

Estudios preliminares sobre la toxicidad de muestras de ajonjolí con alto contenido de selenio

W. G. JAFFÉ, J. F. CHÁVEZ Y B. DE KOIFMAN
Instituto Nacional de Nutrición
Caracas - Venezuela

Durante los últimos años el Instituto Nacional de Nutrición ha dedicado especial atención a la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas, efectuándose una serie de experimentos para determinar el valor nutricional de proteínas vegetales y asimismo su posible aplicación en la alimentación humana. En el curso de estas investigaciones, en las cuales se estaba estudiando el valor biológico de tortas de ajonjolí, se pudo observar que algunas muestras de tortas residuales de dicho producto, procedentes de fábricas locales extractoras de aceite comestible, tenían efectos tóxicos colaterales para las ratas blancas empleadas en la investigación. Estas manifestaciones tóxicas concluían generalmente con la muerte del animal, lo que acontecía a los 1 ó 2 meses. Dada la importancia del hallazgo, se trató de encontrar la causa responsable de dichos efectos, para lo cual se planificó el presente trabajo, cuyas observaciones, resultados e interpretación resumimos a continuación.

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos biológicos se efectuaron con ratas de nuestra colonia, descendientes de la cepa "Sprague Dawley", de 3-4 semanas de edad y de 50-80 gramos de peso. Se emplearon animales machos de diferentes camadas y distribuidos de tal manera que en cada grupo experimental había igual

número de animales de cada cría. Se mantuvieron en jaulas galvanizadas individuales. Tanto la comida como el agua se les suministró "ad libitum" y eran pesados dos veces semanales. Al comienzo de algunos experimentos se tomaron muestras de sangre de la cola y se efectuaron determinaciones de hemoglobina y hematocrito. Al final del experimento se obtuvo la sangre por punción cardíaca y se efectuaron los mismos exámenes arriba indicados, además de la determinación del tiempo de protrombina.

Las tortas residuales procedentes de la obtención industrial del aceite, bien mediante el proceso de "expeller" o de extracción por solvente, fueron utilizadas después de su homogeneización en un molino de martillos. En algunos casos se obtuvo directamente semillas de ajonjolí no procesadas, siendo necesario triturar el material en un molino manual, extrayendo a continuación el aceite por medio de repetidos lavados con hexano; el residuo se secó en la estufa por 4 horas a una temperatura no mayor de 80°C, homogeneizando finalmente la torta resultante en el molino de martillos. El contenido de proteínas ($N \times 5.30$) en las tortas usadas por nosotros variaba aproximadamente entre 30 y 45%, y el de fibra cruda, entre 6 y 10%.

Las dietas experimentales se prepararon mezclando íntimamente los siguientes ingredientes: torta de ajonjolí, 40%; mezcla de sales USP XIV, 4%; aceite de ajonjolí con vitaminas A, D y E, 5%; mezcla de vitaminas del complejo B, 1% (1); almidón de yuca, 50%.

En los animales experimentales la hemoglobina se determinó como ciano-hemoglobina, según el método de Hainline (2), el hematocrito por aspiración de sangre en un tubo capilar heparinizado "Clay Adams", tapando con la masa "seal-ease" de "Clay Adams", centrifugación por 15' a 2.000 revoluciones en una centrífuga para micro-capilares "International" modelo MB, y lectura directa con el dispositivo lector para micro-capilares "International".

Para la determinación del tiempo de protrombina se aplicó la técnica de Quick (3), utilizándose una preparación de tromboplastina "Difco".

El selenio se determinó con el método de Kelleher y Johnson (4), modificado para macro-cantidades de Se *.

* La mayoría de estos ensayos se efectuaron por uno de nosotros (J. F. Ch.) en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Wisconsin, U.S.A.

