

DETERMINACION DE LECITINA Y CEFALINA

EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS ¹

Por ALFONSO A. VIDAL ²

I. INTRODUCCION

Se designa comúnmente con el nombre de fosfolípidos, lipoides o *lipins* a todos aquellos lípidos que incluyen entre los productos de su hidrólisis a los siguientes compuestos: dos moléculas de ácidos grasos, una de ácido fosfórico y una de glicerol; algunos de ellos contienen también una molécula de una base nitrogenada y otros de un catión: calcio o magnesio.

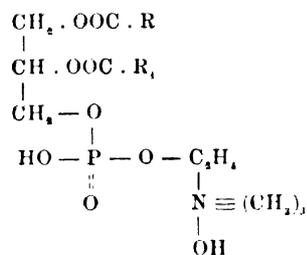
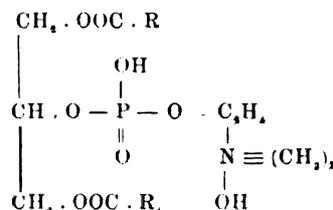
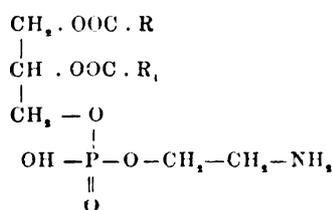
Según Rewald, B. (8) debe darse preferencia al nombre de lipoides. No son sustancias de reserva, sino que forman parte constituyente del protoplasma, atribuyéndoseles un papel importante en las propiedades osmóticas, como asimismo en los problemas oxidativos.

Los lipoides más comunes en las plantas son la lecitina, cefalina y el ácido fosfatídico, generalmente solubles en mezclas de éter y alcohol o éter de petróleo, de cuyas soluciones son precipitados

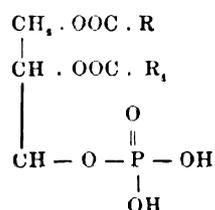
¹ Trabajo realizado en la Cátedra de Química Agrícola (Fitoquímica) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata.

² Ingeniero Agrónomo. Profesor adjunto interino de Química Agrícola (Fitoquímica) en la citada Facultad. El autor agradece al Profesor Titular Doctor e Ingeniero Agrónomo Carlos M. J. Albizzati las sugerencias formuladas.

por el agregado de acetona. La estructura química de los cuerpos citados es la siguiente:

 α -Lecitina β -Lecitina

Cefalina



Acido fosfatídico

La base nitrogenada es la que determina la diferencia entre la lecitina y la cefalina; en la primera es la colina y en la segunda la colamina, mientras que el ácido fosfatídico generalmente se encuentra combinado con el calcio y el magnesio.

Se observa, en general, en las Fanerógamas que a medida que aumenta la cantidad de materia proteica, aumenta también el porcentaje de lecitina y cefalina, especialmente en la hoja.

Cuando en las lecitinas y cefalinas, mediante un procedimiento adecuado, se separa un ácido graso no saturado, se obtienen compuestos solubles en agua, llamados isolectinas e isocefalinas, dotados de fuerte poder hemolítico.

La naturaleza de los componentes ácidos de los fosfátidos reviste interés por su importancia metabólica, ya que en los análisis practicados sobre lecitinas y cefalinas vegetales se han encontrado los siguientes ácidos grasos: palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico.

Se admite que en el metabolismo de los lípidos las grasas neutras experimentan una desaturación y se transforman en fosfolípidos, como fase preliminar de su oxidación. Los fosfolípidos absor-

ben mayor cantidad de agua que las grasas neutras y por eso son dispersados más rápidamente en los líquidos del cuerpo.

Se encuentran fosfolípidos tanto en las semillas como en las plantas; en las primeras es probable que formen material de reserva, pues desaparecen durante la germinación, pero en las hojas son parte integrante del protoplasma.

Indudablemente la glicerina participa en el destino de los hidratos de carbono; en lo que respecta a los ácidos grasos, hay evidencias que indican que la formación de fosfolípidos es uno de los primeros estados de su desintegración, proceso que se efectúa principalmente, en el caso del organismo animal, en el hígado.

Las semillas de las Leguminosas son muy ricas en proteínas y bien dotadas de materias minerales, principalmente ácido fosfórico, bajo la forma orgánica asimilable (lecitina, cefalina y nucleína); por ello se deduce que las Leguminosas tienen un valor alimenticio considerable, el que, indudablemente, depende en una cierta medida de la forma en que son consumidas.

