

2 tomas d. d. t

577.1(04)

ESTUDIO QUIMICO DE LA  
GRASA DE CORAZON HUMANO

*Tesis para el examen profesional de  
Químico Farmacéutico Biólogo, que  
a la Escuela Nacional de Ciencias  
Químicas (U. N. A. M.), presenta*

**M<sup>o</sup> LUISA BARGALLO PORRERA**



QUIMICA

México, D. F.

Año 1948



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mis padres*

*A mi tío Miguel*

*A los maestros:*

*Ernesto Sodi Pallares, Dr. Sc.,  
que dirigió el presente trabajo,*

*y  
Rafael Illescas Frisbie, Quím. Téc.*

*A mis maestros de Ciencias Químicas*

*Agradezco al Instituto Nacional de Nutriología y a mis compañeras del Laboratorio del Hospital de Enfermedades de la Nutrición, su ayuda para la realización de este trabajo.*

# NOTA PRELIMINAR

- I. METABOLISMO DE  
LOS LIPIDOS
- II. METABOLISMO DE  
LA VITAMINA "A"  
Y CAROTENO BETA

# I. METABOLISMO DE LOS LIPIDOS

## DIGESTION Y ABSORCION

1. EMULSION E HIDEOLISIS **P**OR ser las grasas insolubles en el agua, sólo pueden ser absorbidas después de un proceso de transformación

a) *Acción de la lipasa gástrica*.—La lipasa gástrica, de escasa potencia, inicia en el estómago las transformaciones, con una ligera hidrólisis que libera ácidos grasos, éstos, al formar jabones, favorecen la emulsión en el intestino

Para algunos, no obstante, tratare más bien de una acción de la lipasa pancreática, que por refugio llega al estómago

En el intestino delgado se intensifican dichas transformaciones, cuya complejidad puede esquemáticamente reducirse a una *emulsión seguida de hidrólisis*, con producción de ácidos grasos y glicerol.

b) *Acciones de la bilis y de la lipasa pancreática*.—Las grasas son emulsionadas por la bilis, auxiliada por pequeñas cantidades de jabones. Gracias a su emulsión, las grasas pueden ser atacadas más fácilmente por las enzimas

Existen dos tipos fundamentales de enzimas lipolíticas: *lipasas y esteratasas*. Las primeras hidrolizan con facilidad las grasas verdaderas, con acción poco intensa sobre otros lípidos, las segundas, las hidrolizan en menor grado

Hemos de realzar aquí la acción de la bilis, por ser seguramente el factor más importante en la absorción de las grasas: no sólo emulsiona y activa la acción de la lipasa pancreática, sino que actúa como vehículo en la absorción de los ácidos grasos, y al parecer, como disolvente común de la grasa y de la lipasa (1).

## 2. TRANSFORMACIONES DE LOS ACHDOS GRASOS

Los ácidos grasos liberados en la hidrólisis sufren, luego, las transformaciones siguientes:

a) Los ácidos de cadena corta atraviesan directamente la mucosa intestinal; pero los de cadena larga sufren una transformación previa, siendo liberados de nuevo después de atravesada la mucosa.

En el proceso de transformación de los ácidos de cadena larga, se forman tres tipos de compuestos: 1°, combinaciones con ácidos biliares; 2°, ésteres del colesterol, y 3°, fosfatidos. Esta última combinación ha sido demostrada por los trabajos de Sinclair (3) y confirmada por los posteriores de Verzar y Lutz (4).

b) Los ácidos grasos quedan en libertad nuevamente, por acción de una lipasa.

Verzar y Kultry (5) creen que las sales biliares son sustancias hidrofóbicas adsorbidas en la superficie de la mucosidad de la mucosa intestinal y que favorecen el paso de los ácidos grasos y del colesterol.

Otras sustancias, como los fosfatidos, desempeñan en este respecto, papel análogo al de las sales biliares. Según estas ideas, la fosforilación de la grana en las células intestinales constituiría una etapa de la síntesis de las grasas.

3. GLICEROL. Es absorbido directamente.

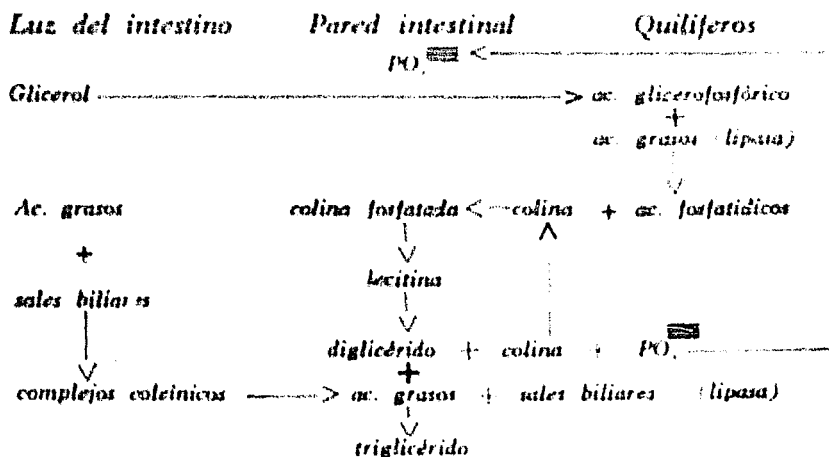
4. SÍNTESIS DE LAS GRASAS. Atravesada la mucosa, el glicerol y los ácidos grasos se sintetizan regenerando los glicéridos correspondientes.

Diversas teorías explican dicha síntesis:

a) Según Sinclair (3) puede ser expresada por

ácidos grasos + fosfolípidos → grasas neutras  
o sea, que al ser absorbidos los ácidos grasos o los jabones que pueden formarse, por las células epiteliales, reaccionan con los fosfolípidos, originando grasas neutras; el complejo ácido-base que resulta reacciona con nuevas cantidades de glicerol, formando nuevamente fosfolípidos.

b) El esquema adjunto muestra otro proceso análogo al anterior, pero que especifica en mayor grado sus fases:



Observemos que el glicerol (absorbido directamente) sufre esterificación con una molécula de ácido fosfórico; da así el ácido glicerofosfórico, y al esterificar sus dos oxhidrilos con los ácidos grasos libres, se producen ácidos fosfatidos, que se unen a la colina para dar lecitina. Por acción de una fosfatasa, pierde la lecitina el ácido fosfórico, y da glicéridos y colina; la cual reanuda el ciclo.

