



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Estudio de la semilla y de los aceites de semilla de Gevuina Avellana mol (proteacea) y de Colliguaya Intergerrima Gillies-Hooker (euforbiacea) : Harinas de extracción (hexano) y aislados proteicos

Malec, Laura Sara
1984

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LA SEMILLA Y DE LOS ACEITES DE SEMILLA DE GEVUI-
NA AVELLANA MOL (PROTEACEA) Y DE COLLIGUAYA INTERGERRIMA
GILLIES-HOOKER (EUFORBIACEA). HARINAS DE EXTRACCION (HEXA-
NO) Y AISLADOS PROTEICOS.

LAURA SARA MALEC

Tesis presentada para optar al título de
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

1984

1848
Ej. 2

Agradezco particularmente al Dr. Pedro Cattaneo, Director de Tesis y Consejero de Estudios, quien con sus enseñanzas y apoyo constante hizo posible la realización de este trabajo.

Agradezco:

- A la Dra. María Susana Vigo por la dedicación, estímulo y amistad brindados en todo momento.
- A la Dra. María H. Bertoni por la valiosa colaboración prestada en diversas etapas de este trabajo.
- A mis compañeros de Bromatología y Microbiología de Alimentos por su sincera amistad.

Agradezco también:

- Al Sr. Director Nacional del INTA Ing. Agrónomo Jorge A. del Aguila el haber logrado las partidas de frutos maduros de Gevuina avellana Mol y Colliguaya intergerrima que motivaron este trabajo.

- Al Sr. Profesor de la facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires Ing. Agrónomo Alberto Soriano el haber proporcionado información bibliográfica acerca de la distribución de la especie Colliguaya intergerrima en Argentina y Chile.

- Al personal técnico y de biblioteca del Instituto de Botánica Darwinion la valiosa información bibliográfica proporcionada sobre aspectos botánicos de ambas especies.

- Al personal del Laboratorio de Cromatografía de Gases del Dpto. de Química Orgánica por su colaboración en la obtención de espectros de esteroides de las especies estudiadas.

A mis padres y hermano.

A José.

-INTRODUCCION-

1. Gevuina avellana Mol.

- 1.1. Descripción de la especie Gevuina avellana.
- 1.2. Distribución geográfica.
- 1.3. Utilización de los frutos maduros.
- 1.4. Antecedentes sobre características y composición química de semilla y aceites de semilla de Gevuina avellana y otras especies de Proteáceas.

2. Colliguaya intergerrima Hillies-Hooker.

- 2.1. Descripción de la especie Colliguaya intergerrima.
- 2.2. Distribución geográfica.
- 2.3. Antecedentes sobre características y composición química de semilla y aceites de semilla de Colliguaya intergerrima y otras Euforbiáceas.

-INTRODUCCION-

Este estudio se refiere exclusivamente a la consideración de composición química de semilla y aceites de semilla de dos especies difundidas principalmente en regiones patagónicas que pertenecen a dos familias botánicas diferentes: Gevuina avellana Mol (Proteácea), un vegetal que no reviste características de maleza y que debe su elección en este estudio a la circunstancia de ser una planta autóctona cuyos frutos fueron fuente de alimentación de poblaciones indígenas de la región andino-patagónica, y Colliguaya intergerrima Hillies-Hooker, una especie perteneciente a la familia de las Euforbiáceas, otra especie autóctona de amplia difusión en la Patagonia y que sí debe actualmente considerarse como una maleza.

Ambas especies habían sido consideradas previamente en el país como probables fuentes de aceites, alimenticio en el primer caso y para fines industriales no alimenticios en el segundo. Estos estudios que datan de hace más de veinte años, respondieron a la aplicación de técnicas azarosas y previas al advenimiento de las instrumentales, especialmente la cromatografía de partición gas-líquido. Por otra parte, y en esos años, no se prestó mayor atención a los aspectos referentes a las composiciones químicas de las harinas de extracción residuales.

Por ello estas contribuciones son complementarias de las entonces realizadas y conforman estudios que pueden considerarse acabados respecto de probables utilizaciones futuras de estos recursos patagónicos.

En esta Introducción se provee actualización de la infor-

mación bibliográfica para ambas especies, la que no es muy abundante por la circunstancia de ser especies autóctonas argentino-chilenas de zonas patagónicas y andinas alejadas de centros densamente poblados y que por lo tanto no despertaron la debida atención.

Se consideran los antecedentes por separado de ambas especies.

1. Gevuina avellana Mol.

El género Gevuina pertenece a la familia de las Proteáceas, la cual incluye alrededor de 50 géneros, que comprenden unas 1000 especies que obedecen a una distribución característica: 591 en Australia, 25 en Asia Oriental, Tropical, 27 en Nueva Caledonia, 2 en Nueva Zelandia, 7 en Chile, 36 en América del Sur, 262 en el Sudoeste de la Colonia del Cabo, 2 en Madagascar y 5 en las Montañas del Africa Tropical.

Tienen predominio notable en el hemisferio sur y la mayoría vive en regiones de largos períodos de sequía con caracteres xerófilos¹.

En la Argentina se conocen cinco géneros de Proteáceas, algunos comunes a Chile: Gevuina, Lomatia, Embothrium, Roupala y Hakea.

Las especies pertenecientes a estos géneros son²:

- Gevuina avellana Mol: desarrolla en Río Negro, Neuquén y Chubut.
- Lomatia hirsuta (Lam) Diels: (Lomatia oblicua, Lomatia dentata); desarrolla en Río Negro, Neuquén y Chubut.

- Lomatia ferruginea (Cav.): (fuique, huinque, palmilla, romerillo); crece en Neuquén, Chubut, Santa Cruz y Río Negro.
- Embothrium coccineum Forst: (notro, ciruelillo, fosforillo), crece en Neuquén, Chubut, Santa Cruz, Río Negro y Tierra del Fuego.
- Roupala cataractum Sleumer: desarrolla en Misiones.
- Hakea gibosa Cav.: de origen australiano, cultivada frecuentemente en la región de Nahuel Huapi.

1.1. Descripción de la especie Gevuina avellana^{3,4}.

Nombre vulgar: avellano, nefuén, guevín.

Es un árbol de copa globosa y follaje persistente. Las hojas son coriáceas, lisas, con la cara superior brillante y la inferior más clara, alternas, imparipinadas, algunas veces bipinadas de 10-20 cm de largo; folíolos aovados, brevemente pedicelados, finamente aserrados, de 4-6 cm. Florece en los meses de enero y febrero.

Las flores están reunidas en un racimo largo, derecho y delgado, que tiene su origen en las axilas de las hojas. Las axilas, como los pedúnculos, están cubiertos de un fino vello ferrugíneo. Dos flores poseen un pedúnculo común, en cuya base se encuentra una pequeña bráctea, formando una flor gemela de la forma de una lira, colocada a 90° una de otra. Cada una de estas flores parciales tiene un tubo floral o perigonio, compuesto de cuatro tépalos de color marfil de base rojiza. El extremo cóncavo superior es verde claro. El fruto, de 1,5 a 2,5 cm de diámetro, demora más de un año en madurar; la cásc-

cara leñosa, rica en tanino, es verde al principio, más tarde coralina y toma luego en el período de madurez un color negro violeta. Sus semillas son comestibles y de sabor que recuerda al de las avellanas (Figura 1).

1.2. Distribución geográfica.

Crece en Río Negro, Neuquén y Chubut.

Es muy común en la cuenca del Lago Puelo (Chubut), donde se ha constituido en una de las especies más típicas. Es además característica de la vegetación chilena, que en la zona del Lago Puelo hace incursiones en territorio argentino, debido a la menor altura del terreno y de los cerros fronterizos⁵.

El grado de latitud 35 es su límite septentrional.

1.3. Utilización de los frutos maduros.

Los frutos de esta especie, constituyeron en otra época uno de los principales recursos alimenticios que dispusieron los primitivos habitantes de la región andino-patagónica. Pueden consumirse crudos, hervidos o tostados. Según Latcham⁶, los indios las molían obteniendo una harina aceitosa muy alimenticia.

En Chile se emplea como sucedáneo de la almendra y en la fabricación de peladillas; también se expende en mercados y hasta habría sido motivo de exportación. Tostadas y trituradas sirven para la preparación de un sustituto del café, semejante al de malta⁷. Es usado también como antidiarreico y anti-hemorrágico⁸. La madera del avellano se empleaba para la elaboración de remos y aún de botes.

1.4. Antecedentes sobre características y composición química de semilla y aceites de semilla de Gevuina avellana Mol y otras especies de Proteáceas.

En 1950 Bridge y Hilditch⁹ publicaron el primer estudio registrado en la literatura sobre la composición ácida del aceite de semilla de una Proteácea. Se trata del aceite de Macadamia ternifolia, una planta nativa de Australia. La composición de este aceite reveló un contenido en ácido palmitoleico (9-10 hexadecenoico) de 20,4 % (sobre ácidos totales), cifra significativamente elevada.

En el caso de la especie Gevuina avellana, el primer estudio sobre sus frutos correspondió a Reichert (1928)¹⁰, quien aportó valores de composición general.

En 1962 Cattaneo et al.¹¹ examinaron los aceites de Gevuina avellana Mol, Lomatia hirsuta (Lam) Diels y Embothrium coccineum Forst. En los tres casos se registraron elevados contenidos en ácido hexadecenoico.

En la semilla de Gevuina avellana el análisis de los ácidos grasos totales del aceite crudo (extraído por hexano) logrado por destilación fraccionada de los ésteres metílicos de los ácidos "sólidos" y "líquidos" permitió observar los siguientes valores (% de ácidos totales): 12:0 (0,1); 14:0 (0,3); 16:0 (3,7); 18:0 (0,8); 20:0 (1,6); 22:0 (1,9); 24:0 (0,2); 16:1 (22,0); 18:1 (37,0); 18:2 (11,2); 20:1 (11,5); 22:1 (9,3); 24:1 (0,4).

El ácido hexadecenoico presente en este aceite fue identificado como el 11-12 hexadecenoico^{11,12}, también señalado por Jantzen¹³ en muy baja concentración dentro del grupo de los hexadecenoicos del aceite de semilla de nabo y por Hofmann y

Tausig¹⁴ como componente menor de los lípidos de *Streptococcus* sp. (cepa H 46 A del grupo C). Por el contrario, en los aceites de Macadamia ternifolia, Lomatia hirsuta y Embothrium coccineum el ácido hexadecenoico fue identificado como palmitoleico (9-10 hexadecenoico).

Posteriormente Cattaneo, Bertoni y Sutton analizaron los aceites seminales de dos especies del género Grevillea¹⁵, diez especies del género Protea¹⁶, la especie Roupala complicata y la especie Hakea gibosa¹⁷ (cabe destacar que todas las especies del género Protea entonces estudiadas rindieron entre 1 y 2,3 % de 16:1).

En 1971, Vickery¹⁸ analizó la composición ácida de los aceites seminales de 26 especies pertenecientes a las dos subfamilias Grevilleoidea y Proteoidea (según la clasificación usada por Briggs y Johnson¹⁹) (ver Tabla 1).

La longitud de cadena de estos ácidos osciló entre C₁₂ y C₂₄ no encontrándose ácidos en número impar de átomos de carbono. Prácticamente no se registran ácidos trietilénicos, existiendo un predominio de ácidos monoetilénicos que en muchas especies excedió el 80 % y rara vez bajó del 70 % siendo el ácido predominante 18:1.

Los aceites seminales de Proteáceas y de pulpas de paltas son tal vez de los pocos aceites vegetales ricos en ácidos hexadecenoicos.

En la familia Proteácea los porcentajes de 16:1 fueron, en 19 de 30 especies analizadas, mayores del 5 %; en 4 excedieron el 40 % y en la especie Kermadecia sinuata llegó a 69 %. Se realizaron además, estimaciones cuantitativas de los isómeros de posición de los ácidos monoetilénicos.

Estos análisis mostraron que existe una amplia variedad de éstos, siendo los predominantes: $\Delta 9$ y $\Delta 11$ en 16:1 y $\Delta 9$ en 18:1.

2. Colliguaya intergerrima Hillies-Hooker.

El género Colliguaya pertenece a la familia de las Euforbiáceas, la que incluye alrededor de 300 géneros y 7650 especies originarias en su mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del orbe. Los dos mayores centros de distribución son las zonas cálidas de América y África²⁰.

Las especies pertenecientes a esta familia son muy diversas en forma y características. Pueden ser arbóreas, arbustivas o herbáceas, generalmente con látex³.

Pertenecen a ella numerosas plantas útiles desde el punto de vista medicinal, industrial o alimenticio.

Económicamente, las especies más importantes de la familia son las productoras de caucho como Hevea brasiliensis y algunas especies de Euforbia, Sapium y otros géneros productores de látex.

Algunas especies producen látex de uso medicinal, pero en otras es tóxico como en el caso del manzanillo de Sudamérica (Hippomane mancinella).

Otras especies son usadas por sus ceras y aceites. A partir de la semilla de Ricinus communis se obtiene el aceite de castor. También las semillas de Aleurites fordii (tung), Aleurites moluccana y Aleurites cordata producen aceites de importante uso comercial. Los frutos de varias especies de Phyllanthus y Antidesma son comestibles y algunos de ellos son cultivados exclusivamente por sus frutos. Otras se utilizan

como plantas ornamentales, tal la especie Euforbia pulcherrima.

2.1. Descripción de la especie Colliguaya intergerrima Hilles-Hooker.

Nombre vulgar: duraznillo o coliguay.

Es un arbusto ramoso, glabro, con ramas leñosas, cilíndricas, inferiormente desnudas, foliosas en las partes terminales, rojizas. Hojas alternas u opuestas, subsésiles, linear lanceoladas, íntegras, coriáceas, lustrosas,

Inflorescencias andróginas en espigas terminales (2-3,5 cm) densifloras, con una o dos flores femeninas en la base.

Flor masculina: 3-4 estambres, filamentos cortos, anteras ovadas.

Flor femenina: 2-3 sépalos, ovados, acuminados, extremidad rojiza; ovario globoso, estilos gruesos, simples, papilosos, encorvados.

Cápsula di-(raro tri-) coca (15-25 mm ancho x 15 mm alto). Semilla subglobosa, parduzco grisácea (9 mm diámetro). Los frutos maduran en los meses de diciembre y enero (Figura 2)²¹.

Es una planta muy variable en cuanto al tamaño (40 cm a 3 m de altura)²² y localización de las comunidades que forma.

El nombre vulgar es de origen mapuche. La palabra mapuche "coli" es un adjetivo: rojo, color, y es mala escritura de "colli" (adjetivo también) que es rojo, colorado y todos los colores afines.

Según Rosales, citado por Erize (1960) los puelches (mapuches argentinos) usaban el látex de coliguay, considerado muy venenoso, para envenenar sus armas²³.

2.2. Distribución geográfica.

El género Colliguaya es sudamericano (Chile y Argentina). Se extiende por la región denominada Provincia Fitogeográfica del Monte^{24,25}, encontrándose la especie Colliguaya intergérrima en la zona oeste de la Provincia de La Rioja, Mendoza (San Isidro y Villavicencio), Neuquén (Parque Nacional Laguna Blanca)²⁶, Chubut (Colonia Sarmiento) y Santa Cruz (zona sur del Lago Buenos Aires)²².

2.3. Antecedentes sobre características y composición química de semilla y aceites de semilla de Colliguaya intergérrima y otras especies de Euforbiáceas.

Los aceites de semillas de Euforbiáceas han sido y son objeto de numerosos estudios de composición.

Al igual que las plantas mismas, los aceites producidos por las numerosas especies de esta familia muestran una gran diversidad. Muchas de ellas contienen ácidos grasos no encontrados comúnmente en otras familias.

Los aceites seminales de algunas especies de los géneros García, Ricinodendron y Aleurites, incluida la especie Aleurites fordii (tung) tienen como componente principal al ácido eleostearico; el aceite de Ricinus communis contiene grandes proporciones de ácido ricinoleico, y el ácido 18-hidroxi-18-oxo-18-oleico es el principal componente del aceite de Mallotus filipinensis. Algunas especies de Cefalocroton contienen altas proporciones de ácido 12,13-epoxi-9-octadecenoico (vernólico). Los aceites de algunas especies de Sapium y Sebastiania son las únicas que contienen glicéridos de ácidos dienoicos conjugados de cadena corta (C₁₀ ó C₁₂): en las especies Sapium sebiferum y S. discolor se encontró un 4-5 % de un ácido identificado

como 2,4-decadienoico y en la especie Sebastiana lingustrina se halló similar proporción de un ácido dienoico conjugado de doce átomos de carbono (probablemente 2,4-dodecadienoico).

Otras especies contienen ácidos grasos más usuales como oleico, linoleico y linolénico.

Las proporciones de ácidos saturados en esta familia son bajas, usualmente de 4-10 % del total de ácidos grasos²⁷.

En 1947 Riganti, Cattaneo y Sutton²⁸ estudiaron la composición química del aceite de semilla de Colliguaya intergerrima.

El análisis de los ácidos grasos obtenidos por destilación fraccionada en vacío de los ésteres metílicos de los ácidos "sólidos" y "líquidos" acusó los siguientes valores porcentuales: 14:0 (0,74); 16:0 (10,03); 18:0 (1,24); 20:0 (0,01); 22:0 (0,86); 16:1 (1,14); 18:1 (30,18); 18:2 (31,53); 18:3 (20,07); 20:1 (0,89); 22:1 (3,31).

No se han hallado en literatura estudios sobre la composición química de la semilla de Colliguaya intergerrima.

-MATERIALES Y METODOS-

1. Materia prima.
2. Obtención de los aceites crudos de extracción.
3. Estudio de los aceites crudos.
 - 3.1. Características físico-químicas y contenido en componentes menores.
 - 3.2. Determinación de las composiciones acídicas.
 - 3.3. Hidrogenación de los ácidos grasos. Análisis de los ácidos hidrogenados.
 - 3.4. Investigación y determinación de esteroides.
4. Harinas de extracción (hexano).
 - 4.1. Composición general.
 - 4.2. Determinación de hidratos de carbono.
 - 4.2.1. Azúcares reductores.
 - 4.2.2. Azúcares invertibles.
 - 4.2.3. Hidratos de carbono sacarificables.
 - 4.2.4. Almidón.
 - 4.2.5. Identificación de los hidratos de carbono.
 - 4.3. Estudios sobre lípidos remanentes.

- 4.3.1. Lípidos extraíbles por mezcla ternaria (principalmente "polares").
- 4.3.2. Lípidos retenidos.
- 4.4. Análisis de otros componentes.
 - 4.4.1. Determinación de fósforo total.
 - 4.4.2. Determinación de fósforo de ácido fítico.
 - 4.4.4. Determinación de lisina disponible
 - 4.4.5. Determinación de la actividad antitriptica.
- 5. Estudios sobre dispersión y precipitación de proteínas.
 - 5.1. Equipos y reactivos.
 - 5.2. Dispersión del material nitrogenado.
 - 5.3. Elección del valor de pH de máxima precipitación.
- 6. Obtención y estudio de los aislados proteicos de harinas de extracción.
 - 6.1. Dispersión.
 - 6.2. Precipitación.
 - 6.3. Purificación.
 - 6.4. Secado.
 - 6.5. Estudio de la fracción separada en lavados etanólicos.

1. Materia prima.

Se dispuso de una partida de frutos maduros de Gevuina avellana cosechados en la zona de Lago Puelo (Chubut). Asimismo se contó con una partida de frutos maduros de Colliguaya intergerrima recolectada en Colonia Sarmiento (Lago Musters, Chubut).

Sobre los frutos enteros de ambas especies se determinó el peso medio/fruto, número de semillas/ 10 g y diámetro medio. Por separación manual se obtuvieron las semillas (pepa) libres de cáscara de ambos frutos, calculando las relaciones cáscara/pepa.

2. Obtención de los aceites crudos de extracción.

Se procedió a la molienda de las cáscaras y semillas en forma separada, a la determinación de Humedad (100°, vacío) y Cenizas (500-550°) del producto molido y a su agotamiento con hexano técnico en equipo Soxhlet. Después de 24 horas de extracción, las harinas liberadas de solvente por exposición al aire fueron remolidas y extraídas nuevamente por 24 horas más. En el caso de la semilla de Gevuina avellana, las harinas se llevaron a estufa de vacío (40°) luego de la primera extracción, debido a que su elevado contenido acuoso imposibilitaba una buena extracción.

Las harinas así agotadas se expusieron al aire y en estufa de vacío (40°; eliminación de restos de solvente), se remolieron y reservaron en frascos herméticos a los fines de un posterior exámen. De los extractos se recuperó el hexano por destilación en baño de agua hirviente, los aceites crudos se

tomaron por éter etílico, filtró (eliminación de partículas de harina), destiló el éter etílico y llevó a constancia de peso en estufa de vacío (100°, 5 Torr), calculándose así los rendimientos (expresados % de semilla tal cual y sobre semilla seca).

Los aceites de semilla obtenidos se preservaron en ampollas de vidrio cerradas a la llama con mínimo de espacio muerto y mantenidas a -15°, al abrigo de la luz, hasta su análisis.

3. Estudio de los aceites crudos.

3.1. Características físico-químicas y contenido en componentes menores.

Sobre los aceites crudos de extracción de semilla de ambas especies se determinaron las siguientes características: Densidad relativa a 25/4° (picnómetro); Índice de Yodo (Wijs); Índice de saponificación (A.O.C.S., Official Method Da 16-48); Número de acidez (I.U.P.A.C. 11.D1, sobre 0,5 g de aceite); Insaponificable % (A.O.C.S., Ca 6b-53, adaptado a los líquidos residuales de la determinación del índice de saponificación); Índice de Yodo del insaponificable (Rosenmund); Esteroles totales (digitonina)²⁹; Tocoferoles totales³⁰; Fósforo lipídico^{31,32} y la reacción de Halphen (A.O.C.S., Official Method, Cb-1-25; presencia de ácidos grasos ciclopropénicos).

En los aceites de cáscara se determinaron los contenidos en insaponificable y en ácidos grasos totales luego de saponificación, y en el aceite de cáscara de Colliguaya intergérrima además, el Índice de Yodo (Wijs).

3.2. Determinación de las composiciones acídicas.

Los líquidos resultantes de las determinaciones de los índices de saponificación adicionados de 5 ml de solución de KOH en etanol al 4 % y de 40 ml de agua (relación etanol: agua 1:2 v/v) se extrajeron en ampolla de decantación con éter etílico (tres extracciones, la primera con 70 ml y las dos restantes con 60 ml cada una). Los extractos etéreos reunidos se lavaron dos veces por agitación con agua (30 ml por vez), con solución de KOH al 2 por mil en agua (eliminación de jabones ácidos) y luego con agua hasta reacción neutra de la fase acuosa (tornasol). El éter se recuperó por destilación (rotavapor) y el residuo se trató en estufa de vacío (100°, 5 Torr) hasta constancia de peso, obteniendo así los materiales insaponificables de los aceites crudos.

De las soluciones hidroalcohólicas de jabones reunidas con los líquidos de lavado de los insaponificables se liberaron los ácidos grasos totales por acidificación con H_2SO_4 1:1 (pH ~ 4; heliantina) aislándolos mediante dos extracciones con 40 ml de éter etílico cada vez. Luego de lavar en ampolla con agua y tratar con Na_2SO_4 anhidro se recuperó el solvente, arrastrando los últimos restos con gas nitrógeno. Los ácidos se esterificaron con 20 ml de metanol anhidro conteniendo 1,5 % en peso de H_2SO_4 conc. como catalizador²⁷ (reflujo durante dos horas). Luego de enfriar se diluyó con 40 ml de agua extrayendo los ésteres metílicos con éter etílico (dos extracciones con 60 ml por vez). Los extractos reunidos se lavaron con agua (tornasol), para eliminar el exceso de metanol y H_2SO_4 , con solución acuosa de K_2CO_3 al 0,05 % (eliminación de ácidos no esterificados) y finalmente con agua (ren-

dimiento de esterificación superior al 99 %).

Se recuperó el éter y se procedió al análisis de los ésteres por cromatografía gas-líquido (CGL), previa búsqueda por espectrofotometría en U.V. (A.O.C.S. Tentative Method Cd 7-58, 1960 y según Holman et al.³³) de conjugación preexistente en la zona de dienos (233 nm), trienos (268 nm) y tetraenos (315 nm).

Las composiciones acídicas se determinaron en un equipo de cromatografía de partición gas-líquido Perkin Elmer Vapor Fractometer, Mod. 154, equipado con detector de ionización de llama, columna de vidrio Pyrex de 3 m de largo por 4,5 mm de diámetro interno, con material de relleno formado por Chromosorb W (lavado ácido, granulometría 60-80) y adipato de etilenglicol poliéster (15 % sobre relleno total). Se operó a 194° regulando la temperatura del block de inyección en la indicación 90 (escala empírica de registro)³⁴, usando nitrógeno como fase móvil (presión de entrada 21 psi) y con inyecciones de 4 μ l de solución de ésteres al 5 % en éter etílico. Los componentes se identificaron según sus tiempos de retención (Tr) y las evaluaciones cuantitativas se resolvieron por triangulación calculando valores porcentuales.

Los resultados obtenidos fueron verificados por cálculo de los valores de Índice de Yodo y de saponificación (en base a los valores de composición encontrados por CGL) y su comparación con los determinados experimentalmente.

3.3. Hidrogenación de los ácidos grasos. Análisis de los ácidos hidrogenados.

Alrededor de 10 mg de ésteres metílicos de los ácidos

grasos totales de ambos aceites se disolvieron en 10 ml de ciclohexano. Se agregaron 10 mg de catalizador (Pd 10 %/ C), luego otros 10 ml de ciclohexano y se hidrogenó según Tiong y Waterman³⁵ a temperatura y presión normales durante 12 horas. Se filtró y destiló el solvente (rotavapor, presión reducida) y los ésteres hidrogenados se examinaron por CGL en las condiciones ya establecidas.

3 4. Investigación y determinación de esteroides.

Los insaponificables de ambos aceites se fraccionaron según Fedeli et al.³⁶ empleando placas de 20 por 20 cm recubiertas de sílicagel G (5 g de sílicagel en 10 ml de agua) utilizando 60 g de esta suspensión por placa (1 mm de espesor). Las placas se activaron por calentamiento a 110° durante 90 minutos, sembrando en forma de banda el insaponificable disuelto en una mezcla de éter etílico-metanol. Se sembraron entre 50 y 100 mg de insaponificable. Paralelamente y en forma separada se sembró una banda de 2 cm con solución de insaponificable y a su lado una mancha de 0,5 cm con colesterol patrón, desarrollando con hexano-éter etílico 1:1 durante 35 minutos. Las placas secas al aire, fueron reveladas con 2,7-diclorofluoresceína al 2 % observando (por luz U.V., 368 nm) la posición del colesterol y la banda de esteroides del insaponificable (fluorescencia verde clara sobre fondo azul oscuro).

Los raspados de las bandas de esteroides se eluyeron con éter etílico obteniendo los esteroides que se examinaron por CGL.

A estos fines se empleó un cromatógrafo gas-líquido, e-

quipado con detector de ionización de llama, columna de vidrio Pyrex de 2 m de largo por 2 mm de diámetro interno, relleno constituido por Chromosorb W-AW DMCS (granulometría 60-80), conteniendo 3 % de OV-17 como fase fija (silicona de polaridad media). Se operó con temperatura de horno 240° y de inyector y detector 300°, usando nitrógeno como fase móvil, con inyecciones de 10 μ l de esteroides en solución al 5 % en éter isopropílico.

Los valores de presión de entrada de la fase móvil y de temperatura de columna, inyector y detector fueron fijadas para encontrar las condiciones más convenientes de resolución del par crítico campesterol-stigmasterol.

Los esteroides correspondientes a cada pico se identificaron en base a sus valores de Tr/ Tr colesterol. Por evaluación de las áreas de los picos se calcularon las composiciones en esteroides particulares % de esteroides totales.

4. Harinas de extracción.

4.1. Composición general.

Sobre las dos harinas de extracción de semilla se efectuaron las siguientes determinaciones:

Humedad (A.O.A.C. Official Method 13.3, 1950) operando sobre 0,5 g de muestra (vacío, 100°, hasta constancia de peso).

