida en analizador lineal de placas; reacción lisina:MDA	108
18. Moléculas sintetizadas para su estudio metabólico	112
19. Espectros de UV de dDL, dPL y εPL	113
20. Radiactividad medida en analizador lineal de placas; reacción lisina:MDA:acetaldehido	115
21. Radiactividad excretada en orina y heces	119
22. Distribución de la radiactividad incorporada a tejidos y órganos	120
23. Análisis de aminoácidos por HPLC de los derivados por reacción con etoximetilenmalonato de dietilo	130
24. HPLC de las incubaciones de homogenados de órganos sin muestra (controles en blanco)	132
25. HPLC de algunas de las incubaciones realizadas con los derivados de lisina	139

INDICE DE TABLAS

1. Productos del ataque de radicales libres lipídicos a amino-ácidos	16
2. Porcentaje de retención (aminoácido no alterado) de lisina, metionina y triptófano en proteínas alteradas de diferentes maneras	26
3. Porcentajes de disponibilidad biológica y química de ciertos aminoácidos esenciales, TD y VB de proteína del suero lácteo almacenada a 37°C durante 4 semanas con linolenato de metilo en oxidación	29
4. Porcentajes de recuperación de MDA en excretas de ratas intubadas con 2 µg de MDA ligado/g de peso corporal, en las primeras 12 y 24 horas tras la intubación	43
5. Análisis elemental y punto de fusión de las estructuras de interacción caracterizadas en la reacción EFL:MDA:propanal	82
6. Datos de ultravioleta, infrarrojo y fluorescencia de las estructuras de interacción caracterizadas en la reacción EFL:MDA:propanal	84
7. Datos de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de ^{13}C y ^1H de las estructuras de interacción caracterizadas en la reacción EFL:MDA:propanal	85
8. Cuantificación de productos de reacciones EFL:MDA:propanal	95

9. Datos de UV, IR y fluorescencia de las moléculas sintetizadas en las reacciones lisina:MDA y lisina:MDA:acetaldehido	110
10. Datos de RMN de ^{13}C y ^1H de las moléculas sintetizadas en las reacciones lisina:MDA y lisina:MDA:acetaldehido	111
11. Análisis elemental y punto de fusión de las moléculas sintetizadas en las reacciones lisina:MDA y lisina:MDA:acetaldehido	114
12. Radiactividad incorporada a excretas y diversas fracciones orgánicas tras dosificación oral	118
13. Radiactividad incorporada a orina, plasma y microsomas hepáticos tras dosificación intraperitoneal	125
14. Lisina liberada en la incubación de los derivados de este aminoácido con homogenados de órganos	134
15. Cantidad de lisina y sus derivados tras incubación con homogenados de órganos	135

1. RESUMEN

La reacción de proteínas alimentarias con lípidos oxidados o sus productos de descomposición provoca pérdidas de valor nutricional en las mismas. Es de especial interés la reacción de varios aldehídos, que se forman como productos secundarios de oxidación lipídica, con los grupos ϵ -amino proteicos, por afectar a un aminoácido esencial y a menudo limitante como es la lisina. El mismo tipo de reacciones puede sufrir la lisina como aminoácido libre cuando se añade a determinados alimentos para corregir deficiencias.

Se ha realizado una evaluación nutricional de alimentos y proteínas en los que químicamente se había comprobado la alteración de los restos de lisina proteicos, al haber sido sometidos a la acción de lípidos oxidados. Sin embargo, se hace necesaria una caracterización precisa de las nuevas estructuras químicas que se forman en estos procesos, para así poder luego estudiar la relevancia nutricional que pudiera tener su formación en los alimentos. Es por tanto necesaria una aproximación desde la Química Biológica a este problema. Esto es lo que nos proponemos en el presente trabajo para el caso de la reacción de lisina con ciertos aldehídos que es conocido que se producen en la oxidación lipídica como productos secundarios.

Dado lo complejo que es el aislamiento y caracterización a partir de los alimentos de los compuestos que nos interesan (que se pueden

producir con rendimientos muy bajos) se recurre al estudio de las estructuras de interacción que se forman en sistemas más sencillos. Siguiendo esta línea, estudiamos como modelo de la interacción entre lisina y aldehidos procedentes de oxidación lipídica la reacción del éster fenilazofenacílico de la lisina con malondialdehido y propanal. Se obtiene un perfil completo de la reacción, y se caracterizan en lo posible los productos formados mediante las técnicas habituales para la elucidación de estructuras de compuestos orgánicos.

En una segunda parte del trabajo se estudia en animales de experimentación el tránsito metabólico de dos clases de productos cuya formación comprobamos en la primera parte de la investigación. Se realizan para ello experimentos de seguimiento de la excreción e incorporación a diversos órganos y tejidos de estos productos marcados radiactivamente. Asimismo se estudia su incorporación a microsomas hepáticos y su ruptura por homogenados totales de hígado, riñón y mucosa intestinal.

2. INTRODUCCION

En este apartado presentamos el problema que supone en Ciencia de los Alimentos la alteración de las proteínas por productos de oxidación lipídica, como causantes de pérdida de valor nutricional en las mismas (no consideramos los efectos sobre sus propiedades funcionales, de los que también se ocupa esta ciencia). En una primera parte haremos una revisión general del problema comenzando por su origen, la oxidación lipídica, para luego seguir con las modificaciones que sufren las proteínas por reacción con los productos de oxidación lipídica y las consecuencias nutricionales que estas pueden tener.

En segundo lugar se desarrollan con mayor profundidad los antecedentes del tema de estudio concreto de esta tesis. Se detallan las estructuras que se han propuesto como productos de la reacción de lisina con aldehidos, así como los escasos estudios que se han realizado sobre su tránsito metabólico.

2.1. INTERACCION LIPIDO OXIDADO-PROTEINA EN LOS ALIMENTOS

2.1.1. OXIDACION LIPIDICA

En gran cantidad de alimentos (típicamente harinas de pescado y semillas oleaginosas) se puede dar con relativa facilidad la descomposición oxidativa de los lípidos, tanto en su procesamiento como en su almacenamiento y manipulación. Fundamentalmente se da por peroxidación de ácidos grasos insaturados. Se puede tratar de un proceso catalizado por enzimas que se activan cuando los tejidos animales o vegetales se dañan, como son las lipasas, lipoxigenasas e hidroperoxidasas (Eriksson, 1982; Gardner, 1980; Zamora *et al.*, 1991a y b). Lo más general es que se produzca por una reacción de autoxidación mediada por radicales libres en la que los primeros productos aislables son los hidroperóxidos de ácidos grasos (Frankel, 1984; Hidalgo *et al.*, 1991a; Karel, 1980). El proceso se divide clásicamente en tres etapas que quedan resumidas en la Fig. 1.

La fase de iniciación comienza con la formación, inducida por luz, calor o algunos metales que actúan como catalizadores, de un radical libre lipídico. Este radical también se puede formar por

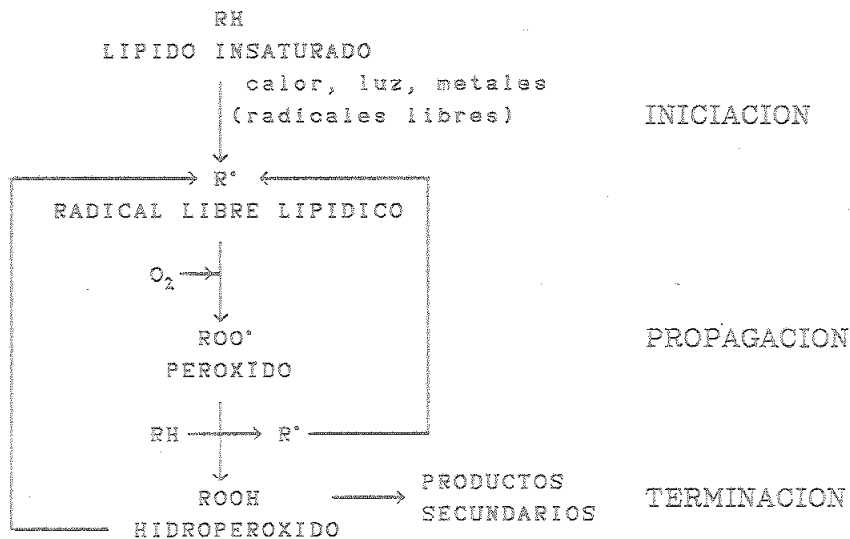


Fig. 1. Autooxidación de lípidos insaturados

intervención de un radical libre de naturaleza no lipídica, o provenir de los hidroperóxidos que más adelante veremos que se forman en la fase de propagación. El radical formado toma oxígeno y el peróxido resultante reacciona con más lípidos insaturados, originando más radicales libres y reduciéndose el mismo a hidroperóxido. Se desarrolla así una reacción en cadena que constituye la fase de propagación. En la fase de terminación los hidroperóxidos sufren procesos de reordenación, polimerización, nuevas oxidaciones y rupturas, en los que se forman productos no radicalarios denominados productos secundarios, que se resumen en la Fig. 2.

Es de destacar que se trata de un fenómeno autocatalítico que

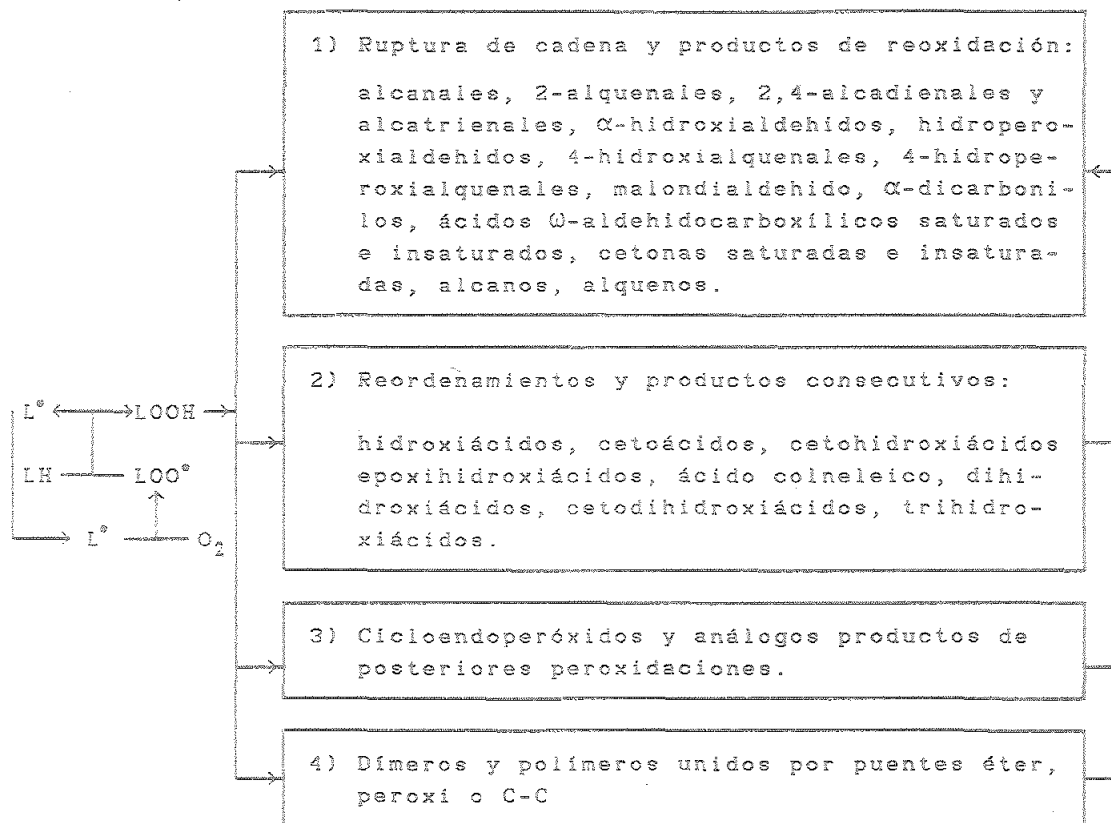


Fig. 2. *Productos secundarios de peroxidación lipídica*
 (Esterbauer, 1982)

puede alcanzar gran desarrollo si no se actúa contra el, y que da lugar a una gran variedad de productos de oxidación (Esterbauer, 1982; Frankel, 1982, 1987). Los antioxidantes pueden romper la cadena de reacciones autoxidativas reaccionando con los radicales libres para formar radicales estables, que o bien son poco reactivos, o forman productos no radicales (Eriksson, 1982).

2.1.2. INTERACCION DE PROTEINAS CON PRODUCTOS DE OXIDACION LIPIDICA

Aunque no sea objeto de estudio en esta tesis, queremos dejar constancia de que a los fenómenos de interacción entre proteínas y lípidos oxidados se les ha relacionado con diversos procesos degenerativos, el envejecimiento y el origen de las lipofuscinas*. En este sentido, el estudio estructural de estas interacciones puede ser la base para estudios en muy diversos campos dentro del ámbito de la Ciencia de los Alimentos y las Ciencias de la Vida.

En los alimentos, los procesos de interacción que nos ocupan se acentúan ya que en ellos deja de funcionar la maquinaria enzimática que defiende a los seres vivos de la oxidación. La ruptura de la integridad celular, con la consiguiente destrucción de la compartimentalización característica de la materia viva, también actúa en este sentido. Además, el procesamiento de los alimentos crea unas condiciones mucho más drásticas que las existentes en medio fisiológico.

* Algunas revisiones y artículos que tratan estos temas, generalmente dentro del marco general del daño por radicales libres y estrés oxidativo, son los de Dianzani, 1982; Esterbauer, 1982; Frankel, 1984; Slater, 1984; Draper, 1986; Kikugawa y Beppu, 1987; Steinbrecher, 1987; Davies, 1988; Draper et al., 1988a; Kikugawa, 1988 y Parinandi et al., 1991.

Las investigaciones realizadas en Ciencia de los Alimentos se han ocupado en parte de la caracterización de las nuevas estructuras químicas formadas en los procesos de interacción. Sin embargo, en las realizadas en otras ciencias, principalmente en Bioquímica, se han considerado más los efectos generales sobre las proteínas y otras macromoléculas biológicas, sin entrar en estudios estructurales.

Las proteínas son los componentes mayoritarios más reactivos en los alimentos. Su interacción con productos de oxidación lipídica es

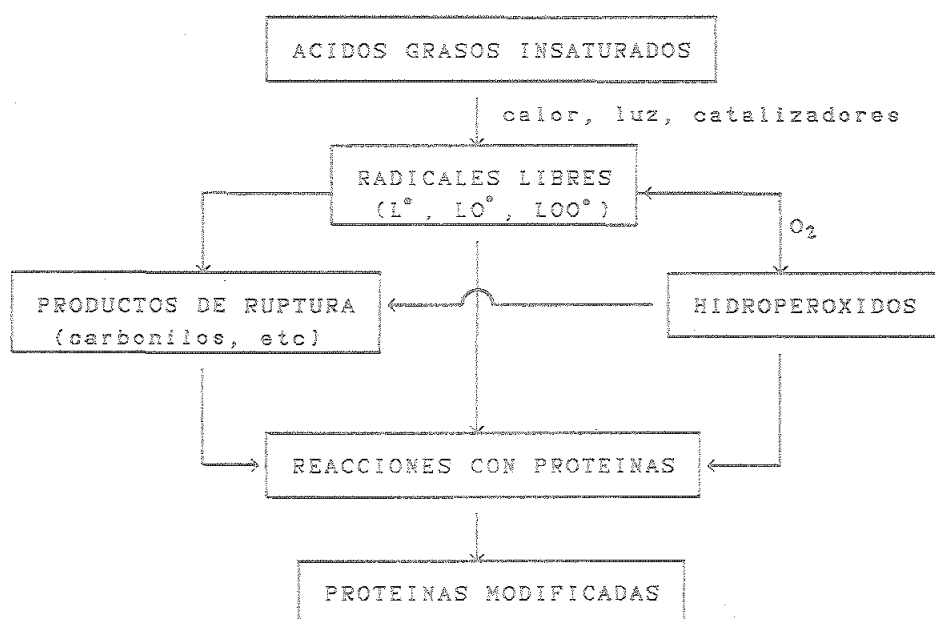


Fig. 3. Reacciones de proteínas con productos de oxidación lipídica (Hurrell y Finot, 1985)

compleja. Intervienen en ella tanto los hidroperóxidos de ácidos grasos, como los radicales y productos secundarios que vimos como se formaban en el apartado anterior (Fig. 3). Las uniones que la constituyen pueden estar mantenidas por fuerzas físicas o por enlaces covalentes.

2.1.2.1. Interacciones no covalentes

Proteínas y lípidos oxidados forman fácilmente complejos no covalentes por atracción hidrofóbica y por formación de puentes de hidrógeno, que se han descrito tanto para el caso de hidroperóxidos de ácidos grasos como para sus productos secundarios de descomposición (Gardner, 1979; Hidalgo *et al.*, 1991a). La fuerza de estas atracciones puede establecerse por una serie de extracciones sucesivas de la mezcla proteína-lípido oxidado con disolventes de creciente polaridad. Los lípidos unidos por puentes de hidrógeno, que son los que cuentan con más átomos de oxígeno, son los que se extraen en último lugar (Pokorny y Davidek, 1979; Kanazawa *et al.*, 1975). La estructura terciaria de la proteína, que determina la existencia de regiones hidrofóbicas accesibles en la superficie de la molécula, es determinante para el establecimiento de atracciones hidrofóbicas (Damodaran y Kinsella, 1981a y b).

Estas interacciones tienen trascendencia en las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias. No hay pruebas de que la tengan en su valor nutricional, aunque hay que valorar su condición de estado previo que facilita las interacciones covalentes que

seguidamente estudiaremos, y que si pueden tener repercusiones nutricionales. Si no se tiene en cuenta la existencia de estas interacciones se puede caer en el error de atribuir a reacciones covalentes efectos de interacción mantenidos tan solo por fuerzas físicas (Kanazawa *et al.*, 1975; Matsushita *et al.*, 1970).

2.1.2.2. Interacciones covalentes

2.1.2.2.1. Reacciones radicalarias

La modificación covalente se puede dar por mediación de radicales libres lipídicos, o por reacción con productos secundarios de oxidación. En el estudio del primer tipo de reacciones es difícil distinguir los efectos de los radicales libres de los producidos por los productos secundarios. Estos estudios se suelen realizar con reacciones modelo consistentes en la incubación de un éster de ácido graso insaturado oxidado, o en oxidación, con una proteína. En estas condiciones, además de radicales libres, en el medio de reacción también se encuentran productos secundarios, de ahí la dificultad a la que nos referíamos. Utilizando resonancia de espín electrónico (RSE) se han logrado identificar los radicales que se forman.

Roubal (1970) mostró la existencia de radicales proteínicos en mezclas deshidratadas de proteína y lípidos peroxidados. La inducción de estos radicales por lípidos peroxidados quedó clara en trabajos posteriores con mezclas de lisozima con linoleato de metilo peroxidado (Schaich y Karel, 1975; Karel *et al.*, 1975).

Estos ataques radicalarios pueden producirse sobre los carbonos α del esqueleto proteico, o bien sobre los carbonos de las cadenas laterales de algunos aminoácidos (Gardner, 1983). En el primer caso las consecuencias pueden ser entrecruzamientos y escisiones de proteínas (Hidalgo *et al.*, 1991b). En el segundo caso se producen ataques sobre ciertos aminoácidos.

Schaich y Karel (1975) profundizaron en el origen de las señales de RSE estudiando mezclas de aminoácidos con linoleato de metilo peroxidado. Solo lisina, arginina, histidina, triptófano, cisteina y cistina dieron señal medible. Gardner (1979) recoge abundante información sobre los aminoácidos que resultan dañados al ser expuestas diversas proteínas a lípidos peroxidados. Los más frecuentemente dañados resultan ser lisina, histidina, cisteina, cistina, metionina, tirosina y posiblemente triptófano (medido en pocas ocasiones). Es de resaltar la coincidencia con los aminoácidos que dan señal en RSE. El autor concluye que la capacidad de formar radicales estables viene ligada a la susceptibilidad al daño por radicales libres.

Sin embargo, en nuestra opinión, es posible que en bastantes de los experimentos referidos el daño se pueda deber tanto a radicales libres como a reacción con productos secundarios, al tratarse de incubaciones de proteínas con productos de oxidación que en su descomposición radicalaria pueden originar los mencionados productos secundarios. En la Tabla 1 se recogen compuestos que se han conseguido caracterizar en incubaciones de ácidos grasos en peroxidación (el más usado es el linoleato de metilo) con aminoácidos o péptidos susceptibles a ataque radicalario; su origen radicalario parece claro (Gardner

Tabla 1. *Productos del ataque de radicales libres lipídicos a aminoácidos*

AMINOACIDO	PRODUCTOS	REFERENCIA
metionina	metionina sulfóxido	Karel <i>et al.</i> , 1975
cisteina	cistina, ácido cisteico, disulfóxido de cistina	Lewis y Wills, 1962
	cistina, H ₂ S, alanina	Roubal y Tappel, 1966
	cistina mono y dióxido (mayoritarios), ácidos cisteinilsulfínico y cisteico (minoritarios)	Finley <i>et al.</i> , 1981
histidina	histamina, valina, ácido aspártico y etilamina	Roy y Karel, 1973
	ácidos imidazol acético e imidazol láctico	Yong y Karel, 1978
lisina	diaminopentano, ácido aspártico, glicina, alanina, ácidos 2,11-dodecanoico, α -aminoadípico y pipercolico	Karel <i>et al.</i> , 1975
triptófano	cinurenina, N-formilcinurenina	Krogull y Fennema, 1987

, 1979). Se trata de aminoácidos azufrados o con heterociclo. Las funciones azufradas y los heteroátomos respectivamente explicarían la facilidad para soportar los radicales libres (Hidalgo *et al.*, 1991b). Aunque la lisina figura también en esta lista, las modificaciones que sufre se deben principalmente a reacciones con productos secundarios de oxidación, como veremos más adelante.

En la reacción de cisteína con el hidroperóxido del ácido linoleico se ha caracterizado un aducto lípido-aminoácido que se formaría por mediación de un radical epóxido (Gardner, 1983).

2.1.2.2.2. Reacciones con productos secundarios

Estos procesos se estudian en reacciones modelo en las que interviene algún producto secundario y una proteína, péptido o aminoácido. Al no ser el componente lipídico una fracción en proceso de peroxidación, sino un producto terminal, la obtención e interpretación de resultados es más sencilla que en los estudios de reacciones radicalarias.

En estas experiencias no se ha cubierto la amplia gama de productos secundarios que se producen en la autoxidación de ácidos grasos. La mayoría de los estudios se han realizado con aldehídos, por presentar éstos una gran reactividad con las proteínas. El aldehído más empleado sin duda ha sido el malondialdehído (MDA), aldehído bifuncional que se produce a partir de peróxidos cíclicos de ácidos grasos de más de tres insaturaciones (Dahle *et al.*, 1962; Pryor *et al.*, 1976). En la detección de este aldehído (no solo de este aldehído

como ya veremos) se basa el test del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), ampliamente utilizado para medir oxidación lipídica.

El test del TBA (Yu y Sinnhuber, 1967) consiste en la medición de la absorbancia a 532 nm del complejo MDA-TBA que se forma en reacción en medio ácido. También se han propuesto medidas fluorimétricas de este complejo (Yagi, 1984). Durante años se ha creído que esta reacción es específica del MDA. Sin embargo, el grupo de Kikugawa ha demostrado que el TBA también forma complejos que se miden en el test con alcanales, alquenaes y alcadienales (Kosugi *et al.*, 1989; Kikugawa *et al.*, 1990). Este test debe por tanto ser considerado como medida de diversos productos de oxidación lipídica, pero no exclusivamente de MDA. El problema de la especificidad parece resolverse al medirse el complejo MDA-TBA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Bird y Draper, 1984). Los problemas de formación de artefactos en la reacción de formación del complejo rojo medido los documenta con datos muy llamativos Duthie (1991). Se intentan resolver estos problemas añadiendo antioxidantes sintéticos al medio de reacción (Piché *et al.*, 1988a), para evitar la formación de MDA a partir de sus precursores lipídicos.

Tomando en cuenta estas consideraciones sobre lo que ha sido durante años el principal método de medida de MDA, así como el escaso número de productos secundarios de oxidación que se han usado en estudios de interacción con proteínas, creemos necesaria una gran cautela al atribuir al MDA efectos de interacción.

El grupo de Gómez-Sánchez (Gómez-Sánchez *et al.*, 1990a; Hermosín, 1990) ha descrito la inestabilidad del MDA en medio acuoso neutro. Observan su hidrólisis en acetaldehído y ácido fórmico, y la aparición

de pequeños polímeros por reacción entre estos aldehidos.

El grupo de Draper ha encontrado tras la digestión enzimática *in vitro* de diversos alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados un compuesto de interacción aparentemente derivado de MDA y lisina. Es la N-ε-(2-propenal)lisina, descrita previamente en reacciones modelo de aminoácidos con MDA, como veremos en el apartado 2.2.1. de esta Introducción. El sistema enzimático consistía en un tratamiento con pepsina a pH ácido, seguido de otro tratamiento con fluido intestinal de cerdo a pH básico (Piché *et al.*, 1988a).

Este mismo grupo de investigación, utilizando el método TBA clásico da valores de MDA en los alimentos entre menos de 1 y 10 ppm, dependiendo de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y el grado de rancidez oxidativa (Siú y Draper, 1978). Posteriormente, utilizando el método HPLC-TBA con antioxidantes observan valores de MDA en algunos alimentos inferiores a los obtenidos con el test espectrofotométrico clásico (Bird y Draper, 1984; Piché *et al.*, 1988).

En los estudios de incubación de proteínas con productos secundarios se observa un cambio en las características de absorción en ultravioleta, en infrarrojo, fluorescencia y comportamiento electroforético (aparición de polímeros debido a entrecruzamientos), así como que los restos de lisina son los más susceptibles a reaccionar. Trabajos pioneros en este sentido son los de Buttkus (1969), Crawford (1967) y el de Chio y Tappel (1969b), que hicieron reaccionar MDA con miosina, albúmina de plasma bovino y ribonucleasa respectivamente. Estos trabajos se ampliaron posteriormente a otras proteínas con similares planteamientos. Se concluye de ellos que el MDA provoca fundamentalmente pérdida de grupos ε-amino libres de

lisina y en segundo lugar de grupos sulfhidrilo de cisteína, aunque no de forma tan clara. Provoca también entrecruzamientos que pueden llegar a hacer precipitar a las proteínas, y perjudicar sus propiedades funcionales.

Kikugawa *et al.* (1985) comprueban que no solo el MDA, sino también aldehidos monofuncionales como el 1-hexanal y el 2,4-decadienal, reaccionan con los grupos ϵ -amino de polilisina, provocando entrecruzamientos y aparición de fluorescencia. Otros de los pocos productos secundarios estudiados en su interacción con proteínas o péptidos, aparte del MDA, son: los ácidos 10-oxo-9-hidroxiesteárico y 9-oxo-10-hidroxiesteárico, que enlazan grupos amino (Janicek y Pokorny, 1971); los ácidos 12-cetooleico y 13-ceto-9,11-octadecenoico, que reaccionan con restos de cisteína y glutámico terminal del glutatión (Zamora *et al.*, 1987); el ácido 9,10-epoxiesteárico (Pokorny *et al.*, 1966); y el ácido 9-oxo-(Z)-12,13-epoxi-(Z)-10-octadecenoico (Gardner, 1979).

Una vez que se observa que un producto secundario puede reaccionar con proteínas, se pasa a intentar averiguar la estructura de los nuevos compuestos que se forman en la interacción. Para ello se realizan reacciones modelo que pretenden reproducir el proceso en un sistema más sencillo, que suele consistir en la reacción de un aminoácido con el producto secundario en cuestión. Este tipo de estudios para el caso de la lisina y aldehidos se revisan ampliamente en el punto 2.2. de esta Introducción.

De la reacción de cisteína con aldehidos α,β -insaturados o con el 1-hidroxi-2-alquenal se han caracterizado las tiazolidinas correspondientes (Esterbauer, 1976). De la reacción con MDA se ha aislado un

aducto en el que tanto el grupo amino como el sulfhidrilo han reaccionado con el aldehído (Buttkus, 1969). Sin embargo, parece que las reacciones de origen radicalario tienen más importancia en el caso de la cisteína que las que tienen lugar con productos secundarios.

Del resto de aminoácidos habituales en las proteínas, tan solo se han aislado productos de reacción del grupo α -amino, pero no de las cadenas laterales características de cada uno, y que portan los grupos funcionales expuestos en las proteínas. Cabe esperar que de esta manera se formen, en mayor o menor medida, similares productos a los que se forman en el caso del grupo ϵ -amino de lisina. Así lo comprueban Nair *et al.* (1981 y 1986) para el caso de dos estructuras por ellos propuestas y que estudiaremos más adelante.

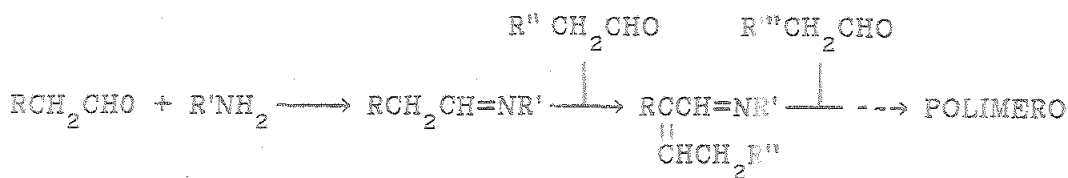


Fig. 4. Mecanismo de oscurecimiento no enzimático por condensaciones aldólicas sobre una base de Schiff (Gardner, 1979)

El oscurecimiento no enzimático de los alimentos se ha atribuido a reacciones entre grupos amino y azúcares o entre grupos amino y aldehídos procedentes de oxidación lipídica. Pokorny (1973) destaca la presencia de ácidos grasos insaturados, la presencia de grupos amino y el grado de peroxidación lipídica como determinantes del proceso de oscurecimiento. Gardner (1979) recoge la opinión generalizada de que se trata de policondensaciones aldólicas con bases de Schiff amino-aldehídos (Fig. 4). El amino puede acabar separándose del polímero que se forma, con lo que su contenido en nitrógeno puede ser bajo.

2.1.2.3. Estudios globales de interacción

Hemos revisado los distintos tipos de interacción entre proteínas y productos de oxidación lipídica, refiriéndonos a trabajos en los que generalmente interacciones no covalentes, radicalarias y con productos secundarios se consideran por separado. Se han realizado pocos trabajos con el objetivo de hacer un estudio integrado de estas interacciones. Algunos ejemplos de ello son los de Matsushita (1970), Gamage y Matsushita (1973), Nielsen *et al.*(1985b), Kanazawa *et al.* (1987) e Hidalgo y Kinsella (1989). Resumimos a continuación los que nos parecen más interesantes.

En el trabajo de Kanazawa *et al.* (1987) se estudia la incubación de caseína con ácido linoleico, el hidroperóxido de ácido linoleico o sus productos secundarios de descomposición. Esta última fracción es una mezcla separada del total de la autoxidación del linoleico por cromatografía de adsorción, consistente en 36% de polímeros, 26% de

epoxihidroperóxidos y endoperóxidos, 4,8% de ácido 9-oxononanoico, 3,7% de hexanal, 2,5% de ácido nonanedioico, 2,4% de ácidos carboxílicos de cadena corta, 0,75% de ácido 8-oxooctanoico y 0,34% de ácido 12-oxododecadienoico. Se propone el siguiente modelo de interacción que aclara sobre todo las primeras etapas del proceso. El ácido linoleico y su hidroperóxido se unen rápidamente a la caseína; la proteína inhibe la autooxidación del linoleico y retarda la descomposición del hidroperóxido. Los productos secundarios son formados a partir de este último, y se unen tanto a zonas hidrofóbicas como hidrofílicas de la proteína y con mayor rapidez que las anteriores moléculas, dando lugar a polimerización y disminución de digestibilidad de la caseína. Provocan también la oxidación de los residuos de metionina y la pérdida de residuos básicos por formación de bases de Schiff con aldehídos.

Hidalgo y Kinsella (1989) estudian la interacción entre β -lactoglobulina B y el 13-hidroperóxido del ácido linoleico. Proponen un modelo según el cual, en un primer momento, el lípido forma con la proteína un complejo no covalente. Esta unión facilitaría la descomposición del hidroperóxido, comenzando entonces la interacción covalente. Probablemente por mediación radicalaria se oxidan cisteína y triptófano. Se forman dímeros por puentes disulfuro. Al mismo tiempo el hidroperóxido o alguno de sus productos secundarios reacciona con grupos amino para formar dímeros. Los productos secundarios reaccionan con los grupos amino formando compuestos fluorescentes y no fluorescentes.