## TRANSPORTE, DEPOSITO Y UTILIZACION DE LAS GRASAS

1. ETAPA INICIAL Si ha sido absorbida excesiva cantidad de grasa, parte de ella permanece algún tiempo en las células intestinales, éstas, al parecer, acogen los productos de la hidrólisis, sintetizándolos en la forma expresada y almacenando las grasas producidas. Pero, en condiciones normales, las grasas una vez sintetizadas, mediante los linfocitos son conducidas por los vasos quilíferos al torrente sanguíneo.

2. FUNCION DEL HIGADO El hígado es un órgano fundamental en el metabolismo de las grasas: las *selecciona*, y también las *almacena* cuando le llegan del intestino en cantidades excesivas (\*). Actualmente, es bien conocido que el hígado es capaz de *betoxidar* los ácidos grasos elevados, con formación intermedia de cuerpos cetónicos (\*\*).

Antes se creía que el hígado "preparaba" la grasa aumentando el número de sus dobles ligaduras, para sufrir luego la oxidación. Los investigadores contemporáneos niegan la acción desaturadora del hígado. La función del hígado en esta primera etapa, como se ha dicho, sería por tanto, la de seleccionar los ácidos, más que la de transformarlos.

3. INTERVENCION DE LOS PULMONES Roger y Binet (y en general la escuela francesa), por investigaciones sobre la sangre de perro, antes y después de su paso por los pulmones, observaron una pérdida de lípidos; por consiguiente, una parte de lípidos es destruida por los pulmones.

Ha de advertirse, no obstante, que Markowitz y Mann (\*) afirman que no descubren cambio apreciable en los lípidos de la sangre, a su paso por los pulmones.

4. LOS LIPIDOS EN LOS TEJIDOS a) Los lípidos se encuentran habitualmente en los tejidos. Al parecer, los ácidos y la cantidad de grasa son variables según el tipo de músculo, el animal, e incluso el grado de actividad del músculo.



Ciertos investigadores (\*) afirman, sin embargo, que las grasas neutras de los diversos tejidos no presentan grandes diferencias entre sí. Klenk y Ditt, al determinar los ácidos grasos del corazón de lince encontraron valores muy semejantes a los correspondientes a las grasas neutras de otros órganos, conteniendo alrededor del 1% de ácidos grasos con más de diez átomos carbonos.

b) Hemos indicado ya la capacidad del hígado para oxidar ácidos grasos, produciendo cuerpos cetónicos, y como el hígado solo en parte puede metabolizar cetonas, dichos compuestos seguirán el curso del sistema sanguíneo hacia los tejidos periféricos que, como se sabe, son capaces de verificar una oxidación completa de las cetonas hasta anhídrido carbónico y agua, o bien la formación de ácidos.

Stadie cree que estas etapas hepáticas y extrahepáticas, no están aún definidas cuantitativamente. Sin embargo, parece que la mayoría de los investigadores no ponen en duda su existencia. Por consiguiente, el hígado no sería el único órgano capaz de betaoxidar directamente los ácidos grasos, también los tejidos extrahepáticos podrían realizar tanto su oxidación directa, como la de los cuerpos cetónicos.

El mecanismo de la oxidación de los ácidos grasos en dos etapas, hepática y extrahepática, puede explicar el metabolismo de la parte considerable de ácidos grasos que se degradan en tejidos extrahepáticos.

De lo anterior se deduce que las conclusiones se verifican de acuerdo con la teoría de la betaoxidación de Knoop, establecida originalmente en los C de precesos beta. Al respecto, es necesario citar la teoría de la omegaoxidación de Vredste en virtud de la cual se verificaría una primera oxidación en el último carbono de la cadena, originando un grupo carbonílico, produciéndose entonces, en etapas sucesivas, la betaoxidación.

En realidad no destruye la teoría anterior, sino que la complementa.

## 5. LOS LÍPIDOS EN EL MUSCULO CARIBAO

Harnet y otros investigadores (\*\*), utilizando el ácido beta hidroxibutírico, observaron: 1°, que desaparece de las preparaciones (corazón pulmón) del perro y la cabra; 2°, que la velocidad de la desaparición no está relacionada con el azúcar sanguíneo, y 3°, que un 82% del consumo total de oxígeno en la preparación puede ser debido a la combustión del beta hidroxibutirato, cuando su concentración en la sangre es aproximadamente de 100 mg.  $\frac{0}{100}$ .

Visscher y Mulder, partiendo del balance de glúcidos y de la medida del consumo de oxígeno establecieron que el 80% del metabolismo total se produce a expensas de sustancias ajenas a los glúcidos, deduciendo que tenía que producirse combustión de grasas.

## II. METABOLISMO DE LA VITAMINA "A" Y CAROTENO BETA

### 1. NORMAS GENERALES

teno beta.

**E**l metabolismo de la grasa rige al de las sustancias liposolubles; y por tanto, al de la vitamina A y al de la provitamina A o caroteno beta.

Las transformaciones de las vitaminas son bastantes conocidas en los peces, pero se conocen aún poco las que sufren en el cuerpo humano. En los peces se ha estudiado bien el proceso de transformación del caroteno en vitamina A. Pero, en los mamíferos, aunque se sabe que existe esa transformación, se desconocen sus etapas.

### 2. INTERVENCION DEL HIGADO

Se cree que la transformación del caroteno beta en vitamina A, se realiza en el hígado por acción de una enzima, la carotenasa; siendo la capacidad de esa transformación distinta en los diversos tipos y clases de animales, hasta el punto de que los animales carnívoros, al parecer, utilizan la vitamina A que acompaña a sus alimentos; sin que necesiten, por tanto, producirla (\*).

