

GLICOESFINGOLIPIDOS (ceramida-hexósidos) DE MUSCULO DE BOVIDO Y CERDO

Por A. López,
T. Roig y
J. Burgos

INTRODUCCION

Los ceramida-hexósidos son un grupo de lípidos polares encuadrados dentro de los glioessingolípidos, constituidos por ceramidas unidas glicosídicamente a una o más moléculas de glúcidos¹.

Las células que constituyen los diferentes tejidos animales contienen tres grupos característicos de glioessingolípidos².

a) Glioessingolípidos neutros (cerebrósidos) conteniendo uno o más residuos de glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, etc.³.

b) Glioessingolípidos, conteniendo fucosa caracterizada por el enlace terminal de la fucosa a un residuo hidrofóbico⁴.

c) Glioessingolípidos ácidos (gangliosidos) que se caracterizan por el típico residuo ácido N-acetylneuramínico en posición terminal⁵.

En el trabajo aquí descrito se estudian y caracterizan los glicolípidos presentes en el músculo Longissimus dorsi (L. D.) de bóvidos y cerdos.

MATERIAL Y METODOS

Los músculos L. D. de bóvidos y cerdos empleados a lo largo del trabajo se obtuvieron de animales recién sacrificados, y se almacenaron congelados hasta su extracción. Tanto los productos químicos como los soportes cromatográficos fueron suministrados por MERCK y BDH. Los disolventes empleados en las extracciones cromatográficas fueron redestilados antes de su uso. Para la cromatografía en fase gaseosa se emplearon nitrógeno, hidrógeno y aire de alto grado de pureza suministrados por la S.E.O.

Para la extracción y purificación del material lipídico se empleó el método de FOLCH⁶.

El fraccionamiento del material así obtenido se realizó siguiendo esencialmente el método de VORBECK y MARINETTI⁷.

Tanto para la cromatografía analítica como para la preparativa, se emplearon láminas finas de sílica gel G desarrolladas en diferentes fases móviles (ver figuras). Para el revelado de la cromatografía se emplearon los siguientes reactivos: a) Generales: ácido sulfúrico 50 % y rodamina 6G. b) Específicos: Reactivo de ninhidrina⁸, reactivo de ácido sulfúrico-antrona y reactivo de periodato-Schiff⁹, reactivo de azul de molibdeno¹⁰, reactivo de anilina-difenilamina¹¹.

Las cromatografías en papel Whatman n.^o 1 fueron desarrolladas en dirección descendente. Los cromatogramas se revelaron con el reactivo de nitrato de plata.

La hidrólisis de los cerebrósidos para la caracterización de sus componentes se realizó por dos métodos distintos:

1.-Hidrólisis ácida con HCl al 5 %, en metanol, calentando a reflujo durante 6 horas.

2.-Hidrólisis ácida con HCl 2N, en tubo cerrado, durante 3 horas a 110^o C.

El primer método se empleó para la caracterización de los ácidos grasos, que se obtienen en forma de sus ésteres metílicos; el segundo para la determinación de los hidratos de carbono, ya que por el primero se obtienen metilatos. La destilación de las bases nitrogenadas, se efectuó sobre el hidrolizado obtenido por el primero de estos métodos.

Para la determinación cuantitativa de hidratos de carbono; se emplearon dos métodos distintos: El clorimétrico de DUBOIS¹² y el densimétrico de ROBERT y REBEL¹³.

La cuantificación de las bases nitrogenadas se efectuó por el método de SIAKOTOS y col¹⁴.

El análisis de los ácidos grasos se realizó por cromatografía en fase gaseosa, empleando las condiciones descritas por LÓPEZ¹⁵.

Las cuantificaciones de los ácidos grasos identificados se efectuó siguiendo el método de STERN y SHAFIRO¹⁶.

Para la cromatografía en fase gaseosa de las bases nitrogenadas, previa transformación de estas en sus trimetilsilil derivados¹⁷ se emplearon columnas de SE30. El gas portador fue nitrógeno.

