

45

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AZUFRE EN LIPIDOS ANIMALES

T E S I S .

CARLOS RAMON GARCIA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 7 0 .



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.

JURADO ORIGINALMENTE ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE:	Prof. FRANCISCO GIRAL GONALEZ
VOCAL:	" FRANCISCO SANCHEZ VIESCA
SECRETARIO:	" OFELIA ESPEJO DE OCHOA
1er. SUPLENTE:	" BERTHA SOTO DE VILLATORO
2do. SUPLENTE:	" MA. DEL SOCORRO SALAS T.

TEMA DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE
FITOQUIMICA DE LA FACULTAD DE QUIMICA. UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

SUSTENTANTE:	CARLOS RAMON GARCIA
ASESOR DEL TEMA:	DR. FRANCISCO GIRAL GONZALEZ
SUPERVISOR TECNICO:	DRA. OFELIA ESPEJO DE OCHOA.

I N D I C E .

I.- INTRODUCCION.*

1.- Generalidades.

2.- Composición de Lípidos de Insectos.

3.- Azufre en Lípidos Animales.

4.- Discusión.

II.- PARTE EXPERIMENTAL.

III.- DISCUSION DE RESULTADOS

Y CONCLUSIONES

IV.- BIBLIOGRAFIA.

GENERALIDADES

LIPIDOS.-

Extenso grupo de productos naturales, vegetales o animales, caracterizados por ser ésteres de ácidos grasos superiores; pueden encontrarse esterificados por glicerol, en cuyo caso reciben el nombre de grasas o glicéridos, o bien, esterificados por otros alcoholes (alifáticos superiores o esteroides), y entonces se denominan ceras. También forman parte de este grupo otras sustancias de origen biológico, que son solubles en disolventes orgánicos, pero insolubles, o muy ligeramente solubles, en agua. (21).

Como aceites y grasas neutras entendemos ésteres formados de glicerol y ácidos grasos saturados o insaturados; se utiliza el término grasa para aquellos que se presentan en estado sólido a temperatura ambiente, y aceite para aquellos que son líquidos.

Los lípidos pueden considerarse como:

1.- Lípidos simples.- Son compuestos formados únicamente por: C,H,O. Pueden ser:

- a) Glicéridos.
- b) Ceras.

2.- Lípidos complejos.- Son compuestos formados por C, H, O, con otros elementos o radicales. -- Pueden ser:

c) Fosfolípidos.

d) Cerebrósidos.

1.- Lípidos simples.

a) Glicéridos.

Triglicéridos simples.- Se denomina así a -- las grasas en las cuales el glicerol se encuentra este rificado totalmente por un mismo ácido graso. Casi no se encuentran en la naturaleza. Ejemplos de triglicéridos simples son la tripalmitina y la triesterina, de los ácidos palmítico y esteárico, respectivamente.

Triglicéridos mixtos.- Son aquellas grasas - en las cuales dos o tres ácidos grasos diferentes son los que esterifican al glicerol; en el primer caso se presentan dos isómeros, y en el segundo, tres, evidentemente dependiendo de las posiciones que ocupen los - diferentes ácidos en la molécula. Estos glicéridos -- son los que se encuentran casi siempre en la naturaleza.

Los triglicéridos son sólidos o líquidos se-- gún sean los ácidos grasos que los integran. La mayor parte de los aceites vegetales son líquidos porque --

tienen gran proporción de ácidos grasos insaturados, tales como ácido oleico, linoleico o linolénico, de punto de fusión muy bajo, mientras que los derivados animales generalmente son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente, por tener en su composición una proporción elevada de ácidos grasos saturados. (16).

La Tabla I reúne datos de algunos ácidos grasos, saturados e insaturados. (14).

Tabla I.

Saturados:

Acido	Núm. de átomos de C.	Fórmula	P.F. (° C).	P.EB. (° C).	P.EB. Ester metílico (° C).
Butírico	4	$CH_3(CH_2)_2COOH$	-4.7	163	102
Valerianico	5	$(CH_3)_2CHCH_2COOH$	-51	174	117
Caprónico	6	$CH_3(CH_2)_4COOH$	-1.5	205	150
Caprílico	8	$CH_3(CH_2)_6COOH$	16.5	257	194
Caprínico	10	$CH_3(CH_2)_8COOH$	31.5	269	224
Láurico	12	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	43.6	102°/1mm	87°/1mm
Mirístico	14	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	58	122°/1mm	111°/1mm
Palmitico	16	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	62.9	139°/1mm	130°/1mm
Estearico	18	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	69.9	160°/1mm	154°/1mm
Aráquico	20	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	75.2	205°/1mm	180°/1mm
Behénico	22	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	80.2	262°/15mm	225°/5mm
Lignocérico	24	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	84.2		
Carótico	26	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$	87.7		

Acido	Átomos de C.	Fórmula	P.F.	P.EB.	P.EB. Ester metílico
$\Delta^{9,10}$ -Decilénico	10	$\text{CH}_2 = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$		142°/4 mm	116°/12 mm.
Estilíngico	10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4 \text{CH} = \text{CHCH} = \text{CHCOOH}$ (cis, trans).			
$\Delta^{9,10}$ -Dodeciléxico	12	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$			90°/1 mm
Miristoleico	14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$			109°/1 mm
Palmitoleico	16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$			135°/1 mm
Oleico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$ (cis).	13, 16°	252°/15 mm	150°/1 mm
Petroselinico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10} \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_4 \text{COOH}$ (cis).	30°		150°/1 mm
Vaccínico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_9 \text{COOH}$ (cis y trans).	39°		
Ricinoleico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5 \text{CHOHCH}_2 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$ (cis)	50°		
Linólico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4 \text{CH} = \text{CHCH}_2 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	-5°	228°/14 mm	155°/1 mm
Linoléxico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2 \text{CH} = \text{CH})_2(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	-11°		155°/1 mm
Eleostearico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9(\text{CH} = \text{CH})_2(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$ (cis, trans, trans)	49°	235°/12 mm	
Licanico	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH} = \text{CH})_2(\text{CH}_2)_7 \text{CO(CH}_2)_2 \text{COOH}$	75°		
Parinárico	18	$\text{CH}_3 \text{CH}_2(\text{CH} = \text{CH})_4(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	86°		
Taririco	18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7 \text{C} \equiv \text{C}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	52°		
Gadoleico	20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	25°		160°/1 mm.
Araquidónico	20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH} = \text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$		160°/1 mm	
Octoleico	22	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_9 \text{COOH}$			170°/1 mm
Erúxico	22	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_{11} \text{COOH}$ (cis)	33.5°	264°/15 mm	
Salicoleico	24	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7 \text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_{13} \text{COOH}$ (cis)	39°		

Tabla I: Insaturados-

Mono y Diglicéridos.- Son compuestos en los cuales el glicerol se encuentra parcialmente esterificado, y contienen, por ello, una o dos fracciones ácido, las cuales tienden a emigrar hacia los extremos de la molécula, ya que así tienen mayor estabilidad.

En tejidos animales y vegetales se encuentran cantidades apreciables de diglicéridos, y probablemente también de monoglicéridos, como resultado de la acción enzimática sobre sus grasas, las cuales sufren una hidrólisis considerable.

b) Ceras.

Las ceras son ésteres formados por alcoholes complejos de la serie de los esteroides, o alcoholes alifáticos superiores de número par de átomos de Carbono, comprendidos entre C_{16} y C_{36} , y ácidos grasos de número par de átomos de Carbono, y de peso molecular superior al de los ácidos que forman las grasas; los ácidos más frecuentes entre las ceras son los comprendidos entre C_{24} y C_{36} .