Los párrafos anteriores sobre intervención del corazón y de los órganos extrahepáticos en general, en el metabolismo de las grasas, sólo pretenden ser un esbozo de algunos de los aspectos principales que en la actualidad presenta dicho problema.

Hilditch, autoridad en la materia, en una obra del 1947 (10), cita sólo los trabajos de K. T. Turner sobre riñón (1931), los de Klenk y Ditt sobre el corazón del buey (1934), y los de Mc Artur sobre el tejido interno ateromatoso de la aorta humana (1942).

El conocimiento de la composición química de las grasas y sustancias liposolubles del músculo cardíaco, puede contribuir a esclarecer su metabolismo, cuestión repleta aún de dificultades y cuya trascendencia es indiscutible.



# ESTUDIO EXPERIMENTAL

- I. *DETERMINACION DE LOS CARACTERES FISICOQUIMICOS DE LA GRASA E IDENTIFICACION DE LOS ACIDOS*
- II. *DETERMINACION DE VITAMINAS*

# I. DETERMINACION DE LOS CARACTERES FISICOQUIMICOS DE LA GRASA E IDENTIFICACION DE LOS ACIDOS

## 1. PROCEDENCIA Y PREPARACION DEL MATERIAL.

SE utilizaron miocardios procedentes de las autopsias del Instituto Nacional de Cardiología.

El material, molido a máquina, fué secado en estufa de vacío.

El agua acompaña a todos los tejidos, especialmente a los grasos en los animales. Por tanto, en la extracción de los lípidos de un tejido, tendrá que recurrirse a la desecación del mismo, y al uso de disolventes no miscibles con el agua. Operaciones que requieren ciertos cuidados, por ser químicamente inestables la mayoría de los lípidos.

Los métodos de extracción utilizados primero, se basaban en secar en el aire el tejido, sometido a temperatura adecuada, y son defectuosos, porque los lípidos se oxidan, o sufren otros cambios químicos por la acción del calor o de ciertas enzimas, e incluso quedan englobados en una masa de proteína. Secando, no obstante, en una atmósfera de gas inerte, se evita la oxidación, pero no los efectos restantes.

La repetida congelación del tejido, seguida de desecación al vacío, se considera como excelente método, aunque poco seguido por sus dificultades técnicas. Otsu y Heki han sugerido una modificación de dicho método.

También se ha practicado la desecación mediante la acetona o el alcohol, procedimiento que tiene el inconveniente de que, por ser dichos líquidos disolventes de los lípidos, deben ser recuperados los lípidos disueltos.

El procedimiento de Javillier y Allaire (\*) elimina los cambios químicos enzimáticos, realizando simultáneamente la desecación y extracción con alcohol hirviendo. Tiene la desventaja de endurecer los tejidos, lo cual dificulta la extracción, y aunque se extraigan los lípidos, puede decirse inalterados, son arrastradas en cambio sustancias extrañas. (Pueden ser alteradas, no obstante, los lípidos más lábiles).

El procedimiento de Javillier y Allaire, aun con los reparos expuestos, al parecer es superior a los anteriormente citados, por tratarse de una extracción directa, sin secado previo, que permite la fácil penetración de los tejidos, separando los lípidos de restantes constituyentes celulares. No obstante, muchos investigadores prefieren el uso del alcohol en frío, a pesar de obrar con mas lentitud y menor rendimiento, porque aleja el peligro de que se descompongan los lípidos, nosotros probamos de utilizar el alcohol frío, renovándolo varias veces, pero al obtener un rendimiento muy bajo en grasa, nos decidimos por la desecación al vacío (temperatura de 10 a 15°).

## 2. EXTRACCION Y PURIFICACION

a) Se procedió con soxhlet y tetracloruro de carbono: la grasa quedó en libertad al eliminar el tetracloruro, por evaporación

al vacío.

Al estado de fusión, fué desodorizada en corriente de vapor de agua. Se sometió la grasa a una segunda extracción con sulfuro de carbono, y se eliminó el sulfuro, evaporando al vacío.

Cuando tratamos de eliminar el olor fuerte por calentamiento prolongado, obtuvimos una masa con mala consistencia, por causa de descomposición por influyo del calor y del aire, además de la probable existencia de aceites no saturados de mayor grado de insaturación que el ácido oleico.

Se obtuvo una grasa de color blanquecino.

Trabajando con otros aceites en la detección de vitaminas, logramos una pasta blanda, en vez de la blanda que se obtuvo en la extracción que aquí nos ocupa.

### 3. CARACTERES FÍSICOQUÍMICOS DE LA GRASA

Seguendo los métodos clásicos (11), obtuvieron los valores indicados en la Tabla 1.

TABLA 1

Peso específico	0.9381	Punto de fusión	17.5°C.
I. de refracción	1.4765	I. de índice	0.7
I. de solub. AlOH <sub>3</sub>	4.9	Número de Henschel	97
I. de saponificación	92.3	Número de los ácidos grasos	95.4
I. de Reichert Meissl	6.3	Número de acetilo	6.1
Punto de solidificación	5.2°C.	Insaponificable	1.96

### 4. SEPARACION DE LOS ACIDOS SOLIDOS Y LIQUIDOS

Se siguió el método de Boughman-Jamieson (12) (13), empleando 20 g. de grasa por vez, y cuatro extracciones sucesivas, en la forma siguiente:

1° Se saponificó la grasa con 50 cc. de solución de potasa en agua al 50% y se añadieron 300 cc. de alcohol, sometiéndola por dos horas a reflujo, calentando a b.m. Se dejó enfriar, se añadieron después 90 cc. de etanol y 400 cc. de agua, se hicieron cinco extracciones consecutivas, con un total de unos 800 cc. de éter de petróleo.

2° Los extractos etéros fueron lavados repetidamente, con agua, incorporando los líquidos acuosos a la solución de jabones. Se lavó la capa etérea con sulfato de sodio anhídrido y se filtró recuperando

el éter por destilación. El insaponificable fué secado en desecador de vacío, en presencia de pentóxido de fósforo, y se pesó.