II. REVISTA DE LA BIBLIOGRAFIA

Yokoyama y Suzuki (14) examinaron las distintas lecitinas de la soja y hallaron en la serie alfa lecitinas palmito-linoleicas, oleo-linoleicas, dioleicas y dilinoleicas.

Suzuki y Nishimoto (11) hallaron que los ácidos grasos de la cefalina de la soja contenían un 50 % de ácido linoleico y un 50 % de una mezcla de partes iguales de ácido linoleico y linolénico.

Howath (4) halló que la soja puede contener arriba de un 3 % del peso de la semilla de fosfátidos. La lecitina de la soja daba valores bajos en fósforo, que el autor pensó eran debidos a su contenido de hidratos de carbono.

Chibnall y Channon (1) hallaron que la lecitina y cefalina estaban ausentes en la hoja del repollo y que los fosfátidos eran de calcio, es decir, una especie de lecitina o cefalina, en las cuales la colina o colamina era reemplazada por el calcio.

Salisbury y Anderson (10), al estudiar los productos de la hidrólisis de la lecitina y cefalina del trigo, en lo que respecta a los ácidos grasos, hallaron que las mismas contenían un ácido no saturado de C_{16} , el cual se encontraba en mayor cantidad en la lecitina.

Jamieson, McKinney y Holton (5) estudiaron la separación de

la mezcla de fosfátidos presentes en la soja y pusieron en evidencia que en la semilla los mismos pueden estar unidos a los hidratos de carbono en compuestos parecidos a los glucósidos.

Roth y Schuster (9) establecieron que la mayoría de los fosfátidos de las semillas contenían 70-80 % de lecitina y 20-30 % de cefalina.

Tristram (13) obtuvo aproximadamente 0,1 % de fosfátidos del látex de *Hevea brasiliensis* y halló que los mismos consistían en proporciones aproximadamente iguales de lecitina y de sales de calcio y magnesio del ácido fosfatídico.

Diemair y Weiss (2) observaron que las proporciones de cefalina y lecitina en los fosfátidos de la semilla de lupino eran, respectivamente, 26 % y 74 % aproximadamente. Los ácidos grasos de la lecitina del lupino consistían aproximadamente de un 15 % de saturados (palmitico y vestigios de aráquico), y 84 % de no saturados (oleico, linoleico y linolénico).

Los análisis practicados por Hilditch, Pedelty y Zeleny (3) sobre los fosfátidos de la semilla de soja, algodón, girasol y lino han probado que el ácido linoleico es el más característico y más abundante de los componentes ácidos de los fosfátidos de la semilla.

III. MATERIAL UTILIZADO

Número de
la muestra

- | | |
|----------|---|
| 1 | <i>Phaseolus angularis</i> (Poroto arroz) 1956. |
| 2 | <i>Vigna sinensis</i> (Caupí) 1956. |
| 3 | <i>Pisum sativum</i> (Arveja ojo negro) 1957. |
| 4 | <i>Phaseolus lunatus</i> (Poroto manteca de rama) 1956. |
| 5 | <i>Lupinus albus</i> (Lupino) 1957. |
| 6 | <i>Vigna sinensis</i> (Caupí plúmbico) 1957. |
| 7 | <i>Vicia faba</i> subsp. <i>major</i> (Haba) 1957. |
| 8 | <i>Vicia faba</i> subsp. <i>major</i> (Haba de Córdoba) 1957. |
| 9 | <i>Vicia villosa</i> (Facultad) 1956. |
| 10 | <i>Glycine max</i> (Soja ootootan F 1.121) 1956. |
| 11 | <i>Vicia sativa</i> (Facultad) 1956. |
| 12 | <i>Glycine max</i> (Soja mammoth F 935) 1956. |

El material de referencia fué facilitado por las Cátedras de Horticultura y Floricultura y Forrajicultura y Praticultura de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata.

IV. METODOS DE EXPERIMENTACION

Las determinaciones analíticas fueron realizadas sobre muestras de cada una de las especies y variedades indicadas, las que fueron finamente molidas determinándose su humedad en estufa de aire a 105° C hasta peso constante.

