

Aislamiento y determinación de la estructura de dos isómeros del ácido eicosatrienoico a partir de hígado de rata

M.^a E. Rivera *

Physiologisch-chemisches Institut. Universität Köln (Alemania)

(Recibido el 16 de enero de 1970)

M.^a E. RIVERA. *Isolation and Structure Determination of Two Isomers of Rat Liver Eicosatrienoic Acid*. R. esp. Fisiol., 26, 245-252, 1970.

The effect of feeding linoleate and linolenate together, upon the fatty acid composition of liver phospholipids of weanling rats previously fed a fat free diet was investigated.

Feeding with linoleate and linolenate caused a decrease in fatty acids, whilst fatty acids synthesized from linoleate and linolenate were incorporated into phosphatides.

The eicosatrienoic acid oleic type did not completely disappear, and was found together with a second isomeric form which was not present in rats fed a fat free diet.

The structure of the second isomer was determined by both oxidative and reductive ozonolysis. It was found to be the $\Delta^{8,11,14}$ -C_{20:3}, which is an intermediate product in the synthesis of arachidonic acid.

Los ácidos polienoicos de los fosfátidos son principalmente ácidos grasos de cadena larga, número par de carbonos, del tipo de los ácidos linoleico y linolénico, es decir, tienen el doble enlace más cercano al grupo metilo terminal en la misma posición que los ácidos linoleico y linolénico. Entre los dobles enlaces media siempre un grupo metileno.

La composición de dichos ácidos polienoicos depende de la dieta. Cuando al animal se le suministra una dieta carente de grasa, se sintetizan principalmente ácidos del tipo del oleico y, en menor cantidad, ácidos del tipo del palmitoleico (14), probablemente para suplir la carencia de áci-

dos polienoicos, sintetizando ácidos semejantes en la longitud de cadena y número de enlaces, pero no en la posición de éstos y, por consiguiente, carentes de actividad esencial. Al administrar los ácidos linoleico y linolénico (11) se produce una regresión de los síntomas, junto a una disminución de la cantidad de ácidos grasos del tipo del oleico, principalmente del ácido eicosatrienoico; a partir de los ácidos linoleico y linolénico se sintetizan ácidos polidesaturados, que se acilan principalmente en la posición β de los fosfátidos (16).

Ahora bien, si se dan ambos ácidos grasos conjuntamente, cabe la posibilidad de que se presenten productos del metabolismo intermediario. Con el fin de investigar una posible interacción de ambos ácidos

* Dirección actual: Max Planck Institut für Ernährungsphysiologie, Dortmund (Alemania).

grasos esenciales, se ha realizado el presente trabajo.

Material y métodos

EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS. Se llevó a cabo siguiendo el método de FOLCH *et al.* (3). El tejido se homogenizó con cloroformo:metanol (2:1, v/v), y se extrajo con 20 volúmenes de dicha mezcla. Se filtró, y se lavó el filtrado con 0,2 volúmenes de solución de NaCl al 0,1 %, para eliminar las sustancias no grasas.

El extracto se evaporó a sequedad, se disolvió en éter etílico, y se separaron los lípidos no solubles — esfingolípidos — por centrifugación. Se logró una obtención prácticamente completa de los fosfátidos por precipitación de los mismos en acetona (en la solución quedó solamente 0,1 % de fósforo lipídico).

OBTENCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS. Los fosfátidos se escindieron por calentamiento a reflujo con solución metanólica de HCl al 5 %, y se extrajeron los ésteres metílicos de los ácidos grasos con éter de petróleo (P.E. 30-60° C). Para eliminar el insaponificable, se hirvieron éstos a reflujo con potasa metanólica 0,5 N, se extrajo el insaponificable con éter etílico:éter de petróleo (1:1, v/v), se acidificó la solución acuosa con HCl 6 N (manteniéndola sobre baño de hielo), y se extrajeron los ácidos grasos libres con éter de petróleo (P.E. 30-60° C). Estos se esterifican nuevamente con solución metanólica de HCl al 5 %.

FRACCIONAMIENTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS SEGÚN EL GRADO DE DESATURACIÓN. Siguiendo el método de JANTZEN y ANDREAS (7, 8), los aductos de mercurio de los ácidos grasos esterificados se fraccionaron por medio de una cromatografía sobre columna de ácido silícico. Los aductos se sembraron disueltos en una pequeña cantidad de benceno. Los ésteres

saturados se eluyeron con 150 ml de benceno, los aductos de los ésteres monoenoicos con 100 ml de éter etílico, y los de los polienoicos con 150 ml de metanol:acético glacial (9:1, v/v). Las diversas fracciones se evaporaron a sequedad, se les agregaron 10 ml de metanol, 4 ml de HCl 6 N y 5 ml de éter de petróleo (60-80° C) por gramo de aducto, y se agitaron durante una hora para escindir el aducto y regenerar el doble enlace. En el caso de los ácidos polienoicos se vio conveniente disolverlos primero en una pequeña cantidad de cloroformo, para facilitar la solubilidad, y luego agregar el resto de metanol, ácido clorhídrico y éter de petróleo. Finalmente, se extrajeron los ésteres grasos con éter de petróleo (P.E. 30-60° C).

CROMATOGRAFÍA DE GASES ANALÍTICA. Se llevó a cabo con un aparato de la casa W. G. PYE, con detector de ionización de Sr⁹⁰. Se empleó argón como gas portador, y una columna de 10 % EGS (succinato de etilenglicol) sobre tierra de infusorios (diámetro de grano 0,16-0,2 mm). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se identificaron haciendo correr un test de ácidos grasos saturados en las mismas condiciones. En el caso de ácidos grasos de elevado número de dobles enlaces se empleó el método de WOODFORD (18).

CROMATOGRAFÍA DE GASES PREPARATIVA. Se llevó a cabo con un aparato de la casa Rubarth y Cía., Hannover, con célula de conductibilidad calorífica de la casa Gowmoe y Cía., modelo 2985D. La columna de metal de 190 × 0,8 cm contenía 20 % de apiezón sobre tierra de infusorios (0,16-0,2 mm). El gas portador era hidrógeno, con velocidad de flujo de 8 l/h, y la temperatura de la columna era 230° C.

Se inyectaron 350-400 mg de ésteres metílicos de los ácidos grasos, disueltos en cloroformo hasta 1 ml. Unos tubos en U, con sendas bolas de algodón en ambos extremos, permitieron recoger el aerosol de ácidos grasos en forma de un

aceite claro. En el caso de que se eluya algo de apiezón se puede separar fácilmente aplicando la mezcla disuelta en una pequeña cantidad de éter de petróleo a una columna con 0,5 g de ácido silícico, y eluyendo con el mismo disolvente. En el ácido silícico queda retenido el apiezón.

DISTRIBUCIÓN POR CONTRACORRIENTE (1, 4). Con este método se pudieron fraccionar los ácidos grasos libres de la misma longitud de cadena según el número de dobles enlaces. Se empleó un aparato de la casa Post VSH, con 500 elementos. El sistema de disolventes fue n-heptano/acetonitrilo/metanol/acético glacial (3:1:1:1, v/v). Para cada paso de distribución se fijaron 25 oscilaciones y un tiempo para la separación de las dos fases de 1,5 minutos. El colector de fracciones recogió la fase superior, reuniendo el contenido de cuatro elementos en una fracción; cada quinta fracción se evaporó a sequedad, determinando el aumento de peso, para seguir la evolución del proceso. Los ácidos grasos se esterificaron con diazometano, y se identificaron por cromatografía en capa fina con nitrato de plata (17). El eluyente más adecuado resultó ser hexano/acetato de etilo (8:2 v/v).

ISOMERIZACIÓN ALCALINA (6). Este método permitió identificar el número de enlaces de los ácidos grasos, independiente de la longitud de cadena.

OZONOLISIS OXIDATIVA Y REDUCTIVA. Permitted localizar la situación de los dobles enlaces en la molécula de ácidos grasos. Para la ozonólisis oxidativa se siguió el método de KLENK y BONGARD (9); no se empleó, sin embargo, la columna de silicagel para el fraccionamiento de ácidos dicarboxílicos, sino que éstos se esterificaron con diazometano, y se analizaron por cromatografía de gases, empleando temperaturas de 130-150° C, con el fin de captar el ácido malónico.