RESULTADOS

En la tabla N^o 1 se presenta un resumen de algunos resultados de los primeros ensayos biológicos sobre la toxicidad de tortas de ajonjolí. Se observa que las dietas preparadas con los lotes No. 2, 3, 4 y 5 resultaron satisfactorios para asegurar un crecimiento normal de los animales, mientras que los lotes No. 1 y 6 permitieron sólo un crecimiento muy deficiente y causaron la muerte de los animales experimentales en menos de 30 días. Las diferencias entre lotes tóxicos y no tóxicos se observan claramente al cabo de 10 días.

En la gráfica N^o 1 pueden apreciarse las curvas de crecimiento de 3 grupos de ratas alimentadas con dietas a base de tortas de ajonjolí. La curva N^o 2 representa el aumento de peso promedio de animales sometidos a un lote no tóxico, y la N^o 1 el correspondiente a un lote tóxico. Las diferencias entre ambas curvas son evidentes. Puede apreciarse en este último grupo que a los 28 días de ensayo han muerto 3 ratas. Un grupo adicional de ratas fue sometido 4 días a la misma dieta tóxica empleada en los animales, cuyo crecimiento está señalado en la curva N^o 1, suministrándoles luego un comedero extra conteniendo dieta no tóxica. Es de hacer notar que a partir del cuarto día los animales prefirieron sistemáticamente la dieta no tóxica, lo cual se evidencia en la gráfica por un crecimiento intermedio entre las curvas 1 y 2.

Se efectuaron varios experimentos con el fin de separar el o los factores tóxicos de las semillas desgrasadas. En estos casos, lotes de 1 kg. de la muestra de ajonjolí N^o 1 se extrajeron con el solvente correspondiente en un aparato Soxhlet grande durante 12 horas; el extracto de una solución de NaCl al 1% se preparó mezclando el material molido con el solvente y filtrando después de 24 horas. Después de eliminar el solvente, los extractos se mezclaron íntimamente con 1 kg. de torta no tóxica. Los residuos de solvente fueron eliminados por calentamiento en estufa a una temperatura no mayor de 80°C, utilizándose la torta en la preparación de la dieta correspondiente; igualmente se usó el residuo de la torta extraída, después de liberarla de restos del solvente por el procedimiento descrito anteriormente, en la preparación de otras dietas.

Como podemos observar en la tabla N^o 2, ni el alcohol, cloroformo, hexano ni la solución salina extraen el factor tóxico, cuya acción siempre se observa en el residuo de la torta de ajonjolí extraída. Asimismo, no es destruido el efecto tóxico mediante el calentamiento a 115°C por 1/2 h. en un autoclave.

La relación existente entre el efecto tóxico y el contenido en Se de los lotes correspondientes de ajonjolí puede observarse en los datos indicados en la tabla N^o 3. El uso de ajonjolí que contiene la cantidad de 2 ppm. de Se permitió un crecimiento normal de las ratas, mientras que en los lotes que contienen 6 ó 12 ppm. de Se pudo notarse un crecimiento deficiente en los animales que consumían tales dietas. Los animales sometidos a las dietas preparadas con torta de ajonjolí, con 27 y 42 ppm. de Se, respectivamente, mostraron evidentes signos de intoxicación.

En otro experimento se separó por medio de un tamiz de tela metálica fina de 200 mallas la parte gruesa de la parte fina de un lote de semillas de ajonjolí desgrasadas con hexano. En la tabla N^o 4 se presenta el contenido en fibra cruda, proteínas, ácido oxálico y selenio de ambas fracciones. Se logró una separación significativa sólo en fibra cruda, mientras que el contenido en ácido oxálico y selenio y el efecto tóxico quedaron repartidos de manera similar en ambas partes.