RESULTADOS

I.-Extracción y fraccionamiento lipídico

En la tabla n.^o 1 se recogen los resultados obtenidos de la extracción del músculo Longissimus dorsi de bovino y porcino, así como los porcentajes que

representan cada una de las fracciones resultantes de la cromatografía en columna de ácido silíceo de estos extractos lipídicos. La fracción eluida con

TABLA N.^o 1
Contenido en lípidos y fraccionamiento en columna de ácido silíceo de los extractos lipídicos de los músculos L. D. de bóvido y cerdo

	Peso músculo extraído	Extracto lipídico				
		(gr.)	% sobre músculo			
Cerdo	1.700	38,7	2,3			
Bóvido	627	11,1	1,8			
Fraccionamiento en columna de ácido silíceo						
	Cloroformo	Acetona	Metanol			
	gr. sobre extracto	% sobre extracto	gr. sobre extracto	% sobre extracto		
Cerdo	27,7	72,7	0,6	1,4	10,2	25,6
Bóvido	7,7	68,4	0,1	1,1	3,0	30,5

acetona, que representa el 1,4 % y 1,1 % de los lípidos presentes en el músculo L. D. de cerdo y bóvido respectivamente contiene los glicolípidos.

II.-Análisis de la fracción acetona

Aliquots de la fracción eluida con acetona, se sometieron a análisis por cromatografía en lámina fina junto con un patrón de ceramida monohexosido (Sigma). Los cromatogramas obtenidos se revelaron con los reactivos específicos para la detección de hidratos de carbono (antrona-anilina-Schiff) y la presencia de fósforo (azul de molibdeno) mostrando dos manchas en cerdo y una en bóvido de Rf 0,58 y 0,72, positivas a los hidratos de carbono y negativas al fósforo. Con el mismo fin y en igualdad de condiciones se analizaron aliquots de las fracciones cloroformo y metanol, demostrándose, solamente en la fracción metanol, la presencia de compuestos positivos al fósforo y negativos en ambas especies a los hidratos de carbono, confirmándose de este modo que la fracción acetona es la portadora de los glicolípidos presentes en el músculo L. D. de bóvidos y cerdos.

III.-Purificación de la fracción acetona

Con el fin de eliminar material contaminante presente en las fracciones acetónicas (Fig. 1A) las muestras obtenidas a partir de los extractos de ambas especies se purificaron por cromatografía en lámina fina preparativa. En la Fig. 1B se presenta una cromatografía en lámina fina de las componentes purificadas.

IV.-Estudio de los glicolípidos purificados de las fracciones acetona

a) Ácidos grasos: Los ácidos grasos presentes en los glicolípidos aislados se obtuvieron por hidrólisis (ácida a reflujo) y extracción con hexano del hidrolizado.

La cromatografía en lámina fina (Fig. 2) demostró que algunos de los ácidos grasos contenían grupos hidroxilo. Mediante cromatografía en lámina fina preparativa (diluyente indicado en la Fig. 2) se purificaron ambos grupos de ácidos grasos y se sometieron independientemente a análisis por cromatografía en fase gaseosa.



