

Tesis de Posgrado

Composición química de los lípidos residuales en tortas y harinas de semilla de algodón : Determinación del contenido en ácidos ciclopropenoicos de un "expeller" de producción nacional

Longo, Salvador Angel

1967

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. 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, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Longo, Salvador Angel. (1967). Composición química de los lípidos residuales en tortas y harinas de semilla de algodón : Determinación del contenido en ácidos ciclopropenoicos de un "expeller" de producción nacional. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1313_Longo.pdf

Cita tipo Chicago:

Longo, Salvador Angel. "Composición química de los lípidos residuales en tortas y harinas de semilla de algodón : Determinación del contenido en ácidos ciclopropenoicos de un "expeller" de producción nacional". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1967. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1313_Longo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"COMPOSICION QUIMICA DE LOS LIPIDOS RESIDUALES EN

TORTAS Y HARINAS DE SEMILLA DE ALGODONERO

DETERMINACION DEL CONTENIDO EN ACIDOS

CICLOPROPENOICOS DE UN "EXPELLER"

DE PRODUCCION NACIONAL"

SALVADOR A. LONGO

13 ' 3

R

Resumen de la Tesis presentada para optar al título de Doctor
en Química de la Universidad de Buenos Aires

1967

El plan de trabajo fijado consistió en el estudio de los lípidos obtenidos a partir de los "expellers" de algodón de producción nacional con especial referencia a la de terminación de componentes ciclopropenoicos.

La realización del trabajo se llevó a cabo de acuerdo al siguiente esquema:

1.- Extracción de lípidos

Se encontró conveniente aislar grandes grupos de lípidos y materiales vinculados por solubilidad, procediendo luego por adaptación de técnicas de valoración a la de terminación de sus concentraciones en ácidos ciclopropenoicos.

Se decidió:

- a.- Agotar el "expeller" con hidrocarburos (hexano técnico). El extracto fundamentalmente constituido por glicéridos o aceite residual, forma la mayor parte de los lípidos residuales del "expeller".
- b.- Reextraer la harina resultante con éter etílico. El extracto está constituido principalmente por pigmentos, fosfátidos y glicéridos.
- c.- Extracción de la harina resultante del proceso b, con mezcla de solventes ($Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$) para provocar la rotura de glándulas que contienen pigmentos y aislamiento de los lípidos y materiales vinculados liberados en este proceso. El extracto está

formado principalmente por pigmentos y fosfátidos

d.- Demostración de la existencia de lípidos residuales en la harina resultante del proceso c mediante una drástica saponificación que conduce el aislamiento de una mezcla de ácidos grasos e insaponificable.

2.- Adaptación a escala semi-micro de la valoración de ácidos ciclopropenoicos con reactivo Durbetaki

Todas las determinaciones de ácidos ciclopropenoicos en los extractos obtenidos por hexano, éter etílico y mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ se han logrado por valoración en medio acuoso con ácido bromhídrico. El método empleado es el de Harris, Magne y Skau que fué verificado en reproducibilidad y sensibilidad en aceites de algodón refinados y crudos de extracción. Debido a la cantidad de muestra necesaria para la aplicación de esta macro-técnica, se vió la necesidad de adaptarla a cantidades diez veces menores. Ello se logró a través de una técnica semi-micro que ha sido debidamente probada, con las mismas exigencias de reproducibilidad y sensibilidad.

3.- Contenido en ácido ciclopropenoico del "expeller"

Aplicando la técnica de valoración semi-micro adoptada a las fracciones aisladas por extracción con hexano, éter etílico y mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ y operando sobre ésteres metílicos obtenidos por metanolisis debidamente liberados de interferentes por percolación a través de alúmina acti-

-vada se han obtenido los contenidos en ácidos ciclopropenoicos de cada extracto, que referidos a % de "expeller" de partida (teniendo en cuenta los rendimientos de éste en cada extracto), figuran en el siguiente cuadro:

Acidos ciclopropenoicos en distintos extractos de un "expeller" de algodón. Contenido total en ácidos ciclopropenoicos

| Extracto en | % de "expeller" | Acido malválico | |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| | | % extracto | % "expeller" |
| Hexano | 10,09 | 0,260 | 0,026 |
| Eter etílico | 0,22 | 0,067 | 0,00015 |
| Mezcla $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ | 0,88 | 0,015 | 0,00013 |

Este cuadro muestra que el 98,9% del ácido malválico total del "expeller" procede de extracto en hexano, fundamentalmente constituido por glicéridos, o sea, por aceite residual.

4.- Composiciones acídicas

Han sido examinados por CGL en sus composiciones acídicas los ésteres metílicos de los ácidos totales contenidos en cada extractivo libres de insaponificable. Se pudo establecer:

- a.- Que la composición acídica (% de ácidos totales) del extractivo en hexano (aceite residual seminal) presenta valores característicos de aceite de se-

-milla de algodón de producción nacional. La CGL señala además vestigios de ácido heptadecanoico y de un ácido, cuyo tiempo de retención para el éster metílico es análogo al del nonadecenoato de metilo. Este componente que persiste por hidrogenación es probablemente ácido dihidroestercúlico (mencionado en la literatura como tal).

- b.- Que las composiciones acídicas de los extractivos en éter etílico y mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ presentan los mismos componentes que el extractivo en hexano, con algunas variaciones de concentración (menores contenidos en ácido linoleico y mayores de palmítico). Además vestigios de ácidos láurico, pentadecanoico, heptadecanoico, heptadecenoico, dihidroestercúlico y ácidos saturados en C_{20} a C_{24} .
- c.- Que los ácidos totales separados por saponificación de la harina residual del tratamiento con $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ son los de menores valores en ácido linoleico conteniendo además, alrededor de 1%, de ácido octadecatrienoico.
- d.- Por adecuada combinación de la destilación fraccionada en vacío de los ésteres metílicos de los ácidos totales libres de insaponificable del extractivo en hexano y CGL de cada fracción de destilación, se ha establecido la composición acídica incluyendo otros componentes en el orden de trazas o bajas concentraciones que comprenden: ácido láu-

-rico, pentadecanoico, heptadecanoico, tetracosanoico, pentadecenoico, heptadecenoico, docosenoico y dihidroestercúlico.

5.- Determinaciones de fósforo lipídico

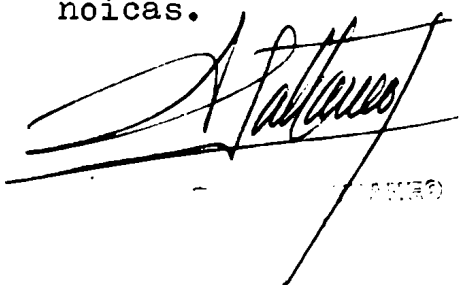
Se determinó el contenido en fósforo lipídico de los distintos extractos, que expresados en fósforo % de los mismos son:

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Hexano _____ | 0,024 |
| Eter etílico _____ | 0,373 |
| Mezcla $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ _____ | 1,370 |

Estos valores relacionados con los contenidos en ácidos ciclopropenoicos % de cada extractivo muestran que a mayor contenido en fósforo lipídico ocurre menor contenido en ácidos ciclopropenoicos.

6.- Ensayo de Halphen sobre insaponificables

Los insaponificables aislados de los extractivos en hexano, éter etílico, mezcla $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$, los procedentes de la saponificación de la harina residual del tratamiento con $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ y los separados de aceites de algodón crudos y refinados, dan siempre ensayos negativos de Halphen. Esto prueba que los insaponificables de aceites de algodón y los procedentes del aislamiento de otros lípidos de esta semilla, no contienen agrupaciones ciclopropenoicas.



A. Paltanero



A. Bunge

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"COMPOSICION QUIMICA DE LOS LIPIDOS RESIDUALES EN

TORTAS Y HARINAS DE SEMILLA DE ALGODONERO

DETERMINACION DEL CONTENIDO EN ACIDOS

CICLOPROPENOICOS DE UN "EXPELLER"

DE PRODUCCION NACIONAL"

SALVADOR A. LONGO

1313
q. 2.

Tesis presentada para optar al título de Doctor
en Química de la Universidad de Buenos Aires

1967

Al Dr. Pedro Cattaneo, padrino de esta Tesis, por sus valiosos consejos y su constante dedicación durante el transcurso de la misma, testimonio aquí mi más profundo reconocimiento.

Agradezco también:

A la Dra. María H. Bertoni por sus ense^ñanzas y la desinteresada colaboración prestada durante todas las etapas de este trabajo.

A la Lic. Matilde C. Durruty por su cor^dialidad y apoyo prestados en todo momento.

A mis compañeros y demás personal de Bromatología y Análisis Industriales por su sincera amis^tad.

Al personal de la Biblioteca y a todos aquellos que han hecho posible la realización de este tra^bajo.

A LA MEMORIA DE MI ABUELO

A MIS PADRES

PARTE -I-

Sobre los ácidos ciclopropenoicos naturales

- a)- Ocurrencia.
- b)- Propiedades físicas y químicas.
- c)- Métodos de detección y valoración de ácidos ciclopropenoicos.
- d)- Significado biológico de los ácidos ciclopropenoicos.

SOBRE LOS ACIDOS CICLOPROPENICOS NATURALES

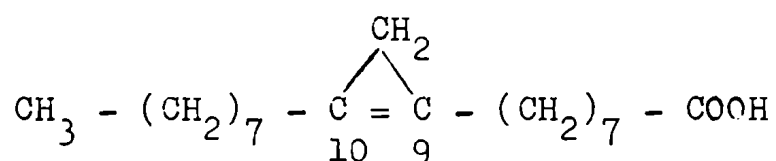
a)- Ocurrencia.-

Las observaciones realizadas principalmente en esta última década, muestran la ocurrencia de ácidos grasos ciclopropenoicos en numerosos productos naturales, hecho que unido al interés despertado por su significación biológica, ha concentrado la atención en la búsqueda de métodos seguros para su detección y estimación. Considerado desde un punto de vista histórico, podríamos tomar como punto de partida el descubrimiento del ensayo colorimétrico de Halphen (1), que si bien originalmente se lo consideró específico para revelar la presencia de aceite de semilla de algodón en mezclas con aceites comestibles, ha demostrado ser un ensayo característico para ácidos ciclopropenoicos.

Este ensayo dió resultado positivo aplicado a otros aceites derivados de semillas o frutos de plantas pertenecientes a las familias de las Malvaceas, Sterculiaceas, Tiliaceas y Bombacaceas. La reacción que tuvo lugar fué definitivamente asociada con la presencia del anillo ciclopropeno contenido en los ácidos grasos malvático y estercúlico que ocurren juntos en la naturaleza (2) (3) (4) (5) (6) (7).

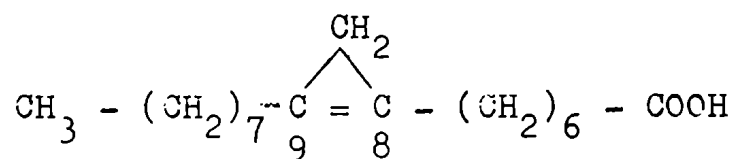
La estructura del ácido estercúlico, principal constituyente de los glicéridos del aceite de Sterculia foetida,

fué establecida por Nunn (8), quien consiguió aislarlo pu ro por medio de sus complejos con urea. Faure (9) (10) con firmó la fórmula propuesta por Nunn como la correspondien te a un ácido en C₁₉, conteniendo un anillo ciclopropeno entre los carbonos 9 y 10 y una cadena alifática de 18 átomo s de carbono:



ácido w- (2-n-octil ciclo prop.-1 enil) octanoico o ester cúlico.

El ácido malvático, aislado de Malváceas por Shenstone y Vickery (11) ha sido identificado estructuralmente por Mac Farlane, Shenstone y Vickery (12), posteriormente por Craven y Jeffrey (13) y más recientemente por Fogerty, Johnson, Pearson y Shenstone (14), como un ácido en C₁₈ con un anillo ciclopropeno entre carbonos 8 y 9 y una ca dena alifática de 17 átomos de carbono:



ácido w- (2-n-octil ciclo prop.-1-enil) heptanoico o malvático.

La ocurrencia en la naturaleza de los ácidos malvático y estercúlico en los mismos aceites, junto a alguno de sus dihidroderivados, presenta un problema de biogénesis de gran interés y en tal sentido ya se han formulado hipó tesis (2).

b)- Propiedades físicas y químicas.-

Los ácidos ciclopropenoicos son los responsables de la reacción colorimétrica de Halphen (1). En este ensayo, el azufre y el alcohol amílico no son esenciales para la formación del compuesto coloreado: El mismo Halphen señaló la presencia conveniente de un solvente del aceite y del reactivo sulfuro de carbono, con punto de ebullición entre ambos (condición que cumple el alcohol amílico) y del azufre libre que dentro de ciertas proporciones, intensifica la coloración de la reacción. También señaló que la acción del calor favorece su desarrollo ya que a temperatura ambiente es mucho más lenta.

Faure (10) al estudiar el comportamiento del ácido estercúlico frente al reactivo de Halphen, dejó en contacto, por varias semanas y a la temperatura ambiente, una solución de ácido estercúlico puro en sulfuro de carbono destilado. A las 24 horas de contacto la solución, presentaba color anaranjado, siendo de un color rojo-anaranjado brillante al cabo de 4 semanas.

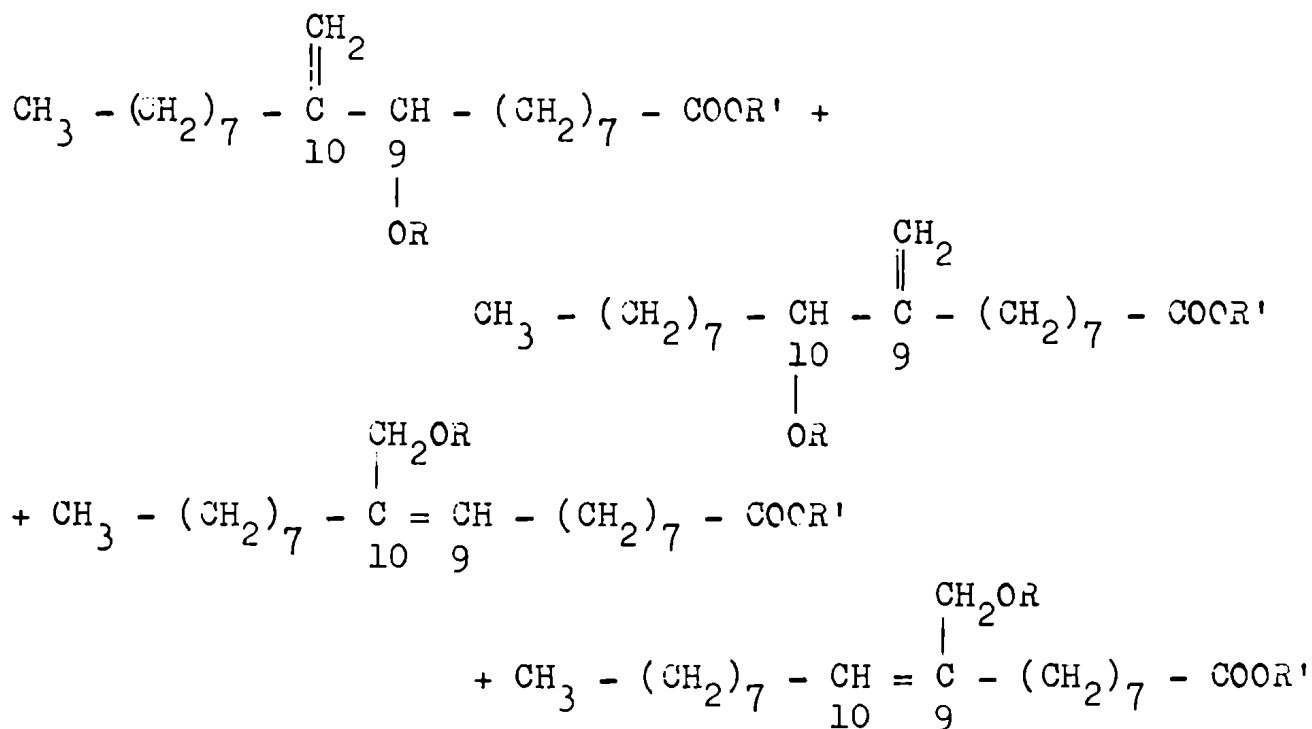
La reacción fué seguida a través de sus bandas de absorción en el IR: las bandas características del anillo ciclopropeno ($5,53 \mu$ y $9,92 \mu$) desaparecían progresivamente del espectro del ácido estercúlico a medida que el color de la solución se intensificaba. Simultáneamente aparecía una nueva banda, en forma gradual, en la región correspondiente a la doble ligadura - C = C -. Ello sugirió que la reacción involucraba una apertura del anillo ciclo-

-propeno a través de una ligadura simple. De otros cambios espectrales observados, el autor asigna tentativamente a determinadas bandas la absorción correspondiente a la doble ligadura en la agrupación $-S-\overset{\cdot}{C}=S$ que crecía en su intensidad durante un tiempo y luego decrecía, en virtud de la reacción entre el sulfuro de carbono y el anillo ciclopropeno para formar finalmente un polímero en el cual alternarían varios átomos de carbono y azufre. El mecanismo exacto de esta reacción no ha sido establecido, dejándose constancia de que en tal sentido prosiguen nuevos estudios.

En sus primeros ensayos Halphen (1) había señalado que la reacción colorimétrica fallaba cuando el aceite de algodón se calentaba previamente, por un tiempo prolongado con vapor de agua sobrecalentado (aproximadamente 200°C) y que la acción de una temperatura más moderada, ocasionaba una disminución en la intensidad del color.

Se ha ensayado con el ácido estercúlico puro, su sensibilidad al calor. Rinehart (15) y Fawcett (16) probaron que se abre el anillo con adición de grupos carboxilos, lo que conduce a una mezcla de 4 isómeros mononosaturados (poliésteres), representada como sigue:

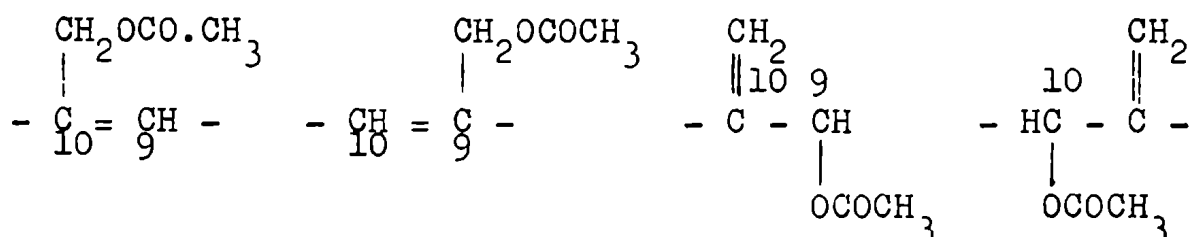
$R = R' =$ redistribución de restos estercúlicos



Se observó un decrecimiento gradual en la absorción correspondiente al anillo ciclopropeno en el IR y la aparición de absorción por la doble ligadura - C = C -, similarmen- te, la absorción característica de la agrupación - COOH, era reemplazada por las bandas del éster. Evidentemente el aumento de temperatura aceleraba el proceso. El glicé- rido o el éster metílico del ácido estercúlico resultó con- siderablemente más estable al calor que el ácido libre. Ulterior evidencia de su destrucción fué el ensayo negati- vo de Halphen.

El aceite de *Sterculia foetida* por sí mismo, se poli- meriza a elevadas temperaturas para dar un "gel". Esta po- limerización de glicéridos neutros, parece no obstante, proceder por un mecanismo diferente del proceso ácido anteriormente descrito (15).

También corresponde a Rinehart (15) haber elucidado la naturaleza de los productos derivados de la acetólisis del ácido estercúlico, calentado a reflujo con ácido acético glacial, que ocurre con apertura del anillo para formar los cuatro isómeros que se representan a continuación:



El ácido estercúlico, aunque con dificultad, es aducible con urea (camino útil para obtenerlo puro), lo que no ocurre con sus derivados acetilados (acetoxiácidos).

Los ácidos ciclopropenoicos que han experimentado polimerización o acetólisis dejan de dar la reacción coloreada de Halphen. Por otra parte, la acetólisis de un aceite que contenga ácidos ciclopropenoicos efectuada por tratamiento con mezcla ácido acético - 10% ácido sulfúrico (5:2), a temperatura ambiente, ocurre sin destrucción del anillo ciclopropeno (2).

La estabilidad del anillo ciclopropeno frente a reactivos alcalinos quedó demostrada a través de numerosas preparaciones, registradas en literatura, que requerían una etapa previa de saponificación conducida ya sea a temperatura ambiente o en condiciones de calentamiento suave, al igual que la obtención de ésteres metílicos por transesterificación con sodio o metóxido de sodio como catalizador.

No obstante, se ha dejado constancia de la labilidad

del anillo en presencia de reactivos acídicos, de nitrato de plata y acetato mercurico. Así, se señala que la esterificación de los ácidos grasos que contengan ciclopropenos, en presencia de catalizadores de carácter ácido, procede con destrucción completa o casi completa del anillo (metanol-ácido sulfúrico; metanol-fluoruro de boro; metanol-ácido clorhídrico, diázoetano) (17) (18).

La hidrogenación de ácidos ciclopropenoicos o de aceites que los contengan, conduce a la formación de derivados ciclopropanos, entre otros productos saturados de cadena ramificada y de cadena normal, estos dos últimos resultantes de la ruptura del anillo. La proporción y tipo de productos formados en la mezcla resultante, parece depender de las condiciones del método de hidrogenación (solvente, tiempo de hidrogenación) (2).

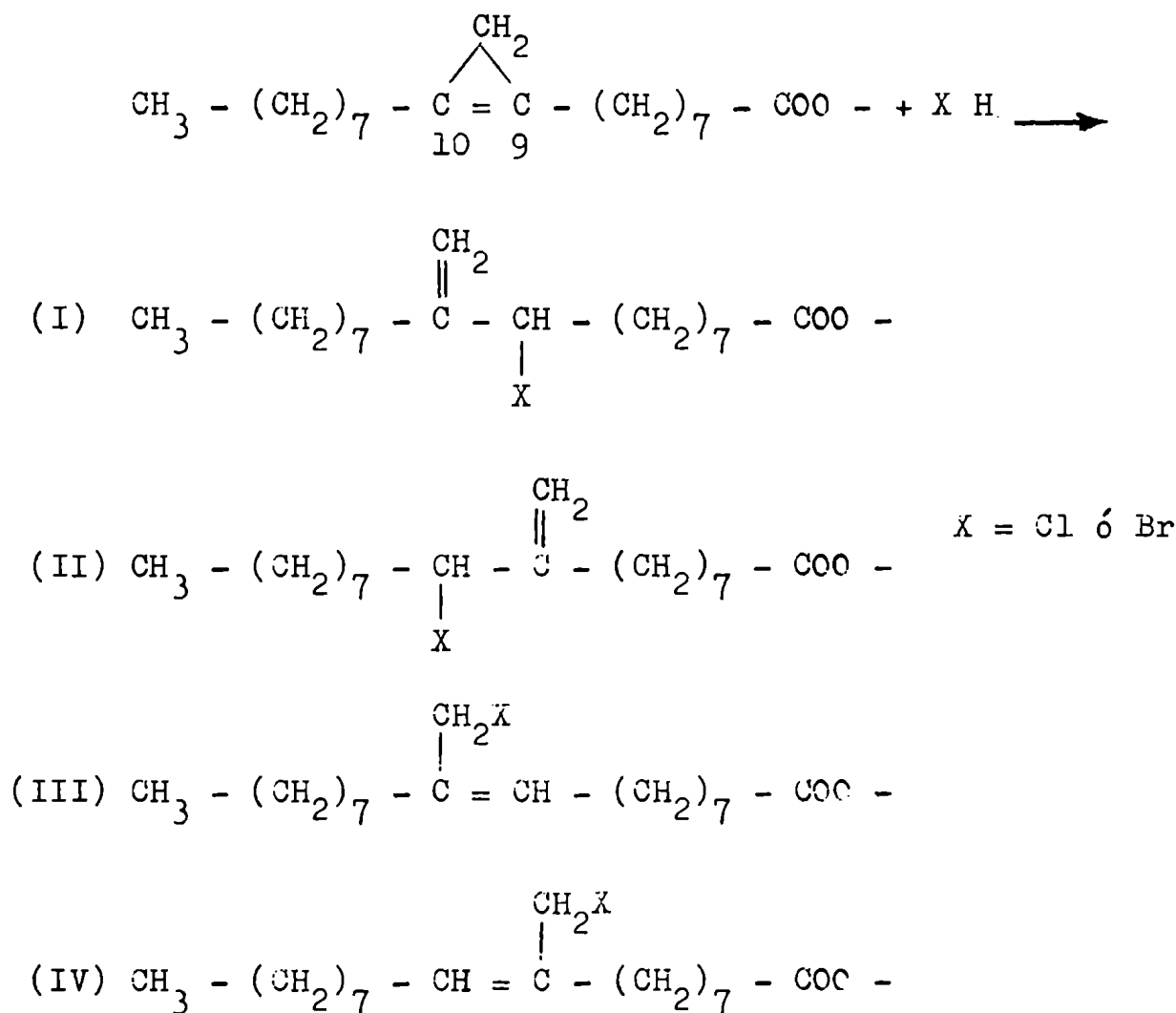
Nunn, cuando aisló el ácido estercúlico, notó que el anillo ciclopropeno era resistente a la reducción con hidruro de litio y aluminio. Esta estabilidad resultó útil posteriormente, para diferenciar ácidos grasos ciclopropenoicos de aquellos que contenían oxígeno oxirano (epoxiácidos).

El tratamiento del aceite de *Sterculia foetida* con ácido clorhídrico o bromhídrico en medio acuoso ó en acético glacial, conduce a la adición de una molécula del ácido halogenado por mol de ácido ciclopropenoico.

El valor del índice de iodo del aceite y las medidas de absorción en el IR indican que el mecanismo es paralelo

al de polimerización y al de acetólisis del ácido estercú-
lico ya descriptos e involucra la formación de cuatro de-
rivados monosaturados y monohalogenados isoméricos.

El valor del índice de iodo (que revela el mantenimiento
to de la doble ligadura) sólo puede ser explicado por una
reacción que ocurra con apertura del anillo ciclopropeno,
entre el carbono metilénico y el carbono olefínico sea és-
te 9 ó 10, con la correspondiente pérdida de las bandas
de absorción características del anillo en el IR (19):



La adición de una solución de bromo en cloroformo a
una solución de ácido estercúlico, a 0°C, ocurre con la

aceptación de exactamente un equivalente de bromo. El producto resultante dibromado, muestra la absorción característica de la estructura - C Br - C Br -.

c)- métodos de detección y valoración de ácidos ciclopropenoicos.-

A los fines de facilitar el análisis de los distintos métodos, los podríamos agrupar en dos grandes categorías:

a) métodos químicos y b) métodos instrumentales.

a) métodos químicos

Ensayo de Halphen

El ensayo colorimétrico de Halphen, que se realiza por calentamiento (aproximadamente 100°C) de una mezcla consistente en dos partes del aceite en examen, una parte de alcohol amílico y una parte de una solución al 1% de azufre en sulfuro de carbono desarrolla, para bajos niveles de ácidos ciclopropenoicos, un color que es variable entre el naranja y el rojo-anaranjado, aún frecuentemente para duplicados del mismo aceite.

Aunque esas variaciones no constituyan un problema en un ensayo cualitativo, hacen que una técnica sea altamente insegura para fines cuantitativos. Por otra parte, para altos niveles en ciclopropenoicos, el color desarrollado es tan intenso, que resulta imposible una diferencia visual a menos que se proceda a una dilución después del desarrollo de color para su comparación con aquel producto de reacción de una muestra de concentración conocida de un standard (ácido estercúlico).

A través de observaciones espectroscópicas se ha demostrado que la variación en el color resultante, tiene su origen en la formación de varios pigmentos en proporciones variables. Las reacciones involucradas aparecen como sumamente complejas, pues dependen de parámetros de difícil control: temperatura, acción de la luz, tiempo de reacción y solvente empleado, como también de otros factores hasta ahora desconocidos.

En tal sentido, el propósito de algunas recientes investigaciones fué el de encontrar la forma de estabilizar esa respuesta en el color; es decir, llegar a establecer una serie de condiciones de reacción bajo las cuales la intensidad del color desarrollado fuese reproducible dentro de límites razonables y poder relacionarla a las correspondientes concentraciones standards de ácidos ciclopropenoicos, a través de factores establecidos a su vez por un método seguro, tal como el de titulación con ácido bromhídrico a 55°C, que se describe más adelante.

En la literatura se registran referencias acerca de que un ensayo de Halphen practicado sobre aceite de algodón refinado por el método oficial para aceite neutro A.O.C.S. (20), dá una respuesta menos uniforme y más débil en color que el practicado sobre aceite crudo, aún cuando existen pruebas de que este procedimiento de refinación no provoca reducción en el contenido de ciclopropenoicos. Se estableció que ciertos constituyentes fosfatídicos son responsables de ejercer una acción exaltadora y estabilizante en el color (21). Un efecto similar lo producen nu-

-merosas aminas y otros compuestos nitrogenados.

Estas revelaciones sirvieron de base a dos ensayos de Halphen modificados con fines cuantitativos. Uno de ellos utiliza piridina como compuesto nitrogenado de efecto estabilizador (22) y el otro agrega morfolina al sistema en reacción con la misma finalidad (23), midiéndose las absorbancias espectrofotométricamente alrededor de los 500 μ .

En este último trabajo se presenta un estudio referente al fraccionamiento de los productos de reacción del ensayo de Halphen sin morfolina practicado sobre los ésteres metílicos, obtenidos por metanolisis, del aceite de Sterculia foetida.