La ozonólisis reductiva se realizó siguiendo el método de KLENK y BROCKER-

HOFF (10); para la cromatografía en capa fina de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas se empleó el sistema de disolventes tetracloruro de carbono/hexano/acetato acético (10:2:1, v/v), según SCHÖLLNER (15).

Resultados

Veinte ratas macho, de cuatro semanas de edad, fueron alimentadas durante dos semanas con una dieta carente de grasa, según BURR y BURR (2); a continuación se les suministraron adicionalmente 75 mg de linoneato de etilo y 75 mg de linolenato de etilo por vía oral. Al cabo de cuatro semanas se sacrificaron los animales y se les extrajo el hígado, que fue trabajado según el método indicado para obtener los ácidos grasos. Se obtuvo un total de lípidos de 12 g, de los cuales 6,8 g eran fosfátidos. La metanolisis de éstos rindió 3,6 g de ésteres metílicos de los ácidos grasos (fig. 1).

Por medio de los aductos de mercurio se verificó un fraccionamiento de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, obteniéndose 1,4 g de ésteres saturados, 0,8 g

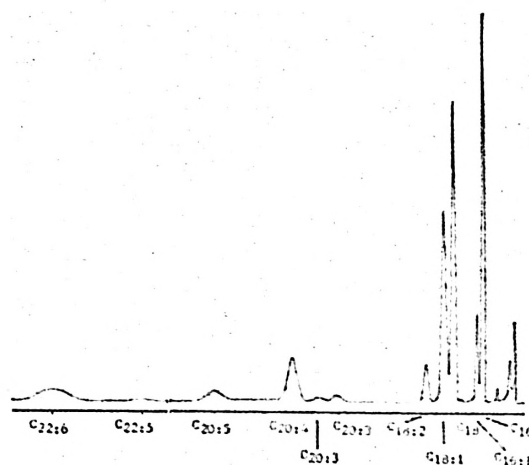


Fig. 1. Cromatograma de gases de los ácidos grasos esterificados, procedentes de los fosfátidos hepáticos.

Temperatura: 165° C.

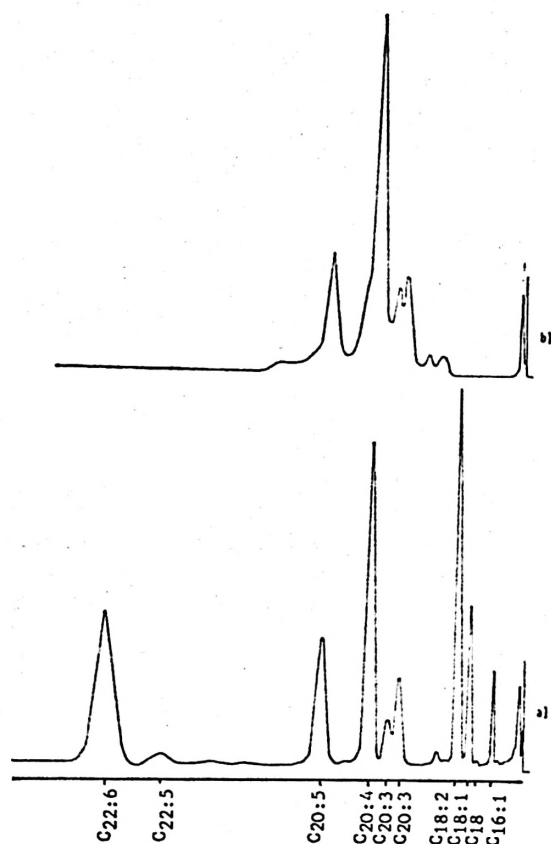


Fig. 2. Cromatograma de gases de ésteres grasos.

a) Ésteres grasos poliénoicos obtenidos por cromatografía de los aductos de mercurio. Temperatura de la columna: 175° C. b) Fracción eicosenoica obtenida por medio de la cromatografía de gases preparativa. Temperatura de la columna: 175° C.