Posteriormente se procedió a la extracción de la materia grasa, utilizando la técnica aconsejada por Lewkowitsch (7), empleando el extractor de Soxhlet, y como solventes éter etílico y luego alcohol etílico a 50° o 60°; una vez agotada la sustancia, se eliminan los solventes y el residuo se toma con acetona. El residuo que queda después del tratamiento con la acetona se utilizó para la determinación de lecitina y cefalina, siguiendo los métodos aconsejados por Thorton, Johnson y Ewan (12) y por Jordi Folch y Schneider (6) respectivamente, cuyas técnicas se indican a continuación:

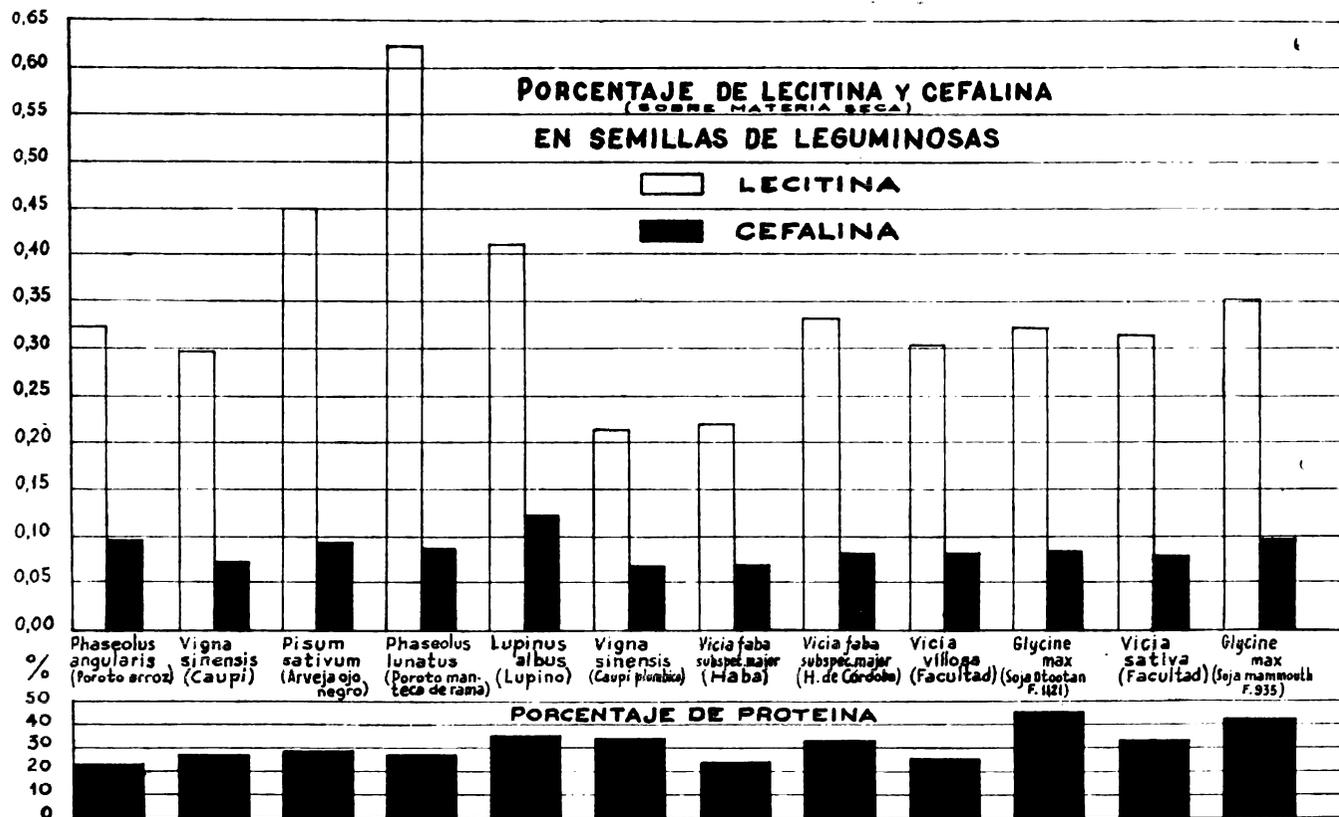
Lecitina: el residuo proveniente del tratamiento con la acetona se toma 4 ó 5 veces con alcohol absoluto, se filtra y lava con alcohol absoluto hasta que el solvente pase incoloro. El residuo A se reserva para la determinación de cefalina. Al líquido, en agitación constante, se le agrega cloruro de cadmio anhidro hasta que no se produzca más precipitación; el precipitado se separa por centrifugación, se lava con alcohol absoluto y finalmente se lo suspende en una cantidad de éter de petróleo equivalente a 150 ml por cada 10 gramos de cloruro de cadmio agregado; esta suspensión es extraída con alcohol etílico al 80 %; se necesitan aproximadamente 15 extracciones para transferir la mayor parte de sal de cadmio a la capa alcohólica; el éter de petróleo disuelto es eliminado de la solución alcohólica por evaporación a presión reducida; esta solución alcohólica fué mantenida a temperatura de -10° C durante toda la noche. Al cabo de ese tiempo aparece un precipitado que es separado por centrifugación y luego suspendido en éter de petróleo, repitiendo 2 ó 3 veces el proceso de extracción y purificación. El precipitado obtenido, completamente libre de color, es disuelto en cloroformo y la lecitina liberada del cloruro de cadmio por agregado de alcohol metílico saturado de amoniaco. El precipitado de cloruro de cadmio es extraído por centrifugación y la solución clorofórmica evaporada a sequedad a presión reducida y a 40° C en una atmósfera de nitrógeno; en esta forma se elimina

