

Tesis de Posgrado

Estudio de la composición química del fruto maduro de "calafate" (Berberis buxifolia LAM.)

Sztarker, Norberto Daniel

1974

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:

Sztarker, Norberto Daniel. (1974). Estudio de la composición química del fruto maduro de "calafate" (Berberis buxifolia LAM.). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1462_Sztarker.pdf

Cita tipo Chicago:

Sztarker, Norberto Daniel. "Estudio de la composición química del fruto maduro de "calafate" (Berberis buxifolia LAM.)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1974. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1462_Sztarker.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ESTUDIO DE LA COMPOSICION QUIMICA
DEL FRUTO MADURO DE "CALAFATE"
(*Berberis buxifolia* LAM.)**

Norberto Daniel Sztarker

1974

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LA COMPOSICION QUIMICA DEL FRUTO MADURO DE "CALAFATE"

(BERBERIS BUXIFOLIA Lam)

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1974

Agradezco al Profesor Dr. Pedro Cattaneo, Director de Tesis y Consejero de Estudios, quien con su ejemplo y estímulo hizo posible la realización de este trabajo.

Agradezco también:

- A la Dra. María Helena Bertoni sus enseñanzas y constante colaboración.
- A la Dra. Alicia Beatriz Pomilio por su asesoramiento para la determinación de antocianinas.
- A la Dra. Inge María E. Thiel la colaboración prestada en la identificación de hidratos de carbono.
- A la Dra. María Susana Vigo y demás miembros de Bromatología su amistad.

a Silvia

a mis hermanas

a mis Padres

I N T R O D U C C I O N

La familia Berberidaceae consta de dos subfamilias: Berberidoideae que comprende los géneros: Nandina, Berberis, Mahonia, Ranzania, Caulophyllum, Leontice, Bongardia, Vancouveria, Epimedium (incl. Aceranthus), Plagiobegma, Jeffersonia y Podophylloideae que comprende: Podophyllum (incl. Dysosma), Diphylleia, Achlys según Janchen¹.

Son plantas herbáceas o arbustivas, inermes o espinosas con hojas persistentes o caedizas, alternas, simples o compuestas, enteras o espinoso dentadas, pecioladas. Flores actinomorfas, hermafroditas, solitarias, en fascículos, cimas o panofas. Sépalos y pétalos de prefloración imbricada, dispuestas generalmente en verticilios trímeros formando dos o mas ciclos. Estambres libres en igual número que los pétalos, anteras dehiscentes por dos valvas superiores mas raramente univalvas o de dehiscencia longitudinal, ovario súpero unilocular, pauchi o pluriiovulado, estilo presente o nulo; estigma copetado, fruto, baya, cápsula dehiscente o indehiscente. Unas 200 especies distribuídas en ambos hemisferios².

Las Berberidaceae están representadas exclusivamente por el género Berberis en la República Argentina.

Distribución geográfica de las especies de Berberis en la República Argentina-

Las especies de Berberis de la República Argentina están distribuídas entre dos centros importantes, el del norte que corresponde a la Selva subtropical tucumano-boliviana, y el segundo que corresponde a la Estepa patagónica y Bosques subantárticos, continuándose por el Desierto andi-

no hasta los 30° de latitud sur. Este segundo centro es notable por el número de especies y por la abundancia de individuos. Encontrándose especies endémicas en esta región, tales como B. Comberi hallado en el cerro Lotena en el territorio de Neuquén, las especies más típicas de la región del lago Nahuel Huapi son B. heterophylla, B. buxifolia, B. Darwini, B. linearifolia y B. bariloensis. B. heterophylla se extiende desde el río Negro, en la Provincia del mismo nombre, hasta Tierra del Fuego. Vegeta en suelos muy secos y arenosos, formando matorrales raquíticos al sudoeste y se lo encuentra también en la cordillera de Aculco, del lado chileno.

Berberis buxifolia alcanza un límite más septentrional, pues llega a los 38° al norte del territorio de Neuquén, creciendo en suelo húmedo, en sitios rupestres o intrincados, tanto en las estepas como en los bosques. B. empetrifolia se extiende por toda la estepa patagónica, en las arenas móviles del litoral magallánico, en las estepas arenosas y pedregosas y hasta las morenas de la costa sur. Se continúa hacia el norte por el Desierto andino hasta los 30° en las provincias de San Juan y La Rioja. Es común en Chile y se lo encuentra hasta en Bolivia.

En el límite norte de los Bosques subantárticos, próximo a Puerto Blest en suelos húmedos y pantanosos y bosques bajos de la cordillera argentino-chilena, se halla B. linearifolia, particularmente a orillas del lago Nahuel Huapi del lado argentino y lago Ranco en Chile, se encuentra también en el Estrecho de Magallanes.

En la región boscosa vecina al lago Nahuel Huapi, crecen B. Montana y B.

Cabrerae hallándose también el primero en Colchagua del lado Chileno.