Tabla I. Composición de los ésteres eicosanoicos, obtenidos por cromatografía de gases preparativa, a partir de la fracción poliénoica de ésteres grasos de los fosfátidos de hígado de rata.

Ester graso	%
C _{20:2}	3,70
C _{20:3}	15,75
C _{20:4}	12,33
C _{20:5}	53,90
C _{20:6}	10,71

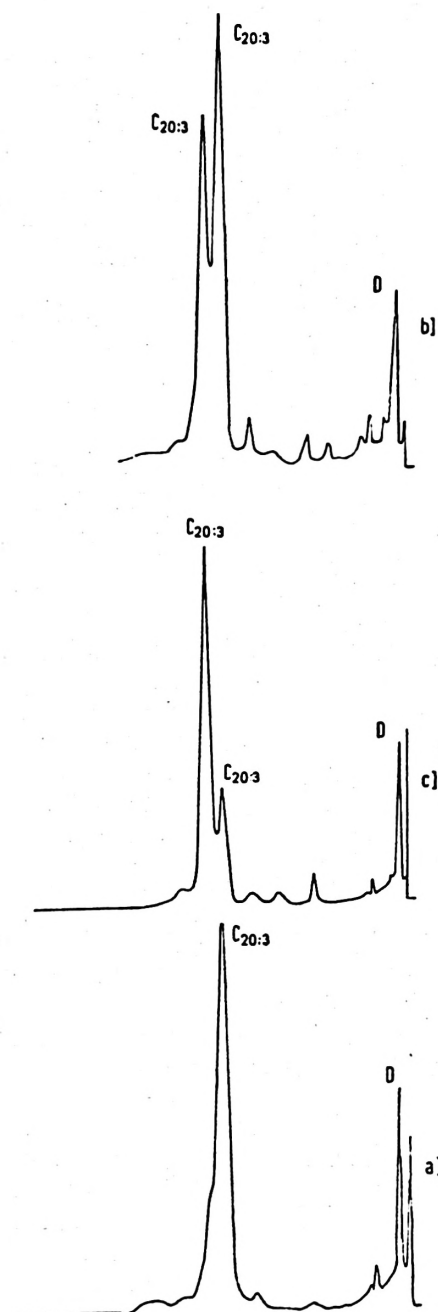


Fig. 3. Cromatogramas de gases de las fracciones donde se encuentra el ácido eicosatrienoico, obtenidas por distribución por contracorriente.

Temperatura de la columna: 175° C. a) Fracción II; b) Fracción III; c) Fracción IV. D = disolvente.

Tabla II. Composición de las fracciones de ácido eicosatrienoico, obtenidas por distribución por contracorriente.

Ester graso	Fracciones				
	I (70-75)	II (75-87)	III (88-94)	IV (95-101)	V (102-105)
C ₁₆	6,52	1,25	1,25	1,41	3,24
C _{16:1}	0,13	—	—	0,78	—
C ₁₈	1,32	—	—	—	0,76
C _{18:1}	1,32	—	1,17	—	0,52
C _{18:2}	3,85	0,94	2,14	3,13	4,40
C _{18:3}	2,76	—	0,90	3,68	7,59
C _{20:2}	—	2,15	4,64	5,94	2,74
C _{20:3}	37,70	74,40	47,80	21,30	—
C _{20:4}	37,15	19,75	38,20	59,90	58,50
C _{20:5}	4,60	1,57	2,19	3,92	22,50

de ésteres grasos monoenoicos y 1,2 g de los polienoicos (fig. 2 a).

Seguidamente se fraccionaron los ésteres grasos polienoicos según las diversas longitudes de cadena, por medio de la cromatografía de gases preparativa. A partir de 1 g se obtuvieron 83 mg de ésteres hexadecanoicos, 123 mg de ésteres octadecanoicos, 210 mg de ésteres eicosanoicos y 125 mg de ésteres docosanoicos. La composición de los ésteres eicosanoicos viene dada en la tabla I (fig. 2 b).

Los ésteres metílicos se saponificaron para fraccionar los ácidos grasos libres por distribución por contracorriente; 200 miligramos de éstos se disolvieron en los

Tabla III. Composición porcentual de los ácidos dicarboxílicos obtenidos a partir de las fracciones de ácido eicosatrienoico tras la ozonolisis oxidativa.