2.1.3. REPERCUSIONES NUTRICIONALES DE LA INTERACCION LIPIDO

OXIDADO-PROTEINA

2.1.3.1. Generalidades

Al contrario que muchos de los productos de oxidación lipídica (para revisión ver Kubow, 1990) los compuestos de interacción de estos productos con proteínas no parecen tener efectos toxicológicos. Todo lo contrario, a los procesos de interacción se les puede atribuir una función desintoxicante al inactivar productos de oxidación lipídica dañinos. Así lo recogen Hidalgo *et al.* (1991c) para el caso de MDA y formaldehído al reaccionar con el grupo ϵ -amino de la lisina y la cisteína respectivamente. En revisión reciente, Erdersdobler (1989) tan solo refiere un efecto carcinogénico de los derivados de triptófano cinurenina y N-formilcinurenina.

Por tanto, al menos según lo que conocemos actualmente, el efecto adverso de los procesos de interacción que nos ocupan vendrá dado por pérdidas de valor nutricional de las proteínas. Estas pérdidas pueden ser graves cuando los alimentos susceptibles de verse afectados constituyan parte fundamental de la dieta, como ocurre en alimentación infantil, dietas precarias y alimentación animal.

La merma en la calidad nutricional de las proteínas alimentarias se puede deber tanto a disminución de la digestibilidad global como a disminución de la disponibilidad de aminoácidos esenciales*. De la

primera causa pueden ser responsables cualquiera de los tres grandes tipos en que dividimos las interacciones lípido oxidado-proteína anteriormente (no covalentes, radicalarias y con productos secundarios). Todos estos procesos pueden provocar alteraciones en la solubilidad y estructura proteicas, pudiendo dar lugar a agregados lipoproteicos de digestibilidad reducida. Las modificaciones covalentes pueden además disminuir la disponibilidad de aminoácidos con grupos funcionales expuestos en la cadena proteica, segunda causa apuntada. Por tanto, como aclaran Hurrell y Finot (1985), la calidad proteica debe ser evaluada considerando estos dos factores. Una simple estimación de la digestibilidad no es suficiente, pues los aminoácidos pueden ser absorbidos en formas no utilizables por el organismo.

En general se considera que en la alteración de proteínas alimentarias las cadenas laterales de los aminoácidos lisina, metionina, triptófano y cisteína son las más afectadas. En la modificación por lípidos oxidados también es así atribuyéndose a la modificación covalente y oxidación de estos aminoácidos esenciales (cisteína semiesencial) las pérdidas de valor nutricional que sufren las proteínas.

En la Tabla 2 se resume un estudio comparativo de la alteración de los tres primeros aminoácidos citados en diversos sistemas. Estos sistemas reproducen las principales alteraciones que sufren las proteínas en los alimentos. Vemos que el tratamiento con lípidos

* Consultar Friedman, M. (1978) para definición de términos nutricionales y abreviaturas.

Tabla 2. Porcentaje de retención (restos de aminoácidos no alterados) de lisina, metionina y triptófano en proteínas reaccionadas en diferentes modos (Hurrell, 1989, sobre experiencias de Nielsen et al., 1985a)

% Retención de	Proteínas reaccionadas con :				
	azúcares reductores	lípidos oxidantes	ácidos polifenólicos	álcali	H ₂ O ₂
Lisina	20	40	77	75	96
Metionina	92	6	79	85	0
Triptófano	101	86	101	90	98

oxidados (proteína del suero lácteo tratada con metil linolenato y agua durante cuatro semanas a 37°C) es el más drástico en conjunto. Sin embargo, la reacción de Maillard debida a azúcares reductores es la que mayor atención ha recibido, tanto en estudios estructurales como nutricionales y toxicológicos. En este tratamiento con lípidos oxidados el triptófano es relativamente estable, mientras que lisina y metionina se alteran más.

Un aspecto a tener en cuenta es que la pérdida de calidad proteica no tendrá gran trascendencia si va asociada a un deterioro importante de las características organolépticas. En este sentido, la alteración de cisteína sería más peligrosa que la de lisina. Esta

primera se da ya en los primeros estadios de la oxidación lipídica, cuando aún no se han desprendido los productos secundarios volátiles responsables de olores desagradables. Sin embargo, hay que considerar también el efecto de inactivación de volátiles que pueden tener los restos de lisina al reaccionar con ellos.

Quizás por la creencia de que el enranciamiento lipídico hace a un alimento organolépticamente inaceptable antes de que el ataque a las proteínas sea de consideración, o quizás por lo poco que se conoce de los compuestos que se forman en estas reacciones, no se ha prestado mucha atención al estudio nutricional de proteínas alteradas por lípidos oxidados. Un proceso de alteración de alimentos relacionado con el que nos ocupa, la reacción de Maillard entre grupos amino y azúcares reductores si ha sido más estudiado. Se conoce la indisponibilidad metabólica de la mayoría de sus productos y el efecto tóxico de algunos de ellos. Se han identificado productos fácilmente medibles en hidrolizados ácidos de alimentos (furosina y piridosina), que permiten estimar el contenido en derivados lisina-azúcar (Erbersdobler, 1989).

Siguiendo el orden del anterior apartado de esta Introducción, vamos a revisar lo poco que se conoce sobre la disponibilidad biológica de algunos de los derivados de aminoácidos ya descritos (el caso de la lisina será tratado más adelante). Después nos referiremos a estudios en que se ha hecho una valoración nutricional más global del producto de interacción sin hacer referencia a las estructuras químicas concretas de alteración de aminoácidos.

2.1.3.2. Disponibilidad de aminoácidos modificados

El sulfóxido de metionina, producto de oxidación de este aminoácido por lípidos oxidados, es casi tan bien utilizado como la metionina libre por las ratas de experimentación (Hurrell, 1989). Su formación no implica por tanto reducción apreciable de la calidad proteica. Hidalgo et al. (1991c) recogen información sobre algunos efectos fisiológicos, sin aparente efecto perjudicial, del sulfóxido de metionina, así como su reducción en el organismo. Esta reducción a metionina parece ser que se llevaría a cabo en el lumen intestinal o al atravesar la barrera intestinal. La actividad enzimática responsable ha sido estudiada en riñón e hígado.

Hurrell y Finot (1985) revisan la información disponible sobre los productos de oxidación de cisteína conocidos. El dióxido de cistina es 20-25% disponible, los ácidos sulfanílico de la cistina y cisteico no son disponibles.

2.1.3.3. Disponibilidad de aminoácidos y digestibilidad de proteínas tratadas con lípidos oxidados

El-Lakany y March (1974) han evaluado la digestibilidad proteica y disponibilidad de lisina en arenque almacenado con o sin antioxidantes. Comprueban que la oxidación lipídica va asociada a pérdida de disponibilidad de lisina.

El grupo de Hurrell (Nielsen et al., 1985a, b y c; Hurrell y Finot, 1985; Hurrell, 1989) ha realizado una serie de trabajos muy

completos de evaluación nutricional del producto de la reacción de proteína del suero lácteo con metil linolenato y agua. En ellos se determina por métodos químicos y por ensayos con ratas la disponibilidad de lisina, metionina+cist(e)ina y triptófano. También se determina en ensayos con ratas la digestibilidad de nitrógeno (TD) y el valor biológico (BV) de la proteína alterada. En la Tabla 3 se muestra lo fundamental de los datos obtenidos. En un experimento similar a este (el oxígeno fue restringido durante la alteración de la proteína) se estudian cist(e)ina y metionina por separado. Las disponibilidades resultaron ser 72% para cist(e)ina, 76% para lisina, 89% para triptófano y 92% para metionina. La TD fue del 91%.

Tabla 3. Porcentajes de disponibilidad biológica y química de ciertos aminoácidos esenciales, TD y BV de proteína del suero lácteo almacenada a 37° C durante 4 semanas con linolenato de metilo en oxidación (Hurrell y Finot, 1985).

Método	Lys	Met Cys	Trp	TD	BV
Ensayos con ratas	23	51	56	71	67
Métodos químicos	40	100	86	-	-
Método químico *TD	28	71	61	-	-

Cist(e)ina y lisina son los aminoácidos que presentan menor disponibilidad, seguidos por triptófano. El índice químico corregido multiplicando por la TD es comparable a los valores de la disponibilidad biológica, salvo para el caso de los aminoácidos azufrados. Las mediciones químicas (tras oxidación con ácido per fórmico e hidrólisis química) no dieron disminución de cisteina. Sin embargo, su biodisponibilidad se ve reducida, debiendo ser esta reducción la mayor responsable de la poca disponibilidad total de aminoácidos azufrados.

2.2. ESTRUCTURAS CARACTERIZADAS EN REACCIONES MODELO ENTRE LISINA Y ALDEHIDOS

Como hemos visto, la lisina es posiblemente el aminoácido más afectado en la modificación covalente de proteínas alimentarias por productos de oxidación lipídica. Ya hemos revisado los aspectos generales de estas alteraciones, así como lo que se conoce sobre las estructuras químicas resultantes de la reacción con otros aminoácidos y su comportamiento nutricional. A continuación vamos a referirnos a las experiencias que están más directamente relacionados con el tema de esta tesis. Revisaremos las estructuras químicas halladas en reacciones modelo de lisina con aldehidos. En el siguiente apartado nos referiremos a las experiencias realizadas de estudio de su metabolismo.

Los productos secundarios son los principales responsables de la alteración de los restos de lisina durante la interacción de proteínas con productos de oxidación lipídica. En el resto de aminoácidos involucrados parecen ser más frecuentes los ataques radicalarios. Dada la gran diversidad de productos secundarios que se conocen cabe esperar que se produzcan gran variedad de estructuras químicas por

reacción con este aminoácido. Los aldehidos, debido a su gran reactividad hacia los grupos amino, ocupan un puesto destacado en estas reacciones.

Ya en las primeras experiencias de incubación de proteínas con productos de oxidación lipídica se observó la alteración de las características espectroscópicas, enzimáticas, electroforéticas y de solubilidad de las mismas, así como la aparición de fluorescencia. Estos cambios venían acompañados de una disminución de los grupos amino libres determinados con un reactivo específico, típicamente el 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno. Para intentar aclarar que estructuras químicas son las que se forman a partir de los restos de lisina, se suele trabajar en sistemas más sencillos que permiten una separación de los productos. Luego se les aplica las técnicas de elucidación de estructuras de compuestos orgánicos. Así, se suele trabajar con un solo producto secundario en reacción con algún aminocompuesto que puede ser la lisina o algún derivado suyo.

Muchas de las experiencias a las que nos referiremos a continuación se han realizado con el objetivo de esclarecer la estructura de los pigmentos tipo lipofuscina que aparecen en los tejidos con el envejecimiento y la peroxidación lipídica.

2.2.1. ESTRUCTURAS POR REACCION CON MDA

El MDA es un producto muy reactivo que muestra gran inestabilidad. No se comercializa como tal, por ello se suele preparar por hidrólisis ácida de 1,1,3,3-tetrametoxipropano o 1,1,3,3-tetraetoxipropano. Neutralizando con NaOH se obtiene la sal sódica que es relativamente estable y que se puede recrystalizar para aumentar su pureza. En muchas experiencias sin embargo se ha utilizado el producto de la hidrólisis ácida sin purificar, por lo que no se eliminaban los subproductos de la hidrólisis, que pueden así intervenir en la reacción con las aminas*.

Crawford et al. (1966) describen la formación de N-(2-Propenal)glicina en la reacción de este aminoácido con MDA a pH muy ácido, utilizando una solución de MDA sin purificar.

Con el mismo método, Chio y Tappel (1969b) preparan las bases de Schiff conjugadas N,N'-1-amino-3-iminopropeno de diversos aminoácidos, que presentan pico de fluorescencia a 460-470 nm cuando se excita a 360-400 nm (Fig. 5). Se formarían a partir de N-2-propenales como los descritos por Crawford por una segunda reacción del grupo aldehído con otro amino. Este grupo de investigación dirigido por A. L. Tappel, ha realizado un extenso trabajo sobre este tipo de estructuras y el

* Hermosín (1990) trata extensamente la química del MDA y su obtención

ción en metanol a 60° C (Nair *et al.*, 1986), obtienen como sales aductos similares a los descritos por Chio y Tappel (1969b). La fórmula tipo de estos compuestos se muestra en la Fig. 5.

2.2.2. ESTRUCTURAS EN LAS QUE INTERVIENEN OTROS ALDEHIDOS

De la reacción de aldehidos monofuncionales saturados con diversos aminoácidos en medio acuoso neutro Suyama y Adachi (1978) aislan sales de piridinio sustituidas (Fig. 6). Posteriormente estudian su descomposición a altas temperaturas (Suyama y Adachi, 1986).

El grupo de Kikugawa ha realizado una extensa serie de trabajos

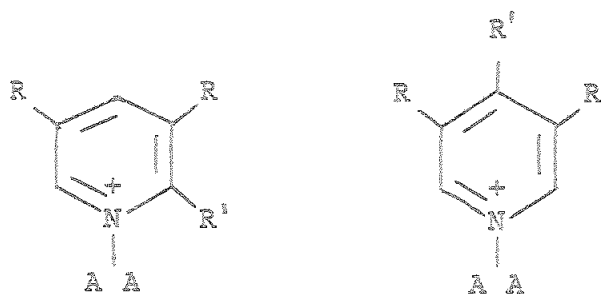


Fig. 6. Sales de piridinio 1,2,3,5 y 1,3,4,5 sustituidas formadas en la reacción de aminoácidos (AA) con alcanales. En ellas se condensan tres moléculas de aldehido. R y R' dependen del alcanal empleado; para el propanal, $R = -CH_3$ y $R' = -CH_2-CH_3$

sobre unas estructuras que aislan inicialmente de la reacción de aminoácidos con MDA a pH 7 (Kikugawa *et al.*, 1981). Son las 1,4-dihidropiridinas-3,5-dicarbaldéhidó sustituidas en posición 4 (que denominaremos abreviadamente dihidropiridinas), que dan pico de fluorescencia a aprox. 390 nm en excitación y 450 en emisión (Fig. 7). Se producen con un rendimiento mucho mayor si se incluye en el medio de reacción un alcanal (Kikugawa *et al.*, 1984a; Kikugawa y Beppu, 1987). La presencia de un alcanal parece ser necesaria. Se ha propuesto que en el caso de no añadirse al medio de reacción, este sería el acetaldehído proveniente de rotura de MDA (Gomez-Sanchez *et al.*, 1990a), o bien de un intermediario posterior a la unión de MDA y grupo amino (Nair *et al.*, 1988).

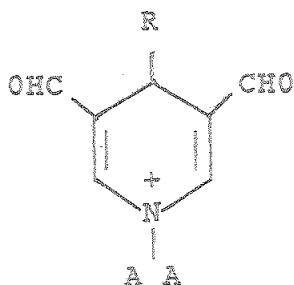


Fig. 7. 1,4-Dihidropiridina-3,5-dicarbaldéhidó sustituida en posición 4. Se forma en la reacción de aminoácidos con dos moléculas de MDA y una de alcanal. R depende del alcanal empleado; para el propanal $R = -CH_2-CH_3$

Trabajando con aminoazúcares y MDA, el grupo de Gómez-Sánchez ha comprobado la formación de las mismas estructuras que en el caso de reacción de otras aminas con MDA. Se trata de los N-2-propenales, dihidropiridinas y N,N'-1-amino-3-iminopropeno. Comprueban la inestabilidad de esta última estructura en medio acuoso no ácido. Los N-2-propenales pueden sufrir posteriores reacciones de ciclación, ya propias solo de azúcares (Gómez-Sánchez *et al.*, 1990b).

La reacción de alcanales con grupos amino para formar la sal de piridinio correspondiente es mucho más lenta que las reacciones en que interviene MDA. En caso de que este último esté presente en el medio de reacción, los alcanales no se condensan para dar este tipo de estructura, sino que lo hacen con MDA para formar dihidropiridinas. En este sentido, aunque los alcanales sean por si solos relativamente poco reactivos, pueden tener importancia modulando la reactividad del MDA, tanto cuantitativa como cualitativamente. Este aldehído precisa de los alcanales para formar las dihidropiridinas, dejando al menos en parte de originar los N-2-propenales.

Kikugawa *et al.* (1985) estudian la fluorescencia, entrecruzamientos y cambios en la absorción ultravioleta, producidos en polilisina por tratamiento con MDA en un ligero exceso molar con respecto a los grupos amino del polipéptido. Estiman que la mayor parte de grupos aminos modificados han formado N-2-propenales, estructura inestable que sería la responsable de los entrecruzamientos al reaccionar con otros grupos amino. En menor cantidad se formarían dihidropiridinas (Fig. 8). Este mismo grupo ha extendido sus investigaciones a otros aldehídos que producen también entrecruzamientos entre aminos (alcanales, 2-alquenales y 2,4-alcadienales). La

fluorescencia que producen en su reacción con metilamina se parece más a la obtenida en las reacciones en que intervienen hidroperóxidos de ácidos grasos que la que da el MDA (Kikugawa y Sawamura, 1987). A la luz de estos resultados y de la falsa interpretación que ya vimos que se ha hecho del test del TBA, creemos que se ha podido exagerar el papel de este aldehído en la alteración de proteínas, tanto en los alimentos como *in vivo*.

En la reacción de butiraldehído con metilamina Kikugawa *et al.* (1989a y b) identifican el 2,4-dietil-2,5-dihidrofurano.

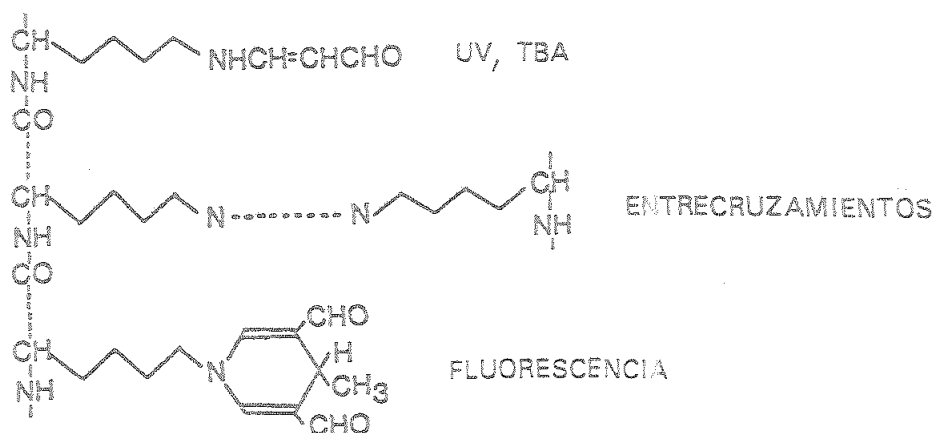


Fig. 8. Estructuras formadas en la modificación de polilisina por MDA. Los residuos fluorescentes fueron estimados en menos del 0.2%, los N-2-propenales en un 22% (Kikugawa *et al.*, 1985).

2.3. ESTUDIOS METABOLICOS DE LAS ANTERIORES ESTRUCTURAS

Si son pocos los productos secundarios estudiados en su reacción con lisina, menos son aún los estudios metabólicos, o nutricionales en general, que se han hecho de los derivados conocidos de este aminoácido. Tan solo las dihidropiridinas, y sobre todo la N-ε-(2-propenal)lisina (εPL), han recibido alguna atención.

En cuanto a las bases de Schiff conjugadas como las descritas por Chio y Tappel (1969b) hay que decir que son inestables a pH ácido. La acidez estomacal basta para hidrolizarlas, liberando los restos de lisina que pudiera tener bloqueados en la proteína alimentaria (Finot *et al.*, 1978; Cheftel *et al.*, 1989).

2.3.1. METABOLISMO IN VIVO DE LA N-ε-(2-PROPENAL)LISINA

El grupo de Draper, que como ya mencionamos ha encontrado la εPL en hidrolizados enzimáticos de alimentos (Piché *et al.*, 1988), ha estudiado el metabolismo del MDA y su presencia en orina de rata (Siú y Draper, 1982). Estudiando el MDA total en orina, liberado de sus derivados por hidrólisis ácida y cuantificando por HPLC el complejo MDA-TBA, se vió que existen unos niveles basales incluso en ayunas. En ratas intubadas con MDA como su sal sódica, o con dieta rica en lípidos insaturados, o dieta que favoreciera la peroxidación lipídica *in vivo*, estos niveles suben (Draper *et al.*, 1984).

Mediante un laborioso proceso cromatográfico, se aislaron y caracterizaron diversos derivados de MDA, así como MDA en forma libre, de orina humana y de rata (Draper *et al.*, 1988; Hadley y Draper, 1988; McGirr *et al.*, 1985; Piché *et al.*, 1988b). Se encontró εPL, N-α-acetil-N-ε-(2-propenal)lisina (APL), y los N-2-propenales de etanolamina y serina. Se trataría por tanto de los derivados de lisina (Fig. 9) y fosfolípidos al reaccionar con MDA, y de la forma acetilada de uno de ellos. Estos aductos se siguen excretando incluso en ayunas o con dieta con grasas hidrogenadas. Sus niveles en orina aumentan cuando se trata de dietas ricas en lípidos insaturados.

Si se suministra εPL o seroalbúmina bovina (BSA) tratada con MDA aumentan también los niveles de estos dos aductos, pero no los de MDA no ligado. La εPL no parece ser por tanto fuente de MDA libre para

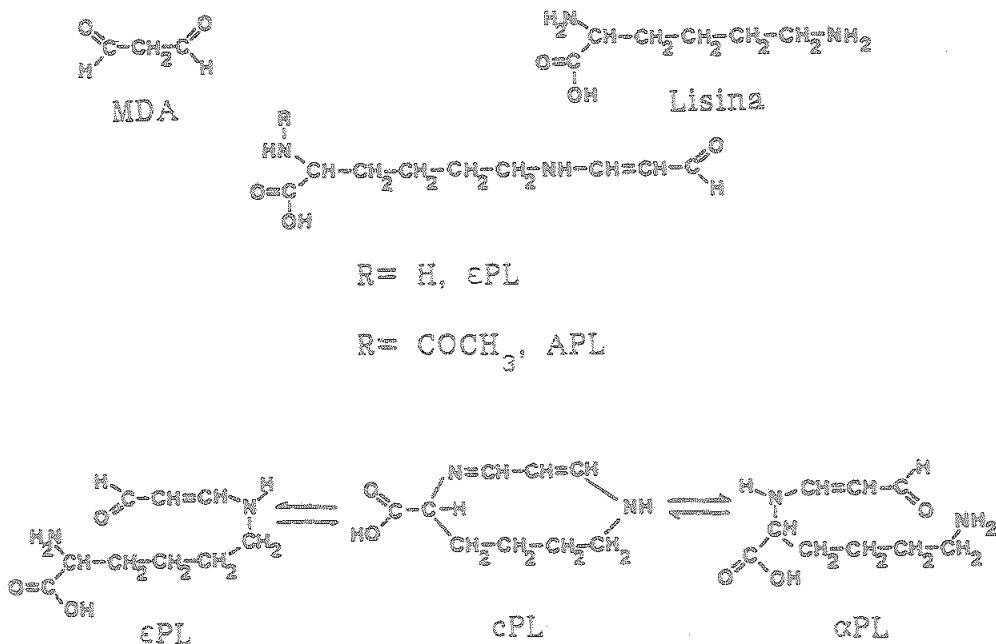


Fig. 9. Aductos lisina-MDA encontrados en alimentos (ϵPL) y orina (ϵPL y APL). La N - α -(2-propenal)lisina (αPL) y el derivado cíclico por reacción entre aldehído y amino (cPL) se forman en solución a partir de ϵPL obtenido por síntesis (Piché *et al.*, 1988a)

el organismo, lo cual es un dato importante porque se han descrito efectos tóxicos de este aldehído (Siú y Draper, 1982). Se deduce también que los aductos encontrados en orina provendrían en su mayoría de la digestión de proteína modificada por MDA, pero también existen

Tabla 4. Porcentaje de recuperación de MDA en excretas de ratas intubadas con 2 μ g de MDA ligado/g de peso corporal, en las primeras 12 y 24 horas tras la intubación. (McGirr et al., 1985). Tras este tiempo la excreción no fue significativa. Los valores máximos encontrados en las ratas control fueron aprox. de 1.5% en orina y 5% en heces.

Intubación con	Orina			Heces		
	12 h	24 h	total	12 h	24 h	total
ϵ PL	26.7	1.6	28.3	0.6	0.7	1.3
BSA-MDA	17.8	9.2	27	-	10.3	10.3

unos niveles basales que vienen dados por formación del aducto in vivo. La Tabla 4 contiene los datos de excreción en orina y heces de MDA, en ratas a las que se les había suministrado ϵ PL o BSA-MDA. Por otra parte, si se suministra la sal sódica de MDA marcada radiactivamente con ^{14}C , se recupera un 9-17% en orina y el resto es oxidado a CO_2 .

La acetilación de aminas primarias ha sido observada como modo de excreción de aminoácidos no naturales (de Bethizy y Hayer, 1989) como las S-arilcisteinas y la L-hexahidrofenilalanina (McGirr et al., 1985 citan a Williams y Millburn, 1975).

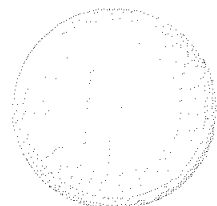
Estos autores preparan la ϵ PL para sus estudios según Nair et al. (1981). La separan de la mezcla de reacción por cromatografía de

intercambio aniónico y HPLC en fase reversa con agua como eluyente.
También identifican la α PL (McGuirr *et al.*, 1985).

2.3.2. METABOLIZACION DE DIHIDROPIRIDINAS POR MICROSOMAS HEPATICOS

Yoden *et al.* (1985) han estudiado la degradación *in vitro* por microsomas de rata de las 4-metil dihidropiridinas obtenidas a partir de MDA y diversos compuestos aminados, entre los cuales no se encuentra la lisina. Observan que cuanto más larga es la cadena carbonada del aminocompuesto, mejor se degradan estos compuestos a formas solubles en agua. El sistema de degradación requiere dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato, se inhibe por monóxido de carbono y está potenciado en ratas pretratadas con fenobarbital.

Por HPLC estudian los compuestos de degradación de la 4-metil dihidropiridina de la feniletilamina (Fig. 10). La estructura de la 4-metil dihidropiridina no se ve afectada en estos compuestos, que siguen presentando su fluorescencia característica. Las rupturas afectan tan solo a la parte de la molécula aportada por la feniletilamina.



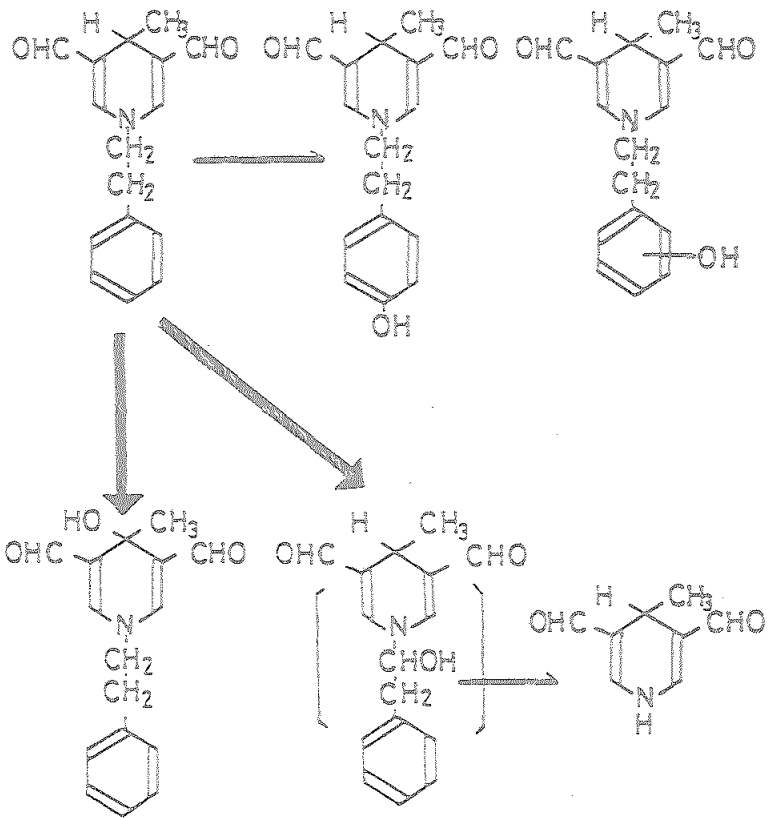


Fig. 10. Degradación por microsomas hepáticos de la 4-metil-dihidropirídina de la feniletilamina

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. PRODUCTOS Y APARATOS

3.1.1. PRODUCTOS COMERCIALES

Todos los reactivos y disolventes son de grado analítico, Panreac, salvo los que figuran en la lista siguiente. Los disolventes de HPLC y los empleados en las espectroscopías son de grado específico para estas técnicas, Romil Chemicals. Para RMN se utilizaron disolventes deuterados de Sigma.

acetaldehído [1,2-¹⁴C] 8,7 mCi/mmol (New England Nuclear)

ácido α -aminobutírico (Serva)

ácido etilendiaminotetraacético (Sigma)

ácido glutámico (Serva)

ácido 2-tiobarbitúrico, monohidrato (Merck)

p-aminoacetofenona (Fluka)

bromo (Fluka)

cisteína, clorhidrato monohidrato (Merck)

Dowex 50W-X8(H⁺) (Fluka)

etoximetilenmalonato de dietilo (Fluka)

glicina (Aldrich)

leucina (Merck)

lisina, monoclorhidrato (Merck)

lisina, monoclorhidrato L-[U-¹⁴C] 312 mCi/mmol (Amersham)

lisina, monoclorhidrato L-[4,5-³H] 8 Ci/mmol (Amersham)

lisina-lisina, diclorhidrato (Sigma)

ninhidrina (2,2-dihidroxi-1,3-indanodiona) (Merck)

nitrosobenceno (Merck)

propanal (Fluka)

sulfato de quinina, monohidrato (Analema)

1,1,3,3-tetrametoxipropano (Fluka)

tricina (N-tris(hidroximetil)metilglicina) (Sigma)

trietilamina (Fluka)

3.1.2. PRODUCTOS SINTETIZADOS

Sal sódica del malondialdehído

Seguimos el método de Kikugawa e Ido (1984b) con pequeñas modificaciones de Hermosín (1990). Se agita 1,1,3,3-tetrametoxipropano (8,2 g, 50 mmol) con resina Dowex (H^+) (40 g) en agua (100 ml) durante 1 h (hasta alcanzar máximo en UV a 267 nm). Se filtra para separar la resina, y el filtrado se ajusta a pH 7 con NaOH 5 N y se extrae con acetato de etilo (3x25 ml). La fase acuosa se liofiliza y se lava con acetona. Se recrystaliza de acetona-agua, obteniéndose la sal sódica como monohidrato. Como criterio de pureza se utiliza TLC con n-propanol:agua 19:1 como eluyente, y aparición en UV de un solo pico a 267 nm. Pf 240 °C (descomposición), literatura (Nair et al., 1981) 245 °C (descomposición).

Bromuro de 4-(fenilazo)fenacilo

Según Sugiyama et al. (1951). A una solución de p-aminoacetofenona (13,5 g, 0,1 mol) en ácido acético glacial (100 ml) se le añade nitrosobenceno (10,9 g, 0,1 mol), y la mezcla se deja a temperatura ambiente durante 12 h. La masa cristalina resultante se filtra y se lava con el mismo ácido y agua. Se recrystaliza de etanol al 95%. La 4'-fenilazoacetofenona resultante se obtiene con un rendimiento del 65%.

Una solución de bromo (3,5 g, 0,022 mol) en cloroformo (15 ml) se añade a una solución de 4'-fenilazacetofenona (6 g, 0,022 mol) en cloroformo (50 ml). La mezcla se deja 20 h a temperatura ambiente y se filtra. El filtrado se lava con agua y por evaporación del solvente se obtiene un sólido rojo que se recristaliza de hexano para dar el producto final con rendimiento del 66%. Pf 104-105 °C, literatura 103°C.

Bromhidrato del éster 4-(fenilazo)fenacílico de la lisina

Seguimos a Alaiz *et al.* (1989). En primer lugar se protegen los grupos amino del aminoácido con etoximetilenmalonato de dietilo, luego se esterifica el grupo ácido con bromuro de 4-(fenilazo)fenacilo y por último se desbloquean los grupos amino con bromo, como detallamos a continuación.

Monoclorhidrato de lisina (0,3 g, $1,6 \times 10^{-3}$ mol) se disuelve en potasa metanólica (0,184 g, $3,3 \times 10^{-3}$ mol en 5 ml). Se añade etoximetilenmalonato de dietilo (0,7 g, $3,3 \times 10^{-3}$ mol); la reacción se da de inmediato. Al eliminar el disolvente se obtiene un aceite que se disuelve en agua (5 ml). Se lleva a pH 3-4 con clorhídrico 0,5 N, separándose un aceite que se extrae con acetato de etilo. Se lava con agua y se lleva a sequedad obteniéndose un aceite amarillo con un rendimiento del 90%.