3° La solución de jabones se descompuso con solución de ácido sulfúrico al 50%, extrayéndose los ácidos grasos liberados mediante tres extracciones con éter de petróleo. Dichos extractos etéreos se lavaron con agua, fueron secados con sulfato de sodio y se filtraron; recuperándose el éter por destilación. Los ácidos grasos obtenidos se secaron en desecador de vacío y se pesaron.

4° El total de ellos se disolvió en 90 cc de alcohol y 15 cc de agua, para transformarlos, de nuevo, en jabones de potasio al agregar solución acuosa de potasa al 15%, hasta obtener reacción débilmente alcalina, a la fenolftaleína. Esta solución se incorporó, poco a poco, a otra solución hirviente, formada por 72 g. de acetato neutro de plomo y 720 cc de agua, con pequeñas porciones de alcohol y agua caliente, y manteniendo el líquido plúmbico en continua agitación, se arrastraron las últimas porciones de solución jabonosa. A continuación, se sumergió el matraz en agua fría, sin dejar de agitar y durante 10 minutos, con lo cual el jabón de plomo se adhirió al fondo y paredes del matraz, quedando el líquido limpio.

5° Se decantó el líquido, lavóse el jabón tres veces consecutivas con 200 cc de agua caliente (70-80°), cada vez. Después de escurrir toda el agua, se enfrió bien y se separaron con papel filtro las gotas de agua que quedaron adheridas al jabón. Se agregaron 220 cc de éter. Se conectó el matraz a un refrigerante de reflujo; calentando suavemente a b.m. por 20 minutos sin dejar de agitar de vez en cuando. Se sumergió el matraz dos horas en agua fría (4-5°) y se filtró el éter; recogiendo el filtrado en un embudo separador y evitando, en lo posible, que cayese en el papel filtro la menor cantidad de jabón sin disolver. Se agregaron al matraz otros cc de éter; repitiéndose el calentamiento a b.m. y reflujo por 20 minutos. Se cerró el matraz y se sumergió en agua fría; simultáneamente se lavó el filtro con un poco de éter muy frío, que se dejó caer en el embudo de separación, reuniéndose así con la porción del líquido etéreo ya filtrado. Se separó el filtro en frasco bien tapado.

6° Se agregó al líquido etéreo del embudo separador, 150 cc de ácido clorhídrico al 20%, con lo cual se descompuso el jabón plúmbico de los ácidos líquidos. Se dejó en reposo, previa vigorosa agitación; y al aparecer un estrato limpio, formado por la solución etérea, se descartó el estrato subyacente y con él, el precipitado de cloruro de plomo formado en su seno. Se repitió el tratamiento

con 100 cc de ácido clorhídrico; secándose con sulfato de sodio anhidro la solución etérea, previamente lavada con agua destilada. Se recuperó el éter por destilación, eliminándose las últimas porciones del mismo por calentamiento a b.m. junto con corriente de dióxido de carbono seco.

7° Haciendo uso del papel filtro que se dejó en frasco bien tapado, recogimos el jabón plumbico de los ácidos sólidos que quedaron sin disolver en el matraz sumergido en el agua fría se lavó con éter bien frío, dejándose caer luego en un embudo separador, en el cual se agitó con éter y ácido clorhídrico, en la misma forma que se hizo para la separación de los ácidos líquidos.

8° Se destiló la solución etérea de los ácidos grasos sólidos, secándose el residuo con desecadores de vacío, en presencia de pentóxido de fósforo, pesándose luego. En esta forma se obtuvieron los ácidos grasos de un color blanquecino.

b) Se reunieron homogénea y cuantitativamente las respectivas fracciones de ácidos sólidos y líquidos obtenidas de las cuatro separaciones, teniendo para ello que fundir los sólidos.

De esta manera, obtuvimos los valores correspondientes a porcentajes de grasa, de ácidos grasos sólidos y de ácidos grasos líquidos. Procediendo después a la determinación de los índices de todo de los ácidos grasos.

c) Los valores obtenidos se exponen en la Tabla II.

TABLA II

Fracciones	% grasa	% ac grasos	Índice de I
Ácidos sólidos	97	114	16.1
Ácidos líquidos	86.7	88.1	101.2

Separar los ácidos grasos sólidos de los líquidos e identificar los ácidos contenidos en cada grupo, encierra ciertas dificultades, por causa del gran número de ácidos presentes, de su distinta solubilidad, de hallarse con frecuencia próximos en la serie homóloga, y por último, de la posible polimerización de los no saturados, lo mayor grado de desaturación. Dificulta des pues de manifestar, entre otros investigadores, por Brown en sus estudios sobre el ácido araquidónico<sup>10</sup> y por Kinsell y Small en sus trabajos sobre el ácido oleico<sup>11</sup>.

El método que hemos seguido en la separación se basa en la diferente solubilidad en el alcohol, de las sales de plomo de los ácidos. Debemos advertir que la separación resulta satisfactoria y suficiente para los fines de nuestro trabajo, aunque, en absoluto, no puede ser calificada de completa.

Resumimos que los ácidos sólidos son, generalmente, saturados, y los líquidos, no saturados.

**5. IDENTIFICACION DE  
LOS ACIDOS SOLIDOS**

a) *Fraccionamiento.*—1° Se disolvieron 5 g. de ácidos sólidos en 100 cc de alcohol de 90°, al b.m. Se enfrió la solución con hielo, filtrándose con filtro tarado de vidrio con fondo poroso. Se obtuvo, así, el ácido octo-oxiaráquico presente; habiéndose filtrado nuevamente para obtener una mejor separación. Se guardó aparte el filtrado, para posteriores determinaciones; lavándose el residuo con pequeñas porciones de alcohol de 90°, muy frío; secándose después, en desecador de vacío; y pesando, por último.