Cenizas (A.O.A.C. Official Method 13.6, 1950) operando sobre 0,5 g de muestra por calcinación en cápsula de platino a 500-550° hasta obtención de cenizas blancas y peso constante.

Nitrógeno total (macrométodo de Kjeldahl, A.O.A.C. Official Method 2.24, 1950; proteína cruda = N total x 6,25).

Fibra cruda (A.O.A.C. Official Method 21.038, 1965) operando sobre 2,0 g de harina integral.

Hidratos de carbono (de acuerdo con las técnicas descriptas en 4.2.).

Lípidos remanentes (de acuerdo con las técnicas descriptas en 4.3.).

Sobre la harina de extracción de cáscara de Colliguaya intergérriba se determinaron: Humedad, Cenizas y Fibra cruda según los métodos anteriormente mencionados.

4.2. Determinación de hidratos de carbono.

4.2.1. Azúcares reductores (A.O.A.C. Official Method 22.043, 1965, modificado).

Entre 10 y 20 g de harina se pesaron en un erlenmeyer neutralizando por agregado de 1 g de CaCO_3 , añadieron 125 ml de etanol 50 % (v/v) y mantuvo en baño de agua (83-87°) 1 hora, empleando un pequeño embudo en el cuello del frasco para condensar el vapor. Una vez frío se estacionó por una noche, centrifugó 15 minutos a 1500 rpm, lavó dos veces el residuo con 25-30 ml de etanol neutro cada vez, reuniendo los líquidos de lavado al sobrenadante original. Los líquidos así reunidos se concentraron (rotavapor, 45°, presión reducida) hasta un volumen de 20-40 ml que se transfirió a un tubo de centrifuga donde se procedió a la defecación por agregado de solución de acetato de plomo neutro. Se agitó y dejó reposar 15 minutos, observando la formación de un precipitado floculento. El exceso de plomo se eliminó por agregado de solución saturada de oxalato de potasio seguido de centrifugación (20-25 minutos, 2500 rpm). Finalmente se llevó a volumen en matraz aforado de 250 ml.

Los azúcares reductores se determinaron gravimétricamente por el método de Munson y Walker (A.O.A.C. Official Method 31.038, 1980), expresando los resultados en glucosa % muestra seca.

4.2.2. Azúcares invertibles.

50 ml de la solución obtenida en 4.2.1. se adicionaron de 5 ml de HCl $d = 1,10$ calentando en baño de agua a 60° durante 30 minutos. Se neutralizó con NaOH 10 % (tornasol) y llevó a volúmen en matraz aforado (100 ml) (A.O.A.C. Official Method 29.026, 1965).

Los azúcares invertibles (expresados como sacarosa % de muestra seca) se determinaron por el método de Munson y Walker antes citado.

4.2.3. Hidratos de carbono sacarificables³⁷.

Alrededor de 3 g de harina se suspendieron en 100 ml de agua, agregó 10 ml de HCl $d = 1,125$ y calentó a reflujo durante dos horas. El líquido frío se neutralizó con NaOH 10 % (tornasol) y centrifugó llevando el sobrenadante a 250 ml.

Los hidratos de carbono sacarificables se determinaron por el método antes citado (A.O.A.C. Official Method 31.038, 1980), expresando el resultado como almidón.

4.2.4. Almidón.

Se investigó la presencia de almidón por agregado de lugol (I_2 en solución de IK) a una suspensión de harina en agua.

4.2.5. Identificación de los hidratos de carbono.

Se utilizaron las soluciones preparadas para las determinaciones de azúcares reductores e invertibles. Los polisacáridos se analizaron operando según 4.2.3. sobre los residuos insolubles en etanol provenientes de la extracción de azúcares. Las soluciones obtenidas se concentraron (rotavapor, 45°) hasta aproximadamente 20 ml. Cada solución así concentrada se pasó por columna de intercambio iónico a fin de eliminar interferencias debidas a sales presentes.

Las resinas utilizadas fueron: Amberlite IR 120 (intercambiador catiónico, acidez fuerte) y Amberlite IRA 410 (aniónico, basicidad media).

Se sembró la columna con la totalidad de la muestra problema, y eluyó con agua destilada, recogiendo los primeros 500 ml (goteo lento). Las columnas se lavaron con tres litros de agua destilada para eliminar los azúcares remanentes. Los 500 ml se concentraron en rotavapor (45°, presión reducida). El residuo se tomó con etanol-agua para efectuar las siembras cromatográficas.

Los azúcares fueron identificados por cromatografía en placa delgada y cromatografía en papel (descendente).

Para la cromatografía en placa delgada se aplicó la técnica de Lewis y Smith³⁸.

Se prepararon placas de 20x20 cm (equipo Desaga; 250 μ de espesor), utilizando Kieselguhr G en buffer fosfato (pH=5), dejándolas secar al aire durante una noche. Se sembraron cada dos cm con capilar de vidrio, 1-4 gotas de patrones (levulosa, glucosa, manosa, galactosa, maltosa, sorbosa, xilosa, arabinosa y ribosa) en una concentración de 10 mg/ml y entre

1-3 gotas de cada muestra.

El solvente de desarrollo utilizado fue n-butanol: acetona: agua (40: 50: 10). El tiempo de desarrollo osciló entre 50-60 minutos. Al cabo del mismo se dejó secar la placa y evidenciaron los azúcares con ácido ftálico en butanol saturado con agua más anilina³⁹ (revelado de azúcares reductores), apreciándose color rojo ciruela para pentosas y marrón para hexosas.

Esta determinación no permitió la diferenciación entre xilosa y ribosa dada la similitud de sus valores de Rf (este problema surgió en el análisis de la fracción sacarificable de ambas harinas), por lo que se utilizaron placas preparadas con Kieselguhr G en acetato de sodio 0,02 M, utilizando como solvente de desarrollo acetato de etilo: 2-propanol: agua (4: 1: 0,5)⁴⁰ y el revelador antes mencionado. Se sembraron además placas en las que se utilizó como revelador una solución de 0,5 g de KMnO_4 en 100 ml de NaOH N para evidenciar la totalidad de los azúcares (manchas amarillas sobre fondo rosa). Las placas se prepararon con Kieselguhr G en NaH_2PO_4 0,15 M, y como solvente de desarrollo se utilizó acetato de etilo: metanol: n-butanol: agua (16: 3: 3: 1)⁴⁰. Se hizo una doble corrida para lograr una apreciable separación entre las manchas correspondientes a glucosa y levulosa.

Se realizó además una cromatografía utilizando papel Whatman N° 1 para uso cromatográfico. Se sembraron como patrones sacarosa, levulosa y sorbosa. Se corrió la cromatografía en forma descendente durante 40 horas utilizando como solvente de desarrollo n-butanol: etanol: agua (10: 4: 4)⁴¹. Como revelador se utilizó resorcina en butanol y HCl 0,25 N que detecta

únicamente la presencia de cetosas (presentes en la muestra o liberadas por hidrólisis parcial, ej: sacarosa) (color cereza).

4.3. Estudios sobre lípidos remanentes.

4.3.1. Lípidos extraíbles por mezcla ternaria (principalmente "polares")⁴²⁻⁴⁴.

30,00 g de harina previamente agotada por hexano se suspendieron en 300 ml de solvente tipo Folch constituido por una mezcla ternaria de cloroformo: metanol: agua (10: 20: 7,6 v/v). Se agitó periódicamente, dejó 24 horas en reposo y luego centrifugó (20 minutos, 2800 rpm). El insoluble se trató con 30 ml de mezcla ternaria, centrifugó y volvió a extraer con 300 ml de dicha mezcla. Los extractos líquidos se reunieron y adicionaron de 150 ml de solución de KCl al 0,88 % separándose una capa clorofórmica inferior que decantó nítidamente por centrifugación. De esta última se recuperó, el cloroformo (rotavapor, presión reducida) completando la eliminación total del solvente en estufa de vacío a 100° hasta peso constante, obteniéndose un residuo lipídico.

Este se tomó con cloroformo llevando a 50 ml, de los que se separaron 20 para determinar el contenido en fósforo lipídico. Se eliminó el solvente de los 30 ml restantes y el residuo obtenido se saponificó con 20 ml de KOH al 4 % en etanol por reflujo durante dos horas, enfrió, diluyó con 40 ml de agua y extrajo el material insaponificable con éter etílico (tres extracciones en ampolla). Los extractos etéreos se reunieron, lavaron con agua, con solución al 1 por mil de

K_2CO_3 (eliminación de jabones) y nuevamente con agua (reacción neutra al tornasol). El éter se recuperó por destilación, llevando el residuo a estufa de vacío (100°) hasta constancia de peso, obteniéndose así la fracción insaponificable de los lípidos remanentes.

La solución de jabones más los líquidos acuosos de la extracción se acidificaron ($pH \sim 4$; heliantina) con HCl (1+4), aislando los ácidos grasos totales mediante dos extracciones sucesivas con éter etílico y posterior eliminación de éste por destilación.

Los ácidos grasos totales de los lípidos polares de ambas harinas se examinaron por CGL a través de sus ésteres metílicos.

4.3.2. Lípidos retenidos^{44,45}.

Las harinas tratadas con la mezcla $Cl_3CH: CH_3OH: H_2O$ (23,47 g en el caso de la harina de Colliguaya intergerrima y 21,14 g en el de Gevuina avellana) se hirvieron a reflujo por una hora con 200 ml de KOH al 6 % en etanol 96 %. Se enfrió, acidificó con H_2SO_4 (1:1 v/v, placa de toque, heliantina) y centrifugó por 20 minutos a 2800 rpm lavando dos veces con 60 ml de etanol cada vez. Los líquidos alcohólicos reunidos se extrajeron con hexano en ampolla, previamente pasado por el material insoluble, repitiendo por dos veces más la extracción (la primera con 100 ml de hexano y las dos restantes con 60 ml cada una). Los extractos en hexano se reunieron en cada caso, lavaron con agua en ampolla, filtraron y llevaron a seco en rotavapor y luego a peso constante en estufa de vacío a 100° .

Los lípidos obtenidos se disolvieron en 30 ml de mezcla etanol: agua (2:1 v/v), alcalinizaron con solución alcohólica de KOH al 6 % en etanol (fenolftaleína) y extrajeron los insaponificables con éter etílico mediante la técnica ya mencionada.

De las soluciones de jabones se aislaron los ácidos grasos totales, los que se examinaron a través de sus ésteres metílicos por CGL.

4.4. Análisis de otros componentes.

4.4.1. Determinación de fósforo total^{31,32}.

Se determinó el contenido en fósforo total en las harinas integrales, en los aislados proteicos y fósforo lipídico en los aceites crudos, en los lípidos extraídos de la harina por mezcla ternaria ($\text{Cl}_3\text{CH} : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$) y en los provenientes de los lavados alcohólicos de los aislados proteicos.

Se pesaron entre 90-100 mg de harina, 45-50 mg de aislado (fósforo total); 0,50-0,55 g de aceite y 45-60 mg de lípidos provenientes del aislado. De la solución clorofórmica de los lípidos residuales de harina se tomaron entre 10-20 ml que contenían 0,2 g aproximadamente de lípidos, eliminando el cloroformo por destilación en rotavapor (60-70°, presión reducida) (fósforo lipídico).

Se adicionó de 5 ml de H_2SO_4 conc. y 10 ml de HNO_3 65 % calentando hasta aparición de vapores blancos (sulfúricos), agregando pequeñas cantidades de HNO_3 y calentando nuevamente hasta comienzo de vapores sulfúricos en etapas sucesivas hasta la obtención de un líquido límpido e incoloro. Se agregó 1 ml de agua bidestilada, calentó hasta humos blancos y adi-

cionó una vez más de 1 ml de agua bidestilada con unos pocos cristalitos de urea, llevando suavemente por calentamiento hasta humos blancos (eliminación de restos de HNO_3). El producto de la mineralización se trasvasó a un matraz aforado de 25 ml con agua bidestilada llevando a volúmen. Paralelamente se realizó un blanco con los reactivos en las mismas cantidades y condiciones de la muestra. Operando sobre este producto se procedió a la valoración del fósforo total según la técnica de Bartlett³¹.

Los contenidos en fósforo total se calcularon en base a la curva de calibración lograda con solución patrón de KH_2PO_4 (200 μg P/100 ml) operando en igualdad de condiciones.

4.4.2. Determinación de fósforo de ácido fítico⁴⁶.

Se realizó esta determinación sobre las harinas integrales y sobre los aislados proteicos. Se pesó una cantidad de muestra que contuviera 5-30 mg de fósforo de ácido fítico y se extrajo con 50 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 3 % (p/v) durante una hora con agitación constante. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se filtró por papel banda azul. Se transfirieron 10-20 ml exactamente medidos del filtrado a un tubo de centrifuga de 40 ml, adicionaron 4 ml de solución de FeCl_3 (conteniendo 2 mg Fe/ml en TCA 3 %) y 2 ó 3 gotas de Na_2SO_4 calentando en baño de agua hirviente durante 45 minutos. Se centrifugó y decantó cuidadosamente el sobrenadante claro. El precipitado se lavó dos veces dispersándolo bien, en 20-30 ml de TCA 3 %, calentando en baño de agua hirviente por 5-10 minutos y centrifugando. Se dispersó el precipitado en 3-4 ml de agua destilada y agregó 3 ml de solu-

ción de NaOH 1,5 N, mezclando bien. Se llevó a aproximadamente 30 ml con agua y calentó en baño de agua hirviendo durante 30 minutos para coagular el precipitado de $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Se centrifugó 10 minutos (1500 rpm), decantó el sobrenadante y lavó con agua, centrifugando y decantando otra vez.

El precipitado de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ se disolvió en 0,5 ml de HCl 0,5 N calentando 10 minutos en baño de agua hirviendo, trasladando a un matraz de 100 ml ayudando con 10-25 ml de HCl 0,1 N y llevando a volumen con agua destilada. Una alícuota de 20 ml se transfirió a un matraz aforado de 100 ml, llevando a volumen con agua destilada. Esta solución se usó para la determinación colorimétrica de Fe.

Los reactivos y la curva "standard" se prepararon de acuerdo a los procedimientos señalados en A.O.A.C. (Official Method 14.013, 1980) para la determinación colorimétrica de Fe con o-fenantrolina, después de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} con clorhidrato de hidroxilamina, leyendo en espectrofotómetro a 510 nm.

Para cada muestra se realizó un blanco de reactivos. A partir de la curva "standard" preparada previamente, se calculó el contenido en fósforo de ácido fítico de las muestras en base al valor de Fe, teniendo en cuenta las diluciones y suponiendo una relación molecular Fe:P de 4:6.

4.4.3. Determinación de calcio.

Por aplicación del método descrito en A.O.A.C. (Official Method, 14.014, 1980): partiendo de 5 g de harina se obtuvieron las cenizas blancas (500-550°). Se agregaron 5 ml de HCl conc. evaporando en baño de agua hasta sequedad. El residuo

seco se tomó con 2 ml de HCl conc. y calentó durante 5 minutos en baño de agua, cubriendo la cápsula con vidrio de reloj. Se filtró a un vaso de precipitado de 400 ml y diluyó aproximadamente a 150 ml agregando 8-10 gotas de verde de bromocresol como indicador y solución de acetato de sodio al 20 % hasta un pH de 4,8-5,0 (azul). Se cubrió con vidrio de reloj y calentó a ebullición, dejó enfriar y precipitó el calcio lentamente agregando solución de ácido oxálico 3 % (1 gota cada 3-5 segundos) hasta pH 4,4-4,6 (verde). Se hirvió durante 1-2 minutos y dejó reposar una noche. Al día siguiente se filtró por papel cuantitativo banda azul lavando el vaso de precipitado con solución de NH_4OH (1+50). Se pasó a un erlenmeyer y tituló con solución de KMnO_4 0,05 N a 70-90° previo agregado de 125 ml de agua y 5 ml de H_2SO_4 conc.

4.4.4. Determinación de lisina disponible^{47,48}.

Aplicando la técnica de Conkerton y Frampton se determinó la lisina disponible en las harinas integrales, en los aislados proteicos y en los residuos de extracción de proteínas de ambas harinas.

Se pesó una cantidad de muestra tal que contuviera entre 100 y 300 mg de proteína y transfirió a un erlenmeyer de 500 ml (triplicado), agregando tres bolitas de vidrio y 10 ml de solución de NaCO_3H 10 % a cada recipiente. Se mezcló bien y dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 10 ml de solución alcohólica de 2,4-dinitrofluorobenceno a dos de los tres recipientes (el otro se utilizó como blanco) y agitaron suavemente en agitador mecánico horizontal por dos horas a temperatura ambiente.

Las mezclas fueron concentradas hasta casi sequedad en corriente de aire tibio (30-40°). El exceso de reactivo y algo de 2,4-dinitrofenol producido en la reacción (producto lateral), se extrajeron de las mezclas a través de cuatro extracciones sucesivas con éter etílico (porciones de 50 ml).

La tercer muestra, a la que no se adicionó reactivo, se extrajo con dos porciones sucesivas de éter etílico (50 ml cada vez). Las trazas de éter se eliminaron por pasaje de corriente de aire tibio.

Las muestras y el blanco se hidrolizaron por 6 horas (autoclave, 121°, 16 libras de presión) con HCl 6 N (50 ml). Inmediatamente y aún en caliente, los productos de hidrólisis se filtraron a través de crisoles filtrantes de vidrio prensado (G₃) ayudando con succión. El erlenmeyer y el filtro se lavaron con agua destilada hasta un volúmen cercano, pero menor, a 100 ml, completando el volúmen con agua destilada y homogeneizando bien.

De cada hidrolizado se separó una alícuota de 10 ml, que fue extraída en ampolla de decantación con cuatro porciones sucesivas de éter etílico (50 ml cada una) para eliminar los 2,4-dinitrofenilaminoácidos interferentes y el resto del 2,4-dinitrofenol. El blanco se lavó sólo dos veces con éter etílico (50 ml cada vez). Las alícuotas así lavadas se diluyeron en matraz aforado de 25 ml con agua destilada.

De cada solución se midieron alícuotas de 2 ml por duplicado, en matraces aforados de 25 ml. Una de ellas fue diluída a volúmen con HCl 1 N y la otra con solución acuosa de NaCO₃H 10 %. Se homogeneizaron y leyeron las absorbancias en espectrofotómetro a 360 nm, usando el blanco correspondiente como so-

lución de referencia.

4.4.5. Determinación de la actividad antitriptica^{49,50}.

Las harinas se molieron y tamizaron de modo que el 95 % de las mismas pasara por tamiz de 100 mesh (149 μ , ASTM). Se pesó aproximadamente 0,5 g de cada una y extrajo con 25 ml de solución de NaOH 0,01 N con agitación permanente durante una hora, manteniendo el pH entre 9,5 y 9,8 y centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm.

Se midieron por triplicado en tubos de ensayo: 0,0; 1,0; 1,2; 1,5 y 1,8 ml del extracto centrifugado ajustando el volumen final a 2,0 ml con agua destilada.

Una serie (blanco) se adicionó de 5 ml de sustrato sintético (clorhidrato de benzoil-DL-arginina p-nitroanilida, BAPA) precalentado a 37°, agitó, incubó exactamente 10 minutos a 37° y adicionó de 1 ml de ácido acético 30 % y 2,0 ml de solución de tripsina (4 mg de tripsina/200 ml de HCl 0,001 N) agitando luego del agregado de cada reactivo y filtrando antes de efectuar la lectura de absorbancia.

Las dos series restantes se adicionaron de 2,0 ml de solución de tripsina y de 5 ml de solución de BAPA precalentado a 37°, agitando bien después de la adición de cada reactivo. Se incubó exactamente 10 minutos a 37°, agregó luego 1,0 ml de ácido acético 30 %, agitó y filtró antes de la lectura de absorbancia a 410 nm, contra el blanco correspondiente.

Expresión de la actividad.

Una unidad (UT) está definida arbitrariamente como el incremento en 0,01 unidades de absorbancia a 410 nm producido

por 10 ml de la mezcla de reacción bajo las condiciones experimentales dadas. La actividad del inhibidor de tripsina se define como el número de unidades de tripsina inhibidas (UTI).

5. Estudios sobre dispersión y precipitación de proteínas.

5.1. Equipos y reactivos.

En los ajustes de pH se utilizaron soluciones de NaOH o de HCl 5 N y las respectivas soluciones diluidas (0,5 N). Se controlaron los valores de pH con electrodo de vidrio (pHmeter E 516- Titriskop Metrohm).

La extracción del material nitrogenado y precipitación de las proteínas se efectuó a temperatura ambiente (20-25°).

En las etapas de dispersión y precipitación se utilizó un agitador mecánico de vidrio y en las separaciones por centrifugación, se operó con una centrifuga Heraeus Christ GMBH.

En las etapas de lavado de las proteínas precipitadas se usó, en todos los casos agua destilada previamente ajustada al valor de pH correspondiente.

5.2. Dispersión del material nitrogenado.

Se pesaron 60,00 g de harina de Gevuina avellana y 30,00 g de harina de Colliguaya intergerrima en tubos de centrifuga y suspendieron en 1200 y 600 ml respectivamente de agua destilada (previamente ajustada a pH 9,5-10,5; relación harina: agua 1:20). Se agitó permanentemente durante una hora a temperatura ambiente, manteniendo el pH de dispersión en el valor prefijado por agregado de solución de NaOH y centrifugó 30 minutos a 2600 rpm.

El líquido sobrenadante (de color amarillo parduzco y

turbio) se trasvasó a un recipiente aforado filtrando a través de tela metálica de acero inoxidable (200 mallas por pulg.). El residuo se lavó por agitación con agua destilada previamente llevada a pH 9,5-10,5 (relación harina: agua 1:5), centrifugó nuevamente (20 minutos, 2600rpm) y el líquido decantado, pasado por malla, se unió al anterior.

El residuo se extrajo nuevamente en las mismas condiciones (una hora, agitación permanente, pH establecido; relación harina: agua 1:10) y centrifugó 30 minutos, 2600 rpm.

Los líquidos sobrenadantes decantados provenientes de las dos extracciones y lavado reunidos se llevaron a volúmen con agua destilada y sobre alícuotas, por duplicado, se determinó el % N extraído.

5.3. Elección del valor de pH de máxima precipitación.

El líquido proveniente de las extracciones se fraccionó en alícuotas de igual volúmen (colocadas en sendos tubos de centrifuga), para operar la precipitación de proteínas a diferentes valores de pH, cubriendo el ámbito de valores de 3,5 a 5,5 y 3,8 a 5,0 para las extracciones provenientes de las harinas de semilla de Colliguaya intergerrima y Gevuina ave-llana respectivamente. Las precipitaciones se efectuaron a temperatura ambiente, por agregado de HCl 5 N (ajuste final del pH con HCl diluído), con agitación que se continuó hasta 5 minutos después de alcanzado el valor de pH deseado.

Los precipitados obtenidos se separaron por centrifugación (30 minutos, 2600 rpm) y los líquidos sobrenadantes respectivos se trasvasaron a matraces aforados.

Los precipitados se lavaron por agitación con 50 ml de

agua destilada ajustada al pH respectivo, centrifugando luego (20 minutos, 2600 rpm).

Los líquidos de lavado se reunieron con los sobrenadantes respectivos llevándolos a volumen y determinando por duplicado, sobre alícuotas, el nitrógeno sobrenadante para cada valor de pH.

La observación de las características de los líquidos sobrenadantes permitió señalar que los separados en las precipitaciones cercanas al pH isoeléctrico resultaron límpidos, mientras que los correspondientes a valores de pH superiores o inferiores a aquellos, eran de turbiedad creciente.

6. Obtención y estudio de los aislados proteicos de harinas de extracción.

6.1. Dispersión.

Se realizó según las operaciones que se indican en 5.2. Los residuos de la extracción se secaron en estufa a 100° y sobre ellos se realizaron las siguientes determinaciones: pérdida de peso (100°, 5 Torr), cenizas (500-550°), N total (Kjeldahl) y lisina disponible^{47,48}.

6.2. Precipitación.

Se llevó a cabo por ajuste del valor de pH al de máxima precipitación de los líquidos de extracción, a temperatura ambiente y con agitación permanente hasta lograr la estabilidad en el valor de pH deseado.

El precipitado se separó por centrifugación, y lavó dos veces con agua destilada previamente ajustada al valor de pH de máxima precipitación (suspensión del precipitado por fuer-

te agitación; relación precipitado: agua entre 1:10 y 1:15) centrifugando luego de cada lavado (20 minutos, 2600 rpm). El sobrenadante reunido a los líquidos de lavado acuoso se llevó a volúmen y en dos alícuotas se determinó su contenido en nitrógeno.

6.3. Purificación.

Los coágulos anteriores se lavaron por agitación energética por tres veces a temperatura ambiente con etanol 96 % y finalmente con éter etílico (relación 1:20 en todos los casos). Este sistema de purificación había sido ya establecido para el caso de semilla de lino⁵¹ y otras.

Los extractos etanólicos se separaron por centrifugación (10 minutos, 2600 rpm), reunieron y evaporaron (evaporador rotatorio, presión reducida), quedando un residuo sólido parcialmente soluble en cloroformo.

Las soluciones etanólicas correspondientes a las dos primeras extracciones, resultaron claras, mientras que la última era muy turbia (sobre todo en el extracto etanólico correspondiente al aislado de Colliguaya intergerrima) debido a la presencia de proteína finamente dividida que no sedimentó en las condiciones de centrifugación señaladas.

Las proteínas así purificadas presentaron color blanco-cremoso y consistencia compacta.

En la Figura 19 se presenta un esquema que permite seguir las distintas etapas del procedimiento de obtención de los aislados proteicos.

6.4. Secado.

Los precipitados se dejaron aproximadamente 12 horas en desecador y luego se extendieron en capas delgadas, secándolos a 45° (vacío, 5 Torr). Se obtuvo un polvo fino y liviano.

El aislado proveniente de la semilla de Colliguaya intergerrima era de color blanco cremoso, no así el de Gevuina avellana que era amarillento.

Sobre ambos aislados se efectuaron las determinaciones de: pérdida de peso (100°, 5 Torr), cenizas, N total, lisina disponible^{47,48}, fósforo total^{31,32}, fósforo de ácido fítico⁴⁶, lípidos retenidos^{44,45} (por saponificación del aislado con KOH 6 %, como se indica en 4.3.2.) e hidratos de carbono de acuerdo con la técnica de fenol-H₂SO₄^{52,53}.

6.5. Estudio de la fracción separada en lavados etanólicos.

El residuo de los lavados etanólicos se tomó por cloroformo, filtró a través de papel de filtro embebido en cloroformo, evaporó el solvente y llevó a peso constante (vacío, 100°), calculándose el rendimiento del material lipídico extraído.

Operando sobre una fracción del residuo obtenido, previa saponificación con KOH 4 % en etanol, se extrajo la materia insaponificable (éter etílico) determinando su porcentaje luego de eliminado el solvente por destilación y finalmente en vacío (100°).

A partir de la capa hidroalcohólica remanente de la separación del insaponificable se obtuvieron los ácidos totales, que se transformaron en ésteres metílicos por esterificación con metanol y H₂SO₄ como ya se ha descripto.

Sobre otra fracción del residuo extraído se determinó el

contenido en fósforo lipídico, como se indicó anteriormente (párrafo 4.4.1.) y el valor de la acidez libre.

-RESULTADOS Y DISCUSION-

1. Características de los frutos y rendimiento en aceite crudo de extracción.
2. Estudio de los aceites crudos de extracción de semilla.
3. Estudios sobre composiciones acídicas de aceites crudos de semilla.
4. Sobre la composición de los lípidos crudos (hexano) de cáscara de fruto de ambas especies.
5. Composición de la fracción de esteroides.
6. Estudios de composición de harina de extracción.
 - 6.1. Valores de composición general.
 - 6.2. Investigación y dosaje de azúcares reductores, invertibles y sacarificables.
 - 6.3. Estudios sobre lípidos remanentes luego de agotamiento por hexano.
 - 6.3.1. Lípidos polares (extraíbles por mezcla ternaria).
 - 6.3.2. Lípidos retenidos.
7. Aislamiento de proteínas de harinas de extracción de Gevuina avellana y Colliguaya intergerrima.
 - 7.1. Obtención de los aislados.

- 7.2. Balance de nitrógeno en la obtención de los aislados proteicos.
- 7.3. Análisis de los aislados proteicos.
- 7.4. Exámen analítico de los extractivos etanólicos de los coágulos proteicos.

