Efecto de la L-aminoácido oxidasa de veneno de serpiente sobre la gamma-hidrazida del ácido L-glutámico e identificación de los productos de la reacción

LORENA RODRIGUEZ-PAEZ*, DORIS NERI-CORTES*,
ISABEL BAEZA-RAMIREZ* y CARLOS WONG-RAMIREZ*

Departamento de Bioquímica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
Prol. de Carpio y Plan de Ayala
Col. Santo Tomás
Apartado Postal 42-186
11340 México, D.F.

RODRÍGUEZ-PÁEZ, L.; D. NERI-CORTÉS; I. BAEZA-RAMÍREZ y C. WONG-RAMÍREZ, 1993. Efecto de la L-aminoácido oxidasa de veneno de serpiente sobre la gamma-hidrazida del ácido L-glutámico e identificación de los productos de la reacción. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., **38:** 167-178.

RESUMEN: Empleando la L-aminoácido oxidasa (veneno de serpiente), se trató de obtener la gamma hidrazida del ácido alfa-ceto glutárico a partir de la gamma hidrazida del ácido L-glutámico. El curso de la reacción de desaminación oxidativa fue seguido mediante el consumo de oxígeno y la producción de amoniaco. Las pruebas químicas, cromatográficas y espectrofotométricas, hechas en forma comparativa con el producto de la reacción enzimática y con el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II), nos indicaron que el producto final de la reacción enzimática no es la gamma hidrazida del alfa-ceto glutárico en su forma lineal, sino su forma cíclica, el ácido tetrahidro-6-piridazinona-3-hidroxi-3-carboxílico (I); el cual, por calentamiento o tratamiento con HCl 2N, puede ser transformado en el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II).

INTRODUCCIÓN

En 1910 se encontró por primera vez el ácido gamma amino butírico (GABA) en materiales biológicos (Ackerman, 1910). Posteriormente, Awapara y col., 1950, y Roberts y col., 1951, encontraron que el GABA es un constituyente esencial del sistema nervioso

---

* Profesores becarios de la Dirección de Especialización Docente e Investigación Científica y Tecnológica dependiente de la COFAA del IPN.

central en los organismos vertebrados, incluyendo a los mamíferos, encontrándose la máxima concentración de esta sustancia en el hipotálamo (Hirsch y Robins, 1962).

Killam y Bain en 1957, al estudiar un agente convulsivante como la tiosemicarbazida, encontraron disminución de los niveles del GABA en el cerebro de los animales tratados, debido a la inhibición de la descarboxilasa del glutámico, enzima encargada de la síntesis del GABA. El GABA a su vez se metaboliza por transaminación con el ácido alfa-ceto glutárico para formar, primero, el semialdehído succínico y luego el ácido succínico, el cual finalmente se degrada hasta CO_2 y H_2O vía ciclo de Krebs. Se ha visto que al inhibir la transaminasa del GABA se impide la degradación del GABA y por lo tanto se eleva su concentración. Entre las sustancias encontradas que inhiben a la transaminasa del GABA en el encéfalo, están la hidroxilamina (Roberts y Hammerschlag, 1972), el ácido aminoxiacético (Wallach, 1960) y la gamma hidrazida del ácido glutámico (Massieu y col., 1962). Tanto la hidroxilamina (Roberts y Hammerschlag, 1972) como el ácido aminoxiacético (Wallach, 1960), se comportan como agentes anticonvulsivantes ya que el aumento de los niveles de GABA que producen es capaz de contrarrestar la disminución del mismo, inducida por agentes convulsivantes como la tiosemicarbazida. De acuerdo con lo anterior, se ha propuesto al GABA como un posible transmisor inhibidor en el sistema nervioso central de vertebrados y mamíferos (Kravits, 1968; Spero, 1982;. Rossor 1982).

Con estos estudios se ha tratado de generalizar, suponiendo que todas las sustancias capaces de disminuir los niveles de GABA se deberían comportar como convulsivantes y además, todas aquellas sustancias capaces de aumentar los niveles cerebrales de GABA tendrían efecto anticonvulsivante (Cowen y Nutt, 1982).

Se ha estudiado la gamma hidrazida del ácido L-glutámico (Massieu y col., 1962; Tapia y col., 1967), con el fin de determinar si tenía algún efecto anticonvulsivante frente a sustancias como la tiosemicarbazida; los datos obtenidos demuestran claramente que el aumento de GABA en el cerebro de los animales tratados con la gamma hidrazida del ácido L-glutámico no impide que se presenten los estados convulsivos y finalmente la muerte.