Las soluciones coloreadas provenientes de varios ensayos de Halphen fueron combinadas y concentradas por repetidos lavados con agua a fin de eliminar el solvente utilizado en la reacción (n-butanol). Con hexano se extrajo un pigmento anaranjado, quedando un pigmento púrpura que fué soluble en etanol 95%. Ambas soluciones de pigmentos exhibían distintos máximos de absorción (490 y 520 μ respectivamente).

Del pigmento anaranjado soluble en hexano, se aislaron a su vez tres fracciones, con el mismo máximo de absorción a 490 μ , pero que diferían en el peso molecular y contenido en azufre.

En vista de la multiplicidad de cuerpos coloreados

formados, no sorprende que haya existido tanta dificultad en adaptar esta reacción para el análisis cuantitativo, unido a la falta de standards para propósitos de calibración.

Los autores presentan esta técnica aplicada a la determinación de ácidos ciclopropenoicos en aceites de algodón crudos y refinados, utilizando morfolina sólo en el segundo caso, ya que los aceites crudos contienen pequeñas cantidades de fosfolípidos que actúan en el mismo sentido y estableciendo factores de proporcionalidad para ambos casos, en base a determinaciones de los mismos por el método de titulación en etapas con ácido bromhídrico.

Aunque estas técnicas de Halphen modificadas, no resulten tan fáciles y precisas como el método de titulación con ácido bromhídrico, tienen la ventaja de requerir muy pequeñas cantidades de muestra y serán particularmente útiles en aquellos casos en que se disponga de muy pequeña cantidad de material, o donde haya altos niveles de sustancias interferentes al método de hidrohlogenación, o donde el nivel de ácidos ciclopropenoicos sea muy bajo, especialmente por su mayor sensibilidad.

Métodos de hidrohlogenación

- 1) Método con ácido clorhídrico concentrado (d 1,18-1,19) acuoso

Sobre la base de una evidencia experimental Bailey y col. (19) concluyeron que el ácido clorhídrico (d 1,18-1,19) era específico para el grupo ciclopropeno en presencia

-cia de otros grupos olefínicos frecuentes en aceites. Esta especificidad sirvió de base a un método de análisis que involucra la determinación del aumento de contenido en cloro de la muestra causado por su reacción con ácido clorhídrico, relacionado estequiométricamente al contenido en ácidos ciclopropenoicos original (24).

Como resultado de este tratamiento desaparecen las bandas características de absorción en el IR asociadas al grupo ciclopropeno.

Aunque los epóxidos, hidroperóxidos y probablemente otros productos de autoxidación interfieren introduciendo error por exceso en el análisis, éstos pueden ser eliminados por un pretratamiento de la muestra de acuerdo a alguna técnica conveniente (acetólisis en condiciones especiales, reducción con hidruro de litio y aluminio o tratamiento con alúmina activada). En ausencia de interferentes, el método tiene una precisión de $\pm 0,37\%$ sobre una concentración dentro del rango de 0-50% de ácido estercúlico y sobre la base de una precisión de $\pm 0,025\%$ en las determinaciones de cloro.

Las numerosas manipulaciones, combinadas a la cuidadosa determinación de cloro, hacen al método algo engorroso y menos rápido y preciso que el método de titulación con ácido bromhídrico de Harris y col. (25) (26).

2) Método de titulación con ácido bromhídrico-acético glacial

Este método se basa en la titulación estequiométrica

de ácidos ciclopropenoicos, con una solución 0,1 N de ácido bromhídrico anhidro en ácido acético glacial (reactivo de Durbetaki).

Aunque las agrupaciones ciclopropanílicas, olefínicas y olefínicas conjugadas no acusan titulación con este reactivo, los epóxidos, hidroperóxidos e hidroxidiolefinas conjugadas, interferirán elevando el resultado de los análisis.

Si bien la interferencia debida a la agrupación epoxi puede eliminarse por reducción con hidruro de litio y aluminio o por acetólisis suave, el método no resulta seguro a menos que se trabaje sobre la muestra entera sometida a reducción o acetólisis, dado el cambio de peso ocurrido en la misma, lo que conduciría al uso de factores de corrección de valorar sobre alícuotas con el agravante de que la titulación de ciclopropenos es de extrema lentitud a temperatura ambiente y poco neta en su punto final.

Los autores observaron que la velocidad de titulación de los ácidos ciclopropenoicos aumentaba con la temperatura, e inversamente decrecía con la disminución de ésta hasta alcanzar los 3°C donde no acusaba consumo de reactivo. El valor de la titulación aumentaba asintóticamente con la temperatura hasta 50°C, permanecía constante entre 50 y 60°C y luego nuevamente crecía a causa de pérdidas de ácido bromhídrico que entraba a la fase gaseosa.

En base a estas observaciones, se eligió la temperatura de 55°C para efectuar las titulaciones, consiguiendo una valoración completa, con punto final neto, dentro de

los 15-20 minutos.

Simultaneamente, una investigación del efecto de la temperatura en la titulación de epoxiácidos con Durbetaki, empleando aceite de lino epoxidado y 1-2, epoxidecano como compuestos-modelo, mostró que se efectuaba en forma completa y rápida a 3°C.

Surgió así una técnica de titulación en etapas sucesivas a 3° y 55°C con ácido bromhídrico en acético glacial como reactivo para aquellas muestras que contuviesen mezclas de epoxiácidos y ácidos ciclopropenoicos. El valor de la titulación a 55°C es una medida del contenido en ciclopropenos presentes.

La observación de las tablas de valores señalados por los autores muestra, que en ausencia de sustancias interferentes en el aceite, ambos tipos de ácidos pueden analizarse con alto grado de seguridad ($\pm 0,17\%$ para epóxidos (epoxioleico) y $\pm 0,15\%$ para ciclopropenoicos (ácido estercúlico)).

Esta precisión no se alcanza, cuando se usa el procedimiento de acetólisis como paso previo para eliminar epoxiácidos (para las mismas composiciones: $\pm 0,75$ y $\pm 0,66\%$).

Es evidente que otras sustancias interferentes, que acusen titulación con el reactivo de Durbetaki en forma lenta tanto a 3 como a 55°C interferirán. Estas sustancias son conocidas: hidroperóxidos, cetonas α - β -no saturadas, dienoles conjugados tales como el ácido dimorfocólico o estructuras similares como el ácido γ -hidroxiximénico (27).

Las experiencias sobre un gran número de aceites que no contienen ácidos ciclopropenoicos, al igual que el aceite de algodón, revelaron que todos contienen trazas de sustancias interferentes que conducen a pequeños consumos en la titulación no sólo a 3° sino a 55°C, especialmente productos de auto-oxidación. Estos productos extraños, aunque en pequeña proporción, hacen inadecuada la técnica para el análisis de aceites con bajo contenido en ácidos ciclopropenoicos, tales como el de algodón, ya que el error en la titulación a 55°C resulta de una magnitud comparable a la verdadera titulación de ciclopropenoicos.

La técnica de titulación en etapas sucesivas, aplicada a una serie de mezclas de aceite de Esterculia foetida-aceite de maní refinado de contenido conocido en ácidos ciclopropenoicos en el ámbito de concentraciones previstas para cubrir los valores en aceites de algodón, permitió solucionar este problema de interferentes por adsorción selectiva de las mismas en columna de alúmina activada, antes del análisis. Para aceites refinados, es suficiente una percolación del mismo por columna de alúmina activada con un solvente como éter de petróleo liviano, mientras que para aceites crudos se requiere un doble tratamiento de percolación a través de alúmina activada, involucrando un primer pasaje según tratamiento para aceites neutros A.O.C.S. y luego el procedimiento alúmina activada-éter de petróleo.

Los aceites rancios (altamente oxidados) deben primero ser convertidos en ésteres metílicos por metanolisis

antes de ser purificados por igual procedimiento que para aceites crudos.

Aún hasta contenidos del orden del 3% en sustancias interferentes, tales como epóxidos o hidroxidiénicos conjugados, pueden contemplarse dentro de este procedimiento sin perturbar su eficiencia o seguridad.

Los autores han probado en base a numerosas experiencias, que el valor de titulación obtenido a 55°C, es representativo del contenido en ácidos ciclopropenoicos cuando después del tratamiento de purificación se consigue un valor de titulación despreciable o nulo a 3°C. El contenido en ciclopropenoicos en aceites de algodón refinado, crudo, rancio, también como el de aquellos deliberadamente adulterados, se pudo determinar por este método con una seguridad del $\pm 0,01\%$ (26). La validez de este método reside en que la concentración en ácidos ciclopropenoicos no cambia apreciablemente por el tratamiento con alúmina y es seguro lográndose la exactitud ya indicada solamente cuando el porcentaje en ácidos ciclopropenoicos y en sustancias interferentes es bajo, como en aceites de algodón.

3) método por titulación con ácido bromhídrico-acético glacial, con previa dilución de la muestra

El método de titulación con ácido bromhídrico en etapas ya descriptas pierde seguridad cuando se lo aplica a muestras que contienen altos porcentajes de ácidos ciclopropenoicos, particularmente si contienen apreciables cantidades de materiales adsorbibles por alúmina. La causa reside en el efecto de fraccionamiento ocasionado por la

alúmina sobre los glicéridos a través de su acción adsorbente selectiva, lo que origina un aumento en la concentración de ácidos ciclopropenoicos, quedando afectados en mayor grado los altos contenidos en esos ácidos. También el método está sujeto a serias inseguridades cuando la muestra contiene altos porcentajes de materiales adsorbibles por alúmina, aún en presencia de bajas concentraciones en ácidos ciclopropenoicos, pues por remoción de tales sustancias interferentes puede resultar alterada la concentración de los primeros.

Así, estos mismos investigadores, en un trabajo posterior desarrollan una modificación a dicho procedimiento para eliminar esas fuentes de error, manteniendo la misma precisión anteriormente mencionada (28).

Esta modificación involucra la titulación de los ésteres metílicos de la muestra a 3° y a 55°C con ácido bromhídrico-ácido acético después que ha sido diluída con una cantidad conocida de oleato de metilo y sometida al pretratamiento con alúmina activada. Esta técnica de dilución es aplicada solamente a los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales, por lo tanto los glicéridos deben ser convertidos primero a ésteres metílicos por metanolisis.

b) métodos instrumentales
Absorción en el IR

Varma y col. (29) determinaron el coeficiente de extinción específico para una muestra de ácido estercúlico puro a 9,92 μ y aunque asignaron una estructura errónea

al ácido estercúlico en base a otras características, desarrollaron una técnica para valorar por este camino el contenido en ácidos ciclopropenoicos en el aceite de Sterculia foetida.

Bailey y col. (30) presentaron un método directo para la estimación de ácidos ciclopropenoicos en glicéridos y en ésteres metílicos, basado en la medida de su absor^tividad característica en el IR a $9,9 \mu$. Si bien tiene ciertas ventajas con respecto a otros métodos ya descriptos, tales como rapidez, pequeña cantidad de muestra (30-300 mg.), ahorro de un pretratamiento para eliminar interferentes y recuperación de la muestra utilizada en el ensayo, no alcanza la precisión señalada para el método de titulación con ácido bromhídrico y necesita una calibración contra standards de alta pureza.

Se lo señala como método particularmente útil para muestras con altas concentraciones de ciclopropenoicos y en aquellos casos donde no sea requerida tanta precisión como en el método de titulación con ácido bromhídrico (por ejemplo control en la preparación de concentrados en ciclopropenoicos).

Cromatografía gas-líquido

Si bien numerosos investigadores han recurrido a la cromatografía gas-líquido como un medio para determinar el contenido en ácidos ciclopropenoicos en diferentes aceites (5) (6) no surge de sus referencias la precisión alcanzada en sus valoraciones ni la interpretación de los cro-

-matogramas obtenidos. También se señala en la literatura las complicaciones que surgen en el análisis por CGL de ésteres metílicos de aceites que contienen estos ácidos, los que aparecen afectados grandemente por las condiciones operatorias, en especial el rango de temperatura utilizado que influye sobre su sensibilidad térmica, como la superposición con otro componente (linoleato). Se ha tratado de evadir estos inconvenientes hidrogenando la muestra o la mezcla de ésteres metílicos y separar los productos resultantes por CGL para permitir el cálculo de la composición acídica. Pero la hidrogenación conduce a una mezcla de varios productos secundarios que crea complejidad al sistema. Wolff y Miwa (31) de acuerdo a observaciones surgidas de numerosas experiencias muestran los grandes efectos en diferentes operaciones intentadas en análisis por CGL de ésteres de ácidos ciclopropenoicos y sugieren precaución a los investigadores que obtengan e interpreten tales datos.

Raju y Reiser (32) describen la estimación de ácidos ciclopropenoicos a través del análisis por CGL de sus metil mercapto derivados (33). Consiguen así resolver la aplicación de la CGL a derivados estables, salvando los inconvenientes anteriormente descriptos. Al mismo tiempo se posibilita la valoración individual de los ácidos ciclopropenoicos, ya que por los métodos hasta ahora señalados solo se estima el contenido total de los mismos.

Nueve aceites de semilla fueron examinados por este camino, siguiendo un procedimiento general de obtención de los ésteres metílicos por metanolisis y preparación de

sus metil mercapto derivados que son directamente analizados por CGL.

Bajo las condiciones experimentales desarrollados en esta técnica, descritas con amplitud por sus autores, la ausencia de picos adicionales ("arti facts") en los cromatogramas, revela que no han ocurrido reacciones colaterales en la obtención de los derivados mercaptanos. También la estabilidad de los mismos quedó demostrada al operar en columnas cromatográficas polares y no polares hasta 240°C sin signos de descomposición.

Se describe la separación de los derivados mercaptanos de los ácidos ciclopropenoicos (malválico y estercúlico) por T.L.C. (adsorbosil-1 con 12% NO_3Ag) a fin de utilizarlos puros como standards de referencia.

La capacidad cuantitativa del método fué probada en el análisis de mezclas standards de aceites de maíz y de semilla de Sterculia foetida de conocido contenido en ácidos ciclopropenoicos. La suma de los % obtenidos para los ácidos malválico y estercúlico hallados por CGL, una muestra de Sterculia foetida, fué comparada con los % obtenidos por el método de titulación con ácido bromhídrico (calculado como ácido estercúlico). La estrecha concordancia entre los mismos permite confiar en el aspecto cuantitativo del análisis por CGL.

Simultáneamente, al analizar las nueve muestras de aceites de semilla (Sterculia foetida, Hibiscus syriacus, Hibiscus esculentus L., Bombax malabaricum o kapok, Tilia platyphilla, Althea rosea cav., Bombacopsis glabra, Lavatera

trimestris y Gossipium hirsutum L. o algodón), se señaló la presencia de un ácido ciclopropenoico de menor longitud de cadena que el malválico en el aceite de Althea rosea cav. y otro de mayor longitud de cadena que el estercúlico en el aceite de Bombacopsis glabra.

El aceite de semilla de algodón presenta problemas en la aplicación de este método, a causa de la aparición de algunos picos irregulares de origen desconocido que emergen después de C_{18} y antes del malvalato.

Teniendo en cuenta que en el método de titulación con ácido bromhídrico, las dificultades que se presentan al analizar aceite de algodón, son salvadas por tratamiento preliminar con alúmina activada, se aplicó este paso previo, pero no se consiguió remover los picos irregulares. El mismo efecto se halló en el aceite fresco extraído, tanto de semillas de algodón normales y sin glándulas, al igual que en productos refinados comerciales.

Resonancia magnética nuclear

Aunque no existen referencias bibliográficas que describan métodos de análisis de ácidos ciclopropenoicos utilizando RMN, queda la duda de su aplicación potencial. Existe ya un acercamiento, aunque indirecto, registrado en el trabajo de Rinehart (15) que lo emplea para dar una medida aproximada de la proporción de pares isoméricos presentes en los productos de acetólisis del ácido estercúlico, que podría convertirse en la base de un método de valoración del contenido en ciclopropenoicos original.

Otros intentos, ya sea por medidas directas a través del grupo CH_2 en el anillo, o indirectas, basadas en la detección de impurezas presentes (% de ciclopropenoicos por diferencia), si bien no han tenido el éxito esperado, permanecen en pie para ser verificados experimentalmente (34).

De una observación de conjunto de los métodos de análisis cuantitativos de ácidos ciclopropenoicos, surge la ubicación, entre aquellos de estequiometría reconocida y cuya exactitud es independiente de un calibrado con standards, de técnicas como la valoración con ácido clorhídrico o titulación con ácido bromhídrico en etapas, y entre los que dependen de tal calibrado para su precisión, a los basados en el ensayo de Halphen, IR y CGL. Los señalados en primer término, pueden servir de standards secundarios de calibración para los segundos.

La elección de un método en particular, dejando de lado las ventajas de los primeros, debe ser la de aquél aparentemente más aplicable a la muestra a analizar, previendo interferencias, complicaciones y exactitud requerida en la medida. Es recomendable la práctica confirmatoria por dos métodos diferentes que den confianza frente a muestras desconocidas que puedan contener sustancias interferentes no previstas.

Los métodos que tienen como base la reacción colorimétrica de Halphen, dada su gran sensibilidad son los preferidos para detectar muy bajas concentraciones en ciclopropenoicos y en particular el método por IR donde existan

problemas especiales de interferencias. Cuando se requiera exactitud en los resultados, será conveniente la aplicación del método de titulación en etapas con ácido bromhídrico y cuando se quiera distinguir entre ciclopropenoicos de diferentes estructuras, solamente se podrá utilizar la valoración por CGL de sus derivados metil mercaptanos, todo ello de acuerdo al estado actual de conocimientos en materia de metodología en ciclopropenoicos.

d)- Significado biológico de los ácidos ciclopropenoicos.--

Sherwood (35) en 1928, había asociado la ingestión de aceite de algodón incorporado a la dieta de gallinas que incubaban, con ciertos cambios en el color de la yema y del blanco, en huevos estacionados en frío por un tiempo prolongado. Los blancos se volvían rosados y las yemas tomaban un color rosa-anaranjado.

Unos años más tarde, Lorenz y col. (36) detallaron los síntomas característicos de esta forma de deterioro, que se llegó a conocer con el nombre de "pink-whites" y que ocasionó severas pérdidas en el mercado, pues afectaba la calidad de los huevos. Este tipo de deterioro se manifestaba por producir, además de los cambios de color mencionados, alteraciones en el tamaño, aspecto y consistencia de la yema, no observándose en ningún caso olor anormal.

En la búsqueda de mayores evidencias que correlacionaran el desarrollo de estos fenómenos de deterioro con el tipo de alimentación, se practicó el ensayo de Halphen para aceite de algodón, en la fracción grasa extraída de

la yema de huevos deteriorados, con resultado positivo.

A causa de la alimentación con torta de semilla de algodón, la grasa de depósito de las aves, como también la grasa extraída de las yemas de los huevos que éstas producían, daban reacción positiva frente al ensayo de Halphen.

En estudios comparativos llevados a cabo con yemas de huevos frescos "normales" (provenientes de gallinas alimentadas con raciones carentes de productos derivados de la semilla de algodón) y yemas de huevos frescos que provenían de gallinas que consumían raciones que los contenían, revelaron que en este último caso el contenido acuoso y proteico eran superiores a los valores normales, siendo inferior el contenido graso. Algunos huevos, separados desde el comienzo de puestos, para estacionarlos en frío y correspondientes a este último lote de animales, revelaron después de unos meses las demás características del deterioro ya mencionado.

Con el mismo fin, se ensayaron otros aceites de plantas de las familias Malvaceas, Tiliaceas y Bombacaceas, incorporándolas a la dieta de gallinas ponedoras.

En todos estos casos, la grasa extraída de las yemas de los huevos producidos daban ensayo de Halphen positivo y presentaban los mismos signos de deterioro en el estacionado, con mayor intensidad cuanto mayor era la proporción del aceite en la dieta, al igual que el aceite extraído de las semillas de dichas plantas.

Fué así que Lorenz y col. (36) sugirieron que la sus-

-tancia presente en el aceite de algodón (como en las semillas de las otras familias), que daba respuesta positiva frente al ensayo de Halphen, sería la responsable del cambio de color en los huevos.

En experiencias más completas, Schaible, Bandemer y Davidson (37) confirmaron las observaciones anteriores, poniendo mayor luz sobre el problema.

El color rosado en el blanco del huevo, se observó primero en la capa del mismo adyacente a la yema y después de prolongado estacionamiento se distribuía uniformemente.

Ya que los blancos contienen normalmente mucha mayor proporción de agua y mucha menor proporción de grasa que las yemas, el aumento porcentual acuoso y proteico unido a la disminución de concentración de grasas en las yemas, señalaban que el blanco del huevo por sí mismo (más que el agua del blanco) pasaba a través de la membrana vitelénica para agrandar las yemas y producir el cambio de composición mencionado.

El fraccionamiento de proteínas contenidas en las yemas agrandadas y de color rosa-anaranjado, provenientes de huevos estacionados, probó la presencia de ovoalbúmina lisozimica, y conalbúmina que provenían del blanco (38). Todo ello significaba difusión a través de la membrana vitelénica.

Otra serie de experiencias comparativas, utilizando lotes de gallinas alimentadas con raciones que no contenían o que contenían productos derivados de semilla de algodón

(aceite, torta residual) permitieron probar que:

- 1) El cambio de color en el blanco y en la yema de huevos enteros, provenientes de gallinas que consumían tales productos, dependía de la difusión de alguno o algunos componentes del blanco hacia la yema y viceversa.
- 2) Que esta difusión ocurría solamente cuando estaban fluídos (como ocurre en el estacionamiento en frío) y no cuando estaban congelados.
- 3) Las yemas y los blancos, cuando eran separados inmediatamente de puestos, no presentaban cambios de color en ningún caso y fueron observados así durante meses hasta varios años.

También se controló paralelamente el pH (con microelectrodo de vidrio). En un huevo normal, la capa vitelénica separa materiales de distinto pH (blanco: promedio 8,7 y yema 6,3). Las mediciones se hicieron desde las 2 horas de puestos, después de una semana y 9 meses de estacionar en frío (1-2°C). Los huevos "normales" cambiaron muy poco el pH, sólo después de mucho tiempo (más de 20 meses) las yemas se volvieron ligeramente más alcalinas y los blancos menos. Por el contrario, en los correspondientes a gallinas alimentadas con aceite o torta de semilla de algodón, el pH de ambas partes cambiaba hacia un valor de equilibrio (pH 8,4) presentado ya el cambio de color, durante un estacionado en frío más o menos prolongado (3-4 meses). La razón de que este proceso ocurra con tanta diferencia de tiempo en ambos casos, reside en el cambio manifiesto en

la velocidad de difusión de ciertos componentes a través de la membrana vitelénica, que ocurre en los huevos deteriorados.

Se determinó el contenido en hierro en la yema y en el blanco de los huevos tan pronto presentaban los cambios de color y se halló que la concentración en hierro en los blancos rosados era mucho más alta que en los huevos frescos o en los "normales", mientras que en las yemas decrecía paralelamente su concentración, lo que estaba en apoyo de una rápida difusión del mismo en huevos deteriorados (39). Se llevó a cabo una serie de experiencias que sirvieron para demostrar que el hierro, que difundía de la yema al blanco a través de la membrana vitelénica, era el causante del compuesto coloreado.

Una sal de hierro añadida (en concentración similar al contenido hallado) al blanco de huevos "normales" fué suficiente para producir una coloración rosada, que se desarrolló en forma gradual. Al agregar más sal de hierro o aumentar el pH (sal NaOH) se intensificaba el color rojizo.

El fraccionamiento de las proteínas de los blancos-rosados, reveló que la única que dá el compuesto coloreado con el hierro es la conalbúmina (40). Por su parte, el color en las yemas de huevos deteriorados, fué atribuído a la difusión de conalbúmina del blanco a la yema y a su combinación con el hierro que ésta contiene.

La vinculación de los fenómenos ocasionados por el

aumento de permeabilidad de la membrana vitelónica con la estructura del anillo ciclopropeno, surgió de estudios posteriores en los que se probó que la incorporación de ácido estercúlico puro, al igual que el aceite de Sterculia foetida, a la dieta de gallinas que incubaban (a un nivel de 25 mg./día) producía el deterioro ya mencionado en los huevos. Cuando el anillo ciclopropenoico se destruía por hidrogenación suave, con anhídrido sulfuroso gaseoso o ácido clorhídrico, los aceites de Sterculia foetida o de algodón dejaron de dar reacción positiva de Halphen y no aparecía el color rosado en los huevos después de su ingestión por las gallinas (41).

El ácido estercúlico polimerizado por acción del calor, deja de dar la reacción coloreada de Halphen, eliminándose el deterioro en los huevos.

A través de los trabajos de Nordby (17) quedó demostrado que el grupo ácido o éster no era requerido para la actividad biológica del compuesto: el éster metílico del ácido estercúlico y el esterculeno (hidrocarburo), que también daban positiva la reacción de Halphen, fueron probados en las raciones dadas a gallinas (18 mg./día). Después de 1 mes de estacionado los huevos producidos se habían vuelto rosados.

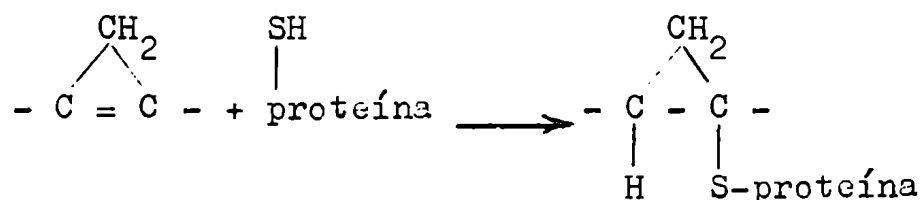
Otros efectos, distintos de los ya detallados, fueron observados por Schneider (42), incorporando cantidades crecientes de aceite de Sterculia foetida en las raciones alimenticias de gallinas ponedoras.

Suplementos tan pequeños como 25 mg./día del aceite

mencionado provocaba la mortalidad del embrión en huevos fértiles al décimonoveno día de incubación; 100 mg. diarios causaba el 100% de la mortalidad y una ingestión de 200 mg./día ocasionaba inhibición en la puesta de huevos y retardo en el desarrollo del ovario y oviducto, agrandamiento del hígado y vesícula, con la consecuencia de un decrecimiento en el índice de iodo de la grasa de depósito del animal (43).

Un posible mecanismo que formula Kircher (33) relacionado a estos aspectos biológicos es la reacción del anillo ciclopropenoico con los grupos sulfhidrilos presentes en proteínas fisiológicamente activas.

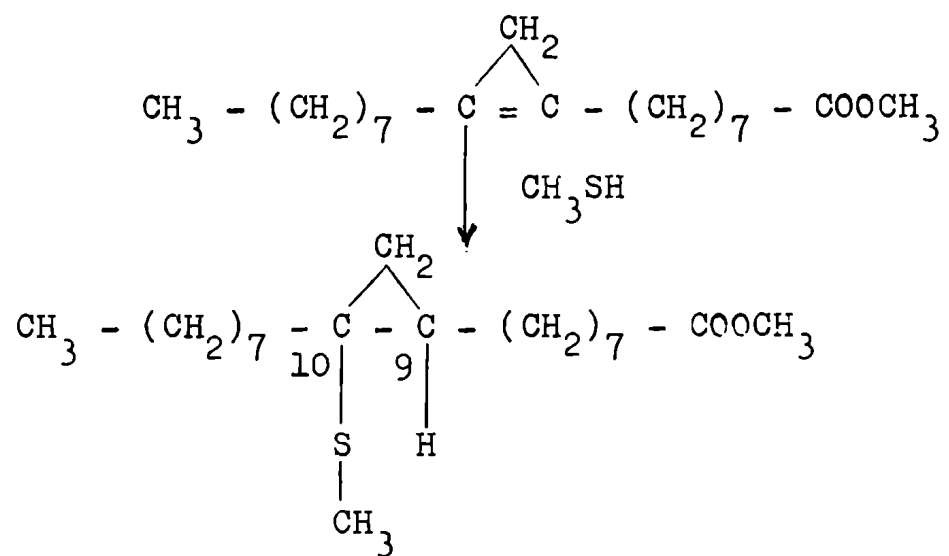
El aumento de reactividad de la doble ligadura en el anillo ciclopropeno con respecto a la doble ligadura presente en los ácidos grasos no saturados corrientes, puede ser la causa de que el primero adicione -SH fácilmente para formar un compuesto estable en condiciones fisiológicas, bajo las cuales no son reactivos estos últimos. Esta adición irreversible de grupos -SH proteicos al anillo ciclopropeno podría alterar grandemente las propiedades físicas y bioquímicas de la molécula de proteína y en consecuencia producir los cambios fisiológicos que se observan "in vivo".

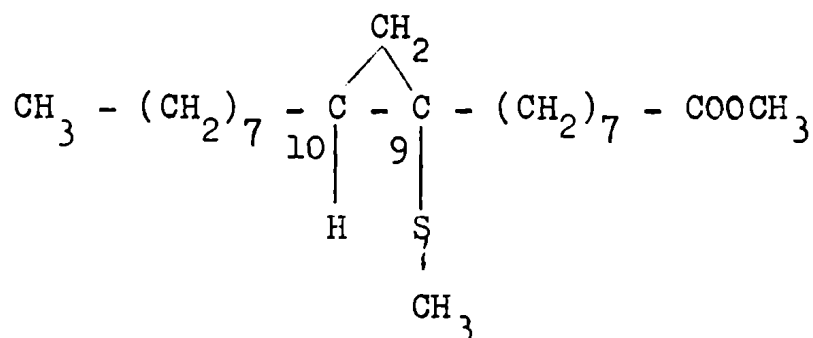


Existen antecedentes de que la interrupción del intercambio normal de grupos disulfuro-sulfhidrilo de hormonas provoca cambios en la permeabilidad de membranas (44) (45).