Figura 1A

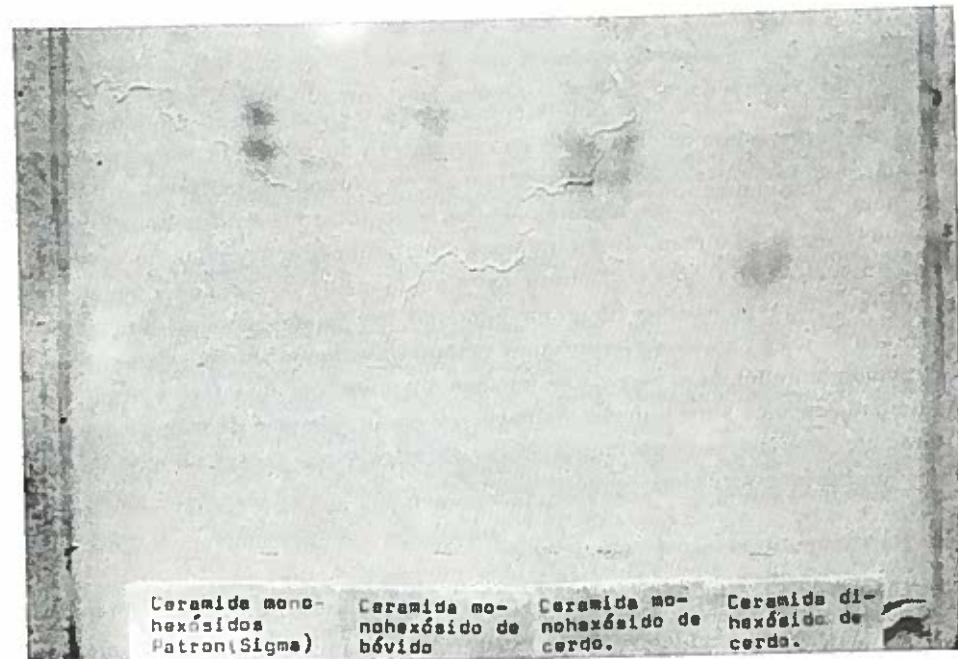


Figura 1B

Figuras 1A y 1B.-Cromatografía en lámina fina de los glicolípidos presentes en la fracción acetona antes y después de su purificación. Fase móvil: Cloroformo-metanol-agua (65-25-4).

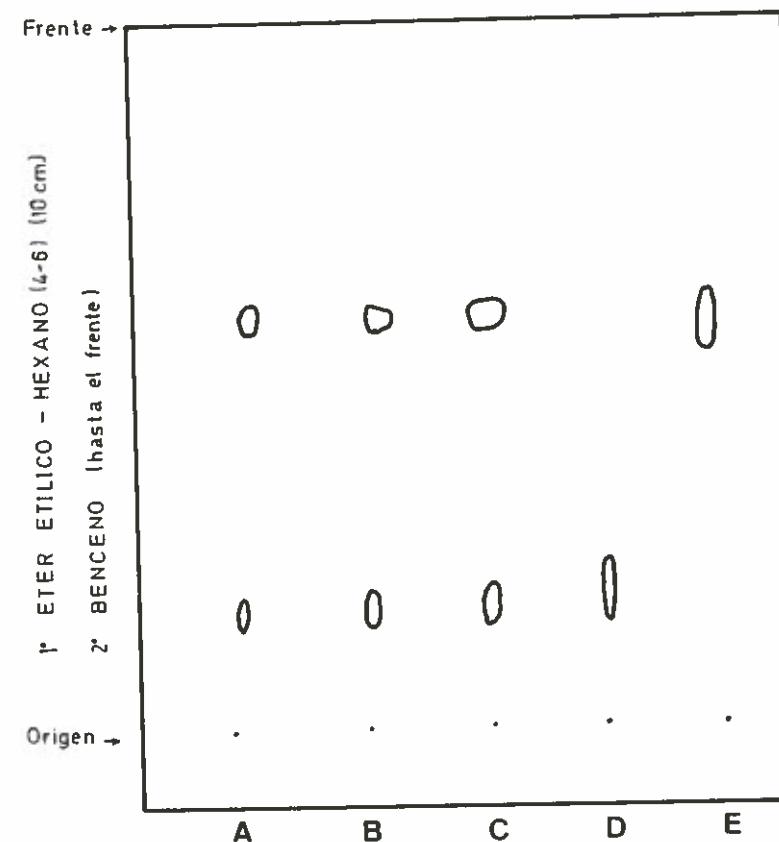


Figura 2

Cromatografía en lámina fina de las fracciones extraídas con hexano del hidrolizado de los glicolípidos purificados.

Revelador: Rodamina 6G.

A-ceramida monohexosido de cerdo. B-ceramida dihexosido de cerdo. C-ceramida monohexosido de bívido. D-ester metílico del ácido hidroxisteárico. E-ester metílico del ácido palmitíco.

