

Tesis de Posgrado

Contribución al estudio de composición de grasa humana de depósito

Calandra, Eva

1946

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química
de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Calandra, Eva. (1946). Contribución al estudio de composición de grasa humana de depósito. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0469_Calandra.pdf

Cita tipo Chicago:

Calandra, Eva. "Contribución al estudio de composición de grasa humana de depósito". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1946.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0469_Calandra.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

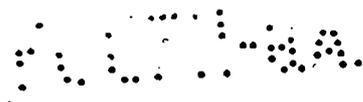


UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES



"CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE COMPOSICION DE
GRASA HUMANA DE DEPOSITO"

Trabajo de Tesis presentado por Eva Calendra para
optar al título de Doctor en Química.

- Buenos Aires - 1946 -

Esis 469

PADRINO DE TESIS

PROF. DOCTOR PEDRO CATTANEO

Agradezco al Prof. Dr. Pedro Cattaneo la dirección y asesoramiento del presente trabajo; al Dr. Abel Sanchez Díaz, el haberme concedido la autorización necesaria para utilizar los laboratorios de la Oficina Química Municipal, a la Dra. Germaine Karman por su colaboración eficaz y al Prof. Dr. Venancio Deulofeu (Cátedra de Química Orgánica-Ingeniería Industrial) por haberme facilitado elementos de trabajo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

.....

Pocos son los antecedentes bibliográficos que se registran acerca de la composición química en ácidos de los depósitos grasos humanos. Jaekle H. (1) da una información parcial en valores de constantes y composición para grasas de depósito y lipomas procedentes de cadáveres de personas fallecidas a causa de enfermedades agudas, pero que desde el punto de vista de la composición química solo tiene valor cualitativo parcial. Posteriormente Eckstein H.C. (2) dió la primera información cuantitativa al respecto. Estudiando la composición de un depósito subcutáneo de hombre, señaló la probable existencia de trazas de un ácido, posiblemente láurico, sólo logró caracterizar muy pequeñas cantidades de los ácidos linoléico y linolénico, a través de sus derivados bromados; asimismo señaló la presencia del ácido araquidónico al que determinó como derivado bromado en la proporción del 0,3 % y encontró alrededor de 1 % de ácido mirístico. Posteriormente Wagner Q. (3) verificó la presencia de los ácidos linoléico y araquidónico pero no la del linolénico.

Nuevas contribuciones al conocimiento de la química de éstos depósitos han sido dadas por Heiduschka y Handritschk (4), Cathcart y Cuthbertson (5), Cuthbertson y y Tomsett (6) y por Stolfi (7) pero que en realidad no aportaron nuevos datos referentes a composición química en ácidos grasos.

Desde entonces, ningún otro estudio de valor registra la literatura, hasta que D.L. Cramer y J.H. Brown (8) aportaron sin duda alguna, la mejor contribución hasta ahora conocida, sobre la composición química de depósitos grasos humanos. El estudio por ellos realizado en el Laboratorio de Química Fisiológica de la Universidad de Ohio (Columbia), se refiere a la composición de cinco depósitos gra-

////

Los retirados de cadáveres frescos, procedentes de individuos de ambos sexos, cuyo estudio patológico no reveló influencia significativa en la composición grasa. El material fue en todos los casos retirado de las regiones abdominal, panicular, mesentérica y perirenal.

La obtención de grasas se logró por fusión al baño maría durante 2 a 5 horas, seguida de prensado y eliminación del agua.

En los estudios de composición, los autores han aplicado el siguiente proceso:

- a) Transformación de los ácidos totales en ésteres metílicos.
- b) Fraccionamiento de los ésteres metílicos separando los ésteres según la magnitud molecular, en C_{14} , C_{16} , C_{18} y C_{20} . En la destilación se empleó una columna de funcionamiento adiabático y alto poder separador (long. 90 cm - Mat. de relleno "single turn glass helices").
- c) Análisis cuali-cuantitativo de cada fracción por cristalización de los ésteres metílicos en metanol a muy bajas temperaturas y de los ácidos en acetona también a bajas temperaturas. Detalles acerca de estas técnicas de separación han sido dadas por Brown J.B. y Shinowara G.Y. (9); Brown J.B. y Stoner G.G. (10); Earle F.R. y Milner R.T. (11); Brown J.B. (12); y De Gray R.J. (13). Los mismos procesos facilitan el aislamiento de ésteres o ácidos puros lo cual permite sus caracterizaciones; y fracciones mezclas, de cuyos pesos e índices de iodo, tiocianógeno, saponificación y números de polibromuros, puede calcularse la composición final. Los resultados obtenidos por Cramer y Brown, están consignados en el siguiente cuadro:

////

TABLA I

	Mujer 53 años	Hombre 74 años	Hombre 61 años	Desco- nocado	Hombre 66 años
Láurico	0,1	0,6	-	-	0,9
Mirístico	2,7	5,9	2,6	2,6	3,9
Tetradecenónico	0,2	0,6	0,4	0,4	0,5
Palmítico	24,0	25,0	24,7	25,4	25,7
Hexadecenoico	5,0	6,7	7,3	5,6	7,6
Esteárico	8,4	5,8	7,7	7,7	5,2
Octodecenónico	46,9	45,4	45,8	44,8	46,6
Octodecadienónico	10,2	8,2	10,0	11,0	8,7
Araquidónico	1,0	1,0	0,4	0,3	0,6
Otros ácidos en C ₂₀	1,5	0,8	1,1	2,2	0,3
Indice de Iodo	68,9	67,4	68,8	64,8	68,5
Ind. de saponifica- ción	196,5	194,0	197,9	197,3	195,4

Los valores de composición, expresados en ácidos % de ácidos totales, muestran una extraordinaria constancia a través de los individuos, como así también los correspondientes a los índices de iodo y saponificación.

Las determinaciones de caracterización de componentes ácidos les ha llevado a las siguientes comprobaciones y confirmaciones, ordenados por magnitud molecular de los ácidos.

- a) C₁₄
- | | | |
|-------------------|---|---|
| Tetradecenónico - | { | Señado por primera vez. Se demuestra su existencia pero no se lo caracteriza. |
| Mirístico | { | Reconocido por la temperatura de fusión de su éster metílico (18,4°C) y determinación de su peso molecular. |

////

C₁₄ No se prueba la existencia de ácidos con un grado de saturación mayor que en el tetradecenóico.

9-10



Hexadecenóico
(Palmitoléico)

Señalado y caracterizado por primera vez, por la temperatura de fusión de su éster metílico (-42° C); por su transformación en ácido palmítico por hidrogenación y por la temperatura de fusión de su dihidroxiderivado (123-124° C).

b) C₁₆

Palmitico

Reconocido por la temperatura de fusión de su éster metílico (29,5° C).

No se comprueba la presencia de ácidos no saturados con grado de no saturación mayor que en el hexadecenóico.

Oléico

Principalmente ^{componente} en el grupo de los ácidos octodecenóicos. Reconocido por la temperatura de fusión del ácido (13° C), índice de iodo, tiocianógeno y peso molecular.

Linoléico

Principal componente en el grupo de los ácidos octodecadienóicos. Reconocido a través del punto de fusión de su derivado bromado (113-114° C).

c) C₁₈

Estearico

Reconocido por la temperatura de fusión de su éster metílico (39,5° C) y por determinación de peso molecular.

No se prueba la existencia de ácido linoléico, pero en cambio se afirma la presencia de ácidos isoméricos octodecenóicos y octodecadienóicos.

Eicosatetraénico
(Araquidónico)

Reconocido por la temperatura de fusión de su octobromo derivado (228,5- 230° C) y por su contenido en bromo (68,7 %).

d) C₂₀

Señalan la probable existencia de otros ácidos en C₂₀ de menor grado de no saturación que en el araquidónico. Se cita como probables al ácido eicosenóico - (C₂₀ monoetilénico) - y como saturado al araquídico (eicosanóico)

Los autores creen probable la existencia, en pequeña cantidad, de ácidos con más de 20 átomos de Carbono. Asignan especial importancia a la resolución pendiente sobre componentes menores en C₁₂ y C₂₀ y reconocen el interés existente en intensificar los estudios referentes a la estructura de los ácidos isoméricos octodecenóicos y octodecadienóicos.

////

NUEVO ESTUDIO DE COMPOSICION DE GRASA HUMANA DE DEPOSITO

El presente trabajo fué realizado con el objeto de establecer la composición química en ácidos grasos de un depósito adiposo humano.

El material fué extraído de una operación de lipectomía practicada en una enferma que consultó a raíz de su excesivo panículo adiposo subcutáneo abdominal.

Los datos de la enferma son los siguientes:

N. C. de M. - Instituto de Clínica Quirúrgica - Hospital de Clínicas.

R G - 116-220 - edad 45 años - española - No presenta antecedentes patológicos.

Consulta por las molestias derivadas de su abdomen excesivamente adiposo y péndulo.

El panículo fué recibido en este laboratorio a las pocas horas de practicada la operación, efectuada el 15 de Diciembre de 1945.