Kircher (33) ensayó la adición de esterculeato de metilo y de esterculeno puros a soluciones diluídas de metil mercaptano y de ácido β -mercaptopropiónico, en benceno y a temperatura ambiente. El grupo -SH se adiciona a la doble ligadura del anillo ciclopropeno sin apertura del mismo. Paralelamente, ensayó oleato de metilo que no resultó reactivo. La ausencia de no saturación en los derivados formados, se comprobó por ensayos con bromo y permanganato, junto con otros datos espectroscópicos y analíticos. Estas reacciones que dan sulfuros de ciclopropilo están en contraste con las reacciones del anillo ciclopropeno y ácidos carboxílicos y halogenuros de hidrógeno donde ocurre apertura del mismo con la formación de derivados alélicos.

La adición de -SH a la doble ligadura en el ciclo del esterculeato de metilo puede conducir a la formación de dos isómeros de posición (sulfuro en 9- ó en 10), que no pudieron separarse y fueron tratados en todas las experiencias como un compuesto único.





El espectro IR mostró en todos los casos, que después de la reacción con los mercaptanos, el esterculeno y el esterculeato de metilo perdían sus bandas de absorción características. Los sulfuros, en cambio, exhibían una banda débil correspondiente al anillo ciclopropano.

Los derivados del ácido β -mercaptopropiónico pudieron ser esterificados y los del esterculeato de metilo saponificados sin disturbar la unión sulfuro.

En razón de que las reacciones de ciclopropenos con grupos -SH tienen la capacidad de proceder tanto por mecanismos de radicales libres como por mecanismos iónicos, es que resultaron erráticas y dificultosas de reproducir. Las reacciones en solución diluída fueron aceleradas por la luz, los peróxidos y pequeñas cantidades de base.

Siempre asociado a la actividad biológica y a la reactividad del anillo ciclopropénico, aparecieron procedimientos para eliminar estos ciclos en los ácidos de los glicéridos del aceite de semilla de algodón por remoción e inactivación, según lo va indicando la reacción de Halphen hasta obtener ensayo negativo. Así se describen en literatura alúminas activadas o alúminas modificadas por tratamiento con anhídrido sulfuroso, ensayadas en su eficiencia

para su doble finalidad como agentes blanqueantes (eliminación de pigmentos) e inactivantes del anillo ciclopropeno (46) (47).

También se describe un procedimiento para reducir el contenido en ácidos ciclopropenoicos por pasaje en forma continua del aceite de algodón sobre una capa fija de un catalizador (silicato de aluminio) a elevadas temperaturas. Bajo condición seleccionadas (no drásticas) de temperatura y tiempo de contacto del aceite con el catalizador (velocidad de pasaje) se puede obtener una reducción apreciable del contenido en ácido ciclopropenoico sin producir cambios apreciables en otros componentes en el aceite.

Los aceites así tratados no produjeron efectos adversos observables en la calidad de los huevos o en su producción (48). Posteriormente, Rayner y col. (49) presentaron un procedimiento simplificado para inactivar ácidos grasos ciclopropenoicos en aceites de algodón neutralizados por álcali. El calentamiento en atmósfera de nitrógeno del aceite neutro en un desodorizador de laboratorio, en presencia de ácidos grasos de aceite de algodón, ácido cáprico, ácido cítrico o ácido fosfórico, se halló efectivo para eliminar la respuesta positiva del aceite frente al ensayo de Halphen.

Por ajuste de la concentración del ácido incorporado, temperatura y tiempo de calentamiento, se consiguió obtener aceites de algodón prácticamente libres de ácidos ciclopropenoicos (titulación por ácido bromhídrico 0,01%) y ensayos de Halphen negativos. Los aceites así tratados,

incorporados a una misma dieta basal de gallinas que incubaban, no mostraron ocasionar cambios en el pH ni alteraciones en el color en las yemas y blancos de los huevos después de estacionado. Paralelamente se ensayaron raciones conteniendo el aceite de algodón neutro de partida (Halphen positivo, 0,66% ácido malválico) y raciones suplementadas con aceite de germen de maíz refinado (que no contiene ácidos ciclopropenoicos) que sirvieron como testigos con efectos opuestos.

La industria algodonera de los EEUU se ha interesado en el desarrollo de un método económico de producción de aceite de algodón que esté esencialmente libre de ácidos ciclopropenoicos y de la evaluación de los distintos métodos registrados en la literatura, podría surgir aquél que sirva de base para una aplicación en escala industrial.

La mayoría de los procedimientos señalados, como intentos para eliminar ácidos ciclopropenoicos, se han concentrado prácticamente en los aceites de semilla de algodón, muy poco se ha registrado en cambio, con la misma finalidad, en lípidos residuales en tortas y harinas provenientes de la extracción del aceite.

PARTE -II-

Discusión de la Parte Experimental

- 1) Introducción.
- 2) Plan de Trabajo y su Discusión.
 - a)- Extracción de lípidos.
 - b)- Adaptación a escala semi-micro de la valoración de ácidos ciclopropenoicos.
 - c)- Contenido en ácidos ciclopropenoicos de un "expe-ller" de semilla de algodón.
 - d)- Sobre las composiciones acídicas.
 - e)- Determinaciones de fósforo lipídico.
 - f)- Ensayo de Halphen sobre insaponificables.
 - g)- Conclusiones generales.

DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

1) Introducción.-

Las tortas, "expellers" y harinas de semillas de oleaginosas constituyen una de las fuentes más importantes para la obtención de alimentos proteicos, alimentos concentrados en proteínas o para el aislamiento de proteínas. Según el tipo de producto pueden dedicarse a la alimentación animal o humana. Como fuente de materia prima para la elaboración de tales productos ricos en proteínas, los "expellers" y harinas de semilla de algodón revisten especial importancia. En efecto, la semilla de algodón producida en el mundo en 1963/64 ocupó el segundo lugar entre las de oleaginosas con 21,5 millones de toneladas métricas, habiendo ocupado el primer lugar la semilla de soya, con 31,5 millones de toneladas métricas (50). Resumiendo los esfuerzos que se realizan para mejorar ya sea la semilla o los productos de expresión y/o extracción de la misma, corresponde señalar estudios del tipo genético que han permitido la obtención de semilla libre de "glándulas" y por tanto libres de gossypol, compuesto tóxico que normalmente existe en tales glándulas. Estas nuevas variedades libres de glándulas y de gossypol parecieran producir semilla con mejores proteínas y simplifican y disminuyen los costos de los procesos de refinación de aceite y tratamiento de los "expellers" y harinas residuales. Se señala que las plantas de tales variedades son menos resistentes a roedores e insectos que las variedades tradicionales. Asimismo, se han propuesto técnicas para disminuir el contenido en

gosipol de harinas y "expellers" que fundan su acción en la regulación de los grados de humedad y grados de cocción de la semilla en los procesos de separación de aceite o en la extracción por solventes especiales (acetona) o mezclas de solventes conteniendo agua (ej.: hexano-acetona-agua), estos últimos destruyendo las glándulas que contienen gosipol. También y con el mismo fin se ha señalado el efecto inhibitor sobre la toxicidad del gosipol del agregado de cantidades convenientes de sulfato ferroso o de hidróxido de calcio a "expellers" y harinas (51).

Desde que se probó el efecto pernicioso de las aflatoxinas en semilla de maní y subproductos del mismo, se prestó atención a la probable contaminación de semilla de algodón y de sus derivados. Al presente no existen pruebas concluyentes sobre la importancia de este tema en relación a la alimentación humana y de animales de experimentación con tales productos de semilla de algodón, sin descartar por ello que el problema pueda existir y sea analizado más profundamente.

En la Parte I de este trabajo se ha hecho amplia referencia a los aspectos biológicos de los ácidos ciclopropenoicos naturales, a las técnicas de destrucción de esos ácidos en aceites de semilla de algodón y a la necesidad de encarar la eliminación o destrucción de los mismos en "expellers" y harinas de la misma procedencia. Los contenidos en ácidos ciclopropenoicos en tales "expellers" y harinas no son conocidos y por tanto el primer problema a resolver se refiere a tal conocimiento y constituye el objetivo principal de este trabajo. Todo parece indicar

que la mayor parte del contenido en ácidos ciclopropenoicos de una harina o "expeller" de algodón, depende de su contenido residual en aceite (lípidos extraíbles por hexano u otros hidrocarburos). Se menciona que concentrados proteicos de semilla de algodón conteniendo hasta 10% de aceite no constituirían problema en roedores cuando tales concentrados no sobrepasan el 40% de la dieta. Esto implica que la ingestión de productos de semilla de algodón con mayores contenidos de aceite o con todo el aceite original o un incremento por encima del 40% de la dieta con productos que contengan un máximo de 10% del aceite, podría provocar inconvenientes nutricionales (52).

PLAN DE TRABAJO Y SU DISCUSION

a)- Extracción de lípidos

Se trata de establecer el contenido en ácidos ciclopropenoicos de un "expeller" de semilla de algodón de producción industrial. En un principio se pensó en el agotamiento exhaustivo de tal "expeller" por adecuada combinación de solventes, la obtención de los lípidos totales, su fraccionamiento en distintos tipos de lípidos y la determinación de los contenidos en ácidos ciclopropenoicos de cada uno de ellos. Este primer proyecto, complicado en su realización y sujeto a la posibilidad de disponer muy pequeñas cantidades de algunos lípidos en particular, con la dificultad de la determinación de sus contenidos en ácidos ciclopropenoicos que surge del conocimiento de las técnicas disponibles para tales determinaciones, obligó a un cambio de enfoque. Surgió como más conveniente aislar grandes grupos de lípidos y materiales vinculados por solubili

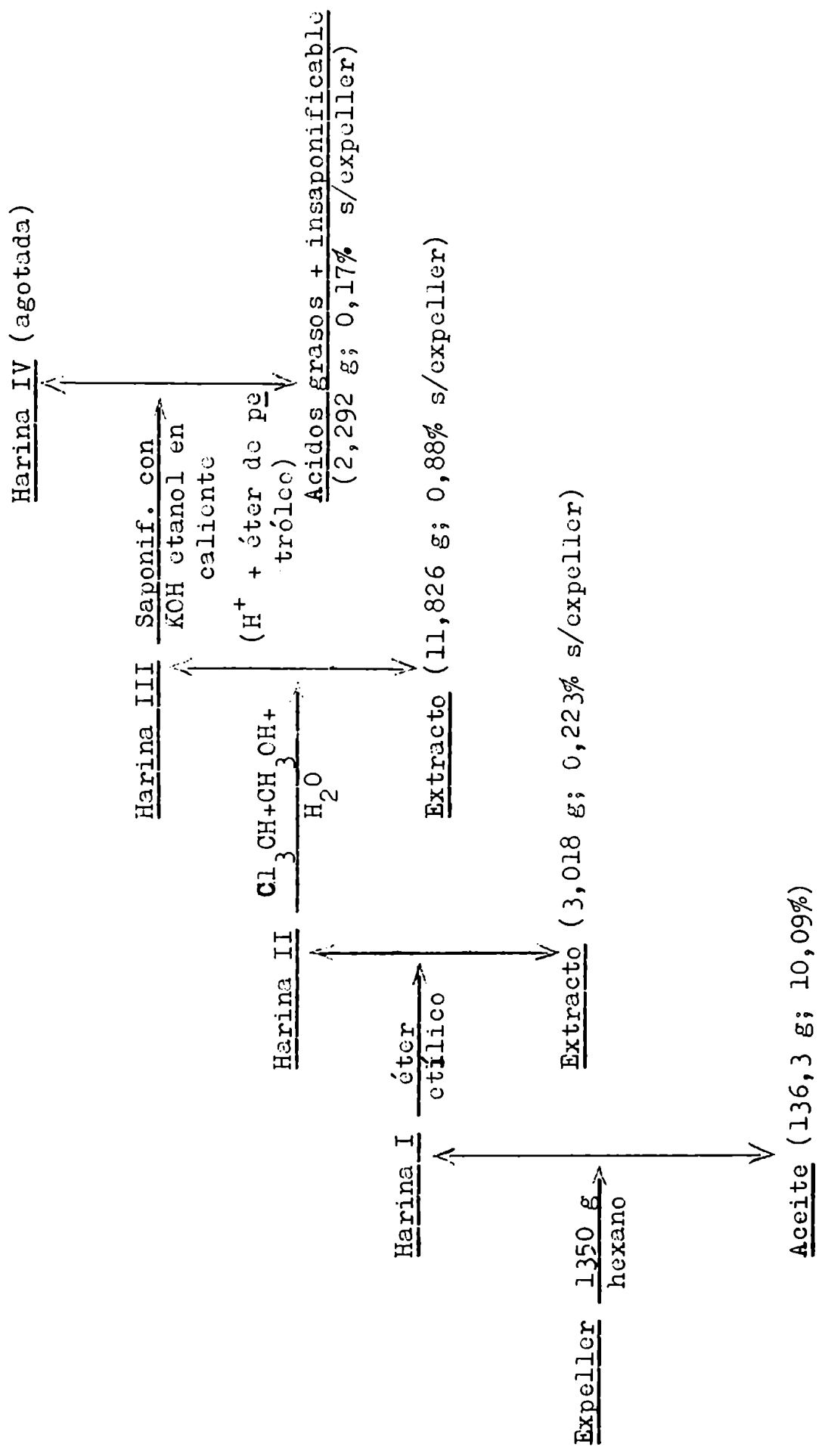
-dad, procediendo luego por adaptación de técnicas de valoración a la determinación de sus concentraciones con ácidos ciclopropenoicos.

Es así que se decidió:

- a)- Agotar el "expeller" con hidrocarburos (hexano técnico). El extracto está fundamentalmente constituido por glicéridos o aceite residual. Constituye la mayor parte de los lípidos residuales en el "expeller".
- b)- Reextraer la harina resultante con éter etílico. El extracto está constituido principalmente por pigmentos, fosfátidos y glicéridos.
- c)- Provocar en la harina resultante del proceso (b), la rotura de glándulas que contienen pigmentos y aislar los lípidos y materiales vinculados liberados en este proceso. Corresponde al tratamiento y extracción con mezcla de solventes ($\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3$ OH: H_2O). El extracto está formado principalmente por pigmentos y fosfátidos.
- d)- Mostrar que la harina resultante del proceso (c) contiene aún lípidos residuales. Se logra por aislamiento de una mezcla de ácidos grasos e insaponificable luego de un drástico proceso de saponificación de la harina obtenida en (c).

Con los detalles que figuran en la Parte Experimental se aplicó este plan al "expeller" industrial con los rendimientos en distintos extractivos que se resumen en el siguiente esquema:

ESQUEMA DEL AGOTAMIENTO DE "EXPPELLER" DE ALGODON POR DISTINTOS SOLVENTES



El esquema anterior merece una fundamentación referente al punto (c) (tratamiento y extracción de la Harina II con mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$).

La mayoría de los pigmentos de la semilla de algodón (53) son segregados por las estructuras morfológicas conocidas como "glándulas de pigmentos", las que poseen una pared gruesa y resistente. Estas glándulas pueden soportar esfuerzos mecánicos muy grandes sobre la semilla cuando el contenido de humedad de la misma es normal, a tal punto que en los procesos corrientes de molienda sólo una pequeña fracción de glándulas sufre roturas. Las paredes glandulares son resistentes a solventes, excepto al agua y a líquidos orgánicos de bajo peso molecular miscibles con ésta.

El contacto con agua provoca la ruptura de las glándulas, efecto que aumenta con la temperatura.

Los alcoholes, cetonas y ciertos éteres también contribuyen a la rotura de la pared glandular. En un proceso industrial de expresión, la distribución de pigmentos entre aceite y "expeller" o torta es, por tanto, función del grado de humedad y de presión operados, así como de la temperatura. En los procesos de extracción inside el tipo de solvente empleado. La morfología de las glándulas de pigmentos ha sido estudiada con microscopio electrónico por Moore y Rollins (54). El análisis exhaustivo de semillas de algodón de las variedades con glándulas y sin glándulas fué realizado por Thaung, Gros y Feuge (55) quienes mostraron análogas características, excepto la presencia de gossipol y otros pigmentos.

La labilidad de las paredes glandulares en presencia de agua constituye la base de los métodos de extracción de "expellers" y harinas de algodón a fin de librarlos del gossipol. En especial se preconiza el empleo de una mezcla azeotrópica hexano: acetona: agua (56,5:42:1,5 en volumen) (56) (57). Por razones prácticas y a los fines del presente trabajo se decide emplear en la fase (c) la mezcla monofásica $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (10:20: 7,6 en volumen) (58) adaptada por Lyons y Lippert (59). La experimentación (ver Parte Experimental) durante esta fase de la extracción consiste en estacionar, a temperatura ambiente, la harina agotada por éter etílico (Soxhlet) con la mezcla mencionada y con agitaciones periódicas. Después de 24 horas y por dilución acuosa de la fase líquida se produce una fina emulsión quedando los lípidos disueltos en la fase clorofórmica que se separa lentamente por decantación.

Luego del agotamiento por hexano, éter etílico y mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, se obtiene una harina (Harina III) que por apropiado tratamiento, muestra contener aún lípidos residuales. No pudiendo recurrir a su aislamiento, se decide probarlo en forma indirecta, a través de un proceso de drástica saponificación de la Harina III con solución etanólica de KOH al 6% adaptando la técnica de Szutowicz (60) desarrollada para evaluar lípidos residuales en "expeller" y harinas de semilla de algodón. Por dilución de la fase líquida, acidificación y extracción por éter de petróleo (ver Parte Experimental) se aísla una mezcla de ácidos grasos e insaponificable que resuelta en estos componentes conforma el total de extracto obtenido en éter de petróleo (ello es lógico habiendo mediado un proceso

previo de saponificación). Durante la acidificación previa a la extracción con éter de petróleo, ocurre fuerte liberación de SH_2 , circunstancia que hace preveer su interacción con probables compuestos ciclopropenoicos existentes, hacia la formación de compuestos sulfurados irreversibles. Esto supone la destrucción de compuestos ciclopropenoicos, lo que se verifica al observar reacción de Halphen negativa. Como complemento de esta fase del agotamiento de la harina y a fin de disminuír las drásticas condiciones de saponificación con potasa alcohólica, se sonete la Harina III a ebullición con solución de metilato de sodio (verificando una concentración remanente de 0,1% de sodio metálico) y aislando un producto formado por ésteres metílicos, insaponificable y pigmentos que convenientemente purificado por percolación a través de alúmina activada (ver Parte Experimental) proporciona un líquido incoloro cuyo ensayo de Halphen resulta muy levemente positivo.

En este ensayo también se observa desprendimiento de SH_2 en la etapa de acidificación (no tan pronunciado).

b)- Adaptación a escala semi-micro de la valoración de ácidos ciclopropenoicos con reactivo Durbetaki

Todas las determinaciones de ácidos ciclopropenoicos en los extractos por hexano, éter etílico y mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ se han logrado por valoración en medio no acuoso con ácido bromhídrico. El método empleado es el de Harris, Magne y Skau (25) que fué verificado en reproducibilidad y sensibilidad en aceites de algodón refinados y crudos de extracción (ver Parte Experimental). Esta macro-técnica exige disponer alrededor de 7 g. de material a valorar

cuando las concentraciones en ácidos ciclopropenoicos (caso de aceite de algodón) son inferiores al 1%. De ahí, la necesidad de adaptarla a cantidades disponibles diez veces menores. Ello fué logrado a través de una técnica semi-micro (ver Parte Experimental) que ha sido debidamente probada sobre los mismos productos operando en macro y semi-micro, con las mismas exigencias de reproducibilidad y sensibilidad.

Durante la realización de estos ensayos de adaptación (ver Parte Experimental) se han realizado valoraciones sobre aceite de algodón, sobre sus ésteres metílicos obtenidos por metanolisis y sobre los ésteres metílicos obtenidos, a partir de los ácidos totales después de saponificación y esterificación con metanol y ácido sulfúrico como catalizador (empleando como mínimo 10 veces el peso de metanol conteniendo 1% en peso de ácido sulfúrico concentrado). Se observaron idénticos resultados referidos a aceite original. La literatura recomienda operar sobre aceites ó esterres metílicos obtenidos por metanolisis, señalando que la esterificación con metanol y ácido sulfúrico provoca destrucción de ácidos ciclopropenoicos. En las condiciones de esterificación con metanol y ácido sulfúrico operadas en el presente trabajo no se observó tal destrucción. Sin embargo todas las valoraciones tendientes a la evaluación final del contenido en ácidos ciclopropenoicos del "expeller" estudiado, lo han sido sobre aceite o sobre ésteres metílicos obtenidos por metanolisis.

c)- Contenido en ácido ciclopropenoico (ácido malvático) del "expeller"

Por aplicación de la técnica semi-micro de valoración adoptada a las fracciones aisladas por extracción con hexano, éter etílico y mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ y operando sobre ésteres metílicos por metanolisis debidamente liberados de interferentes por percolación a través de alúmina activada (ver Parte Experimental) se han obtenido los contenidos en ácidos ciclopropenoicos (expresados en ácido malvático) de cada extracto, que referidos a % de "expeller" de partida (teniendo en cuenta los rendimientos de éste en cada extracto), figuran en el Cuadro 1.

CUADRO 1

Acidos ciclopropenoicos en distintos extractos de un "expeller" de algodón. Contenido total en ácidos ciclopropenoicos

| Extracto en | % de "expeller" | Acido malvático | |
|---|-----------------|-----------------|--------------|
| | | % extracto | % "expeller" |
| Hexano | 10,09 | 0,260 | 0,026 |
| Eter etílico | 0,22 | 0,067 | 0,00015 |
| Mezcla: $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ | 0,88 | 0,015 | 0,00013 |

El Cuadro 1 muestra que el 98,9% del ácido malvático total del "expeller" procede del extracto en hexano, fundamentalmente constituido por glicéridos, esto es, por aceite residual. La presente evaluación no comprende la despre-

-ciable proporción de ácido malválico que pudiera estar presente en los lípidos residuales de la Harina III.

Hacia la finalización de este trabajo apareció una publicación de Levi y col. (57) acerca de la determinación cuantitativa del contenido en ácidos ciclopropenoicos de harinas de algodón. Este trabajo, esencialmente, representa el logro de una técnica analítica para determinar ácidos ciclopropenoicos residuales en tales productos. Operando sobre 20-30 g. de harina sometida a muestreo, por extracción con mezcla azeotrópica Hexano: Acetona: Agua, tratamiento del extracto con mezcla Benceno-Metanol (eliminación de interferentes) y metanolisis aísla ésteres metílicos y otras sustancias vinculadas por solubilidad que contienen los ácidos ciclopropenoicos. Sobre este producto y mediante una adaptación de la técnica colorimétrica de Halphen (23) (a su vez controlada frente a valoraciones con reactivo de Durbetaki), encuentra los contenidos finales en ácidos ciclopropenoicos. En esta evaluación considera que los ácidos grasos libres (no esterificables por metanolisis) tendrían la misma composición que los inicialmente esterificados, computando en los cálculos una corrección en ese sentido (este criterio ha sido el mismo que se sustenta en el presente trabajo, ver Parte Experimental). Menciona que el contenido en ácidos ciclopropenoicos de un "expeller" conteniendo 3,8% de grasa es de 70 p.p.m. (0,007%). Esta cifra referida a un contenido de 10% de grasa sería de 0,02% (concordante en orden con la mencionada en el Cuadro 1). Los autores han confirmado que el tratamiento de la harina con potasa alcohólica según Szutowicz (60) para aumentar la extracción de lípidos residuales, destruye a

los ácidos ciclopropenoicos, lo que concuerda con lo sustentado en el presente trabajo.

d)- Sobre las composiciones acídicas

En el curso de la experimentación fué también propósito aprovechar los distintos extractos obtenidos para conocer la composición acídica de cada uno de ellos. Estas fueron determinadas por CGL (ver Parte Experimental) de los ésteres metílicos de los ácidos totales libres de insaponificable de cada extracto (obtenidos por esterificación con CH_3OH y SO_4H_2). El Cuadro 2 resume las composiciones así encontradas.

La composición acídica del extracto en hexano (aceite residual) está comprendida entre los valores extremos de composición que para aceites de algodón argentinos han señalado Cattaneo y col. (61). Se muestran vestigios de ácido heptadecanoico y de un ácido con tiempo de retención algo superior al del linoleato de metilo, muy probablemente el ácido dihidroestercúlico ya sugerido como tal por Raju y Reiser (32). En general los demás extractos presentan a los mismos componentes mayores con algunas variaciones en sus concentraciones (menores contenidos en ácido linoleico y mayores en palmítico) y la presencia de vestigios de componentes menores (12:0, 15:0, 17:0 y 17:1). En todos ellos y siempre en el orden de los vestigios, el probable ácido dihidroestercúlico y cantidades en el orden de vestigios a 2,2% de ácidos saturados en C_{20} a C_{24} . La totalidad de los ácidos tabulados en el Cuadro 2 solamente se verificó por CGL en los ácidos aislados por saponificación drástica de la Harina III, siendo esta fracción la

CUADRO 2

Composiciones acídicas de los distintos extractos obtenidos del "expeller" (% de ácidos totales)

| Acidos | Extracto en | | | | Acidos aislados por Saponificación Harina III |
|-------------------------|-------------|------------------|---|--|---|
| | Hexano | Eter Etílico (x) | Mezcla: Cl ₃ CH:CH ₃ OH:H ₂ O | | |
| | | | Acidos extraídos por éter de petróleo | Acidos extraídos por éter (xx) etílico | |
| 12:0 | — | — | vest. | 0,1 | 0,2 |
| 14:0 | 0,7 | 0,9 | 0,5 | 0,6 | 0,8 |
| 15:0 | — | — | vest. | — | 0,1 |
| 16:0 | 22,1 | 25,6 | 22,5 | 29,1 | 26,8 |
| 17:0 | vest. | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,3 |
| 18:0 | 2,4 | 3,3 | 3,9 | 4,3 | 4,2 |
| dihidroes-tercúlico (?) | vest. | vest. | vest. | vest. | vest. |
| 20:0 | — | — | 0,2 | ↑ | 0,8 |
| 22:0 | — | — | vest. | ↑ | 1,4 |
| 24:0 | — | — | ↓ | ↓ | vest. |
| 16:1 | 1,6 | 3,2 | 2,3 | 1,8 | 5,1 |
| 17:1 | — | vest. | vest. | vest. | 0,1 |
| 18:1 | 19,5 | 20,6 | 20,1 | 19,3 | 18,4 |
| 18:2 | 53,7 | 45,9 | 50,3 | 44,1 | 40,8 |
| 18:3 | — | — | — | — | 1,0 |

(x) Se registran dos pequeños componentes no identificados con tiempos de retención inferiores al miristato de metilo.

(xx) Se registra un componente no identificado en concentración del 0,1% con tiempo de retención entre laurato y miristato de metilo. Además dos componentes no identificados (0,2 y 0,3%) con tiempos de retención entre miristato y palmitato de metilo.

única que reveló presencia de ácido linolénico.

Composición del extracto en hexano incluyendo componentes menores

Como puede verse en la Parte Experimental, operando sobre el extracto en hexano (aceite residual) se preparan ácidos totales libres de insaponificable, que se transforman en ésteres metílicos, sometiendo a estos a un proceso de destilación fraccionada en vacío. Las distintas fracciones y el residuo de destilación se ordenan en este proceso según orden creciente de volatilidades (coincidente con el aumento de Peso Molecular). Cada fracción de destilación y el residuo se examinan por CGL obteniendo los valores de composición resumidos en el Cuadro 9 (Parte Experimental), con cuyos valores y teniendo en cuenta los pesos de cada fracción en la destilación, se calcula la composición final señalada en el Cuadro 11 (Parte Experimental). La combinación del fraccionamiento por destilación y CGL permite concentrar componentes en muy baja concentración en las distintas fracciones, haciendo así posible su presencia en los distintos cromatogramas.

En este examen y además de los componentes encontrados por CGL en el análisis directo de los ésteres metílicos de los ácidos totales del extracto en hexano, se evidencia la presencia de muy pequeñas cantidades de ácido láurico (12:0), pentadecanoico (15:0), heptadecanoico (17:0), araquídico (20:0), uncosanoico (21:0), docosanoico (22:0), tetracosanoico (24:0), pentadecenoico (15:1), heptadecenoico (17:1) y docosenoico (22:1). También pudo

evaluarse en un 0,13% sobre ácidos totales la concentración de un ácido cuyo éster metílico tiene un tiempo de retención análogo al del nonadecenoato de metilo. Este componente se mantiene luego de hidrogenación y muy probablemente es el ácido dihidroestercúlico (32).