La tabla 2 recoge los ácidos grasos presentes y el porcentaje que estos representan en cada uno de los glicolípidos aislados (2 en cerdo y 1 en el ganado bovino). La relación porcentual existente entre muestras purificadas, de los glicolípidos de cerdo y bóvido se recogen en la Tabla 3.

b) Bases nitrogenadas: Para el estudio de las bases nitrogenadas que forman parte de los glicolípidos aislados, se extrajo con cloroformo el residuo de la extracción con hexano del hidrolizado ácido obtenido por ebullición a reflujo. Los extractos se analizaron por cromatografía en lámina fina de silice gel, junto con patrones de bases nitrogenadas conocidas; las láminas se revelaron con ninhidrina observándose la presencia en los tres glicolípidos de una sola base nitrogenada de R_f igual al de la esfingosina. La identidad fue confirmada por cromatografía en fase gaseosa.

TABLA N.º 3
Contenido en ácidos grasos normales e hidroxiácidos de las ceramidas hexósidos del músculo L. D. de bóvido y cerdo

	Ceramida mono hex. bóvido	Ceramida mono hex. cerdo	Ceramida dihexósido cerdo
Hidroxiác. grasos	45,3 %	33,3 %	43,7 %
Ácidos grasos normales	54,7 %	66,6 %	56,3 %

sola base nitrogenada de R_f igual al de la esfingosina. La identidad fue confirmada por cromatografía en fase gaseosa.

c) Hidratos de carbono: El análisis cualitativo y cuantitativo de los hidratos de carbono presentes en los glicolípidos aislados se realizó tras eliminar, del hidrolizado en tubo cerrado, el HCl por evaporación a vacío hasta seque-

TABLA N.º 2
Porcentaje de ácidos grasos normales presentes en las ceramidas-hexósidos del músculo L. D. de bóvido y cerdo

	Ceramida mono hex. bóvido	Ceramida mono hex. cerdo	Ceramida dihexósido cerdo
C-10	traza	0,78	1,03
C-12	1,7	2,1	1,1
C-14	7,2	2,7	5,2
C-14 : 2	—	0,3	—
C-16	26,5	10,8	29,6
C-16 : 1	3,3	1,5	traza
C-16 : 2	traza	traza	traza
C-17	traza	traza	traza
C-18	47,3	35,3	52,1
C-18 : 1	6,0	16,1	6,6
C-18 : 2	3,1	17,9	1,1
C-18 : 3	4,7	2,3	2,03
C-20	traza	0,8	0,8
C-22	traza	traza	traza
No ident.	—	2,1	0,4

TABLA N.º 2 bis
Porcentaje de hidroxiácidos grasos presentes en las ceramidas-hexósidos del músculo L. D. de bóvido y cerdo.

	Ceramida mono hex. bóvido	Ceramida mono hex. cerdo	Ceramida dihexósido cerdo
C-18	100	100	3,6
C-18 : 1	—	traza	traza
C-20	—	—	1,5
C-22	—	—	9,0
No identif. (1)	—	—	12,8
No identif. (2)	—	—	67,1