En la tabla N^o 5 se presentan valores de hemoglobina, hematocrito y del tiempo de protrombina, determinados en ratas alimentadas con raciones elaboradas con tortas de ajonjolí, presentando diferentes grados de toxicidad. Después de unas 4 semanas pudo notarse en los animales de la serie 449 un crecimiento muy deficiente y marcada palidez en los ojos y en las orejas. Al tomar la muestra de sangre del extremo de la cola se pudo notar muy prolongado el tiempo de sangría. Los valores significativamente más bajos de hemoglobina y hematocrito y el aumento en el tiempo de protrombina hallados en los animales de ese grupo coinciden con estas observaciones experimentales. Cabe destacar, por otra parte, que no existen prácticamente diferencias entre los valores hematológicos de las series 451, 454, 458 y 455, aunque el aumento de peso de las ratas de estas dos últimas series era muy superior.

En un último experimento se ha comparado el efecto de dietas adicionadas de selenio como selenito de sodio y de dietas conteniendo selenio orgánico en la forma de ajonjolí tóxico, sobre el crecimiento de ratas jóvenes. Las raciones se prepararon en tal forma que su composición era idéntica, con la única excepción de que en un caso el origen del selenio era inorgánico y en el otro orgánico aportado por el ajonjolí. Como se observa de los datos de la tabla N^o 7, en ambos casos había una reducción del crecimiento e igualmente una baja en los valores de hemoglobina y hematocrito.

A los 10 días, los animales alimentados con dietas tóxicas generalmente presentaban peso inferior al inicial. Las diferencias entre los grupos experimentales eran muy considerables en este corto tiempo, observándose valores para el cambio de peso promedio a los 10 días de -6 a +36 gramos.

Se han determinado 4 aminoácidos en 2 muestras de tortas de ajonjolí, una tóxica y otra no tóxica, usando los métodos microbiológicos para dicho análisis (10) (11). En la tabla N^o 6 se comparan los resultados con algunos datos de la literatura; nuestros valores encontrados en la muestra tóxica no parecen diferir significativamente de los señalados por los autores citados.

DISCUSION

Los resultados experimentales del presente trabajo demuestran la existencia de tortas de ajonjolí que resultan francamente tóxicas para ratas blancas.

Los lotes más tóxicos causaron la muerte de los animales experimentales al cabo de 30-40 días. La toxicidad no pudo ser eliminada por extracción con alcohol etílico, hexano, cloroformo o con solución acuosa al 1% de cloruro de sodio; tampoco se eliminó por el calor ni se logró concentrar separando la parte gruesa constituida en su mayor parte por la concha, de la parte fina, aunque se obtuvieron dos fracciones de diferentes contenidos de fibra cruda. Un estudio sobre las manifestaciones histopatológicas se encuentra actualmente en curso.

Resulta poco probable que la toxicidad encontrada por nosotros en algunas tortas de ajonjolí pueda asociarse con la naturaleza del factor tóxico —extraíble en cloroformo— pre-

sente en ciertos lotes de harina de maní y recientemente identificado como una toxina producida por el hongo *Aspergillus Flavus* (5, 6). Análisis químicos encaminados a detectar la presencia de residuos de insecticidas en las tortas tóxicas de ajonjolí utilizadas en estos ensayos, han dado resultados negativos *.

De la observación de la tabla N^o 3 puede inferirse que existe una relación definida entre el contenido de selenio en las tortas de ajonjolí, determinado por métodos analíticos, y su grado de toxicidad evidenciado mediante ensayos biológicos en ratas blancas.

El ensayo cuyos resultados se han presentado en la tabla N^o 6 corrobora la conclusión de que la toxicidad de las muestras de ajonjolí se debe a su alto contenido en Se. En este experimento se logró reproducir el mismo cuadro de intoxicación observado en ensayos anteriores con dietas preparadas con ajonjolí tóxico, con una dieta adicionada con una cantidad equivalente de selenito de sodio. Con estos experimentos creemos haber comprobado de manera definitiva que la toxicidad de muestras de ajonjolí desgrasado observado por nosotros es debida a la presencia de elevadas cantidades de selenio en las tortas.