Kuemmel (62) combinando CGL y ruptura oxidativa de fracciones acídicas (separadas por cromatografía de derivados mercurícos) revela la presencia de componentes menores en aceite de algodón. Además de los señalados anteriormente indica la presencia de ácido nonadecanoico (19:0), tricosanoico (23:0) y hexacosanoico (26:0) entre los saturados. No menciona la presencia de ácido pentadecenoico (15:1) ni de docosenoico (22:1); en cambio señala la existencia de ácido eicosenoico (20:1) y de isómeros de posición del ácido octadecenoico (18:1) y vestigios de octadecatrienoico (18:3), este último revelado como presente entre los ácidos aislados por saponificación drástica de la Harina III en el presente trabajo.

e)- Determinaciones de fósforo lipídico

Como complemento, se consideró de interés la determinación de los contenidos en fósforo lipídico de los extractos en hexano, éter etílico y mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$. Con los detalles de adaptación que se describen en la Parte Experimental se aplica la técnica colorimétrica de Bartlett (63), encontrando los siguientes valores en fósforo % de cada extracto:

| | |
|--------------------------------|--------|
| Extracto en hexano _____ | 0,024% |
| Extracto en éter etílico _____ | 0,373% |

Extracto en mezcla _____ 1,37%
 $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$

Estas cifras indican la mayor concentración en fosfolípidos en el extractivo en mezcla $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$, siendo la menor la del extracto en hexano. Los extractivos más ricos en fósforo de fosfolípidos (éter etílico y mezcla $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$) son prácticamente carentes en ácidos ciclopropenoicos. Ello sugiere como tema de estudio el aislamiento de fosfolípidos puros de semillas cuyos aceites son ricos en ácidos ciclopropenoicos (Sterculia foetida) para verificar si contienen o no este tipo de ácidos grasos.

f)- Ensayo de Halphen sobre insaponificables

Desde que no se tienen referencias sobre el comportamiento de insaponificables de aceites de semilla de plantas de Malvaceas, Tiliáceas, Bombacáceas y Esterculiáceas (cuyos aceites seminales suelen contener ácidos ciclopropenoicos), se practicó el ensayo de Halphen sobre el insaponificable de aceites de algodón crudos y refinados y sobre los insaponificables de los extractos en hexano, éter etílico, mezcla $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ y sobre el aislado por saponificación de la Harina III. En todos los casos se observó resultado negativo, indicativo de la ausencia de compuestos ciclopropenoicos.

g)- Conclusiones generales

Aparte de los valores de composiciones acídicas de

los distintos extractivos y de su consideración en componentes menores que han sido discutidos, se presenta el Cuadro 3 que resume las determinaciones de ácidos ciclopropeñoicos, objetivo principal de este trabajo.

Ningún material insaponificable aislado en este trabajo mostró contener compuestos con agrupaciones ciclopropénicas, desde que siempre produjeron ensayos de Halphen negativos.

CUADRO 3

Resumen de las determinaciones en distintos extractivos, sus contenidos en ácidos ciclopropenoicos y en fósforo lipídico

| | Lípidos provenientes de cada extractivo (% de "expeller") | Lípidos de cada extractivo (% de Lípidos totales) | Ácidos ciclopropenoicos como malválico cada extractivo | Ácidos ciclopropenoicos de cada extractivo (malválico % "expeller") | Fósforo Lipídico (fósforo extractivo) (xxx) |
|---|---|---|--|---|---|
| Hexano | 10,09 | 88,82 | 0,260 | 0,02600 ^(x) | 0,024 |
| Eter etílico | 0,22 | 1,93 | 0,067 | 0,00015 | 0,373 |
| Mezcla (Cl ₃ CH:CH ₃ OH:H ₂ O) | 0,88 | 7,75 | 0,015 | 0,00013 | 1,370 |
| Saponificación Harina III | 0,17 | 1,50 | — | — | — |
| TOTALES | 10,36 | 100,00 | — | 0,02628^(xx) | — |

(x) El 98,9% de los ácidos ciclopropenoicos totales del "expeller" provienen del extractivo en hexano (aceite seminal residual).

(xx) El contenido en ácidos ciclopropenoicos totales del "expeller" (263 p.p.m.) es 85 veces mayor que el correspondiente al mismo "expeller" previamente agotado por hexano (3,1 p.p.m.).

(xxx) Los contenidos en fósforo lipídico son inversamente proporcionales a los contenidos en ácidos ciclopropenoicos.

PARTE -III-

Parte Experimental

- a)- Titulación de ácidos ciclopropenoicos con ácido bromhídrico en medio no acuoso.
- b)- Ensayos previos de valoración en aceites de algodón en macro escala.
- c)- Adaptación de las valoraciones por titulación a escala semi-micro.
- d)- Determinaciones de ácidos ciclopropenoicos sobre aceites crudos de algodón extraídos en frío y en caliente.
- e)- Influencia del método de esterificación sobre el contenido de ácidos ciclopropenoicos.
- f)- Extracción exhaustiva de los lípidos de un "expeller" de semilla de algodón. Determinaciones de sus concentraciones en ácidos ciclopropenoicos, composiciones acídicas y contenidos en fósforo lipídico.

a)- Método de determinación de ácidos grasos ciclopropenoicos - Titulación en etapas sucesivas con ácido bromhídrico en ácido acético glacial para el análisis de aceite de algodón

Harris, Magne y Skau (26) describen un método para determinar ácidos grasos ciclopropenoicos en aceites de semilla de algodón refinados y crudos con una precisión de $\pm 0,01\%$. Está basado en la titulación en etapas con ácido bromhídrico a 3 y a 55°C, después de eliminar sustancias interferentes por adsorción en alúmina activada. Esta técnica, altamente probada en todos sus aspectos, surgió como una consecuencia de ulteriores investigaciones sobre un trabajo preliminar (25) enfocando la eliminación de hasta trazas de interferentes a los efectos de llegar a la precisión mencionada en su aplicación a aceites, que como el de algodón, tienen bajo nivel de constituyentes ciclopropenoicos.

La base de la titulación en etapas sucesivas con ácido bromhídrico en medio acético glacial, surgió a su vez de la interferencia que ocasionaban los ácidos ciclopropenoicos en la titulación con ácido bromhídrico (reactivo de Durbetaki) y a temperatura ambiente de epoxiácidos, al consumir igualmente un mol de ácido bromhídrico por mol de ciclopropenoides. Smith (27) observó que eliminando la agrupación oxirano por reducción con hidruro de litio y aluminio, se titulaba cuantitativamente la agrupación ciclopropeno. El hidruro de litio y aluminio convierte el compuesto epoxi a monohidroxiderivado y la agrupación ácido o éster a alcohol, sin afectar el anillo ciclopropeno.

Harris y col. (25) experimentando sobre aceite de Sterculia foetida observaron que la velocidad de titulación de los ácidos ciclopropenoicos con reactivo Durbetaki era muy lenta a temperatura ambiente y con punto final poco neto. Esa velocidad decrecía con la disminución de la temperatura hasta que a 3°C no tenía lugar la titulación e inversamente aumentaba asintóticamente con el aumento de temperatura hasta 50-60°C, rango en el cual permanecía constante. Un aumento mayor de temperatura ocasionaba pérdida de ácido bromhídrico, que entraba a la fase gaseosa. Se eligió como temperatura de titulación 55°C, obteniéndose valores reproducibles, con punto final neto, dentro de los 15-20 minutos.

La precisión del método de titulación con ácido bromhídrico se ensayó frente a una serie gradual de mezclas de aceites de Sterculia foetida y maíz, cubriendo un gran ámbito de composiciones, ya que el aceite de maíz no contiene ácidos ciclopropenoicos y actúa como diluyente del aceite de Sterculia foetida (aproximadamente 50% de ácidos ciclopropenoicos). Una investigación del efecto de la temperatura en la titulación con reactivo de Durbetaki de grupos epóxido, empleando aceite de lino epoxidado y 1,2-epoxidecano como compuestos tipo en mezclas con aceite de Sterculia foetida, mostró que la valoración se podía realizar en forma completa y rápida a 3°C.

Así, las mezclas de ambas sustancias pueden ser analizadas primero por titulación a 3°C para determinar epóxidos y continuar la titulación a 55°C para valorar ácidos ciclopropenoicos en ausencia de otros interferentes. Las

sustancias, que con reactivo de Durbetaki, consumen aún lentamente a 3 y 55°C interferirán (hidroperóxidos, cetonas α - β -no saturadas y dienoles conjugados); mientras este error puede considerarse despreciable para altas concentraciones de materiales epoxi y ciclopropenoicos, asume mayor significación a bajas concentraciones de los mismos. No obstante, un gran número de experiencias sobre aceites vegetales refinados, incluyendo el aceite de algodón, revelaron, que en general, contienen trazas de sustancias que ocasionan pequeños gastos de ácido bromhídrico no solamente a 3, sino también a 55°C, siendo evidentemente productos de autoxidación. De ahí que la exactitud de la primera técnica desarrollada por los autores fuese inadecuada para aceite de algodón (contenidos en ácidos ciclopropenoicos $< 1\%$), ya que el error de la titulación a 55°C resulta prácticamente del mismo orden de magnitud que la concentración de ciclopropenos a ser medida. Una medida exacta del contenido en ácidos ciclopropenoicos en aceites de semilla de algodón, se consigue eliminando estas interferencias por adsorción selectiva con alúmina activada. La efectividad de este tratamiento se puso en evidencia por los resultados obtenidos sobre un gran número de aceites vegetales comestibles no ciclopropenoicos y sobre oleato de metilo, que originalmente consumían reactivo a 3 y 55°C y que después de su pasaje por alúmina activada se anulaban. El hecho de que los aceites tratados por alúmina y aún el oleato de metilo fresco destilado al vacío, que no contenían sustancias interferentes, desarrollaban gradualmente titulaciones positivas a 3 y 55°C, por exposición al aire, confirmó la hipótesis sobre la naturaleza de tales interferentes (productos de autoxidación).

La técnica de titulación en etapas se aplicó también a una serie de muestras-mezcla de aceite de Sterculia-foetida-aceite de maní refinado, con conocidos contenidos en ácidos ciclopropenoicos en el ámbito de concentraciones previstas similares a aceites de algodón además de las composiciones extremas (0 y 100% de ácido estercúlico), probándose que el tratamiento con alúmina activada es efectivo en eliminar interferentes sin afectar los constituyentes ciclopropenoicos, cuyo análisis resulta seguro dentro del $\pm 0,01\%$. Igual tratamiento se practicó con una serie de muestras de aceites de algodón comerciales, refinados o no, confirmándose lo anteriormente expuesto por titulación a 3 y 55°C antes y después del tratamiento con alúmina activada. Una de las muestras, sometida a tres pasajes sucesivos con alúmina activada al reproducir el valor en ciclopropenos respecto al producto original, permitió probar que el tratamiento no afectaba el valor de ciclopropenos a ese nivel de concentración.

A su vez, se demostró la reproducibilidad del método, obteniendo idénticos resultados por cuatriplicado sobre una misma muestra de aceite de algodón.

En cada tratamiento por columna adsorbente, queda retenida una cierta proporción de aceite, que no es necesario recuperar para obtener exactitud en los resultados, a esos niveles de ciclopropenos quedando verificado por variación deliberada del aceite recuperado (desde 65 a 85%) al no registrarse cambios en el análisis. Los aceites de algodón crudos requieren un tratamiento especial para re-

-mover sustancias interferentes, ya que contienen compuestos fosfatídicos y a menudo son fuertemente coloreados. Los fosfatidos acusan titulación con ácido bromhídrico y los compuestos coloreados interfieren en la nitidez del punto final. De ahí que el procedimiento para el análisis de aceites crudos involucre dos diferentes tratamientos por alúmina activada antes de la titulación con ácido bromhídrico: un primer tratamiento de acuerdo al método oficial A.O.C.S. para aceites neutros (20), seguido del pasaje necesario para aceites refinados. Como se indicó anteriormente, los resultados no se consideran correctos a menos que la titulación a 3°C sea cero.

La efectividad de este tratamiento dual se demostró frente a un aceite de algodón refinado, de conocido tenor en ácido malválico, al cual se incorporó una cantidad determinada de un fosfatido (lecitina de soya), confirmando un valor de cero en la titulación a 3°C y el mismo % en ácido ciclopropenoico después de efectuado el tratamiento.

Los aceites rancios (altamente autoxidados) ofrecen otros inconvenientes frente a este sistema de purificación. Usualmente exhiben valores altos en las titulaciones a 3 y 55°C, que no pueden ser eliminados completamente aún por varios pasajes sucesivos por alúmina activada. Esta dificultad fué salvada por metanolisis de los glicéridos, seguido por un tratamiento dual con alúmina activada de los ésteres metílicos obtenidos, antes de efectuar su titulación en etapas. Los autores dan pruebas de la eficacia del tratamiento a través de resultados satisfactorios en aceites de algodón y de maní autoxidados de ex-profeso.

Por otra parte, se señala que la etapa de metanolisis (metanol absoluto-sodio), ensayada sobre dos muestras de aceites de algodón refinados, no afecta el contenido en ciclopropenos, al presentar valores concordantes en la titulación directa del aceite y de sus ésteres metílicos.

Técnica de titulación en etapas de ácidos grasos ciclopropenoicos, con ácido bromhídrico en acético glacial (Escala macro) (26)

a) Reactivos-Soluciones-Solventes-Materiales:

Alúmina F-20 grade, 80-200 mallas Alorco, activada

La alúmina se activa por secado a 200-205°C, 4 horas antes de su uso. Puede ser empleada hasta las 72 horas después del secado, manteniéndola en desecador (20).

Eter de petróleo (30-60°C).

Reactivo de Durbetaki - solución ácido bromhídrico anhidro 0,1 N en ácido acético glacial preparado por dilución con ácido acético glacial de la solución concentrada de ácido bromhídrico en ácido acético (30-32%, aproximadamente 4N) provista por Eastman Kodak Co.

Este reactivo debe standardizarse diariamente contra carbonato de sodio anhidro.

Carbonato de sodio anhidro standard primario, Mallinckrodt, seco a peso constante a 120°C.

Acido acético glacial A.R.

Benceno A.R.

Violeta de cristal - solución al 0,1% en ácido acético glacial.

Semi-micro-Bureta automática (64) - sistema cerrado tipo

Karl Fisher de 10 ml., con reservorio, graduada al 0,05 ml. con tubos de protección, para la carga con deshidratantes.

Mezcla de solventes Éter etílico absoluto-metanol (39:1) (20) preparado por mezcla de 25 ml. de metanol (grado ACS) con 975 ml. de éter etílico absoluto (grado ACS).

Agitador electromagnético y baño circundante de agua.

Columnas cromatográficas.

b) Técnica: I) Accite de algodón refinado

Obtención del aceite - el aceite se extrae de las pulpas de semillas con éter de petróleo (30-60°C) en una mezcladora y recupera del extracto por filtración y eliminación del solvente, no excediendo los 60°C.

Tratamiento con alúmina activada - en una columna cromatográfica (16 mm. diámetro interno) conteniendo suficiente volumen del solvente (éter de petróleo) como para cubrir completamente la carga del adsorbente, se vierten 100 g. de alúmina activada en pequeñas porciones. El comprimido de la carga se consigue por sedimentación, sin golpear. Cuando el solvente ha drenado hasta una altura de aproximadamente 0,5 cm. en el tope del relleno, se vierte una solución que contiene 25 g. de la muestra disuelta en igual volumen de solvente (éter-petróleo). Se percola por gravedad y se eluye por adición controlada de aproximadamente 225 ml. de éter de petróleo desde un embudo separador. El extremo de la columna no debe ser expuesto en ningún momento a la atmósfera durante la operación de percolado o lavado. El conjunto percolado se filtra y el solvente se elimina en un evaporador rotatorio bajo presión reducida a

una temperatura inferior a 60°C. Se emplea la proporción de 4 g. de alúmina por 1 g. de aceite, manteniendo aproximadamente la misma relación de altura de relleno por diámetro de columna para cantidades menores de muestra.

Titulación: se pesa exactamente 0,5-7,0 g. de muestra, dependiendo del contenido en ácidos ciclopropenoicos (7,0 g. para aceite de algodón) ya tratada con alúmina activada, en Erlenmeyer de 50 ml.; disuelve en 5 ml. de benceno y 15 ml. de ácido acético glacial. Después de agregar violeta de cristal (5 gotas) como indicador se conecta el Erlenmeyer a la bureta a través de un tapón de goma perforado, con ranura lateral para salida de aire y pone en marcha el agitador magnético (64). La solución se enfría a 3°C por medio de un baño de hielo circundante. Se titula con el reactivo de Durbetaki hasta el punto final, indicado por el viraje al azul-verdoso del indicador, que permanecía por lo menos 30 segundos. Se reemplaza el baño refrigerante por un baño de agua mantenido a 55°C y se titula nuevamente hasta el mismo punto final azul-verdoso. Las dos titulaciones, corregidas por el consumo del solvente (blanco) se registran separadamente. La titulación a 3°C debe ser cero o despreciable. De no serlo, puede asumirse, en base a experiencias, que la muestra contendrá sustancias interferentes que contribuirán a consumir reactivo también a 55°C y se requerirá un tratamiento adicional de alúmina.

La concentración en ácidos ciclopropenoicos se calcula ya sea como ácido estercúlico ó ácido malválico, según el predominante en el aceite. Para el aceite de algodón se expresará en ácido malválico:

$$\% \text{ ácido malválico} = 28,04 \frac{N v}{w}$$

donde v es el número de ml. de solución de ácido bromhídrico de normalidad N requeridos por w gramos de muestra.

II) Aceite de algodón crudo

El aceite se pasa primero a través de una columna de alúmina activada usando mezcla de éter etílico absoluto-metanol (39:1) como solvente eluyente de acuerdo a la técnica detallada en el método oficial A.O.C.S. para aceites neutros.

En una columna cromatográfica (medidas establecidas en A.O.C.S.) cargado con el solvente mezcla, se transfiere la alúmina activada (20 g. \pm 1 g. para 5 g. de aceite) dejando correr el solvente hasta que quede una capa de 0,5 cm. por encima del material adsorbente.

Pesar exactamente 5 g. de aceite a analizar en un vaso y agregarle 10 ml. del solvente, agitando con varilla hasta disolución total, lavando la varilla con otros 5 ml. del solvente. Transferir la solución de la muestra a la columna y lavar el vaso con otros 50 ml. de solvente.

Lavar las paredes de la columna desde el tope con 3 porciones sucesivas de 10 ml. cada una. Se une ahora a la columna un embudo separador conteniendo 50 ml. del solvente y se hace entrar el mismo, de tal manera que el percolado se recoja a la velocidad de 4 a 6 ml. por minuto hasta que haya pasado totalmente.

Por último, lavar el final del tubo de drenado con pocos mililitros de solvente. Evaporar el mismo a baño maría con ayuda de suave corriente de nitrógeno seco.

III) Aceites rancios (altamente oxidados)

Estos aceites presentan un problema especial ya que exhiben altos valores en la titulación a 3 y 55°C debido a interferentes que no pueden ser eliminados completamente aún por un número sucesivo de tratamientos por alúmina.

Esta dificultad se elimina por metanolisis (metanol absoluto-sodio) de los glicéridos, sometiendo luego los ésteres metílicos al tratamiento de alúmina activada para aceites crudos y luego titulación en etapas con ácido bromhídrico.

b)- Ensayos previos - Valoración en escala macro con reactivo Durbetaki (BrH-CH₃COOH 0,1N), de acuerdo a la técnica señalada en (26) ³(25):

La técnica de titulación en etapas con reactivo Durbetaki, se ensayó en dos muestras de aceites vegetales refinados del comercio, a fin de probar la eficiencia de la alúmina standardizada, para uso cromatográfico según Brockmann (Merck-Darmstadt), que se usó en lugar de la indicada por los autores, ante la dificultad de su provisión dentro de un plazo aceptable.

La siguiente Tabla muestra los valores satisfactorios obtenidos sobre una muestra de aceite refinado no ciclopropenoico (maní) y una muestra de aceite de algodón refinado,

antes y después del tratamiento por alúmina activada (Merck) (éter petróleo).

| Aceite | equivalente BrH como ácido ciclopropenoico % (x) (xx) | | | | |
|------------|---|------|--|------|-----------------------------|
| | original | | después del tratam. con alúmina activada | | |
| | 3°C (xxx) | 55°C | 3°C (xxx) | 55°C | referido a muestra original |
| maní 1 | 0,12 | 0,09 | 0,01 | 0,01 | — |
| refinado 2 | — | — | 0,00 | 0,02 | — |
| algodón 1 | 0,43 | 0,40 | 0,01 | 0,54 | 0,35 |
| refinado 2 | — | — | 0,00 | 0,55 | 0,35 |

(x) calculado como ácido malválico.

(xx) en cada titulación (3 y 55°C) se efectuó la corrección por el ensayo en blanco.

(xxx) componentes titulables por BrH, no ciclopropenoicos, expresados como ácido malválico.

De los valores registrados en la Tabla que antecede, surge que en un aceite que no contiene ácidos ciclopropenoicos como el de maní, las sustancias interferentes que consumen reactivo a 3 y a 55°C quedan completamente adsorbidas en la alúmina activada.

Por otra parte, en un aceite que contiene ácidos ciclopropenoicos, como el de algodón, materiales similares quedan eliminados, como puede comprobarse por el gasto despreciable o nulo en la titulación a 3°C, representando ahora el valor a 55°C el verdadero contenido en ácidos ciclopropenoicos del aceite.

Este valor (0,54-0,55%), referido a % de muestra original, ya que ocurre una retención de ciertos componentes selectivamente adsorbibles en la alúmina elevando la concentración final en ácidos ciclopropenoicos, muestra una cifra de 0,35% que es frecuente hallarla entre las citadas en literatura para aceites de algodón refinados (0,20-0,40%) (26).

En el curso de estas determinaciones y en forma ocasional, se observó que la mezcla solvente que contenía el aceite (5 ml. benceno + 15 ml. ácido acético glacial) cristalizaba en la titulación a 3°C y permaneciendo en ese estado impedía una correcta agitación para la distribución del reactivo titulante, con la consecuencia de un punto final inseguro y valores altamente no reproducibles.

Para salvar este inconveniente se probaron otros solventes respetando las relaciones anteriores con el ácido acético o se modificó la relación benceno-ácido acético ya empleada. Las mezclas que contenían: tolueno-ácido acético o tolueno-ácido acético-benceno, cristalizaron y las formadas por hexano o tetracloruro de carbono y ácido acético presentaban el problema de separación de fases.

La solución se halló en una mezcla de benceno y ácido acético, en partes iguales, que no ofreció inconvenientes en todo el desarrollo del trabajo.

Prueba de ello son los resultados logrados con un acei

-te de algodón refinado, que se valoró sobre muestra original, empleando las dos relaciones de solventes, con resultados concordantes, como se muestra a continuación:

| Aceite algodón refinado original disuelto en: | equivalente BrH como ácido malválico % | |
|--|--|------|
| | 3°C | 55°C |
| (x) (5 ml C ₆ H ₆ + 15 ml CH ₃ COOH) | | |
| 1 | 0,26 | 0,45 |
| 2 | 0,32 | 0,43 |
| 3 | 0,29 | 0,47 |
| 4 | 0,31 | 0,45 |
| (10 ml C ₆ H ₆ + 10 ml CH ₃ COOH) | | |
| 1 | 0,29 | 0,45 |
| 2 | 0,27 | 0,43 |

(x) Las 4 determinaciones que se registran son aquellas en que no cristalizó el solvente en el transcurso de la titulación.

c)- Valoración en escala semi-micro, con reactivo (ácido bromhídrico-acético glacial)

Aquí debemos entrar a considerar un problema práctico que habría de presentarse en la conducción de las próximas determinaciones de ácidos ciclopropenoicos, al disponer de muy pocos gramos de material proveniente de los extractos etéreos y clorofórmicos de la muestra objeto de este trabajo. Se impone así la necesidad de llevar a cabo el desarrollo y ajuste de una técnica de titulación con

ácido bromhídrico en escala semi-micro, que permita operar correctamente sobre algunos decigramos del material. Las experiencias preliminares, que se detallan a continuación, llevan a esa finalidad. Para ello se comenzó por ensayar el mismo procedimiento, utilizando proporcionalmente la 1/10 parte en todos los reactivos y soluciones, efectuando la titulación en Erlenmeyer más pequeño, pero con la misma semi-micro bureta de 10 ml. al 0,05 ml. Es decir que las nuevas condiciones operatorias serían las siguientes:

| | | |
|---|--------|---------------------|
| Solución BrH-CH ₃ COOH gl. | —————→ | 0,01 N |
| Peso de la muestra | —————→ | alrededor de 0,3 g. |
| Solvente mezcla (1 ml C ₆ H ₆ + 1 ml CH ₃ COOH gl.) | —————→ | 2 ml. |
| Solución indicadora (violeta cristal en CH ₃ COOH) | —————→ | 0,01% (8-10 gotas) |

Se ensayaron cantidades variables del indicador hasta conseguir un consumo despreciable en el blanco y punto final neto.

La muestra utilizada fué el mismo aceite de algodón refinado del ensayo anterior. Se registró una dispersión grande en los % de ácido malválico entre duplicados y a su vez no concordantes con los logrados por la técnica en escala macro.

En base a estas observaciones, pareció razonable aumentar en particular la concentración del reactivo, utilizando en cambio una micro bureta automática de 2 ml., graduada al 0,01 ml. para efectuar la titulación. Las condiciones

operatorias actuales serían:

| | |
|---|----------------------------------|
| Solución BrH-CH ₃ COOH gl. _____ | → 0,05 N |
| Peso de la muestra _____ | → alrededor de 0,7 g. |
| Solvente mezcla (5 ml C ₆ H ₆ + 5 ml CH ₃ COOH) _____ | → 10 ml. |
| Solución indicadora 0,1% (violeta cristal en CH ₃ COOH) _____ | → 0,05 ml. medidos con pipeta |

La solución de BrH-CH₃COOH 0,05 N se standardiza contra CO₃Na₂ anhidro.

El consumo de reactivo en el ensayo en blanco, es de una gota (aproximadamente 0,03-0,04 ml.), observándose un viraje neto en el punto final.

El siguiente cuadro ilustra sobre los resultados obtenidos de varias determinaciones efectuadas directamente sobre el mismo aceite de algodón refinado que sirve de base a estos ensayos.

| Determinación N° | equivalente BrH como ácido malválico % (x) | |
|------------------|--|------|
| | 3°C | 55°C |
| 1 | 0,24 | 0,46 |
| 2 | 0,25 | 0,45 |
| 3 | 0,25 | 0,47 |
| 4 | 0,26 | 0,46 |

(x) Las titulaciones efectuadas a 3 y a 55°C están corregidas por el ensayo en blanco.

De la observación de los valores surge la reproducibilidad de los mismos y su concordancia con los obtenidos en escala macro.

Es importante señalar que para asegurar estos resultados satisfactorios es necesario mantener la temperatura ambiente lo suficientemente constante como para evitar variaciones de lectura del reactivo ocasionadas por el elevado coeficiente de expansión térmica del ácido acético.

Una serie de experiencias posteriores (condensadas en el próximo cuadro) ponen en evidencia la excelente concordancia entre los valores registrados, para una misma muestra de aceite de algodón refinado, por aplicación de las técnicas en escalas macro (25) (26) y la semi-micro últimanamente descripta.

| Determinación N° (sobre aceite algodón refinado original) | equivalente BrH como ácido malválico % (x) | | | |
|--|--|------|--------------------|------|
| | técnica macro | | técnica semi-micro | |
| | 3°C | 55°C | 3°C | 55°C |
| 1 | 0,26 | 0,42 | 0,26 | 0,44 |
| 2 | 0,26 | 0,44 | 0,27 | 0,43 |

(x) Las titulaciones a 3 y 55°C están corregidas separadamente por el ensayo en blanco.

Estos valores indican, que de aplicar el procedimiento en escala semi-micro puede esperarse la misma precisión en sus resultados ($\pm 0,01$ a $\pm 0,02$) que en la técnica original macro.

Como complemento de estos ensayos en escala semi-micro y en concordancia con las experiencias llevadas a cabo por Harris y col. (26), la experiencia que a continuación se detalla confirma que el tratamiento por alúmina activada no afecta la concentración original de ácidos cicloprope-

-noicos. Operando sobre el mismo aceite de algodón refinado empleado anteriormente, se procede a su percolación por columna de alúmina activada utilizando éter de petróleo como eluente (76,1640 g. rinden en esta percolación 51,0375 g.). De estos últimos se pesa una alícuota (0,6400 g.) que por titulación a 3°C no acusa consumo y a 55°C un consumo de 0,19 ml. de reactivo (0,05633 N BrH) equivalente a 0,39% de ácido malválico (0,26% sobre aceite original). Un duplicado de esta titulación (0,7012 g.), no consume a 3°C y gasta 0,21 ml. del mismo reactivo de titulación a 55°C (0,40% ácido malválico, equivalentes a 0,27% de aceite original).

En una segunda percolación 25,0795 g. del primer percolado, se pasan por idéntica columna de alúmina, obteniendo 16,8707 g. de percolado, sobre alícuotas del cual se hacen titulaciones a 3 y a 55°C. En la primer titulación sobre este segundo percolado, 0,6825 g. no consumen a 3°C y gastan 0,28 ml. de reactivo titulante a 55°C (equivalentes a 0,58% ácido malválico sobre segundo percolado y a 0,26% sobre aceite original). En el duplicado (0,7748 g.) no hay consumo a 3°C y se emplean 0,32 ml. a 55°C (equivalentes a 0,59% de ácido malválico sobre segundo percolado y a 0,27% sobre aceite original). En estas 4 titulaciones, de los consumos de reactivo titulante, debe deducirse 0,03 ml. correspondientes al blanco.

Como conclusión surge que la semi-microtécnica empleada proporciona valores reproducibles y concordantes con los de titulación en macro, confirmándose que los tratamientos sucesivos por alúmina activada no modifican la concen-

-tracción en ácidos ciclopropenoicos del producto original, lo que es concordante con lo indicado por Harris y col. (26).

d)- Valoración de ácidos ciclopropenoicos en extractivos por hexano o por éter de petróleo a partir de expeller de semilla de algodón

Los ensayos anteriores de adaptación de una semi-microtécnica de valoración lo han sido operando sobre un aceite de algodón refinado. Desde que el trabajo a desarrollar exige operar a partir de un "expeller" de semilla de algodón, los extractivos por hexano tendrán todas las características de los aceites "brutos" o "crudos" de extracción (elevado contenido en pigmentos y demás componentes presentes en aceites crudos). Harris y col. (26) para estos casos recomiendan un previo pasaje del aceite por columna de alúmina activada empleando éter etílico-metanol, como eluente, tratamiento indicado por A.O.C.S. (20) para liberar a estos aceites crudos de fosfátidos y pigmentos interferentes.