RESULTADOS Y DISCUSION

En esta parte se expondrán en primer lugar, los resultados analíticos logrados por aplicación de las técnicas mencionadas en la Parte II, operando sobre los materiales estudiados.

Las partidas de frutos maduros de Gevuina avellana Mol y de Colliguaya intergerrima Hillies-Hooker procedían de las cercanías del Lago Puelo (Chubut) la primera (recolectada en marzo de 1982), mientras que la segunda fue recolectada hacia fines del mismo mes en la zona de Colonia Sarmiento (Chubut), en ambos casos a cargo de Estaciones Experimentales del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

1. Características de los frutos y rendimiento en aceite crudo de extracción.

La Tabla 2 resume algunas características de los frutos de ambas especies e incluye valores de contenido acuoso de sus partes constitutivas así como de cenizas y rendimiento en aceite crudo por extracción con hexano.

Deben destacarse los elevados valores de contenido acuoso para pepa y cáscara de Gevuina avellana, que obligaron a un secado en vacío para asegurar agotamiento por hexano. En ambos casos los valores para ceniza % materia seca fueron sensiblemente superiores en pepa.

Los aceites crudos resultaron del agotamiento según se ha descrito de 485,4 g de pepa de Gevuina y de 100,7 g de pepa de Colliguaya, habiendo obtenido 123,5 y 52,7 g de aceites crudos respectivamente (41,8 y 54,9 % de materia seca). Estas cifras que confirman las encontradas anteriormente por Cattaneo et

al.^{11,27} señalan a estos frutos como conteniendo semillas de real valor oleaginoso.

Eran aceites límpidos a 20-25°, de color amarillo ligeramente más claro para el caso de Gevuina.

Paralelamente se encontraron los tenores en aceite crudo a partir de 16,9 g de cáscara de Gevuina y 10,0 g de cáscara de Colliguaya, rindiendo 0,0717 y 0,12 g de aceites crudos respectivamente (0,62 y 1,34 % de cáscara seca).

2. Estudio de los aceites crudos de extracción de semilla.

La Tabla 3 resume los valores de características físico-químicas y contenidos en algunos componentes menores de ambos aceites crudos.

Debe destacarse que las cifras halladas en este estudio son muy similares a las descriptas previamente por Cattaneo et al.^{11,27}, con excepción del valor de Índice de Yodo para el aceite de Colliguaya que resultó ser, en esta oportunidad 10 unidades más elevado, circunstancia atribuible muy probablemente a variaciones climáticas en las épocas de cosecha. Ha quedado confirmado que el aceite de Gevuina es netamente no secante, no así el de Colliguaya que por su Índice de Yodo se presenta como fuertemente secante.

Ambos aceites muestran tener bajos tenores de tocoferoles (12,0 y 41,6 mg % g, como α -tocoferol). Los tenores en esteroides totales se consideran normales y dentro del rango usual para la gran mayoría de aceites seminales (200-600 mg % g). Las cifras de fósforo lipídico total son bajas y equivalen a 0,30 y 0,75 g de fosfolípidos totales % g de aceites de Gevuina y Colliguaya respectivamente.

Ambos aceites carecen de ácidos ciclopropénicos por acusar reacción negativa de Halphen.

3. Estudios sobre composiciones acídicas de aceites crudos de semilla.

Previamente al análisis por CGL de la composición acídica de ambos aceites, los ésteres metílicos de los ácidos totales se examinaron por espectrofotometría al U.V. (ver Parte II) a fin de observar la presencia o no de conjugación preexistente (dienos, trienos y tetraenos).

En el exámen del aceite de Gevuina avellana no se evidenció la presencia de ácidos conjugados. Por el contrario, en el caso del aceite de Colliguaya intergerrima se encontraron dos máximos en la zona de trienos conjugados (269 y 279,5 nm) (Figura 3) y otros dos en la zona de tetraenos conjugados (301,5 y 316 nm) (Figura 4), no apareciendo el primero de los tres máximos característicos de trienos y tetraenos conjugados. Esto podría deberse a que las curvas correspondientes a los distintos grupos insaturados que absorben a esas longitudes de onda se superpongan.

Los ácidos grasos cuyos máximos de absorción coinciden, bajo las mismas condiciones operativas, con los obtenidos en este trabajo son: dentro de los trietilénicos conjugados, el ácido β -eleosteárico (259, 269 y 280 nm) y entre los tetraetilénicos conjugados, el ácido β -parinárico (288, 301,5 y 315,5 nm).

Los valores de $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (hexano) son:

β -eleosteárico 2000 y β -parinárico 3150.

Los obtenidos en este trabajo fueron:

-zona de trienos conjugados

$$269 \text{ nm} \text{ ————— } E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 0,865$$

Trienos conjugados preexistentes (% de ésteres metílicos totales) = 0,043 (como β -eleosteárico).

-zona de tetraenos conjugados

$$301,5 \text{ nm} \text{ ————— } E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 0,575$$

Tetraenos conjugados preexistentes (% de ésteres metílicos totales) = 0,018 (como β -parinárico).

Los exámenes CGL de los ésteres metílicos de los ácidos totales de cada aceite (libres de insaponificable)[⊗] (Figuras 5 y 6) condujeron a los resultados resumidos en la Tabla 4. En el de Gevuina fueron componentes mayores los ácidos hexadecenoico, octadecenoico y octadecadienoico, debiendo destacarse que el primero de ellos había sido reconocido por Cattaneo et al.^{11,12} como el 11-12 hexadecenoico, mientras que los dos últimos lo fueron como los ácidos oleico y linoleico respectivamente.

Las cifras señaladas en la Tabla 4 son relativamente similares a las encontradas por Cattaneo et al.¹¹ debiendo atri-

(⊗) En exámenes de composición acídica por CGL de ésteres metílicos de aceites de semilla que no han sido registrados en literatura a través de análisis según esta técnica es prudente operar sobre ésteres libres de insaponificable, para prevenir la presencia de picos espúreos presumiblemente originados en componentes de insaponificables.

buirse las diferencias a que estos últimos habían operado el análisis de composición acídica no por CGL sino por destilación fraccionada en vacío de ésteres metílicos de los ácidos "sólidos" y "líquidos" (técnica utilizada durante más de 20 años hasta el advenimiento de la cromatografía gas-líquido). Sin embargo quedó evidenciado entonces que el ácido hexadecenoico figuraba en una concentración (22,0 %) muy próxima a la encontrada por CGL (25,4 %).

Con referencia a la composición acídica del aceite de semilla de Colliguaya intergerrima ha quedado probado que los componentes mayores fueron el ácido palmítico y los ácidos en C₁₈ (oleico, linoleico y linolénico). El total de ácidos insaturados en C₁₈ encontrados (80,8 %) resultó similar al encontrado en 1947 por Riganti et al.²⁷ (81,8 %) si bien se observaron distintos valores en ambos análisis para los componentes integrantes de esta fracción. Asimismo se destaca que el exámen por CGL ha demostrado una concentración significativa para ácido eicosenoico (6,3 %) muy superior a la observada entonces (0,9 %). El análisis presente ha revelado una concentración superior en 18:3, no habiéndose podido constatar la presencia de ácido docosenoico. La composición registrada en este estudio es más simple que la hallada a través del análisis de las fracciones de los ácidos "sólidos" y "líquidos" del estudio anterior.

El aceite de Gevuina avellana contribuye significativamente al valor calórico de esta nuez y no presenta inconvenientes respecto de su integración en formulaciones de alimentos, razón que muy probablemente determinó su uso por poblaciones indígenas y aún su consumo actual por poblaciones estables del Sudoeste de Argentina y Sur de Chile.

El de Colliguaya intergerrima presenta un cuadro de composición acídica con un valor de 18:3 significativo (23,6 %) y que unido al de 18:2 (38,5 %) lo señalan como netamente secante y por tanto (sin tener en cuenta probables acciones tóxicas) como una materia prima de valor para su utilización industrial en la formulación de materiales de protección de superficies (pinturas, barnices, resinas alkyd, etc.).

La explotación de esta verdadera oleaginosa con fines como los señalados permitiría un ahorro de aceites alimenticios (girasol, soja, algodón) con el consiguiente beneficio para el consumo humano. Por otra parte su tenor en 18:3 es de carácter intermedio entre los llamados aceites "non yellowing drying oils" (aceites carentes de 18:3 pero con más de 60-65 % de 18:2) utilizados en la elaboración de pinturas para artistas tales los aceites de semilla de amapola, cártamo y algunos de girasol y los aceites netamente secantes de elevados tenores en lino-lénico (caso del aceite de lino con 50 % de 18:3) o de tung con 90 % de ácido eleosteárico; circunstancia que aconsejaría estudiar las características físicas de las películas de autooxidación y polimerización producidas con este aceite.

Como una confirmación de las composiciones acídicas expuestas en la Tabla 4, los ésteres metílicos de los ácidos totales de ambos aceites se hidrogenaron y los ésteres hidrogenados se estudiaron en sus composiciones acídicas por CGL (Figuras 7 y 8) obteniendo los valores de la Tabla 5 en la que las cifras obtenidas resultan para cada aceite sumamente concordantes con las sumatorias de los ácidos en igual número de átomos de carbono respectivos.

4. Sobre la composición de los lípidos crudos (hexano) de cáscara de fruto de ambas especies.

Los rendimientos en cáscara de los frutos de Gevuina y Colliguaya (separación manual) fueron (Tabla 2) 46,8 y 59,8 % respectivamente. Por este motivo se determinaron los contenidos en lípidos de estos materiales obteniendo cifras bajas (1,82 y 1,44 % de cáscara seca para Gevuina y Colliguaya respectivamente).

Interesó conocer la composición general y acídica de estos lípidos que, por saponificación con KOH 4 % en etanol rindieron 43,24 y 81,66 % (para ácidos grasos totales) junto a 51,19 y 11,55 % (insaponificable) para Gevuina y Colliguaya respectivamente.

Las composiciones acídicas de estos lípidos (CGL de ésteres metílicos de ácidos totales) figuran en la Tabla 6. Comparando las cifras de las Tablas 4 y 6 se observa que los lípidos de cáscara de Gevuina fueron más pobres en 16:1, 18:1, 20:1 y 20:2, careciendo de 20:0, 22:0 y 22:1 respecto de los valores de aceite de semilla, pero contenían mayor proporción en 16:0, 18:0 y 18:2, apareciendo 18:3 (4,3 %).

Los lípidos de cáscara de Colliguaya contenían un porcentaje menor en 18:3 respecto del valor de aceite de semilla, siendo los primeros más ricos en 16:0 y 18:1, encontrándose además una cifra significativa (1,3 %) para un supuesto 23:0 y cifras entre 0,1 y 0,4 % para ácidos en 22:0, 22:1, 23:1 y 24:0 así como vestigios para r-22:0 y r-23:0.

Resulta evidente que los lípidos de cáscara en ambas especies integran un mayor número en ácidos componentes que los de semilla, sobre todo en el orden de los vestigios y concentra-

ciones inferiores a 1-2 % sobre ácidos totales.

Las Figuras 9 y 10 reproducen los cromatogramas de los ésteres metílicos de los ácidos totales de estos aceites.

5. Composición de la fracción de esteroides.

En la Tabla 3 se mencionaron los contenidos en esteroides totales de ambos aceites crudos determinados como digitónidos. Se consideró de interés hacer un examen de su composición en esteroides particulares y siguiendo la técnica detallada anteriormente se aisló por cromatografía en capa delgada a los mismos, que se estudiaron por CGL.

Los cromatogramas se corrieron hasta alcanzar valores de Tr/Tr colesterol ligeramente superiores a los de sitosterol, observando por debajo del pico correspondiente a colesterol numerosos picos pequeños y uno en ambos cromatogramas con valor de Tr/Tr colesterol 0,79, no identificado. Los picos pequeños a que se ha hecho referencia no se consideran debidos a esteroides. En la Tabla 7 se resumen los valores obtenidos y las Figuras 11 y 12 comprenden todos los picos registrados con indicación de los respectivos valores de Tr/Tr colesterol. Como surge de los cuadros mencionados, los esteroides realmente identificados en las condiciones operadas fueron: colesterol, brasicasterol, campesterol y sitosterol (componente principal) para Gevuina y colesterol, campesterol, stigmasterol y sitosterol (componente principal también) para Colliguaya.

6. Estudios de composición de harinas de extracción.

6.1. Valores de composición general.

En la Tabla 8 se resumen los valores hallados en el presente trabajo para la composición de las harinas de extracción de semilla de Gevuina avellana y Colliguaya intergerrima.

En el trabajo de Cattaneo et al.¹¹ sobre aceites de semilla de Gevuina avellana, al que ya se ha hecho referencia, se realizó además un exámen general de la composición de pepa agotada por hexano como subproducto resultante de la extracción del aceite cuyos valores figuran en la Tabla 9.

Comparando los valores de composición general de harinas de Gevuina avellana en ambas tablas se observan semejanzas en los de cenizas, fibra cruda y nitrógeno. Por el contrario, el valor de extracto etéreo obtenido en el actual trabajo es menor y los de hidratos de carbono reductores, invertibles y sacarificables son muy diferentes aunque el de hidratos de carbono totales es cercano si bien algo menor.

En cuanto al método de Casares y Moreno utilizado en la determinación de ácido fítico por Cattaneo et al.¹¹, debe aclararse que fue posteriormente desechado por su falta de especificidad debido a la gran cantidad de sustancias interferentes que podrían estar presentes en las muestras, ya que el método consistía en una extracción en solución HCl 2 % y posterior valoración del extracto con solución de FeCl₃. Fue reemplazado por el método utilizado en este trabajo (ver Parte II), que es más específico.

El contenido proteico de esta harina es bajo (23,8 %, b.s), así como su contenido en lisina disponible (3,70 g/16 g N; patrón de referencia FAO, 1973: 5,50 g lisina/16 g N).

En cuanto a las harinas de extracción de semilla de Colliguaya intergerrima no se registran antecedentes en litera-

tura sobre su estudio.

Sin duda el dato de mayor interés en la composición de estas harinas fue el contenido proteico (51,0 %; N x 6,25, b.s). El valor de lisina disponible obtenido para la harina de Colliguaya (3,89 g/16 g N) es similar al de Gevuina.

Los tenores en calcio y fósforo obtenidos para ambas harinas son muy distintos, así como las relaciones Ca:P (0,70 y 0,13 para Gevuina y Colliguaya respectivamente), pero en ambos el valor de esta relación está alejado de 1,5:1 - 1:1 (proporciones requeridas para una adecuada absorción de estos componentes en infantes y adultos respectivamente), sobre todo para la harina de Colliguaya.

El contenido en fósforo de ácido fítico fue mucho mayor para Colliguaya intergerrima, ya que representó un 68 % del fósforo total, en tanto que para Gevuina avellana fue 37 %.

La actividad antitriptica fue muy baja en ambas harinas (1,05 y 0,60 UTI/mg de harina para Gevuina y Colliguaya respectivamente), lo que indica que este factor no representaría un problema para la ingesta de estas harinas.

Sobre la cáscara molida del fruto de Colliguaya intergerrima se realizaron algunas determinaciones con los siguientes resultados: Humedad (4,82 %); Cenizas (1,23 %, b.s); Fibra cruda (57,6 %, b.s) y Proteína (2,50 %; N x 6,25, b.s).

La observación que surge de estos resultados reside en la concentración significativamente mayor de materias minerales en la harina de pepa, respecto de la cáscara molida. Como era de esperar, el contenido en fibra cruda fue muy superior en cáscara y el proteico mucho menor.

Estas cifras indicarían la conveniencia del descascara-

do previo del fruto entero, con el objeto de obtener harinas de contenidos elevados en proteínas y bajos en fibra.

6.2. Investigación y dosaje de azúcares reductores, invertibles y sacarificables.

En la Tabla 8 figuran los valores obtenidos en las determinaciones de contenido en azúcares reductores (expresados en glucosa), azúcares invertibles (expresados en sacarosa) e hidratos de carbono sacarificables (expresados en almidón).

Se observa que los hidratos de carbono sacarificables se encuentran en mayor concentración, fundamentalmente en el caso de Colliguaya donde éstos representan un 78 % del total. No se observó la presencia de almidón en ninguna de las dos harinas.

El contenido en azúcares reductores fue muy bajo para Colliguaya, no así para Gevuina donde su contenido fue cercano al de hidratos de carbono sacarificables. Los valores para azúcares invertibles fueron mayores que los de azúcares reductores para Colliguaya y menores para Gevuina.

Estas determinaciones se complementaron con la identificación cromatográfica de los azúcares reductores, invertibles y de los azúcares componentes de los hidratos de carbono sacarificables.

Los hidratos de carbono identificados fueron los mismos en ambas harinas, como se indica en la siguiente tabla:

Gevuina avellana

Muestra tal cual: glucosa, fructosa, sacarosa.

Muestra invertida: glucosa, fructosa.

Hidratos de carbono

sacarificables: glucosa, galactosa, arabinosa,
xilosa.

Colliguaya intergerrima

Muestra tal cual: glucosa, fructosa, sacarosa.

Muestra invertida: glucosa, fructosa.

Hidratos de carbono

sacarificables: glucosa, galactosa, arabinosa,
xilosa.

6.3. Estudios sobre lípidos remanentes luego de agotamiento por hexano.

6.3.1. Lípidos polares (extraíbles por mezcla ternaria).

El agotamiento por hexano de la semilla molida extrajo la mayor parte de los lípidos no polares (lípidos neutros) quedando retenidos principalmente lípidos polares, difícilmente extraíbles por ese solvente. En consecuencia las harinas (previa determinación de sus contenidos acuosos) se trataron con un solvente monofásico tipo Folch constituido por $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CHCl}_3 : \text{H}_2\text{O}$. A partir de los extractos y por dilución acuosa, se obtuvieron soluciones de estos lípidos en cloroformo, los que se recuperaron por destilación del solvente y calentamiento final a 100° en estufa de vacío (ver Parte II).

Estos lípidos se saponificaron con potasa alcohólica y resolvieron en insaponificable y ácidos totales cuyos valores, así como los rendimientos en lípidos polares de ambas harinas figuran en la Tabla 10.

Los ácidos totales separados por saponificación de ambos

extractos lipídicos se esterificaron con metanol y estudiaron sus composiciones acídicas por CGL (Figuras 13 y 14). La Tabla 11 resume los valores obtenidos. La comparación de estos datos respecto de la composición acídica de los aceites crudos de extracción (Tabla 4), señala una notable similitud entre los valores para el caso de Gevuina avellana, así como grandes diferencias entre las composiciones acídicas de los aceites crudos de extracción y los lípidos polares de Colliguaya intergerrima.

En estos últimos se observa un notable incremento en los porcentajes de 16:0 (de 10,3 a 24,3 %) y 18:2 (de 38,5 a 49,2%) y una disminución en los valores de 18:1 (de 18,7 a 11,7 %), 18:3 (23,6 a 11,5 %) y 20:1 (de 6,3 a 1,7 %).

6.3.2. Lípidos retenidos.

Los valores de rendimiento, ácidos grasos e insaponificable de estos lípidos se informan en la Tabla 10.

El porcentaje de lípidos retenidos es mayor para Gevuina que para Colliguaya, lo que asociado también a una mayor cantidad de lípidos polares resulta en un alto porcentaje de lípidos remanentes del agotamiento por hexano % harina.

Los componentes acídicos de estos lípidos se examinaron por CGL a través de sus ésteres metílicos.

Los resultados figuran en la Tabla 12. Las cifras obtenidas para Colliguaya difieren de los valores correspondientes a los lípidos extraídos por mezcla ternaria, registrándose en los lípidos retenidos mayores porcentajes en 18:1, 18:3 y 20:1 y menores en 16:0 y 18:2. Las diferencias entre los lípidos retenidos y los polares de Gevuina no resultaron significati-

vas.

Las Figuras 15 y 16 reproducen los cromatogramas correspondientes al análisis por CGL de los ésteres metílicos de estos lípidos para Gevuina y Colliguaya respectivamente.

7. Aislamiento de proteínas de harinas de extracción de Gevuina avellana y Colliguaya intergerrima.

7.1. Obtención de los aislados.

La literatura no registra antecedentes sobre aislados proteicos provenientes de harinas de semilla de Gevuina avellana y Colliguaya intergerrima. Por tal motivo se decidió aislar las proteínas de ambas semillas a fin de observar los rendimientos de extracción de nitrógeno total, el valor de pH de máxima precipitación, el rendimiento en aislado proteico y su análisis, de acuerdo a los métodos expuestos en la Parte II.

Basado en lo observado en las experiencias realizadas con harinas de semilla de lino⁵¹, girasol⁵⁶, zapallo⁵⁷, sésamo⁵⁸, palma Acrocomia totai Mart. ("mbocaya")⁵⁹, cártamo⁶⁰, tomate⁶¹, cítricos⁶², damasco, ciruelay durazno⁶³, se eligió un ámbito de pH de extracción de 9,5-10,5, donde ocurre el óptimo para lograr una alta dispersión del material nitrogenado a partir de la harina de extracción sin exponer las proteínas a un medio de pH elevado que podría dañar su valor nutricional (64-67).

Se procedió luego a determinar el valor de pH de máxima precipitación (pH isoeléctrico) operando sobre los extractos obtenidos a pH 9,5-10,5. Para ello se precipitaron las proteínas a distintos valores de pH (ver Parte II) y una vez que estas fueron separadas por centrifugación se determinó para

cada valor de pH el N sobrenadante % de N dispersado en cada harina. Se obtuvieron de esta manera las cifras de la Tabla 13. La representación gráfica (Figuras 17 y 18) de los valores de N sobrenadante % N dispersado en función del pH de precipitación, muestran curvas cuyos mínimos se registraron a pH 4,0 para Gevuina avellana y a 4,2 para Colliguaya intergerrima.

Luego se procedió a obtener cantidades mayores de aislado proteico según el esquema de la Figura 19 con el fin de poder determinar algunas de sus características químicas.

Operando con 100 y 80 g de harina de Gevuina y Colliguaya respectivamente, se obtuvieron 12,45 y 22,61 g (12,45 y 28,26 %) de aislados respectivamente en forma de polvos livianos, una vez secos en vacío a 45°. El de Gevuina era de color amarillento y con leve olor indefinido, no así el de Colliguaya, cuya apariencia fue más satisfactoria siendo blanco e inodoro.

7.2. Balace de nitrógeno en la obtención de los aislados proteicos.

En los esquemas de las Figuras 20 y 21 están indicados los resultados de los balances cuantitativos de las distintas fracciones separadas durante el aislamiento de ambas proteínas.

Se observa que para Gevuina avellana el valor de N extraído % N total a pH 9,5-10,5 (63,70 %) fue bajo si se lo compara con los observados en la mayoría de las otras semillas mencionadas (lino⁵¹, girasol⁵⁶, zapallo⁵⁷, sésamo⁵⁸, palma Acrocomia totai⁵⁹ y cártamo⁶⁰).

También el porcentaje de nitrógeno precipitado al valor de pH de máxima precipitación respecto del nitrógeno solubili-

zado fue relativamente bajo (63,25 %). Estos valores indican que la recuperación de proteínas a partir de la harina de Gevuina es deficiente si se la compara con las obtenidas a partir de las harinas de semillas anteriormente citadas (N extraído % N total: 70-90; N precipitado % N soluble: 75-85).

Por el contrario, en el balance nitrogenado correspondiente a la obtención de los aislados proteicos de Colliguaya, se observa que tanto el valor de nitrógeno dispersado a pH 9,5-10,5 (82,0 % N total) como el porcentaje de nitrógeno precipitado a pH 4,2 respecto del nitrógeno extraído (73,4 %) fueron altos.

7.3. Análisis de los aislados proteicos.

De acuerdo a los métodos mencionados en la Parte II, se determinaron los valores correspondientes a: Pérdida de peso a 100° (vacío), Cenizas (500-550°), Nitrógeno total (Kjeldahl), Fósforo total^{31,32}, Fósforo de ácido fítico⁴⁶, Lisina disponible^{47,48}, Hidratos de carbono^{52,53} y Lípidos residuales^{44,45} con los resultados que figuran en la Tabla 14.

El contenido en nitrógeno del aislado de Gevuina fue bajo (13,28 % en base libre de humedad y cenizas), lo que según la experiencia recogida en el estudio de aislados proteicos de semillas de lino^{51,68} y cítricos⁶² (ambos con un porcentaje bajo de nitrógeno), llevó a suponer la presencia en este aislado, al igual que en los anteriormente nombrados, de hidratos de carbono fuertemente ligados a la parte proteica. Esto quedó confirmado al determinar su contenido en hidratos de carbono (método fenol-H₂SO₄^{52,53}) que representó 7,9 % de aislado proteico (expresado en galactosa).

El valor de lisina disponible en el aislado (3,55 g/16 gN) representa el 95,9 % del encontrado en la harina (3,70 g/16 gN).

Podría interpretarse entonces que durante el proceso de obtención de proteínas no se habría producido una pérdida apreciable de lisina disponible, tal como ocurre con otros aislados donde el porcentaje de retención es menor.

De todas maneras, la cantidad de lisina disponible en el aislado es baja (patrón FAO 1973: 5,5 g lisina/ 16 g N).

Los contenidos en fósforo total y de ácido fítico, se encuentran en el rango de valores hallados en otros aislados proteicos.

De la relación de fósforo de ácido fítico/ fósforo total se observa que el primero representa el 35 % del fósforo total, porcentaje inferior al que generalmente se registra para otros aislados de semillas como zapallo, tomate, durazno (90-91 %), lino, girasol (69-80 %), cártamo, cítrico y sésamo (45-55 %).

En contraste con el aislado proteico de Gevuina avellana, en el de Colliguaya intergerrima se observa un elevado contenido de Nitrógeno total (16,35 %; b,s). Esto sugiere un aislado de alto grado de pureza.

El valor de lisina disponible también resultó elevado (4,60 g/ 16 g N) si se lo compara con los valores obtenidos para Gevuina avellana y otras semillas. Se observa además un aumento del valor respecto del obtenido para la harina (3,88 g/ 16 g N).

La relación fósforo de ácido fítico/ fósforo total fue 42,9 % siendo ambos valores relativamente altos (0,54 y 1,26 % respectivamente).

El contenido en hidratos de carbono fue 2,6 % (expresado en galactosa), siendo este valor algo elevado respecto al esperado y a los observados en otros aislados proteicos, aunque no llega a los porcentajes hallados en aislados que contienen una elevada cantidad de hidratos de carbono ligados a proteínas.

Durante el proceso de purificación (lavado etanólico de los coágulos proteicos) se eliminan pigmentos lipídicos. A pesar de ello el porcentaje de lípidos retenidos en el aislado de Gevuina resultó muy elevado (7,51 % proteína seca) lo que sugiere la posibilidad de que estos lípidos se encuentren unidos a proteínas. El contenido de estos lípidos en materia insaponificable fue de 9,05 % y en ácidos grasos de 90,05%.

El porcentaje de lípidos retenidos en el aislado de Colliguaya (1,00 % proteína seca) fue mucho menor que en el caso del aislado de Gevuina, siendo el porcentaje de materia insaponificable 17,04 % y 82,96 % el de ácidos grasos.

Esto no significa que tales componentes preexistan en el aislado como tales, desde que en su obtención medió un proceso de saponificación drástica.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales se examinaron por CGL, obteniendo los valores que figuran en la Tabla 15. Las Figuras 22 y 23 reproducen los cromatogramas correspondientes.

En general los valores de composición acídica de los lípidos retenidos del aislado de Gevuina avellana presentan gran similitud con los de los aceites seminales (Tabla 4).

En el caso de los lípidos retenidos del aislado de Colliguaya intergerrima en cambio, si se compara su composición a-

cídica con la correspondiente a los aceites de semilla (Tablas 15 y 4) se observan diferencias en los porcentajes de la mayoría de los ácidos grasos, existiendo sin embargo gran similitud entre los primeros y los lípidos "polares" extraíbles por mezcla ternaria a partir de la harina de extracción (Tabla 11).

Sobre los residuos provenientes de ambas harinas de extracción luego de la dispersión a pH 9,5-10,5 se determinaron los valores de: Pérdida de peso a 100° (vacío), Cenizas (500-550°), Nitrógeno total (Kjeldahl) y Lisina disponible^{47,48}. Los resultados figuran en la Tabla 16.