Bromuro de 4-(fenilazo)fenacilo (0,2 g, 0,66 mol) se añade al aceite anteriormente obtenido (0,334 g, 0,66 mol) disuelto en acetona (2 ml) con trietilamina al 5%. Tras 1 h se eliminan los cristales resultantes de bromuro de trietilamonio y se lleva a sequedad con

nitrógeno. Tras lavar con agua se obtiene un sólido que se recristaliza de etanol. Rendimiento 70%. (Ver fórmula general de este derivado para aminoácidos en Fig. 11, pag. 61; en el caso de la lisina el grupo ϵ -amino también se encuentra bloqueado).

Al sólido anterior (0,1 mg, 0,141 mol) disuelto en cloroformo (5 ml) se le añade bromo (0,023 g, 0,141 mol) en cloroformo al 4% p/v gota a gota, con agitación y sobre hielo. Se deja reposar en el congelador y por filtración se obtiene un sólido rojo que se lava con etanol. Rendimiento 80% UV (Etanol) $\lambda_{\text{máx}}$ 328 nm ($\log \epsilon$ 4,42); Pf 181-183°C.

3.1.3. APARATOS

La HPLC se realiza en un sistema de Waters Instruments consistente en bomba modelo 600E, inyector automático modelo 712 y detector UV modelo 484, conectado a un ordenador personal APCIV (NEC). La adquisición y procesamiento de datos se hace con el programa Maxima 820, versión 3.3. La temperatura de la columna se reguló con un controlador Julabo F10.

Para las medidas espectroscópicas se utilizan los siguientes aparatos:

- Espectrofotómetro UV/VIS Hewlet Packard 8450A
- Espectrofotómetro IR Bomem MB-120
- Espectrómetros de RMN Varian XL-200 y Bruker AC 300
- Espectrómetro de masas AEI MS 30/70 VG, Data System PDP-11/250
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-5

Las centrifugaciones se realizaron en un aparato Sorval RC2-B, con rotores SS34 y GSA para obtener 12000 y 30000 $\times g$ respectivamente, y en una centrífuga MSE Super Minor para centrifugaciones a baja velocidad.

Para la cromatografía de exclusión molecular se usó un conjunto consistente en bomba P1, columna SR25/45 y colector RediFrac

(Pharmacia). Este mismo colector se utilizó en la cromatografía de adsorción.

Los puntos de fusión se midieron en un microscopio con platina calefactora Reichert Wien.

Para las medidas de radioactividad se utilizó un contador de centelleo líquido Rack Beta II 1215 (LKB WALAC) y un analizador lineal de placas de TLC LB2820-1 (Berthold).

Se utilizó un liofilizador Freezemobile 3 (Virtis).

Los homogenados de tejidos se obtuvieron con un homogenizador tipo Potter (Potter, 1955) consistente en un vaso con vástago de teflón (Pobel) accionado por un motor RZR1 (Heidolph), ajustado a 2000 rpm.

3.1.4. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se han utilizado ratas macho de la cepa Wistar suministradas por IFFA CREDO, con un peso inicial de 60-70 g.

El animalario se mantuvo bien ventilado a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se ha utilizado la dieta de mantenimiento A.04 de Panlab*, con suplemento de leche fresca *ad lib* en los tres primeros días tras la recepción debido al bajo peso de los animales.

Se guardó un periodo de adaptación de al menos una semana antes de comenzar los experimentos. Durante los mismos los animales se distribuyeron en jaulas metabólicas individuales (Techniplast 17001) para la recogida de orina y heces.

* Composición basal: valor calorífico 2900 cal/Kg, humedad 12%, proteínas 17%, lípidos 3%, glúcidos 58,7 %, celulosa 4,3% y minerales 5%.

3.2. METODOS

3.2.1. TECNICAS CROMATOGRAFICAS

3.2.1.1. Cromatografía de adsorción en gel de sílice

3.2.1.1.1. Cromatografía en columna

Se realizó en columnas de vidrio de 20x0,6 cm y de 40x1,8 cm (Afora), rellenas con MN-Kieselgel 60, de tamaño de partícula 63-200 μm (Macherey Nagel), activada durante 12 horas a 110°C, con 15 y 45 g para cada tamaño de columna respectivamente. La muestra se aplica disuelta en la menor cantidad posible del eluyente inicial.

Como eluyente se han empleado los siguientes gradientes:

Gradiente A:

cloroformo	100 ml
cloroformo:metanol 15:1	"
" : " 5:1	"
metanol	"

cloroformo:metanol:ácido acético glacial:agua 10:10:1:1 100 ml

Gradiente B:

cloroformo:metanol	3:2	200 ml	
"	: "	1:1	"
"	: "	2:3	"
"	: "	1:2	"
"	: "	1:3	"

3.2.1.1.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

Con fines analíticos se realiza en placas con soporte de aluminio de 8x4 cm con un espesor de 0,25 mm de gel de sílice e indicador fluorescente (Alugram SilG/UV254, Macherey Nagel).

Para cromatografía preparativa utilizamos placas preparadas en el laboratorio de 20x20 cm con un espesor de 0,5 mm de sílica gel G e indicador fluorescente (se extiende sobre placas de vidrio una papilla formada por MN-Kieselgel G/UV254 (Macherey Nagel) al 60% p/v en agua; una vez que se han secado al aire se activan durante 30 min a 110°C). La muestra se recupera del gel de sílice rascando de placa y extrayendo con cloroformo:metanol 1:1 o etanol.

La visualización se realizó según los casos con luz blanca y UV a 254 y 356 nm en un iluminador (DESAGA), además de con los siguientes reveladores de pulverización*:

- Ninhidrina al 0,2% en etanol. Calentar unos minutos a 110°C.

- Acido 2-tiobarbitúrico, solución saturada en ácido acético glacial del 30%. Calentar unos minutos a 110°C. (Piché *et al.*, 1988a)
- Acido sulfúrico al 50% en agua. Calentar sobre placa calefactora hasta carbonización.

Como eluyente se emplean las siguientes mezclas:

- A. n-propanol:agua 19:1
- B. cloroformo:metanol 10:1
- C. cloroformo:metanol 1:10
- D. cloroformo:metanol:ácido acético glacial:agua 10:10:1:1
- E. n-propanol:agua 8:2

Se ensayó también la TLC de reparto en fase inversa con placas de 5x10 cm RP-18F254S (Merck).

* Se puede consultar "Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel" (1980), E. Merck, Darmstadt (R. F. A).

3.2.1.2. Cromatografía de exclusión molecular

Se realiza en columna con relleno de Sephadex LH-20 (Pharmacia), un Sephadex G-25 modificado para su uso con disolventes orgánicos. Se eluye con cloroformo a un flujo de 0,3 ml/min. Las muestras se inyectan disueltas en la menor cantidad posible de cloroformo. El

sistema se instaló en cámara a 4°C. Se calibró la columna utilizando una serie de patrones consistentes en aminoácidos derivatizados con etoximetilenmalonato de dietilo y bromuro de 4-(fenilazo)fenacilo (Fig. 11). Los volúmenes de elución que se dan son la media de los encontrados en tres inyecciones distintas, salvo en el caso de los patrones.

3.2.1.3. Cromatografía líquida de alta presión

3.2.1.3.1. HPLC de los productos de la reacción EFL:MDA:propanal

Se utilizó una columna con relleno de ácido silícico BIC-SIL HP de 10 µm de 250x4 mm (BIORAD), mantenida a 25°C. Se inyectaron 15 µl. El flujo fué de 1,2 ml/min, con el siguiente gradiente de elución de cloroformo:metanol, ambos con 0,05% de ácido acético glacial:

min 0	98:2
min 3	98:2
min 10	70:30
min 11	20:80
min 30	20:80

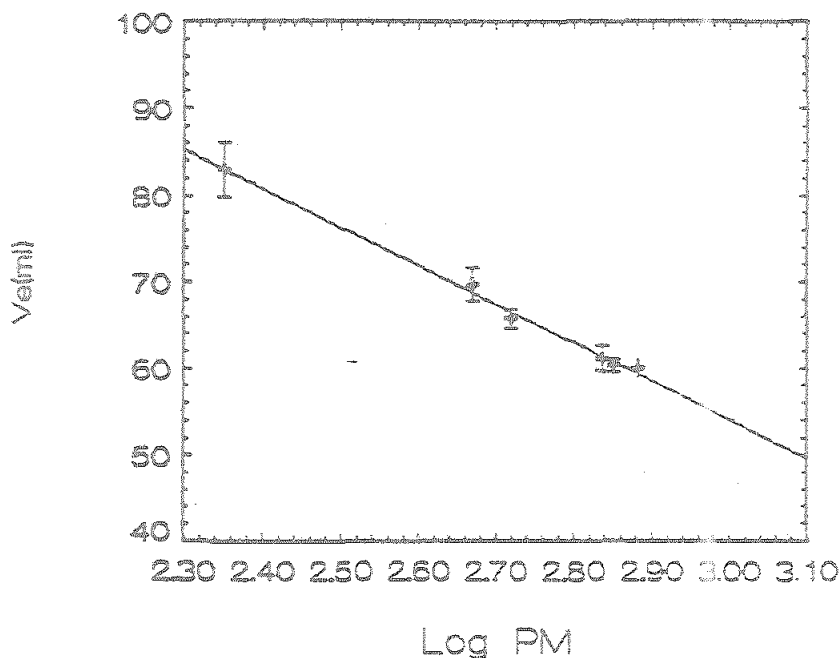
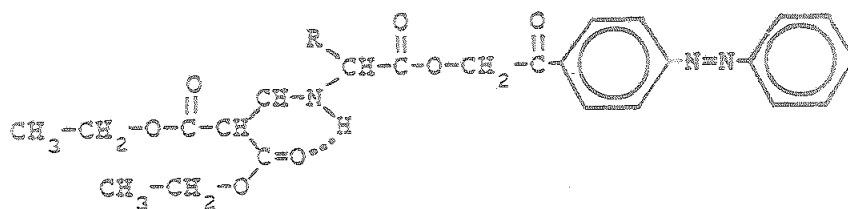


Fig. 11. Recta de calibrado volumen de elución (V_e)-log del peso molecular (PM) de la columna de Sephadex LH-20. Se inyectó por duplicado (se representa la media de los dos valores unidos por una barra vertical) una mezcla de los ésteres 4-(fenilazo)fenacílicos de los derivados 2,2-bis(e-toxicarbonyl)vinil de los aminoácidos glicina, leucina, cisteína, lisina y glutámico; de PM 467, 523, 686, 709 y 761 respectivamente, cuya fórmula general se representa (obtenidos según Alaiz et al., 1989), además de la 4-(fenilazo)acetofenona de PM 224. En la fórmula R es la cadena lateral característica de cada aminoácido.

3.2.1.3.2. HPLC de los derivados 2,2-bis(etoxicarbonil)vinil de aminoácidos

Se ha seguido el método desarrollado en nuestro laboratorio para análisis de aminoácidos en hidrolizados proteicos previa derivatización con etoximetilenmalonato de dietilo (Alaiz et al., 1991b). Hemos comprobado que este método es también útil para la cuantificación de variaciones en las concentraciones de aminoácidos en homogenados de tejidos.

Para la reacción de derivatización se toma una cantidad de muestra que se encuentre en el rango de 2 a 200 μg de aminoácidos/ml de medio de reacción. La reacción se realiza durante 1 h a 50°C con agitación fuerte en tampón borato sódico 1 M pH 9 con 0,8 μl del reactivo de derivatización/ml.

15 μl De la anterior reacción se inyectan en una columna de fase inversa Nova-Pack C18 de 4 μm de 300x3,9 mm (Waters), mantenida a 18°C . Se detecta absorción a 280 nm y se eluye a un flujo de 0,9 ml/min con el siguiente gradiente de tampón acetato sódico 25 mM pH 6 :acetonitrilo:

min 0	91:9
min 3	86:14
min 13	86:14
min 30	69:31
min 40	69:31

Las cantidades de aminoácidos se calculan en base a una serie de rectas de calibrado obtenidas con patrones de aminoácidos. Como patrón

interno se utiliza ácido α -aminobutírico.

Se ha aumentado en 10 min la duración del último paso del gradiente, para incluir en los cromatogramas el tiempo de retención correspondiente al derivado del dipéptido de lisina.

3.2.2. TECNICAS DE CARACTERIZACION DE COMPUESTOS ORGANICOS

Las medidas de absorción en UV/VIS se realizaron con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y etanol como disolvente salvo que se indique lo contrario. Las de transmisión en el infrarrojo (IR) se hicieron sobre sólidos en pastilla de bromuro potásico.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron con tetrametilsilano como referencia interna. Se dan los valores de desplazamiento químico (δ) en ppm y los de las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los de ^1H se realizan a 200 o 300 MHz. La multiplicidad de las señales se abrevia s (singulete), d (doblete), t (triplete), q (cuartete) y a (ancha). Los de ^{13}C se realizaron a 75,1 MHz desacoplados. Se hicieron también algunos espectros bidimensionales de correlación ^1H - ^1H y ^{13}C - ^1H . En algunos casos se añadieron unas gotas de agua deuterada al disolvente empleado para confirmar la asignación de los protones de grupos amino e hidroxilo.

Se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-5 para las medidas de fluorescencia, con ambos slits abiertos 10 nm. Se ajustó el factor de escala de modo que una solución de sulfato de quinina 0,1 μM en sulfúrico 0,1 N diera intensidad relativa (IR) 100, con excitación a 352 nm y emisión a 448 nm. Se usó etanol como disolvente.

Los análisis elementales se realizaron en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla.

Los puntos de fusión no están corregidos.

3.2.3. REACCIONES

3.2.3.1. Reacción EFL:MDA:propanal

Se utilizó el EFL como dibromhidrato y el MDA como su sal sódica monohidratada, obtenidos según se detalló en el apartado 3.1.2. (Fig. 12). La reacción se llevó a cabo en tampón acetato sódico 0,2 M pH 4,2 a una temperatura de 22°C y con agitación. Siguiendo la reacción por TLC (eluyente B) y UV se observó que tras 90 min estaba aparentemente estabilizada y el EFL consumido, por lo que se fijó este tiempo como tiempo de duración de la reacción. Se utiliza una concentración 10 mM de EFL, variando las concentraciones de los otros reactivos según las proporciones EFL:MDA:propanal que se quiera conseguir.

Para obtener los productos de la reacción en cantidad que permita su separación, purificación y caracterización, la reacción se realiza en 200 ml de tampón, por tanto con 2×10^{-3} mol (1.066 g) de EFL. Los productos se separan de la mezcla de reacción para ser posteriormente cromatografiados como sigue. Tras los 90 min se extrae con éter etílico (3 x 50 ml) para eliminar los aldehidos apolares. La fase acuosa, que se queda con todo el color naranja característico del grupo cromóforo del EFL, se pasa a través de una columna de fase inversa de 6 ml de octadecilsilano (C18) unido a gel de sílice de 40 µm (J. T. Baker), que retiene por interacción hidrofóbica todas las moléculas marcadas con el grupo 4-(fenilazo)fenacilo. Para ello se

utiliza una bomba peristáltica P-1 (Pharmacia). Lo retenido se eluye con 10 ml de metanol, despues de lavar con agua (20 ml) y hexano (20 ml). Esta regeneración de la columna se lleva a cabo cada 50 ml. Los productos de modificación del EFL quedan así en un pequeño volumen de metanol listos para ser cromatografiados.

Para su estudio por HPLC las reacciones se realizan en un volumen de 1,5 ml. Una vez concluidas se les añade 3,5 ml de acetonitrilo, siendo inyectadas sin más tratamiento en el cromatógrafo.

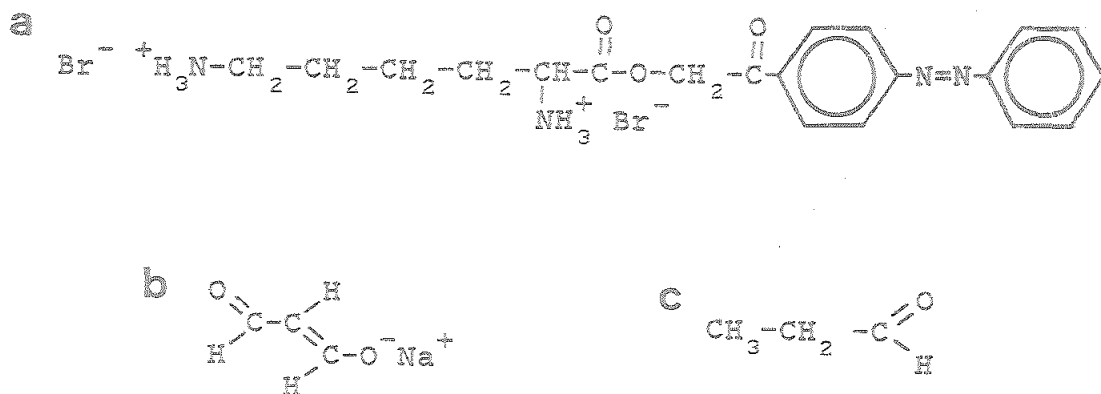


Fig. 12. Reactivos en la reacción modelo estudiada. a) Bromhidrato del EFL; b) MDANa; c) propanal. En solución acuosa predomina la forma ceto del MDA en su geometría EE (configuración *trans* en ambos dobles enlaces, que es la representada) sobre la enólica (Hermosín, 1990)

3.2.3.2. Síntesis de las lisinas modificadas por aldehidos a utilizar en los estudios de metabolismo

3.2.3.2.1. N-2-Propenales de la lisina

Se hizo reaccionar clorhidrato de lisina (0,091 g, $0,5 \times 10^{-3}$ mol) con MDANa (0,074 g, $0,5 \times 10^{-3}$ mol) en metanol (25 ml). Se mantiene en agitación a 37°C . A las 24 h se da por terminada la reacción al desaparecer en UV el pico característico del MDA (267 nm) y alcanzar un máximo el pico propio de los N-2-propenales (280 nm).

La síntesis con precursores radiactivos se realizó igual pero en cantidad dos veces y media menor, y añadiendo 20×10^6 DPM de lisina ^3H .

3.2.3.2.2. 4-Metil dihidropiridinas

A una solución de clorhidrato de lisina (0,091 g, $0,5 \times 10^{-3}$ mol) en tampón fosfato sódico 0,2 M pH 7 (25 ml) se le añade MDANa (0,148 g, 1×10^{-3} mol) y acetaldehido (37,6 μl , $0,67 \times 10^{-3}$ mol). Se mantiene la reacción a 37°C con agitación. Se da por terminada a las 40 h, cuando alcanzan máximo los picos en UV característicos de las estructuras que se pretende sintetizar (238, 267 y 395 nm).

La síntesis con precursores radiactivos se realizó con una cantidad dos veces y media menor y añadiendo 64×10^6 DPM de lisina ^3H y 16×10^6 DPM de acetaldehido ^{14}C .

Se elimina el agua por liofilización antes de proceder a la cromatografía preparativa.

3.2.4. MEDICIONES DE RADIATIVIDAD

3.2.4.1. Centelleo líquido

Se calibró el contador de centelleo para calcular desintegraciones por minuto (DPM) de ^3H y ^{14}C simultáneamente, según el método de la tasa de canales con patrón externo. Se prepararon rectas de calibrado para estos dos isótopos con patrones hidrosolubles en cápsulas (Pharmacia) a los que tras ser disueltos en 2 ml de agua se les añadía 15 ml de líquido de centelleo, y cantidades crecientes de tetracloruro de carbono (Simonet, 1990).

Se utilizó como líquido de centelleo (LC) la mezcla Ready Safe (Beckman), y viales de polietileno de 20 ml de capacidad (Kartell). Como solubilizador de tejidos (ST) se usó BTS 450 (Beckman).

Las muestras fueron procesadas de diferente manera según su naturaleza*:

a) Soluciones de compuestos orgánicos: + 2 ml H_2O + 15 ml LC

* Seguimos con modificaciones a Wunderly, S. y Mooney, D. H. (1981) "A sample preparation guide using Beckman Ready-Solv cocktails for liquid scintillation counting", Beckman Instruments Inc., Fullerton, California

- b) Orina: 1) 1 ml + 0,8 ml H₂O + 200 μl H₂O₂ al 30%, agitar y aguardar 10 min
2) + 15 ml LC
- c) Plasma: 1) ≤ 1 ml + 0,8 ml H₂O + 200 μl H₂O₂ al 30%, agitar y aguardar 10 min
2) + 15 ml LC + 105 μl ácido acético glacial, guardar en oscuridad al menos 10 h antes de contar
- d) Heces: 1) 30 mg de heces liofilizadas y trituradas + 0,15 ml H₂O, agitar y aguardar 10 min, + 1,5 ml ST, agitar 4 h a 37°C
2) + 0,75 ml isopropanol + 0,3 ml H₂O₂ al 30% añadida gota a gota, dejar reposar 10 min y agitar a 37°C 4 h
3) + 105 μl ácido acético glacial, agitar 4 h a 37°C
4) + 15 ml LC, oscuridad al menos 24 h antes de contar
- e) Contenido del digestivo: 1) 500 μl de haber llevado lo recogido al enjuagar el tubo digestivo a 30 ml + 1,5 ml ST, agitar 4 h a 37°C
2) + 0,25 ml isopropanol + 0,2 ml H₂O₂ al 30% añadida gota a gota, esperar hasta que no burbujee y agitar 5 h a 37°C
3) + 105 μl ácido acético glacial, agitar 5 h a 37°C
4) + 15 ml LC, al menos 24 h de oscuridad antes de medir
- f) Organos y tejidos: 1) aproximadamente 150 mg del órgano o tejido troceado con tijeras + 1,5 ml de ST, agitar 5 h a 37°C
2) + 200 μl H₂O₂ al 30% añadida gota a gota, aguardar hasta

que deje de burbujear, agitar a 37°C durante 5 h

3) + 105 µl ácido acético glacial, agitar a 37°C 4 h

4) + 15 ml LC, dejar al menos 24 h en oscuridad antes de contar

g) Microsomas: 1) total de la fracción microsómica de una rata

liofilizada + 100 µl H₂O + 2 ml de ST, agitar 12 h a 37°C

2) + 105 ml ácido acético glacial, agitar 4 h a 37°C

3) + 15 ml LC, oscuridad al menos 24 h antes de contar

Del sobrenadante de la centrifugación para la obtención de los microsomas se toma 1 ml que se prepara según el punto a), pero añadiendo solo 1 ml de agua.

La exactitud de las medidas se comprobó en los casos más delicados (bajo número de cuentas, y alta quimioluminiscencia o baja eficiencia de medida) añadiendo un patrón interno y repitiendo la medida.

Las eficiencias de contaje fueron entre 10 y 28 % para ³H, y 40 y 70 % para ¹⁴C, según el tipo de muestra.

3.2.4.2. Análisis lineal de placas de TLC

Se realizó sobre placas como las utilizadas habitualmente con fines analíticos, pero con un tamaño de 20x20 cm. Se usó para estimar la pureza radioquímica de los productos a utilizar en los estudios de

metabolismo, así como para estudiar las reacciones de las que procedían. La pureza radioquímica se expresa como el tanto por ciento del área total que supone el área del pico de la sustancia a examen, tras descontar el ruido de la línea base.

3.2.5. EXPERIMENTOS CON ANIMALES

3.2.5.1. Dosificación a los animales de experimentación

En todos los casos los animales se mantuvieron aislados en las jaulas metabólicas dos días antes del inicio de los experimentos. Se sometieron además a ayuno nocturno previo de 12 h, con agua *ad lib*. Se procedió siempre a primera hora de la mañana. En este momento las ratas pesaron entre 150 y 210 g.

Para la intubación oral se usó una sonda rígida con punta en bulbo de 18 G (Bioscience n^o 52-4108). La dosis se suministró disuelta en 1,5 ml de agua.

Para la inyección intraperitoneal se utilizaron jeringuillas desechables con aguja de 0,45x13 mm (Omnifix). Se suministró la muestra en 0,4 ml de solución salina (0,85 % ClNa) . Se inyectó en el cuadrante inferior izquierdo del abdomen.

Tras la dosis se permitió de nuevo el acceso a la dieta habitual.

3.2.5.2. Extracción de órganos y tejidos para medir incorporación de radiactividad

Tras anestesiar la rata con éter etílico se expuso la cavidad abdominal. Se recogieron 4 ml de sangre en tubos al vacío con 15 % de

ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Vacuteiner) extraídos de la arteria aorta. El plasma se obtuvo mediante centrifugación a 1500 xg 20 min a temperatura ambiente.

El intestino se extrajo en su totalidad y se recogió su contenido por perfusión con aproximadamente 20 ml de solución salina.

A continuación se extrajeron corazón, hígado, estómago, riñones, pulmón, cerebro y un fragmento de músculo glúteo mayor izquierdo. El contenido del estómago se reunió con el contenido del intestino. Todas estas fracciones se lavaron con solución salina conforme se extraían y se pesaron tras secar superficialmente con papel de filtro. Se pesan por separado intestino delgado y grueso. Todas estas muestras se congelan hasta su análisis.

3.2.5.3. Obtención de microsomas hepáticos

Se obtiene el hígado de ratas anestesiadas con éter etílico tras extraer sangre como en el punto anterior. Obtenemos la fracción microsómica hepática de acuerdo con el método de Sherr et al. (1989) como sigue a continuación (aspectos generales de Lake, 1987).

Todo el proceso se realiza a 4°C. El hígado extraído se lava con medio de homogenización, se elimina el tejido conectivo y se seca superficialmente con papel de filtro. Se trocean 4 g que se homogenizan en 24 ml de tampón de homogenización consistente en sacarosa 0,25 M, tricina 2 mM y EDTA 1 mM a pH 7,6.

El homogenado se filtra a través de gasa quirúrgica y se centrifuga a 12000 xg a 4°C 10 min. El sobrenadante se diluye 6 veces

con una solución de sacarosa 0,125 M y cloruro cálcico 8 mM y se centrifuga a 30000 ×g 10 min. a temperatura ambiente. El sedimento resultante se recoge como fracción microsómica y se liofiliza. También se recoge el sobrenadante (fracción soluble del citoplasma).

3.2.5.4. Obtención de homogenados totales de hígado, riñón y mucosa intestinal

Se extrajo hígado, riñones e intestino delgado de ratas de aproximadamente 240 g, sacrificadas por decapitación tras ayuno nocturno de 12 h con agua *ad libitum*. Estos órganos se lavan con solución salina y con el tampón que se utilizará como medio de homogenización. Para la obtención de los homogenados seguimos el método de Finot *et al.* (1978), (metodología general en Lake, 1987 y Fowler *et al.*, 1989).

Todo el proceso que sigue se realiza a 4°C. Hígado y riñón se procesan de igual manera. Tras lavar bien los órganos se elimina el tejido conectivo y se seca superficialmente. Se secan 4 g que se trocean y se homogenizan en 20 ml de tampón fosfato 0,01 M pH 7,4 con 1mM de EDTA y 20 µM de BHT.

El intestino una vez limpio se abre longitudinalmente y se raspa la mucosa con ayuda de portaobjetos de vidrio. La mucosa intestinal extraída de un animal se homogeniza en 15 ml de tampón tris 0,2 M pH 7,6 con 1mM de EDTA y 20 µM de BHT.

Todos los homogenados se filtran a través de gasa quirúrgica y se utilizan de inmediato para las incubaciones *in vitro*.

3.2.5.5. Incubación de los derivados de lisina con los homogenados

Seguimos a Finot et al. (1978) con modificaciones.

0,85 μ mol Equivalentes de lisina (lisina contenida en los derivados) disueltos en 0,71 ml del tampón de homogenización se añaden a 0,29 ml del homogenado en tubos de ensayo que se cierran con papel de aluminio. Se agitan durante 30 min en baño a 37°C. En estas condiciones el control de efectividad de los homogenados utilizado, el dipéptido de lisina, se hidroliza al 100 %.

El homogenado una vez concluida la reacción se preparó para el análisis de aminoácidos por-HPLC. La incubación se paró añadiendo 3 ml de tampón borato 1 M pH 9 con 1,7 μ mol de ácido α -aminobutírico, que servirá como patrón interno en el análisis. Se toman 2 ml que se pasan por una columna de exclusión molecular con 8 ml de Sephadex G-25 (columnas PD-10, Pharmacia), eluyendo con el mismo tampón. Se deshechan los primeros 6 ml y se recogen los 4 ml siguientes. Con ello se eliminan las moléculas que superan o entran en el rango de fraccionamiento de la columna (de 1000 a 5000 para péptidos y proteínas globulares). De estos 4 ml se toma 1 ml. Tras diluir con 2 ml más de tampón se realiza la reacción de derivatización para el análisis de aminoácidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. ESTUDIO DEL MODELO DE INTERACCION CONSISTENTE EN LA REACCION EFL:MDA:PROPANAL

4.1.1. INTRODUCCION

La elucidación de las estructuras de interacción entre proteínas y productos de oxidación lipídica se realiza por lo general en sistemas de reacción sencillos. En lo que respecta a la modificación de los restos de lisina por aldehidos, estos sistemas suelen estar formados por un aminocompuesto que hace el papel del grupo ϵ -amino del aminoácido, y uno de los aldehidos que se conoce que se forman como producto secundario. Es necesario que los productos de la reacción se formen con un rendimiento suficientemente alto como para permitir su separación cromatográfica y posterior caracterización. En sistemas en los que la fracción lipídica, la proteica, o ambas son heterogeneas, la mezcla de productos que se forman es demasiado compleja para cumplir este objetivo. Ni que decir tiene que aún más dificultades plantea el estudio de los productos alimenticios a este nivel.

Es deseable que estas reacciones modelo relativamente sencillas, que pretenden reproducir la interacción que se da en los alimentos, se realicen en unas condiciones tales que hagan aceptable la

extrapolación de los resultados obtenidos a un nivel superior (los alimentos en último caso). Sin embargo en algunos casos se han realizado a modo de reacción de síntesis orgánica, buscando la formación de un compuesto en concreto.

Con estos antecedentes nos ha parecido de interés el realizar una aportación al estudio de la interacción que nos ocupa a través de una reacción modelo. El objetivo es caracterizar las estructuras químicas que se originan, comparando la información obtenida con la ofrecida por otros autores. Ello nos permite hacer una valoración de la incidencia relativa que tienen estas estructuras, y decidir en consecuencia de cuales está justificado hacer un estudio metabólico.

Para nuestra reacción modelo hemos escogido un derivado de la lisina, su éster 4-(fenilazo)fenacílico (EFL, Fig. 12), que se obtiene mediante esterificación con bromuro de 4-(fenilazo)fenacilo. Antes de su uso en la esterificación de aminoácidos (Alaiz et al., 1989), este reactivo fué utilizado en la esterificación de ácidos grasos para su caracterización (Vioque y Holman, 1961; Vioque et al., 1985).

El grupo 4-(fenilazo)fenacilo es un cromóforo que aporta un característico color naranja y un máximo de absorción en UV a 330 nm. El bloqueo del grupo carboxilo, con introducción además de un grupo hidrofóbico, hace que aumente la solubilidad en disolventes orgánicos. Aunque el EFL es soluble en agua, los productos de reacción con los amino bloqueados son solubles en disolventes orgánicos relativamente polares como cloroformo y acetonitrilo. Estas características de absorbancia y solubilidad facilitan las labores cromatográficas de seguimiento y estudio de la reacción por TLC y HPLC, así como las de

separación y purificación de sus productos (Alaiz *et al.*, 1991a).

Como representantes de los aldehidos formados en la autoxidación lipídica utilizamos MDA y propanal. Pretendemos comprobar así la incidencia relativa de las estructuras ya descritas por otros autores en reacciones con MDA o alcanales por separado, y como pueden intervenir estos aldehidos conjuntamente en la reacción.

Se realizó un ensayo previo para comprobar que la esterificación del grupo carboxilo de la lisina con bromuro de 4-(fenilazo)fenacilo no introducía ningún artefacto en la reacción de los grupos amino con los aldehidos. Se hicieron sendas reacciones EFL:MDA:propanal y lisina:MDA:propanal. En ellas se comprobó que las características fluorescentes y de absorción de los productos de la reacción eran iguales (salvo en lo que respecta a la solubilidad y absorción en UV aportadas por el grupo cromóforo, por supuesto).

Para someter los productos de la reacción a los procesos cromatográficos preparativos que trataremos a continuación, se realizaron reacciones con relaciones molares de los reactivos EFL:MDA:propanal de 1:2:2 y 1:2:0. Del medio de reacción se recuperaron 1,4 y 0,9 g de producto total respectivamente mediante cromatografía en columna de C18. Los derivados del EFL quedan retenidos en la misma por la hidrofobicidad del grupo 4-(fenilazo)fenacilo. Se repitieron varias de estas reacciones con sus correspondientes cromatografías, que se detallan a continuación. Como puede verse solo nos ocupamos de los productos de modificación del EFL, y no de las reacciones que pueden sufrir los aldehidos sin afectar a los grupos amino.