Fracción	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂
II	37,1	11,0	29,7	4,2
III	21,5	7,4	48,9	6,0
IV	5,1	3,7	45,1	7,1

elementos 3.º y 4.º del aparato, y se inició el proceso. El ácido eicosatrienoico se encuentra repartido entre las fracciones 75

Tabla IV. Resultados de la ozonolisis reductiva de las fracciones de ácido trienoico.

Fracción	DNFH*	mg	Mol/Mol C _{22:3}	%
II	C ₉	0,566	0,513	47,8
	C ₇	0,011	0,170	15,8
	C ₆	0,285	0,290	27,0
	C ₄	0,026	0,040	3,8
	C ₃	0,032	0,060	5,6
III	C ₉	0,133	0,240	32,5
	C ₇	0,022	0,043	5,8
	C ₆	0,175	0,365	49,5
	C ₄	0,019	0,050	6,8
	C ₃	0,016	0,040	5,4
IV	C ₉	0,087	0,158	17,7
	C ₆	0,304	0,633	71,1
	C ₄	0,022	0,050	5,6
	C ₃	0,020	0,050	5,6

* DNFH = 2,4-dinitrofenilhidrazona del aldehído.

y 107; éstas se reunieron en cinco grandes fracciones, cuya composición se indica en la tabla II.

Para la determinación de la estructura por ozonolisis se emplearon las fracciones II (11,5 mg), III (5,5 mg) y VI (9,0 mg) (fig. 3). En primer lugar se comprobó que el ácido graso presente en dichas fracciones era un ácido trienoico, por isomeriza-

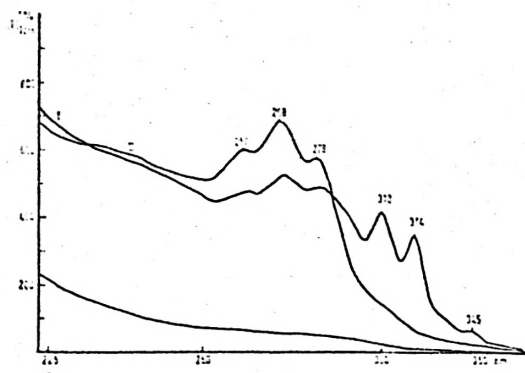


Fig. 4. Espectro ultravioleta de los ácidos C_x -pollenoicos.

I, fracción no isomerizada. II, fracción eicosenoica isomerizada por álcali. III, fracción del ácido eicosatrienoico, isomerizada por álcali.

ción alcalina. En la figura 4 se observan los tres máximos característicos de los ácidos trienoicos en 258, 268 y 278 nm. A continuación se llevó a cabo una ozonólisis oxidativa y una reductiva de cada una de las fracciones (tablas III y IV, figura 5).

Discusión

En los animales alimentados con una dieta carente de grasa disminuye apreciablemente la cantidad de ácidos grasos del tipo del linoleico y linolénico, siendo éstos sustituidos por ácidos de la familia del oleico, principalmente. La relación entre el ácido araquidónico y el ácido eicosatrienoico — del tipo del oleico — (14) puede ser un índice del estado de carencia (5).

Cuando se administran a los animales los ácidos linoleico y linolénico conjuntamente, se altera la composición de los fosfátidos y, como era de esperar, junto a una disminución de los ácidos del tipo del oleico, se incrementan los del tipo del linoleico y linolénico. Sin embargo, llamó nuestra atención la presencia de dos ácidos, cuyos tiempos de retención permiten suponer que se trata de dos isómeros del ácido eicosatrienoico.