7.4. Exámen analítico de los extractivos etanólicos de los coágulos proteicos.

De los líquidos etanólicos resultantes de la purificación de los coágulos proteicos, se aislaron residuos lipídicos cuyas características se observan en la Tabla 17. Es de destacar el alto contenido en lípidos % de proteína seca en el caso de Gevuina avellana (15,95 %), mucho mayor que los hallados para otros aislados.

El elevado valor de número de acidez de estos lípidos (139 mg KOH/g) sugiere que se habría producido saponificación de glicéridos y/o fosfolípidos durante el proceso alcalino de extracción de la proteína, liberándose los ácidos al valor de pH isoeléctrico y coprecipitando con las proteínas. Este comportamiento ha sido siempre observado en lípidos extraíbles por etanol a partir de coágulos proteicos de otras semillas. Es posible entonces que los lípidos preexistentes en las harinas de partida sufran transformaciones en el sentido señala-

do, durante el aislamiento de proteínas.

Los valores de composición acídica de los lípidos aislados de los extractos etanólicos (ver Tabla 18) son semejantes a los de composición acídica de los aceites seminales expuestos en la Tabla 4. La Figura 24 reproduce el cromatograma correspondiente a los lípidos extraíbles por etanol del aislado proteico de Gevuina avellana.

El contenido de lípidos % de proteína seca de Colliguaya intergerrima es mucho menor que el hallado para el aislado de Gevuina avellana así como también el número de acidez (30 mg KOH/g).

Los valores de composición acídica de estos lípidos figuran en la Tabla 18 y la Figura 25 muestra el cromatograma correspondiente.

Estas experiencias han esclarecido las condiciones operatorias a escala de laboratorio respecto de la obtención de aislados proteicos a partir de harinas de semilla de Gevuina avellana y Colliguaya intergerrima. Además proporcionaron información acerca de valores de extracción de nitrógeno y de rendimiento en aislados proteicos así como características analíticas de los mismos. Sería de interés que este estudio fuera completado con:

- Determinación de la composición en aminoácidos esenciales de los aislados.
- Evaluación biológica de los aislados (valor de utilización neta proteica) y valores de digestibilidad.
- Determinaciones de funcionalidad.
- En el caso de las harinas de semilla de Gevuina avellana

cabría realizar también estudios tendientes al logro de un mayor grado de solubilización del nitrógeno total que el registrado en las experiencias realizadas.

T A B L A S Y F I G U R A S

Tabla 1: Aceites de semilla de Proteaceas. Composición acídica (ácidos grasos %
 ácidos totales)¹⁸

<u>Subfamilia</u>	<u>Especies</u>	<u>12:0</u>	<u>14:0</u>	<u>16:0</u>	<u>18:0</u>	<u>20:0</u>	<u>22:0</u>	<u>24:0</u>
Greville- oidea	<i>Banksia integrifolia</i>	—	0,2	5,7	3,5	3,8	0,8	—
	<i>B. collina</i>	—	0,2	10,4	1,9	2,5	0,4	—
	<i>B. ericifolia</i>	—	0,2	10,6	2,2	2,5	—	—
	<i>Grevillea floribunda</i> (1)	—	0,3	2,3	7,2	5,9	3,3	1,3
	<i>G.robusta</i>	—	5,0	3,4	3,4	2,2	1,5	vest.
	<i>G. banksii</i>	—	0,1	2,0	5,6	4,3	1,2	—
	<i>Hakea salicifolia</i>	1,1	1,3	2,5	1,9	1,5	0,8	—
	<i>H. sericea</i>	0,8	1,9	3,3	1,8	2,5	3,1	1,2
	<i>Orites revoluta</i>	—	—	6,4	5,1	0,6	—	—
	<i>O. diversifolia</i>	—	0,1	4,5	0,9	0,7	—	—
	<i>Gevuina avellana</i> (1)	0,1	0,4	4,0	0,8	1,5	1,6	0,2
	<i>Macadamia integrifolia</i>	—	1,0	9,0	3,8	2,0	vest.	—
	<i>Hicksbeachia pinnatifolia</i>	—	0,5	2,4	0,4	0,5	0,6	vest.
	<i>Xylomelum pyriforme</i>	—	—	21,0	2,1	vest.	—	—
	<i>Kermadecia sinuata</i>	—	0,2	12,6	1,3	0,6	1,1	—
	<i>Lomatia hirsuta</i> (1)	0,3	0,2	12,2	1,5	0,6	—	—
	<i>Stenocarpus sinuatus</i>	—	vest.	8,1	7,9	0,9	0,7	—
	<i>Embothrium coccineum</i> (1)	0,5	0,3	8,3	0,9	0,1	—	—
	<i>Telopea truncata</i>	—	1,0	6,6	vest.	—	—	—

<u>14:1</u>	<u>16:1</u>	<u>18:1</u>	<u>18:2</u>	<u>18:3</u>	<u>20:1</u>	<u>20:2</u>	<u>22:1</u>	<u>22:2</u>	<u>24:1</u>	<u>Sat.</u>	<u>Insat.</u>
—	0,7	71,5	0,6	—	13,2	—	—	—	—	14,0	86,0
—	2,0	68,1	1,3	—	13,2	—	vest.	—	—	15,4	84,6
—	0,8	81,0	0,4	—	2,3	—	vest.	—	—	15,5	84,5
0,2	6,6	45,0	6,2	1,0	5,6	9,3	1,5	3,3	0,4	20,3	79,7
0,6	14,9	62,7	0,7	—	2,0	1,8	0,5	1,3	vest.	15,5	84,5
—	7,8	64,3	2,6	—	10,4	—	1,7	—	—	13,2	86,8
0,7	14,5	60,3	4,7	—	5,4	—	1,6	—	3,6	9,1	90,9
vest.	6,8	62,1	1,1	—	8,6	—	6,8	—	vest.	14,6	85,4
—	37,9	27,1	22,0	—	0,9	—	—	—	—	12,1	87,9
—	40,4	37,5	14,6	—	1,3	—	—	—	—	6,2	93,8
—	24,3	37,2	11,3	—	10,5	—	7,8	—	0,8	8,6	91,4
—	29,3	50,8	2,4	—	1,7	vest.	vest.	—	—	15,8	84,2
vest.	40,5	24,3	13,4	—	6,3	—	11,1	—	—	4,4	95,6
—	2,4	69,8	2,7	—	2,0	—	vest.	—	—	23,1	76,9
0,5	69,4	4,9	2,6	—	2,4	vest.	4,4	—	vest.	15,8	84,2
—	24,1	49,1	11,1	—	0,9	—	—	—	—	14,8	85,2
0,4	1,4	80,1	0,5	—	—	—	—	—	—	17,3	82,7
2,7	24,3	43,6	11,4	—	2,2	—	—	—	—	12,4	87,6
vest.	45,1	34,6	12,4	—	0,3	—	—	—	—	7,6	92,4

Tabla 1: (continuación)

<u>Subfamilia</u>	<u>Especies</u>	<u>12:0</u>	<u>14:0</u>	<u>16:0</u>	<u>18:0</u>	<u>20:0</u>	<u>22:0</u>	<u>14:1</u>
Greville- oidea	T. speciosissima	—	0,2	5,2	0,6	vest.	—	—
	Cardwellia sublimis	—	—	2,0	1,6	1,7	4,0	—
Proteoidea	Isopogon anemonifolius	1,3	1,5	15,3	4,0	2,5	—	—
	Protea compacta	—	2,0	12,7	6,6	0,9	—	—
	P. longiflora	—	1,0	10,4	3,8	1,8	vest.	—
	Bellendena montana	—	0,2	13,0	0,7	—	—	—
	Persoonia lanceolata	—	0,4	11,4	1,0	—	—	—
	Cenarrhenes nitida	—	vest.	7,5	0,7	—	—	—
	Beauprea balansae	—	0,6	25,6	5,3	1,8	—	0,1
	B. neglecta	—	0,2	15,0	3,4	vest.	—	—

(1) Datos de Cattaneo et al.

<u>16:1</u>	<u>18:1</u>	<u>18:2</u>	<u>18:3</u>	<u>20:1</u>	<u>20:2</u>	<u>22:1</u>	<u>Sat.</u>	<u>Insat.</u>
33,1	53,8	7,1	—	vest.	—	—	6,0	94,0
19,4	55,5	4,9	—	2,7	—	8,2	9,3	90,7
10,8	57,9	6,7	—	vest.	—	—	24,6	75,4
0,3	70,7	5,7	—	1,1	—	—	22,2	77,8
0,5	73,3	7,0	—	2,2	—	—	17,0	83,0
0,3	52,1	30,5	3,1	—	—	—	14,0	86,0
32,9	51,7	7,2	—	vest.	—	vest.	8,2	91,8
5,7	33,8	27,2	—	—	—	—	33,3	66,7
10,5	43,3	27,5	vest.	—	—	—	18,6	81,4

Tabla 2: Características de los frutos.

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
Peso medio del fruto (mg)	1879	408,5
Nº semillas/10 g	5	25
Diámetro medio (cm)	1,62	0,91
Relación cáscara/pepa	53,2/46,8	40,2/59,8
Contenido acuoso % pepa	39,1	4,67
Contenido acuoso % cáscara	31,5	10,37
Cenizas % pepa seca	3,20	3,14
Cenizas % cáscara seca	1,82	1,44
Aceite crudo % pepa	25,4	52,3
Aceite crudo % cáscara	0,42	1,20
Aceite crudo % pepa seca	41,8	54,9
Aceite crudo % cáscara seca	0,62	1,34

Tabla 3: Aceites crudos de extracción (hexano) de semilla.
Características físico-químicas.

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
Densidad relativa (25/4°)	0,9083	0,9201
Índice de refracción (25°)	1,4674	1,4747
Índice de saponificación	187,1	189,8
Índice de Yodo (Wijs)	86,9	151,3
N° de ácido (mg KOH/g)	2,54	1,14
Insaponificable %	1,92	1,18
Índice de Yodo del insaponificable	93,0	92,9
Ácidos totales %		93,66
Fósforo lipídico (mg P % g)	12,4	30,1
Tocoferoles totales (mg % g; como α -tocoferol)	12,0	41,6
Esteroles totales (mg % g; como sitosterol)	313,4	401,0

Tabla 4: Aceites crudos de extracción (hexano) de semilla.

Composición acídica (ácidos grasos % ácidos totales).

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
<u>14:0</u>	0,1	vest.
<u>16:0</u>	3,0	10,6
<u>16:1</u>	25,4	—
<u>17:0</u>	—	vest.
<u>18:0</u>	0,3	1,9
<u>18:1</u>	41,1	18,7
<u>18:2</u>	12,0	38,5
<u>18:3</u>	—	23,6
<u>20:0</u>	0,8	—
<u>20:1</u>	1,2	6,3
<u>20:2</u>	7,5	0,4
<u>22:0</u>	0,9	—
<u>22:1</u>	7,8	—

Tabla 5: Aceites crudos de extracción (hexano) de semilla.

Acidos grasos hidrogenados.

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
<u>14:0</u>	0,1	0,1
<u>16:0</u>	26,0	10,8
<u>18:0</u>	52,9	82,4
<u>20:0</u>	10,8	6,5
<u>22:0</u>	10,2	0,1
<u>23:0</u>	—	0,1

Tabla 6: Aceites crudos de extracción (hexano) de cáscara.

Composición acídica.

	<u>Gevuina</u>	<u>Colliguaya</u>
	<u>avellana</u>	<u>intergerrima</u>
<u>12:0</u>	0,2	—
<u>13:0</u>	vest.	—
<u>r-14:0</u>	vest.	—
<u>14:0</u>	2,4	0,1
<u>14:1</u>	vest.	—
<u>15:0</u>	0,4	vest.
<u>15:1 + r-16:0</u>	0,3	—
<u>16:0</u>	14,2	14,5
<u>16:1</u>	17,4	—
<u>17:0</u>	0,1	vest.
<u>17:1</u>	0,1	—
<u>18:0</u>	3,8	1,7
<u>18:1</u>	33,9	22,4
<u>18:2</u>	19,6	37,2
<u>18:3</u>	4,3	17,1
<u>20:0</u>	vest.	—
<u>20:1</u>	0,3	4,4
<u>20:2</u>	3,0	0,2
<u>r-22:0</u>	—	vest.
<u>22:0</u>	—	0,4
<u>22:1</u>	—	0,2
<u>r-23:0</u>	—	vest.
<u>23:0</u>	—	1,3
<u>23:1</u>	—	0,3
<u>24:0</u>	—	0,1

Tabla 7: Aceites crudos de extracción (hexano) de semilla.
Composición en esteroides (% de esteroides totales).

<u>Pico</u>	<u>Tr/Tr colesterol</u>	<u>% de esteroides</u>	
		<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
?	0,79	11,8	14,7
?	0,92	0,1	—
Colesterol	1,00	2,6	4,2
Brassicasterol	1,20	0,1	—
Campesterol	1,32	6,9	1,8
Stigmasterol	1,43	—	0,7
Sitosterol	1,65	78,5	78,6

Tabla 8: Harinas de extracción (hexano) de semilla.
Composición general.

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
Humedad %	3,80	5,47
Cenizas % (b.s)	5,90	6,56
Nitrógeno % (b.s)	3,81	8,17
Proteína cruda (Nx6,25) (b.s)	23,8	51,0
Fibra cruda % (b.s)	9,82	5,72
Azúcares reductores % (en glucosa; b.s) -	8,77	0,15
Azúcares invertibles % (en sacarosa; b.s)	2,13	6,43
Hidratos de carbono sacarificables % (en almidón; b.s)	10,63	22,79
Lípidos remanentes % (b.s)	6,76	2,78
Lisina disponible (g/16 g N)	3,70	3,89
Calcio (mg Ca % g; b.s)	294	171
Fósforo total (mg P % g; b.s)	419	1330
Fósforo de fítico (mg P % g; b.s)	157	903
Extracto etéreo % (éter etílico; b.s)	4,68	—
Actividad antitriptica (TUI/mg harina)	1,05	0,60

Tabla 9: Composición general de las harinas de extracción
(hexano) de semilla de Gevuina avellana¹¹.

	<u>% semilla agotada</u>
Humedad (100-105°)	8,5
Cenizas (500-550°)	5,3
Nitrógeno (b.s)	3,91
Proteína (N x 5,7)	21,1
Pentosanos (A.O.A.C.)	8,3
Fibra cruda (A.O.A.C.)	8,0
Extracto etéreo (éter etílico)	6,2
Azúcares reductores (en glucosa)	4,0
Azúcares invertibles (en sacarosa)	13,7
Hidratos de carbono sacarificables	5,5
Acido fítico (Casares y Moreno)	1,6

Tabla 10: Harinas de extracción (hexano) de semilla.
Contenido en lípidos "polares" (extraíbles por
mezcla ternaria) y en lípidos "retenidos".

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
<u>Lípidos "polares"</u>		
Líp. polares % harina (b.s.)	3,14	1,82
Acidos grasos totales % lípidos polares	73,38	56,07
Insaponificable % lípidos polares	7,68	13,68
Fósforo lipídico (mg P % líp. polares)	352	1239
<u>Lípidos "retenidos"</u>		
Líp. retenidos % harina (b.s.)	3,62	0,96
Acidos grasos totales % líp. retenidos	93,94	90,04

Tabla 11: Harinas de extracción (hexano) de semilla.
Composición acídica de los lípidos "polares"
(extraíbles por mezcla ternaria) (% ácidos totales).

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
<u>14:0</u>	0,1	vest.
<u>14:1</u>	vest.	—
<u>15:0</u>	vest.	vest.
<u>16:0</u>	4,7	24,3
<u>16:1</u>	25,8	—
<u>18:0</u>	0,4	1,4
<u>18:1</u>	42,6	11,7
<u>18:2</u>	11,3	49,2
<u>18:3</u>	—	11,5
<u>20:0</u>	0,6	—
<u>20:1</u>	0,7	1,7
<u>20:2</u>	7,3	0,2
<u>22:0</u>	0,6	—
<u>22:1</u>	5,9	—

Tabla 12: Harinas de extracción (hexano) de semilla.
Composición acídica de los lípidos retenidos
(% ácidos totales).

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
<u>14:0</u>	0,1	0,1
<u>16:0</u>	2,5	12,4
<u>16:1</u>	19,3	—
<u>17:0</u>	—	vest.
<u>17:1</u>	—	vest.
<u>18:0</u>	0,5	1,4
<u>18:1</u>	49,9	22,9
<u>18:2</u>	4,6	36,7
<u>18:3</u>	—	17,8
<u>20:0</u>	1,0	—
<u>20:1</u>	1,8	8,5
<u>20:2</u>	9,9	0,2
<u>22:0</u>	2,2	—
<u>22:1</u>	8,2	—

Tabla 13: Aislados proteicos de harinas de extracción de semilla. Elección del valor de pH de máxima precipitación.

<u>N sobrenadante % de N dispersado</u>		
<u>pH de precipitación</u>	<u>Gevuina avellana</u>	<u>Colliguaya intergerrima</u>
3,5	—	20,4
3,8	23,6	17,9
4,0	22,9	17,1
4,2	23,1	17,0
4,5	23,4	17,9
4,8	23,7	18,5
5,0	25,9	19,2
5,5	—	28,0
<u>pH isoeléctrico</u>	4,0	4,2

Tabla 14: Aislados proteicos de harinas de extracción de semilla. Valores analíticos de composición.

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
Rendimiento %	12,45	28,26
Pérdida de peso % (100°, vacío)	8,30	7,50
Cenizas % (b.s)	1,45	0,30
Nitrógeno % (b.s)	13,10	16,35
Nitrógeno % (b.s. y libre de cenizas)	13,29	16,40
Lisina disponible (g/16 g N)	3,55	4,60
P total (mg P % g; b.s)	517	1256
P de ácido fítico (mg P % g; b.s)	182	536
Hidratos de carbono % (como galactosa; b.s)	8,6	2,81
Lípidos retenidos % (b.s)	7,51	1,00

Tabla 15: Aislados proteicos de harinas de extracción de semilla. Composiciones acídicas (% ácidos totales) de lípidos retenidos.

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
<u>14:0</u>	0,1	vest.
<u>15:0</u>	—	vest.
<u>16:0</u>	3,5	23,9
<u>16:1</u>	20,7	0,6
<u>18:0</u>	0,3	1,3
<u>18:1</u>	45,4	12,3
<u>18:2</u>	12,0	52,5
<u>18:3</u>	vest.	7,1
<u>20:0</u>	0,5	—
<u>20:1</u>	0,8	2,3
<u>20:2</u>	7,9	—
<u>22:0</u>	1,7	—
<u>22:1</u>	7,1	—

Tabla 16: Aislados proteicos de harinas de extracción de semilla. Características analíticas de los residuos de extracción.

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
Residuo % harina	48,51	38,56
Pérdida de peso % (100°, vacío)	8,09	8,12
Cenizas % (b.s)	8,35	8,10
Nitrógeno % (b.s)	2,17	3,00
Lisina disponible (ε/16 g N)	1,30	2,46

Tabla 17: Aislados proteicos de harinas de extracción de semilla. Características analíticas de los lípidos extraídos por etanol.

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
Lípidos % proteína seca	15,95	4,03
Nº de acidez (mg KOH/g)	139	30
Acidos totales %	88,33	83,83
Insaponificable %	2,11	3,83
Fósforo lipídico (mg P % g)	254,3	129,4

Tabla 18: Aislados proteicos de harinas de extracción de semilla. Composiciones acídicas de los lípidos extraídos por etanol (ácidos grasos % ácidos totales).

	<u>Gevuina</u> <u>avellana</u>	<u>Colliguaya</u> <u>intergerrima</u>
<u>12:0</u>	—	vest.
<u>14:0</u>	—	vest.
<u>r-14:0</u>	0,1	0,1
<u>14:1</u>	vest.	—
<u>16:0</u>	3,7	16,0
<u>16:1</u>	24,5	—
<u>17:0</u>	—	vest.
<u>17:1</u>	—	vest.
<u>18:0</u>	0,3	1,6
<u>18:1</u>	41,1	20,2
<u>18:2</u>	13,5	43,5
<u>18:3</u>	vest.	13,9
<u>20:0</u>	0,6	—
<u>20:1</u>	0,5	4,3
<u>20:2</u>	9,0	0,4
<u>22:0</u>	0,4	—
<u>22:1</u>	6,3	—

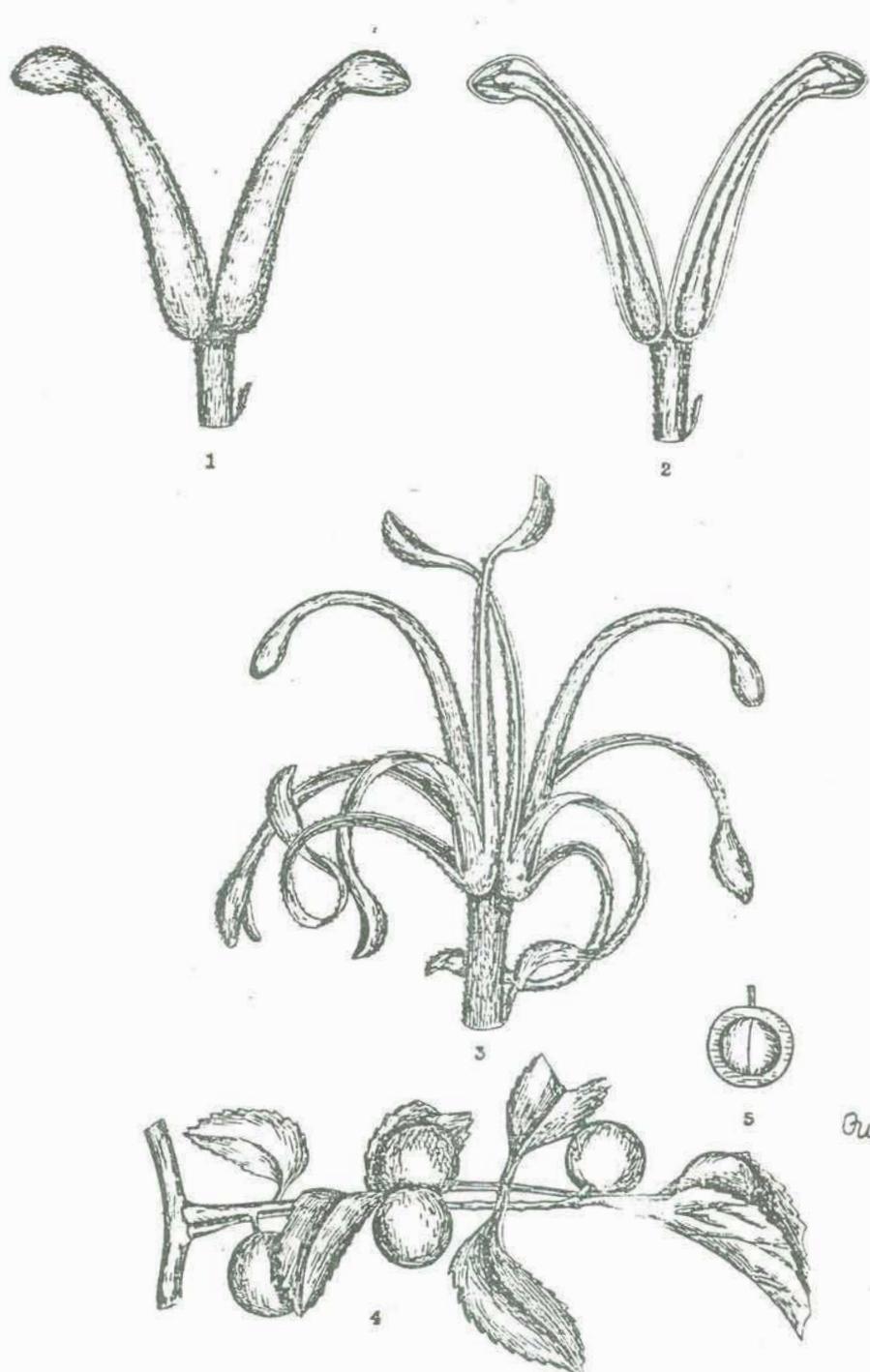


Figura 1: Gevuina avellana. 1. Flor gemela - 2. Corte longitudinal de una flor - 3. Flor abierta - 4. Ramita con frutos - 5. Fruto abierto. -

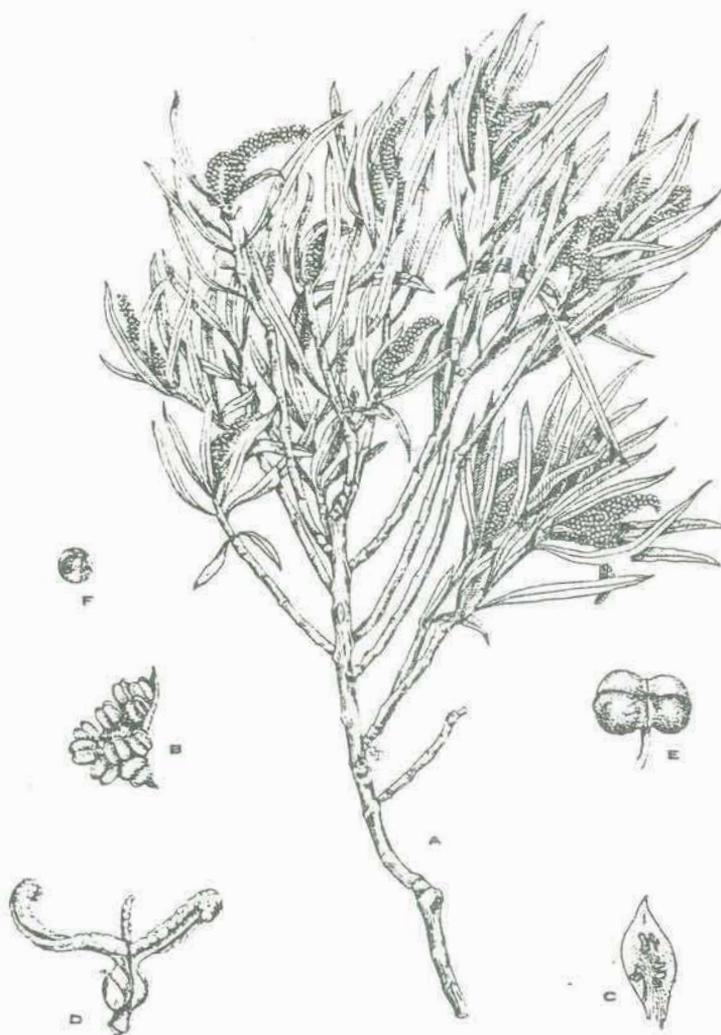


Figura 2: Colliguaya intergerrima. A.Rama - B.Parte infl.♂ -
C.Bráctea de la misma - D.Fl.♀ - E.Fruto - F.Semilla.