4.1.2. PRODUCTOS DE LA REACCION

4.1.2.1. Productos aislados por cromatografía de adsorción

1 g de productos de la reacción EFL:MDA:propanal con estos reactivos en relación molar 1:2:2 se sometió a cromatografía en columna de 40x1,8 cm rellena con gel de sílice, eluyendo con el gradiente A (pag. 57). Las fracciones que se recogen se examinan por TLC, eluyentes B, C, y D (pag. 59), y se reúnen las que presentan igual composición.

La mezcla original de los productos de la reacción presenta en

Tabla 5. *Análisis elemental (AE) y punto de fusión (Pf) de las estructuras de interacción caracterizadas en la reacción EFL:MDA:propanal*

Compuesto	Fórmula	AE (% C, H y N)						Pf(C°)
		calculado		encontrado				
dDEFL	$C_{38}H_{40}O_7N_4 \cdot 2H_2O$	65,18	6,27	8,00	65,14	6,02	8,71	68-71
PDEFL	$C_{32}H_{34}O_6N_4 \cdot 1,5H_2O$	64,31	6,24	9,37	64,28	5,83	9,64	62-65
dPEFL	$C_{26}H_{28}O_5N_4 \cdot 1,3H_2O$	64,71	5,99	11,61	64,50	5,93	12,08	103-106

TLC, eluyente B, cuatro fracciones mayoritarias de Rf 0,59, 0,44, 0,26 y 0. Las tres primeras se lograron separar en la columna en los tres primeros pasos del gradiente de elución. El resultado de su análisis espectroscópico y otras características físicas se recogen en las tablas 5, 6 y 7 (ver también apéndice). En algunos casos se hizo necesaria una repurificación en TLC preparativa, eluyente B, para aplicar con éxito las técnicas que exigen mayor grado de pureza de la muestra. Se pueden así proponer las siguientes estructuras que se representan en la Fig. 13, pag. 87 : N,N'-di-(4-etil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldehído) del EFL (dDEFL), N- α -(2-propenal)-N- ϵ -(4-etil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldehído) del EFL (PDEFL) y N,N'-di-(2-propenal) del EFL (dPEFL).

En la interpretación de los datos de IR, MS y RMN de ^1H se han consultado los trabajos de Herмосín (1990) y Nair *et al.* (1981). Estos autores explican con detalle la interpretación de la información suministrada por estas técnicas para la elucidación de estructuras semejantes a las obtenidas por nosotros.

Según este último autor los N-2-propenales pueden tener dos formas tautómeras (enamína o imina), cada una de las cuales se puede presentar como cuatro isómeros distintos. Sin embargo, en disolventes apolares solo se detectan las enamínas EE y ZZ. Así en el espectro de RMN de ^1H de los derivados del EFL, realizados en cloroformo, se distinguen las señales correspondientes a estos dos isómeros. En disolventes polares el puente de hidrógeno que estabiliza el isómero ZZ no está favorecido, por lo que se presenta mayoritariamente la enamína EE.

Del mismo modo se identificó el alcohol 4-(fenilazo)fenacílico

(OHF), que aparece como mancha minoritaria de Rf 0,85 (Pf 106-108°C; UVmáx $\lambda = 328$ nm log $\epsilon = 4,24$; IR $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3432$ (OH), 1682 (C=O) y 1231 (OH); análisis elemental calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2$, C 70,00 H 5,04 N 11,66, encontrado C H N ; RMN de ^1H (Cl_3DH , 300 MHz) δ : 1,65 (a, OH, desaparece al deuterar), 4,95 (s, CH_2), 7,54 (m, C_6H_4), 8,03 (m, C_6H_5). Se formaría en la ruptura del enlace éster que une el grupo cromóforo a la lisina en el EFL. En ensayos previos se vió que esta ruptura aumenta con el pH de la solución. Esto hace que el EFL no sea apto para estudios en medios neutros y sobre todo alcalinos.

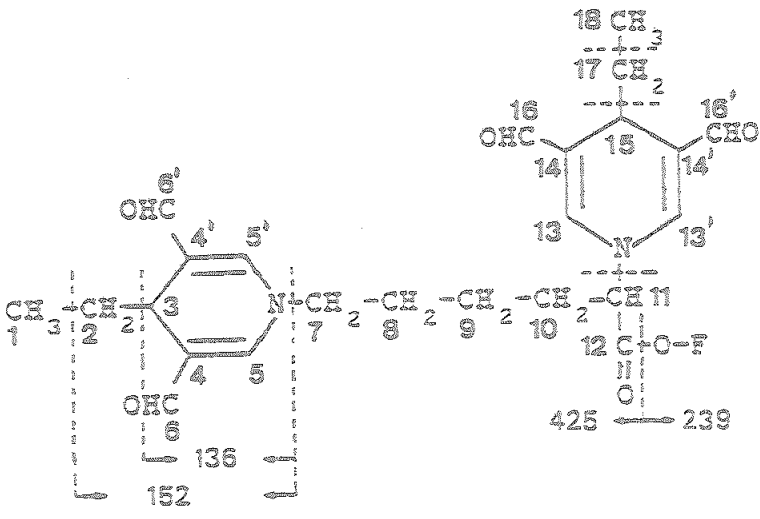
Tabla 6. Datos de ultravioleta (UV), infrarrojo (IR) y fluorescencia de las estructuras de interacción caracterizadas en la reacción EFL:MDA:propanal.

Compuesto	UV λ_{max} log ϵ (nm)		ν IR ₁ (cm^{-1})	Fluorescencia		
				λ_{max} exc (nm)	λ_{max} em (nm)	IR
dDEFL	234	4,52	1661 (C=O ald.)	387	449	64
	273	4,42	1603, 1570 (C=C)			
	328	4,45				
PDEFL	234	4,41	3258 (NH)	391	449	54
	276	4,55	1659 (C=O ald.)			
	327	4,42	1614 (HN-C=C-C=O)			
			1566 (C=C)			
dPEFL	280	4,83	3237 (NH)	no fluoresce		
	325	4,43	1605 (HN-C=C-C=O)			

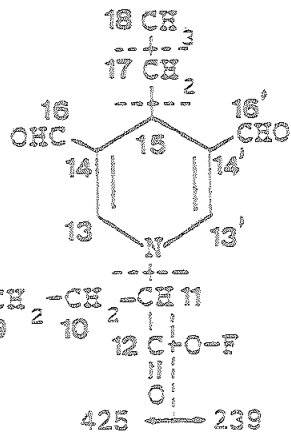
Tabla 7. Datos de espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C y ^1H de las estructuras de interacción caracterizadas en la reacción EFL/MDA:propanal.

MS		RMN (en Cl_3CD)
Compuesto	m/e (int. relativa)	δ (multiplicidad, J, asignación)
dDEFL	77 (100), 136 (24), 152 (9), 425 (0,2)	0,71(t, 7,5, 3H1), 0,73(t, 7,5, 3H18) 1,5-2,5(m, 10H2, 8, 9, 10, 17), 3,53(t, 7,1, 2H7), 4,02(t, 4,4, H3), 4,05(t, 4,5, H15), 4,3(dd, 6,2, H11), 6,83(s, 2H5, 5'), 6,97 ^a (s, H13), 7,01 ^a (s, H13'), 9,29(s, 2H6, 6'), 9,33 ^b (s, H16), 9,34 ^b (s, H16')
PDEFL	77 (100), 136 (24), 152 (9), 276 (3), 304 (1,5), 333 (0,1)	0,68(t, 7,4, 3H1), 1,5-2,2(m, 6H8, 9, 10), 1,46(qd, 7,4, 4,7, 2H2), 3,51(m, 2H7), 3,98(t, 4,3, H3), 4,05(m, H11ZZ) 4,21(m, H11EE), 5,1(m, H15ZZ), 5,33(m, H15EE), 6,4(a, H13EE), 6,83(s, H14ZZ), 6,86(s, 2H5, 5') 7,25(m, H14EE), 9,10(d, 8,2, H16EE), 9,19(m, H16ZZ), 9,26 ^c (s, H6), 9,27 ^c (s, H6'), 10,1 [*] (a, H13ZZ)
dPEFL	ningún fragmento característico	1,5-2,2(m, 6H6-8), 3,26(t, 6,3, 2H5), 4,05(m, H9ZZ), 4,21(m, H9EE), 4,98 ^d (dd, 6,9, 2,2, H2ZZ), 5,15 ^d (m, H13ZZ), 5,32-5,56(m, H2EE), 5,4(m, H13 EE), 5,8(m, 2H4, 11EE), 6,8(m, 2H3ZZ 12ZZ), 7,26(m, 2H3EE, 12EE), 9,07-9,22 (m, 2H1, 14), 10,05 [*] (a, 2H4ZZ, 11ZZ)

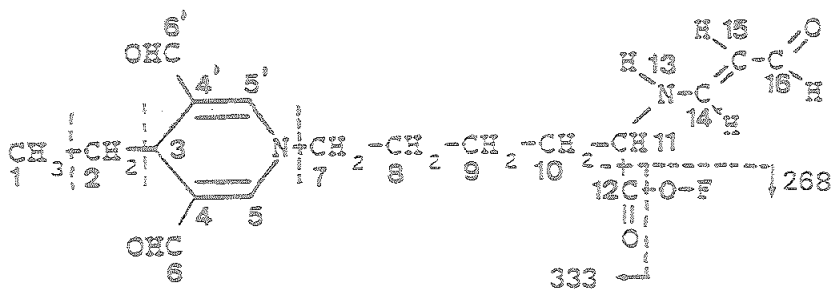
Ver numeración de átomos y fragmentaciones en Fig. 13
a, b, c, d, Las asignaciones pueden estar intercambiadas
Realizados a 300 (dDEFL y PDEFL) o 200 MHz (dPEFL)



QDEFL PM= 664,7



ZZ



EE

PDEFL PM= 570,6

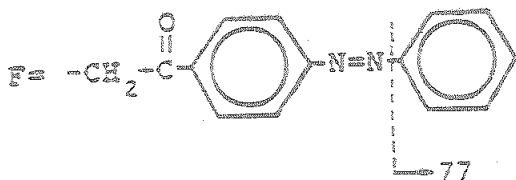
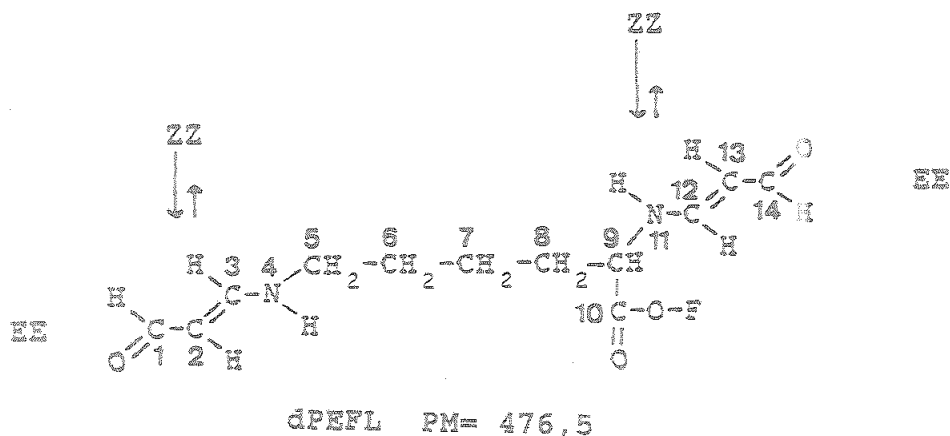


Fig. 13. Estructuras de interacción identificadas en la reacción modelo estudiada. Se da la numeración de carbonos utilizada en la asignación de señales de RMN de ^{13}C y ^1H . Las líneas de puntos marcan las rupturas en MS.

En cuanto a la fracción de Rf 0 en TLC, no hemos conseguido una cromatografía en gel de sílice satisfactoria. Tanto los eluyentes C y D en TLC, como el gradiente A en columna, no consiguen su movilización, a pesar de su gran polaridad. Tan solo se moviliza en pequeña cantidad y sin formar fracciones definidas.

4.1.2.2. Cromatografía de exclusión molecular

0,5 g del producto de la reacción EFL:MDA:propanal en relación molar 1:2:2 se inyectaron en una columna de Sephadex LH-20. El estudio del eluato por TLC, eluyente B, sirvió para estimar volúmenes de elución (V_e).

Las fracciones observadas se corresponden con las encontradas en cromatografía de adsorción. Con el volumen de exclusión ($V_e = 54$ ml) eluye una fracción que da Rf de 0 en TLC. Con V_e de 74, 91 y 154 ml eluyen las que resultan ser dDEFL, PDEFL y dPEFL respectivamente. Con V_e de 108 ml eluye el OHF.

Los pesos moleculares de estas últimas cuatro fracciones no se corresponden con el V_e que les correspondería según la recta de calibrado de la columna usada (Fig. 11). El OHF incluso eluye antes que el dPEFL, de mayor PM. Esto se explica porque el relleno utilizado se basa en el principio de exclusión molecular, pero también está afectado por interacciones hidrofóbicas que provocan separación por reparto (Davenport, 1971). Según este mismo autor la utilización de cloroformo como eluyente impide este efecto. Sin embargo, y según

nuestros resultados, incluso con este eluyente tan solo se puede obtener una aproximación grosera del PM. La fracción que no conseguimos movilizar en TLC eluye con el volumen de exclusión de la columna, por lo que se debe tratar de moléculas de relativamente alto PM (denominaremos a esta fracción POL1).

Se realizó el mismo proceso cromatográfico con 0,5 g del producto proveniente de reacción sin propanal y con la misma proporción entre EFL y MDA que anteriormente. Se encontraron solo dos fracciones al examinar el eluato por TLC, la correspondiente al volumen de exclusión (que abreviamos POL2) y el dPEFL (aparte del OHF).

Se probó la TLC en placas de fase inversa de POL1 y POL2 con diversos eluyentes. No se consiguió movilizar las muestras. Puesto que no logramos una cromatografía satisfactoria se analizaron tal como se obtienen de la columna de Sephadex-LH20 para intentar dilucidar su composición, aún siendo conscientes de que se trataba de fracciones heterogéneas.

El UV de ambas muestras presenta máximos a 280 y 327 nm de aproximadamente igual intensidad. POL2 Presenta además un pico de menor intensidad a 230 nm y hombro a 390 nm. En MS POL1 da fragmentos de m/e 410, 441, 648 y 663; o 419, 464, 549 y 564 (según la intensidad de la ionización), con intensidades relativas entre 10 y 40. Se pueden explicar por ruptura de un dímero de EFL formado por entrecruzamiento de los α -amino a través de tres átomos de carbono saturados, y con los ϵ -amino ocupados por N-2-propenales, que tendría un PM de 885. POL2 da también fragmentaciones relativamente grandes (m/e 411, 446, 447, 448, con intensidades relativas entre 10 y 100), que no nos permiten proponer ninguna estructura. No se detecta fluorescencia. El IR y RMN

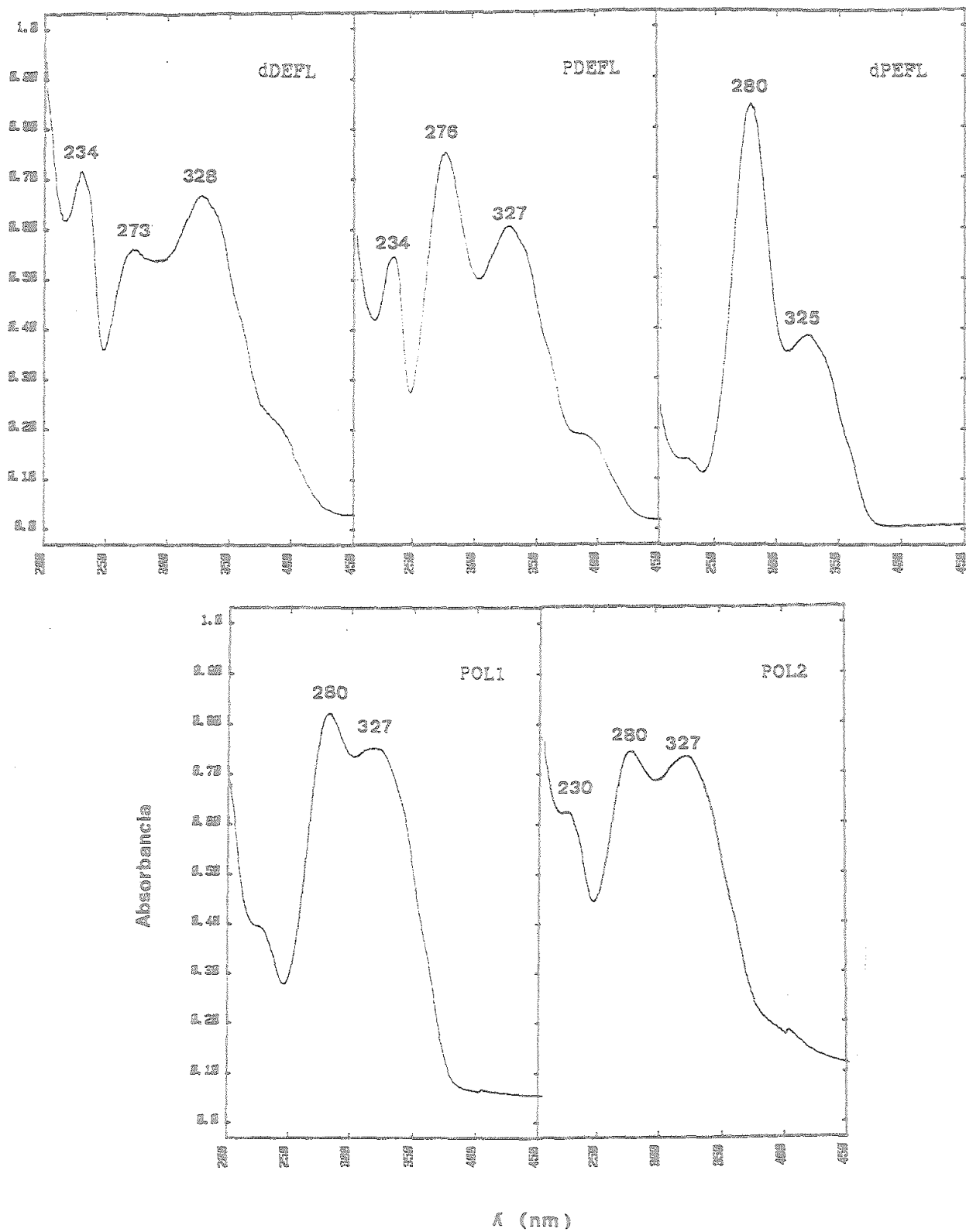


Fig. 14. Espectros de UV de a) dDEFL, b) PDEFL, c) dPEFL, d) POL1 y e) POL 2

no aportan información útil.

Por tanto, basándonos en los datos cromatográficos (Sephadex-LH20) y de UV y MS, tan solo podemos concluir que POL1 y 2 están formadas por dímeros o polímeros del EFL provocados posiblemente por entrecruzamientos entre grupos amino a través de aldehidos. Los aminos que no intervinieran en estos entrecruzamientos estarían formando estructuras tipo N-2-propenal en el caso de POL1, y N-2-propenal y dihidropiridinas en el caso de POL2.

En la Fig. 14 se muestran los espectros UV de POL1 y 2 y las tres estructuras aisladas por cromatografía de adsorción.

4.1.3. ESTUDIO DE LA REACCION POR HPLC

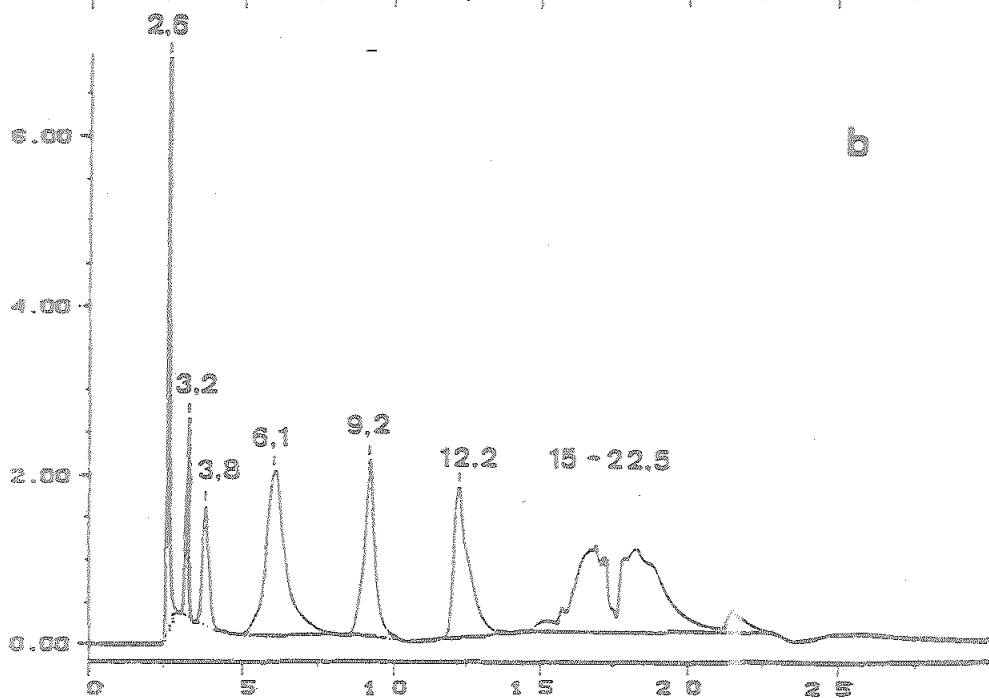
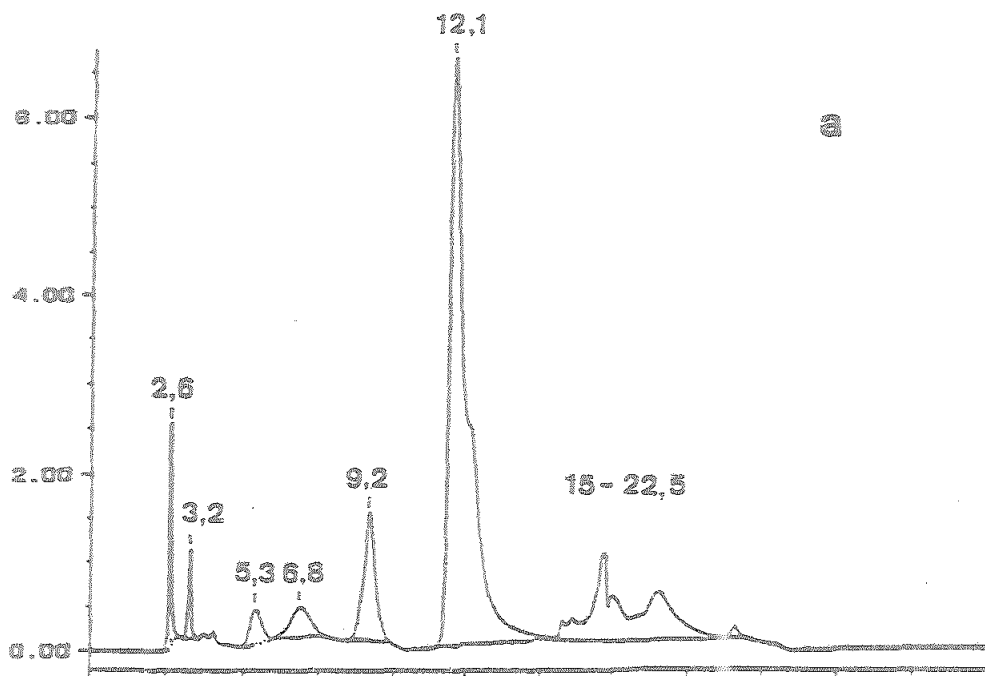
Se estudiaron por HPLC reacciones con proporciones molares de los reactivos EFL:MDA:propanal de 1:2:0, 1:2:2 y 1:2:4. Se realizó también la reacción 1:0:2, pero ya en TLC se vió que el propanal solo en estas condiciones no produce modificación del EFL. Medimos asimismo el UV de una reacción 0:2:2 para ver si podía dar algún producto que pudiera ser tomado por un derivado del EFL al absorber a 330 nm. Se pretende obtener un perfil completo de las reacciones y cuantificar las estructuras que ya se habían logrado caracterizar como se ha descrito.

La detección se realizó a 330 nm, longitud de onda a la que se situa el máximo de absorción del grupo cromóforo del EFL. Las condiciones de elución que se recogen en Materiales y Métodos para este análisis se pusieron a punto realizando ensayos con una mezcla de los productos siguientes: dDEFLL, PDEFLL, dPEFL, POL1, POL2 y OHF. Inyectándolos por separado se recogió su tiempo de retención (tr).

Todas estas fracciones dieron un solo pico, salvo POL1 y 2. Al igual que ocurre en las cromatografías de adsorción, su elución no fué satisfactoria. Se consiguió tenerlas como un pico integrable tan solo acidificando el eluyente con ácido acético glacial y aumentando bruscamente la polaridad del mismo del minuto 10 al 11 de la programación de elución. POL1 y POL2 ofrecieron el mismo análisis en estas condiciones.

Al inyectar las reacciones que queríamos estudiar se observó una

Absorción 330 nm (señal en v \times 10)



Tr (min)

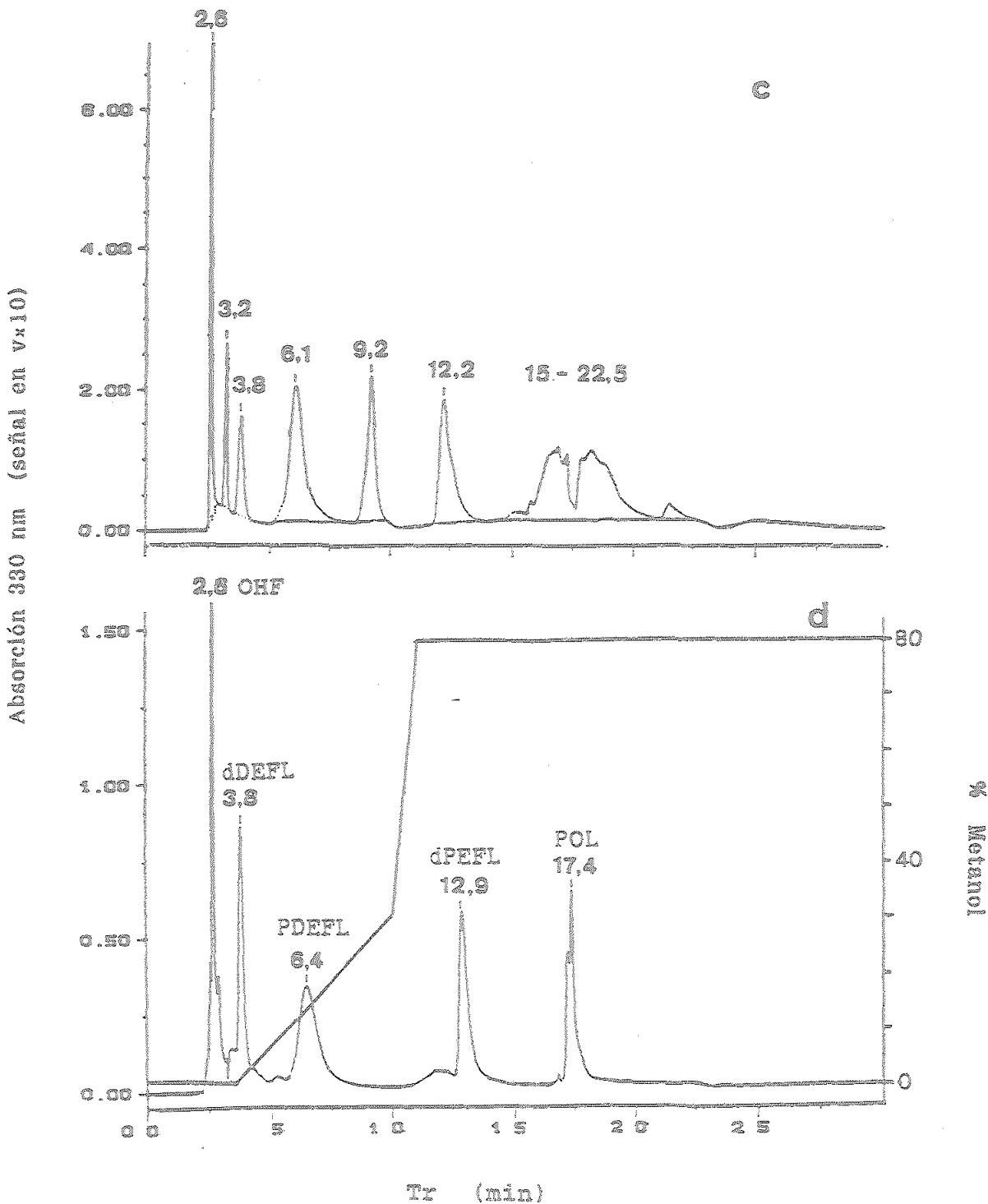


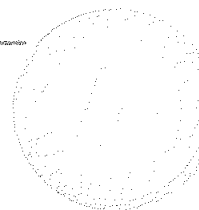
Fig. 15. Cromatogramas de HPLC de reacciones EFL:MDA:propional. La relación entre estos reactivos fué a) 1:2:0, b) 1:2:2 y c) 1:2:4. En d) se muestra el análisis de una mezcla de las fracciones obtenidas por cromatografía preparativa de adsorción y exclusión molecular y el gradiente de elución empleado en estos análisis.

fracción heterogénea localizada alrededor del tiempo de retención de POL1 y 2, que tampoco aparecía en los cromatogramas a no ser que se acidificara el eluyente. En cuanto a su composición solo podemos decir que incluye a los dímeros y/o polímeros de POL1 y 2. En la Fig. 15 se muestran los cromatogramas obtenidos y en la Fig. 16 los UV del total de las reacciones. En la Tabla 8 se recogen las concentraciones de cada una de las fracciones eluidas, estimadas como el tanto por ciento del área total que corresponde a cada pico.

Se repitió la inyección en HPLC de la muestra con relación de reactivos 1:2:2 tras dos días de almacenaje en el congelador. Aparecieron los mismos picos que en la inyección tras concluir la

Tabla 8. Cuantificación de los productos de reacciones EFL:MDA:propanal. Se da el % del área total que corresponde a cada pico, una vez restada el área correspondiente al OHF (que supone entre un 2 y 7% del total).

tr (min)	Asignación	Relación molar de los reactivos:			
		1:2:0	1:2:2	1:2:4	1:2:2 (tras 48h)
3,8	dDEFL	0	4,8	5,1	10,2
6,4	PDEFL	3,3	20,7	20,3	40,9
12,9	dPEFL	63,6	14,8	15,1	12,3
15-22,5	(POL1 y 2)	21,4	43,8	43,8	17,5
3,2 5,3 9,2	desconocidos	11,7	15,8	15,6	19,0



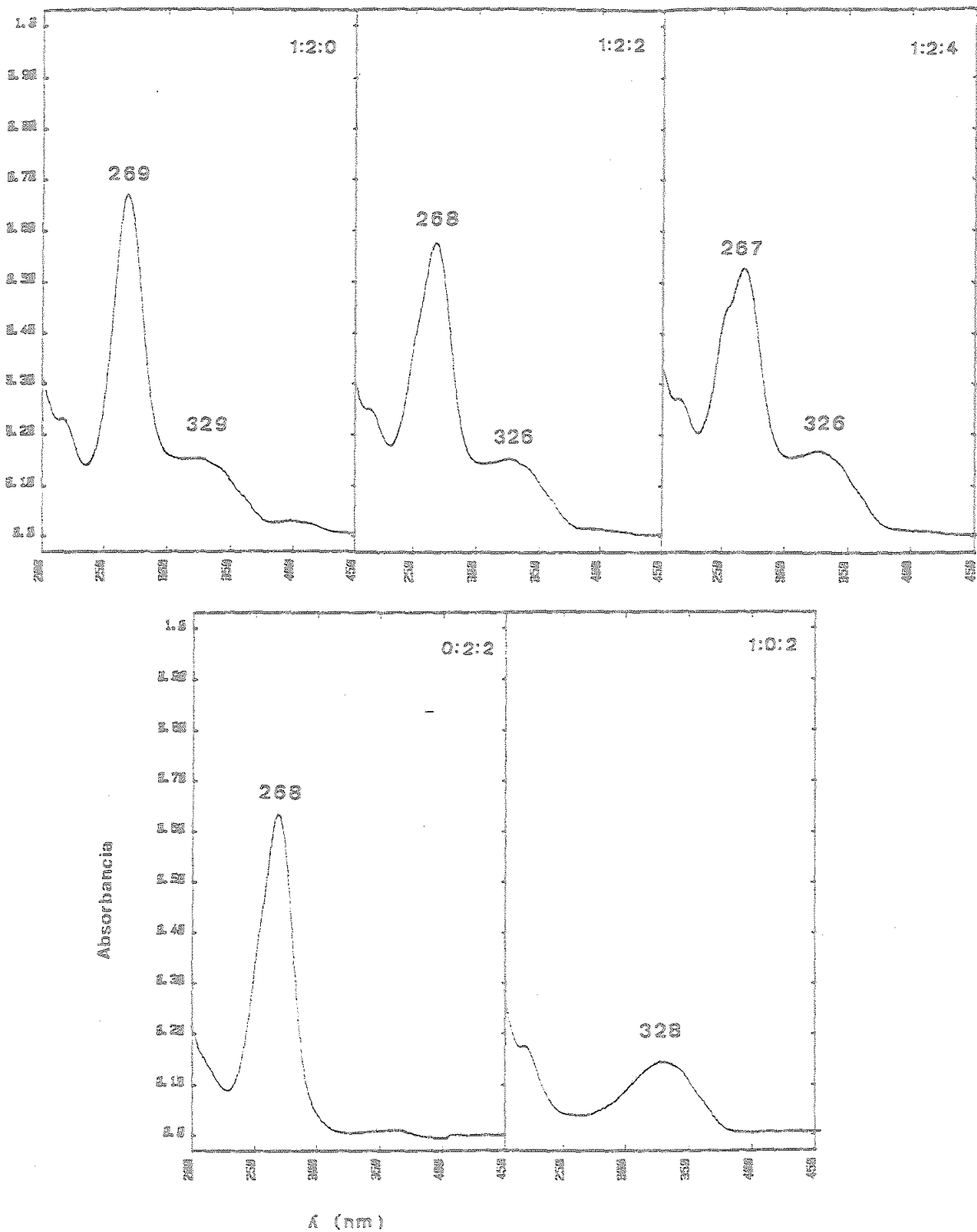


Fig. 16. Espectros de UV de las reacciones EFL:MDA:propanal. Se da la proporción molar de los reactivos. La sal sódica del MDA tiene máximos de absorbancia a λ 267 nm (H_2O , $\log \epsilon = 4,50$) y el EFL a 230 y 328 nm ($\log \epsilon = 4,09$ y 4,42)

reacción, pero con distintas áreas, como se recoge también en la Tabla 8. Resultó una fuerte disminución de los compuestos que eluyen con tr 15-22,5 min, aumentando la cantidad de dDEFL y PDEFL.