El hecho de que la gamma hidrazida del ácido L-glutámico, a pesar de que produce un aumento en el GABA cerebral, no da protección contra las convulsiones inducidas por la tiosemicarbazida, sugiere que esta hidrazida tiene un efecto convulsivante *perse*, además de elevar los niveles de GABA cerebrales. Otra posible explicación, es que no fuera esta hidrazida la que inhibiera a la transaminasa *in vivo*, sino un derivado formado por biodegradación de la propia hidrazida. Este derivado, probablemente con propiedades anticonvulsivantes, sería el responsable de la elevación de los niveles de GABA; sin embargo, estas propiedades serían enmascaradas por el efecto convulsivante de la gamma hidrazida del L-glutámico. Esto explicaría porqué la hidrazida del L-glutámico no protege de las convulsiones y muerte producidas por la tiosemicarbazida, a pesar de que eleva notablemente los niveles de GABA cerebrales (Massieu y col., 1962; Tapia y col., 1967).

Uno de los objetivos de este trabajo es obtener algunos posibles derivados de biotransformaciones de la gamma hidrazida del ácido L-glutámico, para posteriormente determinar si tienen propiedades relacionadas con los efectos farmacológicos de dicha hidrazida.

Un posible candidato sería la gamma hidrazida del ácido alfa-ceto glutárico ya que consideramos que así como el ácido L-glutámico transamina para dar el ácido alfa-ceto glutárico, la gamma hidrazida del ácido L-glutámico también podría transaminar para dar la gamma hidrazida del ácido alfa-ceto glutárico y fuera esta sustancia la responsable de la

elevación de los niveles de GABA por inhibición de la transaminasa y que en teoría podría tener efecto anticonvulsivante. Pero como el grupo amino de la hidrazida del ácido alfa-ceto glutárico reacciona fácilmente con grupos carbonilo, cabe la posibilidad de que éste reaccione con el grupo alfa-ceto de la misma molécula y se forme un compuesto cíclico, el ácido tetrahidro-6-piridazinona-3-hidroxi-3-carboxílico (I), el cual por deshidratación podría dar lugar a la formación del ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II). El otro objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la L-aminoácido oxidasa de veneno de serpiente sobre la gamma hidrazida del ácido L-glutámico, con el objeto de determinar con certeza cuál o cuáles son los productos de la reacción, para que posteriormente, al probar su posible efecto farmacológico, sepamos exactamente a qué estructura química le debemos atribuir dicho efecto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Desaminación oxidativa de la gamma hidrazida del ácido L-glutámico. Método de Warburg

En un matraz de Warburg, se colocan en el pozo central 0.2 ml de NaOH 0.2 N. En la cámara de reacción, 1.0 ml de solución reguladora de tris 0.05 M, pH 7.2, 1.0 ml de KCl 0.1 M, 0.5 ml de agua, 0.1 ml de catalasa (10 mg/ml de solución reguladora de tris 0.05 M, pH 7.2), 0.2 ml de solución de sustrato (L-leucina como control positivo o bien la gamma hidrazida del ácido L-glutámico). Como en la reacción se produce agua oxigenada, la cual oxidaría al alfa-cetoácido formado (lo descarboxila), en el sistema de reacción se debe incluir catalasa con el objeto de que se destruya el agua oxigenada y de esta forma se pueda obtener el alfa-cetoácido. Se mide el consumo de oxígeno de la reacción mediante la técnica de Warburg a 37° $\pm$ 1°C (Clark y Switzer, 1977), agitando con una frecuencia de 70 oscilaciones por minuto y con desplazamiento de 7 cm. Después de que se utilizan la temperatura y presión durante 10 minutos, se adiciona el sustrato y se toman lecturas cada cinco minutos durante una hora. Los resultados se expresan en microlitros después de haber corregido las lecturas con el factor de corrección de cada manómetro y matraz de referencia que contiene todo, excepto la L-aminoácido oxidasa de veneno de serpiente.

Preparación del ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II)

En un matraz erlenmeyer de 260 ml, se adicionan 10 g de ácido alfa-cetoglutárico y 50 ml de ácido acético glacial, esta mezcla se calienta ligeramente hasta disolución. En una bureta se colocan 10 ml de hidrazina (64% en agua) y se agregan gota a gota sobre la mezcla anterior; la adición debe hacerse con agitación, se deja reposar la mezcla 24 hrs. Posteriormente se filtra al vacío obteniéndose un producto sólido de color blanco que se coloca en una caja de petri, se mete en la estufa y cada 10 minutos se remueve con el fin de eliminar el ácido acético. Esta sustancia se recristaliza dos veces en HCl 2 N obteniéndose cristales de color blanco a los que se les determinó su punto de fusión que fue de 196-197°C, igual al reportado en la literatura (Evans y Wiselogle, 1945).