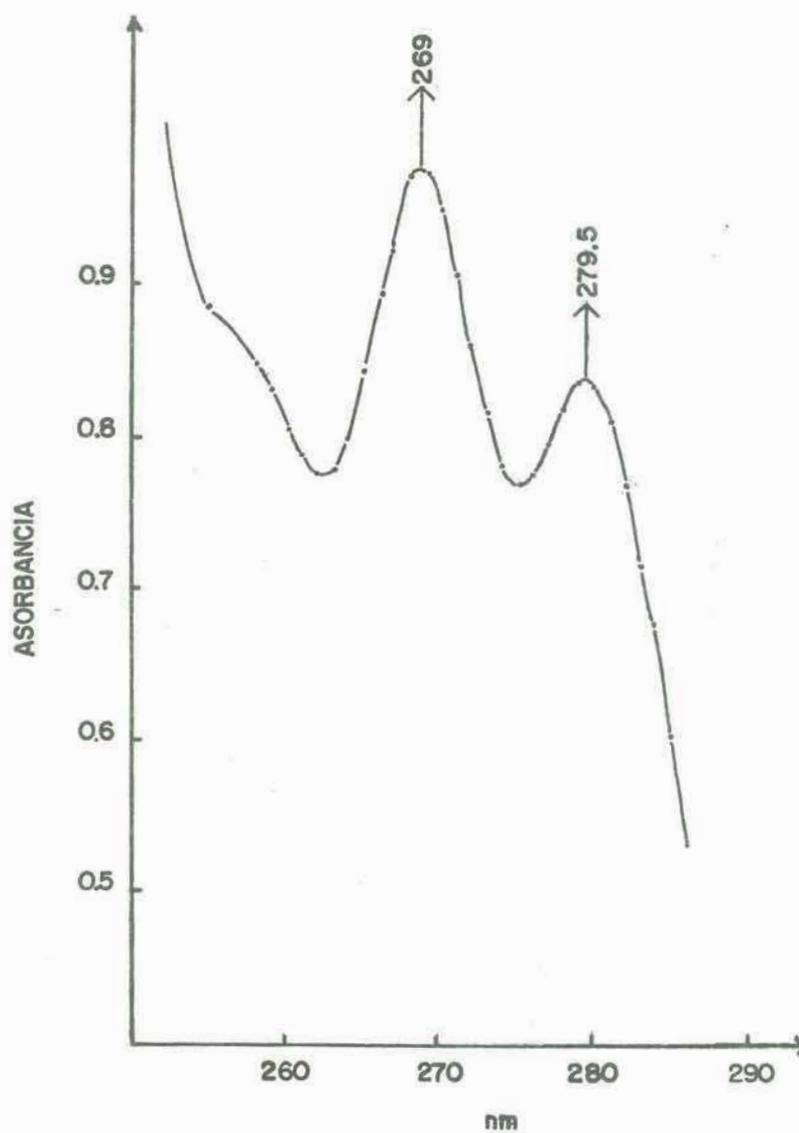


Figura 3: Aceite de semilla de Colliguaya intergerrima.
Exámen espectrofotométrico en U.V. Zona de trienos
conjugados.

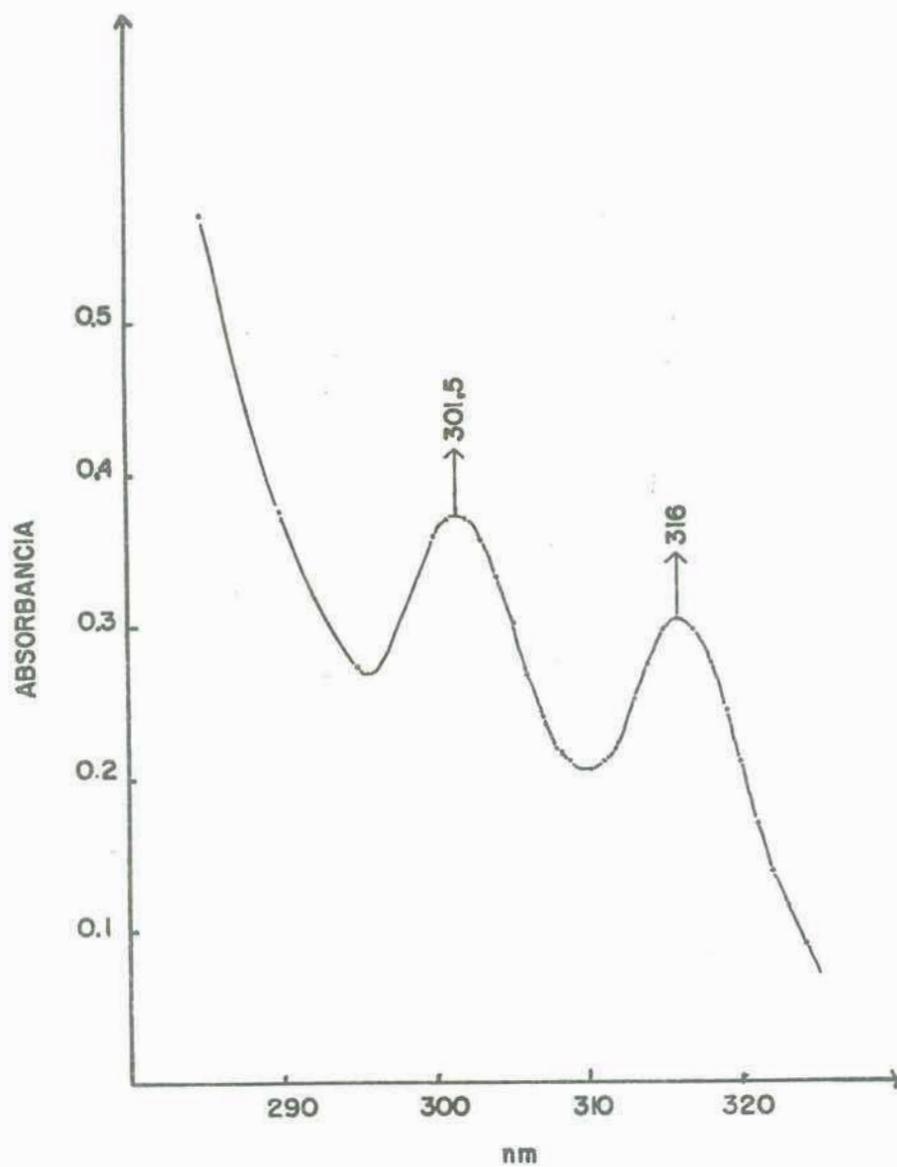


Figura 4: Aceite de semilla de Colliguaya intergerrima. Exámen espectrofotométrico en U.V. Zona de tetraenos conjugados.

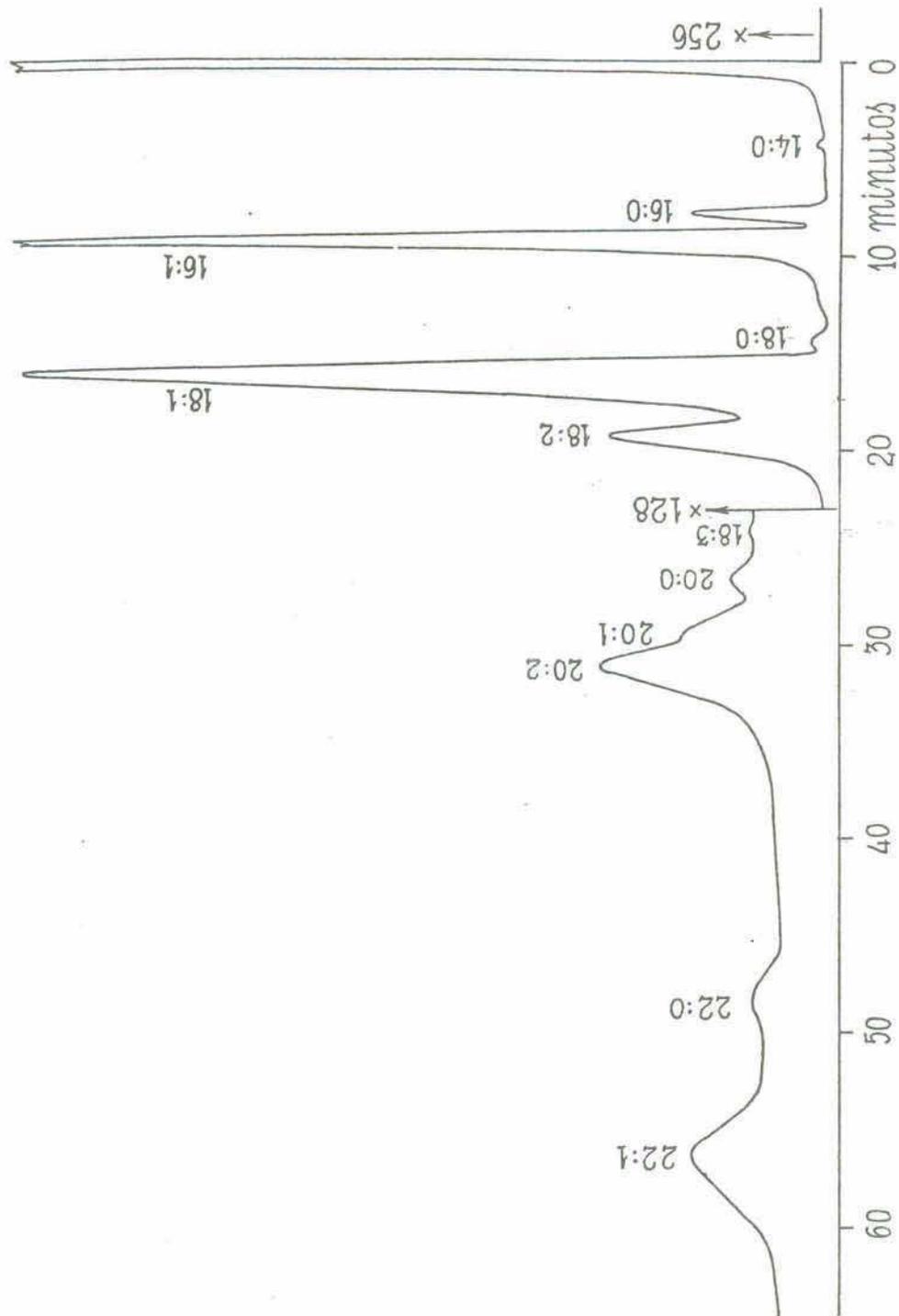


Figura 5: Aceite de semilla de Gevuina avellana. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales.

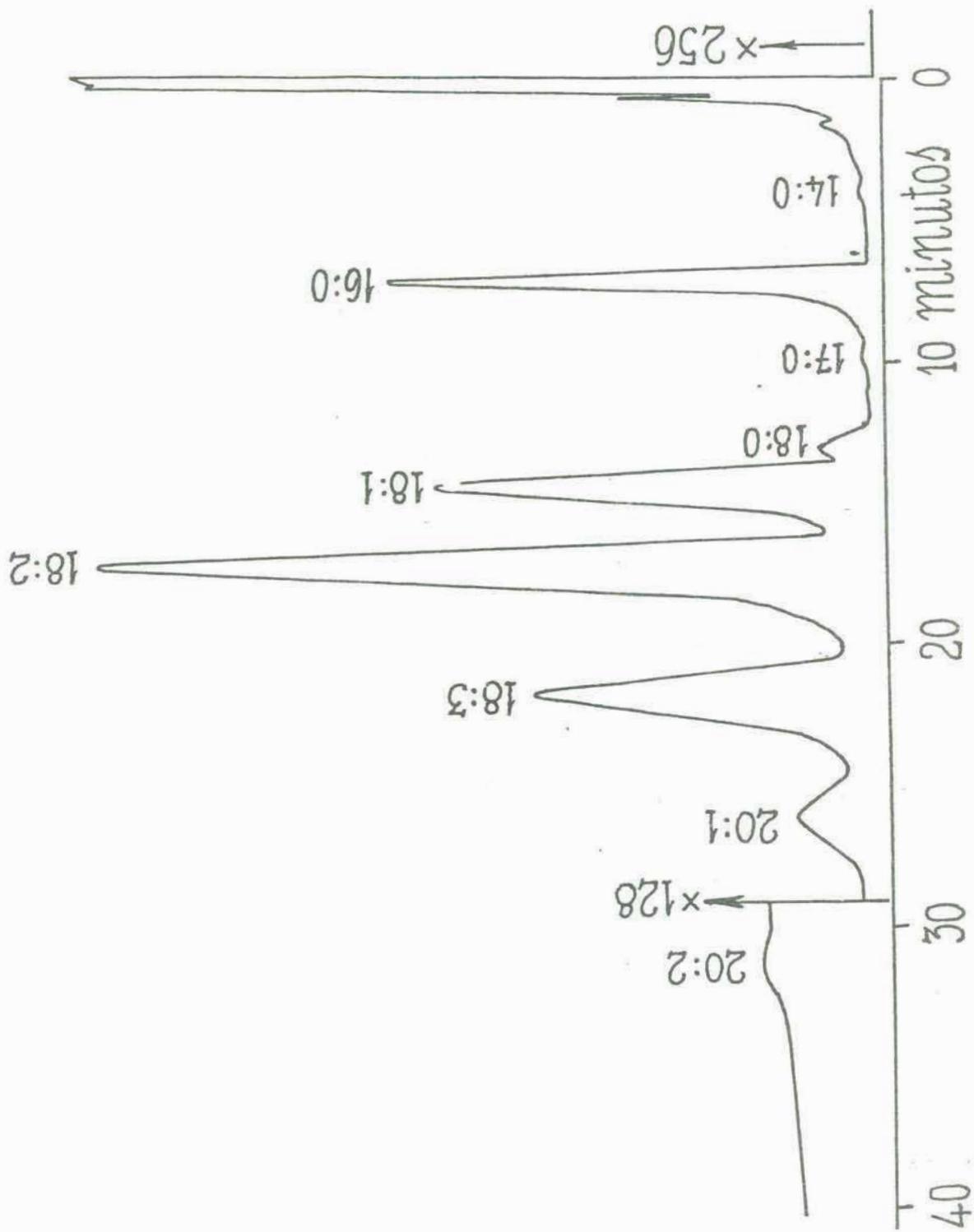


Figura 6: Aceite de semilla de Colliguaya intergerrima. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales.

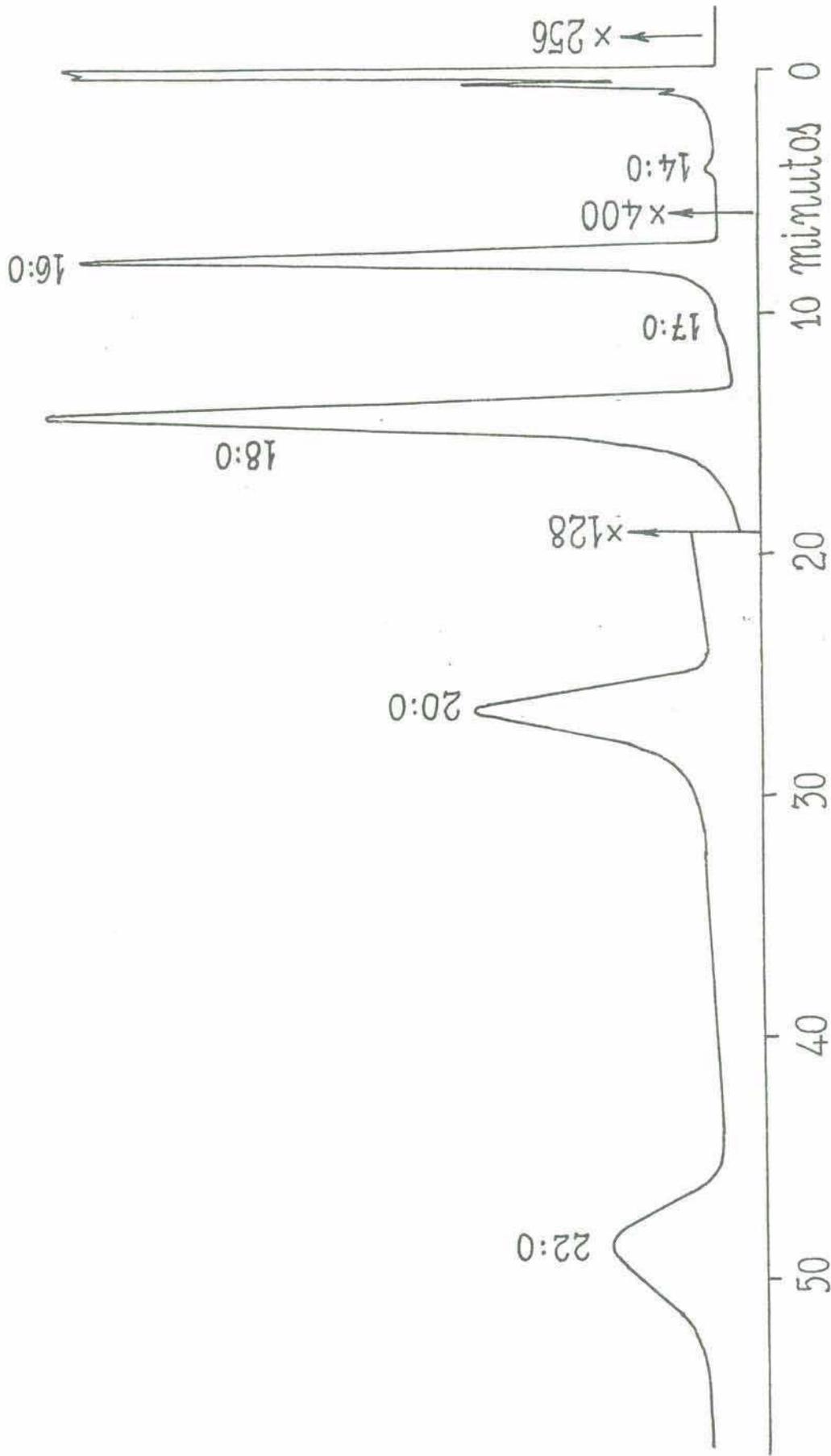


Figura 7: Aceite de semilla de Gevuina avellana. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos hidrogenados de los ácidos grasos totales.

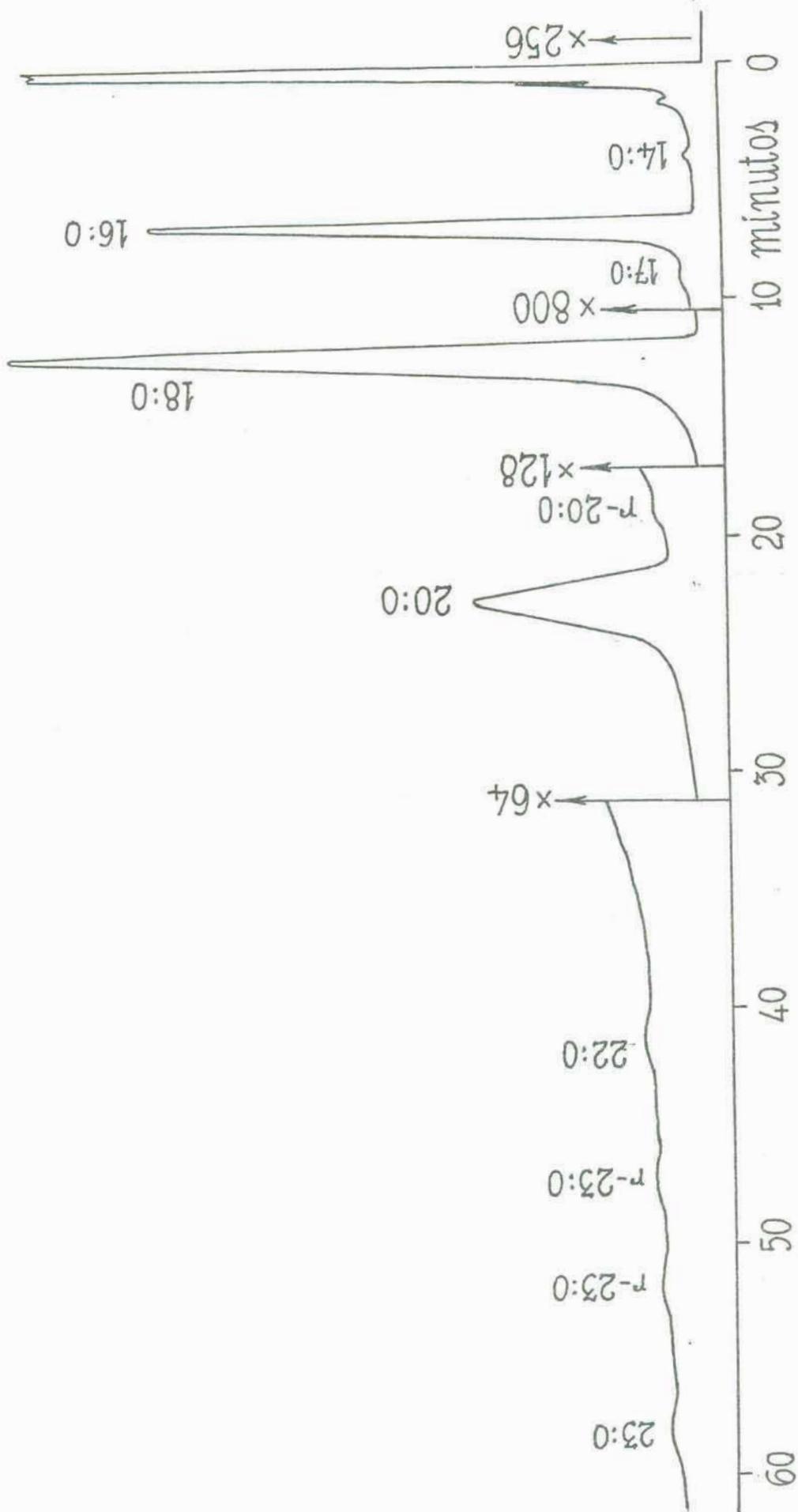


Figura 8: Aceite de semilla de Colliguaya intergerrima. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos hidrogenados de los ácidos grasos totales.

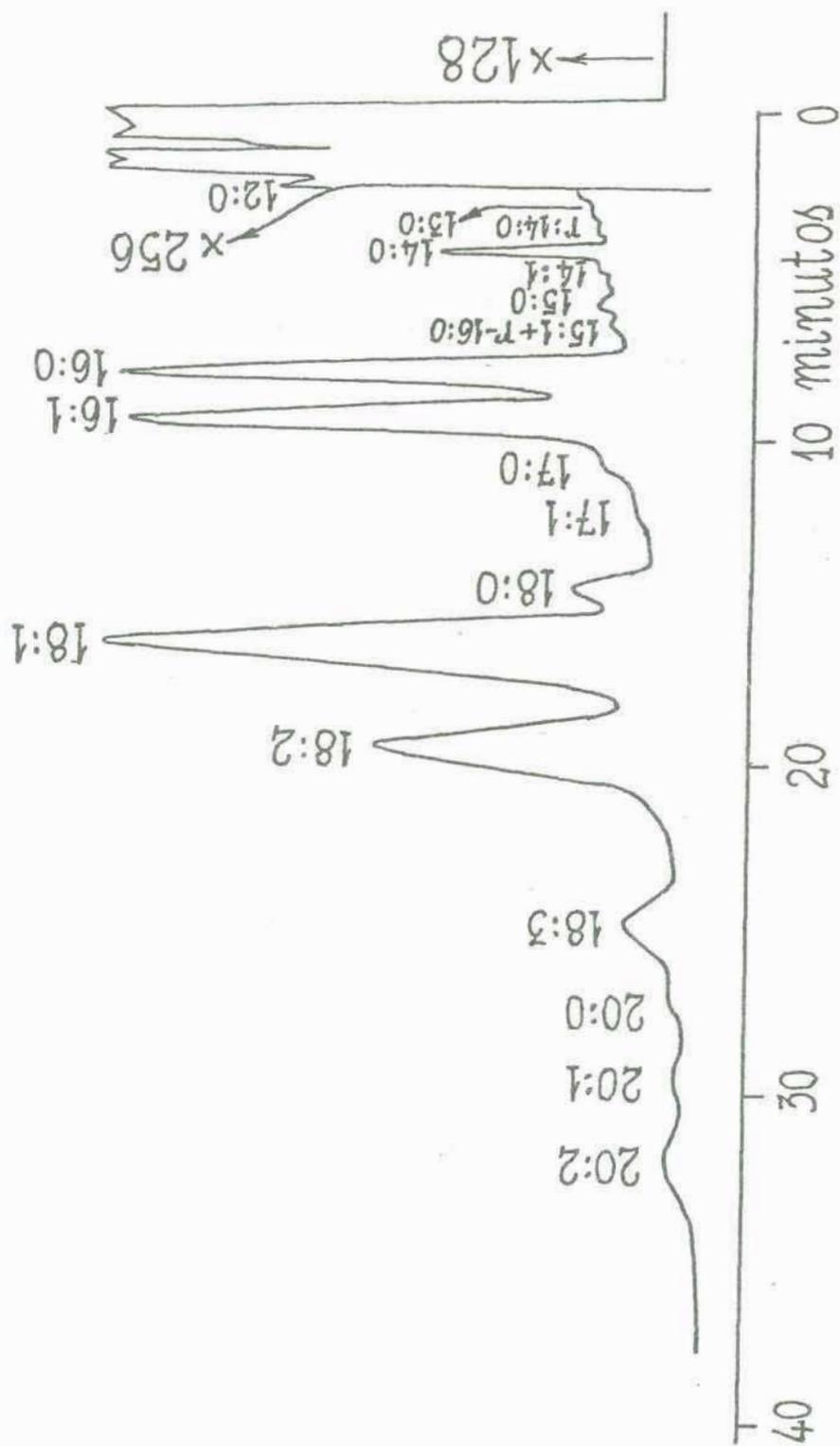
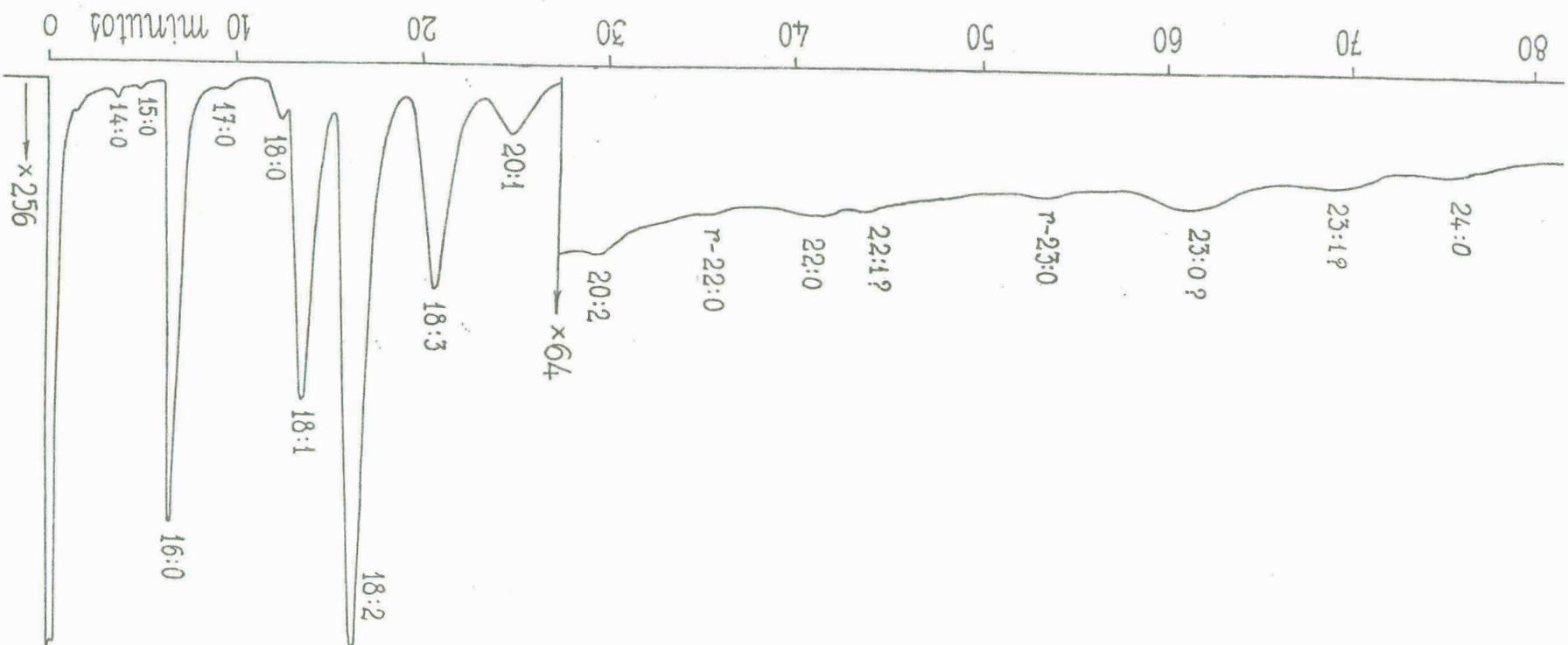


Figura 2: Semilla de Gevuina avellana. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los lípidos extraídos por hexano a partir de cáscara.

de cáscara.

metílicos de los ácidos grasos de los lípidos extraídos por hexano a partir

Figura 10: Semilla de Colliguaya intergrima. Cromatografía gas-líquido de los ésteres



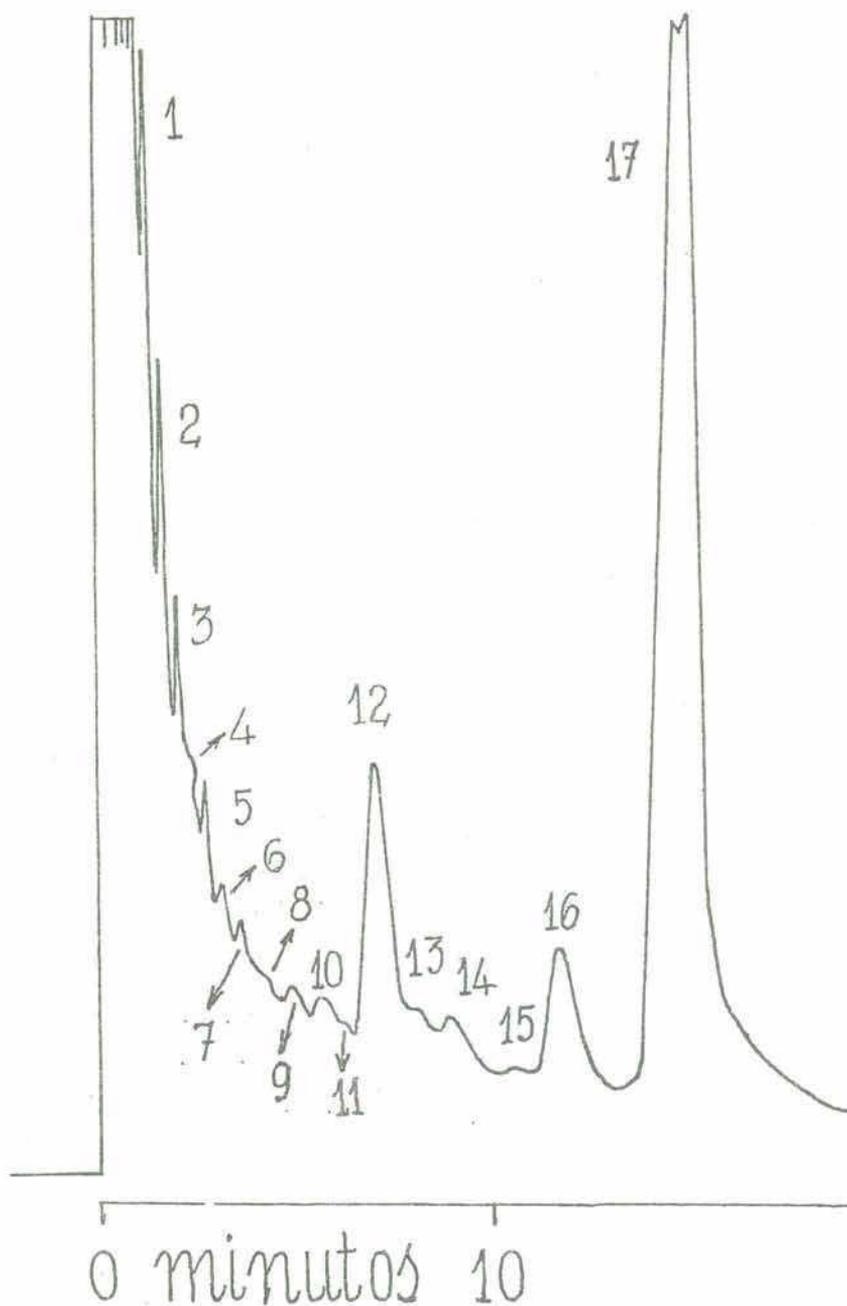


Figura 11: Aceite crudo de semilla de Gevuina avellana. Cromatografía gas-líquido de la fracción de esteroides. Valores de T_r/T_r colesterol para los picos registrados: 1 (0,13); 2 (0,18); 3 (0,24); 4 (0,27); 5 (0,31); 6 (0,36); 7 (0,41); 8 (0,48); 9 (0,54); 10 (0,64); 11 (0,70); 12 (0,79); 13 (0,92); 14 (1,00; colesterol); 15 (1,20; brassicasterol); 16 (1,32; campesterol); 17 (1,65; sitosterol).