Después de mantenerlo en heladera durante unas 20 horas, fué reducido a pequeños trozos y calentado en baño maría, separándose la grasa líquida desprendida. El residuo, prácticamente agotado, fué ligeramente prensado hasta que el rendimiento en grasa se consideró total por este procedimiento. El producto obtenido era un líquido amarillo, del cual se separó el agua por tratamiento con sulfato de sodio anhidro, seguido de filtración. Así se obtuvo alrededor de 600 gramos de una grasa líquida y límpida, pero con acentuada tendencia a separar abundante precipitado blanco a temperaturas inferiores a 15° C

Las primeras determinaciones practicadas comprendieron las principales características físicas y químicas. El siguiente cuadro.

////

da una información de los resultados obtenidos, figurando también en el mismo otros valores logrados a través del estudio de composición, pero que se adelantan como un complemento necesario de las primeras.

////

CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS

Peso específico a 20°/20° C	0,9122
Indice de Refracción a 20° C	1,4690
" " " " 25° C	1,4670
" " " " 30° C	1,4650
" " " " 35° C	1,4630
Indice de Saponificación (A.O.A.C.)	192,4
Peso molecular medio de los glicéridos (calculado)	873,2
Indice de Iodo (Hanus)	91,7
Indice de Reichert-Meissl (A.O.A.C.)	1,3
Indice de Polenske (A.O.A.C.)	3,1
Indice de Acetilo (A.O.A.C.)	3,6
Acidez total (en ácido oléico) %	0,64
Indice de peróxidos [(Riemenschneider (14)) en milimoles de -O-O- por kg.]	4,8
Acidos Grasos Totales	% 95,07
Indice de Saponificación de los Acidos Totales	202,8
Peso Molecular Medio de los Acidos Totales	276,6
Indice de Iodo de los Acidos Totales	94,5
Insaponificable	% 0,65
Indice de Iodo del Insaponificable (Rosenmund-Kuhnemann) (15) -	79,5
Acidos Grasos "Sólidos" (Twitchell)	% 23,23
Indice de Saponificación de ácidos "sólidos"	211,1
Peso Molecular Medio de ácidos "sólidos"	263,3
Indice de Iodo de ácidos "sólidos"	15,3
Acidos Grasos "Líquidos" (Twitchell)	% 71,84
Indice de Saponificación de ácidos "Líquidos"	199,4
Peso Molecular Medio de ácidos "Líquidos"	281,3
Indice de Iodo de ácidos "Líquidos"	119,7

De las características señaladas, llama la atención el elevado valor del índice de iodo, muy superior al máximo señalado en la literatura (73,3, según Jaeckle, loc. cit.) y a los observados por Cramer y Brown (loc. cit.). El valor de índice de iodo registrado en este laboratorio para otra grasa humana de depósito, fué de 83,6. La extraordinaria constancia de los valores Índice de iodo registrados por Cramer y Brown, puede quizás ser interpretada si se tiene en cuenta que estos autores han analizado los materiales grasos obtenidos mezclando los diferentes depósitos grasos citados de cada individuo. Los valores observados por nosotros para otras características dieron seguridad, en el sentido de que el producto estaba libre de cantidades apreciables de productos extraños. En especial, el bajo valor registrado para el índice de peróxidos (4,8 milimoles de agrupación peróxido por kilogramo) indicó que no había ocurrido apreciable oxidación durante las manipulaciones previas, sobre todo en el curso de la fusión al baño maría. Asimismo, descartose la presencia de hidroxilácidos, ya que el valor del índice de acetilo es despreciable y sólo atribuible a la probable existencia de una pequeña proporción de mono o diglicéridos.

////

DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA

El camino seguido no ha sido ^{el} utilizado por Cramer y Brown (loc. cit.) por no contar con las instalaciones necesarias. Se ha procedido, en general, según las técnicas divulgadas por T.P. Hilditch (16) en su obra "The Chemical Constitution of Natural Fats". Según los detalles que pueden verse en la parte experimental, se procedió según el siguiente orden operatorio:

- a) Saponificación (300 g) y extracción del material "insaponificable" hasta virtual agotamiento.
- b) Obtención de los "ácidos totales", estableciéndose su contenido % de grasa y determinándose sus índices de iodo y saponificación.
- c) Separación de los ácidos totales en ácidos "sólidos" y "líquidos", para lo cual se siguió el macroprocedimiento de E. Twitchell (17), modificado por Hilditch (loc. cit.), fundado en la solubilidad en etanol de las sales de plomo de los ácidos no saturados - (evitamos aquí el detalle acerca del alcance de esta separación, determinado por la magnitud molecular y grado de no saturación de los ácidos componentes). Los ácidos "sólidos" y "líquidos" fueron calculados % de grasa y % de ácidos totales y como en el caso de éstos, se determinaron los respectivos índices de iodo y saponificación.
- d) Transformación de los ácidos "sólidos" y "líquidos" en los respectivos ésteres metílicos. Este proceso se controla de modo que se observen altos rendimientos de esterificación, eliminándose la pequeña cantidad de ácidos no esterificados. Asimismo

////

se determinan los respectivos índices de iodo y saponificación. Debe recalcar que todas las operaciones señaladas fueron cumplidas en condiciones que anulasen posibles oxidaciones, para lo cual se trabajó en atmósfera inerte de N_2 , efectuando los secados en estufa de vacío. Asimismo el almacenamiento fué cumplido en todos los casos en desecadores al vacío.

e) Destilación independiente de los ésteres metílicos "sólidos" y "líquidos" (en vacío de aproximadamente 1 mm de Hg). Se emplea una columna que reúna las condiciones dadas por Longenecker (18), con calentamiento eléctrico de protección y material de relleno formado por "single turn glass helices" de 4 mm. de diámetro, cuyo poder separador o eficiencia es de prácticamente 10 platos teóricos, medido por el método gráfico de Mc Cabe y Thiele (19). Ambas destilaciones producen series de fracciones, ordenadas según la magnitud molecular de los ésteres, efectuándose los cortes en grado máximo y teniendo en cuenta las variaciones de temperatura en cabeza. Estas precauciones permiten la obtención de fracciones cuya complejidad no es grande, lo cual hace posible en la mayoría de los casos su fácil resolución con sólo conocer su peso, e índices de iodo, saponificación y tio-cianógeno, según los casos. En otros de mayor número de componentes, debe recurrirse a la determinación de números de poli-bromuros o a análisis complementario (destrucción de ésteres no saturados por oxidación con MnO_4K en acetona, etc.).

f) Cálculo de la composición de fracciones, de los ésteres metílicos "sólidos" y "líquidos" y finalmente de los ácidos "sólidos" y "líquidos" y con ello del producto de origen.

Las páginas y cuadros que siguen, muestran las marchas de ambas

////

destilaciones, las composiciones halladas y los detalles de cálculo efectuado en cada caso. Una buena información acerca de la utilidad y exactitud del análisis de grasas por los métodos basados en estos principios ha sido dada por Hilditch (20) y más recientemente por Baldwin y Longenecker (21).

////

TABLA III - DESTILACION DE LOS ESTERES METILICOS "SOLIDOS"

Fracción Nº	Peso de fracción (g)	Temperaturas (° C)		
		Baño	Centro de la Columna	Cabeza de la Columna
1	1,64	200-201	169-170	93-115
2	3,55	201-210	170-182	115-131
3	4,94	210-215	182-184	131-140
4	5,57	215-218	184-185	140-140
5	5,56	218-221	185-191	140-140
6	6,03	221-227	191-196	140-141
7	7,77	227-230	196-202	141-143
8	6,61	230-240	202-202	143-150
9	11,57	240-250	202-245	150-156
Residuo	1,33	-	-	-

////

Fracción Nº	Peso de la frac- ción (g)	Ind. de Iodo	Índice de Sa- ponif.	Peso Mol. Medio	Peso Mol. Med.de Est.Satur.	Saturados				Oto- dece- noico	Eico- se- noico	Eico- sa- dien.	Doco- snoi- co
						C14	C16	C18	C20				
1	1,64	1,9	228,8	245,2	244,4	1,48	0,13	-	-	0,03	-	-	-
2	3,55	2,2	209,0	268,4	267,8	0,29	3,17	-	-	0,09	-	-	-
3	4,94	1,3	207,1	270,9	270,5	-	4,85	0,02	-	0,07	-	-	-
4	5,57	0,8	206,8	271,7	271,1	-	5,37	0,15	-	0,05	-	-	-
5	5,56	1,1	206,8	271,2	271,0	-	5,36	0,13	-	0,07	-	-	-
6	6,03	0,7	205,2	272,5	272,5	-	5,50	0,48	-	0,05	-	-	-
7	7,77	1,1	206,2	272,0	271,8	-	7,26	0,41	-	0,10	-	-	-
8	6,61	36,4	195,0	287,7	275,3	-	3,73	0,88	-	0,20	0,76	1,04	-
9	11,57	36,0	186,9	300,2	290,5	-	5,84	2,10	-	0,02	1,95	1,66	-
R	1,33	49,5	177,1	316,7	304,5	-	-	0,62	0,19	-	-	0,33	0,19
Tot- tal	54,57					1,77	41,21	4,79	0,19	0,68	2,71	3,03	0,19
Esteres % Esteres Metilicos "Sólidos"						3,24	75,52	8,77	0,35	1,25	4,97	5,56	0,35
Acidos % Acidos "Sólidos"						3,21	75,43	8,80	0,35	1,25	5,00	5,60	0,36
Acidos % Grasa						0,75	17,52	2,05	0,08	0,29	1,16	1,30	0,08