Método de Conway para la determinación de amoniaco (Conway, 1950)

Se coloca 1 ml de ácido sulfúrico 0.001 N en la cavidad central de la cámara de Conway

y en la cavidad periférica se coloca 1 ml de la solución problema. Se coloca la tapa, sellando perfectamente con vaselina. Enseguida, la cámara se inclina un poco apoyándola por uno de sus lados en un pequeño borde. Se corre dejando una pequeña abertura en la parte más levantada de la cámara y por ahí se introduce rápidamente (con una pipeta de flujo rápido) 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio. Se cierra rápidamente la cámara y se agita 10 minutos inclinándola con la mano de un lado a otro, teniendo cuidado de que los líquidos no se mezclen. Se saca lo más posible de la solución de ácido sulfúrico (conteniendo de 0.5 a 10 mg de amoniaco) y se coloca en un matraz aforado de 10 ml. Se lava dos veces con 1 ml de agua, se afora con agua y se agregan 0.5 ml del reactivo de Nessler. El contenido del matraz se agita suavemente, se deja reposar 15 minutos y se determina la intensidad de la coloración en un espectrofotómetro a 500 nm.

Obtención enzimática de la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto-glutárico (Método preparativo)

En un matraz erlenmeyer de 125 ml, se colocaron 25 ml de agua, 20 ml de veneno de serpiente (10 mg/ml de solución reguladora de tris 0.05 M, pH 7.2), 5 ml de solución de catalasa (10 mg/ml de solución reguladora de tris 0.05 M, pH 7.2) y 60 ml de solución de gamma hidrazida del ácido L-glutámico (10 ml de solución de gamma hidrazida del ácido L-glutámico 0.1 M más 50 ml de solución reguladora de tris 0.05 M, pH 7.2) y se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 2 N. Enseguida se incubó a 37°C $\pm$ 1. Se ajustó el pH a 7.2 cada dos horas durante las 10 primeras, después se ajustó cada seis horas. La reacción se dio por terminada a las 24 horas de incubación y se procedió a dializar contra un litro de agua durante 12 horas a 5°C y el dializado se liofilizó, obteniéndose un producto sólido algo pastoso y de color ligeramente café.

L-aminoácido oxidasa

Como L-aminoácido oxidasa se empleó veneno de serpiente liofilizado de Sigma Chemical Co. USA.

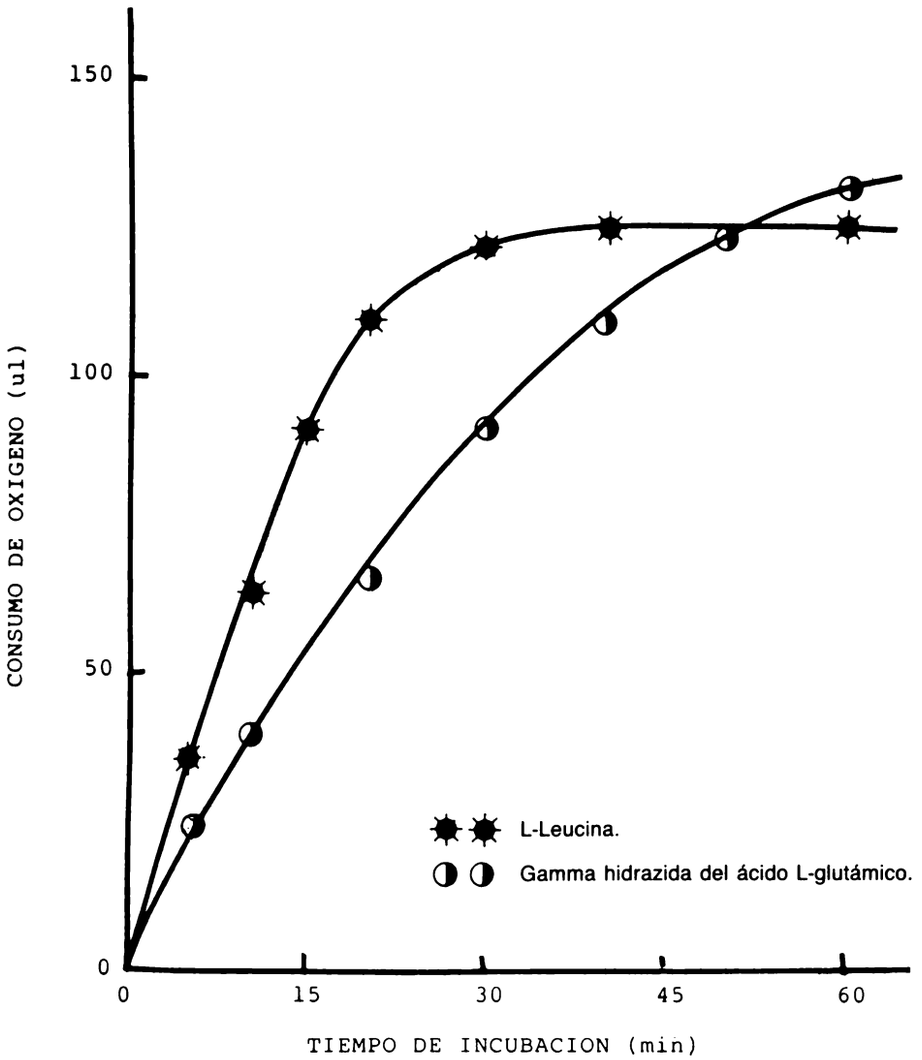
Catalasa

Se empleó una solución de catalasa de Sigma Chemical Co. USA. conteniendo 10 mg de proteína por ml.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la cinética de la desaminación oxidativa de la gamma hidrazida del ácido L-glutámico se presentan en la gráfica 1, en donde se compara la acción de la L-aminoácido oxidasa de veneno de serpiente frente a la gamma hidrazida del ácido glutámico y la L-leucina que se empleó como control positivo. El curso de la reacción se siguió midiendo el consumo de oxígeno.