2° Se eliminó el alcohol del líquido filtrado; fueron esterificados los ácidos con 60 cc de alcohol metílico puro y 1 cc de ácido sulfúrico concentrado; sometiéndose a reflujo en b.m. durante 2 horas; con lo cual se obtuvo una esterificación bastante completa. Se eliminó la mitad del alcohol metílico de la solución resultante, por destilación a b.m., diluyendo después con agua, y extrayendo con éter metílico. Se agitó cuidadosamente la solución etérea tres veces consecutivas con solución acuosa al 0.5% de carbonato de potasio, eliminando así los ácidos no esterificados. Por último, se lavó con agua, y se secó con sulfato de sodio anhidro; filtrando y destilando luego, para recuperar el éter.

3° Los ésteres metílicos correspondientes que se formaron, fueron sometidos a destilación fraccionada, con elevación gradual de la temperatura de destilación, en una columna de destilación rellena de fragmentos de vidrio con dos termómetros colocados uno en la parte media de la columna y el otro en el tope. Así se recogieron dos fracción correspondientes a las siguientes temperaturas:

	<i>Temperatura marcada por el termómetro de la parte media.</i>	<i>Temperatura marcada por el termómetro del tope.</i>
<i>Fracción 1*</i>	202-214° C.	195-205° C.
<i>Fracción 2*</i>	214-235° C.	205-225° C.

4° Dichas fracciones se saponificaron por separado, con solución alcohólica de potasa. Los jabones formados fueron descompuestos con solución de ácido sulfúrico al 50%; extrayéndose con éter los ácidos grasos correspondientes. Se lavó la solución etérea con agua; se secó con sulfato de sodio anhidro, y se filtró; destilando después el éter. Así se obtuvieron los ácidos en libertad y dispuestos para ser identificados.

El fraccionamiento está basado en la destilación fraccionada de los ésteres de metilo

b) *Identificación de los ácidos palmítico y esteárico.*—Se tomaron



0.5 g. de cada uno de los ácidos anteriores. Fueron esterificados por separado, con alcohol metílico y ácido sulfúrico, y los ésteres transformados en hidrazidas. Después de recrystalizadas en alcohol, se determinó el punto de fusión de las mismas, con los siguientes resultados:

Hidrazida formada con las fracciones que destilaban a

195-205°C. punto de fusión 110°C.  
205-225°C. punto de fusión 113°C.

Valores que coinciden con los obtenidos por Curtis Dellachit, quien para la hidrazida del ácido palmítico, obtuvo un punto de fusión de 111°, y por J. Veruel, quien halló un valor de 114° para la hidrazida del ácido esteárico.

c) *Identificación del ácido octo-oxaraquico*. Se determinó el punto de fusión del residuo recogido en el filtro de fondo poroso 195°C.

Además, se observó que se presenta en forma de prismas rectangulares y que es fácilmente soluble en el agua.

Se obtuvo el correspondiente éster de metilo, para lo cual, el residuo fué esterificado con 4 cc de alcohol metílico y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrada, sometiéndose a refluxo durante dos horas. Se eliminó después el alcohol, a *ban.*, extrayéndose el residuo con éter etílico. Se lavó la colación éterea con solución acuosa al 0.5% de carbonato de potasio, y con agua destilada, secándose con sulfato de magnesio anhidro.

Evaporose después el éter, quedando en libertad una masa cuyo punto de fusión, que determinamos, 173°C, concuerda con el valor del punto de fusión del octo-oxaraquidato de metilo (172.5°C.)

#### 6. IDENTIFICACION DE LOS ACIDOS LIQUIDOS a) *Identificación del ácido oleico*—

Se basa en la transformación de este ácido en el 9-10 dihidroxisteárico, para lo cual se siguió la técnica de Robinson-Robinson<sup>(1)</sup>: 0.5 g. del ácido separado según la técnica de Moore<sup>(2)</sup> para la separación de los ácidos oleico y linoleico, se disolvieron en 50 cc de agua y 5 cc de solución acuosa de potasio al 10%, se añadieron 20 cc de agua y algunos pedazos de hielo. Una vez obtenida la temperatura de 10°C, se agregaron rápidamente, 40 cc de una solución acuosa de permanganato de potasio al 1%, neutralizándose el exceso, a los 5 minutos, con una solución de sulfito de sodio y 15 cc de ácido clorhídrico concentrado. Se obtuvo un precipitado blanco que, separado

por filtración, lavado con agua y secado al vacío, se recrystalizó en alcohol; obteniéndose unas láminas hexagonales cuyo punto de fusión resultó ser 131-132°C; valor que coincide con el obtenido por Robinson para este ácido, que es también de 132°C.

b) *Identificación del ácido linoleico.*—Se basa en la transformación de dicho ácido en 9-10-12-13 tetrabromoesteárico, para lo cual se tomó, aproximadamente, 1 g. del ácido obtenido de los líquidos madres de la solución de Moore, y se disolvió en 5 cc de tetracloruro de carbono; se añadió, en frío, una solución de bromo el 10% en tetracloruro de carbono, hasta obtener color rojizo persistente; después, se dejó una noche en reposo, eliminándose el exceso de bromo con solución acuosa de sulfito ácido de sodio. Se formó la capa correspondiente al tetracloruro de carbono, que fue separada, lavada con agua, y secada con sulfato de sodio anhidro. Se trató, después, con carbón animal; se filtró, y se eliminó el tetracloruro de carbono a b.m. Así se obtuvo un residuo pastoso que, tratado con 15 cc de éter de petróleo y enfriado con agua helada, separó un abundante precipitado cristalino, el cual después de filtración y lavado con éter de petróleo, dió un punto de fusión de 113°C; valor que corresponde al obtenido para el ácido 9-10-12-13 tetrabromoesteárico (114°-115°).