La cuantificación de las reacciones en relación de reactivos 1:2:2 y 1:2:4 dan prácticamente el mismo resultado. En la reacción 1:2:0 la fracción que incluye a POL1 y POL2 se forma en cantidad mucho menor que cuando está presente el propanal.

4.4.1. DISCUSION

El empleo del EFL en nuestra reacción modelo como sustrato sobre el que actúan los aldehidos facilita la recuperación de los productos del medio, así como su posterior cromatografía y caracterización estructural. Sin embargo, aun contando con esta ventaja no hemos conseguido identificar a los dímeros y/o polímeros que se forman y que abreviamos POL1 y 2. En la investigación estructural de la modificación de lisina por aldehidos procedentes de oxidación lipídica, es de este tipo de compuestos de los que menos se conoce.

Chio y Tappel (1969a) propusieron la estructura generalmente aceptada para explicar la aparición de productos de alto PM por entrecruzamiento entre grupos amino. Se trata como ya vimos de los N,N'-1-amino-3-iminopropenos, formados por reacción de una molécula de MDA con dos grupos amino de una misma molécula, o de moléculas distintas. Sin embargo, se ha comprobado que también otros aldehidos producen entrecruzamientos (Kikugawa *et al.*, 1985). Posiblemente se ha exagerado la importancia de esta estructura, ante la falta de otras propuestas. Y esta falta de propuestas se explica porque estos productos poliméricos de alto PM relativo suelen ser muy polares e inestables, lo cual dificulta su separación cromatográfica. Los trabajos con reacciones modelo se suelen limitar por tanto a la caracterización de los productos de reacción más estables y más fácilmente separables del medio de reacción, que suelen ser los

extraíbles del medio con disolventes orgánicos.

En lo que respecta a nuestra reacción modelo, pensamos que la derivatización con el grupo 4-(fenilazo)fenacilo rendiría productos en la reacción con aldehidos más fácilmente cromatografiables. Así ha sido salvo para el caso de la fracción que parece estar formada por polímeros, que no se ha podido estudiar por cromatografía de adsorción. Futuras investigaciones con otros rellenos de columna de exclusión molecular con rangos de separación distintos al del Sephadex LH-20 quizá den mejor resultado.

Lo que si podemos concluir es que no parece que las estructuras tipo N,N'-1-amino-3-iminopropeno puedan explicar, al menos en su mayor parte, la formación de los entrecruzamientos entre grupos amino que habrían dado lugar a POL1 y 2. No encontramos la fluorescencia característica de esta estructura (Chio y Tappel, 1969a, con confirmación de Nair *et al.*, 1986) ni su máximo de absorción en UV ($\lambda_{\text{máx}}$ 300-310 nm $\log \epsilon = 4,5$).

El hecho de haber realizado la reacción modelo con dos aldehidos representantes de dos grupos de características muy distintas ($\alpha\beta$ insaturados y bifuncionales por una parte, y alcanales por otra) permite llegar a conclusiones interesantes. No hemos encontrado entre los productos de nuestra reacción las sales de piridinio sustituidas descritas por Suyama y Adachi (1978). No nos parece que se puedan formar fácilmente en los alimentos, pues la reacción de alcanales con aminos en este caso es lenta. El propanal, al menos en su mayor parte, parece ser que en presencia de MDA reacciona conjuntamente con éste para formar dihidropiridinas. Posiblemente los alcanales reaccionen también con otros aldehidos insaturados de alta reactividad antes que

con grupos amino en solitario. En la reacción del EFL con propanal no se ha formado ningún producto de modificación.

La presencia de propanal modula cuantitativa y cualitativamente la reactividad del MDA, en el sentido de que este último deja de formar N-2-propenales para formar también dihidropiridinas con el alcanal.

Como cabía esperar, en el análisis por HPLC de los productos de la reacción del EFL con MDA casi no se forman los derivados que contienen dihidropiridinas en su molécula, pues hace falta un alcanal para ello. Las pequeñas cantidades de dDEFL y PDEFL que se detectan serían formados por el acetaldehído que se origina en la hidrólisis del MDA (Gómez-Sánchez *et al.*, 1990a).

Tan solo una de las estructuras de modificación de la lisina por aldehídos de las que han sido descritas en reacciones modelo ha sido identificada en alimentos. Se trata de la ϵ PL (Fig. 9, pag. 42). Los N-2-propenales se describieron por primera vez para el caso de la glicina (Crawford *et al.*, 1966). La ϵ PL fué encontrada en hidrolizados enzimáticos de alimentos ricos en lípidos insaturados por Piché *et al.* (1988a). Esta estructura se forma por reacción del grupo ϵ -amino de la lisina con MDA. Dado lo favorecida que está la reacción de este aldehído y los alcanales para formar dihidropiridinas, parece muy probable que en este tipo de alimentos también se originen estas estructuras.

4.2. ESTUDIO DEL TRANSITO METABOLICO DE ESTRUCTURAS DE INTERACCION DE LISINA CON MDA Y ACETALDEHIDO

4.2.1. INTRODUCCION

Considerando los resultados de la primera parte de nuestra investigación, así como la literatura relacionada con ella, decidimos realizar el estudio metabólico de las estructuras de modificación de lisina tipo N-2-propenal y dihidropiridina. Aunque la existencia de las segundas no ha sido demostrada en los alimentos, su fácil formación en reacciones modelo como la tratada anteriormente, hace que consideremos muy probable su presencia en alimentos ricos en lípidos insaturados que sufren oxidación.

En la dieta, la lisina se encuentra fundamentalmente formando parte de las proteínas. El amino ϵ es el único grupo funcional susceptible de reacción en los restos de lisina. Si la modificación sufrida por la proteína no impide la acción de los enzimas proteolíticos, estos restos se liberan en la digestión. El amino α antes protegido por el enlace peptídico, queda así libre. Por tanto son las modificaciones del grupo ϵ -amino las que tiene interés

estudiar en cuanto al efecto que puedan tener sobre el valor nutricional de la proteína alimentaria.

Sin embargo, también merece estudio el efecto de las modificaciones del grupo α -amino, por dos motivos principales. A algunos alimentos deficientes en lisina se les añade este aminoácido como suplemento. Esto se hace típicamente en alimentos infantiles basados en cereales, cuya proteína suele tener la lisina como aminoácido limitante. En este caso, los dos grupos amino del aminoácido quedan expuestos a ataque. El segundo motivo es de orden más tecnológico. Por la necesidad de añadir lisina a ciertos alimentos, se han ensayado diversos derivados de este aminoácido en la búsqueda de aquellos que presentando mejores propiedades funcionales que el aminoácido libre, tengan también una alta disponibilidad. En este contexto Finot *et al.* proponen la denominación de "prolisinas" para los derivados de lisina biológicamente disponibles. Estos trabajos se pueden beneficiar de investigaciones como la que hemos realizado (Boggs, 1978; Finot *et al.*, 1978).

Por tanto, nos planteamos la síntesis de los N-2-propenales y dihidropiridinas de la lisina para su uso en los estudios de metabolismo en sus tres posibles "combinaciones": los N- α - y N- ϵ -monoderivados, y el N,N'-diderivado. Sin embargo, solo hemos conseguido obtener con el necesario grado de pureza los tres siguientes: N,N'-di-(2-propenal)lisina (dPL), N,N'-di(-4-metil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldhído)lisina (dDL) y la ϵ PL (que cuando se sintetizó a partir de precursores radiactivos se utilizó como mezcla de ϵ PL y α PL 7:3, Fig 17 pag. 107 y Fig. 20 pag. 115).

Se ha estudiado el tránsito metabólico de estas estructuras. Para ello se han sintetizado con precursores radiactivos y se ha medido su excreción e incorporación a varios órganos y tejidos, así como a microsomas hepáticos. También se ha investigado su resistencia al ataque de los enzimas contenidos en homogenados totales de hígado, riñón y mucosa intestinal. En este caso no fué necesario el marcaje radiactivo. Estas experiencias han ido encaminadas a valorar la disponibilidad de la lisina modificada, comparándola con la de la lisina libre que utilizamos como valor de referencia.

4.2.2. SINTESIS DE LOS DERIVADOS DE LISINA

Nuestro objetivo es encontrar unas condiciones de reacción que ofrezcan un rendimiento lo más alto posible de los productos que nos interesan. La cromatografía que se realice posteriormente debe permitir obtenerlos en un grado de pureza muy alto para que sea posible utilizarlos en experimentos de metabolismo. En el caso de utilización de precursores radiactivos, se debe estimar tanto la pureza química como radioquímica (Catch, 1968; Dring, 1987) de los productos aislados. Hemos medido ambas purezas mediante TLC, visualizando con lámpara UV y reactivo TBA, y midiendo radiactividad por análisis lineal de placas.

Puesto que se trata de sintetizar los productos para utilizarlos en estudios de metabolismo, no cabe la posibilidad de utilizar derivados de lisina que faciliten la tarea, como pueden ser los ésteres metílicos o 4-(fenilazo)fenacílicos, o los derivados N-acetilados. Los productos de interacción de estos derivados podrían comportarse de distinto modo que los productos de interacción del aminoácido natural, distorsionando entonces los resultados. Por tanto, sintetizamos estos productos partiendo de lisina libre, y uno o dos de los aldehidos que bastan para producir las estructuras que hemos decidido estudiar. Ello nos obliga a poner a punto nuevos métodos para la separación de los productos de interacción de la lisina libre. Tan solo contamos para ello con el precedente del grupo de Draper para la

obtención de los N-2-propenales, pero no seguiremos su metodología como a continuación explicamos.

4.2.2.1. N-2-Propenales de la lisina

Estos compuestos se forman por reacción de la lisina con MDA. Siguiendo a Nair *et al.* (1981), el grupo de Drapper realiza la reacción de síntesis en tampón acetato sódico pH 4,2 y con los reactivos en concentración equimolar (McGuirr *et al.*, 1985). La mezcla de reacción la someten a cromatografía de intercambio aniónico. La fracción que obtienen de derivados de lisina la separan por HPLC en fase inversa, utilizando agua como eluyente. Informan haber identificado por RMN de ^1H la αPL y la ϵPL , en una proporción de 1:10.

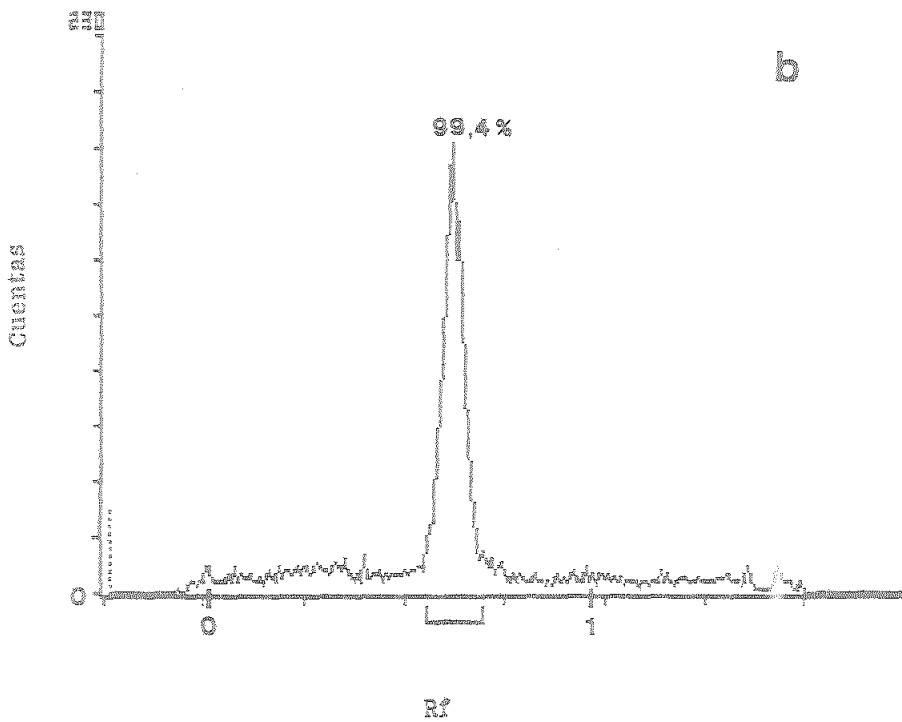
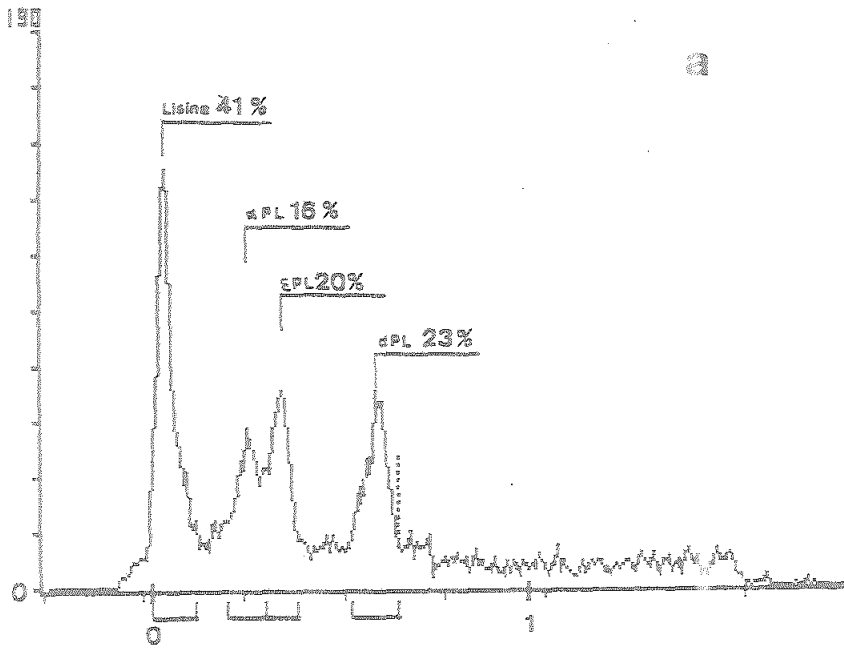
En trabajo posterior (Draper *et al.*, 1988b), describen como en solución acuosa la ϵPL pasa en parte a αPL . Proponen para explicar esto un equilibrio a través del derivado cíclico intramolecular N,N'-1-amino-3-iminopropeno (Fig. 9, pag. 42). En la manipulación de los N-2-propenales de la lisina hemos observado también esta conversión, tanto en solución acuosa como orgánica.

Nosotros ensayamos la reacción en estas mismas condiciones. Detectamos en TLC (eluyente E, visualización en lámpara UV y con reactivo TBA) los compuestos que más tarde caracterizamos como N-2-propenales. Sin embargo no adoptamos este método de síntesis, pues observamos que estos compuestos se deterioran rápidamente en agua. Ya la simple concentración antes de someter los productos a cromatografía (liofilización o concentración a vacío) hacía que se formaran

compuestos de degradación de bajo Rf. No consideramos entonces abordable ni la reacción ni la cromatografía posterior utilizando medios acuosos. En consecuencia realizamos la reacción en metanol según se explica en Materiales y Métodos, y se utiliza cromatografía preparativa de adsorción en columna. En este medio se producen cantidades similares de los tres N-2-propenales, que son además más estables.

Se observaron en la TLC del resultado de la reacción tres manchas que dan positivo con el reactivo TBA, de Rf 0,60, 0,47 y 0,37. Se sometieron a cromatografía en columna de 40 x 1,8 cm con gel de sílice y gradiente de elución B, pag. 58. Se consiguió con un rendimiento del 7% en forma pura el compuesto de Rf más alto. Se identificó como la sal sódica de la N,N'-di-(2-propenal)lisina, por la información obtenida de su análisis espectroscópico (Tablas 9, 10 y 11; ver también apéndice).

Los otros dos compuestos se recogieron juntos con un rendimiento del 22%. Recromatografiando una segunda vez esta fracción se consiguió separar en parte el compuesto de Rf 0,47, que resultó ser la ϵ PL. Fracasamos en la obtención del tercer compuesto como sólido, pues se mostró muy inestable y se descomponía rápidamente. Tomándolo como solución pura tras una tercera cromatografía se hicieron mediciones de IR y UV. Estos datos, más los correspondientes a la ϵ PL se muestran también en las tablas 9, 10 y 11. Los UV e IR de estos dos últimos compuestos resultaron ser iguales. Esta segunda mancha debía ser por tanto la α PL. Se intentó la MS de los tres compuestos, pero no se obtuvieron buenos resultados. Posiblemente hubiera sido necesaria la derivatización de al menos el grupo carboxilo para obtener fragmen-



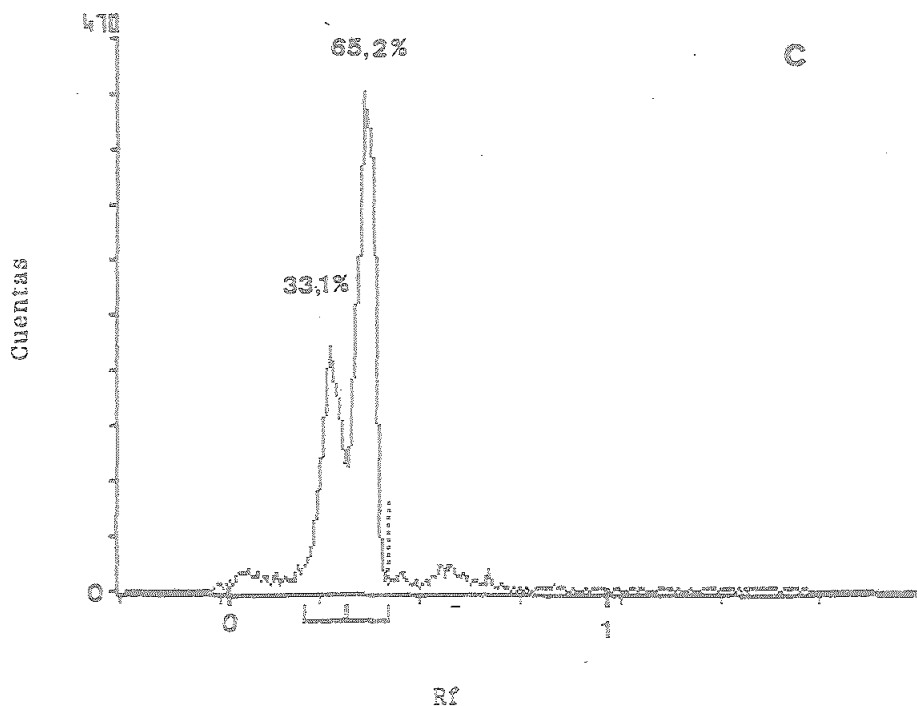


Fig. 17. Radiactividad medida en analizador lineal de placas; reacción lisina MDA. a) Total de la reacción, b) dPL, c) mPL. Se da el % del área de cada pico tras descontar el ruido de fondo.

taciones de interés. En el espectro de RMN de ^1H de los N-2-propenales se distinguen las formas enamina e imina (Fig. 18) como describen McGirr *et al.* (1985). Predomina la forma enamina.

Partidas de dPL y ϵ PL obtenidas de este modo son las que se han utilizado en la experimentación metabólica cuando no era preciso marcaje radiactivo.

Para la síntesis con precursor radiactivo se realizó la reacción de igual manera pero en una cantidad dos veces y media menor y añadiendo lisina tritiada. La separación se realizó también guardando esta reducción de escala tanto en cantidad de relleno como en volumen en cada uno de los pasos de la elución con el gradiente B, en columna de 20x0,6 cm. En vez de ϵ PL se obtuvo una mezcla ϵ PL: α PL 7:3, con lo que se ahorró uno de los pasos a través de columna a los que antes nos referimos y se consiguió mejor rendimiento. En la figura 17 se muestran mediciones de radiactividad en placas de TLC, eluyente E.

4.2.2.2. Dihidropiridinas

Ya vimos como estas estructuras se forman por reacción de dos moléculas de MDA y una de alcanal con un aminocompuesto. Generalmente se han estudiado con MDA como único aldehído presente en la reacción, en cuyo caso el alcanal sería acetaldéhído formado en la hidrólisis de este aldehído. Sin embargo, el empleo de un alcanal como reactivo hace que aumente mucho el rendimiento.

Hacemos la reacción en tampón fosfato sódico pH 7 a 37°C, como Kikugawa *et al.* (1984a), pero utilizamos la sal sódica del MDA y no el hidrolizado total de tetrametoxipropano, como hacen estos autores. Como alcanal usamos acetaldéhído, por no existir el propanal (utilizado en la reacción modelo EFL:MDA:propanal) en catálogo de productos radiactivos.

Otras condiciones de reacción que ensayamos previamente son tampón acetato sódico pH 4,2 50°C (Nair *et al.*, 1988) y metanol

(mejora introducida por nosotros en la síntesis de los N-2-propenales). También se ensayó la utilización de la sal sódica del "cuasitrímero" formado por reacción de dos moléculas de MDA con una de acetaldehído, obtenido según Hermosín (1990). Este compuesto sustituía al MDA y al acetaldehído. Los mejores resultados se consiguieron con las condiciones antes mencionadas y que se desarrollan en Materiales y Métodos. Estos buenos resultados se refieren a buen rendimiento de los

Tabla 9. Datos de UV, IR y fluorescencia de las moléculas sintetizadas en las reacciones de lisina con MDA, y con MDA y acetaldehído. En la Fig. 19 se muestran los espectros UV.

Compuesto	UV λ_{max} (nm)	$\log \epsilon$	ν IR _r (cm ⁻¹)	Fluorescencia		Int. rel.
				λ_{max} exc (nm)	λ_{max} em (nm)	
dPL	281		3252 (OH,NH) 1601 (HN-C=C-C=O) 1406 (C-N)	no fluoresce		
ϵ PL	280	4,53	3238 (OH,NH) 1601 (HN-C=C-C=O) 1406 (C-N)	"	"	
α PL	280		3252 (OH,NH) 1601 (HN-C=C-C=O) 1406 (C-N)	"	"	
dDL	236 265 391	4,51 4,23 4,21	1661 (C=O ald) 1568 (C=C)	391	450	131

Tabla 10. Datos de RMN de ^{13}C y ^1H de las moléculas sintetizadas en las reacciones de lisina con MDA, y con MDA y acetaldehído

Compuesto	RMN	
	^1H δ (multiplicidad, J, asignación)	^{13}C δ , asignación
dDL	0,86(dd, 2,58, 6,47, 6H1, 16), 1,2-2(m, 6H7,8,9), 3,5-3,7 (m, 4H6, 2, 14), 3,91(m, H10), 7,33(m, 4H4, 4', 12, 12'), 9,19 (m, 4H5, 5', 15, 15')	
dPL	1,30(m, 2H7), 1,49(m, 2H8), 1,68 (m, 2H6), 2,99(t, 6,60, 2H5 enam), 3,14(m, 2H5 imina), 3,58, (t, 5,20, H9), 5,07(m, 2H2, 13 enam), , 5,22(m, 2H2, 13 imina), 7,30 (m, 2H3, 12), 8,80(m, 2H1, 14 imina), 8,89(m, 2H1, 14 enam) 7,73(a, H4)*, 7,90(a, H11)*	22,9 C7, 27,8 C8, 31,3 C6, 43,1 C5, 56,5 C9, 100 C2, 13, 158,7 C3, 12, 174,3 C10, 189,6 C1, 14
ϵ PL	1,32(m, 2H7), 1,52(dd, 6,9, 14,1, 2H8), 1,73(m, 2H6), 3,11(t, 6,71, 2H5 enam), 3,22(t, 6,45, 2H5 imina), 3,60(t, 6,04, H9), 5,26, (dd, 9,5, 12,62, H2), 7,40(d, 12,61, H3), 8,47(d, 9,94, H1 imina), 8,55(d, 9,4, H1 enam) 7,65(a, H4)**	23,2 C7, 28,3 C8, 31,4 C6, 44,1 C5, 55,6 C9, 100,7 C2, 162,1 C3, 174,6 C10, 192,3 C1

Ver numeración de átomos y fragmentaciones en Fig. 18

Realizados en $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$ (ϵ PL) o DMSO-d_6 (dDL y dPL)

Realizados a 200 MHz para ^1H y 75,1 MHz para ^{13}C

* Desaparecen al deuterar

** En DMSO-d_6

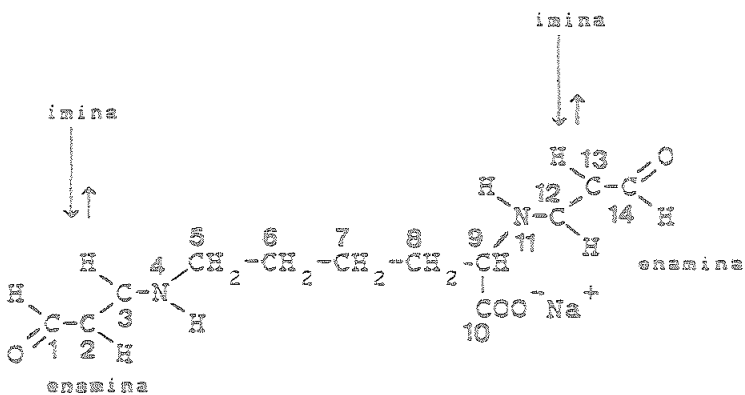
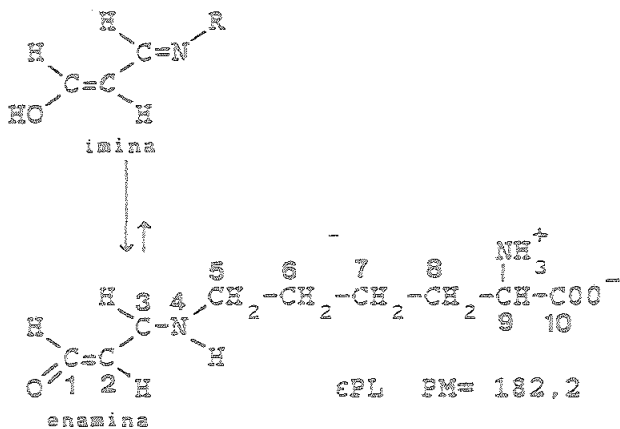
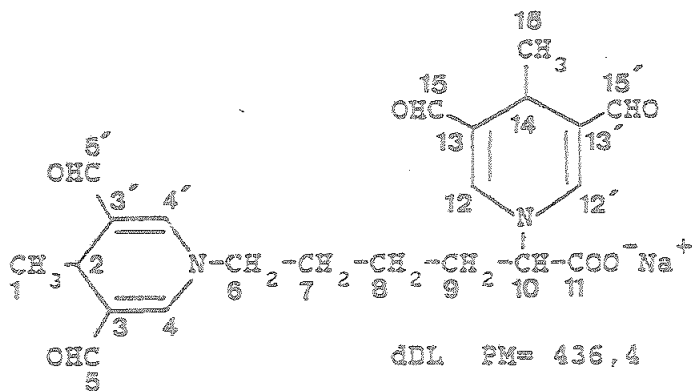


Fig. 18. Moléculas sintetizadas para su estudio metabólico. Se muestra la numeración de carbonos utilizada en la asignación de las señales de RMN

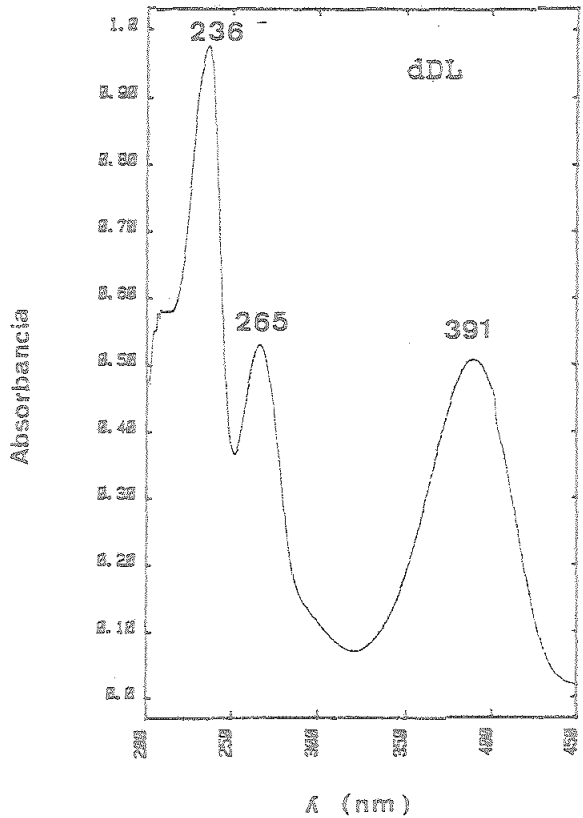
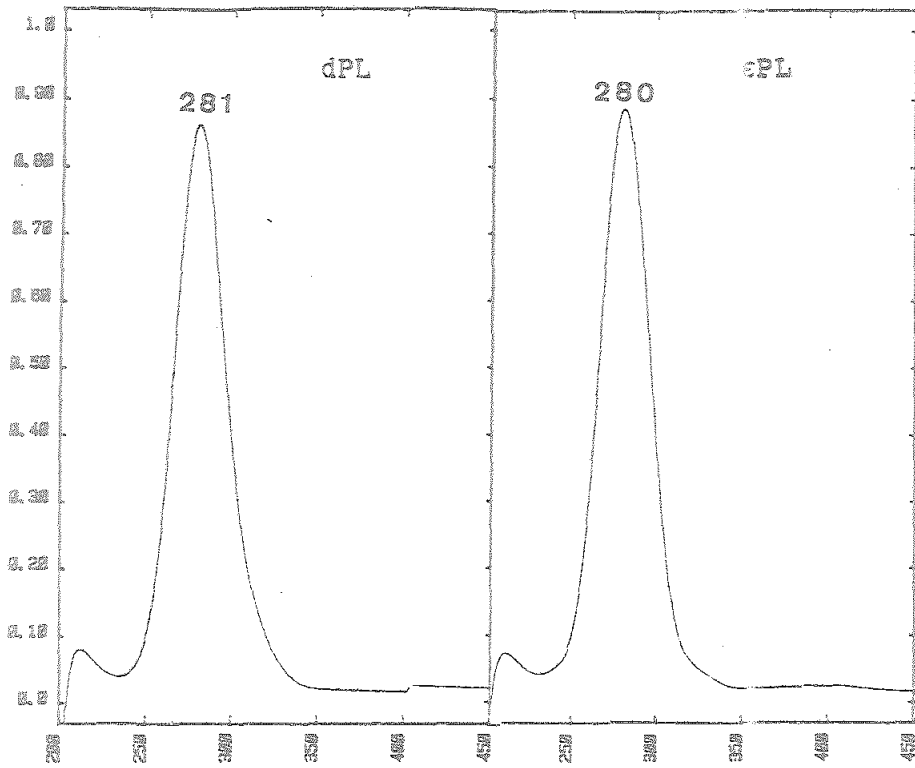


Fig 19. Espectro de UV de dDL, dPL y εPL

Tabla 11. Análisis elemental y punto de fusión de las moléculas sintetizadas en las reacciones de lisina con MDA, y con MDA y acetaldehído

Compuesto	Fórmula	AE (% C, H y N)						Pf(C°)
		calculado			encontrado			
dPL	$C_{12}H_{18}O_4N_2Na$	52,17	6,20	10,14				240(desc)
ePL	$C_9H_{14}O_2N_2 \times 1,5H_2O$	51,66	8,19	13,39	51,92	7,79	13,27	208(desc)
dDL	$C_{22}H_{25}O_6N_2Na \times 2,2H_2O$	55,50	6,22	5,88	55,19	5,69	5,68	170-174

tres productos mayoritarios de la reacción, y a su estabilidad al concentrar la mezcla de reacción para realizar cromatografía, según se ve en TLC.