En vista de que la L-aminoácido oxidasa sí es capaz de transformar a la gamma hidrazida del ácido L-glutámico, se procedió a montar un método preparativo para poder obtener el alfa-cetoácido en una cantidad suficiente para posteriormente purificarlo y caracterizarlo.



GRÁFICA 1. Efecto de la L-aminoácido oxidasa sobre L-Leucina y la gamma hidrazida del ácido L-glutámico.

En la gráfica 2 se puede observar el curso de la reacción de desaminación de la gamma hidrazida del ácido L-glutámico cuando se empleó el método preparativo para la obtención del alfa-ceto-ácido correspondiente. En este caso, la cinética de la reacción se siguió midiendo la producción de amoniaco en el tiempo.

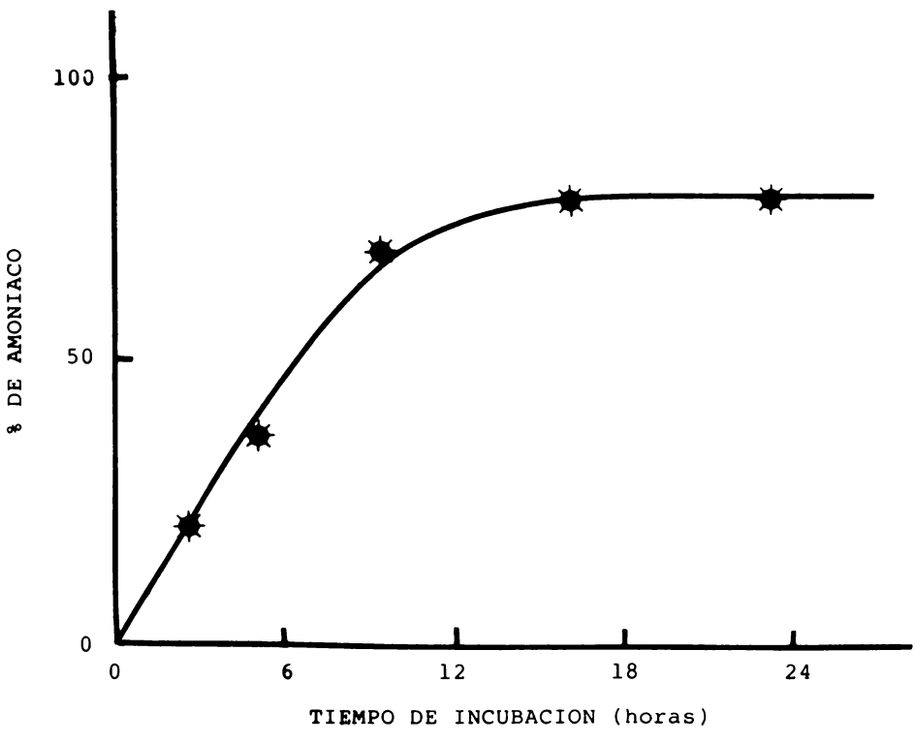
Se observa que en este método la cinética de la reacción es un poco diferente a la que se obtiene en el aparato de Warburg (lo más probable es que esto se deba a que las condiciones de reacción son diferentes), ya que en este método preparativo la reacción es muy

rápida al principio, alcanzando su máximo a las 24 hrs. y a partir de aquí se observa poca actividad, sin embargo el rendimiento es de alrededor del 80%. Es probable que esto se deba a que la enzima se inactiva durante las 24 hrs. de incubación a 37°C ya que en este experimento no se empleó KCl, el cual se ha informado es importante para la estabilidad de la enzima.

Caracterización del producto obtenido por el método enzimático

El producto de la reacción enzimática anterior se dializó contra agua, se liofilizó y se obtuvo un residuo algo pastoso de un color ligeramente café, el cual se sometió a diferentes pruebas con el objeto de tratar de caracterizarlo (Vogel, 1978).