7. PORCENTAJES DE ESTERES QUE FORMAN LA GRASA      Se obtuvieron los valores indicados en la tabla siguiente:

TABLA 111

<i>Saturados</i>		
Palmitina	78 %	(Tripalmitato de glicerina)
Estearina	19 %	(Triestearato de glicerina)
octo octadecina	0.8 %	(Trioctadecanoato de glicerina)
<i>No saturados</i>		
Oleína	86.2%	(Trioleato de glicerina)
Linoleína	2.1%	(Trilinoleato de glicerina)

8. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE GRASA      a) De acuerdo con el método de W. J. Th. A. Krayenhoff Slood<sup>(29)</sup>:

1° Se pesaron en pesafiltro, 2 g. de músculo cardíaco, secado en un desecador con ácido sulfúrico, después de lo cual se pulverizó.

La extracción de la grasa por reflujo, duró una hora, y empleando como disolvente alcohol absoluto.

2° El extracto obtenido se recogió, previa filtración, en un matraz volumétrico de 50 cc aforando hasta la marca con alcohol. Se tomaron dos partes iguales de 20 cc, que fueron evaporadas y secadas. Consecutivamente, se llevó a cabo la oxidación, añadiendo 3 cc de solución N de dicromato de potasio y calentando a alta temperatura durante 15 minutos, se adicionaron 75 cc de agua destilada y 10 cc de solución de KI al 10%, y se tituló el exceso de dicromato de potasio por adición de 3-4 cc de HCl y titulación del yodo puesto en libertad, de acuerdo con la reacción  $K_2Cr_2O_7 + 6KI + 14HCl \rightarrow 8KCl + 2CrCl_3 + 3I_2 + 7H_2O$ , con bisulfato de sodio 0.1 N.

b) *Cálculos.*—Se gastaron 4.128 cc de bisulfato de sodio 0.1 N, que serán equivalentes, según la reacción anterior, a 4.128 cc de dicromato 0.1 N.

Si partimos de que 1 mg de grasa es oxidado por 2.45 cc de solución 0.1 N de ácido crómico, hallaremos la cantidad de la primera relacionando el dicromato gastado en la oxidación, con el ácido crómico; y teniendo en cuenta que fueron utilizados en la determinación 20 cc de los 50 en los cuales estaban contenidos 2 g. de grasa. Valores que llevados a % nos dan

$$\frac{30 \cdot 4.128}{2.45} = 10 \text{ mg de grasa en } 20 \text{ cc} \qquad \frac{10.5 \times 50 \times 100}{20 \times 2000} = 1.32\%$$

c) *Resultados.*—Operando en la misma forma para las otras determinaciones, se obtuvieron los valores:

Determinaciones	Porcentajes obtenidas	Porcentaje aceptado
1°	1.32	
2°	1.35	
3°	1.29	
4°	1.22	
		Promedio 1.29

9. CARACTERES FISICOQUÍMICOS DETERMINADOS. Con objeto de apreciarlos en conjunto, podemos hacer una fusión de las tablas I y II, agregando los demás valores determinados, obteniéndose así la Tabla IV.



# II. DETERMINACION DE VITAMINAS

## VITAMINA "A"

### 1. METODO **M**ETODO colorimétrico de Carr Price (10)

Basado en la coloración azul, que se desarrolla, y debida al efecto del cloruro de antimonio sobre el protéina, y cuya intensidad optica a 620m $\mu$  es función lineal de la concentración de la vitamina.

### 2. PREPARACION DE LA MUESTRA

Se hicieron tres tipos de determinaciones: sobre la grasa, sobre el músculo (estas últimas en seco y en fresco), y se procedió en la siguiente forma:

a) El material, molido a máquina y desecado en estufa de vacío, fué sometido a la extracción de la grasa, con Soxhlet y éter etílico, en la oscuridad y atmósfera inerte de una corriente de dióxido de carbono. La grasa quedó en libertad, al eliminar el éter por evaporación al vacío.

b) Se secó el músculo cardíaco en estufa de vacío. En un Waring Blender, mediante la adición a la masa de músculo, de un peso igual de alcohol de 95%, se procedió durante tres minutos a darle homogeneidad.

c) En forma análoga a la expuesta, se aplicó el Waring Blender a una cantidad, previamente pesada, del músculo fresco.

Las precauciones tomadas para evitar la oxidación a que los rayos ultra violeta destruyen la vitamina A y a evitar su oxidación por el aire. La vitamina A es estable al calor en una atmósfera inerte y también en soluciones alcalinas. En cambio no son estables sus preparaciones cristalinas (11).

### 3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION

Preparadas las muestras como antes se ha expuesto, se efectuaron las extracciones por duplicado y a partir de dos muestras de grasa, dos de músculo seco y otras dos de músculo fresco, siguiendo el procedimiento que a continuación se indica:

a) *Saponificación.*—A una cantidad pesada de muestra (Tabla V) se añadieron 10 cc de solución alcohólica de potasa N/2, calentándose hasta su clarificación, durante tres o cuatro minutos.

La vitamina A se encuentra en la fracción insaponificable de las grasas, junto con otras sustancias solubles, que interfieren con ella al ser determinada. Es preciso, por tanto, una cuidadosa purificación, especialmente cuando es escasa la potencia en vitamina. Para separarla, debe procederse primero a la saponificación, y luego a extraer la vitamina de la parte insaponificable (\*). Aunque, cuando se trata de un material de elevada potencia (más de 10,000 U.I. por g.), puede hacerse la extracción directamente, sin necesidad de saponificar.

b) *Extracción de la vitamina.*—Se añadieron a la muestra saponificada 15 cc de agua, transfiriéndose luego a un embudo de separación.\*

La mezcla de los extractos fue lavada con 20 cc de solución acuosa de potasa. A continuación se lavó con agua y sin agitar. Finalmente, se agitó previa adición de agua, con objeto de liberar del álcali a los lavados, habiéndose hecho, en total, nueve lavados. (En realidad, unos 5 lavados son suficientes).

Después del último lavado, con objeto de secar el éter, se agregó pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro, acompañando la operación de una ligera rotación.

El éter fue removido a un matraz de filtración al vacío. Se lavó el embudo de separación y sulfato de sodio, con otra porción de éter, que fue a su vez añadida al matraz anterior.