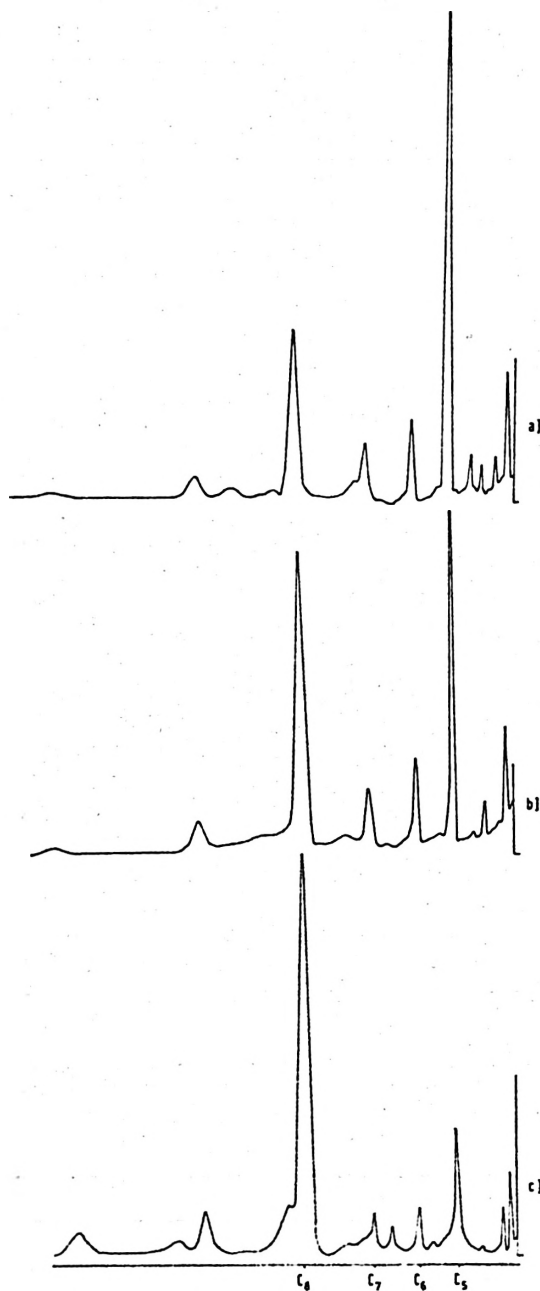


Fig. 5. Cromatogramas de gases de los ésteres metílicos de ácidos dicarboxílicos, obtenidos por ozonólisis oxidativa de los ácidos eicosatrienoicos.

Temperatura de la columna: 130° C. a) Fracción II. b) Fracción III. c) Fracción IV.

Con este fin se ha procedido al aislamiento y a la determinación de la estructura de ambos ácidos, a partir de los fosfátidos de hígado de rata.

En la elección de los métodos se ha buscado combinar la exactitud con la menor pérdida de material; de aquí que se haya elegido la cromatografía en columna de los aductos de mercurio, que permite trabajar siempre en solución y atmósfera de nitrógeno, evitando, por consiguiente, el contacto directo de los ácidos polienoicos, fácilmente oxidables, con el oxígeno del aire.

Por medio de la cromatografía de gases preparativa se procedió al fraccionamiento de los ésteres metílicos de los ácidos grasos según la longitud de cadena; es importante obtener fracciones uniformes, para poder llegar a una buena separación de los distintos ácidos según el número de dobles enlaces, por medio de la distribución por contracorriente. Este es un método más laborioso que la cromatografía en capa fina con silicagel y nitrato de plata, pero de este modo se ha conseguido separar de una forma clara los dos isómeros del ácido eicosatrienoico (fig. 3): en la fracción II predomina el ácido graso de menor tiempo de retención en el cromatograma de gases; en la fracción III se encuentran ambos en cantidades aproximadamente iguales, y en la fracción IV predomina el isómero de tiempo de retención mayor.

Para la localización de los dobles enlaces se ha procedido a la ozonólisis oxidativa y reductiva. La primera permite averiguar la longitud de cadena que media entre el primer doble enlace y el grupo carboxílico. La segunda indica, a través de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de los aldehídos, la situación del doble enlace vecino al extremo metílico.

En las fracciones II y III, la cantidad de ácido subérico correspondiente al hexanal, indica claramente que se trata del ácido $\Delta^{8,11,14}\text{-C}_{20:3}$, del tipo del ácido linoleico. En las tres fracciones se encuen-

tra un mayor porcentaje de nonanal que de ácido glutárico. Si consideramos la presencia de cantidades apreciables de ácido azelaico, podemos deducir que este exceso se debe a una contaminación de ácido oleico, $\Delta^9\text{-C}_{18:1}$. La estructura del isómero de retención menor, es pues, $\Delta^{5,8,11}\text{-C}_{20:3}$, del tipo del ácido oleico.