Estos tres productos a los que nos referimos presentaron Rf (eluyente E) de 0,65, 0,53 y 0,43 respectivamente, presentándose a simple vista el primero en mucha más cantidad. Se visualizaron en lámpara UV, presentando además fluorescencia. Con el reactivo TBA se colorean pero no con el característico color rosa del MDA y los N-2-propenales, sino con un color rojo oscuro.

Se sometió la mezcla de reacción a cromatografía en columna de 40x1,8 cm con gel de sílice, gradiente B, consiguiéndose así en forma pura, según TLC, el compuesto de mayor Rf con un rendimiento del 11%. Resultó ser la sal sódica de la N,N'-di(-4-metil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldéhido)lisina (el resultado de su análisis espectroscópico se recoge en las tablas 9, 10 y 11 (pag. 110-114), junto al de los

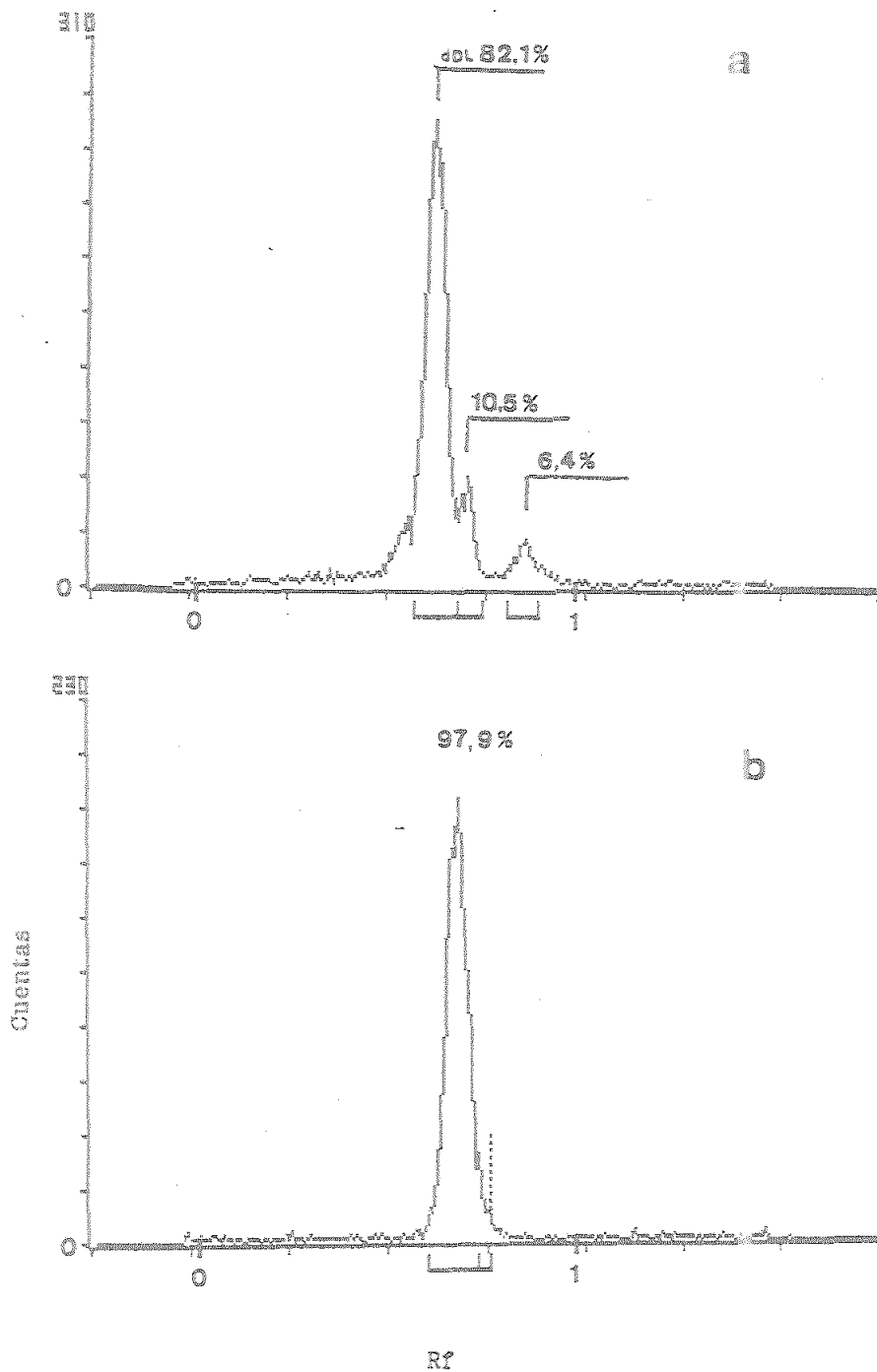


Fig. 20. Radiactividad medida en analizador lineal de placas, reacción lisina:MDA:acetaldehido. Se da el % del área de cada pico tras descontar el ruido de fondo. a) Total de la reacción y b) dDL

N-2-propenales). Las dos manchas de menor Rf mostraron una gran inestabilidad, aunque se observaron en TLC del eluato como manchas únicas que se degradaban en seguida como ocurrió con la α PL. Presumiblemente se trata de las dos monodihidropiridinas, en posición N- α y N- ϵ .

Renunciamos por tanto a obtener las monodihidropiridinas y modificamos la proporción de reactivos para obtener un máximo rendimiento de dDL. Realizamos entonces la reacción como se describe en Materiales y Métodos, pero doblando la cantidad de MDA y acetaldehído, obteniendo así un rendimiento del 89%.

Para el caso de reacción con precursores radiactivos se añadió al medio de reacción lisina ^3H y acetaldehído ^{14}C . Tanto la reacción como la cromatografía posterior se escalaron a una cantidad dos veces y media menor, como se hizo para la síntesis de los N-2-propenales marcados radiactivamente. Los rendimientos, dados en % de las DPM proporcionadas, fueron del 64% para ^3H y 44% para ^{14}C .

Los productos sintetizados se guardaron en el congelador como alícuotas listas para su uso con solo añadir el líquido portador. En el caso de los compuestos radiactivos se añadió producto "frio" para conseguir la actividad específica y molaridad deseadas.

4.2.3. ESTUDIOS DE METABOLISMO IN VIVO

4.2.3.1. Excreción e incorporación a tejidos tras dosis oral

Las muestras a estudio, sintetizadas a partir de precursores radiactivos, se suministraron por intubación gástrica a los animales de experimentación. Todos estos compuestos son muy solubles en agua. Para tener valores de referencia con los que comparar los obtenidos con los derivados de lisina se suministró también monoclóridato de lisina. Se trabajó simultáneamente con cuatro ratas, cada una de ellas tratada con una muestra distinta. La experiencia se realizó por triplicado, con lo que se utilizaron en total tres lotes de cuatro ratas cada uno.

Cada dosis está formada por 12,5 μmol equivalentes de lisina, con las siguientes actividades específicas y posiciones de marcaje (ver numeración de carbonos en Fig. 18, pag. 112, para los derivados de lisina):

dPL	[6,7- ³ H]	5,475 $\times 10^6$ DPM	
mPL	[6,7- ³ H]	1,927 $\times 10^6$ DPM	
dDL	[8,9- ³ H]	3,19 $\times 10^6$ DPM y [1,2,14,16- ¹⁴ C]	1,91 $\times 10^6$ DPM
Lisina	[4,5- ³ H]	1,915 $\times 10^6$ DPM	

A las 24 h de la dosificación las ratas fueron sacrificadas y se recogieron diversas fracciones orgánicas, como se detalla en

Tabla 12. Radiactividad incorporada en excretas y diversas fracciones orgánicas. Se da el % de las DPM dosificadas que se encuentran en cada fracción.

Fracciones	³ H lisina	³ H MPL	³ H dPL	³ H dDL	¹⁴ C dDL
orina 0-5 h	3,7 3	23,1 16	14 21	0,1 33	0,1 63
" 5-12 h	3,9 49	8,7 43	3,3 9	0	0
" 12-24 h	5,8 5	9,8 41	6,3 37	0,1 62	0,1 55
" total	13,4 17	41,6 3	23,6 23	0,2 40	0,2 47
heces	15,3 19	26,5 5	36,5 12	94,2 2	70,5 7
cont.digestivo	2,7 45	0,7 141	1 28	1,8 56	1,8 61
heces + cont.digestivo	18 15	27,2 3	37,4 13	96 3	72,3 8
plasma ^a	3,3 2	0,4 29	0,3 9	0	0
intest. delgado	6,9 20	0,9 28	0,6 23	0,1 73	0
" grueso	1,4 9	0,3 18	0,2 21	0,1 72	0
estómago	1,2 15	0,1 22	0,1 8	0,1 25	0
hígado	11,5 12	1,9 13	0,6 33	0,3 77	0
riñón	1,5 22	0,2 3	0,1 32	0,1 86	0
corazón	0,4 5	0,1 8	0,1 33	0,2 57	0
pulmón	0,8 2	0,2 24	0,1 23	0,1 29	0
músculo glúteo ^b	0,6 15	0,1 13	0	0	0
cerebro	0,6 14	0,1 71	0,1 8	0	0
total tejidos	28,2 7	4,3 11	2,3 13	1 26	0

Se da la media de los valores encontrados en las tres ratas ensayadas con cada muestra. Como medida de dispersión (números pequeños) se da el coeficiente de variación, $V = \frac{\text{desviación estandar} \times 100}{\text{media}}$ (%)

^a El volumen de plasma se calcula asumiendo 3,5 ml/100 g de peso corporal

^b Se trata de las DPM correspondientes a 1 g, peso aproximado del fragmento de músculo extraído

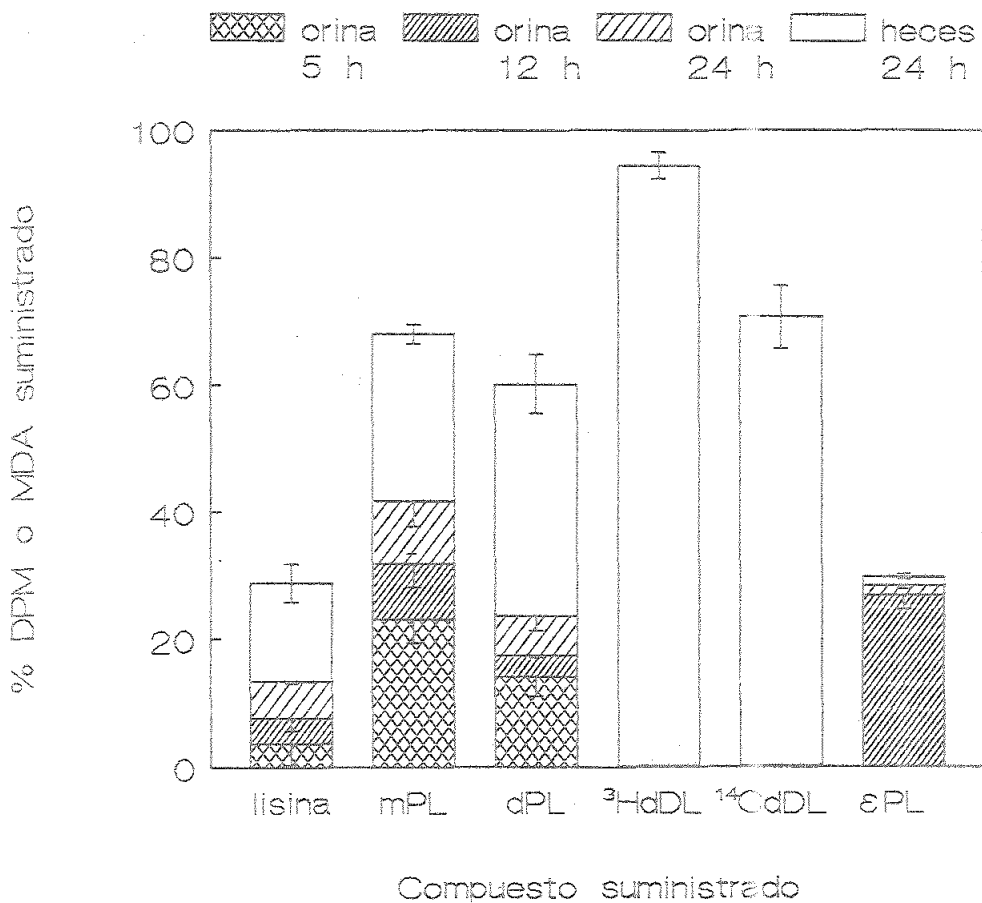


Fig. 21. Radiactividad excretada en orina y heces. Se da también el % de recuperación de MDA reportado por McGirr et al. (1985) tras intubar con εPL (estos autores no recogen orina a las 5 h).

La barra de error representa la desviación estandar.

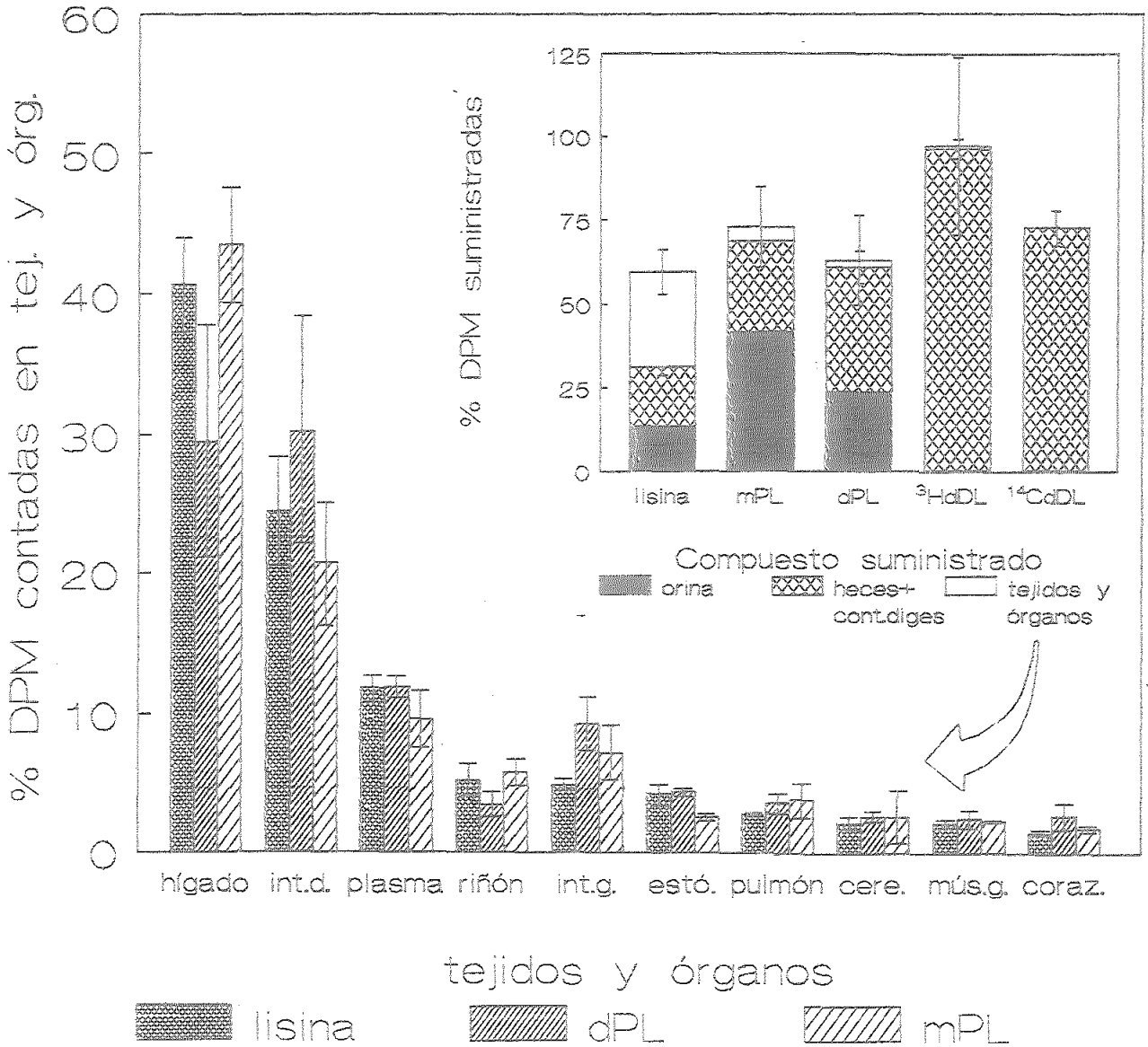


Fig. 22. Distribución de la radiactividad incorporada a tejidos y órganos. Se da el % del total de DPM medidas en tejidos y órganos. En la gráfica pequeña se dan los % de las DPM suministradas que se miden en orina, heces y en tejidos y órganos.

La barra de error representa la desviación estandar.

Materiales y Métodos. Previamente se recogió la orina a 5, 12 y 24 h, y las heces a 24 h.

Se midió la radiactividad presente en muestras tomadas de estas fracciones por centelleo líquido, con contaje simultaneo de ^3H y ^{14}C . En la tabla 12 se recogen los valores obtenidos, referidos al peso o volumen total representado por las muestras que se midieron, excepto para el músculo glúteo que se refiere al fragmento cortado de la rata (1 g aproximadamente). En la Fig. 21 y 22 se presentan gráficamente.

4.2.3.1.1. N-2-propenales

Los dos N-2-propenales estudiados presentan similares diferencias con respecto a los valores de referencia. Se absorben algo peor que la lisina, pues aparece más radiactividad en heces. Sin embargo la absorción sigue siendo bastante alta, por lo que este hecho no supondría por si solo un descenso drástico de la biodisponibilidad. Si lo supone la excreción en orina de la mayoría de lo absorbido. Se observa a pesar de todo una pequeña incorporación a tejidos, de forma clara con la mPL y casi no significativa con la dPL. Se trata por tanto de derivados de lisina muy poco o nada utilizables por la rata, aunque sean relativamente bien absorbidos del tubo digestivo.

La dPL ha perdido los dos grupos amino libres de la lisina, por lo que no tiene carga positiva. Ello imposibilitaría que fuera transportada por un sistema de transporte activo de aminoácidos. En el caso de la mPL si existe esta posibilidad; al quedar libre un grupo amino podría actuar un transportador de aminoácidos monoamino y

monocarboxílicos (Sherr *et al.*, 1989; Gimble y Silk, 1989).

Estimando la disponibilidad como incorporación a tejidos, y expresándola como % de la de la lisina, la de la dPL sería de un 8 % y la de la mPL del 16%. Esta estimación se puede considerar como un valor máximo, pues la disponibilidad real puede ser menor si el compuesto marcado se incorpora a los tejidos en una forma no utilizable por los mismos.

McGirr *et al.* (1985) estudiaron la excreción de MDA, en forma libre o ligada, en orina y heces de ratas intubadas con ϵ PL. Suministraron la misma cantidad de ϵ PL que la de mPL y dPL empleada por nosotros. Miden el complejo MDA-TBA por HPLC (el MDA que se encuentra formando parte de N-2-propenales se libera en el medio de reacción ácido que se utiliza en este método).

Sus resultados son similares a los obtenidos por nosotros con 3 H-mPL en lo que respecta a eliminación en orina, pero no en heces. Hemos medido un 26% de recuperación de radiactividad en heces, mientras que estos autores no encuentran apenas MDA (Fig. 21). Esta discrepancia se podría explicar considerando una posible metabolización del MDA ligado por la flora intestinal de forma que no fuera detectable por el método TBA-HPLC. La medición de radiactividad no se vería afectada por este hecho, pues el marcaje se sitúa en la parte de la molécula de la mPL aportada por la lisina.

Las distribuciones de radiactividad en órganos y tejidos con suministro de mPL y dPL son semejantes a las de la lisina de referencia (Fig. 22). No se aprecia ningún indicio de incorporación o acumulación selectivas.

4.2.3.1.2. Dihidropiridina

De los resultados obtenidos se deduce que la dDL es indisponible para la rata. Un 96. % de las DPM suministradas se recuperan en heces y el contenido del digestivo. Solo se recupera sin embargo un 72 % del ^{14}C , isótopo que marca la posición número cuatro de los anillos de dihidropiridina y los grupos metilo que los sustituyen (Fig. 18, pag. 112). Esta diferencia quizá se deba a actividad metabólica de la flora intestinal.

No se da incorporación que denote absorción alguna de este compuesto. Los valores que se han medido en orina y algunos órganos difícilmente se pueden considerar significativos. La intervención de la flora intestinal, que hemos propuesto para explicar la diferencia de recuperación de ^3H y ^{14}C en heces, no sería capaz de transformar el compuesto en formas absorbibles.

Al igual que en el caso de la dPL, no cabe esperar que sobre la dDL pueda actuar un sistema de transporte activo de aminoácidos. La absorción a través de poros de membrana de moléculas solubles en agua se considera posible para pesos moleculares menores de aproximadamente 200 (Renwack, 1989). Este hecho podría explicar la diferencia de absorción de la dPL y la dDL. Ambas tienen similares polaridades y clase de grupos funcionales, pero el peso molecular de la segunda es del doble del citado límite, mientras que el de la primera es semejante a este valor.

La recuperación de la radiactividad dosificada es muy alta, al localizarse prácticamente toda en heces.

4.2.3.2. Incorporación a microsomas tras dosis intraperitoneal

Se suministraron por inyección intraperitoneal las cuatro mismas muestras que en la experiencia anterior, con la diferencia de tener la mitad de lisina equivalente (6,25 μmol), y la mitad también de ^3H y ^{14}C , es decir:

dPL	[6,7- ^3H]	$2,737 \times 10^6$ DPM	
mPL	[6,7- ^3H]	$0,963 \times 10^6$ DPM	
dDL	[8,9- ^3H]	$1,595 \times 10^6$ DPM y [1,2,14,16- ^{14}C]	$0,955 \times 10^6$ DPM
lisina	[4,5- ^3H]	$0,957 \times 10^6$ DPM	

Se trabajó también con tres lotes de cuatro ratas, utilizando tres ratas para cada compuesto.

Transcurridas siete horas de la inyección se recogió orina, plasma e hígado, y se obtuvo la fracción microsómica hepática por precipitación con Cl_2Ca según Sherr et al. (1989). Se midió la radiactividad incorporada por centelleo líquido (Tabla 13).

La incorporación a microsomas proporciona una estima de la capacidad de los derivados de lisina para ser utilizados en síntesis proteica (Sherr et al., 1989), principal actividad metabólica de esta fracción subcelular. Al suministrarse por inyección intraperitoneal se deja de considerar la pérdida de disponibilidad que pueda suponer la barrera intestinal. La absorción vía capilar de la cavidad intraperitoneal debe ser más rápida que en el caso de administración oral.

La muestra de lisina de referencia presenta un 0,5 % de incorporación. Nuestro método de medida permite la detección de valores entre 15 y 25 veces menores, según las DPM de la dosis. Con

Tabla 13. Radiactividad incorporada en orina, plasma y microsomas hepáticos tras administración intraperitoneal. Se da el % de las DPM suministradas

Fracciones	³ H lisina		³ H mPL		³ H dPL		³ H dDL		¹⁴ C dDL	
Microsomas ^a	0,51	7	0		0		0		0	
Plasma ^b	3,74	13	0,04	141	0,08	46	0,03	141	0,09	73
Orina	4,7	52	34,3	30	20,7	33	5,3	63	4,8	62

Se trata de la media de los valores obtenidos con las tres ratas ensayadas con cada muestra. Como medida de dispersión se da el coeficiente de variación (números pequeños)

^a Se contó el total de la fracción microsómica

^b Se consideró 3,5 ml de plasma/100 g de peso corporal

ninguno de los tres derivados de lisina ensayados se ha detectado incorporación. Este resultado confirma la falta de disponibilidad que se observa al estudiar la excreción y distribución en tejidos.

Sin embargo, con dosificación oral de N-2-propenales se mide cierta cantidad de radiactividad en hígado. El hecho de que no se mida nada en microsomas se puede explicar de dos maneras. En primer lugar cabe la posibilidad de que el paso a través de la pared intestinal permita la biotransformación de un pequeño tanto por ciento de estos compuestos que haga que puedan ser utilizados en síntesis proteica. En

segundo lugar, se puede tratar de que la incorporación a hígado y otros tejidos refleje una unión temporal o una catabolización de las mPL y dPL, sin que sean utilizables en cualquier caso para síntesis proteica. La estabilidad de ambos compuestos en las incubaciones *in vitro* con homogenado de mucosa intestinal que trataremos en el siguiente apartado apoyan la segunda de las hipótesis planteadas, en cuanto a una posible unión sin metabolización. Por otra parte, la distribución de radiactividad en tejidos, similar a la de la lisina, apoya la primera.

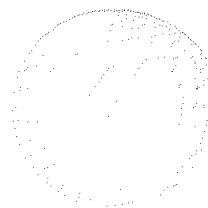
Como ocurría con dosificación oral los N-2-propenales se excretan fácilmente por orina.

La dDL no se absorbe del tubo digestivo. Al dosificarse por inyección intraperitoneal se excreta en orina al menos en parte. Se mide en esta partida un exceso de ^3H frente a ^{14}C con respecto a la muestra suministrada. Esto refleja una biotransformación al menos parcial de este compuesto. Aunque el coeficiente de variación de las medidas para las tres ratas es alto, cada una de ellas presenta una pérdida de ^{14}C con respecto a ^3H de entre un 4 y un 13 %. Quizás se trate de un proceso necesario para la excreción de dDL.

Se contó también radiactividad en el precipitado de la primera centrifugación y el sobrenadante de la segunda centrifugación del protocolo de obtención de microsomas. En esta segunda fracción, debido seguramente a lo diluida que se encuentra, no se detecta radiactividad. Tan solo el precipitado correspondiente a la lisina libre dió una medida positiva.

La aparición en plasma de radiactividad con la dosis de lisina denota utilización del aminoácido. Con el resto de muestras apenas se

detecta radiactividad; la que llega a sangre se excreta rápidamente en orina.



4.2.4. ESTUDIO DE METABOLISMO *IN VITRO*: REGENERACION DE LISINA EN INCUBACION CON HOMOGENADOS TOTALES

4.2.4.1. Introducción

Finot *et al.* (1978) han estudiado por su posible utilización como aditivo para enriquecer nutricionalmente alimentos pobres en lisina diversos derivados de este aminoácido. Han medido su disponibilidad *in vivo* con experimentos de crecimiento de ratas, y su disponibilidad *in vitro* en experimentos de incubación con homogenados de hígado, riñón y mucosa intestinal. Se trata de péptidos naturales, α ,N- y α , ϵ -N,N'-
-acil derivados, y ϵ -N- y α , ϵ -N,N'-aminoacil derivados. Tan solo los derivados que son disponibles en los experimentos de crecimiento son también hidrolizados en las incubaciones *in vitro*. La hidrólisis en el sistema *in vitro* la miden como lisina libre que se regenera, cuantificada por electroforesis en papel, o manométricamente empleando lisina decarboxilasa. El tiempo de incubación son 4 horas y usan el dipéptido de lisina (LL) como control de efectividad de los homogenados.

Este tipo de experimentos *in vitro* permiten una rápida evaluación indirecta de la disponibilidad, pero no pueden sustituir, sino ser complementarios de experiencias de disponibilidad *in vivo*. Nos ha parecido una herramienta útil para el estudio metabólico de los compuestos de interacción que caracterizamos en nuestro laboratorio,

de distinta naturaleza a los estudiados por los citados autores. Lo hemos puesto a punto con mejoras en la detección de la lisina liberada por la acción de los homogenados de órganos.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un método de análisis de aminoácidos de hidrolizados proteicos por HPLC, con derivatización precolumna con el reactivo de grupos amino etoximetilnmalonato de dietilo (Alaiz *et al.*, 1991b). Se caracteriza por su sencillez de ejecución y por ofrecer cromatogramas limpios de productos residuales de la reacción de derivatización. Esta reacción de derivatización es en principio aplicable a una gran gama de aminocompuestos, por lo que el método es en potencia de utilidad para la determinación de una gran variedad de compuestos de interés en Bioquímica. Si es necesario, para ello se puede modificar el gradiente de elución.

Hemos usado este método para la medición de la lisina liberada en la incubación de la ϵ PL, la dPL, y la dDL con homogenados de órganos. Se ha seguido para estas incubaciones a Finot *et al.* (1978), pero el empleo de una mejor técnica de medida de lisina ha permitido utilizar una octava parte de la concentración del derivado a estudio y del tiempo de incubación de los empleados por estos autores (1 mg equivalente de lisina/ml y 4 h). Determinamos además en nuestro caso los derivados a estudio tras el tiempo de incubación, aparte de la lisina liberada.

4.2.4.2. Resultados y discusión

Realizamos la derivatización y el análisis por HPLC de ϵ PL, dPL y dDL, más LL que se usa como control de efectividad de los homogenados.