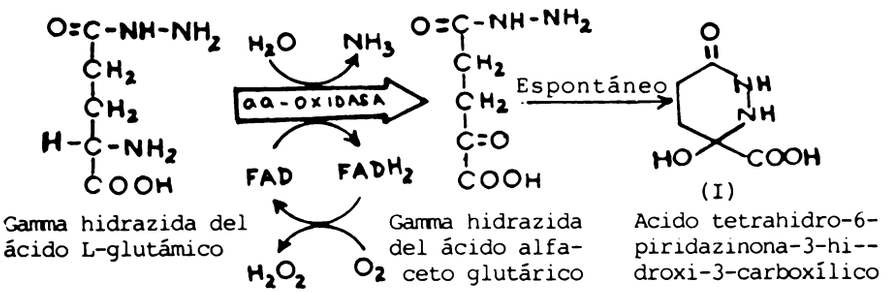
A) *Reacción con 2,4-dinitro-fenil-hidrazina*. Consideramos que si el producto obtenido se encontraba abierto, es decir, no ciclizado, el grupo carbonilo debería dar reacción con la 2,4-dinitro-fenil-hidrazina. Sin embargo, el producto no formó la 2,4-dinitro-fenil-hidrazona, en tanto que una muestra de ácido alfa-ceto-glutárico empleado como testigo, sí la formó. Estos resultados sugieren que se obtiene la forma cíclica de la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto-glutárico.



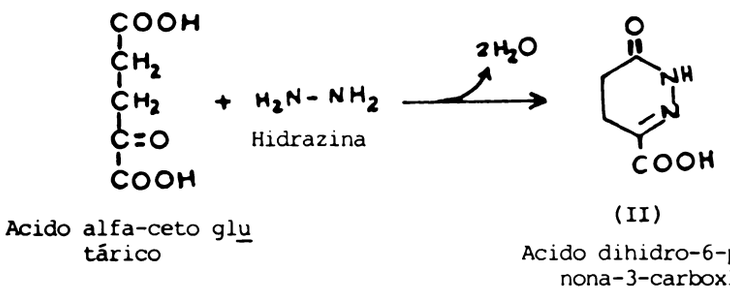
GRÁFICA 2. Producción de amoniaco en la desaminación oxidativa de la gamma hidrazida del ácido L-glutámico.

B) *Reacción de descarboxilación con agua oxigenada.* Se sabe que los alfa-cetoácidos se descarboxilan fácilmente en presencia de agua oxigenada y es por esto que se incluye la catalasa en el método enzimático que empleamos para tratar de obtener la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto-glutárico, ya que en dicha reacción, como se indica en el esquema 1, se produce agua oxigenada la cual descarboxilaría al alfa-cetoácido y nos impediría obtener el producto deseado si la reacción se hiciera en ausencia de catalasa. De acuerdo con lo anterior, si el producto de la reacción enzimática se encuentra en forma abierta, es decir, como alfa-cetoácido, se debería descarboxilar en presencia de agua oxigenada, sin embargo, cuando dicho producto lo pusimos en presencia de agua oxigenada, se observa que no se descarboxila, en tanto que una muestra de ácido alfa-ceto-glutárico empleada como testigo se descarboxila rápidamente en presencia de agua oxigenada, lo cual se detecta por la efervescencia debida a la producción de bióxido de carbono. Lo anterior también es indicativo de que lo obtenido como producto final de la reacción enzimática es la forma cíclica de la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto-glutárico (esquema 1).

ESQUEMA No. 1



DESAMINACION OXIDATIVA CATALIZADA POR LA L-AMINOACIDO OXIDASA DE VENENO DE SERPIENTE.



METODO QUIMICO PARA LA OBTENCION DEL ACIDO DIHIDRO-6-PIRIDAZINONA-3-CARBOXILICO (II).

C) *Cromatografía en capa fina* (Dryer y Lata, 1989). El producto obtenido enzimáticamente se sometió a pruebas de identificación por cromatografía en capa fina comparándolo con el producto sintético, el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II); se probaron varios sistemas de solventes y finalmente el que mejor resultado nos dio fue el de acético-agua-acetona (2:1:0.25) y el revelado de los productos cromatografiados se hizo con yodo metálico.

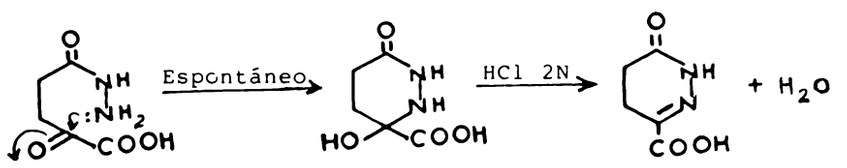
Los resultados se presentan en la tabla 1. Como puede observarse el producto sintético, el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II), presenta un Rf de 0.65, en tanto que el producto enzimático presenta un Rf de 0.80 y, al tratar este producto con HCl 2 N, o bien, calentándolo, el Rf cambia a 0.65, lo cual sugiere que el producto con un Rf de 0.80 es el producto cíclico pero hidratado, el cual se deshidrata al calentarlo o bien al tratarlo con HCl 2 N (esquema 2).

TABLA 1. Estudio cromatográfico del producto obtenido por la desaminación oxidativa de la gamma-hidrazida del ácido L-glutámico.