2.- Lípidos complejos.

c) Fosfolípidos.- Son ésteres de glicerol y ácidos grasos superiores, que contienen en su molécula ácido fosfórico y además una base nitrogenada. Se han encontrado tres tipos de fosfolípidos:

c¹): Lecitinas.- Son los fosfolípidos que -

Tabla II.-

Fosfolipido	Acido Graso	Base	Nombre
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OCOR}_1 \\ \\ \text{CHOCOR}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \text{fosfatidilcolina} \end{array}$	Oleico y Palmitico	Colina	Lecitina
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OCOR}_1 \\ \\ \text{CHOCOR}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3 \\ \text{fosfatidiletanolamina} \end{array}$	Oleico y Palmitico	Aminoetanol	Cefalina
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OCOR}_1 \\ \\ \text{CHOCOR}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{N}^+\text{H}_3 \\ \text{fosfatidilserina} \end{array}$	Oleico y Palmitico	Serina	Cefalina
$\begin{array}{c} \alpha \text{ CH}_2\text{OCH}=\text{CHR}_1 \\ \beta \text{ CHOCOR}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3 \\ \text{fosfatidiletanolamina} \end{array}$	Palmitil y α : éter insat. β : ác. linoleico	Aminoetanol	Plasmalógeno
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{R}_1 \\ \\ \text{CHOCOR}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3 \\ \text{fosfolipido-1-alcóxido} \end{array}$	Probablemente: ác. grasos insaturados	Aminoetanol	α -éter glicérico
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OCOR}_1 \\ \\ \text{CHOCOR}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_5 \\ \text{fosfatidilinositol} \end{array}$	Palmitico, esteárico araquidónico	meso-inositol en lugar de base	inositol fosfolipido
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OCOR}_1 \quad \text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CHOCOR}_2 \quad \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \text{fosfatidilglicerol} \end{array}$	Acidos grasos poliinsatura- dos.	Glicerol en lugar de base	-
$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{R} \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \end{array}$	Acidos grasos superiores	colina	Esfingo- mielina

COMPOSICION DE LIPIDOS DE INSECTOS.-

Se han hecho numerosos estudios de los lípidos extraídos por disolventes orgánicos, del cuerpo total de insectos, y aunque la cantidad de especies cubiertas no es muy grande, aparentemente hay una gran variación en su composición química. Quizá esto deba esperarse en vista de la amplitud de hábitos alimenticios y del medio ambiente al cual se han adaptado los insectos.

Glicéridos.- Comúnmente los lípidos de reserva de los animales se encuentran en forma de glicéridos neutros. Esto resulta cierto para algunos insectos, pero se ha visto que lípidos extraídos de muchas especies contienen una proporción muy elevada de ácidos grasos libres. En varios casos se ha encontrado ausencia de glicéridos, o bien, presencia únicamente en cantidades muy pequeñas. (11).

La composición en ácidos grasos de lípidos de reserva de insectos, varía considerablemente de especie a especie. En casi todos los lípidos animales, los ácidos predominantes son el palmítico y el esteárico, miembros saturados de C_{16} y C_{18} y el ácido oleico, insaturado de C_{18} con un doble enlace; la mayoría de los lípidos vegetales son menos saturados e incluyen ácidos poliinsaturados. Entre los insectos hay muchas especies

en las cuales la composición en ácidos grasos es semejante a la de los animales, pero el campo total de variación es muy amplio, desde lípidos que contienen casi exclusivamente ácidos grasos saturados, hasta aquellos en los que el grado de insaturación es tan elevado como en cualquier aceite vegetal.

En la Tabla III aparece la composición en ácidos grasos de lípidos de algunos insectos. (5).

Lípidos complejos.- Se considera que los fosfolípidos son las formas metabólicamente activas de las grasas, encontrándose en todas las células, mientras que los glicéridos simples son característicos de los lípidos de reserva, relativamente inertes.

Se han identificado fosfolípidos de lecitina en lípidos de insectos adultos del escarabajo de la papa de Colorado. Se ha reportado que los fosfolípidos constituyen sólo el 0.2 a 0.4% de la grasa total extraída del gusano de la remolacha de azúcar. En lípidos de *Drosophila*, (34), se ha identificado fosfolípidos que contienen inositol, colina, etanolamina y serina, así como plasmalógenos y cerebrósidos.

Ceras.- La mayoría de los insectos producen ceras, por lo menos en pequeñas cantidades, siendo su función principal la impermeabilización de la cutícula.

Algunos insectos las producen en gran cantidad, que es colectada y utilizada por el hombre con fines industriales; de éstas, las más importantes son la cera de abeja y la cera resinosa del insecto de laca.

Debido a la dificultad de separar miembros de series de homólogos de parafinas, alcoholes y ácidos, - hay poca certeza con respecto a la composición química de ceras de insectos.

La cera de abeja del comercio contiene todos los isómeros de alcoholes primarios de C_{24} a C_{34} y los ácidos correspondientes, así como series de parafinas - entre C_{25} a C_{31} . Otras ceras contienen alcoholes de -- C_{24} a C_{30} , ácidos de C_{24} a C_{34} y parafinas de C_{27} a C_{31} . La cera resinosa del insecto de laca, contiene alcoholes de C_{26} a C_{34} y sus ésteres con ácidos grasos de C_{30} a C_{34} . También se han identificado cetoalcoholes y cetoácidos de C_{30} a C_{34} , en ceras de diversas familias de insectos. Aunque se ha reportado positiva una prueba - histoquímica para esteroides en la cutícula de un insecto, no se ha encontrado hechas de esteroides en ningún - análisis químico de ceras de insectos. (2).

Derivados de hidrocarburos alifáticos.- Se han identificado químicamente varios derivados de ácidos -- grasos, alcoholes y parafinas de cadena recta, que tie-

nen ciertas funciones específicas en la biología de los insectos, producidos por las glándulas ectodérmicas.

Así, tenemos el trans - Δ^2 hexenaldehído, secreción olorosa de cierta especie de cucaracha, que se supone tiene acción repelente para predadores. En la secreción de la chinche tropical de agua, se ha identificado el acetato correspondiente.

También ha sido caracterizada la 2-metil-4-heptanona, responsable del olor y acción insecticida de la secreción de la glándula anal de un tipo de hormiga, (23).

A continuación se dá una lista de algunas sustancias lipídicas, encontradas en secreciones de glándulas ectodérmicas de diversas familias de insectos, (6).

-Undecano.

-12-tridecanona.

- β (4,8 dimetil-3,7 nonadienil)-furano. (Con efecto tóxico para varias especies de hormigas).

-Acido 10-hidroxi- Δ^2 -decenoico. (Con propiedades antibióticas).

-Hexadeca-10,12 dienol. (Atrayente sexual para algunos insectos).

- Acetato de trans-2-hexenilo. (Con olor parecido al de canela, utilizado en Asia como saborizante de alimentos).
- 2 metil-2 heptén-6 ona. (Secreción "rastros").
- 4 metil-2 hexanona. (Secreción "rastros").
- Acido trans-9 ceto-2 decenoico. ("Sustancia reina").

Terpenoides.- Los insectos sintetizan varios compuestos terpenoides, algunos con propiedades altamente tóxicas para otros animales.

Los terpenoides más sencillos aislados de extractos de insectos son el geraniol y el citral, responsables del olor de sus secreciones glandulares.

Parece ser que por lo menos una de las funciones de los terpenoides producidos por insectos, es la defensa contra otros animales, y puede ser significativo el hecho que algunos de los compuestos extraídos de plantas y utilizados por el hombre para combatir insectos, pertenezcan a este grupo químico.

A continuación se citan terpenoides aislados de extractos de insectos o de sus secreciones:

- Iridodial: con propiedades tóxicas y una gran tendencia a polimerizarse al contacto con el aire, dando una secreción pastosa adherente.

- Dolico dial: con propiedades tóxicas.
- Iridomirmecina: con acción bactericida pronunciada.
- Limoneno: No se conoce su función en insectos.
- Citronelal: posiblemente con acción insecticida.
- Dendrolasina: tóxico para algunas hormigas.
- α y β Pineno: presentes en secreciones de defensa.
- Cantaridina: vesicante y diurético, refutado como afrodisíaco.

En la Tabla IV aparecen las estructuras de estos compuestos. (6).