TABLA IV - COMPOSICION DE LOS ESTERES METILICOS "SOLIDOS"

DETALLE DEL CALCULO DE COMPOSICION DE LAS FRACCIONES DE DESTILACION DE LOS ESTERES METILICOS "SOLIDOS"

Fracciones 1 a 7

a) Parte no saturada. En todas ellas la parte no saturada fué calculada como octodecenoato de metilo, aplicando en cada caso la expresión

$$W I_w = 85,7 x$$

en la que W = peso de la fracción

I_w = índice de iodo de la fracción

85,7 = índice de iodo del octodecenoato de metilo.

x = valor buscado

b) Parte Saturada. El total en cada fracción está dado por las diferencias $(w - x) = y$. Para poder resolverlas en ésteres metílicos de ácidos saturados se determinó el índice de saponificación S_y de los mismos y a través de estos los respectivos pesos moleculares medios:

$$w S_w = x S_x + y S_y$$

donde S_w = indic. de sap. de la fracción

S_x = " " " del octodecenoato de metilo (189,2)

S_y = valor buscado

Obtenido S_y , el peso molecular medio de los ésteres metílicos saturados presentes en cada fracción (PM_y), se calcula con la expresión

$$PM_y = \frac{56,1 x 100}{S_y}$$

////

En el siguiente cuadro se incluyen los valores de x, y, S_y y PM_y, obtenidos para las fracciones 1 a 7.

Fracción	x	y w x	S _y	PM _y
1	0,03	1,61	229,5	244,4
2	0,09	3,46	209,5	267,8
3	0,07	4,87	207,4	270,5
4	0,05	5,52	206,9	271,1
5	0,07	5,49	207,0	271,0
6	0,05	5,98	205,9	272,5
7	0,10	7,67	206,4	271,8

De la observación de los valores de PM_y obtenidos, se deduce que en las fracciones 1 y 2 debe calcularse miristato y palmitato de metilo y en las 3 a 7, palmitato y estearato de metilo. La resolución en sólo dos componentes consecutivos de la serie saturada, se admite, cuando en el fraccionamiento se emplea una columna de alta eficiencia y cuando el corte de las fracciones se lleva al máximo.

La resolución se logra resolviendo sistemas del tipo:

$$z + p = y \quad \text{donde } z \text{ y } p \text{ son los valores buscados de dos ésteres saturados consecutivos, cuyos pesos moleculares } PM_z \text{ y } PM_p, \text{ comprendan el valor de } PM_y. \text{ Los resultados obtenidos pueden verse en la } \underline{\text{Tabla IV}}.$$

$$\frac{z}{PM_z} + \frac{p}{PM_p} = \frac{y}{PM_y}$$

Fracciones 8 - 9 y 10 (Residuo)

a) Parte Saturada. Teniendo en cuenta el elevado índice de iodo de estas fracciones, 36,4, 36,0 y 49,5 respectivamente; que es posible en ellas la presencia de ésteres metílicos de ácidos no saturados en C₁₈

////

y C₂₀, dado que la probable presencia de éstos últimos en grasa humana ha sido señalada por Cramer y Brown (loc. cit.) y que la solubilidad en alcohol de sus sales de Pb no es elevada, con lo cual formarían parte de los ácidos "sólidos", se decidió aislar y determinar cuantitativamente los ésteres saturados presentes en estas fracciones. El camino seguido fué el de destruir los ésteres metílicos no saturados por oxidación con MnO_4K en acetona anhidra (ver parte experimental)- transformándose así en productos acídicos, lo que permite aislar los ésteres metílicos saturados inalterados. La cantidad de estos (x) presentes en cada fracción y sus respectivos índices de saponificación S_x y pesos moleculares medios (PM_x), figuran en el siguiente cuadro:

Fracción	x	S_x	PM_x
8	4,61	203,7	275,3
9	7,94	193,1	290,5
10(R)	0,81	184,2	304,5

Observando los valores de PM_x se deduce la presencia de palmitato y estearato de metilo en las fracciones 8 y 9 y de estearato y araquidato de metilo en el residuo

de la destilación. Como araquidato de metilo se expresan los ésteres de ácidos con más de 18 átomos de carbono. La resolución de los valores de x en ésteres metílicos de ácidos saturados consecutivos se hace en la forma señalada anteriormente y los resultados obtenidos figuran en la Tabla IV.

b) Parte no saturada. Conociendo el peso total de la fracción (w), sus índices de iodo y saponificación I_w y S_w ; el contenido en ésteres metílicos de ácidos saturados determinados por oxidación (x) y su índice de saponificación S_x , es posible conocer la cantidad de ésteres metílicos de los ácidos no saturados destruidos por oxidación y (w-z)

////

y calcular sus índices de iodo I_y , de saponificación S_y y a través de éstos sus pesos moleculares medios PM_y .

Cálculo de S_y - $wS_w - xS_x + yS_y$

$$S_y = \frac{wS_w - xS_x}{y}$$

Cálculo de PM_y - $PM_y = \frac{1000 \times 56,1}{S_y}$

Cálculo de I_y - $wI_w = yI_y$

$$I_y = \frac{wI_w}{y}$$

El cuadro siguiente, muestra los valores así calculados para los ésteres metílicos no saturados presentes en las fracciones 8, 9 y 10:

Fracción	y w x	I_y	S_y	PM_y
8	2,00	120,2	174,9	320,7
9	3,63	114,6	173,3	323,7
R 10	0,52	126,5	166,0	337,8

Los valores de PM_y en las fracciones 8 y 9 son del orden del que corresponde a los ésteres metílicos en C_{20} (eicosenoato de

metilo 324,5; eicosadienoato de metilo 322,5). Los respectivos índices de iodo I_y , indican la presencia de ésteres de ácidos mono y dietilénicos. Debe también admitirse la presencia de una pequeña proporción de octodecenoato de metilo, deducida de los valores de PM_y .

Por lo tanto, la resolución de los ésteres no saturados presentes en las fracciones 8 y 9 se hizo entre eicosenoato (C_{20} monoetilénico), eicosadienoato (C_{20} dietilénico) y octodecenoato de CH_3 , resolviendo sistemas del tipo.

////

$$\begin{cases} v + p + z = y \\ vI_v + pI_p + zI_p = yI_y \\ vS_v + pS_p + zS_p = yS_y \end{cases} \quad \begin{array}{l} \text{donde } y, z \text{ y } p \text{ son los valores} \\ \text{buscados, correspondientes a octo-} \\ \text{decenoato, eicosenoato y eicosa-} \\ \text{dienoato de metilo respectivamente} \end{array}$$

y I_v, I_p, I_z, S_v, S_p y S_z sus respectivos índices de iodo y saponificación. Los valores hallados figuran en la Tabla IV.

Puede suponerse también la presencia de ésteres de ácidos en C_{20} tri y tetraetilénicos. Este último sin embargo, se descarta aquí por no habérselo caracterizado a través de su derivado bromado y en cuanto a los ésteres de ácidos en C_{20} trietilénicos también se los descarta pues su ausencia queda demostrada por el hecho de que los únicos derivados bromados insolubles en éter etílico que se aislan en grasa humana se obtienen directamente con la temperatura de fusión que corresponde al ácido octobromoaraquidónico, lo que no ocurriría en presencia de un ácido trietilénico, cuyo derivado bromado sería también insoluble bajo las mismas condiciones experimentales.

En cuanto al residuo, el valor de PM_y , indica la presencia de ácidos no saturados con más de 20 átomos de C. El índice de iodo I_y indica la presencia de ácidos mono y dietilénicos. La pequeña cantidad de material disponible no hace posible ensayos de caracterización. Por lo tanto la resolución se ha efectuado entre eicosadienoato y docosenoato de metilo (C_{20} dietilénico y C_{22} monoetilénico), por resolución del siguiente sistema:

$$\begin{cases} z + p = y \\ zI_z + pI_p = yI_y \end{cases} \quad \begin{array}{l} \text{Los valores pueden verse en la} \\ \text{Tabla IV.} \end{array}$$

Los ensayos de oxidación que han permitido estos cálculos, han señalado también la existencia de componentes ácidos aún no carac-

////

terizados. La dificultad que esto supone es grande y debe merecer especial atención.