Producto obtenido por el método:	Rf
ENZIMATICO	0.80
ENZIMATICO + HCl 2N	0.65
ENZIMATICO CALENTADO	0.65
QUIMICO	0.65
QUIMICO + ENZIMATICO CALENTADO	0.65
QUIMICO + ENZIMATICO + HCl 2N	0.65

Producto enzimático (supuestamente la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto glutárico); producto sintetizado químicamente (ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico). Los cromatogramas se corrieron con: ácido acético-agua-acetona (2:1:0.25).

E S Q U E M A No. 2



Gamma hidrazida del ácido alfa-ceto glutárico

Acido tetrahidro-6-piridazinona-3-hidroxi-3-carboxílico.

Acido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico.

De este estudio cromatográfico, se puede considerar que lo que se obtiene al tratar el producto enzimático tanto con HCl 2 N como por calentamiento, es el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico, ya que se obtienen los mismos Rfs y además, cuando el producto calentado o tratado con HCl 2 N se mezcla con una muestra del ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico puro se obtiene una sola mancha con Rf también de 0.65, lo que indica que se trata de la misma sustancia. El producto con un Rf de 0.80 es el producto cíclico pero hidratado, ya que las pruebas con 2,4-dinitro-fenil-hidrazina y con agua oxigenada indican también que se trata de un producto cíclico.

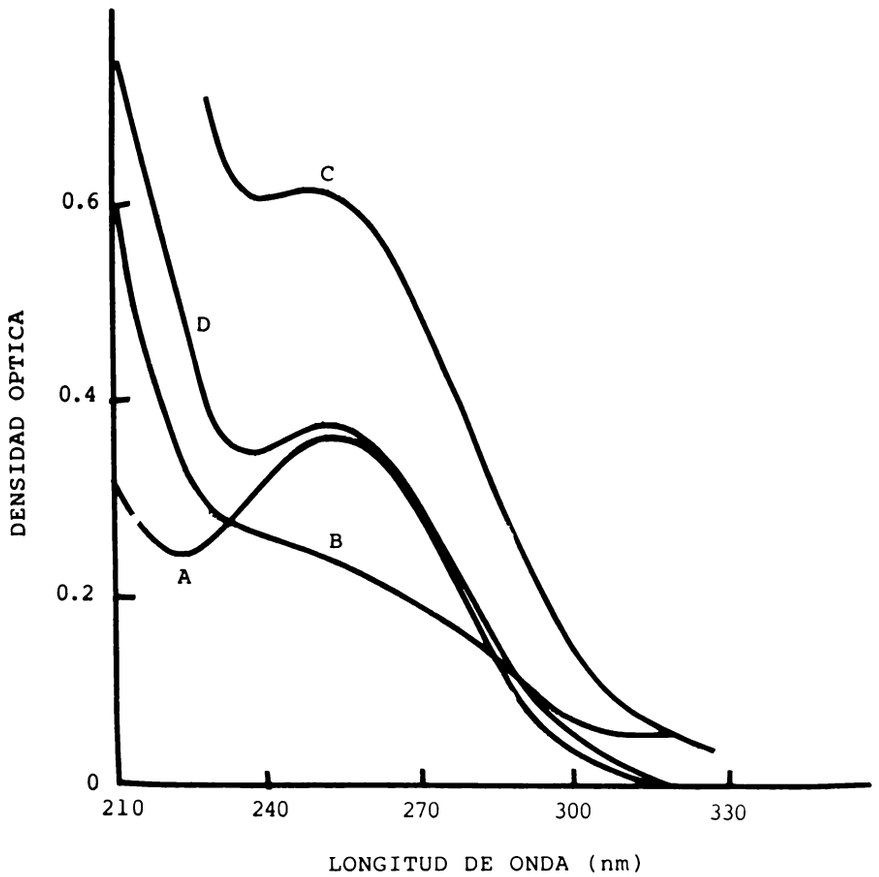
D) *Estudio espectrofotométrico (UV).* Se hizo también un estudio espectrofotométrico del producto de la reacción enzimática comparándolo con el espectro del producto calentado o tratado con HCl, y con el espectro del ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico; los resultados aparecen en la gráfica 3.

Como se puede ver, el producto obtenido enzimáticamente presenta un espectro diferente al del ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico, y al calentar o tratar con HCl cambia a un espectro muy similar al del ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico. Estos resultados también nos indican que el producto que se obtiene por el método enzimático no es el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico. Es casi seguro que se trata del producto cíclico pero hidratado, el cual por tener un doble enlace menos en su anillo debe absorber menos a 260 nm, como es el caso del espectro que obtuvimos. Se observa también que cuando el producto enzimático lo calentamos o tratamos con HCl 2 N, el espectro cambia a otro muy semejante al espectro del ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico, el cual por poseer una doble ligadura más en su anillo absorbe más a 260 nm, que es donde presenta su máximo de absorción.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se empleó un sistema capaz de transformar la gamma-hidrazida del ácido L-glutámico en el correspondiente alfa-cetoácido (gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto glutárico) para esto se seleccionó la L-aminoácido oxidasa del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) por su inespecificidad (Meister, 1952; Dixon y Webb, 1979). De acuerdo con los resultados obtenidos, y mostrados en la gráfica 1, la L-aminoácido oxidasa sí es capaz de transformar a la gamma-hidrazida del ácido L-glutámico tan eficientemente como a la L-leucina que se emplea como testigo en este tipo de reacciones. Además, hay evidencias importantes que indican que la desaminación oxidativa se lleva a cabo, ya que se consume oxígeno y se produce amoniaco para dar lugar a la formación de la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto-glutárico.