En lípidos de insectos es común encontrar varios tipos de compuestos que provienen de su dieta alimenticia. Entre estos tenemos a los esteroides. El --colesterol se encuentra en las células de los insectos, asociado con complejos proteína-fosfolípido, formando parte de la organización estructural de la célula; también se ha encontrado β -sitosterol, ergosterol y algunos otros esteroides derivados de estos. Han sido encontrados carotenoides (α y β carotenos, retineno₁),

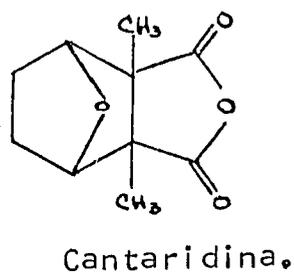
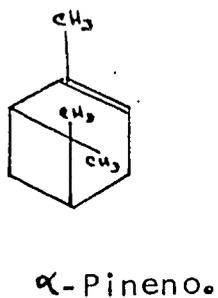
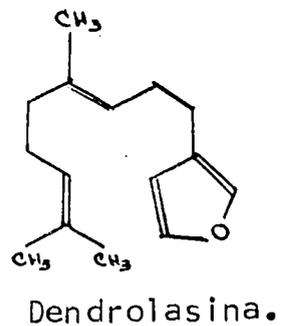
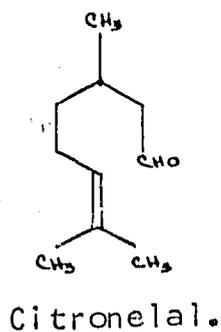
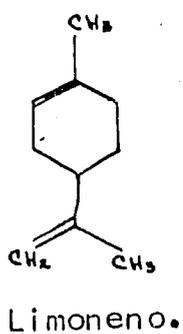
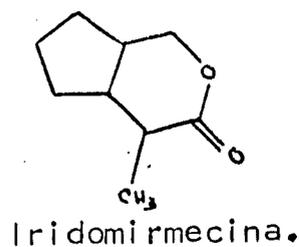
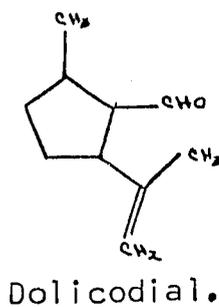
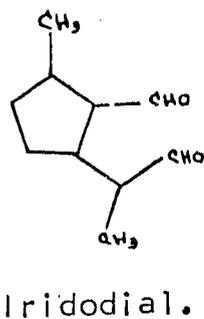
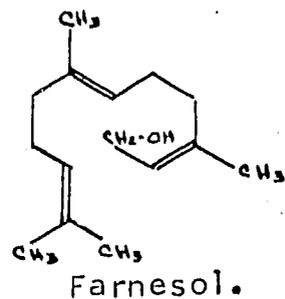
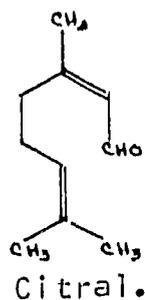
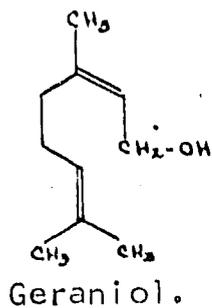
que generalmente están conjugados con proteínas y otros pigmentos derivados de las plantas anfitrión, (antraquinonas, antocianinas, flavonas, etc.) (6).

Tabla III.- Composición en ácidos grasos de lípidos de algunos insectos.

Ácidos Grasos	LEPIDOPTERA			COLEOPTERA			ORTHOPTERA		
	Bombyx mori	Acentropana hesperaris	Carpocapsa pomonella	Homostigma streptalis	Tenebrio molitor	Mylabris pustulata	Rachymerus dacrys	Sphananom purpurascens	Melanoplus atlantis
SATURADOS:									
C ₁₂							24		
C ₁₄							21	29	
C ₁₆	20	50	12	25	25	15	8	14.8	7.3
C ₁₈	4	4			25	32		11.4	12.2
C ₂₀	<1								2.8
C ₂₂									
INSATURADOS:									
C ₁₆	2							9.6 (-2.4)	4.1 (-2.4)
C ₁₈	75 (-3.8)	66 (-2.6)	88 (-2.6)	75 (-2.8)	77 (-2.8)	54 (-2.4)	47 (-2.2)	55 (-2.9)	29.9 (-2.8)
C ₂₀						1 (-0.8)		25.8 (-4.7)	38.4 (-3.8)
C ₂₂	1-2								5.3 (-3.7)

Los números en paréntesis se refieren al grado de insaturación de los ácidos.

TABLA IV.- Terpenoides de Insectos.



AZUFRE EN LÍPIDOS ANIMALES.-

En el estudio de los lípidos resulta interesante la presencia de azufre. En repetidas ocasiones se han aislado compuestos que contienen azufre de extractos lipídicos, los cuales han sido caracterizados químicamente como: sulfolípidos sencillos y conjugados, sulfatos de bases nitrogenadas, sulfonas y sulfóxidos.

En 1912, (18), Levene aisló un sulfolípidio sencillo, de extractos de cerebro de res; en 1936, Reichstein, (25), aisló una sustancia con azufre del extracto crudo de glándulas suprarrenales de res, que después, (26), identificó como sulfóxido de tiodiglicol, llegando a la conclusión de que este derivado del tiodiglicol se encuentra esterificado con ácidos grasos superiores. Woolley y Peterson, en 1937, aislaron el sulfato cíclico de colina del extracto acetónico de micelios de un hongo, (33); Pfiffner y North, en 1940, encontraron un compuesto con azufre en extractos de glándulas suprarrenales frescas de res, que resultó ser dimetil sulfona, (24); ese mismo año, Ruzicka et. al, aislaron dimetil sulfona a partir del extracto acetónico de sangre de res, (27). En 1941, F. Giral, (7), reportó por vez primera la presencia de azufre en el aceite de un insecto,

(*Taeniopoda auricornis*, Catantopidae, Acridioidea), con la particularidad de presentar acción tóxica dicho extracto; observó que la toxicidad presentada -- fué proporcional al contenido de azufre. J. Giral, -- et al, reportaron en 1943 y 1946, (8-11), presencia de azufre tóxico en el aceite de otro insecto, (*Melanoplus atlantis*, Catantopidae, Acridioidea) y ausencia del mismo en *Sphenarium purpurascens*, insecto -- también Acridioidea pero de familia diferente. En 1954 F. Giral (12), sugirió que tal compuesto con -- azufre, tóxico, parecía ser un éster neutro de ácido sulfúrico y alcoholes de peso molecular elevado, reportó negativos los sondeos en insectos Lepidópteros, Coleópteros y Hemípteros, sus datos parecen indicar que tal compuesto es específico de la familia Catantopidae de los Acridioidea, (Ortópteros).

De 1954 hasta la fecha no aparece en la literatura ninguna publicación más acerca de azufre en lípidos de insectos.

Posteriormente varios investigadores, por separado, estudiaron extractos lipídicos de cerebros humano y de rata y han reportado separación y caracterización de sulfolípidos semejantes al cerebrón-sulfolípidos.

En 1963, Stoffyn y Stoffyn, (30), publicaron evidencias de que los sulfolípidos son ésteres sulfúricos de cerebrósidos, generalmente con el grupo sulfato unido en la posición 3 de la fracción galactopiranosido.

También en 1963, Martensson, (20), describió la separación de sulfolípidos en riñon humano; R. Soper encontró sulfolípidos en cerebro y otros tejidos, de rata, ratón, buey, lagarto verde, lipovitelina de huevo de gallina, huevos de varios animales marinos y hongos, (29).

D I S C U S I O N .

El problema de la presencia de azufre tóxico en lípidos de insectos, presenta varios aspectos diferentes. Desde el punto de vista químico, es de interés el aislamiento y la caracterización de tal o tales compuestos con azufre; para los entomólogos, el estudio se centra en la especificidad de su presencia y su significación filogenética. El conocimiento del origen y la función de dicho compuesto, contribuiría al campo de la bioquímica de los insectos; y, además, el estudio detallado de la acción tóxica del compuesto, resulta sumamente interesante para el investigador en farmacología.

En 1954, (12), se reportó que la grasa de *Schistocerca paranensis* (langosta emigrante americana), contenía azufre; se advertía que su estudio sería interesante, dada la relativa facilidad de adquirir materia prima.

De la Secretaría Nacional de Agricultura se recibió un envío de este insecto, en cantidades apreciables. Ensayos cualitativos para azufre, en la grasa extraída con hexano, del cuerpo total de los insectos, han resultado positivos. Se presenta, pues, la oportunidad de hacer un estudio más detallado en lo -

que concierne al azufre.

Concientes de la importancia que reviste la investigación del azufre tóxico, se ha realizado un estudio comparativo de varios métodos para determinación de azufre en la grasa, con objeto de contar con aquel más idóneo, para las valoraciones necesarias - en el estudio experimental del problema.

Ha sido propósito de esta tesis aportar nuevos datos que contribuyan al estudio de tal compuesto, orientados hacia el aislamiento e identificación del mismo, así como referentes a sus interesantísimas propiedades tóxicas.

P A R T E E X P E R I M E N T A L .

La grasa utilizada para este trabajo se extrajo del cuerpo total de langosta emigrante americana, cuyo nombre científico es: Schistocerca paranensis. Estos insectos fueron recolectados en la región de Mérida, Yucatán, y enviados por la Secretaría Nacional de Agricultura.

1.- TRATAMIENTO PREVIO.