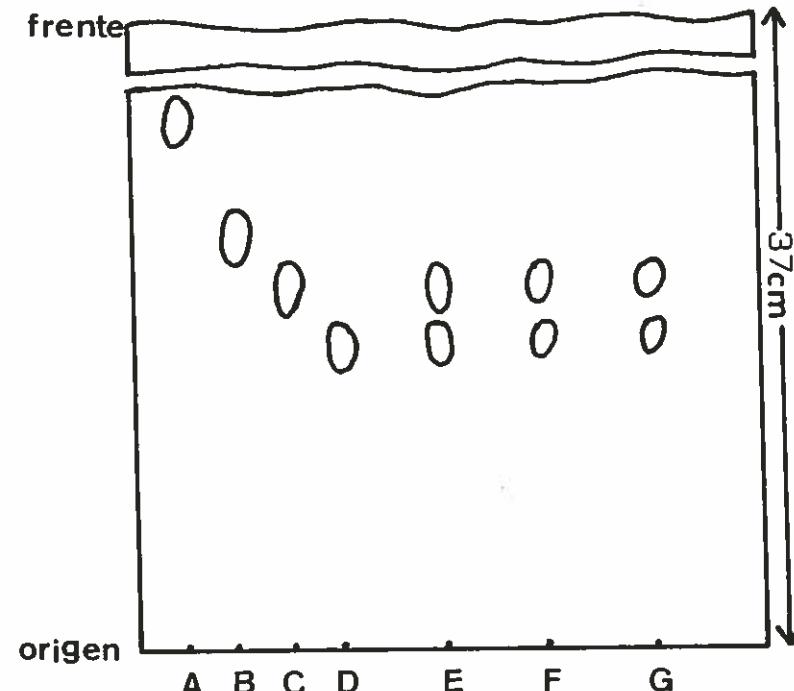


Figura 3

Cromatografía en papel descendente del extracto acuoso del hidrolizado de cada uno de los glicolípidos identificados, junto con patrones de monosacáridos.

Fase móvil: n-Butanol-piridina-agua (6/4/3).

Revelador: Nitrato de Plata.

A-glicerol; B-manosa; C-glucosa; D-galactosa; E-fracción acuosa de las ceramidas-hexosidos de bóvido; F-fracción acuosa de las ceramidas-monohexosidos de cerdo; G-fracción acuosa de las cerámicas dihexósidos de cerdo.

dad y disolución acuosa del residuo. Alícuotas del extracto acuoso fueron sometidas a análisis por cromatografía en papel descendente junto con patrones de monosacáridos. Los resultados obtenidos (Fig. 3) demuestran que los hidratos de carbono presentes en los tres glicolípidos son glucosa y galactosa. En la Tabla 4 figura el contenido total en hidratos de carbono en cada uno de los glicolípidos. El cálculo del porcentaje que representan la glucosa y galactosa en cada uno de ellos se realizó por densitometría.

En la Tabla 5 se muestra la relación molar existente entre las bases nitrogenadas, hexosas y ácidos grasos en cada uno de los glicolípidos identificados.

TABLA N.º 4
Contenido en glucosa y galactosa de las ceramidas-hexosidos del músculo L. D. de bóvido y cerdo

	Ceramida mono hex. bóvido	Ceramida mono hex. cerdo	Ceramida dihex osido cerdo
Glucosa	38,8 %	49,5 %	32 %
Galactosa	61,2 %	50,5 %	68 %

TABLA N.º 5
Relación molar entre los ácidos grasos, hexosas y bases nitrogenadas de las ceramidas-hexosidos del músculo L. D. de bóvido y cerdo

	Ceramida mono hexosido de bóvido	Ceramida mono hexosido de cerdo	Ceramida dihexosido cerdo
pmoles de ácidos grasos	0,042	0,038	0,021
pmoles de hexosas	0,05	0,04	0,04
pmoles de bases nitrogenadas	0,04	0,04	0,015

DISCUSION

Las ceramida hexosidos han sido ampliamente estudiadas durante los últimos años en una gran variedad de tejidos, tanto de origen animal como vegetal².

Trabajos recientes¹⁸ ponen en manifiesto que el establecimiento del enlace glucosídico a través del que se une la porción glucídica tiene lugar una vez sintetizada la correspondiente ceramida.

En el suero animal son especialmente abundantes en el tejido cerebral e intestino²; se han aislado también de la leche.

El contenido en glúcidos difiere con la especie y el tejido de procedencia. Así en los bóvidos los procedentes del cerebro contienen glucosilceramidas¹⁹; el intestino del cerdo ceramidas glucosídos, galactósidos y digalactoditos³, los

presentes en la membrana del glóbulo graso de la leche de bóvido son monoglucoesilceramidas y galactoglucoesilceramidas²⁰; y los del músculo aquí estudiado son monoglucoesil y monogalactosil ceramidas en los bóvidos; en el músculo del cerdo monoglucoesil y monogalactosil ceramidas y ceramidas dihexosidos contenido glucosa y galactosa.