Obtención del extracto en hexano (en caliente)

220 g. de "expeller" finamente molido se agotan por hexano técnico en Soxhlet durante 24 horas. El "expeller" se remuele y somete en igual forma a nueva extracción por 4 horas. De los extractos reunidos se recupera el hexano por destilación a baño maría, eliminando las últimas trazas en estufa de vacío a 100°C y 5 mm. hasta constancia de peso. Se obtienen 22,81 g. de aceite bruto (10,37% sobre "expeller"). Dadas las condiciones de extracción, eliminación de solvente y tratamiento final en la estufa de

vacío, denominamos a este extractivo como "obtenido en caliente". Sobre este producto, se observó que el tratamiento previo de pasaje por una sola columna alúmina activada (éter etílico-metanol) si bien eliminaba la mayor parte de pigmentos, requería un segundo pasaje por otra columna similar para obtener un percolado prácticamente incoloro (ligero tono amarillento). En efecto, el punto final es muy inseguro al titular el producto resultante del primer pasaje, siendo correcto luego de una segunda percolación.

Los resultados mencionados en el Cuadro 4 por titulación "macro" y "semi-micro" sobre el producto obtenido luego de una tercera percolación por columna de alúmina activada (éter petróleo) son totalmente concordantes.

Obtención del extracto en éter de petróleo (30-60°C) (en frío)

500 g. de "expeller" finalmente molido y colocado en frasco caramelo, se agotan con éter de petróleo (30-60°C), con agitación mecánica durante 90 horas.

Se filtra y de los extractos etéreos reunidos se recupera el solvente por destilación a temperatura menor de 60°C, hasta peso constante; se obtienen 97,32 g. de aceite bruto (9,7% sobre "expeller").

De acuerdo a las condiciones empleadas en el procedimiento de obtención, denominamos a este extractivo como "obtenido en frío". Es evidente que en ambas condiciones de extracción (en frío y en caliente) se obtienen prácticamente los mismos rendimientos en aceite bruto. En el Cuadro 5 se resumen los valores obtenidos, después de someter

CUADRO -4-

Aceite crudo extraído por hexano, en caliente

Pasado dos veces por columna de alúmina activada (éter etílico-metanol)

El aceite crudo original (19,7313 g.) rinde en el primer pasaje por la columna de alúmina, 17,0063 g. de producto percolado. 17,0063 g. de este producto percolado, pasados nuevamente por otra columna similar de alúmina, rinden 16,5520 g. de producto percolado (aceite segunda percolación). 16,5520 g. de este último producto se percolan nuevamente por otra columna de alúmina activada (éter de petróleo) y rinden 10,7147 g. de producto percolado (aceite tercera percolación).

-Titulación en escala macro-

| Determinación No | Peso muestra (g) | equivalente BrH como ácido malválico % | | |
|------------------|------------------|--|------------------------------------|---------------------|
| | | 30°C | 55°C | |
| | | ml % (aceite percolación) original | ml % (aceite percolación) original | % (aceite original) |
| 1 | 6,9828 | 0,05 0,00 | 1,02 0,46 | 0,25 |

Reactivo titulante: BrH-CH₃COOH: 0,1184 N; blanco 0,05 ml. a 3 y a 55°C.

En los cálculos se considera la corrección por el ensayo en blanco, separadamente a 3 y 55°C.

continúa

-Titulación en escala semi-micro-

| Determinación No | Peso muestra (g) | equivalente BrH como ácido malvático % | | | | |
|------------------|------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------|
| | | 30°C | | 55°C | | |
| | | ml % (aceite percolación) original | ml % (aceite percolación) original | ml % (aceite percolación) original | ml % (aceite percolación) original | |
| 1 | 0,7455 | 0,04 | 0,00 | 0,24 | 0,47 | 0,25 |
| 2 | 0,6514 | 0,04 | 0,00 | 0,22 | 0,48 | 0,26 |

Reactivo titulante: BrH-CH₂COOH: 0,06224 N; ensayo en blanco: 0,04 ml. a 3 y 55°C.

En los cálculos se considera la corrección por el ensayo en blanco, separadamente a 3 y 55°C.

CUADRO -5-

Aceite crudo extraído por éter de petróleo (30-60) en frío

Pasado dos veces por columna de alúmina activada (éter etílico-metanol)

El aceite crudo original (80,352 g.) rinde en el primer pasaje por la columna de alúmina, 67,1500 g. de producto percolado. 64,4040 g. de este producto percolado, pasados nuevamente por otra columna similar de alúmina, rinden 63,5500 g. de producto percolado (aceite 2da. percolación).

-Titulación en escala semi-micro-

| Determinación N° | Peso muestra (g) | equivalente BrH como ácido malválico % | | | | | |
|------------------|------------------|--|---------------------|-------------------------|---------------------|------|------|
| | | 30°C | | 55°C | | | |
| | | ml % (aceite percolado) | % (aceite original) | ml % (aceite percolado) | % (aceite original) | | |
| 1 | 0,6977 | 0,29 | 0,60 | 0,49 | 0,21 | 0,41 | 0,33 |
| 2 | 0,7085 | 0,28 | 0,57 | 0,47 | 0,20 | 0,38 | 0,31 |

Reactivo titulante: BrH-CH₃COOH 0,06021 N: blanco: 0,04 ml.

En los cálculos se consideró la corrección del ensayo en blanco separadamente a 3 y 55°C 20,2127 g. del segundo percolado se pasan por otra columna de alúmina activada (éter petróleo) y rinden 13,2234 g. de producto percolado (aceite 3ra. percolación).

continúa

-Titulación en escala semi-micro-

| Determinación N° | Peso muestra (g) | equivalente BrH como ácido malválico % | | | | | |
|------------------|------------------|--|------------------------|---------------------------|------------------------|------|------|
| | | 3°C | | 55°C | | | |
| | | ml % (aceite percolación) | 3° % (aceite original) | ml % (aceite percolación) | 3° % (aceite original) | | |
| 1 | 0,6979 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,20 | 0,39 | 0,21 |
| 2 | 0,6683 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,19 | 0,38 | 0,21 |

Reactivo titulante: BrH-CH₃COOH 0,06021 N; blanco 0,04 ml. a 3 y 55°C.
En los cálculos se considera la corrección por el ensayo en blanco, separadamente a 3 y 55°C.

el aceite bruto a un proceso de eliminación de pigmentos y de interferentes idéntico al señalado para el extracto en caliente, que se obtienen por titulación en escala semi-micro sobre el producto resultante del pasaje sucesivo por las dos primeras columnas (éter etílico-metanol) y sobre el producto eluído de la tercera percolación (éter petróleo). Estos últimos valores (0,21%) son prácticamente concordantes (ligeramente inferiores) a los registrados en el ensayo anterior (procedimiento en caliente) en escalas macro y semi-micro (0,25%; 0,26%).

La conclusión inmediata que surge de estas experiencias, es que el proceso de extracción en caliente ($<100^{\circ}\text{C}$), no afecta el contenido en ácidos ciclopropenoicos del aceite obtenido. Sin embargo y como norma precaucional, los calentamientos en estufa de vacío, hasta constancia de peso, se hacen en lo sucesivo a temperatura no mayor de 60°C .

e)- Influencia del método de esterificación sobre el contenido de ácidos ciclopropenoicos

El objeto de las experiencias que se describen a continuación, es el de evaluar dos métodos diferentes de esterificación frente a su probable influencia sobre la agrupación ciclopropeno, en relación a las concentraciones determinadas sobre el aceite original.

Sobre ésteres metílicos obtenidos por metanolisis a partir del aceite bruto extraído con hexano (26)

A 10,35 g. de aceite bruto se agregan 40 ml. de metanol absoluto y 0,15 g. de sodio metálico (que involucra la neutralización de la acidez libre y el 0,1% en exceso respecto

del metanol agregado).

La mezcla se calienta (baño maría) a reflujo durante 25 minutos a fin de alcanzar homogeneidad. A la mezcla fría se la agita en ampolla de decantación con ácido clorhídrico diluído hasta llevar a pH 4,00 (heliantina) y se extraen los ésteres metílicos con éter etílico.

El extracto etéreo se lava con agua para eliminar acidez mineral, se neutralizan los cuerpos acídicos residuales con solución de hidróxido de potasio alcohólico 40%, lava nuevamente con agua, seca con sulfato de sodio anhidro, filtra y elimina la mayor parte del solvente a baño maría y seca el residuo en estufa de vacío a temperatura no mayor de 60°C. Se obtienen 8,14 g. de ésteres metílicos que contienen el insaponificable original.

Sobre este producto y según el detalle del Cuadro 6, una vez sometido al tratamiento de percolación por las dos columnas de alúmina activada (éter etílico-metanol) y (éter petróleo) para aceites crudos (26), se procede a la titulación en escala semi-micro. Los resultados logrados (0,28; 0,26%) concuerdan estrechamente con los obtenidos sobre el aceite bruto (0,25; 0,26%) y a su vez confirma, de acuerdo a lo señalado por Harris y col. y por Hammons y Shone (18) que la esterificación por metanolisis procede sin destrucción del anillo ciclopropeno.

Sobre ésteres metílicos obtenidos por esterificación con metanol y ácido sulfúrico

Desde que en la literatura (18) se menciona que la

CUADRO -6-

Obtención de ésteres metílicos a partir del aceite extraído con hexano-
por metanolisis (metanol, sodio metálico) (26)

10,35 g. aceite bruto extraído por hexano, rinden 8,14 g. de ésteres metílicos que contienen el insaponificable original, 5,0433 g. de estos ésteres metílicos se percolan por una primer columna de alúmina (éter etílico-metanol) y rinden 4,9338 g. de percolado que se pasan por una segunda columna de alúmina (éter petróleo) rindiendo 4,0228 g. de producto percolado.

-Titulación en escala semi-micro-

| Determinación N° | Peso muestra (g) | equivalente BrH como ácido malválico % | | | |
|------------------|------------------|---|---------------------------|---|---------------------------|
| | | 3°C | | 55°C | |
| | | ml (ésteres metílicos producto percolado) | % (aceite original) | ml (ésteres metílicos producto percolado) | % (aceite original) |
| 1 | 0,7256 | 0,04 | 0,00 | 0,23 | 0,45 |
| 2 | 0,6884 | 0,04 | 0,00 | 0,21 | 0,26 |

Reactivo titulante: BrH-CH₃COOH 0,06095 N; blanco 0,04 ml. a 3 y 55°C.

En los cálculos se considera la corrección del ensayo en blanco, separadamente a 3 y 55°C.

esterificación de ácidos grasos con metanol y ácido sulfúrico se acompaña de destrucción de ácidos ciclopropenoicos, se decide experimentar tal influencia.

Partiendo del aceite bruto extraído por hexano se hace necesario saponificar este aceite (por reflujo durante 2 horas con 30 g. de hidróxido de potasio y 500 ml. de etanol/100 g. grasa), luego de lo cual y previa dilución acuosa se acidifica con ácido sulfúrico (1:1) (heliantina) y extrae los ácidos grasos totales más insaponificable con éter etílico. Los extractos etéreos se lavan con agua, tratan por sulfato de sodio anhidro y recupera el solvente a baño maría. Como técnica de esterificación se sigue la indicada por Hilditch y Williams (65) empleando metanol absoluto en cantidad no menor a 10 veces el peso de ácidos a esterificar (el metanol contiene 1% en peso de ácido sulfúrico concentrado como catalizador). Se procede por ebullición a reflujo en baño maría durante 2 horas, se enfría, transfiere a ampolla de decantación y extrae por 3 veces con éter etílico. Los extractos etéreos reunidos se lavan con agua (eliminación de metanol y ácido sulfúrico), se añade solución de potasa alcohólica (4%) gota a gota y agitando hasta reacción alcalina (fenolftaleína; eliminación de cuerpos acídicos no esterificados), lava nuevamente con agua, trata por sulfato de sodio anhidro, recupera el solvente a baño maría y calienta en estufa de vacío a constancia de peso a temperatura no mayor de 60°C.

El producto así obtenido comprende ésteres metílicos de ácidos totales y el insaponificable original.

En operación separada y luego de la saponificación referida, la solución alcohólica de jabones se diluye con agua (2 veces su volumen) y se extrae el insaponificable en ampollas de decantación con éter etílico ajustando la técnica a las prescripciones de A.O.C.S. (66). De las soluciones hidroalcohólicas libres de insaponificable se recuperan los ácidos totales en la forma ya indicada que se esterifican con metanol y ácido sulfúrico como ha sido descripto. Los ésteres metílicos así obtenidos están libres de insaponificable. Los Cuadros 7 y 8 se refieren a las determinaciones, por titulación semi-micro y previo pasaje por dos columnas de alúmina activada (éter etílico-metanol) y (éter petróleo) sobre los ésteres metílicos más insaponificable y los ésteres metílicos libres de insaponificable, ambos obtenidos por esterificación con metanol-ácido sulfúrico en las condiciones indicadas. Las concentraciones finales en ácidos ciclopropenoicos, expresadas en ácido malválico (0,26 y 0,27% referido a aceite original) son, además de concordantes, iguales a las observadas operando sobre aceite bruto y sobre ésteres obtenidos por metanolisis.

Ello indica:

- 1)- La esterificación de ácidos grasos con metanol y ácido sulfúrico en las condiciones operatorias indicadas, no provoca destrucción de ácidos ciclopropenoicos. Este comportamiento difiere del señalado por Hammonds y Shone (18), quienes en su publicación no precisan la técnica de esterifica

CUADRO -7-

Obtención de ésteres metílicos a partir de aceite extraído con hexano, en caliente, por saponificación con potasa alcohólica, aislamiento de los ácidos totales libres de insaponificable y esterificación con metanol y ácido sulfúrico como catalizador

51,45 g. aceite bruto (hexano) rinden por saponificación 47,70 g. de ésteres metílicos, libres de insaponificable, obtenidos por esterificación de los ácidos totales con un mínimo de 10 veces su peso de metanol absoluto y conteniendo 1% en peso de ácido sulfúrico concentrado como catalizador.

9,9854 g. de ésteres metílicos, libres de insaponificable se percolan por una primer columna de alúmina (éter etílico-metanol) obteniendo 9,8257 g. de ésteres que a su vez se pasan por otra columna de alúmina (éter petróleo) rindiendo 8,1170 g. de ésteres metílicos finales, libres de insaponificable.

-Titulación en escala semi-micro-

| Determinación No | Peso muestra (g) | equivalente BrH como ácido valvático % | | | | | |
|------------------|------------------|--|------|-----------------------------|------|------------|-----------------------------|
| | | 30°C | | | 55°C | | |
| | | ml | % | (ésteres metílicos finales) | ml | % | (ésteres metílicos finales) |
| 1 | 0,7314 | 0,00 | 0,00 | 0,18 | 0,35 | prom. 0,27 | |
| 2 | 0,7511 | 0,00 | 0,00 | 0,19 | 0,37 | 0,366 | |
| 3 | 0,7316 | 0,00 | 0,00 | 0,19 | 0,38 | 0,366 | |

Reactivo titulante: BrH-CH₃COOH 0,06171 N; blanco 0,03 ml. a 3 y 55°C.

En los cálculos se consideró la corrección por el ensayo en blanco, a 3 y 55°C separadamente.

CUADRO -8-

Obtención de ésteres metílicos a partir de aceite extraído con hexano, en caliente, por saponificación con potasa alcohólica, aislamiento de ácidos totales más insaponificable y esterificación con metanol y ácido sulfúrico como catalizador

5,20 g. aceite bruto (hexano) rinden por saponificación 4,7378 g. de ácidos totales más insaponificable que, por esterificación producen 4,9325 g. de ésteres metílicos conteniendo el insaponificable original. El total de ésteres se percola por una primera columna de alúmina (éter etílico-metanol) obteniendo 4,8680 g. de percolado que se percolan por una segunda columna de alúmina (éter petróleo) rindiendo 3,8993 g. de ésteres metílicos finales conteniendo el insaponificable original.

-Titulación en escala semi-micro-

| Determinación No | Peso muestra (g) | equivalente BrH como ácido valvático % | | | | |
|------------------|------------------|--|----------------------------------|------|----------------------------------|------|
| | | 30°C | | 55°C | | |
| | | ml | % (ésteres metílicos finales) | ml | % (ésteres metílicos finales) | |
| 1 | 0,6610 | 0,03 | 0,00 | 0,16 | 0,34 } prom. | 0,26 |
| 2 | 0,7090 | 0,03 | 0,00 | 0,18 | 0,37 } (promedio) | 0,35 |

Reactivo titulante: BrH-CH₃COOH 0,06154 N; blanco 0,03 ml. a 3 y 55°C.

En los cálculos se consideró la corrección por el ensayo en blanco a 3 y 55°C separadamente.

-ción empleada. Las experiencias del presente trabajo señalan que en las condiciones operatorias descriptas y con bajas concentraciones en ácidos ciclopropenoicos, no se observan normas en las concentraciones de tales ácidos.

- 2)- Que la presencia de insaponificable de aceites de algodón en los ésteres metílicos no afecta las determinaciones.

Pese a estas comprobaciones, las determinaciones de ácidos ciclopropenoicos en los distintos extractivos de expeller de algodón que se señalan más adelante, se practican sobre ésteres obtenidos por metanolisis.

- f)- Extracción exhaustiva de los lípidos de un "expeller" de semilla de algodón. Consideración de distintas fracciones de extracción, sus composiciones acídicas y contenidos en ácidos ciclopropenoicos

Como ha sido señalado en la Discusión de la Parte Experimental, la extracción exhaustiva de los lípidos residuales en el "expeller" de algodón, se logra por:

- 1)- Agotamiento por hexano técnico.
- 2)- Extracción subsiguiente por éter etílico.
- 3)- Extracción subsiguiente en medio hidratado (destrucción de glándulas de pigmentos) con mezcla $Cl_3CH-CH_3OH-H_2O$.
- 4)- Saponificación de la harina final con potasa alcohólica y aislamiento de insaponificable y ácidos grasos de los lípidos remanentes.

En las experiencias que siguen se detallan estos procesos, la evaluación de los lípidos aislados, sus conside-

-raciones analíticas y de composición en ácidos grasos y contenidos en ácidos ciclopropenoicos, para luego calcular el contenido final en estos últimos del "expeller" original.

Materia prima

El "expeller" de semilla de algodón empleado como materia prima y obtenido en la provincia de Chaco por la firma "Molinos Río de la Plata", procede de un tratamiento de la semilla en prensas previo calentamiento a 85-90°C. El "expeller" obtenido emerge de tales prensas a $100 \pm 3^\circ\text{C}$ y con un contenido de humedad de 8,2 a 8,8%. Se presenta como material pulverulento heterogeneo de color pardo. Una partida de aproximadamente 20 kg. se remuele finamente y homogeneiza a los fines de las determinaciones analíticas.

1.- Agotamiento por hexano técnico - Estudio del extracto en hexano

a) Extracción - Características químicas y contenido en ácidos ciclopropenoicos

1350 g. de "expeller" remolido se agotan en Soxhlet con hexano técnico por 24 horas. El solvente se recupera a baño maría y el residuo lleva a constancia de peso en estufa de vacío (5 mm.) a no más de 60°C. Se obtienen 136,3 g. de un aceite bruto pardo oscuro (10,09% sobre "expeller" original), con las siguientes características analíticas: índice de iodo (Hanus) 110,3, índice de saponificación 193,9, insaponificable total (66) 2,58%, índice de iodo del insaponificable (Rosenmund-Kuhnenn) 66,8, número de acidez (mg. KOH/g.) 23,2 (equivalente a 11,6% ácido

oleico). El contenido en ácidos ciclopropenoicos expresados en ácido malválico de este aceite bruto es de 0,26%, valor coincidente con los varios otros señalados precedentemente sobre este mismo producto. Por tanto y referido a "expeller" original, el extractivo en hexano técnico indica la presencia de 0,026% de ácido malválico. Como resultado del agotamiento del expeller por hexano resta una harina que denominamos Harina I.

b) Saponificación - Insaponificable - Ácidos totales - Esteres metílicos

51,45 g. de aceite bruto se saponifican (15 g. hidróxido de potasio y 250 ml. etanol), obteniendo 0,8718 g. de insaponificable (1,70%; valor inferior al señalado anteriormente por operarse en macro escala) y 48,10 g. de ácidos totales (93,5%). Los ácidos totales se transforman en ésteres metílicos con la técnica ya descrita (metanol-ácido sulfúrico), obteniendo 47,7 g. de ésteres de índice de iodo 109,1.

Insaponificable - Se destina exclusivamente a practicar sobre el mismo un ensayo de Halphen, aplicando estrictamente la técnica A.O.C.S. (67). Al cabo de 2 horas a 100-110°C se observa un tono parduzco que se considera como ensayo negativo. Dada la sensibilidad de la reacción de Halphen para con compuestos ciclopropenoicos, ello indica ausencia de tales componentes en el insaponificable.

Composición ácida - Operando por CGL (aparato Perkin-Elmer Vapor Fractometer Mod. 154, equipado con detector de ionización de llama, columna de 2 metros con material

relleno Chromosorb W, lavado ácido (100-120 mallas) y adipato de polietilenglicol (13% sobre relleno total), nitrógeno como carrier y temperatura de 200°C, se obtiene el cromatograma de la Fig. 1, que permite por triangulación el cálculo de la composición acídica con los resultados que figuran al pie del mismo y en el Cuadro 2 (Parte II).

Composición acídica en componentes menores - Desde que el examen por CGL operando directamente sobre los ésteres metílicos de los ácidos totales no se presta para revelar la presencia de componentes en muy baja concentración se procede, en operación separada, al fraccionamiento de los ésteres metílicos de los ácidos totales en vacío de 0,5-1,0 mm. Hg empleando un equipo según Longenecker (68) cuya eficiencia es de doce platos teóricos medida por el método gráfico de Mc. Cabe y Thiele (69) (70) con mezcla benzol-tetracloruro de carbono. Sobre la serie de fracciones y residuo de destilación obtenidos, se practican exámenes por CGL obteniendo los cromatogramas de las Fig. 2 a 8, cuyas composiciones particulares figuran en el Cuadro 9.

El Cuadro 10 resume el proceso de destilación fraccionada y comprende ensayos de Halphen practicados sobre las distintas fracciones de destilación excluyendo la primera. Estas se practicaron según (67) operando con 0,3 a 0,5 ml. de fracción y observándose resultados positivos en todas, con la mayor intensidad en las fracciones 4, 5 y 6 que son las más ricas en oleato y linoleato (conteniendo la mayor concentración de ácido malválico). El residuo (1 g.), de color oscuro fué percolado por alúmina activada (4 g.) (éter etílico-metanol) obteniendo un producto claro que dá reacción

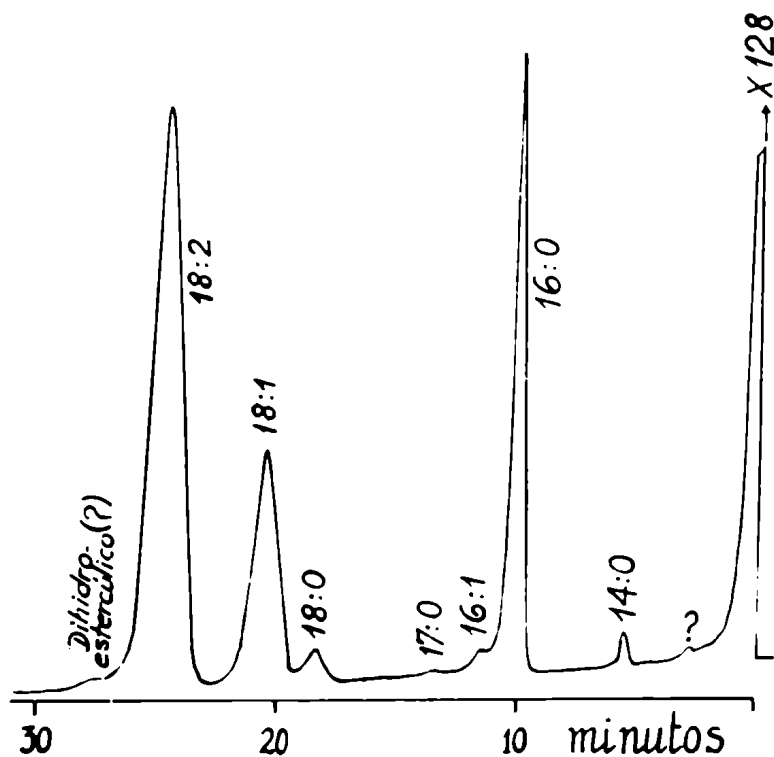


FIG. 1 - Extracto en hexano - Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales.

Composición acídica del extracto en hexano
(% de ácidos totales)

| | | |
|------------------------|-------|-------|
| mirístico | _____ | 0,7 |
| palmítico | _____ | 22,1 |
| heptadecanoico | _____ | vest. |
| estearico | _____ | 2,4 |
| palmitoleico | _____ | 1,6 |
| oleico | _____ | 19,5 |
| dihidroestercúlico (?) | _____ | vest. |
| linoleico | _____ | 53,7 |

Ind. de iodo ésteres metílicos ác. totales (det.) → 109,1
 " " " " " " " (calc.) → 110,8