Los insectos fueron sumergidos en gasolina blanca para matarlos y evitar su descomposición. Se recibieron 51.1 kg. de insectos secos.

2.- EXTRACCION.

A).- El método empleado fué de extracción por medio de disolventes. Este método es más eficaz cuando se desea hacer una extracción total, o casi total, de la materia grasa.

Para hacer la extracción se utilizó hexano; los pasos realizados fueron los siguientes:

Los insectos secos y pesados fueron colocados en un recipiente adecuado, se agregaron 60 litros de hexano puro hasta cubrir totalmente el material y tener un exceso de disolvente; se agitó a fin de asegurarse que todos los insectos estuviesen en contacto con el disolvente. Se dejó reposar durante tres días y se decantó la parte superior que se repuso con 60

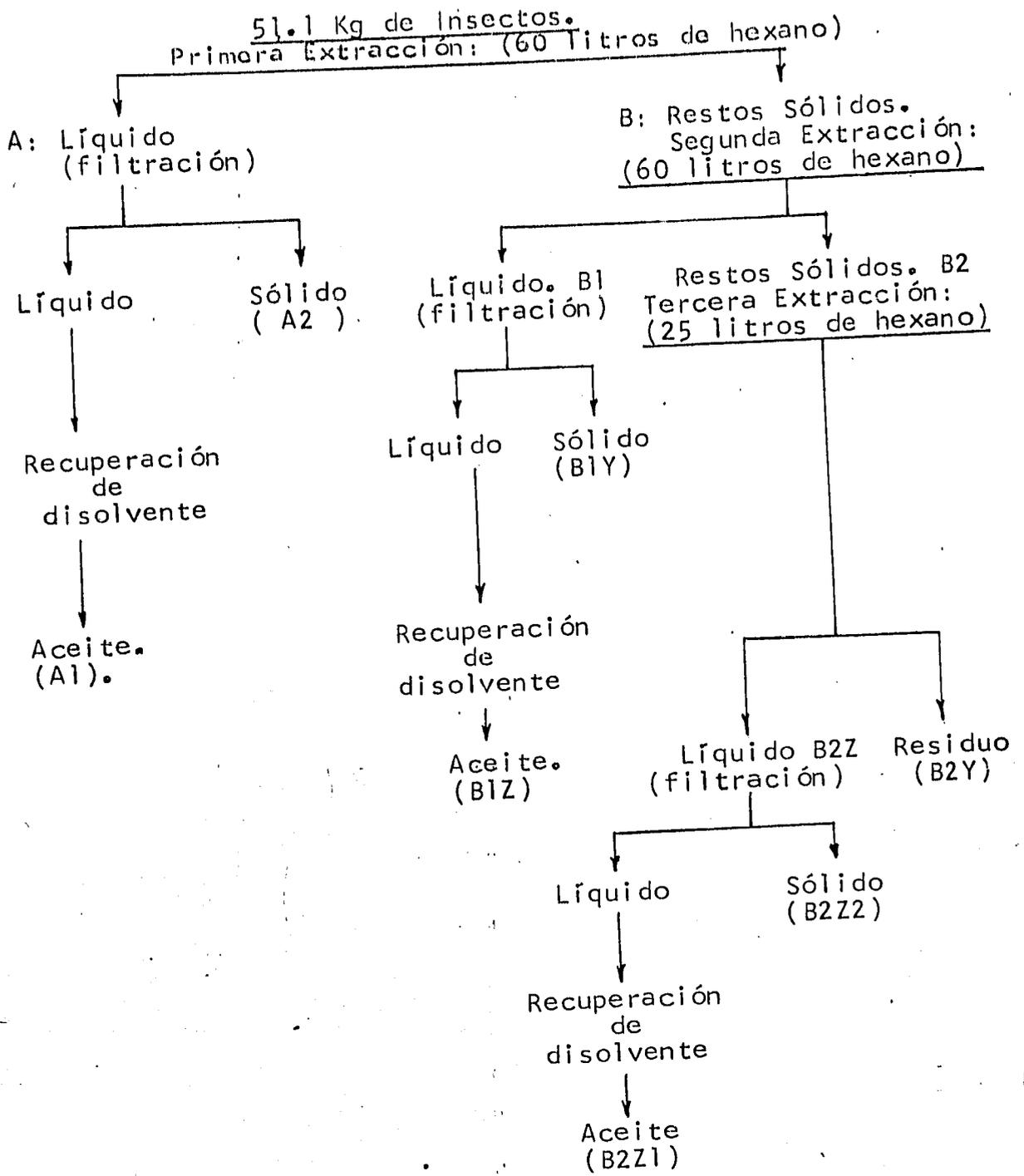
litros de hexano puro. El líquido decantado se filtró, obteniéndose un sólido de color café oscuro, y del filtrado se recuperó el disolvente por destilación a B.M. para separar la grasa libre. Esta serie de operaciones se repitió una y otra vez hasta agotamiento de los insectos, lo cual se comprueba de la siguiente manera: en el extremo de un papel filtro se coloca una gota del disolvente puro, el cual no deja huella al evaporarse; la gota puesta después de la primera y segunda extracción deja un residuo de grasa, pero después de una extracción más, en pruebas realizadas posteriormente, la gota no deja huella, con lo cual se comprobó que los insectos estaban agotados.

Se reunieron las porciones obtenidas de la primera y segunda extracción, recuperándose el disolvente por destilación a vacío, con baño de agua a temperatura constante de 80°C. Lo mismo fué hecho para el extracto obtenido de la tercera extracción. Posteriormente se separó el resto del disolvente que aún tenía la grasa, mediante una destilación a presión reducida de 0.05 mm de Hg, con baño de agua a temperatura constante de 90°C.

Tanto el aceite como el sólido obtenidos fue-

ron colocados en un desecador de vacío, utilizando -
presión reducida hasta lograr peso constante y poder
determinar el rendimiento obtenido, así como para --
una mejor conservación de la grasa.

B).- ESQUEMA DE EXTRACCION.



C).- RESULTADOS DE LA EXTRACCION.

Primera y Segunda extracción:

Aceite (A1 + B1Z): 2,202.6 g.

Sólido (A2 + B1Y): 89.0 g.

Tercera extracción:

Aceite (B2Z1): 248.0 g.

Sólido (B2Z2): 21.0 g.

% de aceite en peso (A1+B1Z+B2Z1)= 4.76%

% de sólido en peso (A2+B2Z2)= 0.21%

% Total extraído= 4.97%

3.- DETERMINACIONES ANALITICAS.

En la grasa en estudio se verificaron determinaciones analíticas cualitativas y cuantitativas de Nitrógeno, Fósforo y Azufre.

A).- Determinación Cualitativa de N, P y S.

a): La identificación del fósforo se efectuó oxidando la muestra con peróxido de sodio y carbonato de sodio anhidro como fundente, en crisol de níquel, llevándolo hasta fosfato y reconociendo este -- por su reacción con molibdato de amonio. (31).

b): Para la identificación de nitrógeno y -- azufre, se efectuó una fusión de la muestra con Sodio, reconociendo al nitrógeno por su reacción con solución acética de bencidina y sulfato de cobre, y al azufre -

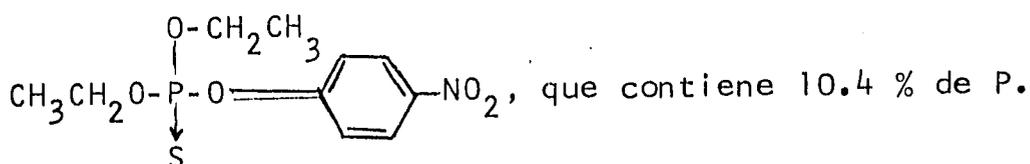
mediante su reacción con solución acuosa de nitroprusiato de sodio. (28, 31).

c): Resultados obtenidos:

Para todas las fracciones estudiadas (A1, A2, B2Z1 y B2Z2), se encontraron pruebas positivas de Nitrógeno, Fósforo y Azufre.