Un ensayo designado para estudiar la posibilidad de fraccionar la acción tóxica de una torta de ajonjolí desgrasada no dio resultado positivo. Es posible obtener un producto en forma de una harina fina pasando el material por un tamiz, pero el contenido en selenio como también en ácido oxálico no es separado sensiblemente por este procedimiento. Sólo la proporción de fibra es reducida de manera significativa.

El experimento presentado en la Fig. 1 demuestra la capacidad de las ratas de distinguir entre el ajonjolí tóxico y no tóxico. Las dos dietas usadas en el ensayo no presentan ningunas diferencias organolépticas apreciables por humanos.

La notable baja de los valores de hemoglobina y hematocrito en la sangre de los animales alimentados con una dieta tóxica de elevado contenido en selenio coincide con observaciones previas sobre la relación de ambos factores (9). La prolongación del tiempo de protrombina y la observación de una falla completa de coagulación de la sangre de ratas que por

* Los autores agradecen la colaboración del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) en la realización de dichos análisis.

6 semanas habían ingerido una dieta con ajonjolí amerita un estudio posterior más detallado.

Si se tiene en cuenta que en ratas blancas la ingestión continua de apenas 4 ó 5 ppm. de selenio aportadas por raciones "ad libitum" provoca en corto tiempo síntomas de seleniosis (7), un contenido de 40 ppm. de selenio hallado por nosotros en algunas tortas de ajonjolí puede considerarse como muy elevado. Por otra parte, ninguna de las tortas analizadas hasta la fecha contiene menos de 2 ppm. de selenio. Es de interés que en la bibliografía consultada no aparecen datos sobre la presencia de selenio en tortas de ajonjolí ni referencia alguna sobre si el ajonjolí posee la facultad de absorber selenio del suelo y acumularlo en sus tejidos, como es el caso de otras plantas de importancia en alimentación humana, como el trigo o el maíz, cuando son cultivados en zonas seleníferas.

Hasta el presente no hemos tenido oportunidad de realizar un estudio comparativo entre el contenido de selenio en los suelos y la procedencia del ajonjolí cuya torta hemos utilizado. Presumiblemente, las muestras de tortas tóxicas proceden de un ajonjolí el cual ha sido cultivado en suelos que eventualmente podrían presentar un contenido de selenio relativamente elevado; a este respecto, y anotando aquí el criterio de Moxon (8), suelos que ofrezcan un contenido de selenio de apenas 0.5 ppm. deben conceptuarse como potencialmente peligrosos. Hasta la fecha de publicación de este trabajo no han sido reportadas, o al menos ubicadas en Venezuela, regiones seleníferas y, por consiguiente, productoras de vegetación tóxica, aunque se conocen suelos colombianos con un elevado contenido de selenio (12, 13).

En virtud de los resultados del presente trabajo consideramos necesario extender estos estudios a los suelos y a muestras de ajonjolí de otros países, para llegar a conclusiones definitivas sobre el contenido de selenio en semillas de ajonjolí procedentes de distintas zonas.

El hallazgo de muestras de ajonjolí tóxicas con tan elevado porcentaje en selenio clama por un estudio más extensivo sobre las posibles zonas seleníferas del país, el contenido de selenio en otros productos agrícolas de la zona y los posibles efectos sobre la salud pública y crianza animal.

RESUMEN

Se presenta un estudio sobre la toxicidad en ratas de algunas muestras de tortas de ajonjolí nacionales y extranjeras. Los síntomas observados fueron: crecimiento muy deficiente, valores muy bajos de hemoglobina y hematocrito y prolongado tiempo de protrombina. Los animales morían aproximadamente en 30 días. La toxicidad no pudo ser eliminada por extracción con hexano, alcohol etílico, cloroformo o solución salina al 1%, ni tampoco por calentamiento en el autoclave de las muestras durante 30 minutos a 15 libras.

