

Departamento de Química Orgánica de Barcelona, del Instituto
"Alonso Barba" de Química. Universidad de Barcelona.

Acerca de la bilis de atún (*Thunnus Thynnus*) *

por José Castells y José Pascual

(Recibido para publicar el 28 de marzo de 1953)

La bilis del atún se extrae por simple expresión de su vejiga biliar, y se presenta como un líquido rojo oscuro, de olor característico, que fácilmente forma una espuma intensa y persistente de color dorado. Se conserva bien con sólo añadirle un 1 % de sosa cáustica, pudiendo así transportarse y guardarse cómodamente para su estudio.

T. SHIAMADA (1) le asigna un contenido de 0'18 gramos de colessterina, y 1'73 gramos de ácido cólico por litro.

Nuestros trabajos se han realizado con bilis de atunes procedentes de la almadraba de Barbate de Franco (Cádiz), de la campaña de los meses de junio y julio. En otras ocasiones se ha trabajado con bilis de la misma procedencia y de campaña indeterminada. Los resultados han sido siempre análogos.

La bilis, guardada con álcali, según hemos dicho, se decanta de los mucilagos y restos insolubles que la acompañan y cuya separación por filtración resulta difícil. Una extracción directa con éter da 2 gramos de colessterina bruta por litro, que se convierte por saponificación y recristalización en 1'7 de substancia pura.

Separada la colessterina se saponifica la bilis, previa adición de una proporción de 10 % de KOH (o de NaOH), en autoclave a 140-150°, durante 20 horas. Después se precipita con ácido clorhídrico, que al principio puede ser 4 ó 2N, pero al final conviene

* Este trabajo fué realizado con motivo de un encargo del Consorcio Nacional Almadrabeto al Patronato «Juan de la Cierva» de Investigación Teórica, referente al aprovechamiento de las bilis del atún. Dicho Consorcio concedió una pensión durante un año a uno de nosotros (J. C.) y facilitó los productos necesarios.

que sea 0'5N. Si la precipitación tiene lugar estando la bilis recubierta de éter de petróleo (o ciclohexano), se recogen en éste los ácidos grasos (unos 5 gramos/litro), mientras los ácidos cólicos precipitan en forma de un magma consistente, pegado a las paredes, del cual el líquido madre y las aguas de lavado se decantan fácilmente. El aspecto es análogo si se precipita sin separar los ácidos grasos.

El magma referido se seca al vacío a 100° sobre KOH. Queda una masa pulverizable, que se somete a tratamiento con alcohol, como se describe en la Parte Experimental, para llegar a ácidos cólicos cristalizables. Por repetidas cristalizaciones en cantidades de alcohol que al principio no conviene que sean superiores a 1'5 veces el peso de ácidos, pues cuando impuros son muy solubles, y que después deben aumentarse, se llega a obtener 19 gramos de ácido cólico prácticamente puro por litro de bilis.

Hasta el momento, y a pesar de varios ensayos, no ha sido posible caracterizar otros ácidos cólicos.

Material y métodos

Extracción de colesteroína. — Un litro de bilis alcalinizada se extrae con 700 ml. de éter, en porciones de 100 ml. Los últimos ml. no extraen prácticamente nada. Se lava el éter con un poco de agua, se seca sobre sulfato sódico y se destila; quedan 2 gramos de producto sólido, de color amarillo y buen aspecto. Se recrystaliza en alcohol y a pesar de hacerlo repetidamente, su f. es 140-141'5°. Se hierva a reflujo durante 6 horas con KOH 2N alcohólica; se vierte la solución en agua, se filtra, se lava con agua y luego con alcohol y se seca a 0'05 mm. y 100°: f. 143-145°. Reacción positiva de SALKOWSKI y LIEBERMANN-BURCHARD. $[\alpha]_D^{20} = -39^\circ$ (en CHCl_3).

La extracción también se ha efectuado con éter de petróleo, obteniéndose un producto bruto menos coloreado, pero la extracción completa exige mayor volumen de disolvente.

La extracción de colesteroína se hace de un modo más cómodo y con menos disolvente, usando un perforador con agitación (2): con éter la extracción dura una jornada y con éter de petróleo, dos.

Obtención del ácido cólico. — La bilis, de la que se ha extraído la colesteroína y eliminado el éter disuelto, se alcaliniza al 10 % con KOH o NaOH, y se saponifica en autoclave, utilizando en cada operación 1 ó 1'5 litros, a una temperatura de 140-150° durante 18-20 horas.