B).- Determinaciones Cuantitativas.

a): Fósforo.- Siguiendo las recomendaciones de Kolthoff y Sandell, (17), se montó la técnica para determinación cuantitativa de Fósforo: se probó reproducibilidad del método con patrón de Paratió, de fórmula: $C_{10}H_{14}NO_5PS$,



Técnica: En matraz apropiado para destrucción de materia orgánica, se pasaron de 20 a 30 mg de muestra, se les añadió 4 ml de H_2SO_4 conc. y 2 ml de HNO_3 concentrado, se les sometió a calentamiento durante 4 horas. Se dejó enfriar y, con agua destilada, se les pasó a un vaso de precipitados de capacidad adecuada; esta mezcla se calentó hasta casi ebullición y les fueron añadidos 60 ml de HNO_3 al 40% y 30 ml de S.R. de molibdato de amonio, con agitación constante. La precipita

ción obtenida fué rápida; se dejó reposar, se filtró el precipitado en Schott G4, lavándolo repetidas veces con agua destilada hasta que casi se eliminó reacción ácida, (pH 6); el precipitado se disolvió con 20 ml de solución 0.5N de NaOH, medidos con precisión, - se lavó el Schott con agua destilada hasta que se eliminó reacción de alcalinidad. Se tituló el exceso de NaOH con solución 0.5N de HCl, utilizando fenolftaleína como indicador. (17).

$$\% P = \frac{V \times N \times \text{Meq. P} \times 100}{p. \text{ muestra (g)} \times \text{Factor de Corrección.}}$$

Resultados obtenidos:

A1 y B2Z1: 0.165 % de P.

A2 y B2Z2: 0.184 % de P.

b): Nitrógeno.- La cuantificación de Nitrógeno se realizó mediante un micro-Kjeldahl modificado. (35). probándose la técnica con propilurea como patrón.

$C_4H_{10}N_2O$, $CH_3CH_2NH-CO-NH_2$, que contiene 27.4 % de N. Técnica: se pesaron de 15 a 30 mg de muestra, se añadió 3 ml de H_2SO_4 concentrado y 1.5 g de catalizador constituido de 10 g de óxido de mercurio, 5.0 g de silicio y 150.0 g de H_2SO_4 , por cada 165 g del mismo. -

Después se calentó por un tiempo mayor de dos horas, hasta lograr la clarificación de la solución.

Con objeto de lograr una destilación más completa y mejor controlada, se llevó a cabo por arrastre de vapor; se pasó la muestra al matraz de destilación, lavando muy bien con agua destilada el matraz de digestión, y se añadió 15 ml de solución de NaOH al 40%.

El destilado se recibió en 20 ml de solución de H_3BO_3 al 4% con 30 gotas de indicador mixto por cada 100 ml de la misma. Este indicador se preparó mezclando 100 ml de solución de azul de metileno al 1:1000, en agua y 10 ml de solución de anaranjado de metilo al 1:100 en metanol. La destilación se continuó hasta 10 minutos después del vire del indicador.

Se determinó % de Nitrógeno valorando el amoníaco con solución 0.01N de HCl.

$$\% \text{ de N} = \frac{V \times N \times \text{Meq. N} \times 100}{\text{peso muestra (g)}}.$$

Resultados obtenidos:

A1 y B2Z1:	1.75 % de N.
A2 y B2Z2:	1.80 % de N.

c): Azufre.- Para la determinación de Azufre se hizo una comparación de tres métodos: Bomba Parr, -

Carius y Combustión en atmósfera de Oxígeno, (clásicos los dos primeros y moderno el último).

En los tres métodos se utilizó tiourea como patrón: $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$, $\text{H}_2\text{N-CS-NH}_2$, que contiene 42.1% de S.

c'): Método de la Bomba Parr.

Fundamentalmente, consiste en oxidar la muestra con perclorato de potasio y peróxido de sodio en una bomba Parr. (4,19).

Para mayor comprensión de las manipulaciones del método, ver Esquema 1. (19).

Técnica: Se pesaron con exactitud 1.0 g de perclorato de potasio y 0.3 g de ácido benzoico, colocándolos en el crisol de fusión de una bomba Parr. Enseguida se pesó exactamente de 0.05 a 0.1 g de muestra y se colocaron en el crisol de fusión. Se mezclaron perfectamente con la varilla que suministra el equipo, rompiendo los aglomerados que en ocasiones se formaban, cepillándose dentro del crisol el material adherido a la varilla. Se añadió cerca de 11.0 g (o $3/4$ de la medida que suministra el equipo), de peróxido de sodio al crisol de fusión. Se mezcló rápidamente el contenido del crisol con la varilla. Finalmente, se agregó $1/4$ de la medida, de peróxido de sodio, de modo de formar una capa delgada en la parte superior de la mezcla; se colocó la cubierta sobre el crisol evitando mezclar su contenido.

Se ensambló la bomba y se atornilló la tapa. Se colocó la bomba en el casquete de ignición, soportado en un tripié, añadiendo 1 ml de agua en cada lado de las depresiones de la cubierta de la bomba. Se dió inicio a la reacción al calentar el fondo de la bomba con un mechero Bunsen, de flama fuerte y fina. Al empezar a hervir el agua de la cubierta de la bomba, se tomó esta con una pinza, sumergiéndola inmediatamente en agua fría, Cuando la bomba se enfrió a temperatura ambiente, se abrió y lavó el exterior de la cubierta con agua destilada caliente, -- dentro de un recipiente de 600 ml. Se aseguró la disolución de cualquier porción de la fusión que pudiera estar adherida en el exterior. Luego, fué colocado el crisol de costado en el mismo recipiente y se añadió agua destilada suficiente para cubrir 2/3 del crisol. Se cubrió el recipiente con un vidrio de reloj y fué colocado en un baño de vapor hasta disolver la fusión. Al llegarse a la disolución completa se retiró el crisol, lavándose perfectamente con agua destilada caliente, dentro del recipiente. Una vez a temperatura ambiente, se añadió cuidadosamente HCl, evitando pérdidas por proyección, hasta que hubo exceso de ácido. Se agregó 10 ml de agua de bromo saturada, se colocó el recipiente en el baño de vapor y se llevó a sequedad. Se adicionaron 3 ml de HCl y 50 ml de

agua destilada, se calentó hasta disolución completa de todas las sales solubles. Fué separado cualquier residuo insoluble por filtración, lavando perfectamente el recipiente y el filtro con agua destilada caliente y recibiendo filtrado y lavados en recipiente adecuado. El filtrado se diluyó a 300 ml, se calentó hasta ebullición y fué precipitado el ión sulfato por adición lenta, con agitación constante, de 10 ml de solución de BaCl_2 al 10%. Se mantuvo el recipiente en el baño de vapor durante una hora, dejándolo en reposo, a temperatura ambiente durante la noche, (16 horas), Se filtró a través de un gooch, previamente seco en estufa a 105°C , a peso constante, y fué colocado en la estufa a 900°C , durante 30 minutos; se enfrió a temperatura ambiente en un desecador y se pesó. (4).

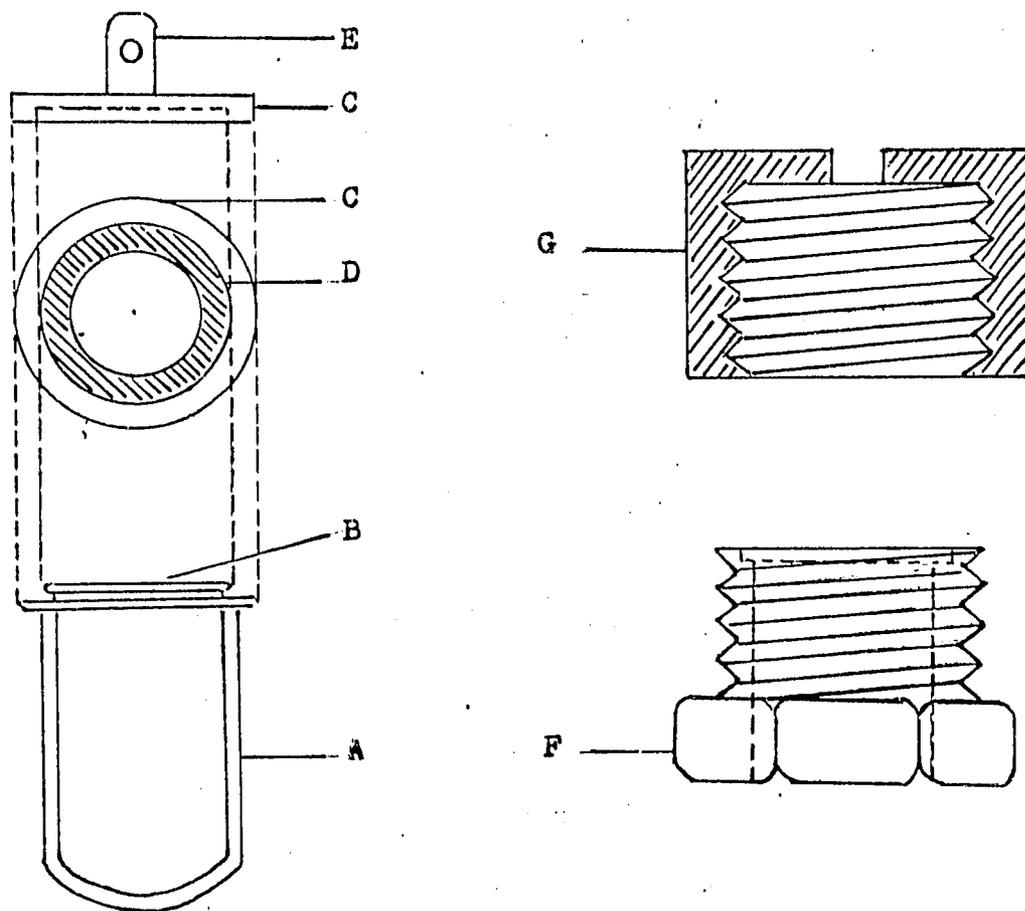
$$\% \text{ de S} = \frac{\text{g de BaSO}_4 \times 13.75}{\text{g de muestra}}$$

Resultados obtenidos:

Al, 0.287 % de S.