El éter se evaporó a sequedad, mediante succión. Las últimas trazas de agua y de éter remanentes, fueron separadas por inmersión del matraz en agua caliente, durante unos minutos. Hemos de advertir que como residuo final obtuvimos siempre una masa oleaginosa.

Luego, se disolvió el residuo en pequeñas porciones de cloroformo, en un matraz aforado, de 25 ó 50 cc (en proporción con el peso de la muestra).\*\*

El lavado con álcali, asegura la remoción de los jabones ácidos, que son solubles en éter. No obstante, este lavado es omitido por algunos investigadores.

Para evitar que se oxide la vitamina, la adición del cloroformo debe hacerse inmediatamente después de evaporado el éter.

4. LECTURA a) Se utilizó el fotocolorímetro Evelyn, con un *blank* conteniendo 1 cc de cloroformo y 9 de tricloruro de antimonio al 25%.

b) Se vertió en la celdilla 1 cc del problema (diluido a 25 cc ó 50, según el peso de la muestra utilizada), añadiéndose rápidamente,

\* En caso de haber sido la última extracción amarilla, debería haberse verificado otra extracción.

\*\* Cuando se emplea Evelyn, la dilución más adecuada es la que conduciría a la concentración de 7 a 15 U.I. por cc.

9 cc de tricoloruro de antimomo al 25% \*, mediante una pipeta, con tal inclinación que el líquido vacie en dos segundos. Se tomó como lectura, el valor más pequeño del galvanómetro en el cual la aguja se detiene por unos segundos (véase Tabla V).

c) Corrección por caroteno. Por haber dado la última dilución del tubo problema una coloración ligeramente amarilla, se aplicó la corrección en función del caroteno presente, que da también coloración azul con el tricoloruro de antimomo. Con tal objeto, se realizó sobre la misma dilución, una lectura con una densidad óptica de 440 mμ.

En estas condiciones, la DO corregida para la vitamina A nos la da la fórmula:

$$DO = DO - \frac{0.140 \times DO_{440}}{10}$$

### 5. CALCULOS

La lectura del galvanómetro fue convertida en densidad óptica, corrigiéndose ésta en función del caroteno presente. Haciendo uso de la curva standard \*\*, fueron determinadas las U.I. de vitamina A por cc de muestra, que llevados a %, nos dieron los valores expresados en la Tabla V.

## CAROTENO BETA O PROVITAMINA "A"

### 1. METODO Método cromatográfico (1), (2), (3).

Está fundado en la separación de los pigmentos carotenoides biológicamente activos, de los pigmentos carotenoides totales, mediante un adsorbente con afinidades diferentes para los distintos pigmentos. Se trata de un método basado en los principios de la cromatografía, o sea, en la adsorción diferencial en un proceso de contramovimiento del mismo modo que la destilación fraccionada es equivalente a millares de destilaciones ordinarias, la cromatografía con el ordinario movimiento del líquido a través del adsorbente y con el que se mantiene en constante equilibrio, equivale a una continua agitación del adsorbente seguida de filtración (4). Dicho método fue establecido por el botánico polaco Linnet, pero solo desde hace unos doce años, los químicos se aprovechan de su enorme eficiencia.

- \* La solución del tricoloruro de antimomo y el cloroformo usados deben ser anhidros. Además, si no es reciente, el color desaparece con excesiva rapidez.
- \*\* Factor de la curva standard 46.

2. PREPARACION DE LA MUESTRA      El músculo cardíaco fresco se homogenizó en licuadora.
3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION      Preparadas las muestras, las extracciones se efectuaron por duplicado y utilizando dos muestras de músculo fresco. He aquí el procedimiento seguido:

a) *Saponificación.*—A cantidades pesadas de muestra (Tabla V), se añadió 50 cc de solución alcohólica de potasa al 12%, y se calentaron durante 30 minutos.

b) *Extracción del caroteno.*—Ya saponificada y enfriada la muestra, se le adicionó 50 cc de éter de petróleo; transfiriéndose luego a un embudo de separación.

El residuo fué vertido en un mortero y mezclado con 15 cc de éter de petróleo, tantas veces como fué necesario para que el éter resultase incoloro (tres veces). Por último, los líquidos etéreos fueron reunidos en un embudo de separación. La mezcla de los extractos fué lavada suavemente con 100 cc de agua, desechándose ésta. Se dejó en reposo la capa de alcohol y agua y después fué sometida a extracción tres veces consecutivas con éter de petróleo, que fué incorporado a los extractos etéreos. Éstos fueron lavados de siete a ocho veces\* con 50 cc de agua destilada y llevados con nuevo éter de petróleo a un volumen de 100 cc (la dilución depende del grado de concentración del caroteno, baja en el caso que nos ocupa).

4. PURIFICACION      a) *Preparación de la columna.*—Como adsorbente se empleó celita y óxido de magnesio.\*\*

El tubo de adsorción fué conectado a un matraz de filtración al vacío y se obturó con lana de vidrio su extremo inferior. Conectando a la llave de vacío, se agregó el adsorbente necesario para obtener una columna de 2 cm de altura. Se comprimió el adsorbente y se hicieron nuevas adiciones del mismo, repitiendo la compresión,

\* El método original recomienda 2-3 lavados, pero en el Instituto de Nutriología observaron que eran insuficientes.

\*\* El método original utiliza fosfato dicálcico, recomendado por Moore (\*\*). Sin embargo, para evitar la probable destrucción de caroteno que ocasiona cierta clase de fosfato dicálcico, en el Instituto Nacional de Nutriología se emplea en su lugar óxido de magnesio y celita, según la adaptación al método hecha por el Laboratorio de Nutrición y Bioquímica, del Instituto de Tecnología de Massachusetts. (Comunicación personal del Dr. R. S. Harris).



hasta obtener una columna de 10 cm de altura.

En la cima de la columna se añadió una capa de 1 cm de altura de sulfato de sodio.