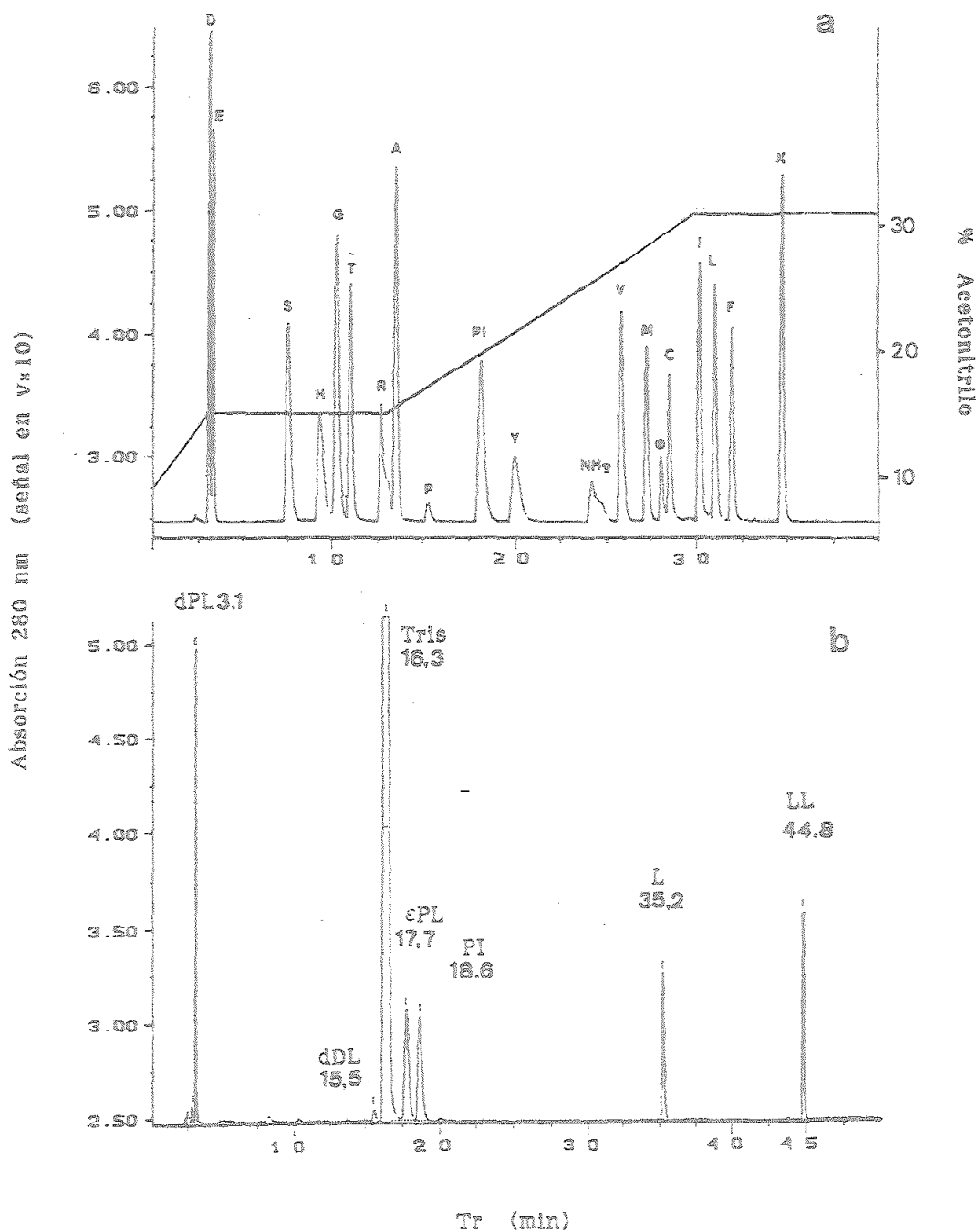
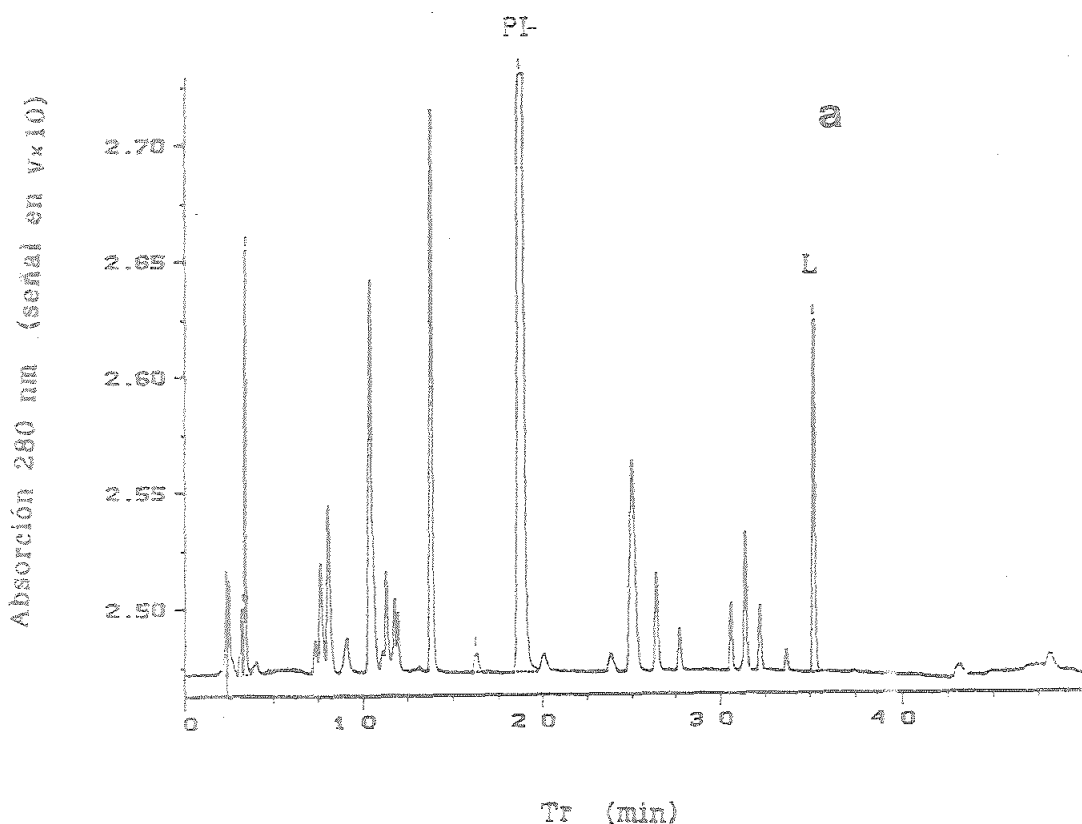


Fig. 23. Análisis de aminoácidos por HPLC de los derivados obtenidos por reacción con etoximetilenmalonato de dietilo. a) Mezcla de patrones de aminoácidos, PI, patrón interno; b) mezcla de los productos de reacciones de ϵ PL, dPL, dDL y LL con etoximetilenmalonato de dietilo, la dDL eluye con el mismo tiempo que el aspártico.

Se nombran los aminoácidos con la nomenclatura de una sola letra

Se tomaron tiempos de retención, comprobándose que para recoger el del LL es necesario alargar en 10 min la programada de elución descrita para el análisis de los aminoácidos comunes en proteínas (Fig. 23). Se forman previsiblemente los derivados 2,2-bis(etoxicarbonil)vinil del ϵ PL (en posición N- ϵ) y del LL (en posiciones N- α y N,N'- ϵ). La dPL y la dDL permanecerían inalteradas al tener los grupos amino ya bloqueados, pero son detectables al absorber por sí mismas a 280 nm (la dDL muy poco, Fig. 19 pag 113).



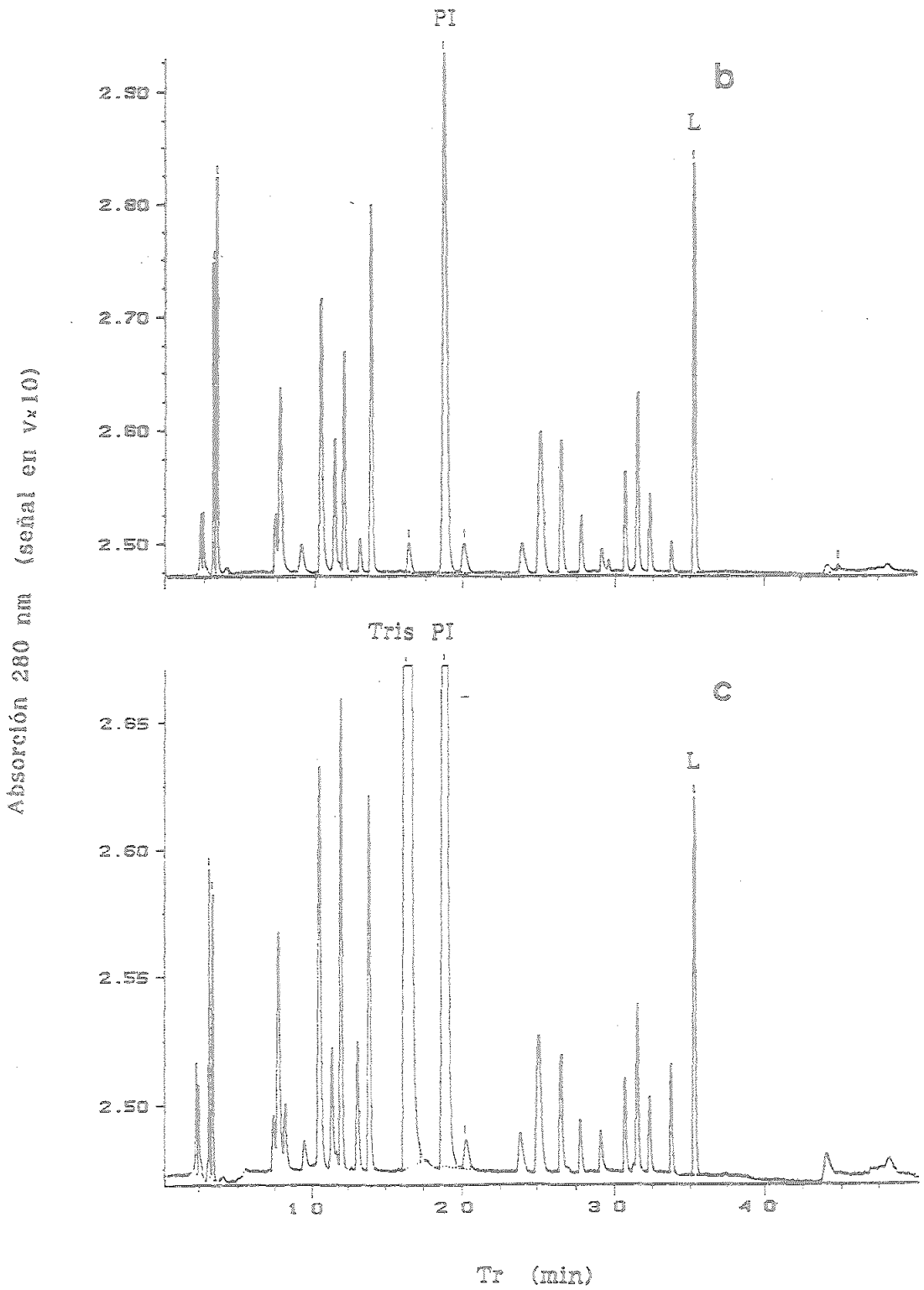


Fig. 24. HPLC de las incubaciones de homogenados de órganos sin añadir muestra. a) Hígado, b) riñón y c) mucosa intestinal. Los dos homogenados empleados de cada tipo ofrecieron el mismo perfil.

Para este análisis por HPLC utilizamos como patrón interno el ácido α -aminobutírico. Se añade siempre en la misma cantidad al acabar la incubación y antes de la preparación de la muestra para la reacción de derivatización. Esta preparación consiste en el paso a través de una columna de exclusión molecular de bajo rango para deshechar todos los componentes de PM aproximadamente mayor de 1000. Expresamos la cantidad de cada compuesto como respuesta de pico, definida como el área del pico en cuestión dividida por el área del pico de patrón interno.

Hemos realizado la experiencia completa dos veces. Tenemos por tanto para cada muestra resultados correspondientes a incubaciones con los homogenados de dos ratas distintas.

Con cada uno de los homogenados se incubaron dDL, dPL y ϵ PL, el control de efectividad de los homogenados consistente en LL, y otro control de lisina libre. Este último ofrece los valores de lisina que deberían presentar los derivados en caso de que toda la lisina en ellos contenida quedara libre por la acción de los homogenados. Además se dispone de incubaciones "en blanco" de cada homogenado, sin añadir muestra alguna; y de incubaciones de cada una de las muestras sin homogenado (en el tampón de homogenización).

En los casos en que los picos de las muestras a estudio tienen un tr igual al de los picos que aparecen en los cromatogramas de los controles en blanco (Fig. 24), se restan las respuestas de estos últimos de la de los primeros.

Obtenemos por tanto medidas de la lisina liberada a partir de sus derivados (Tabla 14), y de los derivados no atacados (Tabla 15, Fig. 25). Las incubaciones de cada una de las muestras sin homogenado

permitieron comprobar que ninguna de ellas, incluido el LL, sufre alteración. Cuando se añade cualquiera de los homogenados, el LL se hidroliza por completo.

En los resultados expuestos en la tabla 14 vemos que ni los N-2-propenales ni la dihidropiridina estudiada son atacados por los homogenados de modo que se libere lisina. El hecho de que los

Tabla 14. *Lisina liberada en la incubación de los derivados de este aminoácido con homogenados de órganos.*

Homogenado	Moléculas incubadas			
	dPL	dDL	εPL	LL
Hígado	0,030	0,041	0,018	0,435
	-0,020	-0,028	-0,014	0,475
	0,005	0,006	0,002	0,456
Riñón	-0,028	-0,021	-0,028	0,466
	-0,081	-0,082	-0,077	0,566
	-0,054	-0,051	-0,052	0,516
Mucosa Int.	-0,018	-0,026	-0,004	0,469
	-0,036	-0,034	-0,019	0,462
	-0,027	-0,03	-0,011	0,466

Valores obtenidos con los homogenados de dos ratas (números pequeños) y la media correspondiente. Se trata de las respuestas ($\frac{A \text{ pico}}{A \text{ PI}}$) del pico de lisina tras restar las respuestas obtenidas con los blancos correspondientes (incubaciones de los homogenados sin añadir muestra)

Tabla 15. Cantidad de los derivados de lisina, lisina libre y dipéptido de lisina tras su incubación con homogenados de órganos. Se da también el análisis de las muestras no tratadas con homogenados como referencia.

Homogenado	Moléculas incubadas				
	dPL	dDL	εPL	L	LL
Hígado	0,510	0,048	0,681	0,501	
	0,600	0,059	0,757	0,586	
	0,555	0,053	0,719	0,543	0
Riñón	0,514	0,059	0,565	0,538	
	0,661	0,079	0,780	0,475	
	0,587	0,069	0,672	0,506	0
Mucosa Int.	0,467	0,066	0,725	0,555	
	0,616	0,084	0,761	0,476	
	0,541	0,074	0,743	0,515	0
Sin homog.	0,782	0,071	0,814	0,525	0,348
	0,673	0,079	0,815	0,563	0,338
	0,725	0,075	0,814	0,544	0,343

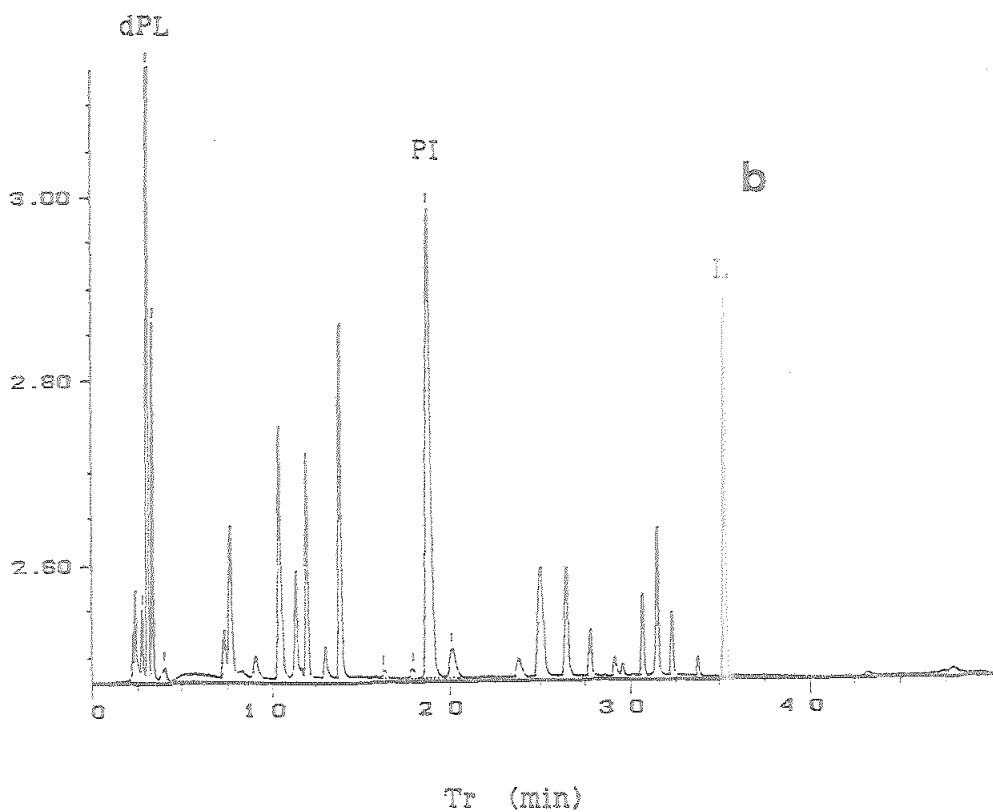
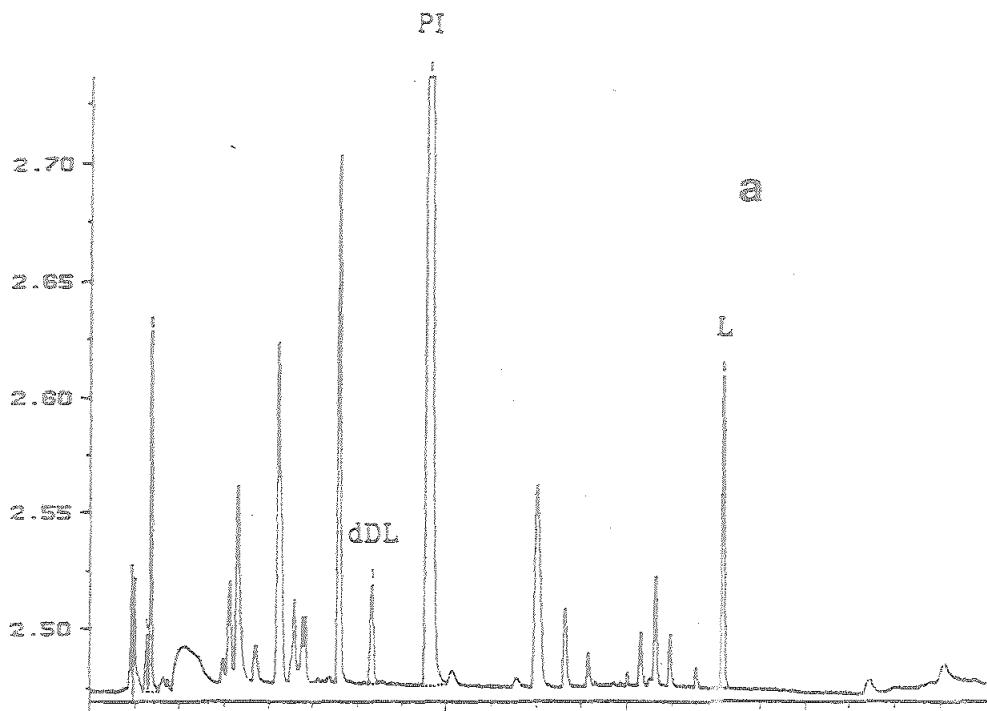
Valores obtenidos con los homogenados de dos ratas (números pequeños) y la media correspondiente. Se trata de las respuestas ($\frac{A \text{ pico}}{A \text{ PI}}$) de los picos de las moléculas incubadas tras restar las respuestas obtenidas con los blancos correspondientes (esta resta solo es necesaria en el caso de dPL y L).

controles sin homogenado y con lisina añadida ofrezcan los mismos valores que la lisina incubada con los homogenados (Tabla 15) excluye la posibilidad de que la lisina que se pudiera liberar no fuera detectable por ligarse de alguna otra manera durante la incubación.

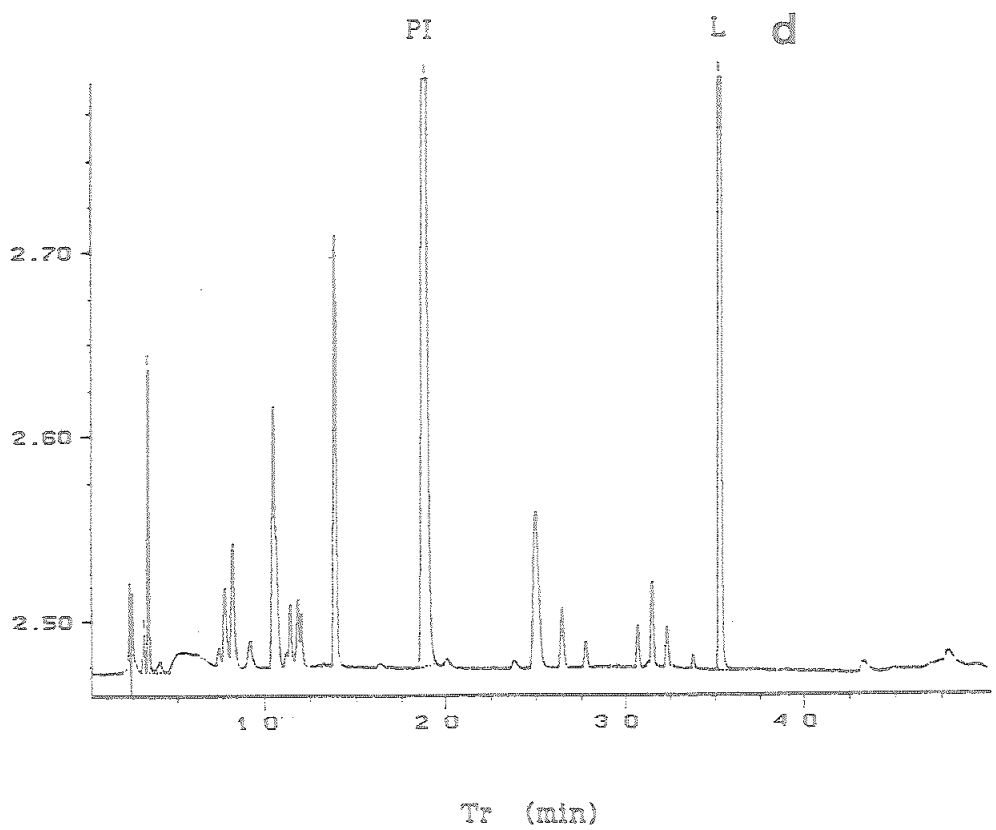
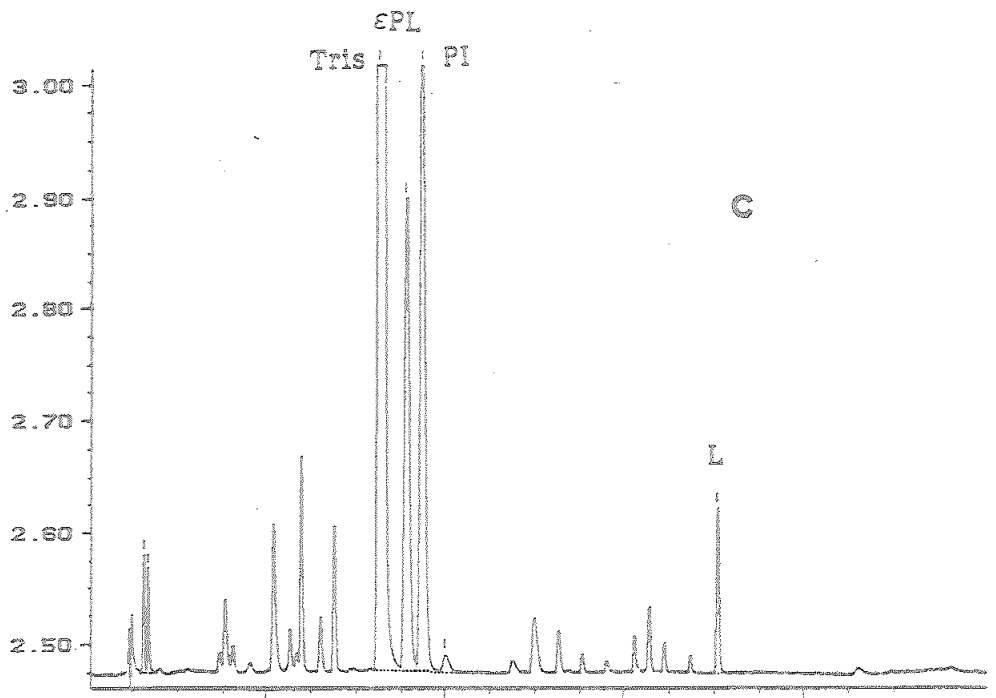
Los resultados obtenidos con la dDL son compatibles con los de Yoden *et al.* (1985) usando microsomas hepáticos y diversas dihidropiridinas de aminocompuestos distintos de la lisina. Estos autores constatan un ataque a las moléculas estudiadas que aumenta con la hidrofobicidad del sustituyente en posición 1 del anillo de dihidropiridina. En nuestro caso este grupo es polar, por lo que no cabía esperar este tipo de ataque.

Aunque estas tres moléculas no sirvan como prolisina, al menos en nuestras condiciones de experimentación, sus niveles descienden durante la incubación. Posiblemente se deba a interacción con grupos funcionales presentes en las moléculas del homogenado, preferentemente grupos amino proteicos. Esto indicaría una reactividad de estos productos que hace que no se les pueda considerar como productos terminales en el proceso de interacción entre proteínas y productos de oxidación lipídica.

Absorción 280 nm (señal en $v \times 10$)



Absorción 280 nm (señal en $v \times 10$)



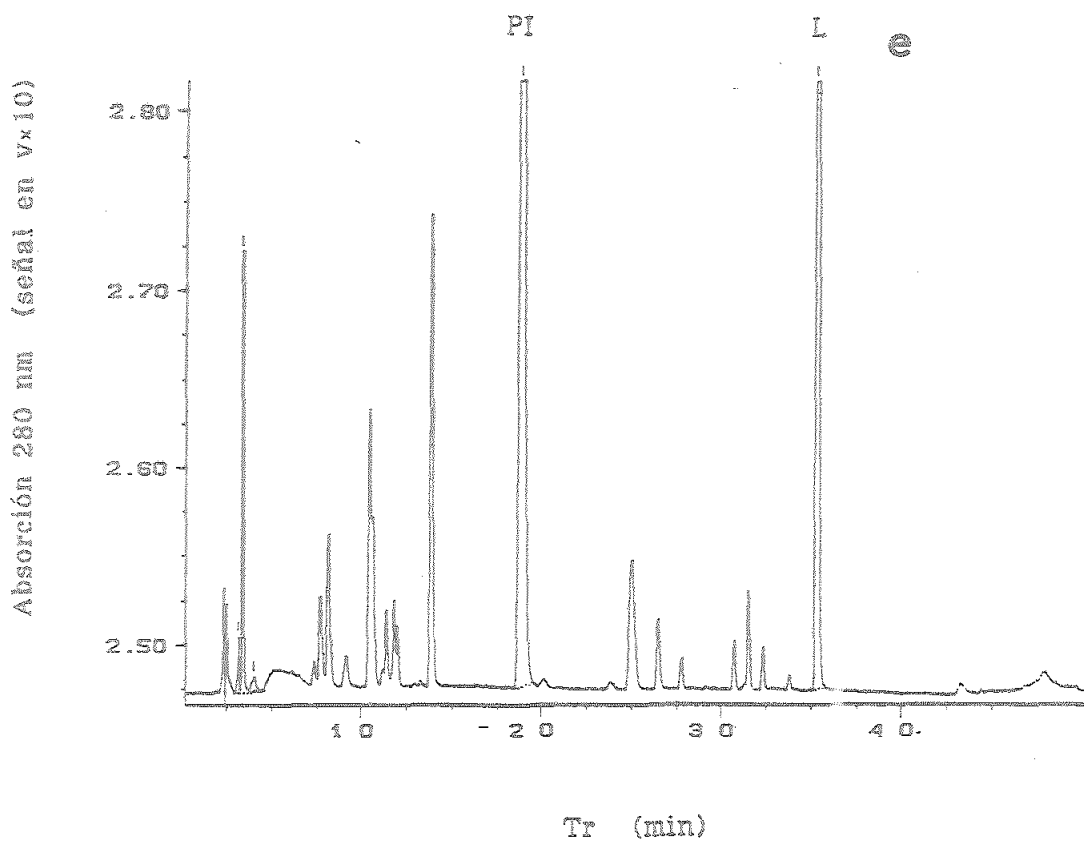


Fig. 25. HPLC de algunas de las incubaciones realizadas con los derivados de lisina. a) dDL con homogenado de hígado, b) dPL con homogenado de riñón, c) ϵ PL con homogenado de mucosa intestinal, d) L con homogenado de hígado, y e) LL con homogenado de hígado.

5. CONCLUSIONES

5.1. Introducimos un nuevo derivado de la lisina para su uso en las reacciones modelo que intentan reproducir las reacciones entre proteínas y productos de oxidación lipídica. Se trata del EFL, sintetizado por bloqueo del grupo carboxilo de la lisina con el grupo cromóforo 4-(fenilazo)fenacilo. Su empleo facilita las labores cromatográficas encaminadas al seguimiento, aislamiento y caracterización de los productos que se forman en estas reacciones, si bien su empleo no es aconsejable a pH neutro, y sobre todo básico, por sufrir entonces hidrólisis que libera el grupo cromóforo.

5.2. En la reacción modelo del EFL con MDA y propanal, a pH 4,2 y temperatura ambiente, y con proporción equimolar de estos aldehidos y los grupos amino del EFL, se forman mayoritariamente tres tipos de estructuras: N-2-propenales, 4-etil-dihidropiridinas y estructuras que provocan entrecruzamientos entre las moléculas de EFL aumentando su peso molecular. Cualitativamente, el esquema que resulta de esta reacción modelo es similar al obtenido por el grupo de Kikugawa estudiando la reacción de polilisina con MDA.

5.3. Los N-2-propenales son las estructuras mayoritarias en nuestra reacción modelo. Su proporción aumenta cuando en el medio de reacción no se incluye un alcanal, en nuestro caso el propanal. Nuestros resultados corroboran los del más importante precedente, el grupo de Nair, que ha trabajado con otros derivados de lisina.

5.4. En la reacción modelo se forman dihidropiridinas en cantidad cercana a la de N-2-propenales. Puesto que estas últimas estructuras han sido encontradas en alimentos ricos en lípidos insaturados, y en las condiciones en que se produce MDA se forman también alcanales, consideramos muy probable que las dihidropiridinas también se encuentren en este tipo de alimentos.

Sería de interés la investigación de estas dos estructuras como posibles indicadores de alteración de proteínas por productos de oxidación lipídica en alimentos, de similar manera a como la furosina lo es de la reacción de Maillard entre proteínas y azúcares. Para ello habría que desarrollar su determinación en alimentos.

5.5. El propanal por si solo no es capaz de modificar al EFL. Sin embargo, la importancia de alcanales como el propanal puede ser grande al modificar la reactividad de aldehidos más activos como el MDA, según hemos visto en la conclusión anterior.

5.6. No hemos conseguido elucidar la estructura o estructuras de los entrecruzamientos que provocan la aparición de dímeros y/o polímeros del EFL, que constituyen casi la mitad de los productos de nuestra reacción modelo. Pese a la utilización del EFL, estos compuestos de relativo alto peso molecular tienen un comportamiento cromatográfico e inestabilidad que no nos han permitido obtenerlos con el necesario grado de pureza.

En cualquier caso no se trata, al menos en su mayoría, de estructuras N,N'-1-amino-3-iminopropeno como las propuestas por Tappel, comunmente asignadas en estos casos. La dificultad en la

caracterización estructural de los entrecruzamientos ha dado a esta estructura una trascendencia que no creemos que tenga.

5.7. A la vista de los resultados resumidos en las anteriores conclusiones, consideramos de interés el estudio de la biodisponibilidad de los N-2-propenales y dihidropiridinas de la lisina. Para ello hemos trabajado en su síntesis y separación por cromatografía de adsorción en gel de sílice. Hemos puesto a punto la obtención de dDL, dPL, mPL y εPL con el grado de pureza necesario para los estudios metabólicos.

5.8. Se ha modificado el método de análisis de aminoácidos por HPLC, con derivatización- precolumna con etoximetilenmalonato de dietilo, para la determinación de la lisina liberada en incubaciones de homogenados de órganos con los derivados de este aminoácido, así como de los derivados sin alterar. Se puede realizar así una evaluación rápida *in vitro* de la lisina disponible que pueden aportar los derivados, complementaria de los métodos *in vivo* o químicos. En nuestro caso hemos estudiado como métodos *in vivo* la excreción e incorporación de los derivados de lisina marcados radiactivamente a tejidos tras dosificación oral, y a microsomas hepáticos tras dosificación intraperitoneal.

5.9. La dDL ha resultado ser indisponible para la rata. Suministrada oralmente se excreta en su práctica totalidad en heces. Suministrada intraperitonealmente no resulta incorporación de radioactividad a microsomas. No se regenera lisina en las incubaciones con

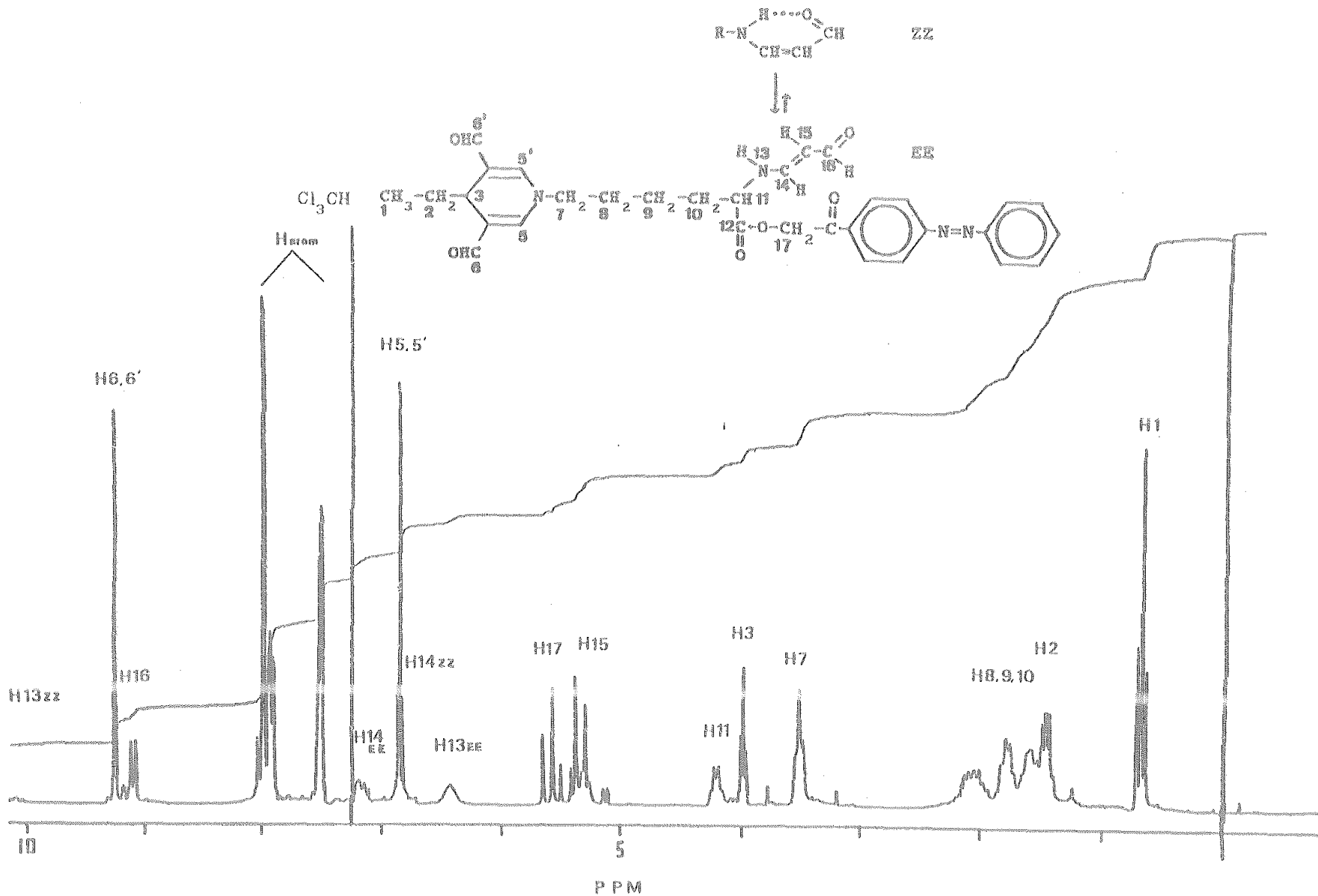
los homogenados de hígado, riñón y mucosa intestinal.