B2Z1, 0.296 % de S.

ESQUEMA I.- BOMBA PARR.



A: crisol de fusión.

B: Borde saliente.

C: cubierta del crisol.

D: depresión circular.

E: saliente de la cubierta del crisol, con una horadación.

F: casquete metálico.

G: cubierta del casquete.

c''): Método de Carius.

Consiste en la descomposición completa de la sustancia, por calentamiento en presencia de HNO_3 fumante en un tubo sellado; el material orgánico se oxida a CO_2 y H_2O , y el azufre a H_2SO_4 . La solución obtenida se pasa a un recipiente adecuado, se precipita el azufre como sulfato de bario y como tal se determina.

Técnica: En un tubo de Carius de aproximadamente 75 cm de longitud, perfectamente lavado y seco, se añadió no más de 1.5 a 2.0 ml de HNO_3 fumante.

En un tubo pequeño, de 6 cm de longitud y 8 a 10 mm de diámetro, se pesó con toda exactitud no más de 0.2 g de muestra.

Cuidadosamente se permitió que el tubo pequeño resbalase por las paredes del tubo de Carius inclinado, hasta llegar al fondo. Evitando siempre el contacto del contenido del tubo pequeño con el HNO_3 fumante, se colocó el tubo de Carius en su camisa metálica, procediéndose al sellado del mismo. Se introdujo entonces al horno de Carius.

Una vez encendido el aparato, se mantuvo por dos horas aproximadamente a 250°C ; después, se elevó la temperatura a 270°C , la cual se mantuvo constante durante cuatro horas más. Se dejó enfriar du-

rante toda la noche.

Se procedió a abrir el tubo ya frío. Se pasó el contenido a un vaso de precipitados de capacidad adecuada, lavando exhaustivamente el tubo de Carius con agua destilada. Esta solución se diluyó a 150 ml con agua destilada, se añadió 1 ml de solución de HCl concentrado y se calentó hasta casi ebullición en un recipiente cubierto. Se adicionó solución de BaCl_2 al 10%, gota a gota y con agitación constante, hasta completa precipitación del ión sulfato, hirviendo la solución suavemente, en recipiente cubierto, durante una hora. Se dejó reposar durante la noche. Se filtró a través de un gooch, previamente seco en estufa a 105°C y pesado, fué colocado en la estufa a 900°C durante 30 minutos; se dejó enfriar a temperatura ambiente en un desecador y se pesó. (4).

Los cálculos se hicieron en la misma forma que los realizados para el método de la bomba Parr. Resultados obtenidos:

Al: 0.279 % de S.

B2Z1: 0.341 % de S.

c''): Método de Combustión en atmósfera de Oxígeno para Determinación de Azufre.

Consiste en una oxidación completa de la muestra por combustión de la misma en presencia de

oxígeno, posterior titulación del ión sulfato formado con solución valorada de perclorato de bario, utilizando como indicador una mezcla de torina -azul de metileno.

Técnica: Se utilizaron muestras de 4 a 8 mg. La muestra fué pesada con exactitud en un papel filtro rectangular de dimensiones adecuadas, con una prolongación que permite iniciar la combustión, doblado de tal manera que no se permitiera pérdida de muestra y luego pudiera sujetarse en el alambre de platino del matraz de combustión. En este fueron colocados 5 ml de solución de peróxido de hidrógeno al 5%, se saturó con oxígeno. Se incineró la muestra en tal atmósfera de oxígeno y se dejaron absorber los vapores durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron las paredes del matraz de combustión con 25 a 30 ml de alcohol isopropílico y se añadieron una gota de una solución etanólica de azul de metileno al 1% y una gota de solución etanólica de torina al 1%, dando una solución de color verde manzana. Se procedió a la titulación del ión sulfato con una solución 0.002N de perclorato de bario en alcohol isopropílico; se consideró como punto final de la titulación, el vire del indicador de verde manzana a rosa. (32).

$$\% \text{ de S} = \frac{V \times N \times \text{MeqS} \times 100.}{\text{peso muestra (g)}}$$

Resultados obtenidos:

A1: 0.298 % de S.

B2Z1: 0.322 % de S.

No se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos por los tres métodos para la determinación de azufre. Sin embargo, el método de combustión en atmósfera de oxígeno mostró las siguientes ventajas, con respecto a los otros dos:

a: Tiene menor número de manipulaciones que puedan ser fuente de error, b: es mucho más rápido, y c: se utiliza una cantidad de muestra 20 veces menor.

Los datos que a continuación se describen fueron, pues, obtenidos por tal método.

Resultados:

A1: 0.298 % de S.

A2: 0.277 % de S.

B2Z1: 0.322 % de S.

B2Z2: 0.364 % de S.

Siendo el contenido de Azufre muy semejante en las diferentes fracciones (de 0.277 a 0.364 %), se continuó el estudio con la porción que se tenía en mayor cantidad, siendo esta el aceite denominado A1.

4.- CONSTANTES DE LA GRASA TOTAL. (14, 15).

En la grasa total se determinó:

Densidad a 25°C:	0.9341.
Indice de Refracción a 27°C;	1.4718.
Indice de Yodo:	87.6
Indice de Acidez:	131.0
Indice de Saponificación:	175.3

5.- SAPONIFICACION Y DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE MATERIA INSAPONIFICABLE.

Se hizo una saponificación del aceite con objeto de desdoblar a las grasas en sus componentes, que son ácidos grasos y materia insaponificable.

La saponificación se llevó a cabo según el método de Hilditch, (14): "Para asegurar que la hidrólisis sea completa en la grasa original, es suficiente en la mayoría de los casos, saponificar 100 partes en peso de la grasa, con una solución que contenga 30 partes en peso de hidróxido de potasio en 500 g de alcohol etílico de 95 a 100 %".

Se utilizó el doble de la cantidad de hidróxido de potasio que Hilditch recomienda, para asegurar la completa saponificación de la grasa.

Las cantidades que se utilizaron fueron las siguientes:

Grasa total:	150.0 g
Hidróxido de Potasio:	90.0 g
Alcohol etílico al 96 %:	750.0 g

Se colocó la grasa en un matraz de fondo -- redondo de capacidad adecuada y después se añadió la solución etanólica de hidróxido de potasio, poniéndose a hervir a reflujo durante 6 horas.

Posteriormente se destiló la mayor parte de etanol.

Materia Insaponificable.- Es la fracción -- que en una grasa se encuentra esterificando los áci-- dos grasos; puede estar formada por alcoholes superio-- res (alcoholes de las ceras), esteroides, glicerina, -- vitaminas liposolubles (A,D,E.), etc.

Después de la saponificación, la materia -- insaponificable se encuentra mezclada con los jabo-- nes (sales formadas por la reacción de un ácido graso y un álcali); puede ser separada por diversos métodos, aprovechando su solubilidad en disolventes de grasas.

Separación de la Materia Insaponificable.- La extracción se efectuó en un aparato de extracción

continúa, utilizando éter etílico como disolvente.

El porcentaje de materia insaponificable obtenido fué:

Grasa total saponificada:	150.0 g
Materia insaponificable:	9.2 g
% de Materia insaponificable:	6.1 %

6.- SEPARACION DE LOS ACIDOS GRASOS TOTALES.

Después de extraer la materia insaponificable, se procedió a la separación de los ácidos grasos totales, a partir de la solución de jabones obtenidos de la saponificación.