TABLA V - DESTILACION DE LOS ESTERES METILICOS "LIQUIDOS"

Fracción Nº	Peso de Fracción (g)	Temperaturas (° C)		
		Baño	Centro de la columna	Cabeza de la columna
1	1,55	190-210	165-180	85-125
2	1,93	210-213	180-184	125-133
3	4,04	213-222	184-190	133-133
4	4,49	222-224	190-203	133-150
5	7,34	224-230	203-208	150-158
6	10,02	230-232	208-209	158-161
7	13,53	232-234	209-218	161-163
8	11,82	234-234	218-219	163-165
9	11,54	234-236	219-220	165-165
10	13,24	236-236	220-220	165-165
11	12,29	236-238	220-220	165-166
12	9,11	238-243	220-221	166-166
13	9,71	243-255	221-224	166-166
14	4,00	255-258	224-245	166-
Residuo	8,02	-	-	-

////

Fracción	Peso de Fracción	Índice de Refracción	Índice de Saponificación	Peso Molecul. Medio	P.M. Medio corregido	P.M. Medio de Esteres Saturados	Saturados		Tetra-decenoico	Hexa-decenoico	Octa-decenoico	Octadeca-dienoico	Eicosenoico	Eicosadienoico	Ticosate-trienoico (Aragidinoico)	Docosa-noico	Inapen.
							C14	C16									
1	1,55	33,3	228,9	245,1	-	242,3	0,96	-	0,41	0,18	-	-	-	-	-	-	-
2	1,93	63,3	213,3	2,63,0	-	262,4	0,18	0,50	0,22	1,03	-	-	-	-	-	-	-
3	4,04	64,6	207,2	270,7	-	270,4	-	1,21	-	2,07	0,76	-	-	-	-	-	-
4	4,49	65,8	203,6	275,5	-	270,4	-	1,66	-	1,90	0,51	0,42	-	-	-	-	-
5	7,34	116,8	191,1	293,5	-	-	-	0,54	-	-	3,64	3,16	-	-	-	-	-
6	10,02	118,2	190,0	295,3	-	-	-	-	-	-	6,27	3,75	-	-	-	-	-
7	13,53	117,6	189,6	295,8	-	-	-	-	-	-	8,56	4,97	-	-	-	-	-
8	11,82	117,0	188,9	297,0	-	-	-	-	-	-	7,19	4,29	0,34	-	-	-	-
9	11,54	118,4	188,9	296,9	-	-	-	-	-	-	6,82	4,38	0,34	-	-	-	-
10	13,24	119,3	188,8	297,1	-	-	-	-	-	-	19,91	13,66	1,07	-	-	-	-
11	12,29	120,1	188,6	297,3	-	-	-	-	-	-	19,91	13,66	1,07	-	-	-	-
12	9,11	119,9	188,7	297,3	-	-	-	-	-	-	5,90	3,52	0,29	-	-	-	-
13	9,71	116,7	189,1	297,0	-	-	-	-	-	-	2,03	1,62	0,35	-	-	-	-
14	4,00	120,3	187,8	298,8	-	-	-	-	-	-	0,55	0,45	0,10	-	-	-	-
R	8,02	134,9	166,6	336,7	-	-	-	-	-	-	0,55	0,45	0,10	-	-	-	-
Total	122,63						1,14	3,91	0,63	5,18	62,14	40,22	2,49	3,23	0,66	2,83	0,20
Esteres % Esteres volátiles "líquidos" →																	
Acidos % Acidos "líquidos" →																	
Acidos % Grasa →																	

— TABLA VI — COMPOSICION DE LOS ESTERES ANTIQUICOS "LÍQUIDOS"

DETALLE DEL CALCULO DE COMPOSICION DE LAS FRACCIONES DE
DESTILACION DE LOS ESTERES METILICOS "LIQUIDOS"

Fracciones 1-2-3 y 4 - La exacta determinación de su composición está vinculada al cálculo de algunos componentes menores, ya señalados en otros estudios de composición. Entre ellos se citan los ácidos láurico, mirístico, tetradecénico (C_{14} monoetilénico) y hexadecénico (C_{16} monoetilénico). Por su magnitud molecular y solubilidad en etanol de sus sales de plomo, corresponde determinarlos en las primeras fracciones de la destilación de los ésteres metílicos líquidos. De las 4 elegidas son sin duda las 3 primeras las más importantes y también las que más dificultad presentan, por su complejidad y por lo escaso del material que las forma (1,55; 1,93; y 4,04 g. respectivamente). Fué necesario (como puede verse en la parte experimental), recuperar los ácidos en los ensayos de determinación de índice de saponificación de las fracciones y reesterificarlos para lograr éxito en la solución.

El camino seguido en la solución de estas 4 fracciones ha sido el empleado y descrito en el caso de las fracciones 8 - 9 y 10 de la destilación de los ésteres "sólidos".

a) Parte Saturada. Se aislan los ésteres metílicos saturados, en forma cuantitativa por destrucción de los no saturados por oxidación con MnO_4K en acetona y luego se determinan sus índices de saponificación I_x y Pesos moleculares medios (PM_x). El cuadro que sigue resume los valores de éstos índices y los contenidos (x) en ésteres saturados de las fracciones 1 a 4:

////

Fracción	x	S _x	PM _x
1	0,96	231,5	242,3
2	0,68	213,8	262,4
3	1,21	207,0	271,0
4	1,66	205,1	273,5

Los valores de PM_x señalan en la fracción 1 la sola presencia de miristato de metilo (PM 242,3) y en la fracción 2 la presencia de miristato y palmitato de metilo. En

cuanto a las fracciones 3 y 4, los esteres saturados corresponden prácticamente en su totalidad a palmitato de metilo. Los valores de PM_x (271,0 y 273,5) son algo superiores al que corresponde al PM del palmitato (270,4). Sin embargo hemos resuelto sólo considerar la sola presencia de palmitato ya que muy difícilmente el ácido esteárico puede formar parte de los ácidos líquidos, atribuyendo las diferencias observadas en parte a errores experimentales y también al hecho de que las oxidaciones no fueron totales, pues se registraron valores de índices de iodo sobre los ácidos saturados obtenidos (ver parte experimental), pero que en modo alguno invalidan los resultados. Por lo tanto sólo en la fracción 2, se resolvió la composición de los ésteres saturados en dos componentes: miristato y palmitato de metilo.

Como resultado de estos cálculos, se señala la ausencia de ácido láurico (C₁₂ sat). Cramer y Brown (loc. cit.) han estudiado 5 grasas humanas de depósito, habiendo sólo calculado este componente en 3 casos y en la muy baja proporción de 0,1 a 0,9 %. Es probable sin embargo que la pequeña cantidad de laurato de metilo que pudiese haber existido en el ensayo de oxidación de la fracción 1, se haya perdido por ser algo arrastrable por vapor, circunstancia ésta, existente en el proceso (ver parte experimental).

b) Parte no Saturada. El peso (y) de ésteres no saturados, se deduce de (W - x), donde x es el peso de la fracción. Los índices de iodo

////

do de los mismos I_y , de saponificación S_y y el peso molecular medio PM_y , se calcularon en la misma forma ya señalada en el caso de las fracciones 8, 9 y 10 de los ésteres "sólidos". Esos valores, están consignados en el cuadro siguiente:

Fracción	y w x	I_y	S_y	PM_y
1	0,59	-	224,6	249,8
2	1,25	97,6	213,0	263,4
3	2,83	92,2	207,2	270,7
4	2,83	104,4	202,7	276,7

Los valores de PM_y en las fracciones 1 y 2 están comprendidos entre los correspondientes a los ésteres metílicos de los ácidos

tetradecenóicos y hexadecenóico. En la fracción 3, los valores de PM_y e I_y quedan satisfechos admitiendo la presencia de hexadecenoato y octodécenoato de metilo; mientras que en la fracción 4 es necesario añadir a éstos la presencia de octodecadienoato de metilo, como consecuencia del valor elevado de I_y .

Para las resoluciones se aplicaron los siguientes sistemas:

$$\text{Fracción 1} \left\{ \begin{array}{l} z + p = 0,59 \\ \frac{z}{268,4} + \frac{p}{240,3} = \frac{0,59}{249,8} \end{array} \right.$$

$$\text{Fracción 2} \left\{ \begin{array}{l} z + p = 1,25 \\ \frac{z}{268,4} + \frac{p}{240,3} = \frac{1,25}{249,8} \end{array} \right.$$

en los que z y p son los contenidos en ésteres metílicos de los ácidos tetradecenóico y hexadecenóico, siendo 240,3 y 268,4 sus respectivos pesos moleculares.

////

Fracción 3

$$\begin{cases} z + p = 2,83 \\ 85,7z + 94,6p = 2,83 \times 92,2 \end{cases}$$

donde z y p corresponden a octodecenoato y hexadecenoato de CH₃ siendo 85,7 y 94,6 sus respectivos índices de iodo.

Fracción 4

$$\begin{cases} v + z + p = 2,83 \\ 209,0v + 189,2z + 190,5p = 2,83 \times 202,7 \\ 94,6v + 85,7z + 172,5p = 2,83 \times 104,4 \end{cases}$$

donde v, z y p son los contenidos en ésteres de los ácidos hexadecénico, octodecénico y octodecadienónico, los coeficientes de la 2ª ecuación sus índices de saponificación y los de la 3ª sus respectivos índices de iodo. Los resultados de composición de estas fracciones figuran en la Tabla VI

Fracción 5.