Cantidades apreciables de ácido pimélico y de heptanal permiten deducir la presencia de un ácido $\Delta^{7,10,13}\text{-C}_{20:3}$, de la familia del palmitoleico.

El ácido de tiempo de retención menor en el cromatograma de gases es idéntico al que se acumula en el organismo en carencia de grasa, y el segundo se puede considerar como un producto intermedio de la síntesis del ácido araquidónico a partir del ácido linoleico. Este hecho puede ser debido a que el enzima o sistema enzimático que cataliza el alargamiento de cadena y la desaturación de los ácidos grasos no tiene preferencia por uno u otro tipo de ácidos, igualmente que el enzima acilante y, por ello, no es de extrañar que se encuentren productos del metabolismo intermediario del ácido linoleico en los fosfátidos.

Resumen

Se investigó el efecto que produce la administración de linoleato y linolenato de etilo a ratas previamente alimentadas con dieta carente de grasa, sobre la composición de los ácidos grasos de los fosfátidos hepáticos.

La administración de linoleato y linolenato originó una disminución de los ácidos grasos de la familia del oleico, mientras que se sintetizaron ácidos grasos a partir del linoleico y linolénico, y se incorporaron en los fosfátidos.

El ácido eicosatrienoico del tipo del oleico no desapareció totalmente, y junto a él se encontró un isómero del mismo, que no estaba presente en ratas carentes de grasa.

Se determinó la estructura de este segundo isómero por ozonólisis oxidativa y reductiva. Resultó ser el $\Delta^{8,11,14}\text{-C}_{20:3}$, de la familia del linoleico; es un producto intermedio en la síntesis del ácido araquidónico.

Agradecimiento. Expreso mi profundo agradecimiento al Prof. Dr. E. KLENK por su interés en la dirección de este trabajo.

Bibliografía

1. AHRENS, E. H. y CRAIG, L. C.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 299, 1952.
2. BURR, G. O. y BURR, M. M.: *J. Biol. Chem.*, **86**, 587, 1930.
3. FOLCH, J., LEE, M. y SLOANE, S.: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497, 1957.
4. HECKER, E.: *Chimia*, **8**, 229, 1954.
5. HOLMAN, R. T.: *J. Nutrition*, **70**, 405, 1960.
6. HOLMAN, R. T. y BURR, G. O.: *Arch. Biochem.*, **19**, 474, 1948.
7. JANTZEN, E. y ANDREAS, H.: *Angew. Chem.*, **70**, 656, 1958.
8. JANTZEN, E. y ANDREAS, H.: *Chem. Ber.*, **94**, 628, 1961.
9. KLENK, E. y BONGARD, W.: *Z. physiol. Chem.*, **290**, 181, 1952.
10. KLENK, E. y BROCKERHOFF, H.: *Z. physiol. Chem.*, **310**, 153, 1958.
11. KLENK, E. y OETTE, K.: *Z. physiol. Chem.*, **318**, 86, 1960.
12. KLENK, E. y PFLÜGER, H.: *Z. physiol. Chem.*, **335**, 53, 1963.
13. KLENK, E. y TOMUSCHAT, H. J.: *Z. physiol. Chem.*, **308**, 165, 1957.
14. KLENK, E. y TSCHÖPE, G.: *Z. physiol. Chem.*, **332**, 193, 1963.
15. SCHÖLLNER, R. y HERZSCHUH, R.: *Fette und Seifen*, **68**, 616, 1966.
16. DE TOMÁS, M. E., BRENNER, R. R. y PELUFFO, R. O.: *Biochem. Biophys. Acta*, **70**, 472, 1963.
17. DE VRIES, B. y JURRIENS, G.: *Fette und Seifen*, **65**, 725, 1963.
18. WOODFORD, F. P. y VAN GENT, C. M.: *J. Lipid Res.*, **1**, 188, 1960.