Existe una relación entre el contenido de selenio determinado por análisis químico y el grado de toxicidad del material utilizado. Síntomas similares han sido observados en ratas alimentadas con una muestra de ajonjolí no tóxico adicionada de selenio en la forma de selenito de sodio. No se logró reducir el contenido en Se ni la toxicidad de la harina de ajonjolí mediante la separación en dos fracciones, al tamizar el material por una malla fina.

SUMMARY

Symptoms of toxicity have been observed in rats fed diets containing sesame press cake or defatted sesame seeds from Venezuela. The animals, after approximately 30 days on a diet with 40% of the toxic material, showed very poor growth, low hemoglobin and hematocrit values, prolonged protrombina time, and usually died within a short period. The toxic effect could not be extracted with hexane, ethyl alcohol, chloroform, or 1% saline, nor was it destroyed by autoclaving for 30 minutes at 15 lbs.

A close correlation existed between the toxic effect and the selenium content of the seeds determined by chemical analysis. In the non toxic seed or cakes, values of about 2 ppm. of Se were found, while the most toxic sample contained 43 ppm. of Se. Similar symptoms have been observed with rats fed a diet of non-toxic sesame supplemented with sodium selenite. Separation of the seed hulls by screening did not reduce selenium content or toxicity of the meal.

Gráfica Nº 1

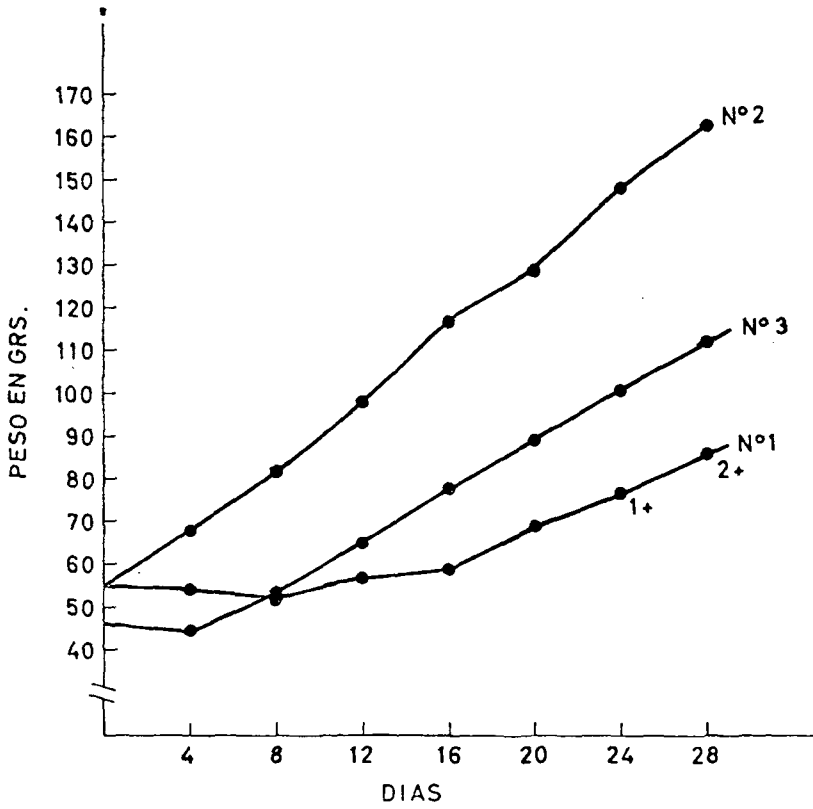


TABLA Nº 1

CRECIMIENTO Y MORTALIDAD DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS PREPARADAS CON 40% DE RESIDUOS DE AJONJOLI DE DIFERENTES PROCEDENCIAS

Experimento No.	Lote de ajonjolí	Procedencia del ajonjolí	Crecimiento en 10 días gr.	Crecimiento en 30 días gr.	No. de muertos en 30 días
373	1	Venezuela	— 5.5 ± 6.0	6.6 ± 15.1	6/15
362	2	Nigeria	38.6 ± 6.8	77 ± 17.6	0/6
381	3	Venezuela	31.6 ± 6.8	81.8 ± 11.7	0/3
366	4	Nigeria	31.3 ± 10.7	93.7 ± 25.1	0/3
383	5	Venezuela	28.6 ± 9.7	87.6 ± 36.4	0/6
391	6	Venezuela	4.1 ± 5.6		6/6