Por sus índices de iodo I_w y de saponificación S_w debe resolverse en palmitato (x) octodecenoato (y) y octodecadienoato (z) de metilo, por resolución del sistema:

$$\begin{cases} x + y + z = w \\ yI_y + zI_z = wI_w \\ xS_x + yS_y + zS_z = wS_w \end{cases}$$

Fracciones 6 y 7

- Para ambas, los valores de índice de iodo I_w y de saponificación S_w, responden a mezclas de sólo octodecenoato (x) y octodecadienoato de metilo (y). Su resolución es fácil, con sistemas del tipo:

$$\begin{cases} x + y = w \\ xI_x + yI_y = wI_w \end{cases}$$

////

Fracciones 8 a 13 - Sus pesos moleculares medios comprendidos entre 296,9 y 297,3 indican, además de los componentes señalados para las fracciones 6 y 7, ésteres metílicos de ácidos con más de 18 átomos de C. Sin embargo, ello puede ser debido a la presencia de pequeñas cantidades de material insaponificable. Por esa razón se determinó a éste y en posesión de esos valores se hizo la corrección del valor de PM_w (ver parte experimental). Los nuevos valores así hallados son de 296,5. Esto indica la presencia de ácidos en más de C_{18} . Por lo tanto, todas las fracciones han sido resueltas en los componentes: octodecenoato (x), octodecadienoato (y), y eicosenoato de metilo (z) en el que se expresan los ésteres de ácidos en C_{20} , calculando sistemas del tipo:

$$\left[\begin{array}{l} x + y + z = w \\ xS_x + yS_y + zS_z = wS_w \\ xI_x + yI_y + zI_z = wI_w \end{array} \right.$$

Fracción 14 - Presenta las mismas características que las fracciones anteriores pero en ella el contenido en ácidos en C_{20} es mayor, pues el valor de PM_y corregido por la presencia de insaponificable es de 297,9. Su resolución es análoga a los casos anteriores.

El haber supuesto en todas estas fracciones al eicosenoato de metilo como el componente en C_{20} presente y no al eicosadienoato, calculado en las fracciones "sólidas" 8-9 y 10 está respaldado por el hecho de no haber podido aislar derivado bromado alguno insoluble en éter de petróleo. En cambio en las fracciones sólidas citadas se aislaron derivados aceitosos, acerca de lo cual se informa en lugar aparte. Tampoco forman derivados bromados insolubles en éter de petróleo los ácidos octodecadienóicos (isómeros del linoléico).

////

Fracción 15 - (Residuo)

De todas las fracciones de ambas destilaciones, es ésta la de mayor complejidad. Su peso molecular medio, determinado es de 336,7 y corregido por la presencia de material insaponificable (ver parte experimental) se transforma en 328,3. Este valor indica la presencia de ácidos no saturados con más de 20 átomos de C, lo cual está de acuerdo con lo encontrado al solucionar la parte no saturada del residuo de destilación de los ésteres metílicos "sólidos".

Por otra parte, el índice de iodo de esta fracción es el más elevado de todas (134,9). Ello se explica por la presencia en ella del éster metílico del ácido eicosatetraenóico (araquidónico), determinado y caracterizado a través de su octobromoderivado.

a) Determinación del contenido en Araquidonato de Metilo

Con este fin se ha operado sobre los ácidos del residuo, libres de insaponificable. Se determinó el rendimiento en derivados octobromados, insolubles en éter etílico anhidro a 0° C (ver parte experimental). El producto así obtenido está formado por sólo octobromoderivados del ácido araquidónico, como pudo ser establecido por su temperatura de fusión. Este hecho anula la posible existencia de ácidos trietilénicos, pues en el ensayo darían hexabromoderivados, también insolubles en esas condiciones.

De 1,5336 g de ácidos del Residuo, se obtuvo 0,1037 g de bromoderivados, lo que equivale a 0,1052 g de octobromoaraquidonato de metilo producidos por 1,6016 g de ésteres metílicos de residuo. Por lo tanto, el total de ésteres en residuo (7,82 g), produciría 0,5136 g. de octobromoderivados insolubles en éter etílico.

////

Brown (28) ha establecido que 1 g de araquidonato de metilo puro, produce sólo 0,776 g de octobromoderivados insolubles en éster etílico, cuando en realidad el cálculo indica que deberían obtenerse 3,01 g. La diferencia es debida a que del gran número de isómeros posibles en la bromuración sólo son insolubles 0,776 g por g. de éster original. Como el autor citado ha verificado cierta constancia en el rendimiento en octobromuros insolubles, el cálculo se hace sobre la base de que 0,776 g de octobromoderivado corresponden en realidad a 3,01 g.

Por lo tanto el rendimiento del total de ésteres del residuo en octobromoaraquidonato de metilo es de 2,00 g. correspondientes a 0,66 g de ácido araquidónico, que es el valor que figura en la Tabla VI.

b) Cálculo del Índice de Iodo de los Esteres del Residuo libres de Araquidonato de CH₃

Los ésteres de otros ácidos son en total 7,82 - 0,66 7,16 g. El índice de iodo de los mismos se determina según

$7,82 \times 134,9 = 0,66 \times 319,0 + 7,16x$ donde 134,9 es el índice de iodo de la fracción; 0,66 el contenido en araquidonato de CH₃ y 319,0 el índice de iodo del mismo. Resulta $x = 118,0$

c) Cálculo del Índice de Saponificación y P.M. Medio de los Esteres del Residuo libres de Araquidonato de CH₃. Se hace según:

$7,82 \times 170,8 = 0,66 \times 176,1 + 7,16x$ donde 170,8 y 176,1 son los índ. de sap. del residuo (correg.

////

Resulta $x = 170,3$

$$\text{PMM} = \frac{1000 \times 56,1}{170,3} = \boxed{329,4}$$

por insaponificable) y del araquidonato de metilo.

No es posible resolver la composición de esta parte del residuo con exactitud en función de los datos que se poseen. Debe admitirse que en la composición entran ésteres metílicos de ácidos mono y dietilénicos en C₁₈ (componentes de la fracción 14), de ácidos monoetilénicos en C₂₀ (señalado en fracciones y residuo de la destilación de los ésteres metílicos "sólidos") y ésteres metílicos de ácidos con más de 20 átomos de C, cuyas características no es posible precisar.

Ensayando una solución se ha planteado un sistema que contempla a todos estos componentes. Una de las incógnitas (x) se considera formada por los ésteres metílicos de los ácidos octodecenóico, octodecadienóico y eicosenóico, considerados en la misma relación que en la fracción 14 (I_x 120,3; S_x 188,3), otra (y) por el eicosadienoato de metilo (I_y 157,5; S_y 173,9) y la tercera (z) que comprende a los ésteres de ácidos con más de 20 átomos de C, expresado como docosenoato de metilo (C₂₂ monoetilénico) y para el cual I_z 72,0; S_z 159,2. La resolución del sistema, dió solución exacta.

$$\left\{ \begin{array}{l} x + y + z = 7,16 \\ 188,3x + 173,9y + 159,2z = 7,16 \times 170,3 \\ 120,3x + 157,5y + 72,0z = 7,16 \times 118,0 \end{array} \right.$$

Finalmente el valor obtenido para x (1,10) se reparte entre octodecenoato, octodecadienoato y eicosenoato de metilo, guardando para estos componentes la relación que les correspondiera en la fracción 14.

////

Como un complemento al detalle del cálculo de composición de fracciones "sólidas" y "líquidas", presentamos el siguiente cuadro con valores útiles en el planteo y resolución de sistemas de ecuaciones.

TABLA VII. VALORES ÚTILES EN CÁLCULOS DE COMPOSICIÓN

Designación	Fórmula	ACIDOS			ESTERES METILICOS			Factor de conversión de Ester a Acido
		II	IS	PM	II	IS	PM	
Erístico	$C_{14}H_{28}O_2$	-	245,7	228,3	-	231,4	242,3	0,9418
almítico	$C_{16}H_{32}O_2$	-	218,8	256,4	-	207,4	270,4	0,9482
teárico	$C_{18}H_{36}O_2$	-	197,2	284,4	-	187,9	298,4	0,9527
eaquídico	$C_{20}H_{40}O_2$	-	179,5	312,5	-	171,8	326,5	0,9567
tradecenoico	$C_{14}H_{26}O_2$	110,4	252,3	226,3	105,7	233,4	240,3	0,9413
xadecenoico	$C_{16}H_{30}O_2$	99,8	220,8	254,4	94,6	209,0	268,4	0,9478
otodecadié- sico	$C_{18}H_{32}O_2$	181,0	200,0	280,4	172,5	190,5	294,4	0,9522
otodecenónico	$C_{18}H_{34}O_2$	89,9	198,6	282,4	85,7	189,2	296,4	0,9527
cosenónico	$C_{20}H_{38}O_2$	81,9	180,9	310,5	78,3	172,6	324,5	0,9568
cosadienónico	$C_{20}H_{36}O_2$	164,6	181,8	308,5	157,5	173,9	322,5	0,9566
cosatetra- nónico (Araqui- nónico)	$C_{20}H_{32}O_2$	333,6	168,1	304,5	319,0	176,1	318,5	0,9560
cosenónico	$C_{22}H_{42}O_2$	74,5	165,7	338,5	72,0	159,2	352,5	0,9602

////

DISCUSION DE LA COMPOSICION ENCONTRADA

Teniendo en cuenta las composiciones encontradas para los ácidos "sólidos" y "líquidos" y los porcentajes de éstos en la grasa de origen, se ha calculado la composición final, expresando los resultados en ácidos % de grasa y % de ácidos totales. En la Tabla VIII puede observarse estos valores y los encontrados por Cramer y Brown para uno de los productos por ellos estudiados.