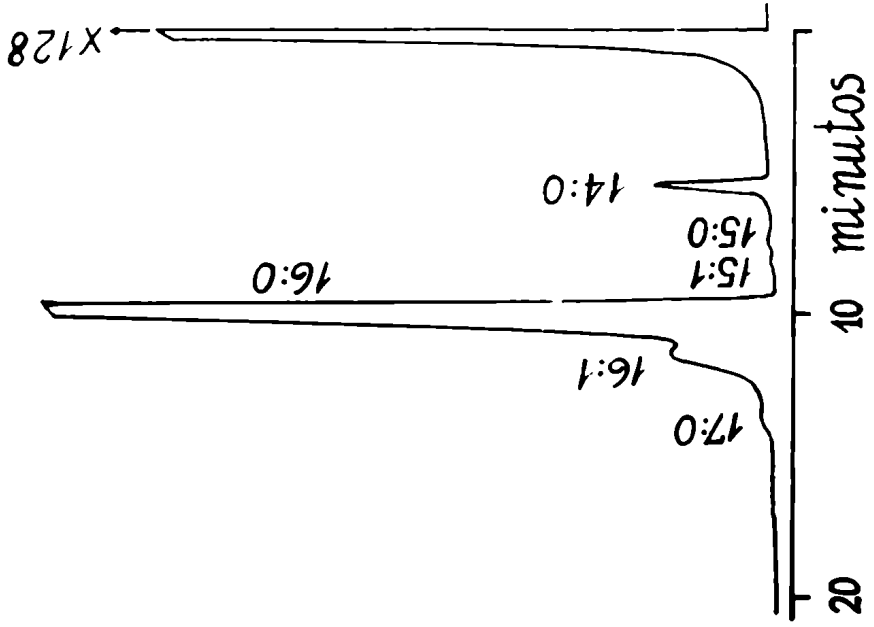


FIG. 3 - Fracción 2

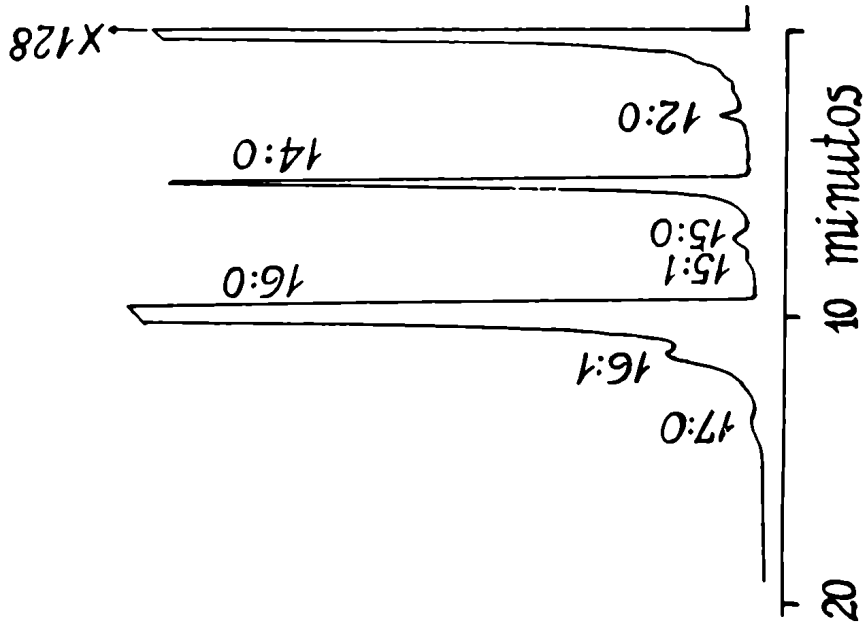


FIG. 2 - Fracción 1

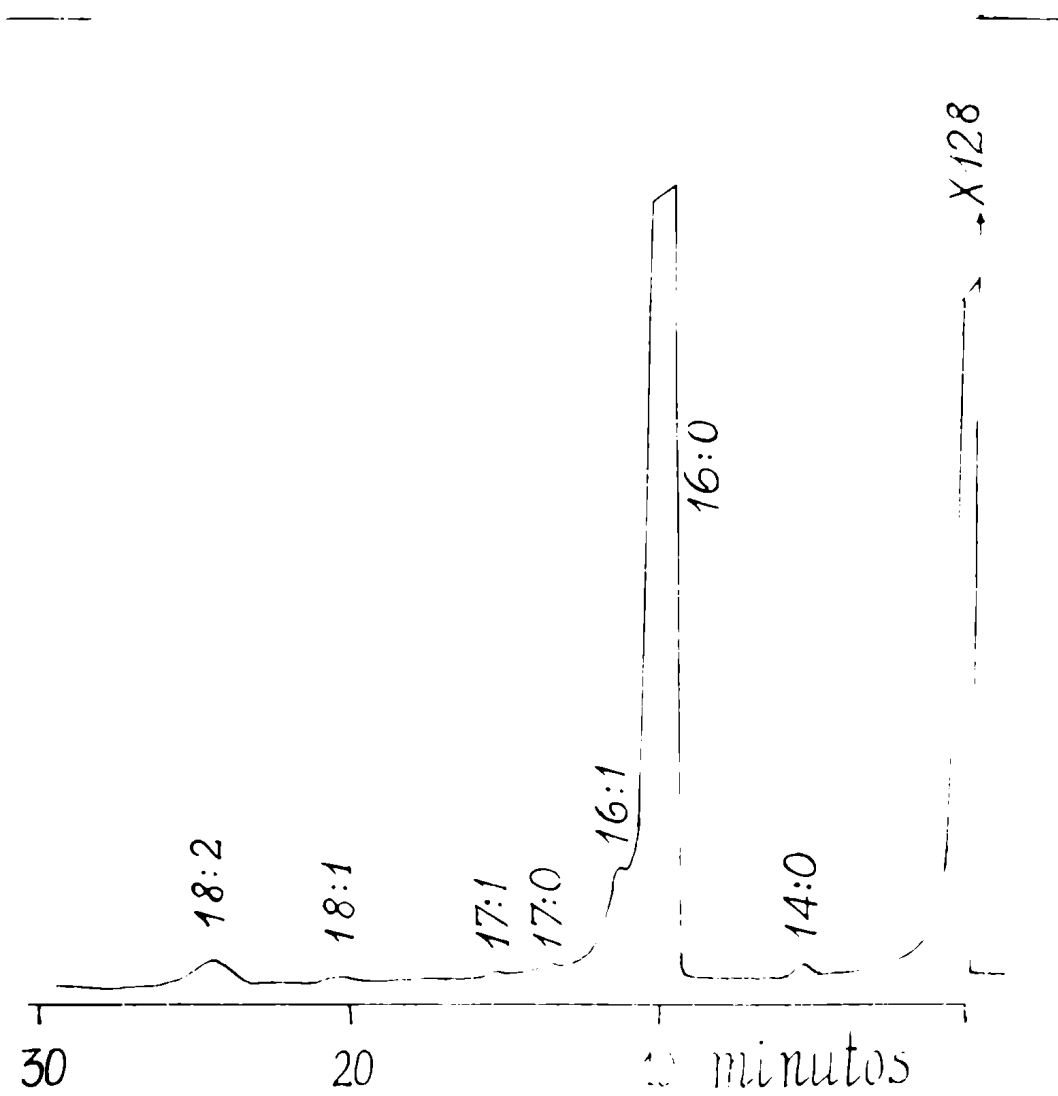


FIG. 4 - Fracción 3

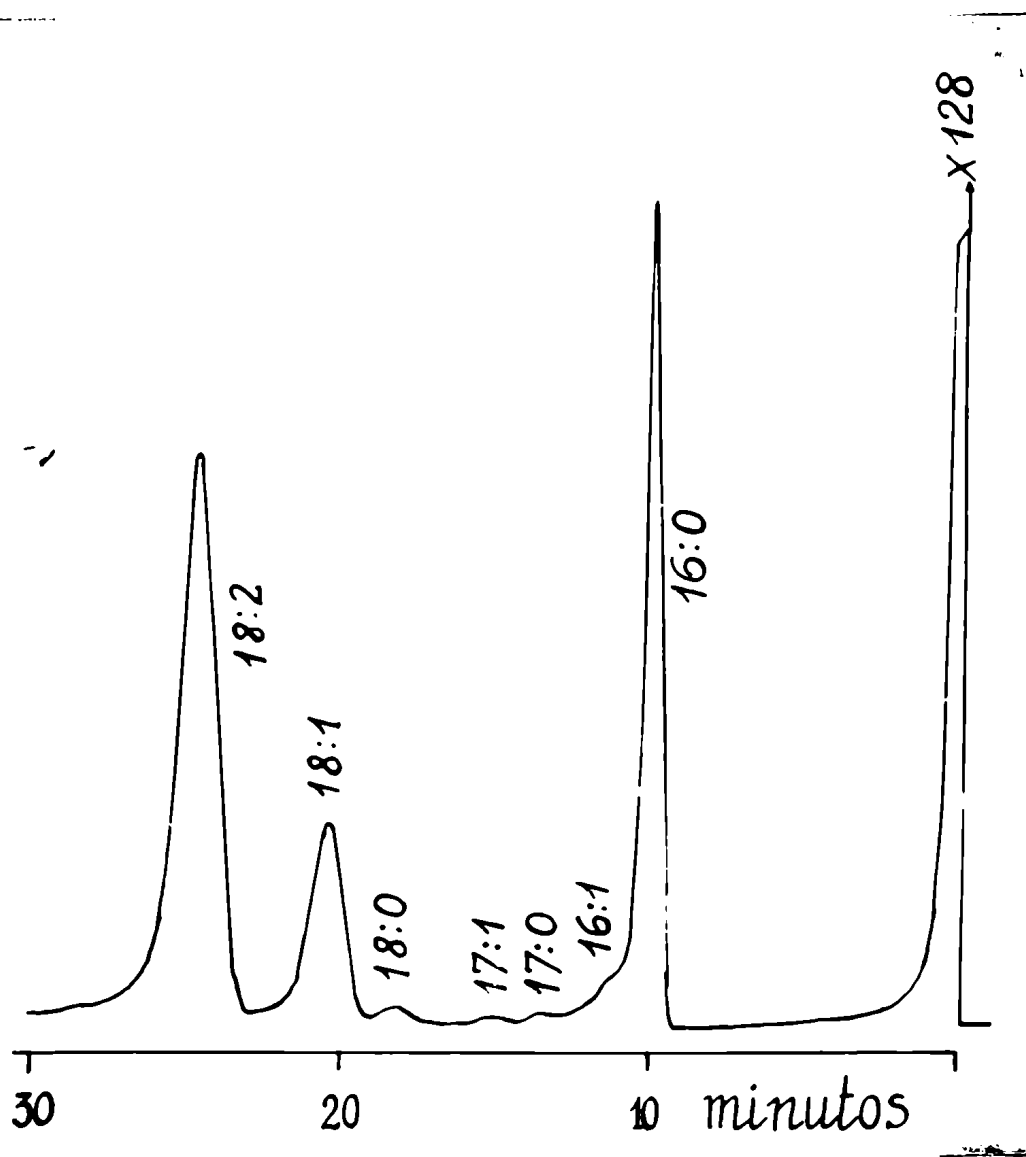


FIG. 5 - Fracción 4

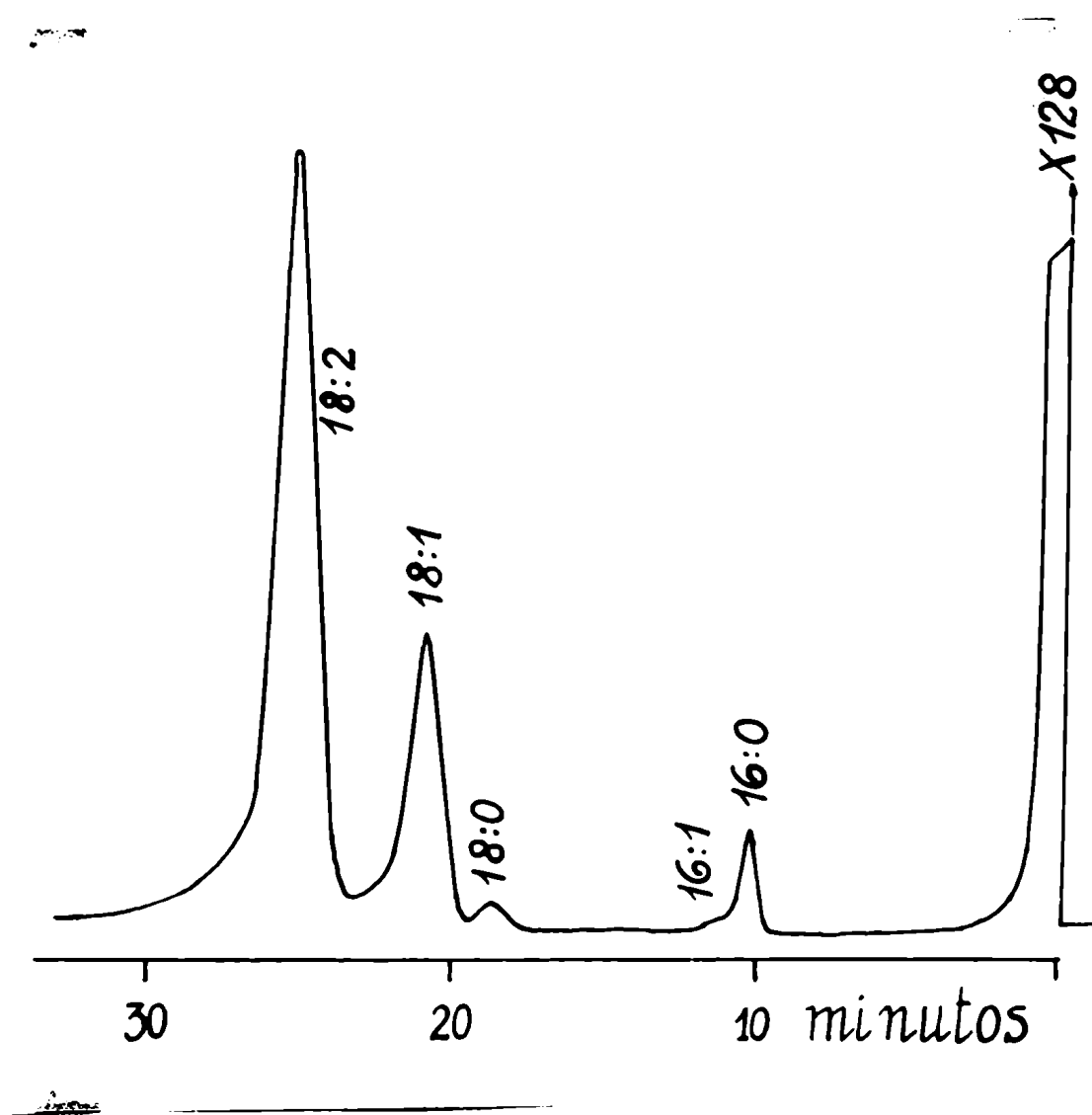


FIG. 6 - Fracción 5

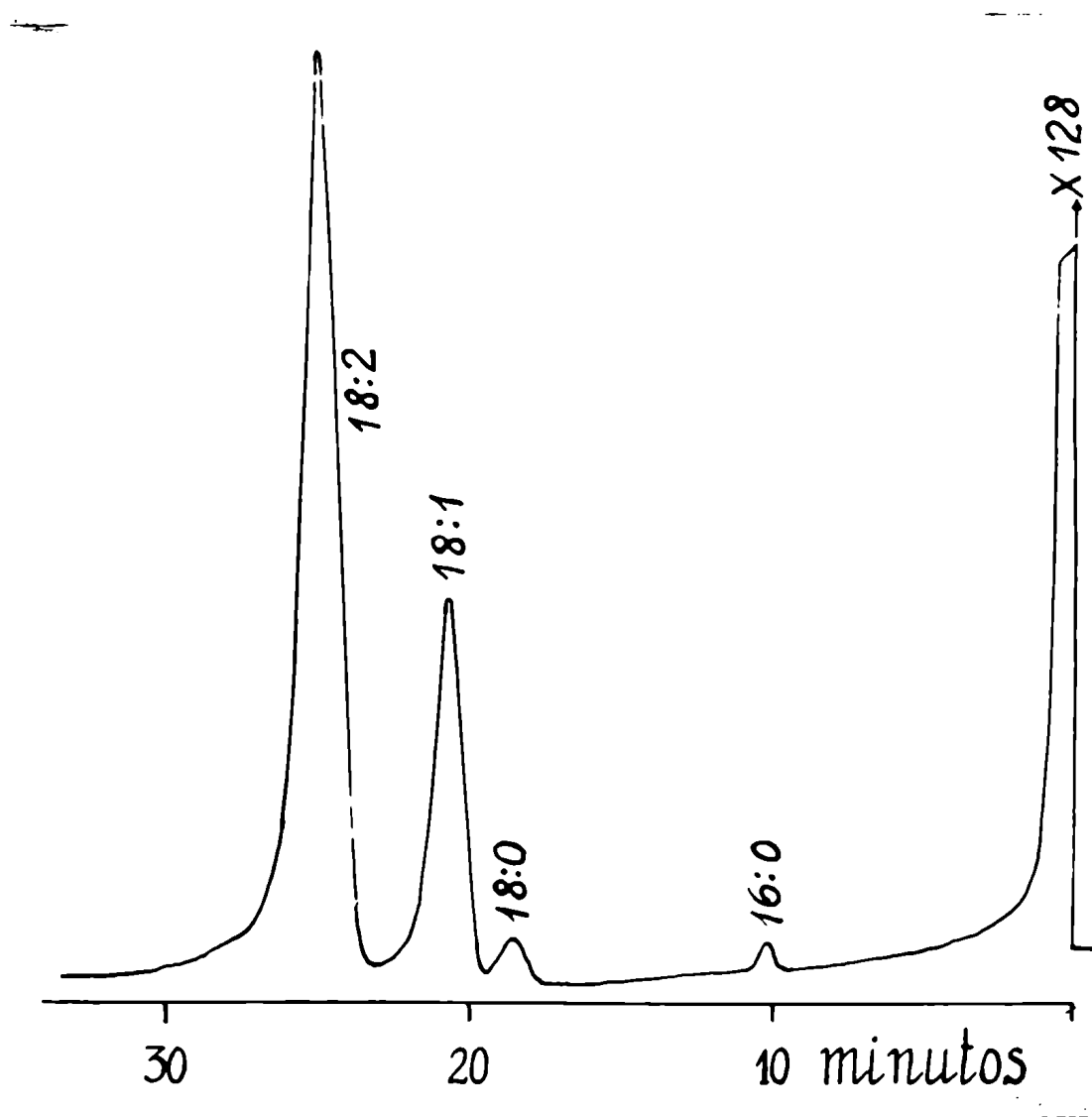


FIG. 7 - Fracción 6

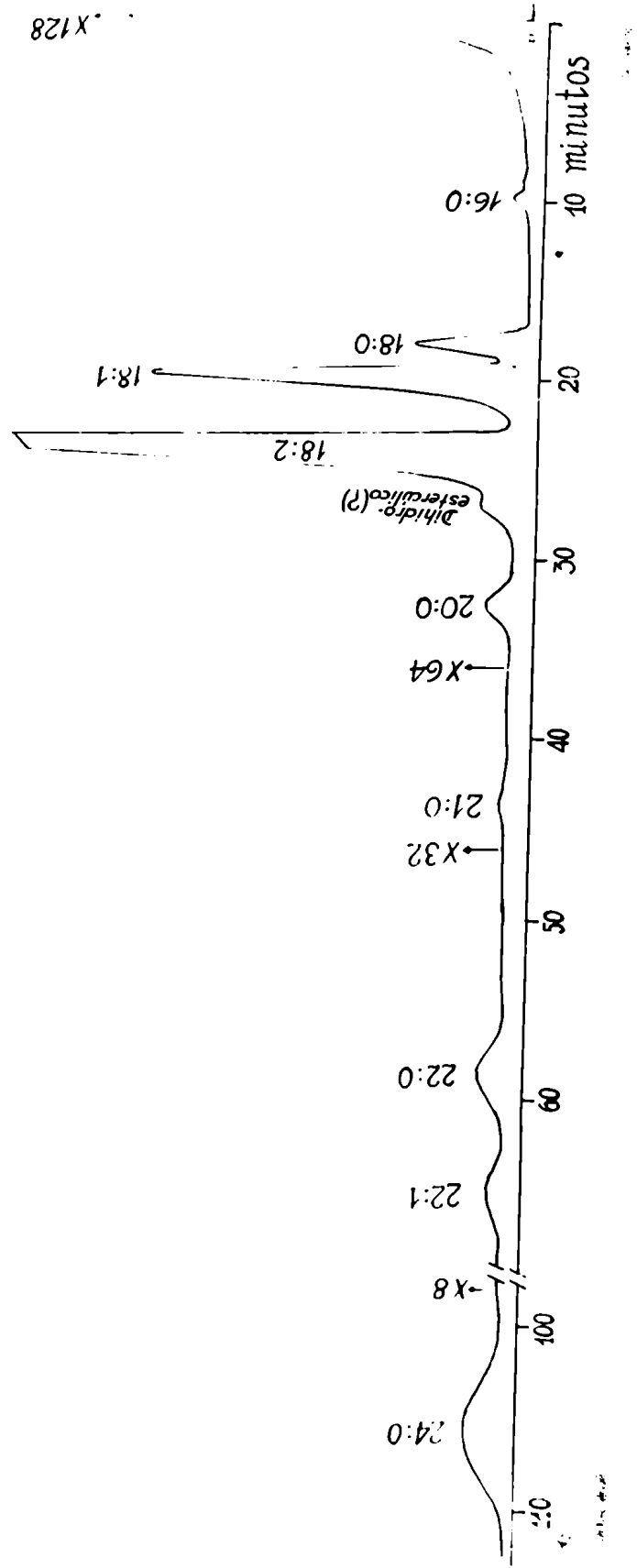


FIG. 8 - Residuo de destilación

CUADRO -9-

Composiciones acídicas de las fracciones de destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales del extracto en hexano (% de ácidos totales en fracción)

| Acido | Fracción | | | | | | Residuo |
|--------------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 12:0 | 0,4 | — | — | — | — | — | — |
| 14:0 | 16,1 | 3,1 | 0,2 | — | — | — | — |
| 15:0 | 1,0 | 0,2 | — | — | — | — | — |
| 16:0 | 74,4 | 87,9 | 89,9 | 31,2 | 3,9 | 0,9 | 0,5 |
| 17:0 | 0,3 | 0,3 | vest. | 0,2 | — | — | — |
| 18:0 | — | — | — | 1,1 | 1,8 | 2,6 | 6,7 |
| 20:0 | — | — | — | — | — | — | 2,1 |
| 21:0 | — | — | — | — | — | — | vest. |
| 22:0 | — | — | — | — | — | — | 1,1 |
| 24:0 | — | — | — | — | — | — | 0,8 |
| 15:1 | 0,3 | vest. | — | — | — | — | — |
| 16:1 | 7,5 | 8,5 | 7,3 | 0,2 | vest. | — | — |
| 17:1 | — | — | vest. | vest. | — | — | — |
| 18:1 | — | — | 0,5 | 15,3 | 23,6 | 25,9 | 25,3 |
| 22:1 | — | — | — | — | — | — | 1,0 |
| 18:2 | — | — | 2,1 | 52,0 | 70,7 | 70,6 | 55,5 |
| dihidro- estercúlico (?) | — | — | — | — | — | — | 0,8 |

CUADRO -10-Destilación fraccionada de ésteres metílicos de ácidos
totales del extracto en hexano

| Fracción Nº | Peso fracción (g) | Temperatura (°C) | | | Reacción de Halphen |
|----------------|-------------------------|------------------|---------|---------|---------------------------|
| | | Baño | Medio | Cabeza | |
| 1 | 0,52 | 205-210 | 187-188 | 90-115 | — |
| 2 | 1,06 | 210-210 | 188-190 | 115-120 | muy débil |
| 3 | 1,85 | 210-210 | 190-195 | 120-130 | débil |
| 4 | 3,32 | 210-223 | 195-203 | 130-145 | fuerte |
| 5 | 4,12 | 223-227 | 203-204 | 145-146 | fuerte |
| 6 | 5,80 | 227-240 | 204-238 | 146- ↓ | fuerte |
| Res. | 3,36 | — | — | — | débil |

Total recuperado 20,03 g. Puesto en balón 20,15 g. -
Presión 0,5-1,0 mm. Hg - Duración destilación 4 horas.

de Halphen débilmente positiva. Se concluye que la destilación fraccionada operada no provoca la destrucción, al menos total, de los ésteres metílicos de ácidos ciclopropenoicos en un proceso de 4 horas con temperaturas del baño de aceite entre 205 y 240°C.

Las composiciones particulares de cada fracción de destilación y los valores del Cuadro 10, permiten calcular la composición de los ésteres originales con los valores que figuran en el Cuadro 11 (% de ácidos totales). En consecuencia esta combinación de técnicas revela la presencia de pequeñas cantidades de los ácidos laúrico, pentadecanoico, heptadecanoico, araquídico, behénico, lignocérico, pentadecenoico, heptadecenoico, nonadecenoico y docosenoico, no indicados por la cromatografía directa.

La presencia del ácido nonadecenoico como componente del residuo de destilación surgió de observar un pequeño pico con tiempo de retención de 15,10 cm. (tiempo de retención relativo al oleato de metilo: 1,50) inmediatamente después del pico correspondiente al linoleato de metilo. Tal presencia debe descartarse desde que el cromatograma correspondiente al residuo hidrogenado, según Tiong y Waterman (71) mantiene el mismo pico con el mismo tiempo de retención y el mismo tiempo de retención relativo al oleato. Probablemente se trate de un ácido dihidroestercúlico ya señalado como posible por Raju y Reiser (32).

Los valores de composición encontrados por destilación fraccionada y CGL coinciden estrechamente en sus componentes comunes con los hallados por CGL directa. Asimismo,

CUADRO -11-

Composición acídica incluyendo componentes menores del extracto en hexano (x)

| Acido | % de ácidos | Acido | % de ácidos |
|-------|-------------|--------------------------------|-------------|
| 12:0 | 0,01 | 15:1 | 0,01 |
| 14:0 | 0,61 | 16:1 | 1,37 |
| 15:0 | 0,04 | 17:1 | vest. |
| 16:0 | 21,41 | 18:1 | 19,38 |
| 17:0 | 0,06 | 22:1 | 0,17 |
| 18:0 | 2,46 | 18:2 | 53,68 |
| 20:0 | 0,35 | dihidro- ostercúlico (?) | 0,13 |
| 21:0 | vest. | | |
| 22:0 | 0,19 | | |
| 24:0 | 0,13 | | |

(x) No se incluye 0,26% de ácidos ciclopropencicos totales evaluados sobre aceite bruto, equivalente a 0,28% sobre ácidos totales.

Indice de saponif. ésteres metílicos ácidos totales (det.) → 195,4
 " " " " " " " " (calc.) → 194,1

Indice de iodo ésteres metílicos ácidos totales (det.) → 109,1
 " " " " " " " " (calc.) → 110,6

el valor de índice de iodo calculado en base a estas composiciones 110,6 y 110,8 son concordantes con el determinado directamente sobre los ésteres de partida 109,1. El índice de saponificación calculado en base a la composición CGL es 194,1 siendo el valor determinado 195,4.

Método de determinación de fósforo lipídico

Bartlett (63) describe un método de valoración de fósforo total basado en una modificación de la técnica colorimétrica de Fiske y Subbarow, con la finalidad de aumentar su sensibilidad y facilitar los numerosos análisis en lípidos eluidos de columnas cromatográficas.

Este aumento de sensibilidad se logra a través de una mayor intensidad de color, que se consigue por calentamiento a 100°C operando por un tiempo de 7 minutos, efectuando luego la lectura a 830 m μ (7,2 veces mayor que el alcanzado en el método clásico a temperatura ambiente, con lectura a 660 m μ).

Ante la dificultad de conseguir agua oxigenada libre de fósforo (incorporado a la misma como agente estabilizante en forma de fosfatos), se impuso la necesidad de practicar la destrucción de la materia orgánica recurriendo a una calcinación de la muestra en presencia de un fijador (carbonato de sodio) y operando a 500-550°C en mufla. El fósforo orgánico se determina así como ortofosfato a continuación de la destrucción del material orgánico, de acuerdo a la técnica colorimétrica indicada por Bartlett.

Soluciones - Reactivos - Aparatos

CO_3Na_2 puro

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ cristalizado Baker's R.A.

$\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ p.a. Mallinckrodt, solución al 5% en agua destilada

Acido l-amino, 2-naftol, 4-sulfónico p.a. C. Erba

$(\text{NH}_2\text{C}_{10}\text{H}_5(\text{OH})\text{SO}_3\text{H})$

SO_3Na_2 puro, Merck

SO_3HNa anhidro puro, Merck

Tubos cónicos de centrifuga de aproximadamente 12 ml. de capacidad

Espectrofotómetro C. Zeiss, PMQ II.

Reactivo de Fiske - Subbarow - preparado por agregado de 0,5 g. del reductor (ác. l-amino, 2-naftol, 4-sulfónico) con agitación a 200 ml. de una solución fresca conteniendo 15% de SO_3HNa anhidro y 1 g. de SO_3Na_2 anhidro se filtra y guarda en frasco oscuro. Esta solución debe prepararse semanalmente.

Procedimiento para la calibración del método

Se prepara una solución "stock" de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ p.a. en agua destilada de concentración exactamente conocida, conteniendo 0,1100 g. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ en 250 ml. (1 ml. de esta solución "stock" equivale a 100,13 μg P).

Pipetear 1 ml. de esta solución "stock" y llevar a 50 ml. con agua destilada en matraz controlado. De esta solución diluída se miden exactamente una serie de alícuotas

en tubos de centrífuga, como para cubrir un rango desde 0,50 hasta 4,00 $\mu\text{g P}$ (0,25 a 2,00 ml.). En cada tubo se completan los volúmenes correspondientes a 2,00 ml. con agua destilada y se adicionan en forma sucesiva y agitando luego del agregado de cada reactivo: 0,5 ml. de SO_4H_2 10 N; 2,1 ml. de agua destilada; 0,2 ml. de solución molido al 5% y 0,2 ml. de reactivo de Fiske-Subbarow. El volumen total en cada tubo es de 5,0 ml. Se tapan los tubos con bolitas de vidrio y se calientan en baño de agua hirviendo por 7 minutos. Se registra la densidad óptica de las soluciones coloreadas así obtenidas, a 830 m μ utilizando cubas de vidrio de 1 cm. de espesor y agua destilada como referencia. Paralelamente se efectúa un blanco con los reactivos.

En concordancia con lo señalado por Bartlett, la intensidad del color producido fué proporcional a la concentración de fósforo en los standards, dentro del rango señalado (0,5 a 4,0 $\mu\text{g P}$), obteniéndose una recta al representar extinciones contra μg de fósforo en ensayo, tal como puede observarse en la Fig. 9. Esta recta permitió obtener los factores de transformación utilizados en los cálculos de estimación de fósforo en ensayos de recuperación y en muestras desconocidas por aplicación de un factor calculado según: $f = \frac{\mu\text{g P (standard)}}{D \cdot O}$ con anterioridad al desarrollo de la curva de ^{D.O.} calibrado, una muestra standard de la serie utilizada, sirvió para verificar la posición del máximo de extinción a 830 m μ .

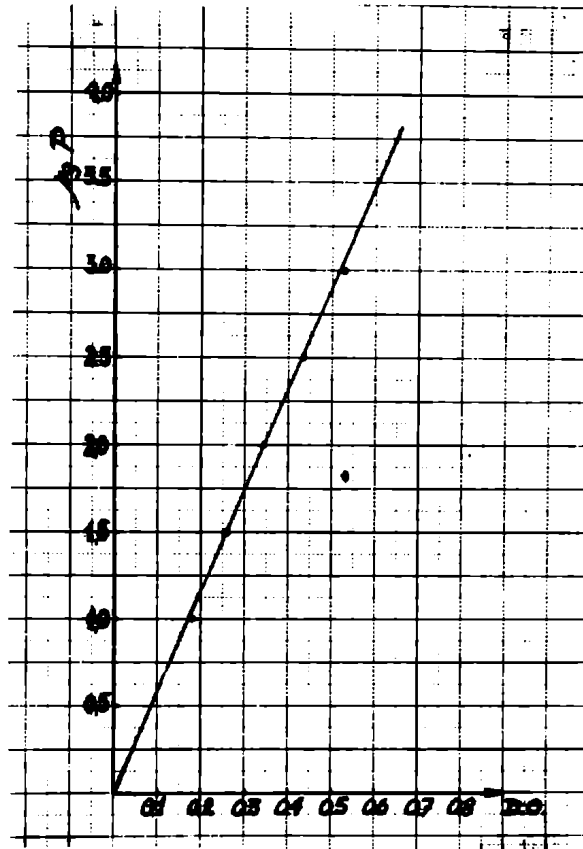


FIG. 9 - Curva standard de fósforo (método de Bartlett (D.O. a 830 mμ, cuba de 1 cm.)

| $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ sol. dil. (ml) | Fósforo (ug) | D.O. leída (promedio de duplicados) cuba 1 cm esp. |
|--|-----------------|---|
| 0,25 | 0,50 | 0,140 |
| 0,50 | 1,00 | 0,228 |
| 0,75 | 1,50 | 0,307 |
| 1,00 | 2,00 | 0,391 |
| 1,25 | 2,50 | 0,486 |
| 1,50 | 3,00 | 0,583 |
| 1,75 | 3,50 | 0,684 |
| 2,00 | 4,00 | 0,757 |

Ensayo en blanco (4,1 ml H_2O + reactivos) \rightarrow D.O. 0,047.