TABLA N° 2

EFFECTO DE LA EXTRACCION CON SOLVENTES, SUPLEMENTACION Y OTROS TRATAMIENTOS EN RESIDUOS DE AJONJOLI SOBRE EL CRECIMIENTO Y MORTALIDAD DE RATAS

Experimento N°	Lote de ajonjolí N°	Tratamiento	Crecimiento 10 días en gramos	Crecimiento 30 días en gramos	Animales muertos en 40 días
368	4	Extracto alcohólico, Lote N° 1	43.4 ± 4.1	143 ± 13.2	0/3
367	1	Residuo de Lote N° 1	-0.7 ± 7.2	30.7 ± 13.8	0/3
387	5	Extracto de cloroformo de Lote N° 1	23.8 ± 3.8	84.6 ± 8.6	0/3
379	1	Residuo de Lote N° 1	-0.3 ± 3.2	7.9 ± 6.5	3/3
390	5	Extracto con hexano de Lote N° 1	26.8 ± 5.5	89.1 ± 46.1	0/3
386	1	Residuo de Lote N° 1	2.0 ± 5.2	29.3 ± 10.3	3/3
382	1	Residuo de extracto con sol. NaCl al 1%	-1.8 ± 7.9	—	3/3
371	1	Autoclavizado 30'	-1.1 ± 3.4	21.9 ± 4.6	3/3

TABLA N° 3

RELACION ENTRE EL CRECIMIENTO Y MORTALIDAD DE RATAS Y EL CONTENIDO EN SELENIO EN DIFERENTES TORTAS DE AJONJOLI

Experimento N°	Lote de ajonjolí N°	Crecimiento en 10 días gramos	Crecimiento en 30 días gramos	Animales muertos	Contenido en Se *
422	13	34.7 ± 7.7	109.0 ± 22.8	0/6	2
435	25	13.0 ± 3.5	44.8 ± 8.7	0/6	6
451	43	9.5 ± 2.4	47.2 ± 6.5	0/6	12
440	31	1.4 ± 1.4	23.1 ± 2.6	0/6	27
437	27	-5.9 ± 7.9	— **)	6/6	42

Todas las dietas contenían 40% de residuos de ajonjolí.

*) En el ajonjolí desgrasado expresado en partes por millón.

***) Todos los animales murieron en menos de 30 días.

TABLA N° 4

COMPOSICION DE LA PARTE TAMIZADA Y RESIDUAL, RESPECTIVAMENTE, DE SEMILLAS DE AJONJOLI DESGRASADAS POR SOLVENTE

Lote No. 39	Parte gruesa	Parte fina
Fibra cruda *)	17.0 %	5.6 %
Acido oxálico	2.6 %	2.5 %
Proteína (N × 5.30)	24.0 %	32.0 %
Se	22.4 ppm.	31.6 ppm.

*) En la muestra original, 10.5

TABLA N° 5

DATOS HEMATOLOGICOS DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS DE AJONJOLI

Serie N°	Lote de ajonjolí N°	C R E C I M I E N T O		Hemoglobina %	Hematoorlito %	Tiempo de protrombina seg.
		10 días gramos	30 días gramos			
458	49	19.0 ± 1.0	64.7 ± 4.3	12.5 ± 1.2	41.7 ± 2.1	17.5 ± 2.4
455	46	22.5 ± 3.1	59.5 ± 4.9	12.8 ± 1.7	36.5 ± 7.4	17.0 ± 1.4
451	43	9.5 ± 2.4	47.2 ± 6.5	12.2 ± 1.2	41.5 ± 2.1	21.0 **
454	55	8.6 ± 0.5	37.2 ± 7.3	11.8 ± 1.8	39.8 ± 4.7	20.7 ± 3.8 *
449	39	-2.5 ± 2.9	17.7 ± 3.2	6.9 ± 0.9	26.0 ± 3.9	28.3 ± 7.1

Duración del experimento: 6 semanas.