Como se señala en la introducción, uno de los objetivos de este trabajo era el de tratar de caracterizar el producto final de la reacción, obtenido al hacer reaccionar la gamma-hidrazida del ácido glutámico con la L-aminoácido oxidasa de veneno de serpiente. En un trabajo anterior, suponíamos que el producto que se obtenía era la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto-glutárico (Machain, 1973), pero como este producto se puede ciclizar espontáneamente en el medio de reacción dando el ácido tetrahidro-6-piridazinona-3-hidroxi-3-carboxílico (I), el cual a su vez se puede deshidratar fácilmente en medio ácido para dar el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II), decidimos caracterizar por otros métodos el producto final de la reacción enzimática señalada anteriormente (esquema 2).



GRÁFICA 3. Espectros de absorción de: **A** ácido tetrahidro-6-piridazinona-3-carboxílico. **B** producto obtenido enzimáticamente. **C** producto obtenido enzimáticamente, tratado con HCl 2N. **D** al espectro C se le restó el espectro B.

Lo primero que se hizo fue obtener la supuesta gamma-hidrazida del ácido alfa-cetoglutárico por el método enzimático previamente descrito por nosotros (Machain, 1973) y este producto una vez aislado lo sometimos a diferentes análisis. Consideramos que si el producto se encontraba abierto, es decir, no ciclizado, el grupo carbonilo debería dar reacción con la 2,4-dinitro-fenil-hidrazina. Sin embargo, el producto no formó la hidrazona correspondiente, en tanto que una muestra de ácido alfa-ceto-glutárico empleada como testigo sí la formó. Estos resultados sugieren que se obtiene la forma cíclica de la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto-glutárico.

También hicimos reaccionar el producto final de la reacción enzimática con agua oxigenada, ya que se sabe que los alfa-ceto-ácidos se descarboxilan fácilmente al ser tratados con peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), encontrando que dicho producto no se des-

carboxila, en tanto que una muestra de ácido alfa-ceto-glutárico empleada como testigo se descarboxila rápidamente, lo cual nos indicó también que probablemente lo que se obtiene es la forma cíclica de la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto-glutárico.

Con el objeto de estar seguros de haber logrado la forma cíclica, empleando el método enzimático, procedimos a obtener químicamente el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II) para compararlo con el producto enzimático, ya que si se consigue el producto cíclico empleando el método enzimático, éste se debe transformar fácilmente en el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II). Así que, contando con este ácido puro obtenido químicamente, estábamos en condiciones de hacer estudios comparativos. Por cromatografía en capa fina, encontramos que el producto obtenido enzimáticamente presenta un Rf de 0.80, en tanto que el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II) presenta un Rf de 0.65, pero al tratar el producto enzimático con HCl 2 N o bien calentando, se transforma rápida y cuantitativamente en el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II) con un Rf de 0.65, lo cual es una prueba más de que el producto que se obtiene enzimáticamente es el producto cíclico (ácido tetrahidro-6-piridazinona-3-hidroxi-3-carboxílico (I) (Tabla 1).

El estudio espectrofotométrico también nos indicó que el producto obtenido enzimáticamente no es el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II) sino el producto hidratado cíclico, el cual se transforma fácilmente al tratarlo con HCl o bien calentando, en un compuesto con un espectro de absorción muy semejante al del ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II).

De acuerdo con los resultados se puede decir que el producto obtenido con el método enzimático es un producto cíclico, ya que no da reacción con la 2,4-dinitro-fenil-hidrazina ni tampoco se descarboxila con agua oxigenada y, cromatográficamente, así como espectrofotométricamente es diferente del ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico. La conclusión es que se trata del producto cíclico (ácido tetrahidro-6-piridazinona-3-hidroxi-3-carboxílico (I), el cual se transforma en el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico al calentar o bien al tratar con HCl.

De acuerdo con lo anterior, podemos decir que con el método enzimático empleado logramos los objetivos planteados, puesto que no sólo identificamos el producto de la reacción, sino que además tenemos la forma de obtener el ácido tetrahidro-6-piridazinona-3-hidroxi-3-carboxílico (I), como un posible metabolito de la gamma hidrazida del ácido L-glutámico, que además se puede transformar fácilmente en el ácido dihidro-6-piridazinona-3-carboxílico (II), que también podría ser otro posible metabolito obtenido por biotransformación (Jakoby, 1980).