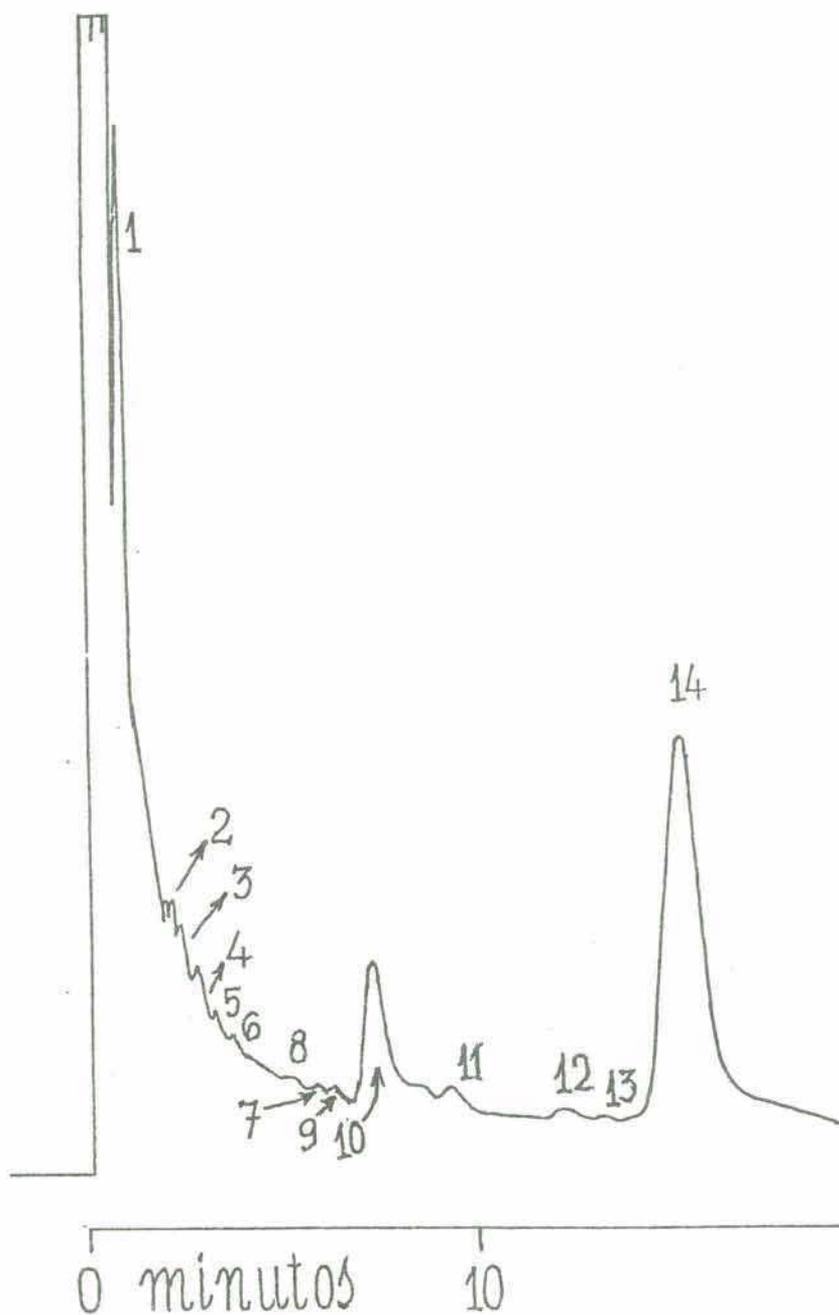


Figura 12: Aceite crudo de semilla de Colliguaya intergerrima. Cromatografía gas-líquido de la fracción de esteroides. Valores de T_r/T_r colesterol para los picos registrados: 1 (0,12); 2 (0,23); 3 (0,26); 4 (0,30); 5 (0,36); 6 (0,40); 7 (0,55); 8 (0,64); 9 (0,67); 10 (0,79); 11 (1,00; colesterol); 12 (1,32; campesterol); 13 (1,43; stigmasterol); 14 (1,65; sitosterol).

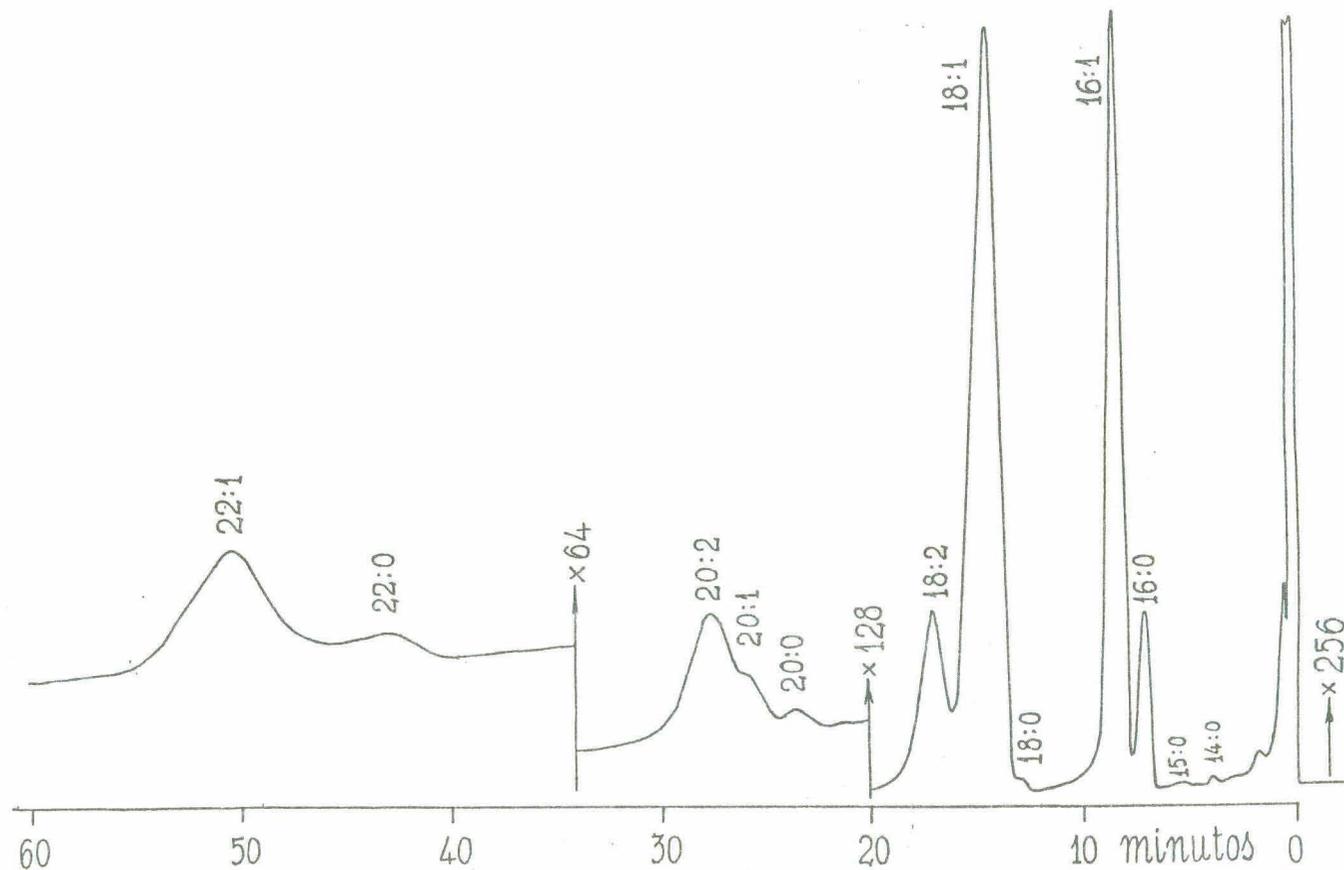


Figura 13: Semilla de Gevuina avellana. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los lípidos extraídos por mezcla ternaria (Folch) de harina de extracción (previamente agotada por hexano).

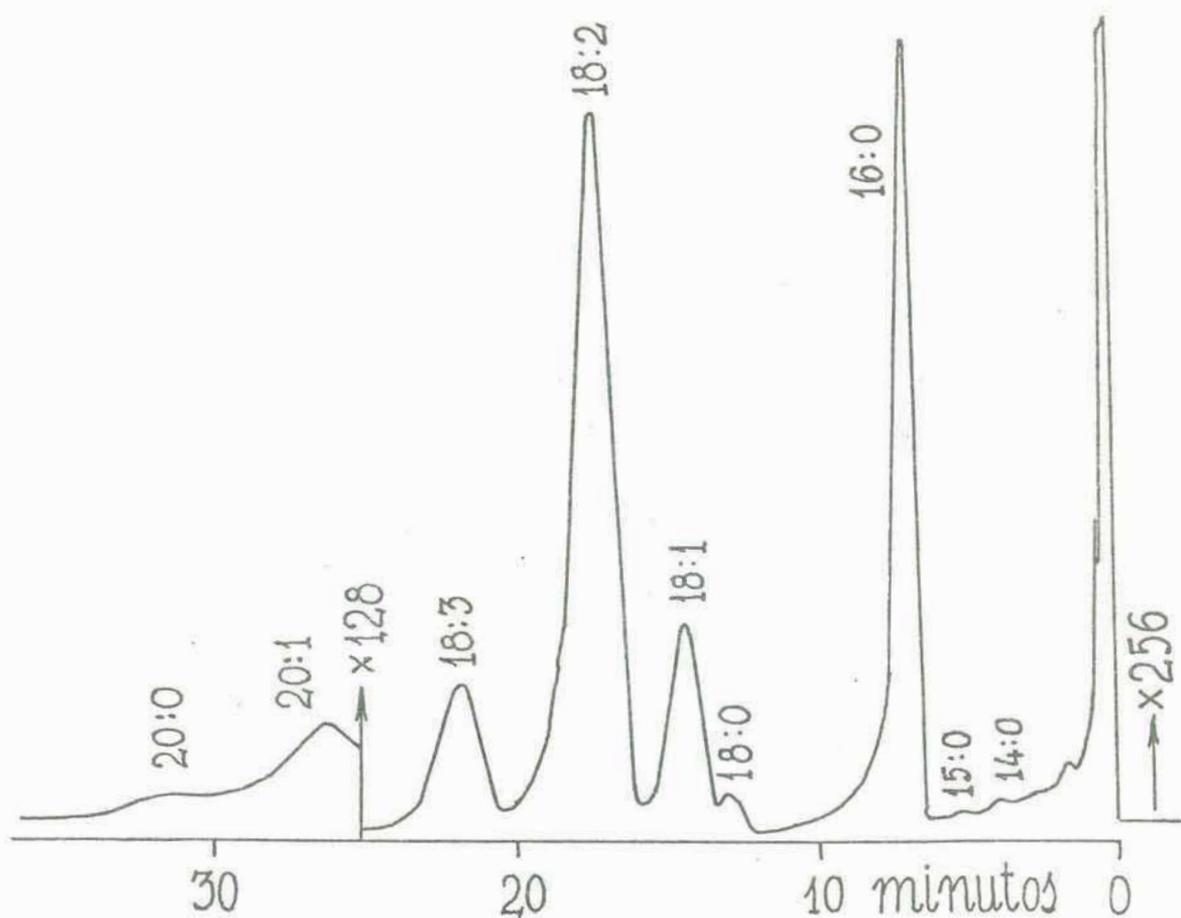


Figura 14: Semilla de Colliguaya intergerrima. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los lípidos extraídos por mezcla ternaria (Folch) de harina de extracción (previamente agotada por hexano).

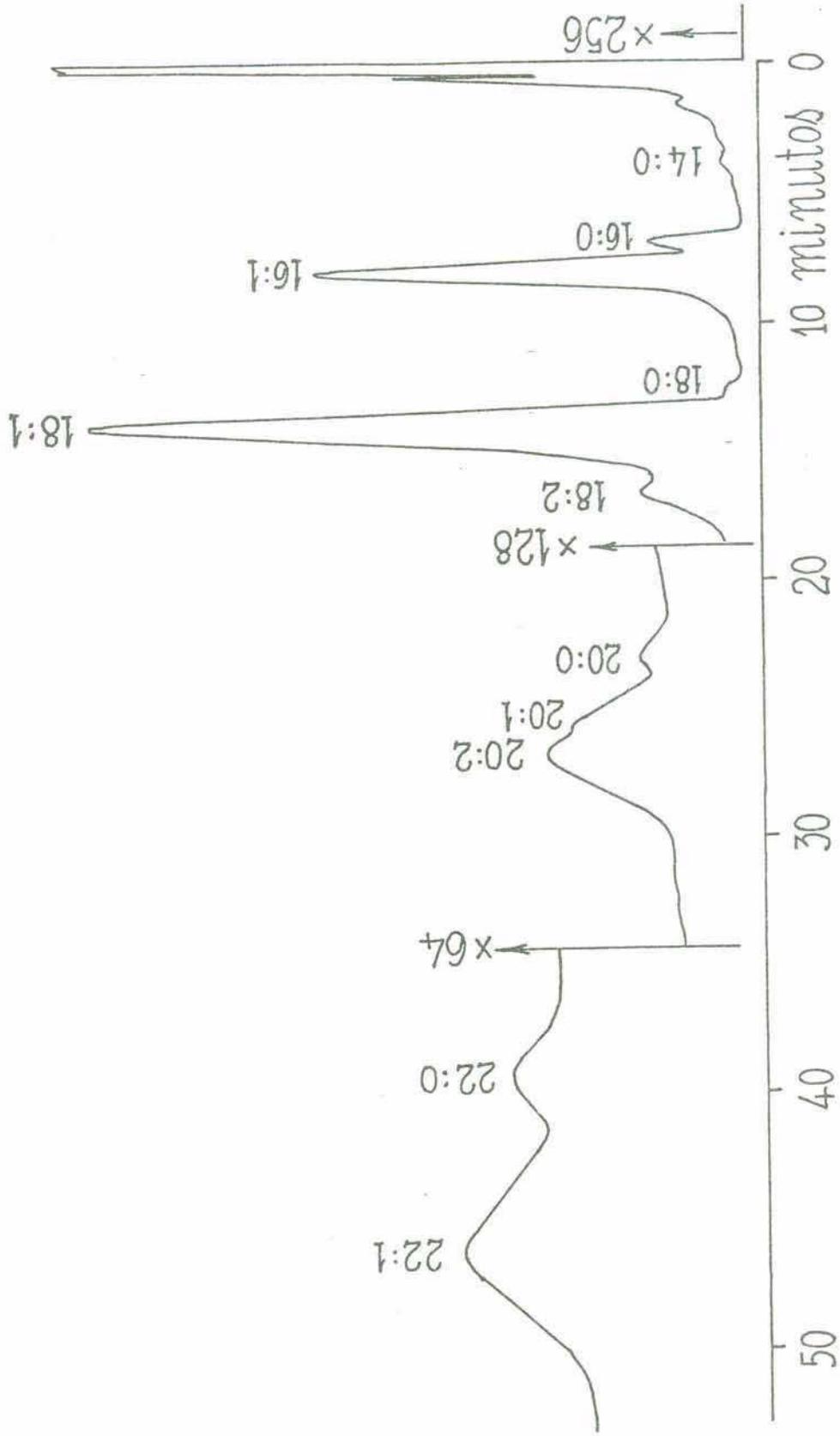


Figura 15: Semilla de Gevuina avellana. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los lípidos "retenidos" en la harina de extracción.

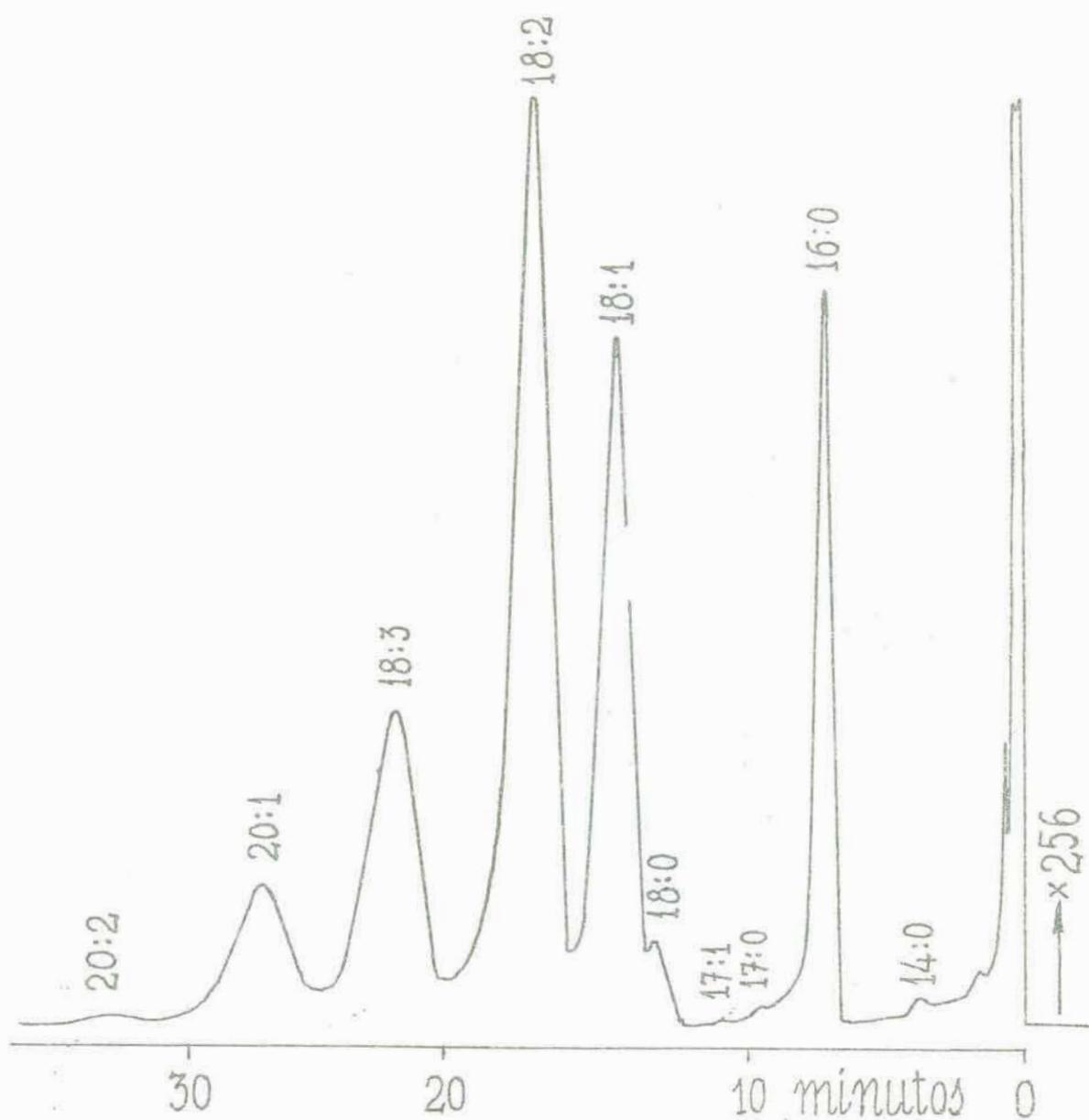


Figura 16: Semilla de Colliguaya intergerrima. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los lípidos "retenidos" en la harina de extracción.

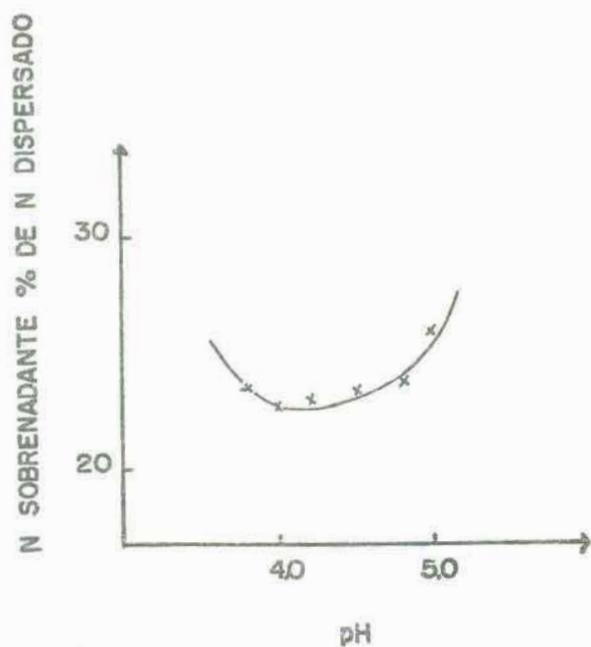


Figura 17: Aislado proteico de harina de extracción de semilla de Gevuina ave-llana. Valores de pH de máxima precipitación.

Figura 18: Aislado proteico de harina de semilla de Colli-guaya intergerrima. Valores de pH de máxima precipitación.

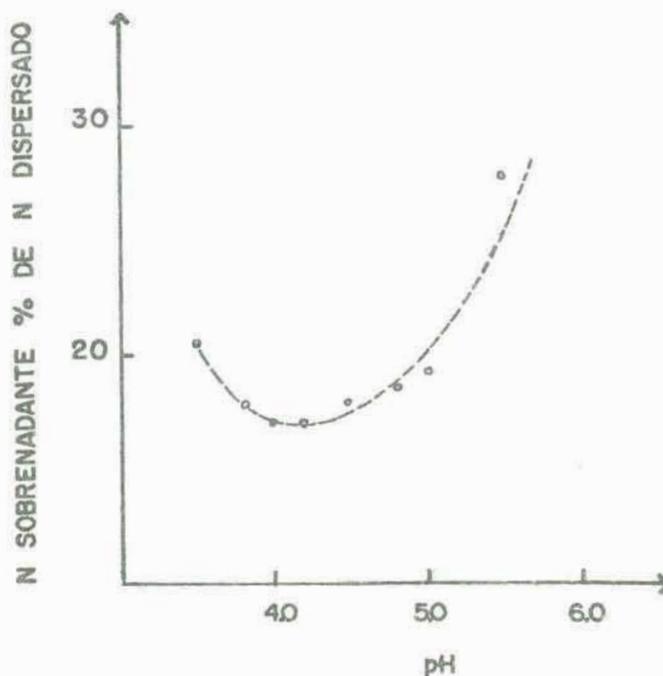
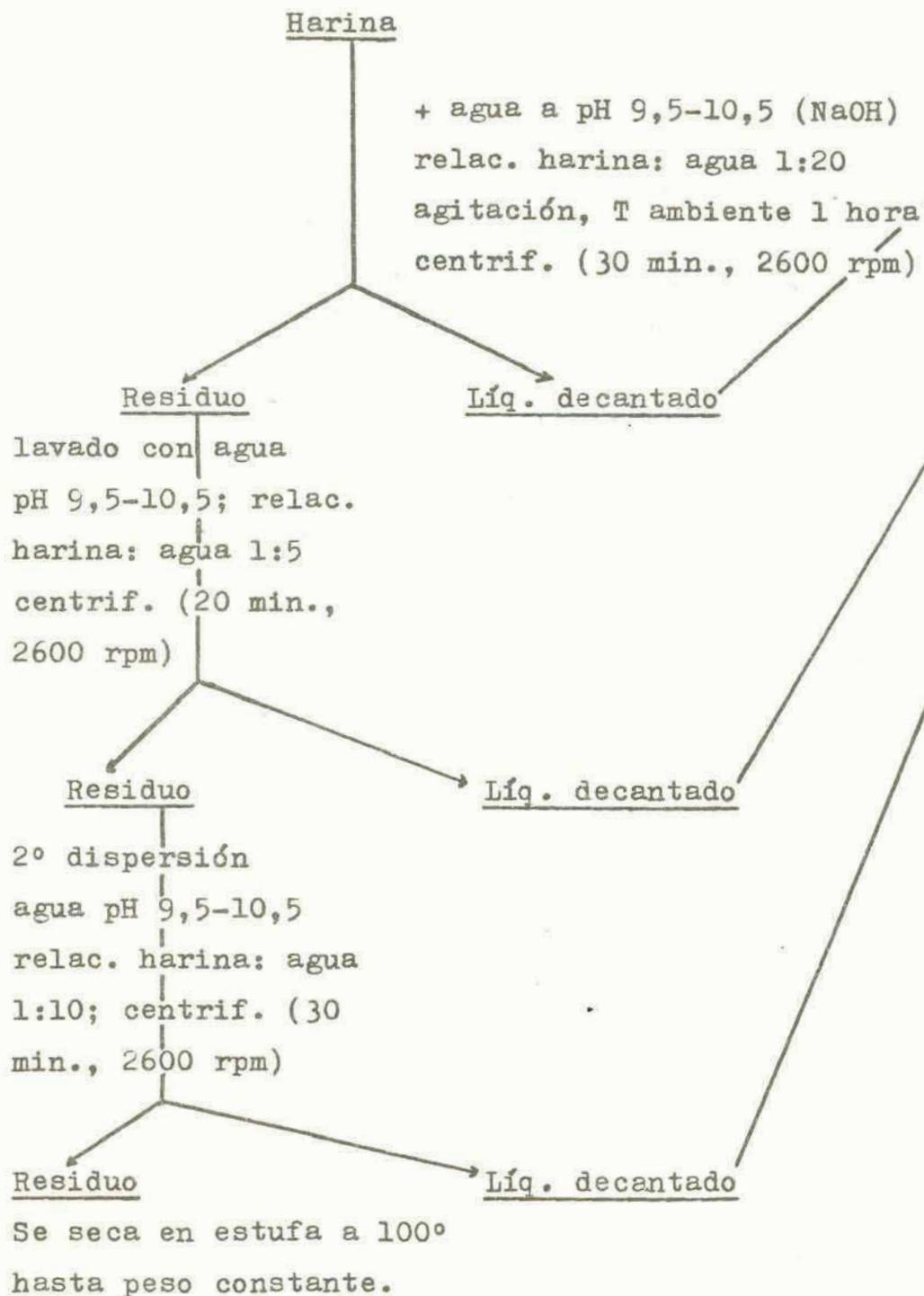


Figura 19: Aislamiento de proteínas a partir de harinas de extracción.