* Un suero no coaguló en 5 minutos y no se incluyó en el promedio.

** Tres sueros no coagularon en 5 minutos y no se incluyeron en el promedio.

TABLA N° 6
AMINOACIDOS EN AJONJOLI
 (gr. por 16 gr. de N)

	Tóxico (Lote N° 1)	No tóxico (Lote N° 12)	1)	2)	3)
Triptófano	1.35	1.68	1.8	1.22	1.91
Lisina	2.44	2.57	2.8	2.66	2.75
Cistina	1.85	1.50	1.3	—	—
Metionina	2.54	2.12	3.1	2.03	2.65

- 1) R. J. Block y D. Bolling, Arch. Biochem. 6, 277 (1945).
- 2) R. J. Block y D. Bolling, The Amino Acid Composition of Proteins and Foods. C. C. Thomas. Springfield, 1951.
- 3) Calculado según C. M. Lyman, K. A. Kniben y F. Hale, J. Agr. Food. Chem. 4, 1008 (1956).

TABLA Nº 7

CRECIMIENTO Y VALORES HEMATOLOGICOS DE RATAS SOMETIDAS A DIETAS CON SELENIO APORTADO POR AJONJOLI O SELENITO DE SODIO

Experimento Nº.	Dieta	Creoimiento en 28 días gr.	Hemoglobina %	Hematocrito %	Tiempo de protrombina seg.
488	Se orgánico (12 ppm.)	33.8 ± 5.5	6.84 ± 4.1	25.8 ± 4.2	40 *
489	Se inorgánico (12 ppm.)	40.4 ± 8.8	7.29 ± 10.1	26.7 ± 6.5	53 **
490	Control	111.1 ± 10.6	12.3 ± 0.46	43.0 ± 1.0	15

Series de 4 animales cada una.

* Un suero no coaguló en 4' y no se incluyó en el promedio.

** Dos sueros no coagularon en 4' y no se incluyeron en el promedio.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Jaffé, W. G.—Arch. Venez. Nut. 3, 61 (1952).
- (2) Hainline, A.—Standart Methods of Clinical Chemistry, Vol. II, p. 49-60, New York, 1958.
- (3) Quick, A. J.—Hemorrhagic Diseases, Philadelphia, 1957.
- (4) Kelleher, W. J., y Johnson, M. I.—Anal. Chem. 33, 1.429 (1961).
- (5) Lancaster, M. C.; Jenkins, F. P., y Philip, J.—Nature 192, 1.095 (1961).
- (6) Sargeant, K.; Sheridan, A., y O'Kelly, J.—Ibid. 192, 1.096 (1961).
- (7) Trelease, S. F., y Beath, O. A.—“Selenium”, publicado por los autores, New York (1949).
- (8) Moxon, A. L., y Dakota, S.—Agric. Exptl. Sta. Bull. 311 (1937).
- (9) Franke, K. W, y Potter, V. R.—J. Nut. 8, 615 (1934).
- (10) Barton-Wright, E. C.—“The microbiological Assay of the vitamin B-complex and aminoacids”, London, Pitman (1952).
- (11) Koch, F., y Hanke, M.—“Practical methods in biochemistry”, 6ª ed. The Williams & Williams Co., Baltimore (1953).
- (12) Benavides, S. T., y Mojica, R. F.—Seleniosis: ocurrencia de selenio en rocas, suelos y plantas. Intoxicación por selenio en animales y humanos. Pub. IT-3 Instituto Geográfico de Colombia (1959).
- (13) Ancízar Sordo, J.—Soil. Sci. 63, 437 (1947).