Procedimiento para la estimación de fósforo lipídico

a) Ensayo de recuperación

Solución "stock" de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 0,1050 g. de la solución en 250 ml. (1 ml. equivale a 95,58 $\mu\text{g P}$).

Solución diluída de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 1 ml. de la solución "stock" se lleva a 50 ml. con agua destilada (1 ml. solución diluída equivale a 1,91 $\mu\text{g P}$).

Técnica: 1 ml. de la solución a ser analizada (solución diluída) se coloca en cápsula de platino y agrega 0,3 ml. de una solución al 1% en agua de CO_3Na_2 . Evapora lentamente y luego calcina a 500-550°C en mufla. Las cenizas se toman con un total de 4,1 ml. de agua destilada trasvasándolas cuantitativamente a un tubo de centrífuga, donde se agregan en forma sucesiva los siguientes reactivos, cuidando homogeneizar bien la solución por agitación: 0,5 ml. SO_4H_2 10 N, 0,2 ml. solución molibdato de amonio al 5% y 0,2 ml. de reactivo de Fiske - Subbarow. Cubrir con una bolita de vidrio y calentar a baño de agua hirviente durante 7 minutos. Enfriar y leer en cubetas de vidrio de 1 cm. de espesor, en espectrofotómetro, usando agua destilada como referencia. Se ensaya un blanco paralelamente. Duplicados del ensayo sobre 1 ml. de muestra tipo, registraron las siguientes lecturas: 0,368 y 0,370 correspondiendo a un valor promedio de 1,92 μg de fósforo (valor teórico 1,91 $\mu\text{g P}$). Blanco: 0,038 - factor: 5,81.

b) Determinación sobre extracto en hexano

0,1015 g. del extracto en hexano, se disuelven en hexano y llevan a volumen de 50 ml. Se miden 2 ml. de esta solución en cápsula de platino, evapora el solvente y adiciona de 0,3 ml. de una solución al 1% de CO_3Na_2 . Lleva a sequedad y calcina en mufla a 500-550°C hasta obtener cenizas blancas (destrucción de materia orgánica). De acuerdo al procedimiento anteriormente descrito, se procede luego a la valoración colorimétrica de fósforo. Se registra una lectura de 0,222 D.O. a 830 m μ en cubeta de 1 cm. de espesor, correspondiendo al blanco un valor de 0,046 D.O. Utilizando el factor hallado a través de la curva de calibrado (5,53) se expresan el resultado como μg de fósforo total. El valor obtenido 0,97 μg , corresponde a un contenido de 0,024 de fósforo lipídico % de extracto en hexano original.

2.- Extracción de la Harina I con éter etílico

El total de Harina I se extrae por éter etílico en Soxhlet durante 24 horas obteniendo, luego de la eliminación del solvente a baño maría y secado en vacío de 5 mm. a 60°C 3,0178 g. de extracto (0,223% sobre "expeller" original). Se trata de un producto semi sólido, intensamente oscuro (pigmentos).

El bajo rendimiento en este extracto obliga a la obtención de mayores cantidades de Harina I ("expeller" agotado por hexano, que luego se reextrae con éter etílico en las condiciones recién señaladas). En total se logra

reunir 11,22 g. de extracto en este último solvente. El índice de iodo de este producto (Hanus) es 68,4. Como resultado del agotamiento de la Harina I por éter etílico resta una nueva harina que denominamos Harina II.

Saponificación - Insaponificable - Acidos totales

1,1492 g. de extracto en éter etílico se saponifican por reflujo en baño maría durante 30 minutos con 25 ml. de solución al 40% de hidróxido de potasio en etanol. Se diluye con 50 ml. de agua y extrae el insaponificable con éter etílico (4 extracciones con 100, 50, 50 y 50 ml.).

Se obtienen 0,1578 g. de insaponificable (13,7% sobre extracto en éter etílico). De la solución hidroalcohólica alcalina remanente reunida con los líquidos de purificación del insaponificable, por acidificación con SO_4H_2 (1:1) (he-liantina) y extracción por éter etílico, se aíslan 0,6956 g. de cuerpos acídicos (60,5% sobre extracto en éter etílico). Es evidente la distinta naturaleza de los lípidos aislados por éter etílico, desde que la suma de insaponificable más cuerpos acídicos representa tan solo el 74% de los lípidos originales del extracto.

Composición acídica - El total de cuerpos acídicos (0,6956 g.) se esterifican por reflujo (2 horas) con 20 ml. de metanol y 0,1 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Siguiendo el proceso ya descrito se aísla un total de 0,5175 g. de ésteres que se percolan por una columna de alúmina activada (éter etílico-metanol), obteniendo 0,4633 g. de ésteres que se vuelven a percolar por una columna idéntica,

obteniendo 0,4275 g. (37,2% sobre extracto original) de ésteres finales incoloros que se someten a un examen de composición acídica por CGL empleando las mismas condiciones y columna señaladas para el caso del extracto en hexano. El cromatograma de la Fig. 10 permite por triangulación, el cálculo de la composición acídica de estos ésteres que figura en el Cuadro 12.

CUADRO -12-

Composición acídica del extracto en éter etílico
(% de ácidos totales)

| | |
|--------------------------|-------|
| desconocido (?) _____ | 0,1 |
| desconocido (?) _____ | 0,1 |
| mirístico _____ | 0,9 |
| palmitico _____ | 25,6 |
| palmitoleico _____ | 3,2 |
| heptadecanoico _____ | 0,3 |
| heptadecenoico _____ | vest. |
| esteárico _____ | 3,3 |
| oleico _____ | 20,6 |
| linoleico _____ | 45,9 |
| dihidroestercúlico _____ | vest. |

Metanolisis - La técnica de metanolisis aplicada al caso del extracto en hexano (26) debió ser modificada en el sentido de asegurar la subsistencia de 0,1% de sodio (catalizador) sobre el metanol empleado. El extracto en éter etílico, en razón de su intensa coloración pardo-oscuro, presenta dificultades para la evaluación de su acidez titulable a la fenolftaleína (valor que es preciso

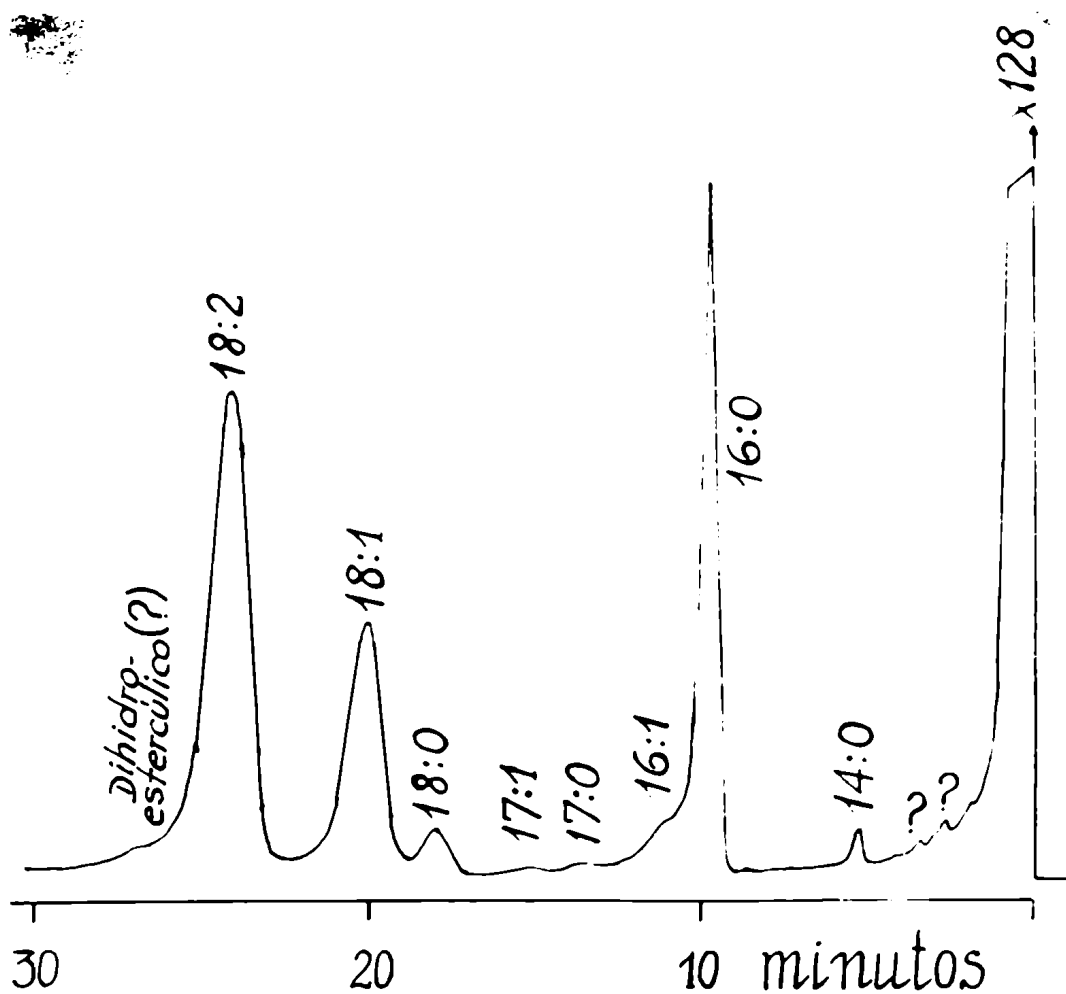


FIG. 10 - Extracto en éter etílico - Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales.

conocer para calcular la cantidad necesaria de sodio que satisfaga la concentración residual en exceso que permita la metanolisis).

La técnica usada fué la siguiente:

8,197 g. de extracto en éter etílico se hierven a reflujo en baño maría con 80 ml. de metanol anhidro hasta máxima disolución. Se enfría y de a pequeñas porciones se añade solución 0,5 N de metilato de sodio en metanol absoluto hasta observar reacción alcalina a la fenolftaleína (placa de toque, conteniendo gotas de agua destilada fenolftaleína y gotas del líquido en ensayo). Se vuelve a hervir a reflujo por 15 minutos y verifica, por el mismo sistema, que la reacción es alcalina. Se añaden 0,08 g. de sodio metálico (0,1% respecto del metanol) y se hierve a reflujo por 30 minutos. se enfría, diluye con igual volumen de agua, acidifica con ácido clorhídrico (1:3) (placa de toque, heliantina) y extrae por éter etílico (3 extracciones con 100, 50 y 50 ml.). Los extractos reunidos se lavan con agua (eliminación de acidez clorhídrica), agrega solución diluída de hidróxido de potasio en etanol, hasta reacción alcalina a la fenolftaleína (eliminación de cuerpos ácidos no esterificados), lava con agua, trata por SO_4Na_2 anhidro y recupera el solvente a baño maría. El residuo, tomado por éter de petróleo (30-60°C) se filtra de un insoluble floculento, recupera el solvente del filtrado a baño maría y lleva a constancia de peso a 60°C y 5 mm. Se obtienen 3,4354 g. de un líquido oscuro que se percola por una primera columna de alúmina activada (éter etílico-metanol) obteniendo 2,7533 g. de producto que, por pasaje

por una columna idéntica rinde 2,6350 g. de producto aún coloreado.

Este total se percola por columna de alúmina activada (éter de petróleo) obteniendo 1,6520 g. de producto final, prácticamente incoloro (la merma significativa ocurrida en esta última percolación debe atribuirse a una fuerte retención de compuestos del insaponificable presente, al emplearse éter de petróleo como eluente).

Reacción de Halphen - 0,15 g. del producto final de la metanolisis se adicionan 0,20 ml. de reactivo de Halphen, practicando la reacción según (67) se obtiene resultado netamente positivo.

Contenido en ácidos ciclopropenoicos

Operando en semi-micro escala sobre el producto final de la metanolisis, se practican dos titulaciones con los siguientes detalles.

| <u>Peso muestra</u> | <u>equivalente BrH como ácido malválico %</u> | |
|---------------------|---|--------------------------|
| | 55°C | |
| | <u>ml</u> | <u>% ésteres finales</u> |
| 0,6336 | 0,09 | 0,16 |
| 0,7904 | 0,12 | 0,20 |
| | | } prom. 0,18 % |

Reactivo titulante: BrH-CH₂COOH 0,06154 N - blanco: 0,03 ml - Las titulaciones a 3°C no consumen reactivo - En los cálculos se consideró la corrección por el ensayo en blanco.

La determinación de ácidos ciclopropenoicos sobre el producto resultante de la metanolisis luego de tres perco-

-laciones por columna de alúmina conduce, según lo anterior, a un valor promedio de 0,18% en ácido malválico sobre tal producto. La merma entre los rendimientos de productos resultantes de la 2º y 3º percolación (0,983 g.) ha sido atribuida a insaponificable (dada la naturaleza del eluente) y representa un 12% sobre extracto en éter etílico original (cifra próxima al de 13,7% que corresponde al insaponificable total determinado por saponificación del extracto en éter etílico).

Por tanto, el producto final sometido a valoración de ácidos ciclopentóicos estaba constituido por ésteres que, referidos a extracto en éter etílico original, representan el 20,2%. Los ésteres obtenidos por esterificación con metanol y ácido sulfúrico sobre los cuerpos acídicos totales del extracto, luego de percolaciones por columnas de alúmina representan el 37,2% de dicho extracto. La diferencia: $37,2 - 20,2 = 17,0\%$ debe atribuirse a la presencia en el extracto original de ácidos grasos libres no transformables en ésteres en un proceso de metanolisis. Si se admite que la composición acídica de estos últimos es similar a la de los ésteres obtenidos por metanolisis y teniendo en cuenta que el contenido de estos últimos en ácido malválico es de 0,18% se calcula un contenido final en ácido malválico de 0,067 % sobre el extracto en éter etílico original. Esta cifra, referida a "expeller" original (100 partes de "expeller" rinden 0,223 de extracto en éter etílico) representa el 0,00015% en ácido malválico, valor extraordinariamente bajo.

Determinación de fósforo lipídico sobre extracto en éter etílico.

0,0710 g. de extracto en éter etílico, se disuelven en éter etílico y llevan a volumen de 50 ml., 5 ml. de esta solución se diluyen nuevamente a 25 ml. con éter etílico.

Sobre 2 ml. de ésta última solución se practica la valoración de fósforo de acuerdo a la técnica detallada para el caso del extracto en hexano, registrándose una lectura de 0,410 D.O. a 830 m μ en cubeta de 1 cm. de espesor (blanco: 0,042 D.O.; f = 5,75). El valor obtenido 2,12 μ g P corresponde a un contenido de 0,373 de fósforo lipídico % de extracto en éter etílico original.

3.- Extracción de la Harina II con mezcla cloroformo-metanol-agua

En la Discusión de la Parte Experimental se ha hecho referencia a la influencia del grado de humedad de una harina de algodón sobre la estabilidad de las "glándulas" que contienen pigmentos. Por tanto, con el fin de asegurar la destrucción de tales glándulas, liberación de pigmentos y lípidos que puedan contener, se procede al agotamiento de la Harina II según el método de Lyons y Lippert (59) con mezcla $\text{Cl}_3\text{CH} : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ en la relación de 10:20: 7,6 en volumen.

El total de Harina II obtenida luego del agotamiento por éter etílico, operando en fracciones de 350 g. por vez, se estaciona a temperatura ambiente y por 24 horas con una

mezcla de 850 ml. de Cl_3CH , 1.700 ml. de CH_3OH y 650 ml. de H_2O , agitando periódicamente. Al cabo, se filtra a la trompa de agua, lavando el insoluble con 200 ml. de la mezcla anterior. El insoluble se deja secar al aire en capa delgada y constituye la Harina III.

Los filtrados reunidos se añaden de 840 ml. de agua y decanta por 24 horas. La capa superior se descarta y la inferior (clorofórmica) se lava en ampollas con solución acuosa de sulfato de sodio, filtra, recupera el cloroformo a baño maría y toma el residuo por éter etílico. Se filtra, recupera el éter por destilación y lleva a constancia de peso a 60°C y 5 mm. En total se obtienen 11,826 g. (0,88% sobre "expeller" original) de lípidos de aspecto semi sólido e intensamente pardo-oscuros, de índice de iodo (Hanus) 70,7.

Saponificación - Insaponificable - Ácidos totales

8,345 g. de los lípidos aislados se saponifican por reflujo durante 1 hora con 100 ml. de potasa alcohólica al 40%. Se enfría, diluye con 200 ml. de agua y extrae el insaponificable con éter etílico (5 extracciones con 100 ml. por vez). De los extractos etéreos reunidos se aíslan 0,7144 g. de insaponificable (8,56% sobre lípidos totales).

Los líquidos hidroalcohólicos alcalinos reunidos con los de purificación del insaponificable se acidifican (heliantina) y con ácido sulfúrico (1:1) extrayendo los cuerpos acídicos con éter de petróleo ($30-60^\circ\text{C}$) (5 extracciones con 100 ml. por vez). De los líquidos etéreos reunidos,

lavados con agua, tratados por sulfato de sodio anhidro y luego de recuperar el solvente a baño maría, se aislan 4,094 g. de cuerpos acídicos solubles en éter de petróleo (49,06% sobre lípidos totales de este extracto) luego de llevar a constancia de peso a 60°C y 5 mm.

Los líquidos alcalinos residuales se agotan por éter etílico (4 extracciones con 100 ml. por vez) obteniendo, en iguales condiciones 0,4944 g. de cuerpos acídicos extraíbles por éter etílico (5,92% sobre lípidos totales). El insaponificable es amarillo y ceroso, los cuerpos acídicos extraídos por éter de petróleo son más claros y fluídos que los extraídos por éter etílico. La suma de cuerpos acídicos e insaponificable (63-64%) señala, al igual que en el caso de éter etílico, una distinta naturaleza de los lípidos componentes respecto del extracto en hexano.

Composiciones acídicas - Los totales de cuerpos acídicos aislados, por extracción con éter de petróleo (4,094 g.) y por éter etílico (0,4944 g.) se esterifican con metanol y ácido sulfúrico concentrado, empleando un mínimo de 10 veces esos pesos de metanol absoluto conteniendo 1% en peso de ácido sulfúrico concentrado. Siguiendo la técnica ya expuesta, se aislan 3,7928 g. de ésteres metílicos para el primer caso y 0,2784 g. para el segundo.

Los ésteres metílicos procedentes de los ácidos extraídos por éter de petróleo se percolan por alúmina activada (éter etílico-metanol) recuperando 3,5522 g. de ésteres de color verdoso, sobre los que se practica un examen CGL con la misma columna y condiciones ya mencionadas para ca-

-sos anteriores. Se obtiene el cromatograma de la Fig. 11 que por triangulación conduce a la composición acídica del Cuadro 13.

Los ésteres metílicos de los cuerpos acídicos extraídos por éter etílico (0,2784 g.) se percolan por dos veces por columna de alúmina activada (éter etílico-metanol) obteniendo 0,2038 g. de producto final de color ligeramente amarillo-pardo. Sobre éstos se practica un examen por CGL en las condiciones ya mencionadas obteniendo el cromatograma de la Fig. 12 que por triangulación conduce a la composición acídica mencionada en el Cuadro 14.

Metanolisis - Dadas las características del extracto en mezcla $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ debió recurrirse a la técnica de metanolisis modificada para el caso del extracto en éter etílico. 3,4142 g. de extracto se hierven a reflujo con 50 ml. de metanol anhidro hasta máxima disolución. Se enfría y de a pequeñas porciones se añade solución 0,5 N de metilato de sodio en metanol anhidro hasta observar reacción alcalina a la fenolftaleína (placa de toque). Se lleva a ebullición por tres minutos y verifica, luego de enfriamiento, que la reacción es aún alcalina. Se añaden 0,06 g. de sodio metálico y se hierve a reflujo por 30 minutos. Se enfría, diluye con igual volumen de agua, acidifica (piedra de toque, heliantina) con ácido clorhídrico (1:3) y extrae con éter etílico por 3 veces (100,50 y 50 ml.). Los extractos étercos reunidos se lavan con agua, neutralizando la acidez libre residual con solución diluída de hidróxido de potasio en etanol (fenolftaleína). Se lava con agua, trata con sulfato de sodio anhidro y recupera

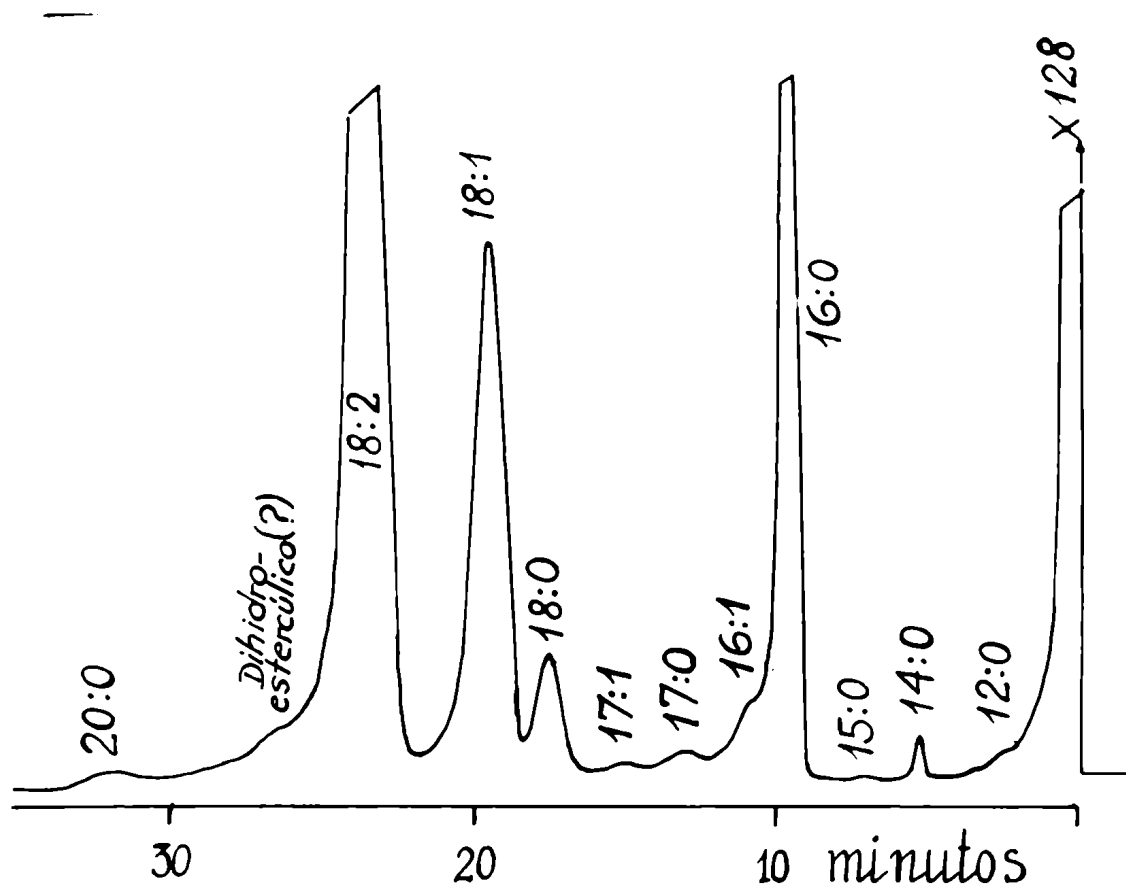


FIG. 11 - Extracto en mezcla $\text{CCl}_3\text{H} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ - Cromatografía gas-líquido de los ³ésteres metílicos de los ácidos extraídos por éter de petróleo.

CUADRO -13-

Composición acídica del extracto en mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ -
Esteres de ácidos extraídos por éter de petróleo
 (% de ácidos totales)

| | |
|-------------------------------------|-------|
| láurico _____ | vest. |
| mirístico _____ | 0,5 |
| pentadecanoico _____ | vest. |
| palmitico _____ | 22,5 |
| palmitoleico _____ | 2,3 |
| heptadecanoico _____ | 0,2 |
| heptadecenoico _____ | vest. |
| esteárico _____ | 3,9 |
| oleico _____ | 20,1 |
| linoleico _____ | 50,3 |
| dihidroestercúlico (?) _____ | vest. |
| araquídico _____ | 0,2 |
| $\text{C}_{22}-\text{C}_{24}$ _____ | vest. |

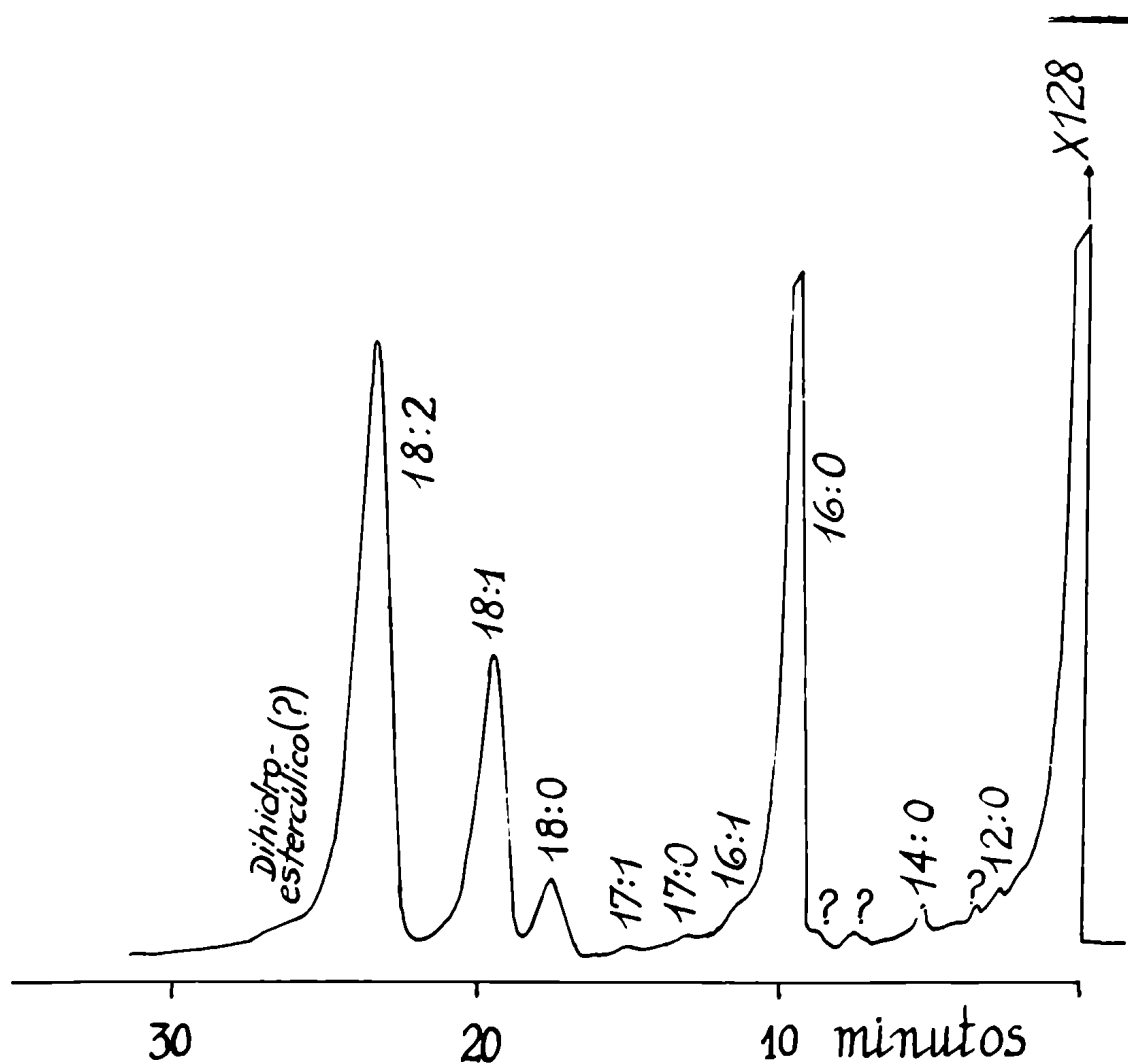


FIG. 12 - Extracto en mezcla $\text{CCl}_4 + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ - Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos extraídos por éter etílico.

CUADRO -14-

Composición acídica del extracto en mezcla $\text{Cl}_3\text{CH:CH}_3\text{OH:H}_2\text{O}$ -
Esteres de ácidos extraídos por éter etílico
 (% de ácidos totales)

| | |
|-------------------------------------|-------|
| láurico _____ | 0,1 |
| desconocido (?) _____ | 0,1 |
| mirístico _____ | 0,6 |
| desconocido (?) _____ | 0,2 |
| desconocido (?) _____ | 0,3 |
| palmitico _____ | 29,1 |
| palmitoleico _____ | 1,8 |
| heptadecanoico _____ | 0,1 |
| heptadecenoico _____ | vest. |
| esteárico _____ | 4,3 |
| oleico _____ | 19,3 |
| linoleico _____ | 44,1 |
| dihidroestercúlico (?) _____ | vest. |
| $\text{C}_{20}\text{-C}_{24}$ _____ | vest. |

el solvente a baño maría. El residuo se toma por éter de petróleo (30-60°C), filtra de un insoluble y del filtrado se recupera el solvente a baño maría llevando a peso constante a 60°C y 5 mm. Se obtienen 1,2786 g. de producto que se percola por una columna de alúmina activada (éter etílico-metanol) obteniendo 1,1690 g. de producto que se vuelve a percolar por alúmina activada (éter de petróleo) obteniendo finalmente 0,9172 g. de un producto prácticamente incoloro.