Esta solución se colocó en un vaso de precipitados de capacidad adecuada, calentando y agitando de vez en cuando, hasta obtener una temperatura uniforme de 80°C. Se procedió a la precipitación de ácidos grasos totales, agregando, lentamente y con agitación, una solución de HCl al 10 %, (Hilditch recomienda utilizar ácido sulfúrico al 10 %, pero, para los propósitos de este trabajo, resultó conveniente sustituirlo por HCl, evitando así posible contaminación con azufre inorgánico), hasta obtener una reacción francamente ácida; se hirvió esta mezcla durante un poco más de tiempo, con objeto de conseguir la separación completa de los

ácidos grasos totales, como una capa oleosa en la parte superior, la cual, al enfriarse completamente (después de 24 horas), se solidificó y fué fácil separarla de la parte líquida; esta capa dura constituida -- por los ácidos grasos totales, se colocó en un vaso de precipitados donde se disolvió con éter etílico, - pasando posteriormente la solución etérea a un embudo de separación, para efectuar el lavado necesario con agua destilada, hasta desaparición de la reacción ácida de las aguas de lavado.

La parte acuosa restante, después de la separación de los ácidos grasos, se pasó a un embudo de separación y se le extrajo con éter etílico el resto de ácidos grasos que pudiera tener; esta solución --- etérea se lavó como la anterior y se juntó con ella. A la solución etérea de ácidos grasos totales, se le añadió CaCl_2 anhidro, (en sustitución de sulfato de sodio anhidro, para evitar contaminación con azufre), a fin de eliminar los restos de agua que pudiesen --- haber quedado, y poder obtener más tarde, previa destilación del disolvente, los ácidos grasos totales. - (14).

Se encontró que los ácidos grasos totales - constituyen el 89 % de la grasa original.

Se obtuvieron, entonces, de la saponificación, tres fracciones correspondientes a:

- 1).- Materia insaponificable.
- 2).- Acidos grasos libres totales.
- 3).- Aguas de la saponificación.

A continuación se procedió a investigar azufre en cada una de las fracciones obtenidas, llegándose a los resultados siguientes:

- 1).- Materia insaponificable: S (+), 1.32 % de S.
- 2).- Acidos grasos libres totales: S (-).
- 3). - Aguas de la saponificación, (previamente fueron llevadas a sequedad):
 - a) S como SO_4 : (-).
 - b) S en otra forma de combinación, (por combustión en atmósfera de oxígeno): (+), 0.70%.

7.- ENSAYOS FARMACOLOGICOS.

Inicialmente se hizo un ensayo para determinar si el aceite total, (fracción A1, con 0.298 % de S), presentaba toxicidad o nó; para ello, se inyectó por vía intraperitoneal a un ratón de 24 g de peso, una dosis de 1.0 ml por cada 30 g de animal, (dosis descrita como mortal en estudios anteriores de lípidos de insectos con azufre, (7)). Que efectivamente resultó mortal en 15 minutos.

Con esta base, se procedió a estudiar más -- detalladamente la variación en toxicidad, al ir disminuyendo las dosis aplicadas. Se utilizaron ratones de ambos sexos de 24 a 28 g, administrando por vía intraperitoneal dosis de 0.50 ml, 0.25 ml, 0.125 ml, y ---- 0.062 ml, por cada 30 g de animal.

Resultados obtenidos:

Peso de ratón (g)	Dosis/ 30 g	Vía	Resultados
24	1.0 ml	I.P.	(+): muerte en 15 minutos
26	0.5 ml	I.P.	(+): muerte en 50 minutos
27	0.25 ml	I.P.	(+): muerte en 90 minutos

Peso de ratón (g)	Dosis/ 30 g	Vía	Resultados
27	0.125 ml	I.P.	(+): muerte en 18 horas.
28	0.062 ml	I.P.	(-): muerte en 24 horas.

En términos generales, en todos los animales se observó: primero depresión sin llegar a narcosis, - depresión de reflejos por atonía muscular, salivación, lagrimeo, parálisis progresiva que va aumentando hasta ser total; y muerte; al disectar al animal se vió intestino en espasmo y corazón en paro sistólico.

Pensando que la toxicidad pudiera ser debida al hexano que contenía el aceite, se inyectaron dos ratones de 26 y 29 g con dosis de hexano de 1 ml por 30 g de animal; se observaron síntomas de intoxicación, - como levantamiento de extremidades con incoordinación de movimientos, signos que tienen escasa semejanza con los observados en los ratones tratados con el aceite; además, ninguno de los ratones testigo murió.

Por los resultados en cuanto a toxicidad en relación a dosis, para la determinación de la dosis de

letal media en 24 horas, se eligió como dosis menor 0.03 de ml por cada 30 g de animal, empleando una razón ascendente de 7/4 para las otras dosis.

Se aplicaron dosis de 0.03 ml, 0.055 ml, - 0.10 ml, 0.17 ml y 0.30 ml, por cada 30 g de peso de animal, a ratones de ambos sexos, de 21 a 30 g, por vía intraperitoneal, a razón de 8 animales por dosis, distribuidos por culebra japonesa.

Resultados obtenidos:

Gpo.	Dosis ml/30g	Núm. de anim.	animales		% animales muertos	% co rreg.	Probits
			vivos	muertos			
I	0.30	8	0	8	100	96.9	6.87
II	0.17	8	3	5	62.5	50	5.32
III	0.10	8	4	4	50	50	5.00
IV	0.055	8	6	2	25	25	4.32
V	0.031	8	8	0	0	3.12	3.12

Los valores extremos de % de animales muertos fueron corregidos por las relaciones:

$$a): \quad 0 \quad \% \quad 100 (0.25/n).$$

$$b): \quad 100\% \quad 100 [(n - 0.25)/n] .$$

donde: n = número de animales por grupo.

Graficando los valores de % corregido de animales muertos contra dosis, en papel milimétrico y semilogarítmico, y Probits contra dosis, en papel semilogarítmico, se encontró una dosis letal media en 24 horas de 0.105 ml por cada 30 g de ratón.

Ensayo con la materia insaponificable.

Teniendo en cuenta la dosis letal media en contrada para el aceite y su contenido en azufre, se calculó administrar dosis de 23 y 46 mg de insaponificable, por cada 30 g de animal; por falta de instrumental adecuado; las dosis realmente administradas fueron de 32.5 mg y 65 mg, por cada 30 g de animal. El ensayo se realizó por vía intraperitoneal, en ratones de ambos sexos, de 31 a 36 g de peso.

Para la administración del insaponificable se preparó una dilución de 325 mg del mismo, en 5.0 ml de aceite de cocina, o sea, una "solución" de 65 mg/ml.

Resultados obtenidos:

GRUPO I.-

Peso ratón (g)	Dosis en mg/30 g.	Vía	Vol. aplicado	Resultados: muerte en 24 horas.
31	32.5	I.P.	0.516 ml	(+)
32	32.5	I.P.	0.533 ml	(-)
33	32.5	I.P.	0.550 ml	(-)
35	31.5	I.P.	0.567 ml	(-)
35	31.5	I.P.	0.567 ml	(+)
36	32.5	I.P.	0.600 ml	(-)

GRUPO II.-

31	65.0	I.P.	1.033 ml	(+)
32	65.0	I.P.	1.067 ml	(+)
35	65.0	I.P.	1.167 ml	(+)

DISCUSION DE RESULTADOS
Y
CONCLUSIONES

1.- El trabajo se inició con 51.1 Kg de insectos secos. Langosta emigrante americana. (Schistocerca paranensis, Acridioidea, Catantopidae).

2.- Se realizó la extracción de lípidos totales del cuerpo de los insectos, con hexano como disolvente, obteniéndose:

Aceite (A1+B1Z+B2Z1): 2,450.6 g; 4.76 %, en peso.

Sólido (A2+B1Y+B2Z2): 110.0 g; 0.21 %, en peso.

Total extraído: 2,560.6 g; 4.97 %, en peso.

3.- Se hicieron ensayos cualitativos y cuantitativos; Resultados:

A: Cualitativos:

En todas las fracciones se encontró:

N	P	S
(+)	(+)	(+)

B: Cuantitativos:

Se hizo un estudio comparativo de tres métodos para valorar Azufre en la grasa en estudio: método de la bomba Parr, método de Carius y método de Combustión en atmósfera de Oxígeno; se llegó a los resultados siguientes:

FRACCION	% de S		
	Método de B. Parr	Método de Carius	Método de Comb. en atm. de O ₂
A1	0.287	0.279	0.298
B2Z1	0.296	0.341	0.322

Es de notarse que en B2Z1, por el método de la bomba Parr, se obtuvo un resultado más bajo que con los métodos restantes.