Un litro de bilis saponificada se introduce en un matraz de tres bocas, dispuesto para enérgica agitación. Se agregan 300 ml. de éter de petróleo o ciclohexano, se inicia la agitación y se hace gotear HCl 4N. En la boca libre del matraz se coloca

un tapón con un tubito alargado en punta, para que la superficie de evaporación sea mínima. Próxima la neutralización, se acidifica lentamente con HCl 1 ó 0'5N: pronto se inicia la separación, de una pasta oscura y pegajosa, que se adhiere al agitador y a las paredes del matraz. Hacia el final de la acidificación (acidez al congo), la agitación se hace muy difícil.

Se deja en reposo durante un día y se separa por decantación el líquido acuoso y el éter de petróleo, de la pasta precipitada; se separan luego los dos líquidos entre sí. Se lava la capa acuosa con unos 100 ml. de éter de petróleo (o ciclohexano), que se unen a los otros 300, que son ligeramente coloreados. Las soluciones etéreas reunidas se extraen un par de veces con KOH 2N, se acidula el extracto y se extrae con éter ordinario. Después de secar y evaporar queda un aceite rojizo, que, con el tiempo, se solidifica en parte. Pesa 5 gramos. No ha sido estudiado.

Es difícil sacar del matraz el producto semisólido precipitado. Generalmente lo redisolvemos en amoníaco 2N y lo reprecipitamos en un vaso de precipitados grande. En las últimas operaciones hemos agitado con un vibroagitador, que nos ha sido de gran utilidad.

Caso de no interesar la separación de los ácidos grasos, la bilis seaponificada se acidifica directamente en el vaso de precipitados.

Después de un día de reposo, se separa por decantación el líquido acuoso del producto precipitado; se lava éste con agua y con ayuda de una espátula se desprende de las paredes del vaso y del agitador y se pasa a un desecador de vacío en caliente, que contiene potasa sólida. Se calienta a b. m. a ebullición, durante una o dos horas, y se deja enfriar. La masa, anteriormente pastosa, aparece formando un vidrio, que puede pulverizarse en el mortero. El producto seco y pulverizado (conteniendo ácidos grasos) pesa 92-98 gramos, dependiendo de las condiciones de desecación.

A 18'5 gramos de ácidos brutos (procedentes de 200 ml. de bilis), se agregan 27 ml. de alcohol ordinario y se dejan en la sacudidora durante una jornada. Se deja reposar la mezcla por una semana (es posible que con menos tiempo la formación de polvo cristalino fuera ya completa). Se filtra por vidrio frito número 4 y buena succión, pues el líquido filtrado es muy espeso. Se escurre bien, sin lavar. Se completa la desecación del sólido a b. m.: 9'2 gramos. Este sólido se hierve a reflujo con 20 ml. de alcohol y se deja reposar 3 días. Se filtra por vidrio frito y se lava con 1 ml. de alcohol: 6'5 gramos de producto seco. Los 6'5 gramos se disuelven en 50 ml. de alcohol, se hierve a reflujo con 0'5-1 gramos de carbón activo, se filtra en caliente y se concentra aproximadamente a 20 ml. La solución tiene aún color bastante intenso. Pasados un par de días se filtran los cris-

tales, se lavan con poco alcohol y se secan : 4'5 gramos. Por nueva disolución en alcohol y concentración a unos 10 ml., se obtienen 3'9 de ácido cólico blanco f. 193'50. Apurando las aguas madres de las últimas cristalizaciones, puede obtenerse alguna nueva cantidad de ácido cólico impuro.

Por recriсталizaciones sucesivas en alcohol se eleva la f. del ácido cólico hasta 198°, 5-199°, 7. Reacción de Mylius positiva. $[\alpha]_D^{21} = +38^\circ$ (en CHCl_3 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ — 4 : 1). Metilester : f 153-6°.

Resumen

Ha sido estudiada la bilis del atún y se encontró en estado puro 1'7 gramos/litro de coleslerina y 19 gr./litro de ácido cólico. No ha sido posible determinar otro ácido biliar.

Summary

The bile of the tunny fish has been studied and 1,7 g of cholesterol and 19 g of cholic acid, both pure, in a liter, have been obtained. It has not been possible to characterize any other bile acid as yet.

Bibliografía

- (1) The Journal of Biochemistry (Japón). **26**, 181-5, 1937.
- (2) El aparato diseñado con este fin, es el descrito en ION, **11**, 425, 1951.