Reacción de Halphen

a) Esteres de ácidos extraídos por éter de petróleo

3,3024 g. del producto ya percolado por columna de alúmina (éter etílico-metanol, ver Composición acídica), se percolan por una columna de alúmina activada obteniendo 2,4700 g. de un producto, prácticamente incoloro. Se practica una reacción de Halphen sobre 0,2 g. de este producto observando una coloración rosada neta (ensayo positivo).

b) Esteres de ácidos extraídos por éter etílico

Se realiza un ensayo de Halphen sobre 0,15 g. del producto obtenido luego de 3 percolaciones en columna de alúmina activada, observando resultado negativo, luego de dos horas de calentamiento (110-115°C).

c) Producto de metanolisis

Sobre 0,1 g. del producto obtenido luego de percolación por ambos tipos de columnas, se practica un ensayo

de Halphen con resultado positivo.

Contenido en ácidos ciclopropenoicos

Operando sobre el producto de la metanolisis sometido a dos percolaciones por columna de alúmina activada empleando ambos tipos de eluentes (ver Metanolisis) se procede a la valoración empleando la semi-micro técnica de acuerdo al siguiente detalle:

| Peso muestra (g) | equivalente BrH como ácido malválico % | |
|------------------|--|-------------------|
| | 55°C | |
| | ml | % ésteres finales |
| 0,7278 | 0,06 | 0,046 |

Reactivo titulante: BrH-CH₃COOH 0,06095 N

blanco: 0,04 ml - La titulación a 3°C

no consume reactivo - Se corrige por el ensayo en blanco

El valor de 0,046% sobre ésteres finales empleados en la titulación corresponde a 0,012% expresado sobre extracto original en mezcla Cl₃CH:CH₃OH:H₂O. Al igual que en el caso del éter etílico ocurre que el proceso de metanolisis no transforma en ésteres los ácidos grasos originalmente libres.

En la obtención del producto de metanolisis sobre el cual se realiza la valoración de ácidos ciclopropenoicos ocurren dos percolaciones por alúmina activada (ver Metanolisis). La merma que sucede entre lo recuperado en ambas percolaciones (1,1690 - 0,9172 = 0,2518 g.) debe atribuírse a insaponificable retenido en la alúmina con éter de

petróleo como eluente (esta merma representa el 7,4% referido a extracto original, siendo el contenido en insaponificable 8,5%). De ahí que el producto sometido a valoración de ácidos ciclopropenoicos se considera totalmente formado por ésteres (0,9172 g. producidos por 3,4142 g. de extracto original; 26,8% del extracto original).

Sin embargo el contenido en ésteres expresado % de extracto original logrado por esterificación de los ácidos libres de insaponificable y por saponificación del extracto original, luego de las correspondientes percolaciones por alúmina, es 31,8%. Refiriendo a este último porcentaje se encuentra un contenido del extracto original en ácido malválico de 0,015%. Esta cifra referida a "expeller" original (100 partes de "expeller" rinden 0,88 partes de extracto en mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) representa el 0,00013% en ácido malválico, valor que al igual que en el caso del extracto en éter etílico es extraordinariamente bajo.

Determinación de fósforo lipídico sobre extracto en mezcla de $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$

0,1284 g. del extracto en $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en éter etílico y llevan a volumen de 50 ml. 1 ml. de esta solución se vuelve a llevar a volumen de 25 ml. con éter etílico. La determinación de fósforo, se practica por duplicado y de acuerdo a la técnica anteriormente descripta para extracto en hexano, sobre 2 ml. de la última solución obtenida. Se observan los siguientes valores leídos a 830 μ y en cubetas de 1 cm. de espesor: 0,560 y 0,532 D.O. (blanco: 0,042 D.O.; $f = 5,60$) que expresados como fósforo representan

respectivamente 2,91 y 2,74 μ g, correspondiendo a un contenido promedio: de 1,37 de fósforo % de extracto en mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ original.

4.- Saponificación de la Harina III con potasa alcohólica

El agotamiento del "expeller" original por hexano, éter etílico y mezcla cloroformo-agua-metanol, proporciona 1,276 g. de Harina III secada al aire. Fué propósito mostrar que la Harina III contiene lípidos residuales, a través del aislamiento de nuevas cantidades de ácidos grasos luego de un drástico proceso de saponificación.

A tal fin y mediante una adaptación de la técnica de Szutowicz (60) 400 g. de Harina III se hierven a reflujo por 1 hora con 4 litros de solución de hidróxido de potasio al 6% en etanol. Se enfría y acidifica a la heliantina (piedra de toque) con ácido sulfúrico (1:1), observándose fuerte desprendimiento de ácido sulfhídrico. Por centrifugación se separa la fase líquida, lavando el sólido por centrifugación con un litro de etanol. Los líquidos alcohólicos reunidos se diluyen con tres litros de agua y extraen en ampollas de decantación por tres veces con éter de petróleo (30-60°C) (700 ml. cada vez). Los extractos etéreos reunidos se lavan con agua, tratan con sulfato de sodio anhidro, recupera el solvente a baño maría y lleva a constancia de peso a 60°C y 5 mm. Se obtienen 0,7186 g. de lípidos totales (0,179% sobre Harina III) equivalentes a 0,17% sobre "expeller" original.

Resolución en ácidos grasos e insaponificable

El total de lípidos obtenidos (0,7186 g.) se disuelve en 7,2 ml. de potasa alcohólica al 40%, agrega 30 ml. de etanol y 60 ml. de agua, extrayendo el insaponificable con 4 extracciones de éter etílico (50 ml. por vez). Se obtienen 0,2532 g. de insaponificable de índice de iodo 30,0, equivalentes a 35,2% sobre lípidos totales de esta saponificación. Los líquidos alcohólicos alcalinos reunidos con los de purificación de insaponificable se acidifican con ácido sulfúrico (1:1) (heliantina) extrayendo los cuerpos acídicos con éter etílico.

Se obtienen 0,4654 g. de cuerpos acídicos (64,8% sobre lípidos totales). Se verifica que la suma de cuerpos acídicos más insaponificable conforman el 100% del extracto resultante de la saponificación.

Composición acídica - El total de cuerpos acídicos (0,4654 g.) se esterifican con 10 ml. de metanol y 0,05 ml. de ácido sulfúrico concentrado por reflujo durante 1 hora aislando finalmente 0,4190 g. de ésteres metílicos que se percolan por alúmina activada (éter etílico-metanol). Se recupera 0,8787 g. de ésteres ligeramente amarillos y de aspecto ceroso.

Empleando las mismas condiciones y columna ya mencionada, se practica un ensayo por CGL obteniendo el cromatograma de la Fig. 13, en el que aparecen semisuperpuestos dos picos después del correspondiente al linoleato de metilo en principio atribuidos a linolenato y araquidato de

metilo.

Para esclarecer este punto se obtiene un cromatograma de estos ésteres previa hidrogenación según (71) que muestra la desaparición del pico atribuido a linolenato y en el que persiste el señalado como araquidato de metilo. En ambos cromatogramas aparece un pico ya indicado en casos anteriores que probablemente corresponde a dihidroesterulato de metilo.

El Cuadro 15 muestra los valores de composición acídica de estos ésteres.

Reacción de Halphen - Aunque la drasticidad del proceso de saponificación operado hace presumir la destrucción de probables compuestos ciclopropenoicos (la evolución marcada de ácido sulfhídrico observada al acidificar la solución alcalina importa la formación de compuestos irreversibles entre éste y agrupaciones ciclopropenicas), se realiza un ensayo de Halphen sobre los ésteres metílicos finales, con resultado negativo.

Con el fin de disminuir las drásticas condiciones de saponificación se intenta, operando sobre Harina III un proceso de metanolisis.

400 g. de Harina III se llevan a constancia de peso a 60°C en estufa de vacío, obteniendo 332 g. de Harina III seca. Se añade un litro de metanol anhidro y un gramo de sodio metálico hirviendo a reflujo por 30 minutos. Se enfría y ensaya con piedra de toque a la fenolftaleína con

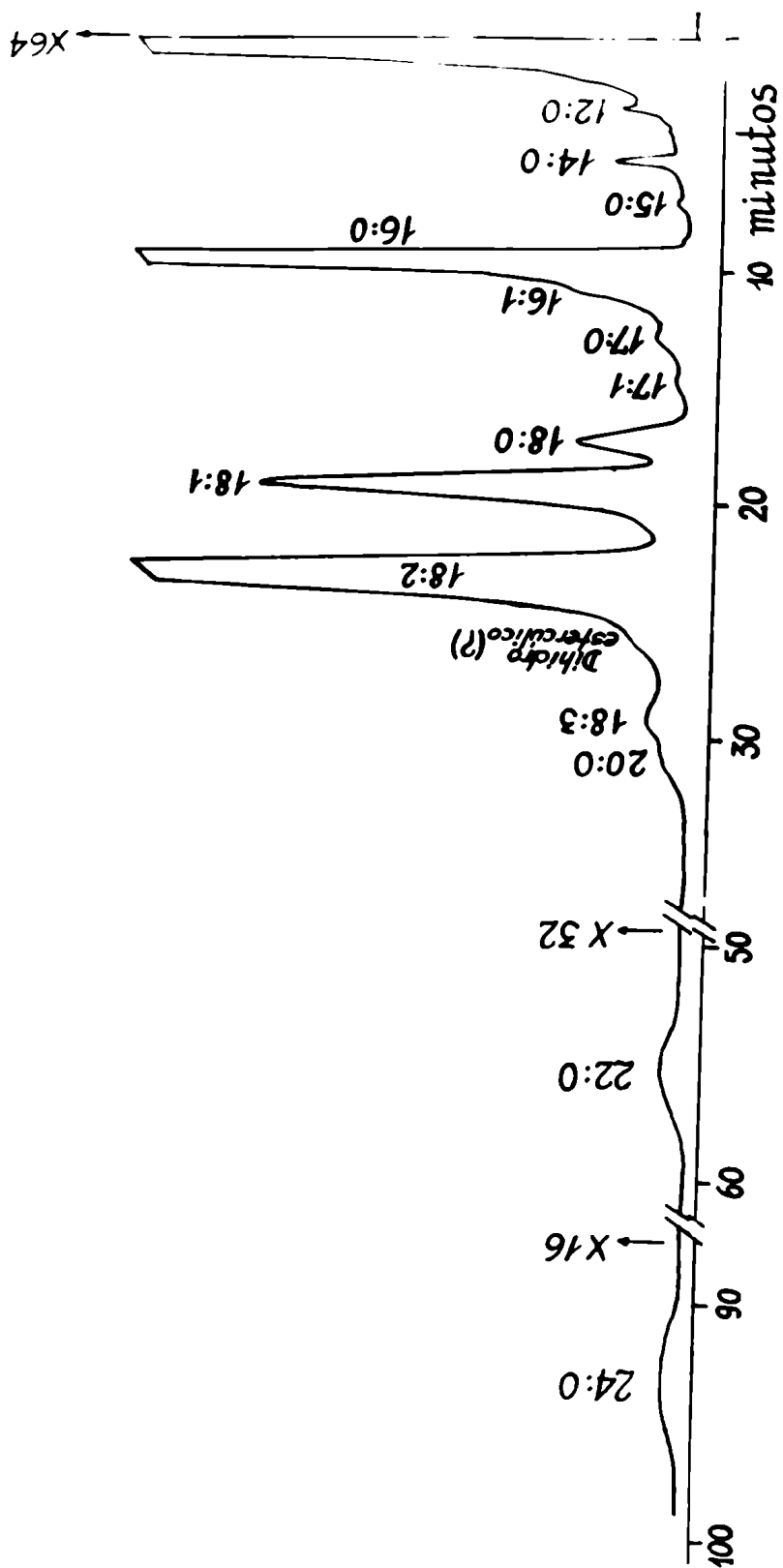


FIG. 13 - Saponificación de Harina III - Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales aislados.

CUADRO -15-

Composición acídica del producto aislado por saponificación
de la Harina III
 (% de ácidos totales)

| | |
|------------------------------|-------|
| láurico _____ | 0,2 |
| mirístico _____ | 0,8 |
| pentadecanoico _____ | 0,1 |
| palmitico _____ | 26,8 |
| palmitoleico _____ | 5,1 |
| heptadecanoico _____ | 0,3 |
| heptadecenoico _____ | 0,1 |
| estéarico _____ | 4,2 |
| oleico _____ | 18,4 |
| linoleico _____ | 40,8 |
| dihidroestercúlico (?) _____ | vest. |
| linolénico _____ | 1,0 |
| araquídico _____ | 0,8 |
| behénico _____ | 1,4 |
| lignocérico _____ | vest. |

resultado negativo. Se añaden dos gramos de sodio metálico y refluja por 30 minutos, se enfría y ensaya nuevamente sin verificar reacción alcalina. Se añaden otros dos gramos de sodio, refluja 30 minutos, enfría y verifica alcalina a la fenolftaleína. Se separa el líquido por centrifugación, lavando el insoluble por centrifugación con un litro de metanol. Los líquidos reunidos se diluyen con igual volumen de agua, acidifican con ácido clorhídrico (1:1) (fenolftaleína), observando desprendimiento de sulfhídrico. Se extrae tres veces (500 ml. por vez) con éter etílico. Los extractos etéreos se lavan con agua, tratan con sulfato de sodio anhidro, recupera el solvente al baño maría. El residuo, tomado con éter de petróleo, se filtra de un insoluble, recupera el solvente y elimina las últimas trazas en corriente de nitrógeno. Se obtienen 0,4873g. de un producto que se percola por alúmina activada (éter etílico-metanol) obteniendo 0,4308 g. de un producto amarillo intenso que percolado por alúmina activada (éter de petróleo) rinde 0,2910 g. de producto incoloro, sobre el que se practica reacción de Halphen.

Al cabo de la reacción se observa tonalidad pardorrojiza que se interpreta como muy levemente positiva.

PARTE -IV-

Resumen

Y

Conclusiones

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1) Se presenta una revisión acerca de la ocurrencia de ácidos ciclopropenoicos naturales, de sus propiedades físicas y químicas, de su identificación como agentes causales del ensayo colorimétrico de Halphen, métodos químicos e instrumentales de determinación y significación biológica.
- 2) Al presente la toxicidad de tortas, "expellers" y harinas de semilla de algodón, se atribuye principalmente a sus contenidos en gossipol. El conocimiento actual de las acciones biológicas de los ácidos ciclopropenoicos, presenta el problema de establecer el contenido residual en tales ácidos de aquellos productos. En tal sentido se presenta un estudio tendiente a la determinación de la concentración en ácidos ciclopropenoicos de un "expeller" de semilla de algodón de producción nacional.
- 3) Con carácter previo se decide emplear, como técnica de valoración de tales ácidos, la titulación con ácido bronhídrico en medio no acuoso. La macro-técnica hasta ahora descrita se adapta a semi-microescala, con análogas exigencias de reproducibilidad y sensibilidad. Se prueba por determinaciones simultáneas con la macro-técnica sobre un mismo aceite de algodón refinado y sobre aceite de algodón crudo, la bondad de la semi micro-técnica adoptada.

- 4) Se confirma que se obtienen los mismos valores de contenido en ácidos ciclopropenoicos operando sobre aceites de algodón crudos y sobre sus ésteres metílicos (por metanolisis), ambos previamente liberados de interferentes por percolaciones sobre alúmina activada, empleando en forma sucesiva metanol-éter etílico y éter de petróleo como eluentes, siempre que los resultados finales se refieran a aceite original.

- 5) Operando sobre ésteres metílicos de ácidos totales de aceite de algodón obtenidos por esterificación con CH_3OH y SO_4H_2 como catalizador (un mínimo de 10 veces el peso de ácidos en esterificación de metanol anhidro conteniendo 1% en peso de SO_4H_2 (concentrado)), no se ha observado destrucción de ácidos ciclopropenoicos en las condiciones operadas. Estos resultados contradicen otros registrados en la literatura.

- 6) Operando sobre "expeller" y a los fines perseguidos se decide su agotamiento sucesivo con hexano técnico (aceite seminal residual), éter etílico (pigmentos, fosfátidos, glicéridos) y mezcla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (10:20:7,6 en volumen) (pigmentos y fosfátidos), esta última provocando la rotura de glándulas de pigmentos con liberación de éstos y otros materiales. Se prueba que la harina resultante de estas extracciones sucesivas (Harina III) aún contiene lípidos. En efecto, sometida a un drástico proceso de saponificación con potasa alcohólica permite aislar, por acidificación y extracción con éter de petróleo, una mezcla de ácidos grasos e insaponificable.

Se pudo probar:

- a) que los distintos extractivos, expresados en % de "expeller" original tal cual son:

| | |
|---|-------|
| Hexano _____ | 10,09 |
| Eter etílico _____ | 0,22 |
| Mezcla ($\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) _____ | 0,88 |
| Por saponificación de Harina III _____ | 0,17 |

- b) que los contenidos en ácidos ciclopropenoicos de los tres primeros extractivos, expresados en ácido malválico % de cada extractivo (determinados por titulación semi-micro con BrH, luego de eliminación de interferentes) son:

| | |
|---|-------|
| Hexano _____ | 0,26 |
| Eter etílico _____ | 0,067 |
| Mezcla ($\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) _____ | 0,015 |

El contenido particular en tales ácidos de la mezcla de ácidos grasos e insaponificable aislada por saponificación de la Harina III previamente agotada por los demás solventes no se determina, por dar ensayo negativo de Halphen (ausencia o destrucción de ácidos ciclopropenoicos presentes por interacción con ácido sulfhídrico liberado por acidificación luego de la saponificación).

- c) que los contenidos en ácido malválico así encontrados, expresados % de "expeller" original tal cual,

como provenientes de cada extractivo son:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Hexano _____ | 0,026 |
| Eter etílico _____ | 0,00015 |
| Mezcla ($Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$) _____ | 0,00013 |

Se concluye que el 98,9% de los ácidos ciclopropenoicos totales presentes en el "expeller" provienen del extractivo en hexano (aceite seminal residual).

- d) que el contenido en ácidos ciclopropenoicos totales del "expeller" (263 p.p.m.) resulta ser 85 veces mayor que el contenido en ácidos ciclopropenoicos del mismo "expeller" previamente agotado por hexano (3.1 p.p.m.).
- 7) Los contenidos en fósforo lipídico de los distintos extractivos, expresados en fósforo % de los mismos, son:

| | |
|---------------------------------------|-------|
| Hexano _____ | 0,024 |
| Eter etílico _____ | 0,373 |
| Mezcla ($Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$) _____ | 1,370 |

Estos valores relacionados con los contenidos en ácidos ciclopropenoicos % de cada extractivo muestran que a mayor contenido en fósforo lipídico ocurre menor contenido en ácidos ciclopropenoicos. Esta observación sugiere la conveniencia de estudiar si los fosfolípidos de semillas de plantas cuyos aceites son ricos en ácidos ciclopropenoicos (Sterculia foetida), contienen o no tales ácidos como componentes normales, tema a desarrollar.

8) Los insaponificables aislados de los extractivos en hexano, éter etílico, mezcla $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$, los procedentes de la saponificación de la Harina III y los separados de aceites de algodón crudos o refinados, dan siempre ensayos negativos de Halphen. Ello prueba que los insaponificables de aceites de algodón y los procedentes del aislamiento de otros lípidos de esta semilla, no contienen agrupaciones ciclopropénicas.

9) Los ésteres metílicos de los ácidos totales contenidos en cada extractivo libres de insaponificables, han sido examinados por CGL en sus composiciones acídicas. Se pudo establecer:

a) que la composición acídica (% de ácidos totales) del extractivo en hexano (aceite seminal residual) presenta valores característicos de aceites de semilla de algodón de producción nacional, registrados en la literatura. La CGL señala, además, vestigios de ácido heptadecanoico y de un ácido (cuyo tiempo de retención para el éster metílico es análogo al del nonadecenoato de metilo). Este componente, que persiste por hidrogenación, es probablemente ácido dihidroestercúlico (mencionado en la literatura como tal).

b) que las composiciones acídicas de los extractivos en éter etílico y mezcla $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ presentan los mismos componentes que el extractivo en hexano, con algunas variaciones de concentración (me-

-nores contenidos en ácido linoleico y mayores en palmítico). Además, vestigios de ácidos láurico, pentadecanoico, heptadecanoico, heptadecenoico, dihidroestercúlico y ácidos saturados en C₂₀ a C₂₄.

c) que los ácidos totales separados por saponificación de la Harina III son los de menores valores en ácido linoleico conteniendo, además, alrededor de 1% de ácido octadecatrienoico.

10) Por adecuada combinación de la destilación fraccionada en vacío de los ésteres metílicos de los ácidos totales libres de insaponificable del extractivo en hexano (aceite seminal residual) y CGL de cada fracción de destilación, se ha establecido la composición acídica incluyendo otros componentes en el orden de trazas o bajas concentraciones que incluyen: ácido láurico, pentadecanoico, heptadecanoico, araquídico, uncosanoico, docosanoico, tetracosanoico, pentadecenoico, heptadecenoico, docosenoico y dihidroestercúlico.

PARTE -V-

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA


- (1) Halphen G., Journ. de Pharm. et de Chimie, II, 241 (1894); "Huiles et Graisses Végétales Comestibles" Beranger Editor, Paris (1912) pág. 328.
- (2) Wilson T.L., Smith C.R. y Mikolajczak K.L., J. Am. Oil Chem. Soc., 38, 696 (1961).
- (3) Smith C.R., Wilson T.L. y Mickolajczak K.L., Chem. and Ind., 256 (1961).
- (4) Shenstone F.S. y Vickery J.R., Nature, 190, 168 (1961).
- (5) Cornelius J.A. y Shone G.G., Chem. and Ind., 1246 (1963).
- (6) Bruin A. de, Heesterman J.E. y Mills M.R., J. Sci. Food Agr., 14, 758 (1963).
- (7) Cornelius J.A., Hammonds T.W. y Shone G.G., J. Sci. Food Agr., 16, 170 (1965).
- (8) Nunn J.R., J. Chem. Soc., 313 (1952).
- (9) Faure P.K. y Smith J.C., J. Chem. Soc., 1818 (1956).
- (10) Faure P.K., Nature, 178, 372 (1956).
- (11) Shenstone F.S. y Vickery J.R., Nature, 177, 94 (1956).
- (12) Mac Farlane J.J., Shenstone F.S. y Vickery J.R., Nature, 179, 830 (1957).
- (13) Craven B.M. y Jeffrey G.A., Nature, 183, 676 (1959).
- (14) Fogerty A.C., Johnson A.R., Pearson J.A. y Shenstone F.S., J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 885 (1965).
- (15) Rinehart K.L., Goldberg S.I., Tarimu C.L. y Culberston T.P., J. Am. Chem. Soc., 83, 225 (1961).
- (16) Fawcett R.F. y Smith J.C., Chem. and Ind., 2, 871 (1960).

- (17) Nordby H.E., Heywang B.W., Kircher H.W. y Kemmerer A.R.,
J. Am. Oil Chem. Soc., 39, 183 (1962).
- (18) Hammons T.W. y Shone G.G., The Analyst, 91, 455 (1966).
- (19) Bailey A.V., Magne F.C., Boudreaux G.J. y Skau E.L.,
J. Am. Oil Chem. Soc., 40, 69 (1963).
- (20) A.O.C.S. - Official and Tentative Methods of the American
Oil Chemists' Society, Official Method Ca 9f-57.
- (21) Bailey A.V., Magne F.C., Pittman R.A. y Skau E.L., J.
Am. Oil Chem. Soc., 38, 505 (1961).
- (22) Deutschman A.J. y Klaus I.S., Anal. Chem., 32, 1809
(1960).
- (23) Bailey A.V., Pittman R.A., Magne F.C. y Skau E.L., J.
Am. Oil Chem. Soc., 42, 422 (1965).
- (24) Magne F.C., Harris J.A. y Skau E.L., J. Am. Oil Chem.
Soc., 40, 716 (1963).
- (25) Harris J.A., Magne F.C. y Skau E.L., J. Am. Oil Chem.
Soc., 40, 718 (1963).
- (26) Harris J.A., Magne F.C. y Skau E.L., J. Am. Oil Chem.
Soc., 41, 309 (1964).
- (27) Smith C.R., Burnett M.C., Wilson T.L., Lohmar R.L.
y Wolff I.A., J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 320 (1960).
- (28) Magne F.C., Harris J.A., Pittman R.A. y Skau E.L.,
J. Am. Oil Chem. Soc., 43, 519 (1966).
- (29) Varma J.P., Das Gupta S., Bholra N. y Aggarwal J.S.,
J. Indian Chem. Soc., 33, 111 (1956).
- (30) Bailey A.V., Boudreaux G.J. y Skau E.L., J. Am. Oil
Chem. Soc., 42, 637 (1965).
- (31) Wolff I.A. y Miwa T.K., J. Am. Oil Chem. Soc., 42,
208 (1965).

- (32) Raju P.K. y Reiser R., *Lipids*, 1, 10 (1966).
- (33) Kircher H.W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 41, 4 (1964).
- (34) Magne F.C., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 332 (1965).
- (35) Sherwood R.M., *Poultry Sci.*, 8, 99 (1928); Kircher H.W.,
J. Am. Oil Chem. Soc., 41, 4 (1964).
- (36) Lorenz F.W. y Almgvist H.J., *Ind. Eng. Chem.*, 26, 1310
(1934).
- (37) Schaible P.J., Bandemer S.L. y Davidson J.A., *Poultry
Sci.*, 25, 440 (1946).
- (38) Evans R.J., Bandemer S.L., Davidson J.A. y Bauer D.H.,
J. Agr. Food Chem., 7, 47 (1959).
- (39) Schaible P.J. y Bandemer S.L., *Poultry Sci.*, 25, 451
(1946).
- (40) Schaible P.J. y Bandemer S.L., *Poultry Sci.*, 25, 456
(1946).
- (41) Masson J.C., Vavich M.G., Heywang B.W. y Kemmerer A.R.,
Science, 126, 751 (1957).
- (42) Schneider D.L., Vavich M.G., Kurnick A.A. y Kemmerer A.R.,
Poultry Sci., 40, 1644 (1961).
- (43) Schneider D.L., Kurnick A.A., Vavich M.G. y Kemmerer A.R.,
J. Nutrition, 77, 403 (1962).
- (44) Jensen E.V., *Science*, 130, 1319 (1959).
- (45) Fong C.T.O., Silver L., Christman D.R. y Schwartz I.L.,
Proc. Natt. Acad. Sci., U.S. 46, 1273 (1960) y Schwartz
I.L., Rasmussen H., Schoessler M.A., Silver L. y Fong
C.T.O., *Proc. Natt. Acad. Sci., U.S.* 46, 1288 (1960);
Kircher H.W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 41, 4 (1964).
- (46) Pons W.A., Kuck J.C. y Frampton V.L., *J. Am. Oil Chem.
Soc.*, 40, 10 (1963).

- (47) Kuck J.C., Pons W.A. y Frampton V.L., J. Am. Oil Chem. Soc., 41, 101 (1964).
- (48) Deutschman A.J., Berry J.W., Kircher H.W. y Sakir C.M., J. Am. Oil Chem. Soc., 41, 175 (1964).
- (49) Rayner E.T., Brown L.E. y Dupuy H.P., J. Am. Oil Chem. Soc., 43, 113 (1966).
- (50) Abbott J.C., F.A.O., Nutrition Document, Roma, Meeting - julio 1965 - "Protein Rich Foods from Oilseeds: Economic Aspects", pág. 11.
- (51) Jarquín R., Bressani R., Elias L.G., Tejada C., Gonzalez M. y Braham E.J., J. Agr. Food Chem., 14, 275 (1966).
- (52) Milner M., F.A.O., Nutrition Document, Roma, Meeting - julio 1965 - "Cottonseed Protein Concentrates", pág. 3, 4 y 5.
- (53) Bailey A.E., "Cottonseed and cottonseed Products" - Interscience Publ., New York, (1948), pág. 321, 343 y 346.
- (54) Moore A.T. y Rollins M.L., J. Am. Oil Chem. Soc., 38, 156 (1961).
- (55) Thaung U.K., Gros A. y Feuge R.O., J. Am. Oil Chem. Soc., 38, 220 (1961).
- (56) King W.H., Kuck J.C. y Frampton V.L., J. Am. Oil Chem. Soc., 38, 19 (1961).
- (57) Levi R.S., Reilich H.G., O'Neill H.J., Cucullu A.F. y Skau E.L., J. Am. Oil Chem. Soc., 44, 249 (1967).
- (58) Bligh E.G. y Dyer W.J., Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911 (1959).
- (59) Lyons M.J. y Lippert L.F., Lipids, 1, 136 (1966).

- (60) Szutowicz W., J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 254 (1965).
- (61) Cattaneo P., Karman de Sutton G., Costanzo N.C., Bertoni M.H. y Canal J.M., An. Asoc. Quím. Arg., 49, 192 (1961).
- (62) Kuemmel D.F., J. Am. Oil Chem. Soc., 41, 667 (1964).
- (63) Bartlett G.R., J. Biol. Chem., 234, 466 (1959).
- (64) Durbetaki A.J., Anal. Chem., 28, 2000 (1956).
- (65) Hilditch T.P. y Williams P.N., The Chemical Constitution of Natural Fats, Chapman and Hall, Londres, 1964, pág. 668.
- (66) A.O.C.S. - Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society, Tentative Method Ca 6b-53.
- (67) A.O.C.S. - Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society, Official Method Cb 1-25 (1963).
- (68) Longenecker H.E., J. Soc. Chem. Ind., 56, 199 T (1939).
- (69) Mc. Cabe W.L. y Thiele E.W., Ind. Eng. Chem., 17, 605 (1925).
- (70) Word C.C., Technical Paper, 600 U.S., Dept. of the Interior, Washington 1939.
- (71) Sie Swang Tiong y Waterman H.I., Chimie et Industrie, 81, 204 (1959).



DR. PEDRO CATTANEO
PROFESOR PLENARIO