TABLA VIII

ACIDOS		% de Grasa	% de Acidos Totales	Cramer y Brown (x) % ácidos totales
Saturados	Mirístico	1,4	1,5	2,7
	Palmitico	19,8	20,8	24,0
	Esteárico	2,0	2,2	8,4
	Araquídico	0,1	0,1	-
No Saturados	Tetradecénico	0,4	0,4	0,2
	Hexadecénico	3,0	3,2	5,0
	Octodécénico	36,8	38,7	46,9
	Octodecadiénico	23,6	24,8	10,2
	Eicosénico	2,6	2,8	↑ 1,5
	Eicosadiénico	3,2	3,3	↓
	Eicosatetraénico	0,4	0,4	1,0
	Otros-como Docosenico	1,7	1,8	-
Indice de Iodo de Grasa		91,7		68,9
Indice de Sap. de Grasa		192,4		196,5

(x) Además 0,1 % de ácido láurico.

////

Entre los componentes ácidos mayores (octodecenóico, octodecadienóico y palmítico) se nota un mayor contenido en los octodecadienóicos y menor en octodecenóico y palmíticos, lo cual se justifica teniendo en cuenta la notable diferencia de los valores de índice de iodo. Entre los componentes ácidos menores comunes, los contenidos en mirístico, tetradecenóico, hexadecenóico y araquidónico pueden considerarse parejos (ver Tabla I), mientras que el contenido en ácido esteárico es sensiblemente menor. El ácido láurico no tuvo lugar en nuestro cálculo de composición. Otros probables componentes menores en C₂₀ merecen comentario aparte, como puede verse a continuación.

Sobre los ácidos en C₂₀

En el presente estudio el ácido araquidónico fué reconocido y determinado a través de su derivado octobromado, obtenido con P. de Fusión 230-232° C (Brown, da P.F. entre 228 y 232 para el ácido octobromoaraquídico aislado de lípidos glandulares vacunos.) Eckstein (2) fué el primero en reconocer al ácido araquidónico en grasa humana y sus resultados fueron confirmados por Wagner (3) y Cramer y Brown (8). Este ácido existe ampliamente difundido en lípidos de órganos y así Haltley (22) lo reconoció en hígado; Levene y Simms (23) en cerebro, al igual que Weson (24); Cartland y Hart (25) en el cuerpo amarillo; Bloor (26) en corazón, cerebro, hígado, riñón y páncreas; Brown en hígado (27) y posteriormente (28) en tiroides, suprarenal y bazo. La estructura del ácido araquidónico también ha sido objeto de especial atención. Shinowara y Brown (29) le asignaron la del ácido 6,10,14,18 eicosatetraenóico; y Dolby, Munn y Smedley Mac Lean (30) la del ácido 5,8,11,14 eicosatetraenóico. Esta última estructura ha sido confirmada por Mowry, Brode y Brown (31).

////

El ácido eicosenoico (C_{20} monoetilénico) ha sido calculado por nosotros como componente de fracciones y residuos de destilación. No cabía sino admitir su presencia para dar solución a las mismas. La falta de material y la complejidad de las fracciones en las que se lo calculó han hecho imposible ensayos de caracterización. Los primeros informes que registra la literatura sobre la presencia de ácidos eicosenóicos fueron dados por Bull (32), quien caracterizó el ácido $9-10$ eicosenóico como componente del aceite de hígado de bacalao (ácido gadoléico). Posteriormente se lo ha encontrado ampliamente difundido en aceites de pescados y mamíferos marinos por Takano (33) y Toyama y Tsuchiya (34). En cambio el ácido Δ^{11-12} eicosenóico ha sido caracterizado por McKinkey y Jamieson (35) y Green, Hilditch y Stainsby (36) como componente de la cera líquida de semillas de "Simmondsia Californica". La presencia de ácidos eicosenóicos como componentes de glicéridos vegetales, parece haber sido probada por Foreman y Brown (37) en aceite de semilla de nabo.

También hemos debido calcular un ácido eicosadienóico (C_{20} dietilénico) como única solución en la composición de fracciones sólidas y residuos de ambas destilaciones. Ware y Shorland (38) sostienen que un tal ácido existe en la grasa de cerdo y sospechan una amplia difusión de los mismos en grasas animales. Asimismo informan haber obtenido un ácido tetrahidroxiaraquídico por oxidación con MnO_4K en medio alcalino y en frío según el método de Lapworth y Mottram (39), de P. de F. $128^{\circ} C$ y cuyo análisis en C e H es muy correcto. Como puede verse en la parte experimental, nosotros hemos obtenido, en nuestro caso, un producto de oxidación con P. de F. $127,5-129^{\circ} C$, partiendo del material remanente de la fracción 8 de los ésteres metílicos "sólidos". Por bromuración de la misma fracción en eter de petróleo a $0^{\circ} C$, sólo se obtuvieron derivados aceitosos que no pudieron ser

////

cristalizados. Mare y Shorland (loc. cit) tampoco pudieron cristalizar los mismos tipos de derivados. Recientemente Longenecker y Baldwin (40), se han visto precisados a calcular de 2,4 a 4,7 % de un ácido eicosadienónico en la composición de grasa de calostro y leche humanas.

El ácido araquídico (C_{20} saturado) ha sido calculado en la proporción del 0,1 %. Como tal hemos incluido a los ácidos saturados con más de 18 átomos de carbono. Cramer y Brown (loc. cit.) indican como probable la existencia del ácido araquídico en grasa humana. Del mismo modo, ha resultado evidente en nuestro análisis, la existencia de ácidos no saturados con más de 20 átomos de carbono, que hemos calculado en ácido docosenónico, (C_{22} monoetilénico).

Las dificultades de caracterización de componentes ácidos contenidos en pequeña proporción, son grandes, debido principalmente a la escasez de material y al grado de complejidad de las mezclas en las que se los concentra. Si bien es cierto que no es posible hacer afirmaciones mientras no se tenga éxito en las identificaciones, los hechos señalados en el presente análisis refuerzan las afirmaciones de Cramer y Brown, en el sentido de que es posible la existencia de ácidos de bajo grado de no saturación en C_{20} , descartándose a los eicosatrienónicos por las razones ya señaladas anteriormente.

////

SOBRE LOS VALORES DE RECONSTRUCCION

Si durante todo el curso del análisis no han ocurrido pérdidas ni fenómenos de oxidación; si en los procesos de esterificación de los ácidos "sólidos" y "líquidos" se han observado altos rendimientos de esterificación; si durante ambas destilaciones no se han producido polimerizaciones; y si en la resolución de composición de las fracciones de destilación se han planteado sistemas correctos, debe existir una marcada concordancia entre los valores correspondientes a los índices de iodo y saponificación obtenidos por determinación directa y los calculados en base a las composiciones encontradas, para los ácidos y ésteres "sólidos" y "líquidos", ácidos totales y grasa de origen. El siguiente cuadro resume esos valores de reconstrucción:

TABLA IX

	Indice Iodo		Ind. de Saponificación	
	Deter- minado	Calcu- lado	Deter- minado	Calcula- do
Acidos "Sólidos"	15,3	14,7	211,1	213,2
Acidos "Líquidos"	119,7	119,5	199,4	199,6
Esteres "Sólidos"	14,2	13,9	202,5	201,0
Esteres "Líquidos"	113,8	113,1	190,4	189,7
Acidos Totales	94,5	94,0	202,8	202,9
Grasa	91,7	90,0	192,4	193,0

Las diferencias observadas se consideran dentro del orden aceptable para este tipo de análisis.

////

PARTE EXPERIMENTAL

1º) Determinación de constantes físicas y químicas

Fueron obtenidas de acuerdo a las técnicas señaladas en cada caso como puede observarse en la Tabla II.

2º) Saponificación

Se operó sobre 300,2 gr. de grasa, con 180 gr. de HOK., 1 lt. de alcohol y siguiendo estrictamente las indicaciones de Hilditch (loc. cit.) pág. 367.

3º) Aislamiento del insaponificable

El líquido proveniente de la saponificación anterior se transvasó cuantitativamente a un frasco de 5 lt. de capacidad, mediante el agregado de 1 lt. ^{de alcohol y 1 lt.} de agua. Este frasco forma parte de un extractor continuo cuyas características figuran en la obra de Hilditch (loc. cit. pág. 369). En el mismo el insaponificable fué extraído con éter de petróleo (P.E.: 60-80° C) durante 33 horas consecutivas. Los líquidos etéreos fueron decantados, concentrados a un volumen menor por destilación al Baño María, pasados a una ampolla de decantación adecuada y agitados energicamente con solución de HOK al 12 % y finalmente con agua hasta reacción neutra a la fenolftaleína. La capa etérea así purificada (de álcalis y jabones) fué secada con $SO_4 Na_2$, recuperándose el disolvente por destilación al Baño María. Por secado del residuo a 100° C en la estufa de vacío se obtuvieron 1,987 gr. de insaponificable, que corresponden a 0,65 % de grasa.