SUMMARY

Using L-aminoacid oxidase (snake venom) we tried to obtain the alpha keto glutaric acid gamma hydrazide from L-glutamic acid gamma hydrazide. The oxidative deamination reaction course was followed by the oxygen uptake and the production of ammonia.

Running comparative chemical, chromatographic and spectrophotometric assays on the enzymatic product and on the dihydro-6-pyridazinone-3-carboxylic acid (II), we found that the final enzymatic product was not the expected lineal form of alpha keto glutaric acid gamma hydrazide, but the cyclic form of alpha keto glutaric acid gamma hydrazide,

the tetrahydro-6-pyridazinone-3-hydroxy-3-carboxylic acid (I), which on heating or treatment with HCl 2N may be transformed into dihydro-6-pyridazinone-3-carboxylic acid (II).

BIBLIOGRAFÍA

ACKERMAN, D.S. 1910. S. Physiol. Chem., **69,** 263. Citada en la Tesis doctoral: Massieu, H.G. E N C B 1963.

AWAPARA, J.; A.J. LANDUA; R. FUERST and B. SEALE, 1950. Free aminobutyric acid in brain., *J. Biol. Chem.* **187:** 35-39.

CLARK, J.M. and R.L. SWITZER, 1977. Methods to measure gas exchange. In Experimental biochemistry. 2nd ed. W.H. Freeman and Company N.Y., pág. 259-264.

CONWAY, E.J., 1950. Microdifussion analysis and volumetric error. En: Crosby Lockwood and Son LTD., 3a. ed.

COWEN, P.J. and D.J. NUTT, 1982. Abstinence symptoms afterwithdrawl of tranquilizer drugs. *Lancet* **II;** 360-362.

DRYER, R.L. and G.F. LATA, 1989. Experimental biochemistry. Oxford University Press. pág. 164-167.

DIXON, M., and E.C. WEBB, 1979. Enzymes. Longmans, pág. 280-284, 327-331.

EVANS, R.C. and F.Y. WISELOGLE, 1945. Studies in the pyridazine series. The absorption spectrum of pyridazine. *J. Amer. Chem. Soc.* **67:** 60-64.

HIRSH, H.E. and E. ROBINS, 1962. Distribution of gamma aminobutyric acid in the layers of the cerebral and cerebellar cortex. *Implications for its physiological role. J. Neurochem.* **9,** 63-69.

JAKOBY, W.B., 1980. Enzymatic basis of detoxication. Vol. II. Academic Press. Pág. 123.

KILLAM, K.F., and J.A. BAIN, 1957. Convulsant hydrazides. *In vitro* and *in vivo* inhibition of vitamina B_6 enzymes by convulsant hydrazides, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **119:** 255-262.

KRAVITZ, E.A., 1968. A study of synaptic chemistry in single neurones. Carlson (Ed) en: Physiological and biochemical aspect of nervous integration. Prentice Hall, Inc. N. Jersey. pág. 67.

MACHAIN A., B.L., 1973. Obtención enzimática de la gamma-hidrazida del ácido alfa-ceto glutárico. Tesis Profesional. ENCB, IPN.

MASSIEU-H.G., I. TAPIA-R. and C. ORTEGA-B., 1962. Free aminoacid in brain of mice treated with glutamic acid gamma hydrazide. *Biochem. Pharmac.* **11:** 976-979.

MEISTER, A., 1952. Enzymatic preparation of alpha keto acid. *J. Biol. Chem.* **197:** 309-317.

ROBERTS, E. and S. FRANKEL, 1951. Glutamic acid decarboxilase in brain. *J. Biol. Chem.* **188:** 789-795.

ROBERTS, E., and R. HAMMERSCHLAG, 1972. Amino acids transmitter En: Basic neurochemistry. Litle, Brown and Co. Boston. pág. 131.

ROSSOR N.M., 1982. Dementia. *Lancet* **II:** 1200-1204.

SPERO, L., 1982. Epilepsy. *Lancet* **II:** 1319-1322.

TAPIA, R.; H. PASANTES; M. PÉREZ-DE LA MORA; B.G. ORTEGA and G. MASSIUE-H., 1967. Free amino acids and glutamate decarboxilase activity in brain of mice during drug-induced convulsions. *Biochem. Pharmac.* **16:** 483-496.

VOGEL, H., 1978. Textbook of practical Organic Chemistry. 4th ed. Ed. Longman, London and N.Y. Pág. 1071, 1111-1112.

WALLACH, D.E., 1960. The inhibition of gamma aminobutyric alpha ketoglutaric acid transaminase *in vitro* and *in vivo* by amino oxyacetic acid. *Biochem. Pharmac.* **5:** 166-167.

Recibido para su publicación en mayo de 1992