Pero en general, no se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos por los tres métodos para la determinación de Azufre. Sin embargo, el método de Combustión en atmósfera de Oxígeno mostró las siguientes ventajas:

- a: Tiene menor número de manipulaciones que - puedan ser fuente de error.
- b: Es mucho más rápido.
- c: Se utiliza una cantidad de muestra 20 veces menor.

Resultados:	N	P	S
A1 + B2Z1:	1.75 %	0.165 %	0.310%
A2 + B2Z2:	1.80 %	0.184 %	0.320%

Relación atómica N:P:S.

A1 + B2Z1:	12.5	:	0.53	:	0.97
A2 + B2Z2:	12.8	:	0.59	:	1.00

o sea, aproximando:

22 : 1 : 2.

De lo cual podría deducirse que con hexano se extrae una pequeña proporción de fosfolípidos y - una gran cantidad de compuestos nitrogenados.

Es importante hacer notar la relación P : S de 1 : 2.

4.- En la grasa total se determinaron las -- siguientes constantes:

Densidad a 25°C:	0.9341.
l. de Refracción:	1.4718.
l. de Yodo:	87.6
l. de Acidez:	131.0
l. de Saponificación:	175.3

5.- Se realizó una saponificación de la -- fracción denominada A1; se obtuvieron los resultados siguientes:

Grasa total saponif. :	250.0 g
Material insaponif. obtenido:	21.25 g;
	6.1 %
Acidos grasos libres totales:	222.50 g;
	89 %

6.- Se investigó Azufre en cada una de las fracciones obtenidas de la saponificación, obteniéndose:

A: Materia insaponificable: (+),	^S 1.32%	^N (-)	^P (-)
B: Acidos grasos libres tot.: (-).			
C: Aguas de la saponificación:			
a) Como sulfatos:		(-)	
b) En otra forma de combinación:		(+),	0.70 %.

La ausencia de sulfatos en las aguas de la saponificación nos revela que el o los compuestos con azufre no están presentes como diéster sulfúrico, del tipo SO_4-R_2 , ya que, de ser así, al saponificar se -- hidrolizarían y se detectarían iones sulfato en las -- aguas de la saponificación.

El azufre se encuentra, entonces, combinado en otra forma.

7.- Se realizaron ensayos farmacológicos:

A: Con el aceite A1:

- a) Toxicidad (+).
- b) Se encontró una DL_{50} en 24 horas, en ra tón, de: 0.105 ml de A1, (0.294 mg de S), vía I.P., por cada 30 g de animal.
- c) En los animales tratados con el aceite, y no en los testigos, se observó: primero una depresión que nunca llegó a narcosis, seguida de una depresión de reflejos por atonía muscular, salivación, lagrimeo, parálisis que aumenta progresivamente hasta ser total, y muerte. Al disectar se vió intestino en espasmo y corazón en paro sistólico.

B: Con el material insaponificable:

- a) Toxicidad (+)
- b) En base al contenido en azufre, tanto en el aceite como en el insaponificable, se planeó administrar dos dosis de éste; la primera aproximadamente igual a la DL_{50} encontrada para el aceite, y la segunda el doble de la anterior.

Resultados:

b¹: Dosis de 32.5 mg de insap. (0.429 mg de S), por cada 30 g de animal, por vía l. P., resultaron mortales para el 33% de los ratones.

El hecho de que la dosis aplicada resultara mortal sólo para el 33% de los animales, en lugar del 50% esperado, podría explicarse por haber realizado la prueba en un grupo pequeño, y la utilización de ratones de mayor peso.

b¹¹: Dosis de 65,0 mg de insaponificable, --- (0.858 mg de S), por 30 g de animal, definitivamente resultaron mortales para el 100% de los ratones tratados.

El efecto tóxico observado está en relación directa con el contenido en azufre del material ensayado.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Conn, E.E. y P.K. Stumpf.
Bioquímica Fundamental.
2a. Ed., Ed. Limusa-Wiley, S.A., México, (1967).
- 2.- Denneil, R.
Proc. Roy. Soc. (London), B133, 348, (1946).
- 3.- Fieser, L.F. y M. Fieser.
Química Orgánica.
Ed. Grijalbo, S.A., México, (1965).
- 4.- Freeport Sulphur Co., Technical Staff.
The Sulphur Data Book.
McGraw-Hill, U.S.A., (1954).
- 5.- Gilmour, D.
The Biochemistry of insects.
Academic Press, U.S.A., (1961).
- 6.- Gilmour, D.
The Metabolism of Insects.
W.H. Freeman and Co., U.S.A., (1965).
- 7.- Giral, F.
Rev. Soc. Mex. Hist. Nat., 2(4), 243-50, (1941).
- 8.- Giral, J., F. Giral y M. L. Giral.
Ciencia, 4, 155-6, (1943)
- 9.- Giral, J., F. Giral y M.L. Giral.
Ciencia, 4, 215-16, (1943).

- 10.- Girai, J., F. Girai and M.L. Girai.
J. Biol. Chem., 162(1), 55-9, (1940)
- 11.- Girai, F.
J. Biol. Chem., 162(1), 61-3, (1940)
- 12.- Girai, F.
Ciencia, 14(7-8), 163-4, (1954).
- 13.- Harper, H.A.
Review of Physiological Chemistry.
Lange Medical Publications, U.S.A., (1965).
- 14.- Hilditch, T.P.
The Chemical Constitution of Natural Fats.
4th. Ed., Chapman and Hall, London, (1964).
- 15.- Jenkins, G.L., A.G. Du Maz, J.E. Christian y G.
Hager.
Química Farmacéutica Cuantitativa. (Traducción).
Ed. Atlante, S.A., México, (1951).
- 16.- Kirk-Othmer.
Encyclopedia of Chemical Technology.
2nd. Ed., Vol. 8, U.S.A., (1965).
- 17.- Kolthoff, I.M. and E.B. Sandell.
Textbook of Quantitative Inorganic Analysis.
3rd. Ed., MacMillan Co., U.S.A., (1955).
- 18.- Levene, P.A.
J. Biol. Chem., 15, 463-64, (1912-1913).

- 19.- Mann, F.G. and D.C. Saunders.
Practical Organic Chemistry.
4th. Ed., Longmans, Green and Co., Ltd., Great
Britain, (1960).
- 20.- Martensson, E.
Acta Chem. Scand., 17(4), 1174-76, (1963).
- 21.- Miall, S. y L. Mackenzie-Miall.
Diccionario de Química. (Traducción).
Ed. Atlante, S.A., México, (1953).
- 22.- Oertel, G.W.
Z. Physiol. Chem., 343(46), 276-81, (1966)
- 23.- Pavan, M.
"Proceedings of The Fourth International Congress
of Biochemistry. Symposium 12, Biochemistry of -
Insects".
Pergamon Press, London, (1959)
- 24.- Pfiffner, J.J. and H.E. North.
J. Biol. Chem., 134, 781-2, (1940).
- 25.- Reichstein, T.
Helv. Chim. Acta, 19, 41, (1936).
- 26.- Reichstein, T. and A. Goldschmidt.
Helv. Chim. Acta, 19, 401-2, (1936)
- 27.- Ruzicka, L., M.W. Goldberg and H. Meister.
Helv. Chim. Acta, 23, 559-61, (1940).

- 28.- Shriner, R.L., R.C. Fuson and D.Y. Curtin.
Systematic Identification of Organic Compounds.
5th. Ed., J. Wiley & Sons, Inc., U.S.A., (1964).
- 29.- Soper, R.
Comp. Biochem. Physiol., 10(4), 325-34, (1964).
- 30.- Stoffyn, P. and A. Stoffyn.
- 31.- Vogel, A.
A Textbook of Practical Organic Chemistry.
3rd. Ed. Longmans, Green and Co., Ltd., Great Britain, (1961).
- 32.- Wagner, H.
Mikrochim. Acta, 1, 19-23, (1957).
- 33.- Woolley, D.W. and W. H. Peterson.
J. Biol. Chem., 122, 213-8, (1937-1938).
- 34.- Wren, J.J. and H.K. Mitchell.
J. Biol. Chem., 234, 2823, (1959).
- 35.- Ind. Eng. Chem., Anal. Chem., 18, 61, (1940).