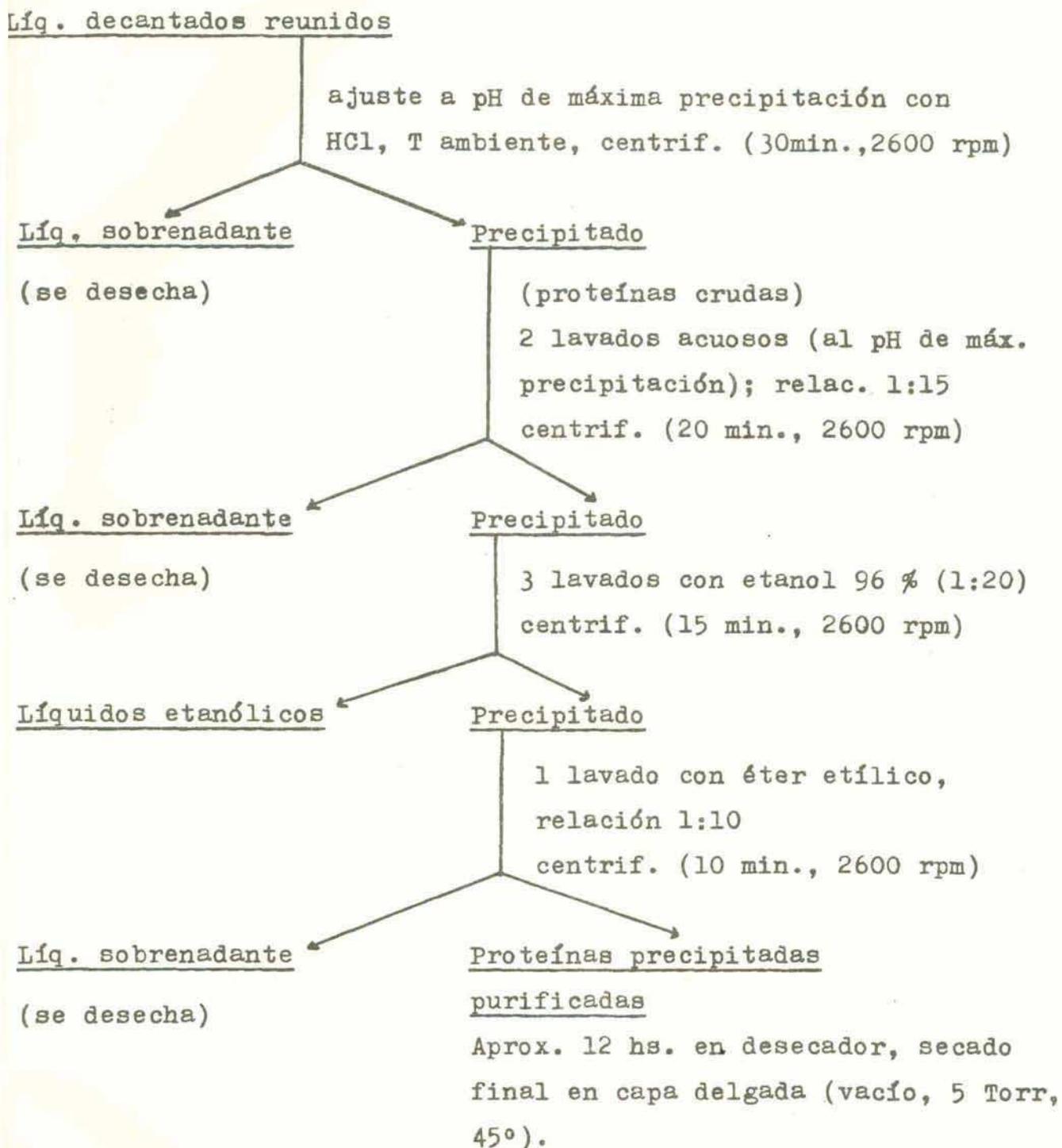


Figura 20: Aislado proteico de semilla de Gevuina avellana.
Balance nitrogenado.

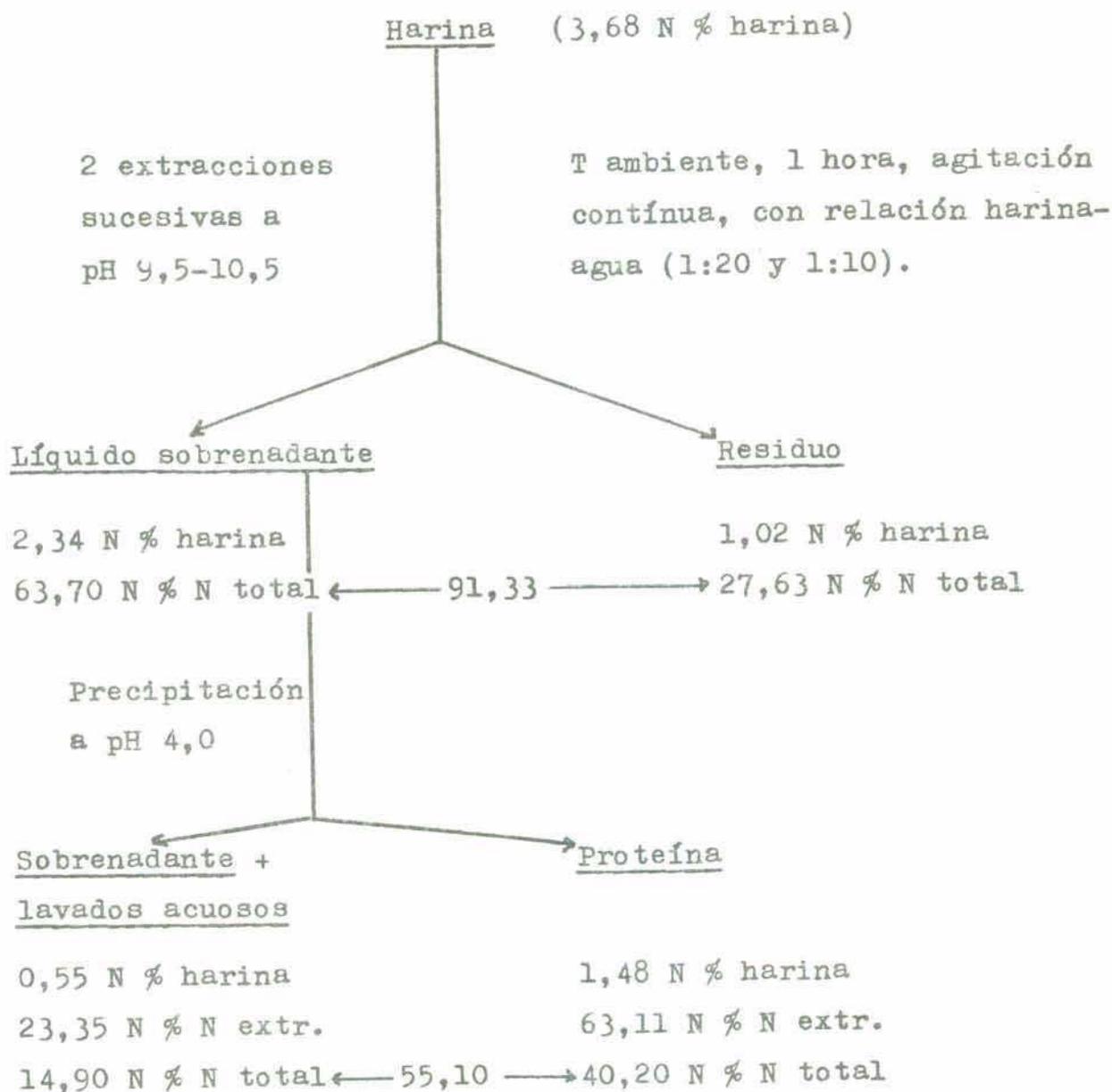
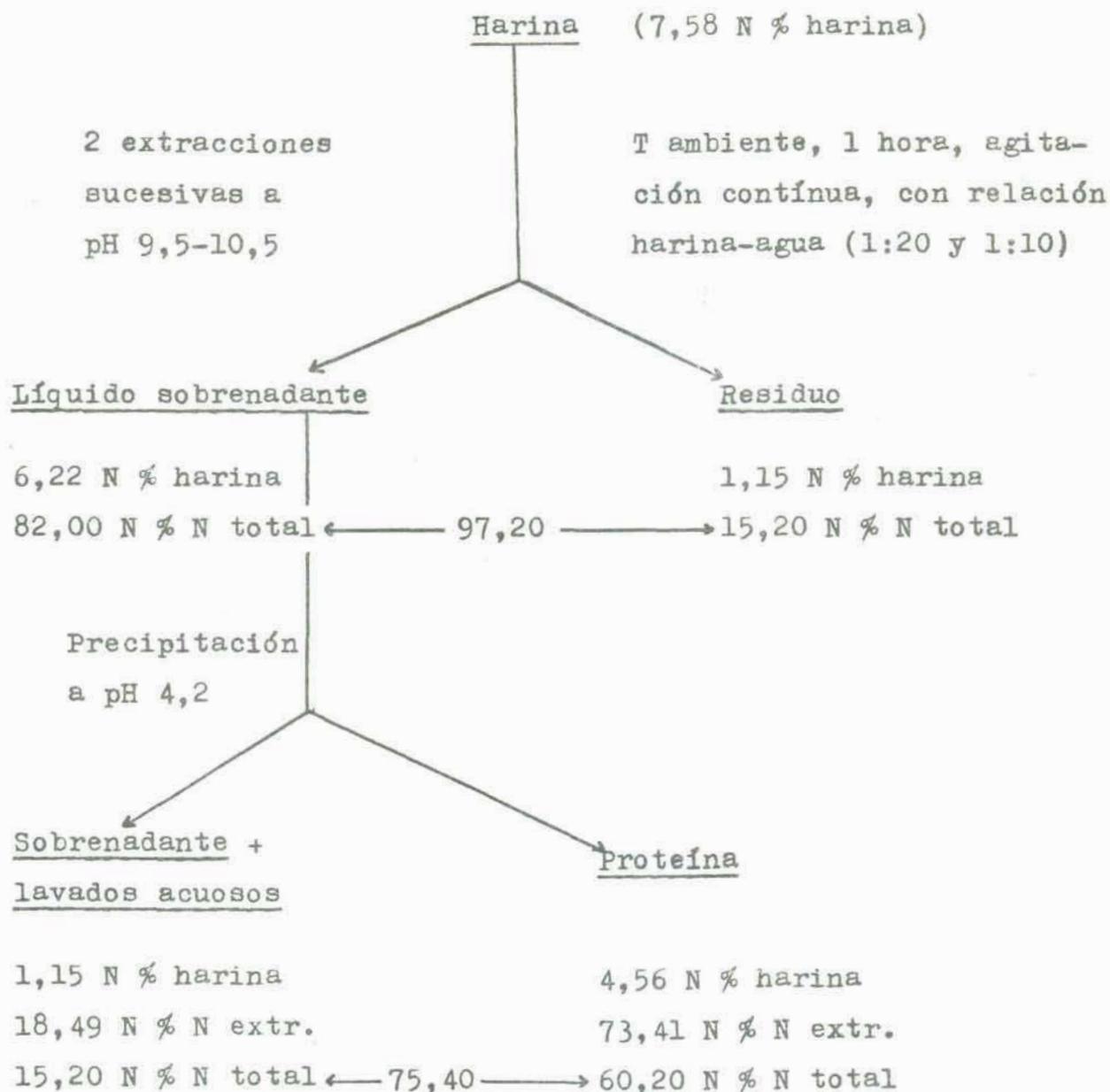


Figura 21: Aislado proteico de semilla de Colliguaya intergerrima. Balance nitrogenado.



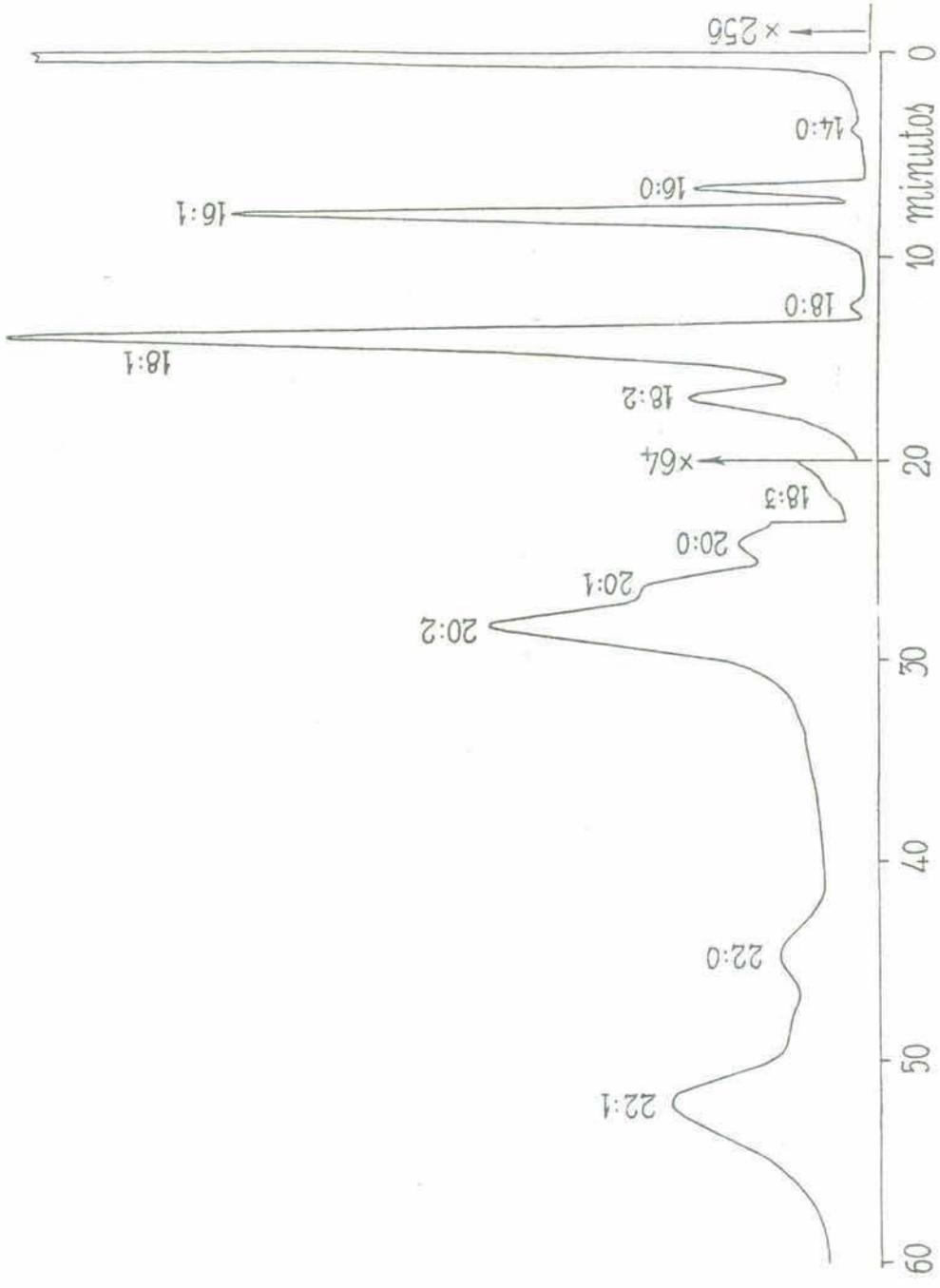


Figura 22: Semilla de Gevuina avellana. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los lípidos "retenidos" en el aislado proteico.

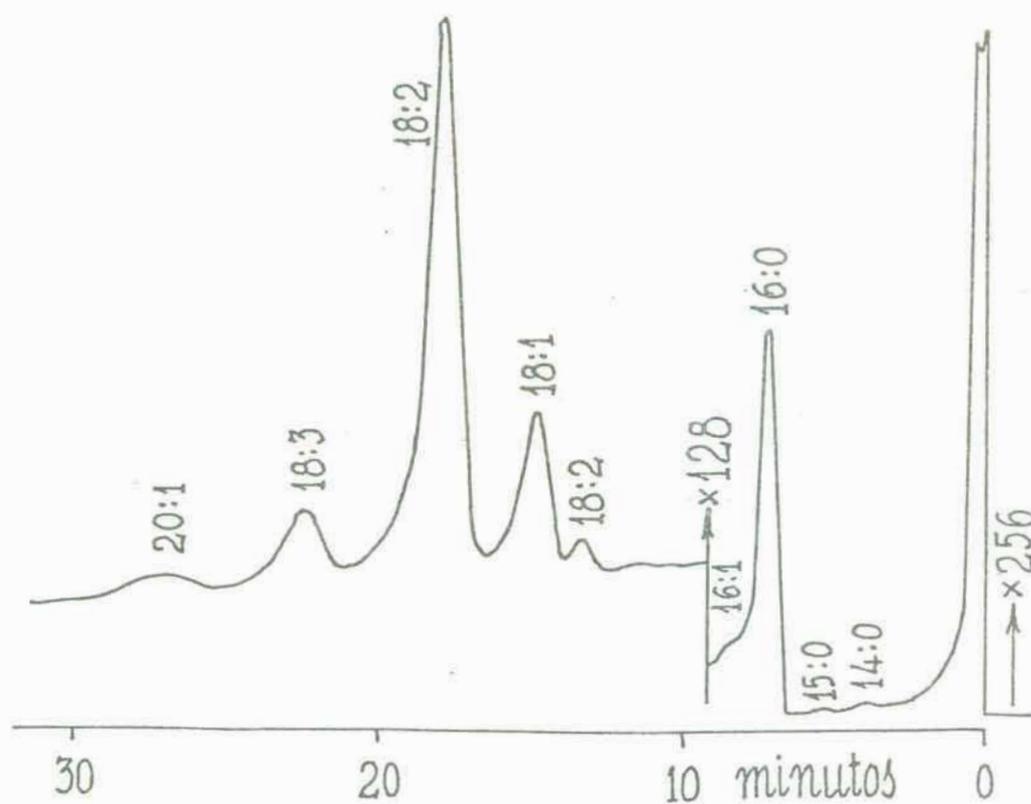


Figura 23: Semilla de Colliguaya intergerrima. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los lípidos "retenidos" en el aislado proteico.

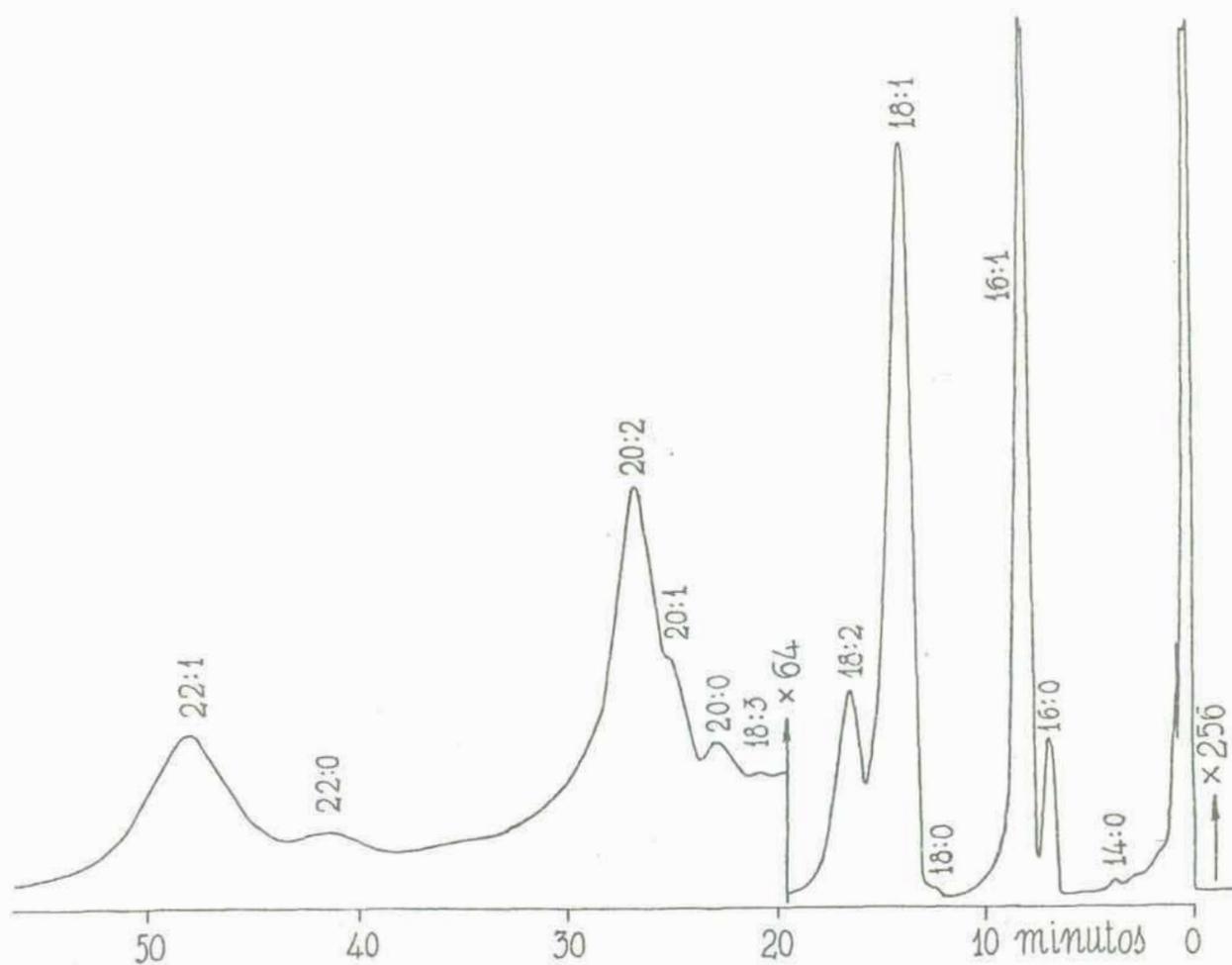


Figura 24: Semilla de Gevuina avellana. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los lípidos separados del aislado proteico por extracción con etanol.

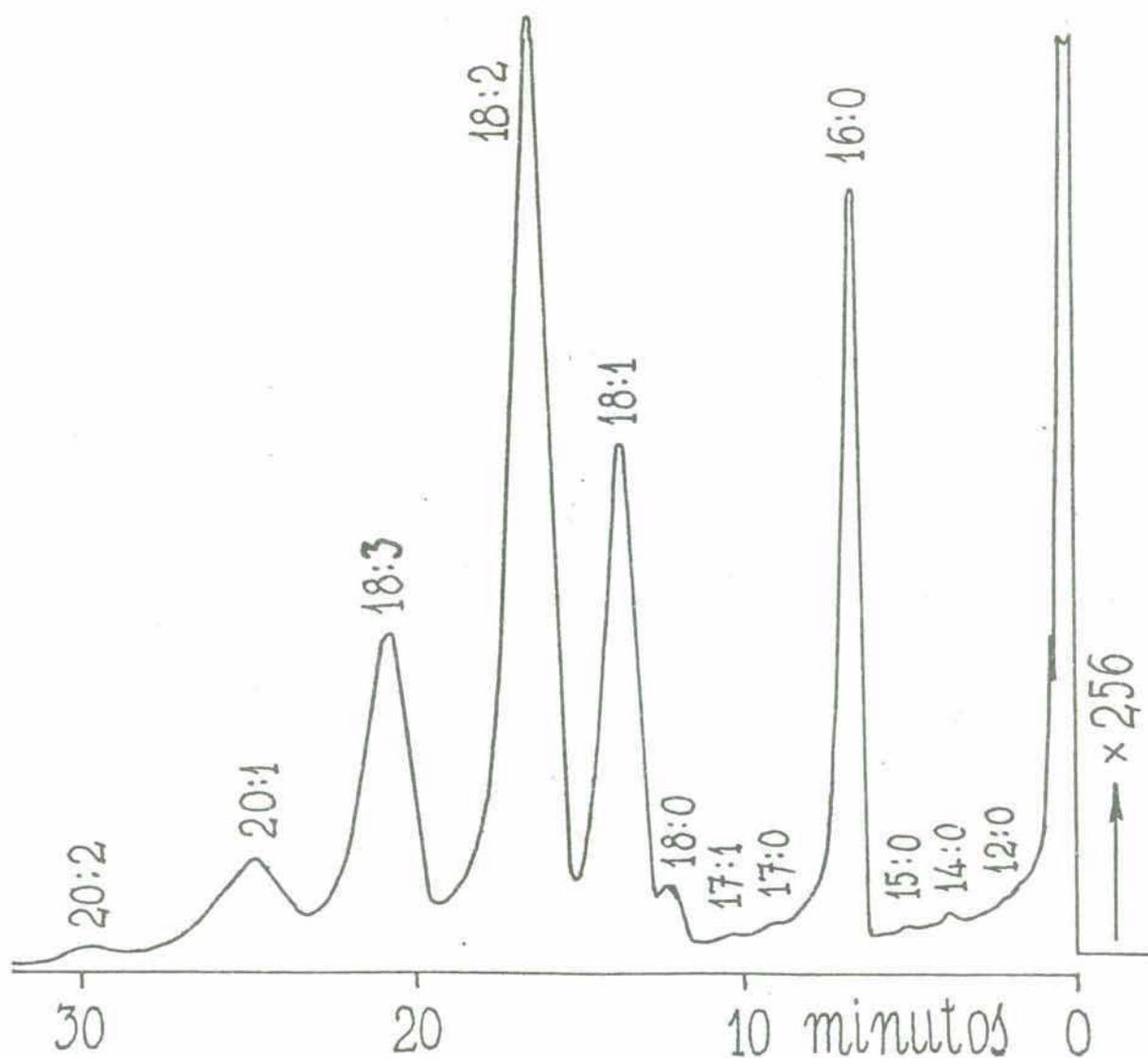


Figura 25: Semilla de Colliguaya intergerrima. Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los lípidos separados del aislado proteico por extracción con etanol.

-IV-

-RESUMEN Y CONCLUSIONES-

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se presenta un estudio sobre frutos maduros de dos especies vegetales autóctonas (patagónicas) pertenecientes a dos familias botánicas diferentes: Gevuina avellana Mol, una Proteácea de nombres vulgares "avellano", "nefuén", "guevín", que desarrolla en las provincias de Río Negro, Neuquén y Chubut (cuenca del Lago Puelo y común a Chile) y Colliguaya intergerrima Hillies-Hooker, una Euforbiacea conocida como "duraznillo" o "coliguay", de frutos rojos, que desarrolla como plaga en las provincias de Neuquén (Parque Nacional Laguna Blanca), Chubut (Lago Musters, Colonia Sarmiento), Santa Cruz (Lago Buenos Aires), La Rioja (zona oeste) y Mendoza (San Isidro y Villavencio). Se trata de frutos cuyas semillas son de alto contenido en aceites fijos y que al presente sólo registran en ambos casos una mención bibliográfica correspondiente a estudios realizados en el país. Los frutos de Gevuina avellana fueron y aún son fuente alimenticia para nativos del Sudoeste argentino y Sur de Chile. Los de Colliguaya intergerrima despiertan interés por su difusión creciente y por las características de composición acídica de su aceite de extracción netamente "secante" y por tanto con posibilidades de explotación con fines de utilización industrial.