Se lavó la columna con unos 25 cc de éter de petróleo; desconectándose el vacío, se transfirió a un matraz limpio.

b) *Adsorción y "elución"*.—Se hizo pasar el problema a través de la columna; se lavó ésta con éter, cuidando de que no descendiesen las fajas de materias colorantes que son de caroteno. Se lavó la columna con el "eluyente" (acetona, éter), añadiéndolo en porciones sucesivas, continuándose los lavados hasta remover los pigmentos de la columna y obtención de un filtrado incoloro.

El filtrado se trasladó a un matraz volumétrico, aforando con "eluyente" hasta 25 cc.

5. LECTURA      Se utilizó el fotocolorímetro Evelyn, con un filtro de 440 m $\mu$ .
6. CALCULOS      Se convirtió la lectura en D.O. Esta, por medio de la curva standard\* se relacionó a  $\mu\text{g } \% \text{ g.}$  de muestra, que transformados a su vez, en U.I. nos da los valores expresados en la Tabla V.

---

\* Factor de la curva: 0.0659.

TABLA V

<i>Tipo de muestra</i>	<i>Peso de la muestra</i>	<i>Lectura</i>	<i>D.O.</i>	<i>D.O.<sub>c</sub></i>	<i>% Vit. A de la muestra en U.I.</i>	<i>% caroteno de la muestra en U.I.</i>	<i>% Vit A de la grasa en U.I.</i>	<i>% caroteno de la grasa en U.I.</i>
<i>Músculo seco</i>	3.228 g.	96 <sup>1</sup>	0.0166	0.01625	1,157		22,422	
<i>Músculo seco</i>	3.228 g.	96 <sup>2</sup>	0.0156	0.01560	1,112		21,550	
<i>Músculo fresco</i>	10 g.	96 <sup>3</sup>	0.0177	0.01712	199.2		15,502	
<i>Músculo fresco</i>	10 g.	96 <sup>4</sup>	0.0177	0.01712	199.2		15,502	
<i>Músculo fresco</i>	10 g.	87 <sup>1</sup>	0.568			583		45,213
<i>Músculo fresco</i>	10 g.	87 <sup>2</sup>	0.580			625		48,139
<i>Músculo fresco</i>	10 g.	87 <sup>3</sup>	0.568			583		45,213
<i>Músculo fresco</i>	10 g.	87 <sup>4</sup>	0.568			583		45,213

## CONCLUSIONES

1. *Cantidad de grasa del músculo cardíaco:* 1.3%
2. *Valores de las fracciones sólida y líquida de la grasa:*
  - a) *Acidos sólidos* 11.4%
  - b) *Acidos líquidos* 88.1%
3. *Indices de iodo de cada fracción:*
  - a) *Acidos sólidos* 16.1
  - b) *Acidos líquidos* 101.2
4. *Acidos grasos determinados y porcentajes:*

a) <i>Saturados:</i>	<i>% de glicérido</i>
<i>Acido palmítico</i>	7.8
<i>Acido esteárico</i>	1.9
<i>Acido octo-oxiaráquico</i>	0.8
b) <i>No saturados:</i>	
<i>Acido oleico</i>	86.2
<i>Acido linoleico</i>	2.1
5. *Cantidades de vitamina A y caroteno beta en 100 g. de grasa:*

a) <i>Vitamina A</i>	18,962 U.I.
b) <i>Caroteno beta</i>	45,213 U.I.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Peters, J. P. and D. D. Van Slyke. "Quantitative Clinical Chemistry Interpretations" (1946).
- (2) Sinclair, R. J.: *J. Biol. Chem.* (82) 117 (1929).
- (3) Bloor, W. R. "Biochemistry of Fatty Acids", págs. 227 y 91, (1943).
- (4) Leathes, J. B. and associates: *J. Physiol.* (38) 38 (1909).
- (5) Albert, L. Zehninger: *J. Biol. Chem.* (161) 131 (1946).
- (6) Markowitz and F. C. Mann: *Am. J. Physiol.* (93) 521 (1930).
- (7) Bloor, W. R.: *J. Biol. Chem.* 114, 639 (1936).
- (8) Barnes, R. H., E. M. Mackay, G. K. Mac and M. B. Wisscher: *Am. J. Physiol.* (123) 272 (1938).
- (9) Rosenberg, H. R.: "Chemistry and Physiology of the Vitamins" (1942).
- (10) Hilditch, T. P. "The Chemical Constitution of Natural Fats" (1947).
- (11) Osato, S. and M. Heki: *J. Biol. Chem.* (87) 541 (1931).
- (12) Villavecchia, V. *Química Analítica Aplicada* (1919).
- (13) Baughman, W. F. and G. S. Jamieson. *J. Agric. Res.* (26) 77 (1923).
- (14) Baughman, W. F. and G. S. Jamieson: *J. Am. Chem. Soc.* (42) 156 (1920).
- (15) Brown, J. B.: *J. Biol. Chem.* (83) 783 (1929).
- (16) Knauss, C. A. and J. G. J. Small: *J. Am. Chem. Soc.* (49) 2808 (1927).
- (17) Hartley, P.: *J. Physiol.* (38) 353 (1909).
- (18) Robinson Robinson: *J. Chem. Soc.* (127) 1029 (1925).

- (19) Moore, L. A.: *J. Soc. Chem. Ind.* (38) 320 (1919).
- (20) Krayenhoff Sloop W. I. Th. A.: *Acts Neerland Morphol.* (3) 406 (1939-1940).
- (21) Dam, W. J. and K. A. Evelyn: *Biochem. J.* (32) 1008 (1938).
- (22) The Association of Vitamin Chemists, Inc. "Methods of Vitamin Assay", págs. 20 y 29 (1947).
- (23) Oser B. L. Melnick, D. Padesr. *Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed.* (15) 717 (1943).
- (24) Fraps et al. "J.A.O.A.C." (24) 743 (1941).
- (25) Fraps et al. "J.A.O.A.C." (25) 92 (1942).
- (26) Peterson and Huges. "J.A.O.A.C." (22) 79 (1939).
- (27) Martin, A. J. P.: *Endeavour*, (21) 21-28 (1947).
- (28) Moore, L. A.: *Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed.* (12) 726 (1940).