Diferencias similares se dan en el contenido en ácidos grasos. En el cerebro de bóvido¹⁹ las cerámidas hexosidos contienen C16, C18, y C20 fundamentalmente, mientras que en el glóbulo graso de la leche de bóvido son el C16, C22 y C24 los componentes mayoritarios. Por el contrario en ceramidas-hexosidos del riñón humano²¹ el 17 % de los ácidos grasos contienen grupos hidroxi.

Los ácidos grasos de las ceramidas hexosidos por nosotros estudiados, muestran importantes diferencias, sobre todo en el contenido en ácidos grasos con grupos hidroxi.

La diferencia más significativa entre las ceramidas hexosidos del músculo de cerdo y bóvido se refiere de un lado a la existencia en el del cerdo de ceramida dihexosido que falta en el de los bóvidos y de otro al contenido en ácidos grasos con grupos hidroxi.

Es posible que un estudio más detallado de las ceramidas hexosidos del músculo permitiera utilizar estos compuestos para la detección del origen de una carne.

RESUMEN

Se han estudiado la composición en glicolípidos del músculo L. dorsi de cerdo y bóvido. Se han detectado solamente ceramidas hexosidos. El músculo de cerdo contiene ceramida monohexosidos y dihexosidos; el de bóvido sólo monohexosidos.

La base nitrogenada de las tres ceramida hexosidos es esfingosina; glucosa y galactosa son los hidratos de carbono presentes y como ácidos grasos contienen con y sin grupos hidroxi.

SUMMARY

The glycolipid composition of pig and beef L. dorsi have been studied. Only ceramide hexosides have been found. Pig muscle contains both ceramide monohexosides and ceramide dihexosides; beef only monohexosides.

The long-chain basis of three ceramide hexosides is sphingosine; their carbohydrate moiety is composed of glucose and galactose and their fatty acids of normal and hydroxy acids.

BIBLIOGRAFIA

- 1) CLARK, J. M. y SWITZER, R. L. (1977). "Experimental Biochemistry", W. H. FREEMAN and Co., San Francisco, 73-205.
- 2) STOFFET, W. (1971). "Ann. Rev. Biochemistry", **40**, 57-82.
- 3) SUZUKI y col. (1968). "Arch. Biochem. Biophys.", **127**, 140.
- 4) Mc KIBBIN, J. M. (1969). "Biochemistry", **8**, 679.
- 5) SUZUKI, K. y col. (1968). "Biochem. Biophys. Acta", **152**, 570.
- 6) FOLCH, J. y col. (1957). "J. Biol. Chem.", **226**, 497.
- 7) VORBECK, M. L. y MARINETTI, G. V. (1965). "J. Lipid Res.", **6**, 3.
- 8) WAGNER, H. y col. (1961). "Biochem. Z.", **334**, 175.
- 9) SHAW, N. (1968). "Biochem. Biophys. Acta", **164**, 435.
- 10) DITTMER, J. C. y LESTER, R. L. (1964). "J. Lipid Res.", **5**, 127.
- 11) BAILY, R. W. (1962). "J. Chromatogr.", **8**, 57.
- 12) DUROIS, M. y col. (1956). "Anal. Chem.", **28**, 350.
- 13) ROBERT, J. y REBEI, G. (1975). "J. of Chromatography", **110**, 393.
- 14) SIAKOTOS y col (1971). "Lipids", **6**, 254.
- 15) LÓPEZ, A. (1972). "An. Fac. Vet. Leon", n.º 18 (2), 613.
- 16) STERN, I. y SHAPIRO, B. (1953). "J. Clin. Path.", **6**, 158.
- 17) CARTER, H. E. y GARVER, R. C. (1967). "J. Lipid Res.", **8**, 391.
- 18) FUJINO, Y. y NAKANO, M. (1969). "Biochem. J.", **113**, 573.
- 19) NISHIMURA, K. y col. (1968). "Lipids", **3**, 262.
- 20) FUJINO, Y. y col. (1969). "Japan J. Zootech. Sci.", **40**, 349.
- 21) MAKITA, A. (1964). "Biochem J. (Tokio)", **55**, 296.