Operando sobre frutos maduros de Gevuina avellana Mol (cosecha, marzo 1982) de la región argentina del Lago Puelo (provincia de Chubut) se pudo probar:

- 1)→ Que presentaban una relación porcentual cáscara/pepa de 53,2/46,8 con un contenido acuoso elevado tanto en pepa como en cáscara (39,1 y 31,5%, respectivamente).

- 2)- Que el contenido en aceite crudo de extracción (hexano) % de pepa seca fue 41,8, mientras que el de cáscara seca fue de poca significación: 0,62.-
- 3)- Que el contenido en materias minerales (cenizas %) fue significativamente mayor en pepa respecto del de cáscara (3,20 y 1,82 respectivamente).-
- 4)-Que el exámen de las características físico-químicas del aceite crudo de extracción de la pepa confirmó que se trataba de un aceite típicamente no secante (Índice de Yodo 86,9), de bajo tenor en insaponificable (1,92 %) y asimismo en tocoferoles totales (12,0 mg % g, como α -tocoferol) y en esteroides totales (313 mg % g, como sitosterol).-
- 5)-Que el exámen (CGL) de composición acídica del aceite crudo de extracción de la pepa confirmó la riqueza de este aceite en ácido hexadecenoico (11-12 hexadecenoico) con 25,4 % sobre ácidos totales, exhibiendo en total 28,4; 53,4; 9,5 y 8,7 % de ácidos en C_{16} , C_{18} , C_{20} y C_{22} (sobre ácidos totales), respectivamente.-Que estos valores fueron eficientemente comprobados por análisis (CGL) de los ésteres metílicos de los ácidos totales hidrogenados.- Que por exámen en U.V. se probó ausencia de ácidos grasos conjugados preexistentes.-
- 6)-Que el exámen de composición acídica del aceite crudo de cáscara señaló mayor complejidad con menor concentración en 16:1 (17,4 %) y significativamente menor en 16:0 (14,2 %). Asimismo cabe destacar la presencia de 4,3 % de 18:3, este último probable componente de los lípidos de "pulpa", comprendida en la designación "cáscara" (en efecto, experiencias en marcha muestran casi sin excepción hasta el presente

- que las pulpas de los frutos contienen 18:3 con ausencia de éste en los de muchos de los aceites seminales respectivos⁶⁹).
- 7)- Que a partir del insaponificable del aceite crudo seminal, por cromatografía en sílica-gel y CGL se identificaron a través de sus valores de Tr/Tr colesterol, a colesterol (2,6); brasicasterol (0,1); campesterol (6,9) y sitosterol (78,5 % sobre esteroides totales).-
- 8)- Que la "harina de extracción" (previa deshidratación parcial) contenía en base seca 5,90 % de cenizas (500-550°); 23,8 % de proteína cruda; 9,82 % de fibra cruda, ausencia de almidón y un total de 21,53 % de hidratos de carbono (de los que 10,63 % correspondían a hidratos de carbono sacarificables).- Que el valor de lípidos remanentes era elevado (6,76 %, b.s.).- Que esa harina contenía 3,70 g de lisina disponible/ 16 g N, una relación P total/ Ca de 1,42 y un contenido en P de ácido fítico de 157 mg % g (equivalente al 37,4 % del P total de la harina seca).- Que el valor de actividad antitriptica (1,051 TUI/ mg de harina) era despreciable.-
- 9)- Que los lípidos (principalmente polares) de la harina de extracción (3,14 % b.s.) rindieron por saponificación 73,38 % de ácidos grasos totales, 7,68 % de insaponificable y un contenido de P lipídico de 352 mg % g (equivalente a 8,80 % de fosfolípidos sobre tales lípidos).-
- 10)- Que la harina de extracción agotada por hexano y mezcla ternaria $\text{CCl}_3\text{H} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ rindió 3,62 % de lípidos "retenidos" constituidos (dado el sistema de aislamiento) por

93,94 % de ácidos grasos y 6,06 % de insaponificable.-

- 11)- Que la composición acídica de los lípidos "polares" fue muy similar a la del aceite crudo de extracción, no así la de los lípidos retenidos, de menores concentraciones en 16:1 y 18:2, y mayor en 18:1.-
- 12)- Que operando por extracción alcalina sobre la harina se estableció en 4,0 el valor de pH de máxima precipitación de estos líquidos extraídos, obteniendo un aislado proteico (12,45 % sobre harina) conteniendo 3,55 g lisina disponible/ 16 g N; 13,10 % de N (b.s.); siendo el P de ácido fítico el 35,2 % del total. Los hidratos de carbono asociados (8,6 % como galactosa) y lípidos retenidos (7,51 %) son significativos y justifican el bajo valor de N del aislado. La composición acídica de los lípidos extraídos por etanol del aislado proteico recién floculado era muy similar a la del aceite crudo de extracción de la semilla, así como la de los lípidos retenidos en el aislado proteico.-

Operando sobre frutos maduros de Colliguaya intergerrima Hillies-Hooker (cosecha marzo 1982) de la región de Colonia Sarmiento (provincia de Chubut), se pudo establecer:

- 1)- Que presentaban una relación porcentual cáscara/pepa de 40,2/59,8, con un contenido acuoso de 4,7 % en pepa y 10,4 % en cáscara.-
- 2)- Que el contenido en aceite crudo de extracción (b.s.) fue 54,90 % en pepa y 1,34 % en cáscara.- Que los contenidos en materias minerales fueron significativamente mayores en pepa que en cáscara (3,14 y 1,44 % b.s., respectivamente).-

- 3)- Que el exámen de las características físico-químicas del aceite crudo de extracción de pepa (Índice de Yodo 151,3 y reacción bromada de Halphen positiva) lo señalan como aceite netamente "secante" con bajo contenido en tocoferoles totales (41,6 mg % g, como α -tocoferol).- Que ello se vió confirmado a través de los valores de composición acídica (23,6 % de 18:3; 38,5 de 18:2 sobre ácidos totales, exhibiendo cifras de 10,6; 82,7 y 6,7 % para ácidos en C₁₆ (ausencia de hexadecenoico), C₁₈ y C₂₀, valores que resultaron confirmados por análisis CGL de los ésteres metílicos de los ácidos totales previamente hidrogenados.-
- 4)- Que un exámen previo de los ésteres metílicos de los ácidos totales en U.V., mostró dos máximos de absorción en la zona de trienos conjugados (269 y 279,5 nm) y otros dos en la de tetraenos, pertenecientes presuntivamente a los ácidos β -eleosteárico y β -parinárico (β -eleosteárico 0,043 % y β -parinárico 0,018 %), concentraciones que resultan despreciables.-
- 5)- Que a partir del insaponificable del aceite crudo seminal por cromatografía en placa de sílica-gel y CGL y a través de los valores de Tr/Tr colesterol se identificaron: colesterol (4,2), campesterol (1,8), stigmasterol (0,7) y sitosterol (78,6 % de esteroides totales).-
- 6)- Que el exámen de composición acídica de los lípidos crudos de extracción de cáscara fue relativamente similar al del aceite crudo de extracción de pepa (respecto de componentes comunes), mostrando rastros o muy bajas concentraciones para ácidos ramificados en C₁₄, C₁₆, C₂₂ y C₂₃ y ácidos saturados y monoetilénicos en C₂₀ a C₂₄.-

- 7)- Que la harina de extracción desolventizada contenía en base seca 6,56 % de cenizas (500-550°), 51,0 % de proteína cruda; 5,72 % de fibra cruda, ausencia de almidón y un total de 29,37 % de hidratos de carbono (de los que 0,15 correspondían a reductores, como glucosa; 6,43 a azúcares invertibles como sacarosa y 22,79 a hidratos de carbono sacarificables).- Que el valor de lípidos remanentes fue 2,76 % (b.s.), el de lisina disponible 3,70 g/ 16 g N y la relación P total/ Ca fue 7,77. El contenido en P de ácido fítico (903 mg % g) representó el 67,8 % del fósforo total de la harina seca y la harina estaba prácticamente libre de actividad antitriptica (0,60 TUI/ mg harina).-
- 8)- Que los lípidos (principalmente polares) de la harina de extracción (1,82 %, b.s.) rindieron por saponificación 56,07 % de ácidos grasos totales, 13,68 % de insaponificable y un contenido de fósforo lipídico de 1,24 % (equivalente a 31,0 % de fosfolípidos sobre tales lípidos).-
- 9)- Que la harina de extracción agotada por hexano y mezcla ternaria ($Cl_3CH: CH_3OH: H_2O$) rindió 0,96 % (b.s.) de lípidos retenidos constituidos (dado el sistema de aislamiento) por 90,04 % de ácidos grasos y 9,96 % de insaponificable.-
- 10)- Que la composición acídica de los lípidos polares fue sustancialmente distinta a la del aceite crudo de extracción (mayor riqueza en 16:0 y en 18:2 y menor en 18:1, 18:3 y 20:1).- Que la composición acídica de los lípidos retenidos fue en cambio, relativamente similar a la del aceite crudo de extracción de pepa.-
- 11)- Que operando por extracción en medio alcalino sobre la ha-

rina de extracción se estableció en 4,2 el valor de pH de máxima precipitación, obteniendo un aislado proteico (28,26 % sobre harina) conteniendo 4,60 g de lisina disponible/16 g N; 16,35 % de N (b.s.), siendo el P de ácido fítico el 42,6 % del P total.- Que los hidratos de carbono asociados (2,81 % b.s. como galactosa) y los lípidos retenidos (1,00 % b.s.) deben considerarse como cifras de poca significación.-

- 12)- Que las composiciones acídicas de los lípidos extraídos por etanol del aislado recién floculado fueron relativamente similares a las del aceite crudo de extracción de pepa, mientras que la de los lípidos retenidos del aislado diferían notoriamente (mayor riqueza en 16:0 y 18:2 y menor en 18:1, 18:3 y 20:1).-
- 13)- Que dentro de los hidratos de carbono integrantes de ambas harinas se identificaron como tales: glucosa, fructosa y sacarosa y como integrantes de los hidratos de carbono sacarificables: glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa.-

BIBLIOGRAFIA

-BIBLIOGRAFIA-

- 1- G. Looser, Rev. "La Farmacia Chilena", 8, Santiago de Chile (1933); P. Cattaneo, G.K. de Sutton, R.H. Arias, R.R. Brenner y M.E. de Tomas, Anales Asoc. Quím. Argentina, 50, 1 (1962).
- 2- A.H. Sleumer, Botanische Jahrbücher, 76, 139 (1954); P. Cattaneo, G.K. de Sutton, R.H. Arias, R.R. Brenner y M.E. de Tomas, Anales Asoc. Quím. Argentina, 50, 1 (1962).
- 3- M.J. Dimitri, Enciclopedia Arg. de Agric. Ganad., Ed. ACME S.A.C.I., Buenos Aires (1972).
- 4- O. Urban, Botánica de las Plantas Endémicas de Chile, Ed. Concepción, Chile (1934).
- 5- M.J. Dimitri, La Región de los Bosques Andino-Patagónicos, Ed. INTA, Argentina (1972).
- 6- R.E. Latcham, La Agricultura Precolombina en Chile y en los Países Vecinos, Santiago de Chile (1936); A.E. Ragonese y R. Martínez Crovetto, Rev. Invest. Agríc., 3, 165 (1947).
- 7- A.E. Ragonese y R. Martínez Crovetto, Rev. Invest. Agríc., 3, 165 (1947).
- 8- A. Murillo, Plantas Medicinales de Chile, París (1889).
- 9- R.E. Bridge y T.P. Hilditch, J. Chem. Soc., 2396 (1950).
- 10- F. Reichert, Rev. Centro Est. Agron. Veter. Bs. As., 21, 343 (1928).
- 11- P. Cattaneo, G.K. de Sutton, R.H. Arias, R.R. Brenner y M.E. de Tomas, Anales Asoc. Quím. Argentina, 50, 1 (1962).
- 12- M.E. de Tomas, R.R. Brenner y P. Cattaneo, Rev. Arg. Grasas y Aceites, 53, 1 (1963).

- 13- E. Jantzen, H. Andreas, K. Morgenstern y W. Roth, Fette, Seifen Ans., 63, 685 (1961); P. Cattaneo, M.H. Bertoni y G.K. de Sutton, Anales Asoc. Quím. Argentina, 54, 117 (1966).
- 14- K. Hofmann, F. Tausig, J. Biol. Chem., 213, 415 (1955); P. Cattaneo, M.H. Bertoni y G.K. de Sutton, Anales Asoc. Quím. Argentina, 54, 117 (1966).
- 15- P. Cattaneo, M.H. Bertoni y G.K. de Sutton, Anales Asoc. Quím. Argentina, 54, 117 (1966).
- 16- P. Cattaneo, G.K. de Sutton y M.H. Bertoni, Anales Asoc. Quím. Argentina, 54, 123 (1966).
- 17- P. Cattaneo, M.H. Bertoni y G.K. de Sutton, Anales Asoc. Quím. Argentina, 55, 95 (1967).
- 18- J.R. Vickery, Phytochemistry, 10, 123 (1971).
- 19- L.A.S. Johnson y B.G. Briggs, Aust. J. Bot., 11, 21 (1963).
- 20- Enciclopedia Británica, Vol. 6, 15^o Edición (1974).
- 21- C.A. O'Donell y A. Lourteig, Lilloa, 8, 552 (1942).
- 22- A. Soriano, Rev. Inv. Agr., 10, 323 (1956).
- 23- A. Ruiz Leal, Deserta, 3, 84 (1972).
- 24- J.H. Morello, Opera Lilloana, 2, 1 (1958).
- 25- J.H. Hunziker, Rev. Inv. Agr., 6, 175 (1952).
- 26- M.J. Roquero, Anales Parq. Nac., 11, 129 (1968).
- 27- T.P. Hilditch y P.N. Williams, The Chemical Constitution of Natural Fats, 4^o Edición, Londres (1964).
- 28- A.R. Riganti, P. Cattaneo y G.K. de Sutton, Anales Asoc. Quím. Argentina, 35, 21 (1947).
- 29- V.C. Mehlenbacher, The Analysis of Fats and Oils, The Garrard Press Publ. Champaign, Illinois (1960).
- 30- M.H. Bertoni y P. Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 47, 52 (1959).

- 31- G.R. Bartlett, J. Biol. Chem., 234, 466 (1959).
- 32- M.S. Vigo, Tesis, Fac. Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1972).
- 33- R.T. Holman, W. Lundberg y T. Malkin, Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids, Pergamon Press, Vol. 4, (1957).
- 34- H. Forchieri, M.H. Bertoni, G.K. de Sutton y P. Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 58, 313 (1970).
- 35- Tiong Sie Wang y H.I. Waterman, Chim. et Ind. (Paris), 81, 204, (1959).
- 36- E. Fedeli, A. Lanzani, P. Capella y G. Jacini, J. Am. Oil Chem. Soc., 43, 254 (1966).
- 37- M.L. Rodenstein, Tesis, Fac. Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1974).
- 38- B.A. Lewis y F. Smith, Thin Layer Chromatography, Ed. Springer, Berlín (1969).
- 39- L. Hough, J.K. Jones y W.W. Wadman, J. Chem. Soc., 1702, (1950).
- 40- M. Ghebregzabher, S. Rufini, B. Monaldi y M. Lato, J. of Chromatography, 127, 133 (1976).
- 41- P. Partridge, Biochem. J., 42, 238 (1948).
- 42- J.M. Lyons y L.F. Lippert, Lipids, 1, 136 (1966).
- 43- E.N. Zerba, Tesis, Fac. Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1974).
- 44- S.N. Fusero, Tesis, Fac. Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1982).
- 45- W. Szutowicz, J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 254 (1965).
- 46- A.O. Rucci y M.H. Bertoni, Anales Asoc. Quím. Argentina, 62, 365 (1974).

- 47- E. Conkerton y V. Frampton, Archives of Biochem. and Biophys., 81, 133 (1959).
- 48- S.C. Revuelto, Tesis, Fac, Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1976).
- 49- M.L. Kakade, N. Simons y E. Liener, Cereal Chem., 46, 518 (1969).
- 50- J.O. Bouzas y M.H. Bertoni, Anales Asoc. Quím. Argentina, 68, 81 (1980).
- 51- M.H. Bertoni, P. Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 60, 363 (1972).
- 52- M. Dubois, K.A. Giles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith, Anal. Chem., 28, 350 (1956).
- 53- R.L. Whistler y M.L. Wolfrom, Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 1, Academic Press, N. York. (1962).
- 54- National Academy of Sciences, Washington D.C., 1974. Recommended Dietary Allowances.
- 55- R.S. Harris y H. von Loesecke, Nutritional Evaluation of Food Processing, Ed. Wiley and Sons, U.S.A. (1960).
- 56- A.O. Rucci, M.H. Bertoni, Anales Asoc. Quím. Argentina, 61, 165 (1973).
- 57- M.S. Vigo, M.H. Bertoni y P. Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 61, 241 (1973).
- 58- L. Villegas Varela y M.H. Bertoni, Anales Asoc. Quím. Argentina, 62, 309 (1974).
- 59- L.A. Zaputovich, M.H. Bertoni y P. Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 60, 43 (1972).
- 60- M.H. Bertoni y P. Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, en prensa.
- 61- M.S. Vigo, I. Dasso y P. Cattaneo, Anales Acad. Ci. Ex. Fís. Nat., 29, 193 (1977).

- 62- A.E. Tortosa, M.S. Vigo y P. Cattaneo, Anales Acad. Ci. Ex. Fís. Nat., 29, 181 (1977).
- 63- J.A. Funes, M.H. Bertoni y P. Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 66, 255 (1978).
- 64- M.J. Horn, D.B. Jones y S.J. Ringel, J. Biol. Chem., 138, 141 (1941).
- 65- K.J. Carpenter, J. Duckworth, G.M. Ellniger y D.H. Shrimpton, J. Sci. Food Agric., 6, 278 (1952).
- 66- Z. Bohak, J. Biol. Chem., 239, 2878 (1964).
- 67- K.G. Ziegler, I. Melchert y C. Lürken, Nature, 214, 404 (1967).
- 68- M.H. Bertoni y P. Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 61, 129 (1973).
- 69- M. Sanchez y P. Cattaneo, Comunicación Privada.



Buenos Aires, 25 de julio de 1984

A la Subcomisión de Doctorado
Departamento de Química Orgánica

Dra. Norma S. Nudelman

De mi consideración:

En mi carácter de Director de Tesis del Doctorado, Lic. LAURA SARA MALEC, elevo el Informe sobre resultados logrados en ese trabajo, que versó sobre:

TBA- "Estudio de la semilla y de los aceites de semilla de Gevuina avellana Mol. (Proteáceas) y de Colliguaya intergerrima Gillies-Hooker (Euforbiáceas)-Marianas de extracción (hexano) y aislados proteicos".

La consideración de este tema referido principalmente a los aceites crudos de extracción de semilla de ambas especies se abordó por única vez y en nuestro país, en sendos trabajos de Tesis, a saber:

(1946)-Riganti A.H.- "Composición química del aceite de semilla de Colliguaya intergerrima Gillies-Hooker (duraznillo, Euforbiáceas)".

(1960)-Arias R.A.- "Aceites de semilla de Proteáceas argentinas. Composición acídica del aceite de semilla de Gevuina avellana Mol. (avellano), cosechada en Lago Puelo, prov. de Chubut".

Estos trabajos y sus conclusiones se publicaron, según se menciona a continuación:

"Aceites de semilla de Proteáceas argentinas-I-Composición en ácidos grasos de los aceites de Gevuina avellana Mol., Lomatia hirsuta (Lam.) Diels y Embothrium coccineum Forst". Por G. Kaman de Sutton, R. Arias y P. Cattaneo. Anales de la Asoc. Quím. Argentina, 50, 31 (1962). Presentado a las Sesiones Científicas sobre Productos Naturales, Buenos Aires, 1960.

"Composición química del aceite de semilla de Colliguaya intergerrima Gillies-Hooker (duraznillo)". Por A. Riganti, G. Kaman y P. Cattaneo. Anales Asoc. Quím. Argentina, 35, 21 (1947).

Los trabajos mencionados fueron pioneros respecto, principalmente, de los aceites seminales de esas especies autóctonas. Colliguaya intergerrima por tratarse de una Euforbiáceas (familia extensa y compleja respecto de las composiciones acídicas de sus aceites seminales), perteneciente a un género del que no se registraban antecedentes sobre estudios químicos. Además, porque esa especie desarrolla en nuestro país como plaga en las provincias de Neuquén, Chubut, Santa Cruz, La Rioja y Mendoza. Gevuina avellana Mol. por ser una especie perteneciente a la familia Proteáceas, que prácticamente sólo presenta especies en el hemisferio sur del globo. Además, porque la literatura sólo registraba un sólo estudio, el de la especie Macademia ternifolia, una planta nativa de Australia posteriormente introducida en Hawaii: R.E. Bridge y T. P. Hilditch, J. Chem. Soc., 2396 (1950).

En aquellos estudios se demostró que la semilla de Colliguaya contenía 52% de un

aceite netamente secante que contenía 20% (sobre ácidos totales) de 18:1 (ácido 11-nolénico), cifras que en principio señalaron interés en ahondar nuevos estudios, como la CGL, entonces no disponible.

En Gevuina avellana se había probado que las semillas contenían 40% de un aceite no secante (In. yodo:87,7) que, al igual que el de Macadania ternifolia era rico en 16:1 (ácidos hexadecenoicos) (20,4 y 22,0 % de ácidos totales, respectivamente).

Esa característica resultó común (excepto en el género Protea) a los aceites seminales de especies argentinas y australianas de Proteáceas, tal como fué demostrado y publicado en trabajos posteriores en Argentina y en Australia. Cabe destacar que posteriormente De Tomás, Brenner y Cattaneo (Rev. Argentina de Grasas y Aceites, 5, 53 (1963), demostraron que el ácido hexadecenoico del aceite seminal de Gevuina era el ácido 11,12- hexadecenoico y no el conocido y difundido ácido palmitoleico (9,16- hexadecenoico). También aquí y en razón del carácter comestible de los frutos de esta especie, quedó pendiente un estudio más acabado de los mismos.

En su Tesis la Lic. MALEG ha estudiado los frutos maduros de esas especies patagónicas autóctonas, operando sobre los de Gevuina avellana (cosecha 1982) procedentes de los alrededores del Lago Puelo (prov. de Chubut) y sobre los de Colliguaya intergerrima (cosecha 1982) procedentes de la zona de Colonia Sarmiento, prov. de Chubut. Los exámenes llevados a cabo, han comprendido las principales características de los frutos (con especial referencia a las relaciones cáscara/pepa), a los rendimientos en aceite crudo de extracción (hexano) sobre semilla y a las determinaciones de sus principales características físico-químicas, contenidos en componentes menores, composiciones acídicas y en esterolés. Asimismo los rendimientos y composiciones acídicas de los aceites de extracción de cáscara.

Para los aceites de semilla encontró valores de composiciones acídicas que confirmaron en buena parte los encontrados anteriormente en los estudios ya mencionados, tales los contenidos en 18:3 en Colliguaya y en 16:1 en Gevuina. Señaló que en de Gevuina la fracción de esterolés identificados (según valores de T_c /colesterol) estaba formada por 78,5% de sitosterol; 6,9% de campesterol; 2,6% de colesterol y 0,1% de brassicasterol (CGL sobre esterolés totales separados en placa de sílica-gel a partir de insaponificable), mientras que en el de Colliguaya se observaron valores de sitosterol 78,6%, colesterol 4,2%, campesterol 1,8% y stigmasterol 0,7%.

Operando sobre harinas de extracción se procedió a los estudios de su composición general (contenidos acuosos, cenizas, proteína cruda, fibra cruda, hidratos de carbono (reductores, invertibles y sacarificables), lípidos remanentes (polares y retenidos), lisina disponible, relación P/Ca y P de ácido fítico.

En el caso de Gevuina el tenor de proteína cruda (b.s.) fué de 23,8%, el de lisina disponible 3,70g/16g N y el de la relación P/Ca 1,42. Esta harina contenía (b.s.) 8,14% de lípidos principalmente polares (extraíbles por mezcla ternaria CCl_4, CH_2OH, H_2O) cuya composición se estudió por resolución (saponificación) en ácidos grasos totales e insaponificable, los primeros examinados por CGL. Esos lípidos contenían 8,80% de fosfolípidos (evaluados a través de la determinación de P lipídico). Otro dato de interés residió en el contenido en "lípidos retenidos" de la harina resultante de la separación del aceite seminal (hexano) y de los lípidos polares (mezcla ternaria) (3,62%), cuya composición acídica fué determinada. En experiencias repetidas quedó probado que estas semillas retienen cantidades significativas de lípidos no extraíbles por hexano, restanto aún por establecer las razones de ese comportamiento.

Aplicando el método de dispersión alcalina (pH 9-11) y precipitación a pH isoeléctrico (pH 4,0) se obtuvo un "aislado proteico" (12,45% sobre harina) conteniendo 3,55 g de lisina disponible/16g N; con un valor de 13,10% de N (b.s.), valor bajo pero justificable si se tiene en cuenta que el "aislado" contenía 8,6% de hidratos de carbono (expresados en galactosa) y 7,51% de lípidos retenidos.

En el caso del aceite seminal de Colliguaya y además de los valores CGL de composición acídica, el examen previo de los ésteres metílicos de los ácidos totales por espectrofotometría en el U.V. mostró dos máximos (268,0 y 279,5 nm) correspondientes a trienos conjugados preexistentes y asimismo otros dos más en la zona de tetraenos, presuntivamente pertenecientes a muy bajas concentraciones (0,043 y 0,018%) respectivamente de los ácidos β -eleosteárico y β -parinárico. En b.s. la harina contenía 51,0% de proteína cruda; 3,70 g de lisina disponible/16g N; 2,76% de lípidos remanentes (polares más retenidos) y una relación P/Ca 7,77. Los lípidos polares (1,82%) contenían 31,% de fosfolípidos. Los lípidos retenidos fueron evaluados en 0,96%, habiéndose estudiado su composición acídica.

Por aplicación del método señalado para el caso de Gevuina, se obtuvo un "aislado proteico" (pH isoeléctrico 4,2) con un rendimiento de 28,3% sobre harina, que contenía 4,60 g de lisina disponible /16 gN. Esta cifra resultó ser mayor que la observada sobre harina (hecho significativo y poco frecuente). El "aislado" contenía 16,35% de N (b.s.).

En ambas harinas se identificaron los siguientes hidratos de carbono: glucosa, fructosa y sacarosa (azúcares); glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa como integrantes de los hidratos de carbono sacarificables.

En resumen puede afirmarse que la semilla de Gevuina avellana Mol., que en otra época constituyó uno de los principales recursos alimenticios que dispusieron los primitivos habitantes de la región andino-patagónica, en razón de los valores encontrados para su composición química (factibles de intensificación, sobre todo en lo referente a la composición aminoacídica de sus proteínas) presenta un apreciable valor calórico. Ello mueve a recomendar estudios de composición química complementarios, así como de índole agrícola respecto de la conveniencia o no de la extensión de su cultivo.

Por su parte la de Colliguaya interguerrina GilliesHooker, procedente de una especie considerada maleza o plaga con tendencia a expansión, es una muy valiosa fuente de aceite netamente "secante" (índice de yodo 151,3), por lo que se recomienda hacer estudios complementarios sobre las propiedades de sus películas por "secado" con o sin el agregado y tratamiento con "secativos", a los fines de su probable uso en la formulación de materiales de protección de superficies (pinturas, barnices, resinas "alkid", etc.). Asimismo y en relación al elevado tenor proteico (51%) de su harina de extracción y discreto valor de lisina disponible (mayor en el "aislado" que en la harina) recomendar estudios de índole toxicológica (tanto sobre harinas como sobre "aislados proteicos").