////

4º) Obtención de los ácidos totales

La solución de jabones procedente de la operación anterior unida a los líquidos acuosos provenientes de la purificación del insaponificable fueron concentrados por destilación en corriente de N_2 hasta reducir su volumen en 2/3. El líquido resultante se acidificó por agregado de 250 cc. de SO_4H_2 (1:1) y los ácidos liberados se extrajeron por agitación con éter etílico hasta agotamiento. Los líquidos etéreos se lavaron repetidamente con agua, hasta reacción neutra al tornasol, secaron con SO_4Na_2 , se recuperó el éter por destilación a Baño María y secó en estufa de vacío a $100^\circ C$ hasta constancia de peso. Se obtuvieron 285,4 gr. de "ácidos totales" lo que representa el 95,07% de grasa. Sobre los mismos se hicieron las siguientes determinaciones:

Indice de Iodo:	94,5
Indice de saponificación	202,8
Peso molecular medio (calc.)	276,6

5º) Obtención de los ácidos "sólidos" y "líquidos"

Como ha sido citado, en esta separación se aplicó el método de Twitchell (17). 249,6 gr. de ácidos totales se disolvieron en 1250 ml de etanol de 96%; por otra parte 175 gr. de acetato de plomo neutro se disolvieron en igual cantidad de etanol adicionado de 30 ml de ácido acético glacial. Esta última solución hirviente, fué añadida a la primera también en ebullición dejando la mezcla por 24 horas a la temperatura de $15-20^\circ C$. La parte líquida fué separada por filtración y el precipitado se

////

recristalizó en 2 lt. de etanol adicionados de 10 ml de ácido acético glacial. Después de 24 horas de reposo a la temperatura señalada, el insoluble fué aislado por filtración y lavado con pequeñas porciones de etanol. Los líquidos alcohólicos de estas dos operaciones fueron reunidos y concentrados a un pequeño volumen por destilación al Baño María en corriente de N_2 . La solución así obtenida fué diluída con agua y extraída con éter etílico hasta agotamiento. Los extractos etéreos se lavaron por agitación con agua hasta eliminación total de alcohol, sales de plomo y ácido acético; y posteriormente agitados con solución acuosa de HCl (1:1) para asegurar la total descomposición de jabones de plomo. Finalmente se lavó con agua hasta reacción neutra al tornasol, secó con SO_4Na_2 , recuperó el éter por destilación y secó en estufa de vacío a $100^\circ C$. Se obtuvieron 189,7 gr, de ácidos "líquidos".

El precipitado de jabones insolubles separados por filtración se descompuso en un vaso de precipitados con exceso de solución caliente de HCl (1:1). Cuando los ácidos se separaron en una capa superior lípida, se enfrió hasta solidificación de la misma y la torta resultante fué aislada y disuelta en éter etílico. El líquido acuoso fué extraído con éter etílico, previamente utilizado en el lavado del precipitado de Cl_2Pb , vasos y varillas empleados en esta operación. Los líquidos etéreos fueron reunidos, lavados con agua y secados con SO_4Na_2 . Por recuperación del disolvente y secado en estufa de vacío a $100^\circ C$ se obtuvieron 60,9 gr de ácidos "sólidos".

El siguiente cuadro indica los rendimientos y características observadas para estas dos fracciones.

//////

TABLA IV

Acidos	por 100 gr de aceite	por 100 gr de ac.tot.	Ind.de iodo	P M medio	Ind.de Saponif.
sólidos	23,23	24,43	211.1	263.3	15.3
líquidos	71.84	75.58	199.4	281.3	119.7

6°) Obtención de ésteres metílicos "sólidos" y "líquidos"

En operaciones separadas se esterificaron ambas fracciones empleando una cantidad de metanol igual a cuatro veces el peso de los ácidos, utilizando SO_4H_2 concentrado como catalizador en la proporción de 1 % con respecto al metanol empleado. Se trabajó por reflujo a Baño María durante 6 horas y en atmósfera de N_2 en el caso de los ácidos líquidos, después de lo cual se eliminó la mayor parte del metanol por destilación al Baño María. Los residuos de estas destilaciones se disolvieron en éter etílico lavando por agitación con agua hasta eliminación de la acidez sulfúrica, con solución de CO_3K_2 al 0,5 % para eliminar los ácidos no esterificados y finalmente con agua, Después de secar con SO_4Na_2 y recuperar el éter por destilación se secó en estufa de vacío a 100° C. La Tabla X muestra los rendimientos de esterificación y características de los ésteres obtenidos.

TABLA X

Esteres	Acidos esterificados gr.	Esteres obtenidos gr	Rendimiento %	Ind.de iodo	P M medio	Indice de saponific.
sólidos	58.18	59,8	94.3	14.2	277.0	202.5
líquidos	151.60	156.3	95.2	113.0	294.5	190.4

////

7º) Destilación de ésteres metílicos "sólidos" y "líquidos"

Como ha sido dicho se empleó una columna H.E.T.P. cuyas características pueden verse en (18). Se trabajó en vacío de 0,5 a 1 mm. de Hg y los detalles de ambas destilaciones pueden verse en las tablas III, IV, V y VI.

8º) Oxidación de las fracciones 8- 9 y 10 (sólidas)

Se trabajó siguiendo en principio la técnica de Steger y van Loon (41), por oxidación de las fracciones empleando diez veces su peso de MO_4K y veinte veces su peso de acetona. Después de aproximadamente 10 horas de ebullición a reflujo, se eliminó la acetona por destilación y el residuo se trató en caliente con cantidades suficientes de SO_4H_2 (1:2) y SO_3Na_2 para disolver los óxidos de manganeso. La solución resultante se extrajo con éter etílico hasta agotamiento, lavando posteriormente la capa etérea con agua hasta eliminación de acidez sulfúrica. Los productos ácidos se extrajeron por agitación repetida con solución diluida de HOK (5 al 10 %) lavando finalmente con agua y eliminando el éter por destilación al Baño María. Los ésteres saturados resultantes fueron pesados después de ser secados en estufa de vacío a 100°C y sobre los mismos se determinó el P M medio utilizado conjuntamente con el total de ésteres saturados calculado para esas fracciones en el cálculo de composición de las mismas.

El siguiente cuadro resume los valores obtenidos en estas oxidaciones para los ésteres saturados, figurando también el Índice de Iodo de los mismos determinado como un control de las oxidaciones.

////

TABLA XI

F	Cdad.en ensayo (gr)	Est. sat. obt.	I.S. est. sat.	P M est. obt.	I I est. sat.
B	2.4460	1.7082	203,7	275.3	3.4
9	3.0436	2.0899	193,1	290.5	3.1
R	0.8810	0.5376	184,2	304.5	9.6

9°) Oxidación de las fracciones 1-2-3 y 4 (líquidas)

La poca cantidad de material disponible obligó a recuperar los ácidos contenidos en los líquidos resultantes de la determinación de Índice de saponificación de estas cuatro fracciones. Posteriormente se los reesterificó con metanol y sobre los ésteres así obtenidos se efectuaron las oxidaciones en la forma ya descripta. Los rendimientos en ésteres saturados y características de los mismos figuran a continuación

F	Cdad en oxid.(gr)	Est.sat. obt. (gr)	IS	PM.M.	II
1	1.0430	0,6446	231,5	242,3	5,0
2	1,5336	0,5438	213,8	262,4	4,7
3	1,7020	0,5104	207,0	271,0	4,8
4	2,0190	0,7481	205,1	273,5	3,5

10) Determinación del contenido en ácido octobromocaraquidónico en el residuo de destilación de los ésteres líquidos.

Se trabajó sobre 1,5336 gr de ácidos del residuo obtenidos por saponificación del mismo. Esta cantidad de ácidos se disolvió en

////

30 ml de éter etílico anhidro y la solución resultante se enfrió a 0° C. Posteriormente se agregó Br₂ hasta color rojo persistente, observándose la formación de un precipitado blanco que fué separado por filtración y lavado a fondo con éter anhidro y frío empleando un crisol de placa filtrante G 4 previamente tarado. Por secado a 100° C hasta constancia de peso se obtuvo 0,1037 gr. de derivado bromado, que fundió con descomposición y evolución de gases a 230-232° C. indicando que se trataba del ácido octobromo-araquidónico. Esta determinación fué empleada en el cálculo de composición del residuo señalado como ya ha sido descripto.

Sospechando la probable presencia de araquidonato de metilo en las últimas fracciones de la destilación de los ésteres líquidos, se hizo una determinación de polibromuros en la fracción 14, con resultado prácticamente negativo.

11) Sobre el aislamiento de un ácido tetrahidroxilaraquídico

Teniendo en cuenta que Mare y Shorland (38) afirman haber aislado un ácido tetrahidroxilaraquídico de P.F. 128° C por oxidación de los ácidos de una fracción de destilación de los ésteres metílicos de una grasa de cerdo, y habiendo observado que la fracción 8 de la destilación de los ésteres metílicos sólidos fué calculada con un alto contenido en ácido eicoseadienónico, resolvimos aplicar sobre un resto de los ácidos de la misma el procedimiento de oxidación de Lapworth y Mottram (39). Con este fin 1,56 gr. de ácidos de la fracción 8 se disolvieron en 15 ml de HOK al 10% y 1.300 ml de agua. Por agregado de hielo se llevó la temperatura a unos 5-10° C añadiendo entonces 100 ml de solución de M₂O₄K al 1%; después de cinco minutos se agregó un exce-

////

so de SO_3Na_2 y 45 ml de HCl concentrado. Los ácidos precipitados se separaron por filtración lavándose los a fondo con éter de petróleo para eliminar los ácidos saturados. El insoluble final se recrystalizó por dos veces de alcohol obteniéndose un producto cristalino con P.F. 127-129° C que cristalizado nuevamente de acetato de etilo (empleado por los autores citados) no produjo un aumento en la temperatura de fusión. Pese a la concordancia observada en esta temperatura de fusión no puede afirmarse el aislamiento de un ácido tetrahidroxiaaraquídico, ya que resulta difícil admitir la separación total de los derivados hidroxilados de los ácidos octodecenóico y eicosenóico calculados también en la fracción aunque en menor proporción.