el exceso de amoníaco. Eliminado el cloroformo, la lecitina es disuelta en alcohol absoluto, en el cual es extremadamente soluble; evaporar el solvente a baja temperatura y repetir el tratamiento 2 ó 3 veces.

Cefalina: el residuo A de la extracción con alcohol absoluto es tratado 2 ó 3 veces con pequeños volúmenes de éter de petróleo para disolver la cefalina. Este extracto etéreo es concentrado a pequeño volumen al vacío, se le agrega un exceso de alcohol absoluto, inmediatamente aparece un precipitado de cefalina bruta, que es separado por centrifugación. Este precipitado se disuelve en éter etílico, se agrega a esta solución etérea unos mililitros de agua destilada a fin de obtener una solución clara que es mantenida en reposo, en un refrigerador, durante toda la noche; aparece un precipitado que se extrae por centrifugación. La solución clara es tratada con alcohol absoluto, formándose un precipitado de cefalina bruta que se separa nuevamente por centrifugación, lavándose el mismo con alcohol absoluto; la totalidad del líquido se descarta. El precipitado de cefalina bruta es emulsionado con un pequeño volumen de agua destilada, luego gradualmente se diluye a mayor volumen con agua destilada y se flocula con el agregado de 750 ml de HCl N. El precipitado es separado por centrifugación, lavado con HCl N/10 y luego con acetona. Este precipitado es secado al vacío, a temperatura ambiente, hasta peso constante.

A título informativo y de comprobación se determinó la materia proteica bruta, directamente sobre la semilla molida, siguiéndose el método de Kjeldahl-Gunning-Arnold.

Los datos obtenidos son expresados sobre sustancia seca.



V. DATOS

Número de la muestra	Especie o variedad	Humedad %	Proteína %	Lecitina %	Cefalina %
1...	<i>Phaseolus angularis</i> (Poroto arroz).	10.14	23.37	0.323	0.097
2...	<i>Vigna sinensis</i> (Caupí).	9.67	26.67	0.298	0.074
3...	<i>Pisum sativum</i> (Arveja ojo negro).	9.54	29.70	0.450	0.094
4...	<i>Phaseolus lunatus</i> (Poroto manteca de rama).	10.05	26.41	0.622	0.089
5...	<i>Lupinus albus</i> (Lupino).	8.42	35.40	0.411	0.123
6...	<i>Vigna sinensis</i> (Caupí plumbico).	9.82	34.70	0.213	0.066
7...	<i>Vicia faba</i> subsp. <i>major</i> (Haba).	9.03	23.81	0.220	0.068
8...	<i>Vicia faba</i> subsp. <i>major</i> (Haba de Córdoba).	9.63	33.13	0.332	0.081
9...	<i>Vicia villosa</i> (Facultad).	10.36	24.71	0.304	0.081
10...	<i>Glycine max</i> (Soja Ootoan F 1.121).	8.44	43.79	0.321	0.084
11...	<i>Vicia sativa</i> (Facultad).	10.28	33.41	0.315	0.076
12...	<i>Glycine max</i> (Soja mammoth F 935).	7.99	42.50	0.351	0.097

VI. SUMARIO

Sobre doce muestras de semillas de Leguminosas, finamente molidas, provenientes de los campos didácticos de las cátedras de Horticultura y Floricultura y Forrajicultura y Praticultura de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata, se realizaron determinaciones de fosfátidos: lecitina y cefalina, y a título de comprobación, de la materia proteica bruta.

Las muestras analizadas corresponden a las siguientes especies: *Phaseolus angularis*, *Phaseolus lunatus*, *Pisum sativum*, *Vigna sinensis* (dos muestras), *Vicia faba* (dos muestras), *Vicia sativa*, *Vicia villosa*, *Lupinus albus* y *Glycine max* (dos muestras), provenientes todas ellas de las cosechas 1956 y 1957, de acuerdo a lo indicado en la página 4.