5.10. dPL y mPL presentan una disponibilidad muy reducida. Estimada como incorporación de radiactividad a tejidos y expresada como % de la de la lisina sería de 8 y 16 % respectivamente. La mayor parte de la dosis se elimina en orina. La medición de incorporación a microsomas da resultado negativo, por lo que esta pequeña incorporación a tejidos puede que solo refleje una catabolización de ambos compuestos como fuente de energía, sin que suponga regeneración de lisina disponible para síntesis proteica. En las incubaciones *in vitro* de ambos no se libera lisina.

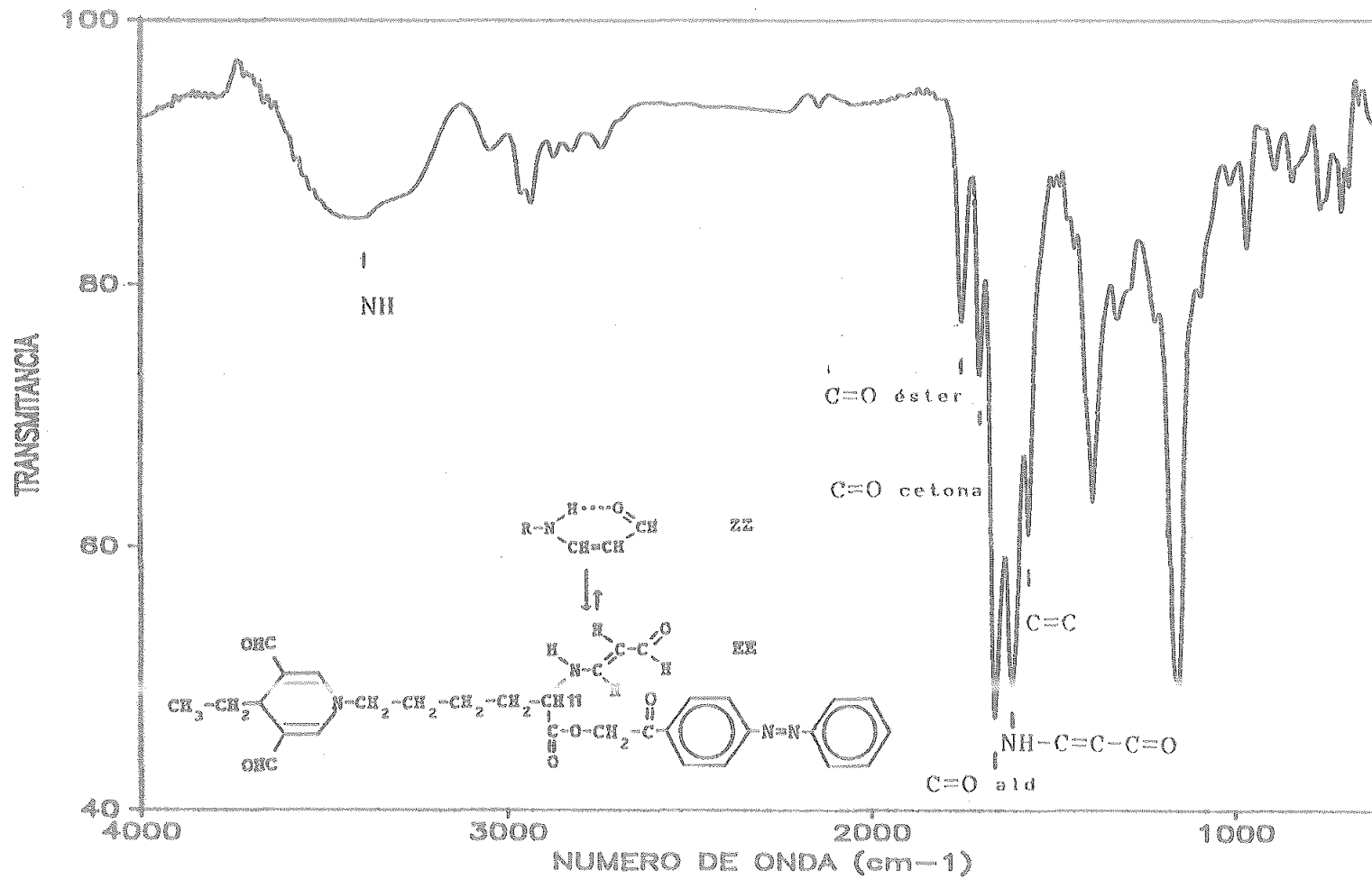
La formación de N-2-propenales y dihidropiridinas supone por tanto una drástica pérdida de biodisponibilidad de lisina. Su determinación en alimentos no solo tendría interés por su hipotética utilización como indicadores de daño a proteínas por lípidos oxidados, como ya hemos indicado, sino también por sus repercusiones nutricionales directas.

6. APENDICE

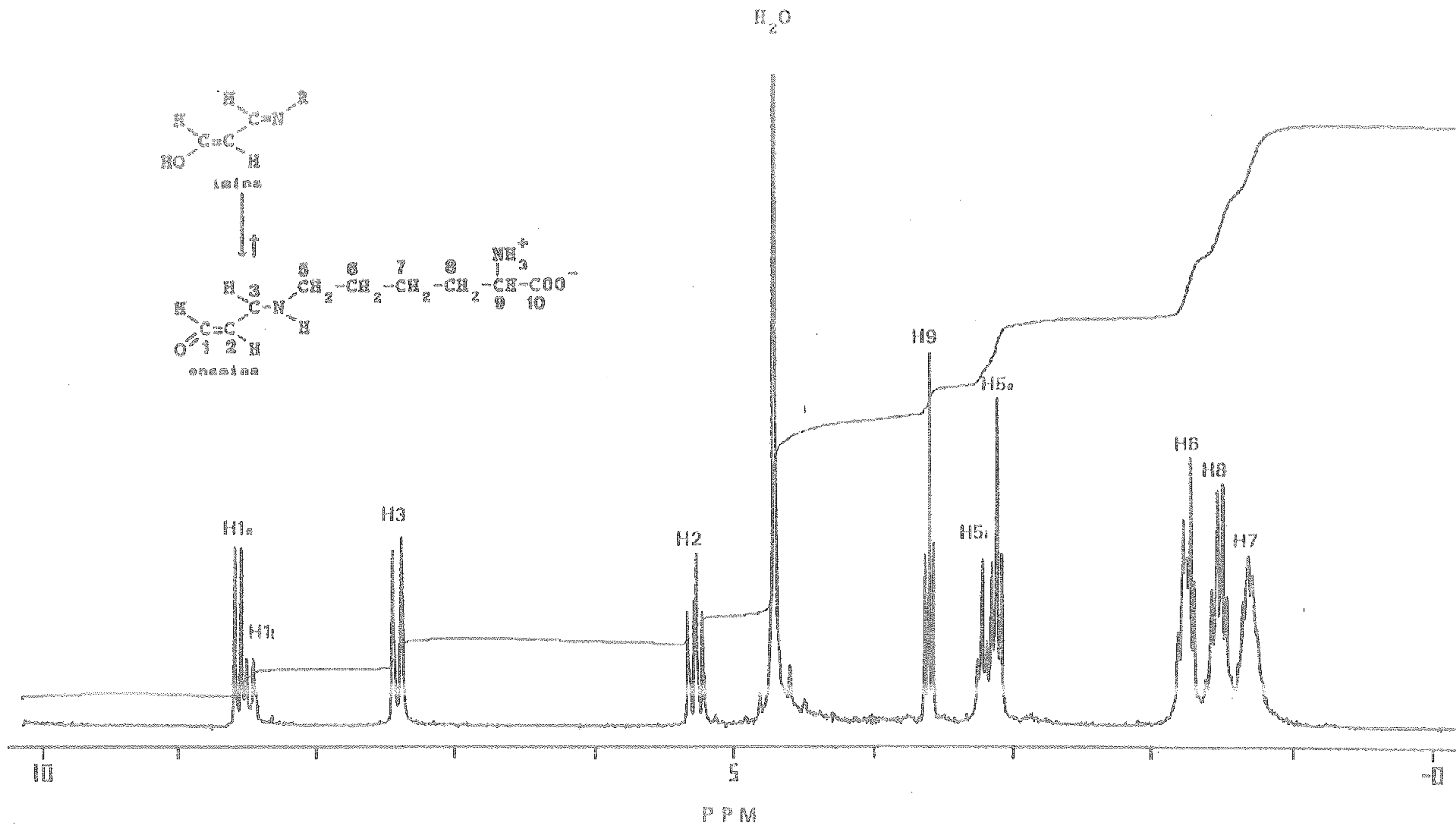
A continuación se recogen registros espectroscópicos de dos moléculas representativas de las reacciones realizadas. Se trata del PDEFL, formado en la reacción modelo del EFL con MDA y propanal, y la ϵ PL, sintetizada por reacción de la lisina con MDA.



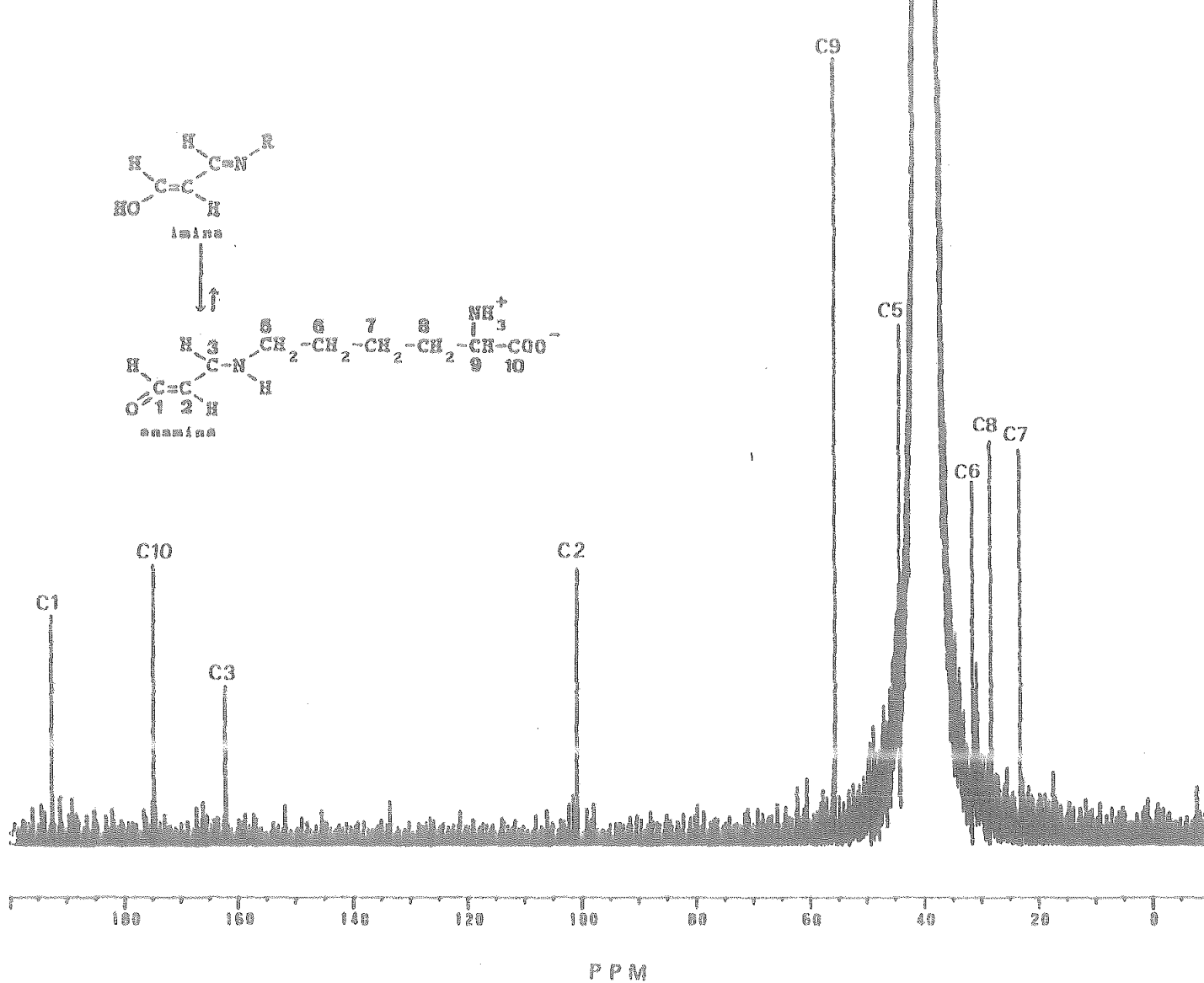
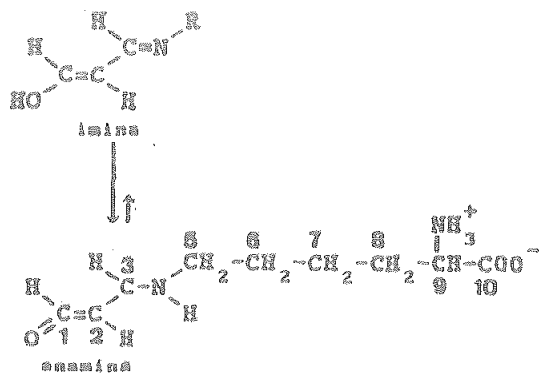
RMN de 1H del PDEFL (200 MHz en Cl_3CD)



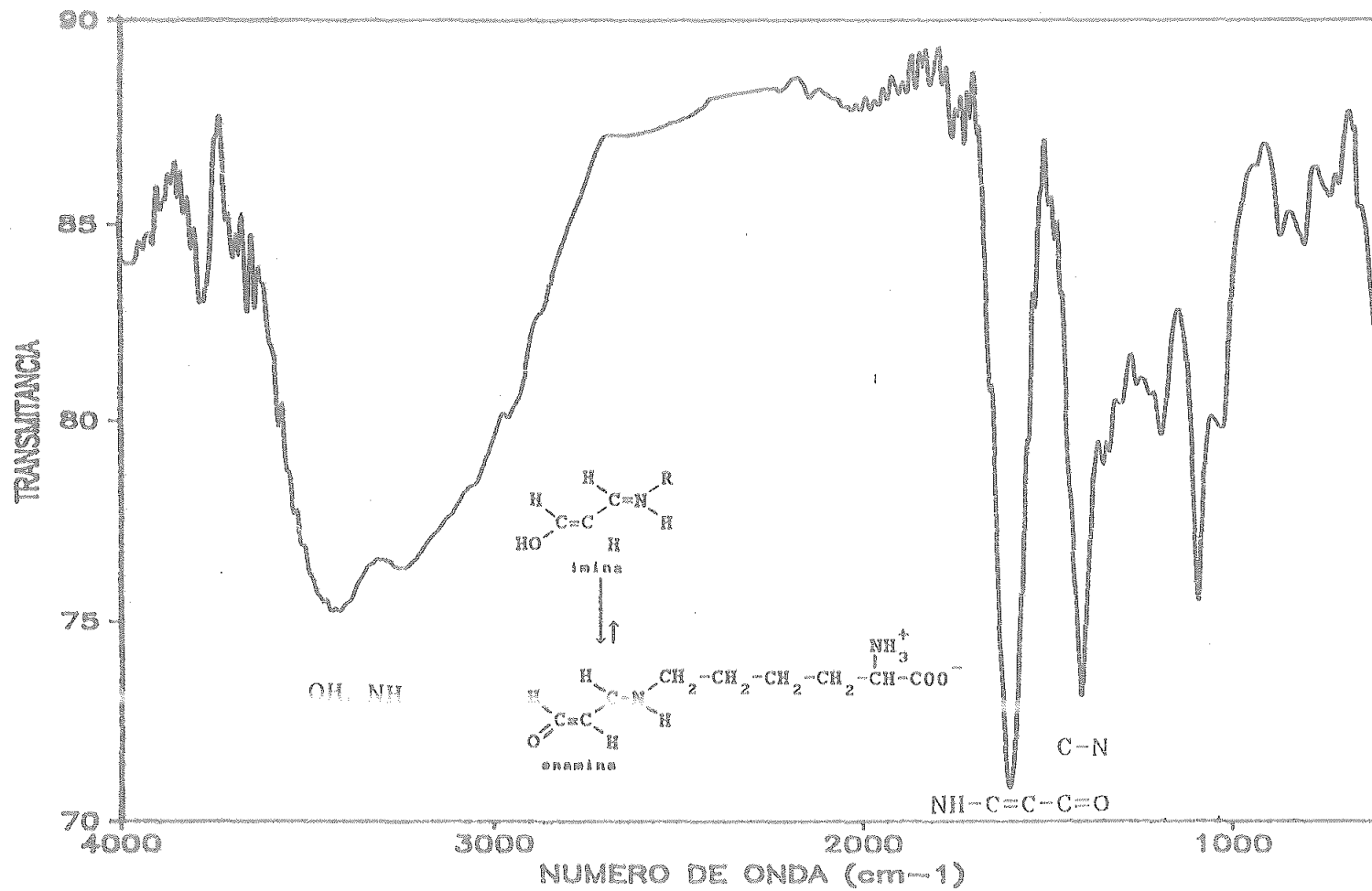
IR del PDEFL (pastilla de BrK)



RMN de 1H de la ϵ PL (200 MHz en D_2O)

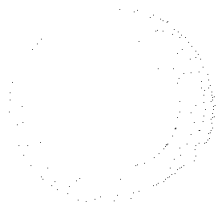


RMN de ^{13}C de la ϵPL (75,1 MHz en $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$)



IR de la εPL (pastilla de BrK)

7. BIBLIOGRAFIA



- Alaiz, M., Girón, J., Hidalgo, F. J., Maza, M. F., Millán, F., Zamora, R. y Vioque, E. *Synthesis* 1989, 944
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J. y Vioque, E. (1991a) *J. Planar Chrom.* (aceptado)
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J. y Vioque, E. (1991b) *J. Chromatogr.* (aceptado)
- Bird, R. P. y Draper, H. H. (1984) *Methods Enzimol.* 105, 299
- Boggs, R. W. (1978) en *Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins* (ed. Friedman, M.), pp. 841-850, Plenum Press, New York
- Buttkus, H. (1969) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 46, 88
- Catch, J. R. (1968) *Purity and Analysis of labelled compounds*, Amersham, Bucks, England
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L. y Lorient, D. (1989) *Proteínas alimentarias* pp. 304-309, Acribia, Zaragoza
- Chio, K. S. y Tappel, A. L. (1969a) *Biochemistry* 8, 2827
- Chio, K. S. y Tappel, A. L. (1969b) *Ibid.* 8, 2821
- Crawford, D. L., Yu, T. C. y Sinnhuber, R. O. (1966) *J. Food Sci.* 14, 182
- Crawford, D. L., Yu, T. C. y Sinnhuber, R. O. (1967) *Ibid.* 32, 332
- Dahle, L.K., Hill, E. G. y Holman, R. T. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* 98, 253

- Damodaran, S. y Kinsella, J. E. (1981a) *J. Agric. Food Chem.* 29, 1249
- Damodaran, S. y Kinsella, J. E. (1981b) *Ibid.* 29, 1253
- Davenport, J. B. (1971) en *Biochemistry and Methodology of Lipids* (eds. Johnson, A. R. y Davenport, J. B.), pp. 163-165, John Wiley & Sons Inc., New York
- Davies, K. J. A. (1988) en *Lipid Peroxidation in Biological Systems* (ed. Alex Sevanian), cap. 7 American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois
- deBethizy, J. D. y Hayes, J. R. (1989) en *Principles and Methods of Toxicology* (ed. Hayes, A. W.), pp. 815-834, Raven Press, New York
- Dianzani, M. U. (1982) en *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer* (eds. McBrien, D. C. H. y Slater, T. F.), pp. 129-158, Academic Press, London
- Dillard, C. J. y Tappel, A. L. (1984) *Methods Enzimol.* 105, 337
- Draper, H. H., Polensek, L., Hadley, M. y McGuirr, L. G. (1984) *Lipids* 19, 836
- Draper, H. H., McGuirr, L. G. y Hadley, M. (1986) *Lipids* 21, 305
- Draper, H. H., Dhanatoki, S. N., Hadley, M. y Piché, C. A. (1988a) en *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms* (ed. Ching Kuang Chow), pp. 97-108, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- Draper, H. H., Hadley, M., Lissemore, L. Laing, N. M. y Cole, P. D. (1988b) *Lipids* 23, 626

- Dring, L. G. (1987) en *Bioquímica toxicología a practical approach* (eds. Snell, K. y Mullock, B.), pp. 183-213, IRL Press, Oxford
- Duthie, G. G. (1991) *Chemistry & Industry* 2, 43
- El-Lakany, S. y March, B. E. (1974) *J. Sci. Fd. Agric.* 25, 889
- Erndersdobler, H. F. (1989) en *Nutritional Impact of Food Processing* (eds. Samogoyi, J. C. y Muller H. R.), pp. 140-155, Karger, Basel
- Eriksson, C. E. (1982) *Food Chemistry* 9, 3
- Esterbauer, H. (1976) *Tetrahedron* 32, 285
- Esterbauer, H. (1982) en *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer* (eds. McBrien, D.C. y Slater, T.F.), pp. 101-128, Academic Press, London
- Finley, J. W., Wheeler, E. L. y Witt, S. C. (1981) *J. Agric. Food Chem.* 29, 404
- Finot, P.-A., Mottu, F., Bujard, E. y Mauron, J. (1978) en *Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins* (ed. Friedman, M.), pp. 549-570, Plenum Press, New York
- Fowler, B. A., Lucier, G. W. y Hayes, W. A. (1989) en *Principles and Methods of Toxicology* (ed. Hayes, A. W.), pp. 815-834, Raven Press, New York
- Frankel, E. N. (1982) *Prog. Lipid Res.* 22, 1
- Frankel, E. N. (1984) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 61, 1908

- Frankel, E. N. (1987) *Chem. Phys. Lipids* 44, 73
- Friedman, M. (1978) en *Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins* (ed. Friedman, M.), pp. 841-850, Plenum Press, New York
- Gamage, P. T. y Matsushita, S. (1973) *Agric. Biol. Chem.* 37, 1
- Gardner, H. W. (1979) *J. Agric. Food Chem.* 27, 220
- Gardner, H. W. (1980) en *Autoxidation in Food and Biological Systems* (eds. Simic, M. G. y Karel, M.), pp. 447-504, Plenum Press, New York
- Gardner, H. W. (1983) en *Xenobiotics in food and feeds* (eds. Finley, J. W. y Schwas, D. E.), pp 63-84, A. C. S. Symp. Serie 234, American Chemical Society, Washington D. C. C.
- Gomez-Sanchez, A., Hermosín, I. y Maya, I. (1990a) *Tetrahedron Lett.* 31, 4077
- Gómez-Sánchez, A., Maya, I. y Hermosín, I. (1990b) *Carbohydr. Res.* 200, 167
- Grimble, G. K. y Silk, D. B. A. (1989) *Nutritional Research Review* 2, 87
- Hadley, M. y Draper, H. H. (1988) *FASEB J.* 2, 138
- Hermosín, I. (1990) *Estudio sobre las reacciones de malondialdehído con amino azúcares y sus posibles implicaciones en la reacción de oscurecimiento no enzimático (reacción de Maillard)* Tesis Doctoral presentada en la Universidad de Sevilla

- Hidalgo, F. J. y Kinsella, J. E. (1989) *J. Agric. Food Chem.* 37, 860
- Hidalgo, F. J., Zamora, R. y Alaiz, M. (1991a) *Grasas y Aceites*
(aceptado)
- Hidalgo, F. J., Zamora, R. y Alaiz, M. (1991b) *Ibid.* (aceptado)
- Hidalgo, F. J., Zamora, R. y Girón, J. (1991c) *Ibid.* (aceptado)
- Hurrell, R. F. y Finot, P. A. (1985) en *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds* (eds. Finley, J. W. y Hopkins, D. T.), pp. 233-246, American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota
- Hurrell, R. F. (1989) en *Nutritional Impact of Food Processing* (eds. Samogoyi, J. C. y Muller, H. R.), pp. 125-139, Basel, Karger
- Janicek, G. y Pokorny, J. (1971) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 145, 142
- Kanazawa, K., Danno, G. y Nataka, M. (1975) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*
21, 373, CA 85:1753q
- Kanazawa, K., Ashida, H. y Nataka, M. (1987) *J. Food Sci.* 52, 475
- Karel, M., Schaich, K. M. y Roy, R. B. (1975) *J. Agric. Food Chem.* 23,
159
- Karel, M. (1980) en *Autoxidation in Food and Biological Systems*
(Simic, M. G. y Karel, M. eds.), pp. 191-206, Plenum Press, New York
- Kikugawa, K., Machida, Y., Kida, M. y Kurechi, T. (1981) *Chem. Pharm. Bull.* 29, 3003, CA 96:85949w

- Kikugawa, K., Ido, Y. y Mikami, A. (1984a) *J. Am. Oil Chemists' Soc.*
61, 1574
- Kikugawa, K. e Ido, Y. (1984b) *Lipids* 19, 600
- Kikugawa, K., Takayanagi, K. y Watanabe, S. (1985) *Chem. Pharm. Bull.*
33, 5437, CA 104:146640r
- Kikugawa, K. y Beppu, M. (1987) *Chem. Phys. Lipids* 44, 277
- Kikugawa, K. y Sawamura, A. (1987) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 64, 1156
- Kikugawa, K. (1988) en *Lipofuscin-1987: State of the Art* (ed. Nagy, I. Zs.), pp. 51-68. Académiai Kiadó, Budapest y Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Kikugawa, K., Kato, T., Iwata, A. y Hayasaka, A. (1989a) *Chem. Pharm. Bull* 37, 3061, CA 112:114486z
- Kikugawa, K., Kato, T., Beppu, M. y Hayasaka, A. (1989b) en *Lipofuscin and Ceroid Pigments-1989: State of the Art* (manuscrito de congreso)
- Kikugawa, K., Kojima, T. y Kosugi, H. (1990) *Free Rad. Res. Comms.* 88, 107, CA 112:154659q
- Kosugi, M., Kojima, T. y Kikugawa, K. (1989) *Lipids* 24, 873
- Krogull, M. K. y Fennema, D. (1987) *J. Agric. Food Chem.* 35, 66
- Kubow, S., (1990) *Trends in Food Sci. & Technol.* 1, 67

- Lake, B. G. (1987) en *Biochemical toxicology a practical approach* (eds. Snell, K. y Mullock, B.), pp. 183-213, IRL Press, Oxford
- Lewis, S. E. y Wills, E. D. (1962) *Biochem. Pharmacol.* 11, 901
- Malshet, V. G. y Tappel, A. L. (1973) *Lipids* 8, 194
- Matsushita, S., Kobayashi, M. y Mitta, Y. (1970) *Agric. Biol. Chem.* 34, 817, CA 73:52471f471f
- McGirr, L. G., Hadley, M. y Draper, H. H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 15427
- Nair, V., Vietti, D. E. y Cooper, C. S. (1981) *J. Am. Chemists' Soc.* 103, 3030
- Nair, V., Cooper, C. S., Vietti, D. E. y Turner, G. A. (1986) *Lipids* 21, 6
- Nair, V., Offerman, R. J., Turner, G. A., Pryor, A. N. y Benzinger, N. C. (1988) *Tetrahedron* 44, 2793
- Nielsen, H. K., De Weck, D., Finot, P. A., Liardon, R. y Hurrell, R. F. (1985a) *Br. J. Nutr.* 35, 281
- Nielsen, H. K., Loliger, J. y Hurrell, R. F. (1985b) *Br. J. Nutr.* 53, 61
- Nielsen, H. K., Finot, P. A. y Hurrell, R. F. (1985c) *Br. J. Nutr.* 53, 75
- Parinandi, N. L., Zwizinski, C. W., Schmid, H. H. O. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 118

- Piché, L. A., Cole, P. D., Hadley, M., Van der Bergh, R. y Draper, H. H. (1988a) *Carcinogenesis* 9, 473
- Piché, L. A., Draper, H. H. y Cole, P.D. (1988b) *Lipids* 23, 370
- Pokorny, J., Klein, S. y Koren, J. (1966) *Die Nahrung* 10,321
- Pokorny, J., Tai, P. T. y Janicek, G. (1973) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 151, 36, CA 78:12283b
- Pokorny, J. y Davidek, I. (1979) *Acta Alimentaria Polonica* V, 87
- Potter, V. R. (1955) *Methods Enzimol.* 1, 10
- Pryor, W. A., Stanley, J. P. y Blair, E. (1976) *Lipids* 11, 370
- Renwick, A. G. (1989) en *Principles and Methods of Toxicology* (ed. Hayes, A. W.), pp. 835-878, Raven Press, New York
- Roubal, W. T. y Tappel, A. L. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 5
- Roubal, W. T. (1970) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 47, 141
- Roy, R. B. y Karel, M. (1973) *J. Food Sci.* 38, 896
- Schaich, K. M. y Karel, M. (1975) *J. Food Sci.* 40, 456
- Sherr, B., Lee, C. L. y Jelesciewicz, C. (1989) *J. Agric. Food Chem.* 37, 119
- Simonnet, G. (1990) en *Radioisotopes in Biology* (ed. Slater, R. J.), pp. 50-82, Oxford University Press, 1990
- Siú, G. M. y Draper, H. H. (1978) *J. Food Sci.* 43, 1147

- Stiá, G. M. y Draper, H. H. (1982) *Lipids* 17, 349
- Slater, T. F. (1984) *Biochem. J.* 222, 1
- Steinbrecher, U. P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 3603
- Sugiyama, N., Harada, R., Mita, T. y Ueno, T. (1951) *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.* 72, 152 CA 46:3447i
- Suyama, K. y Adachi, S. (1978) *J. Org. Chem.* 44, 1417
- Suyama, K. y Adachi, S. (1986) *Dev. Food Sci.* 13, 95
- Trombly, R. y Tappel, A. L. (1975) *Lipids* 8, 441
- Vioque, E. y Holman, R. T. (1961) *Anal. Chem.* 33, 1444-1445
- Vioque, E., Maza, M. P. y Millán, F. (1985) *J. Chromatogr.* 331, 187
- Williams, R. T. y Millburn, P. (1975) en *MTP International Review of Science, Physiological and Pharmacological Biochemistry* (ed. Blaschko, H. K. F.) 12, pp. 211-266, University Park Press, Baltimore
- Yoden, K., Matsuzaki, R., Iio, T. y Tabata, T. (1985) *Yakugaku Zashi* 105, 855, CA 104:18235f
- Yagi, K. (1984) *Methods Enzimol.* 105, 328
- Yong, S. H. y Karell, M. (1978) *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 55, 352
- Yu, T. C. y Sinnhuber, R. O. (1967) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 44, 256

Zamora, R., Hidalgo, F. J., Alaiz, M., Millán, F., Meza, M.P. y

Vicque, E. (1987) *Grasas y Aceites* 38, 318

Zamora, R., Hidalgo, F. J. y Alaiz, M. (1991a) *Ibid.* 42, 155

Zamora, R., Hidalgo, F. J. y Alaiz, M. (1991b) *Ibid.* 42, 230

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Julio Giron Calle

titulo Estudio estructural y de biodegradabilidad de compuestos de reacción entre amino y aldehidos procedente de oxidación lipídica

acordó otorgar la graduación de Artes "cum laude" por merecimiento

Sevilla, 7 de Mayo de 1992

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,


El Presidente


El Secretario,


El Doctorado,