12) Derivados bromados insolubles en éter de petróleo en la fracción 8 (sólidos).

Ya que en esta última fracción el único ácido dietilénico calculado corresponde a un eicosadienóico, se trató de obtener su derivado bromado por bromuración de los ácidos de esa fracción a 0° C y empleando éter de petróleo como disolvente. La cantidad excesiva de ácidos saturados presentes obligó a separarlos previamente enfriando a 0° C la solución en éter de petróleo hasta no observar más precipitación, efectuando la bromuración sobre la solución así depurada. Se obtuvieron como derivados bromados, líquidos aceitosos que no pudieron ser cristalizados, pero que al menos prueban la existencia de ácidos dietilénicos en más de C_{18} , ya que éstos no producen derivados bromados insolubles en éter de petróleo en caso de la grasa humana. Mare y Shorland (loc. cit.) en el caso de la grasa de cerdo y en una fracción de composición muy semejante, también obtuvieron derivados bromados acei-

////

tosos.

13) Sobre el contenido en insaponificable del residuo y últimas fracciones de destilación líquidas.

El elevado peso molecular obtenido por determinación directa en todas estas fracciones fué corregido por la presencia de pequeñas cantidades de insaponificable. Estas fueron determinadas por extracción con éter etílico sobre los líquidos resultantes de las determinaciones de índice de saponificación. Las cantidades obtenidas en las fracciones destiladas fueron muy pequeñas (0,014 a 0,030) para el total de fracción, mientras que en el caso del residuo, se encontró que este contenía 0,2 gr de material insaponificable como puede verse en la Tabla VI.

////

CONCLUSIONES

- 1) Se ha efectuado una revisión bibliográfica sobre temas relacionados con la composición química de grasa humana de depósito.
- 2) El material graso de un pánículo abdominal subcutáneo de mujer, obtenido en una lipectomía, fué empleado en un estudio de composición química en ácidos grasos. Por destilación fraccionada en vacío de los ésteres metílicos de los ácidos "sólidos" y "líquidos", se obtuvieron los siguientes resultados, expresados en ácidos % de ácidos totales:

Acido Mirístico	1,5
Acido Palmítico	20,8
Acido Estearico	2,2
Otros Acidos Saturados (como araquídico)	0,1
Acido Tetradecenico	0,4
Acido Hexadecenico	3,2
Acido Octodecenico	38,7
Acido Octodecadienico	24,8
Acido Eicosenico	2,8
Acido Eicosadienico	3,3
Acido Eicosatetraenico (Araquidónico)	0,4
Otros Acidos no Saturados (como Docosenico)	1,8
	<u>100,0</u>

Corresponde considerar como "componentes ácidos mayores" a los ácidos palmítico, octodecenico y octodecadienico.

- 3) Como "componentes ácidos menores", han sido calculados todos los

////

señalados por Cramer y Brown (loc. cit.), autores del más completo estudio de composición de grasa humana de depósito.

Los ácidos tetradecanóico y hexadecanóico, fueron calculados por segunda vez como componentes de grasa humana. En cambio no pudo confirmarse por cálculo la presencia de ácido láurico.

- 3) En el grupo de los ácidos no saturados en C_{18} , no se pudo probar la existencia de ácidos octodecatrienóicos. Tampoco pudieron aislarse derivados bromados insolubles en éter de petróleo, lo cual se atribuye al hecho, ya señalado, de que en grasa humana existen, junto al linoléico, numerosos isómeros del mismo.
- 6) Las principales observaciones de interés se refieren a los ácidos no saturados en C_{20} . Además del eicosatetraenóico (araquidónico), caracterizado y determinado a través de su octobromuro (ya señalado en trabajos anteriores), han debido ser calculados ácidos mono y dietilénicos (eicosenóico y eicosadienóico) como única solución en la resolución de composición de algunas fracciones de destilación.

En grasa humana, puede afirmarse la inexistencia de ácidos en C_{20} trietilénicos.

- 7) Ha sido probada la existencia de muy pequeñas cantidades de ácidos saturados con más de 18 átomos de carbono, que fueron calculados como araquídico.
 - 8) Fué también establecida la presencia de ácidos no saturados con más de 20 átomos de carbono, que fueron calculados en ácido docosenóico (C_{22} monoetilénico).
-

BIBLIOGRAFIA

- (1) - JAECKLE H.- Z. physiol. Chem. 36 - 53- (1902)
- (2) - ECKSTEIN H.C.- J. Biol. Chem. 64 - 797 - (1925)
- (3) - WAGNER O. - Biochem. Z. 174 - 412 - (1926)
- (4) - HEIDUSCHKA A.- HANDRITSCHK C. Biochem. Z. 197 - 404- (1928)
- (5) - CATHCART E.P. - CUTHBERTSON D.P. - J. Physiol. 72 - 349 - (1931)
- (6) - CUTHBERTSON D.P. -TOMPSETT S.L. - Biochem. J. 27 - 1103 (1933)
- (7) - STOLFI G. Boll. Soc. ital. biol. sper. 9 - 108 - (1935)
- (8) - CRAMER D.L. -BROWN J.B.- J. of Biol. Chem. 151 - 427 - (1943)
- (9) - BROWN J.B. -STONER G.G. - J. Amer. Chem. Soc. - 59 - 6- (1937)
- (10) - BROWN J.B. -STONER G.G. - J. Amer. Chem. Soc. - 59 - 3- (1937)
- (11) - EARLE F.R. - MILNER R.T. - Oil and Soap - 17 -106- (1940)
- (12) - BROWN J.B. - Chem. Revs. - 29 - 333 (1941)
- (13) - DE GRAY R.J. - Ind. Eng. Chem., Anal.Ed. 13 - 22 - (1941)
- (14) - RIEMENSCHNEIDER. TUREB Y SPECK - Oil and Soap, 20 - 169-(1943)
- (15) - ROSENMUND- KUHNHEHN - Z. Nahr. u. Genussm. 46 - 154 - (1923)
- (16) - HILDITCH T.P. "The Chemical constitution of natural fats",
Londres, (1941).
- (17) - TWITCHELL E. - J. Ind. Eng. Chem. 13 - 806 - (1921)
- (18) - LONGENECKER H.E. - J. Soc. Chem. Ind. -56 - 199 T- (1937)
- (19) - MC CABE Y THIELE - Ind. Eng. Chem. 17 - 605 - (1925)
- (20) - HILDITCH T.P. - Biochem. J. - 28 - 779- (1934)
- (21) - BALDWIN A.R. -LONGENECKER H.E.- Oil and Soap - 32 -151-(1945)
- (22) - HALTLEY - J. Physiol. - 38 - 353 - (1909)
- (23) - LEVENE - SIMMS - J. Biol. Chem. - 48 -185- (1921); 51 - 285-
(1922)
- (24) - WESON - J. Biol. Chem. 60 - 183 - (1924).
- (25) - CARTLAND- HART - J. Biol. Chem. 66 - 619- (1926)

////

FOOTNOTES

- (26) - BLOOR - J. Biol. Chem. - 68 - 33 - (1926)
- (27) - BROWN - J. Biol. Chem. - 80 - 455 (1928)
- (28) - BROWN - J. Biol. Chem. - 83 - 777 (1929)
- (29) - SHINOWARA-BROWN - J. Biol. Chem. - 134 - 331 - (1940)
- (30) - DOLBY - MUNN - SMEDLEY - Biochem. J. - 34 - 1422 - (1940)
- (31) - MOWRY - BRODE - BROWN - J. Biol. Chem. 142 - 679- (1942)
- (32) - BULL - Ber. - 39 - 3570- (1906)
- (33) - TAKANQ - J. Soc. Chem. Ind. Japan - 36 - 1317- (1933)
- (34) - TOYAMA - TSUCHIYA - J. Soc. Chem. Ind. Japan - 37 - 14B-17B-
(1934)
- (35) - MC KINKEY-JAMIESON - Oil and Soap, 13 - 289- (1936)
- (36) - GREEN - HILDITCH- STAINSBY - J. Chem. Soc. 1750- (1936)
- (37) - FOREMAN - BROWN - Oil and Soap - 21 - 183- (1944)
- (38) - MARE - SNORLAND - Analyst - 69 - 337- (1944)
- (39) - LAPWORTH-MOTTRAM - J. Chem. Soc. 127 - 1629- (1925)
- (40) - LONGENECKER-BALDWIN - J. Biol. Chem. 154 - 255 - (1944)
- (41) - STEEGER - VAN LOON - Rec. Trav. Chem. 52 - 593 - (1933)

Ey. C. ...