En todas las muestras ensayadas se han encontrado cantidades dosables de fosfátidos correspondientes a la lecitina y cefalina, siendo por otra parte muy ricas en materia proteica bruta.

De estos dos fosfátidos, la lecitina se encuentra en proporción mucho mayor que la cefalina, pudiéndose estimar que esta relación es de aproximadamente un 70-80 % para la lecitina y un 20-30 % para la cefalina.

En general las semillas de *Phaseolus* y *Pisum* son las que contienen mayor cantidad de lecitina, siguiéndoles en orden decreciente las de *Lupinus*, *Glycine* y *Vicia*. En lo que respecta a la cefalina, si bien existe una pequeña variación de una semilla a otra, esta diferencia es menor, no existiendo una relación directa entre el porcentaje de lecitina-cefalina, como puede apreciarse en el cuadro (pág. 8).

En lo que respecta a la materia proteica bruta, no guarda, en general, una relación estrecha con el contenido de fosfátidos.

Por las razones expuestas queda confirmado que las semillas de las Leguminosas tienen un gran valor alimenticio, no sólo por la materia proteica que contienen, sino también por su tenor en fósforo orgánico (lecitina y cefalina).

Conclusiones. — 1ª Las semillas de las Leguminosas ensayadas contienen cantidades dosables de los fosfátidos: lecitina y cefalina.

2ª La lecitina se encuentra en mayor proporción que la cefalina; esta relación es de aproximadamente un 70-80 % para la primera y un 20-30 % para la segunda.

3ª No se observa una relación estrecha entre el contenido de proteína bruta y el de los fosfátidos de referencia.

4ª Las semillas de *Phaseolus lunatus* son las que contienen mayor cantidad de lecitina.

Conclusions. — 1st. The leguminous seeds tested have a valuable amount of the phosphatides: lecithin and cephalin.

2nd. The lecithin is present in higher amount than the cephalin; the ratio being 7 : 3 or 8 : 2 respectively.

3rd. There is not a close relation between the amount of crude protein and the above mentioned phosphatides.

4th. The *Phaseolus lunatus* seeds have the largest amount of lecithin.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. CHIBNAL, A. C. AND H. J. CHANNON. 1929. *The ether soluble substances of cabbage leaf cytoplasm. V. The isolation of n-nonacosane and di-n-tetradecylketone.* — *Biochem. J.* 23 : 176-259.
2. DIEMAIR, W. AND E. WEISS. 1939. *Plant phosphatides and lecithins. V. phosphatides of lupines.* — *Biochem. Z.* 302 : 112.
3. HILDITCH, T. P. H., W. H. PEDELT AND J. A. H. ZELENY. 1942. *The components fat acids of some vegetable seed phosphatides.* — *Biochem. J.* 36 : 815.
4. HOWART, A. A. 1935. *Phosphatides of the soybean.* — *Ind. Eug. Chem. News Ed.* 13 : 89-259.
5. JAMIESON, G. S., R. S. MCKINNEY AND W. B. HOLTON. 1937. *Soybean phosphatides.* — *Oil and Soap.* 14 : 126.
6. JORDI FOLCH AND HOWARD A. SCHNEIDER. 1941. *An amino acid constituent of ox-brain cephalin.* — *Jour. Biol. Chem.* Vol. 137-51.
7. LEWKOWITSCH, M. A. 1916. *Tecnologie et Analyse Chimiques des Huiles Graisses et Cires.* Tomo I. Paris.
8. REWALD, B. 1928. *The lipid question.* — *Chem. Abs.* 22-3178.
9. ROTH, H. AND P. SCHUSTER. 1940. *The preparation of mono-amino-phosphatides from plant and their determination.* — *Angew. Chem.* 53-273.
10. SALISBURY, L. F. AND R. J. ANDERSON. 1936. *The chemistry of the lipids of yeast. III. Lecithin and cephalin.* — *Jour. Biol. Chem.* 112 : 541.
11. SUZUKI, B. AND U. NISHIMOTO. 1930. *Soybean lecithins and cephalins.* — *Imp. Acad. Japan Proc.* 6 : 262 : 341.
12. THORTON, M. H., C. S. JOHNSON AND M. A. EWAN. 1944. *The component fatty acids of soybean lecithin.* — *Oil and Soap.* 21-3 : 85.
13. TRISTRAM, G. R. 1942. *The phosphatides of Hevea brasiliensis.* — *Biochem. J.* 36-400.
14. YOKOYAMA, Y. AND B. SUZUKI. 1931. *Soybean lecithin. II. Lecithin of the alla-series.* — *Proc. Imp. Acad. Tokyo.* 7-12 : 258.