En el extremo norte de los Bosques subantárticos hacia los 37° de latitud y al norte del territorio de Neuquén, correspondiente a la cordillera de Chillan en Chile, tenemos B. chillanensis.

En bosques espesos con suelo húmedo, hasta los 45° habitan B. Pearcei y B. Darwinii, soportando este último suelos secos, pedregosos y lomas de tosca.

En bosques bajos y proximidades del cerro Otto crece B. Parodii.

Todas estas especies pueden agruparse como sigue:

1º- Especies exclusivas de la Selva Valdiviana: B. barilochensis, B. Parodii, B. Chillanensis, B. lologensis, B. Cabrerae, B. Montana, B. linearifolia.

2º- Especies de los Bosques australes: B. Darwinii, B. Pearcei.

3º- Especies del Desierto andino y Estepa patagónica: B. buxifolia, B. empetrifolia, B. cuneata, B. heterophylla³.

Descripción de la especie Berberis buxifolia Lam.

Nombre vulgar: Calafate, michay.

Arbusto de follaje tupido, glabro, de 1-1,50 m aproximadamente de altura, con ramas rectas o ligeramente sinuosas, fuertes, leñosas, con nudos muy pronunciados e internodios de 8-15 mm de largo; leño blanco con radios medulares abundantes y corteza resquebrajada, gris negruzca en las ramas viejas y rojo vinoso en las jóvenes. Braquiblastos de 2-3 mm de largo, rodeados de numerosas brácteas de color rojo vinoso que conjuntamente con los restos de pecíolo que quedan a la caída de las hojas

aparecen en el tallo como protuberancias nudosas que le comunican a éste un aspecto tortuoso.

Espinas trifidas tanto o más largas que las hojas de 1-1,5 cm de largo, la ramificación mediana, por 0,8-1,2 cm las laterales, a veces se reducen tanto que a simple vista se presentan como I-fidas, en efecto, la central mide 1 cm y las laterales 1-2 mm, esto ocurre particularmente en el extremo de las ramas. Son de color castaño claro, algo rojizo, lisas, fuertemente acanaladas en su cara inferior, ensanchadas en su base.

Hojas coriáceas, ovales u obovoides, subsesibles, decurrentes por el pecíolo, de 0,8-2,5 cm de largo por 0,5-1 cm de ancho, incluyendo un pecíolo de 1-2 mm de largo, provisto a veces de pequeñas papilas. Verde lustroso en la cara superior y verde opaco, algo mas claro, en la inferior, borde entero, ligeramente engrosado en la cara inferior, macronadas, retinervadas, un nervio central bien pronunciado y un retículo mas fino pero perfectamente visible sin aumento. Dispuestas en número de 6-10 en cada nudo, arrosietadas, cubriendo a veces casi por completo el tallo.

Flores simples, solitarias, sobrepasando escasamente las hojas, de 10-12 mm de diámetro, formadas por 3 sépalos obovoides de 6 mm de largo por 4 mm de ancho, con un nervio mediano trifurcado en el extremo superior y cuatro laterales no ramificadas, alcanzando los exteriores la mitad de la longitud del sépalo; tres pétalos en forma de pera de 9 mm de largo y 8 mm de ancho, con la base estrechada y el ápice perfectamente obtuso, provisto de 7 nervios tenues, muy ramificados, divergentes,

que cubren toda la superficie; 6 pétalos interiores de la misma forma de 5 mm de largo por 4 mm de ancho con dos nectarios fusiformes, simples, que ocupan la cuarta parte de la longitud del pétalo, con cinco nervios ramificados y muy tenues; 6 estambres no apendiculados, de 4,5 mm de largo por 0,7 de ancho, débilmente ensanchadas en la base de la antera y de ápice redondeado. Gineceo subgloboso de 4 mm de largo por 2 mm de ancho, con estigma sésil, articulado en un pedicelo de 1-2,8 cm de largo, generalmente péndulos.

Baya esférica, negro vinoso, con fuerte rocío glauco que le comunica un viso azulado, de 1 cm aproximadamente de diámetro, con estigma sésil engrosado, pequeño, de 1,5 mm de diámetro, umbilicado y papiloso. Contiene 8-11 semillas castaño rojizo, semilunares con una cara convexa y dos cóncavas formando una carena, punto de inserción estrechado y redondeado el extremo opuesto, de 5mm de largo por 2 mm de ancho³.

Utilización de frutos maduros de especies de Berberis

La información que se acompaña ha sido tomada de la obra "Plantas indígenas de la Argentina con frutos o semillas comestibles" de Ragonese y Martínez Crovetto⁴, ampliada en la medida en que fue posible la consulta de los artículos originales por ellos mencionados.

Los de Berberis buxifolia (bosques cordilleranos entre los 37° y 45° de latitud sur) son de sabor dulce y agradable y se utilizan para preparar una bebida semejante al vino con el agregado de azúcar (sin duda para aumentar la concentración alcohólica por fermentación). No obstante

según información del Perito Francisco P. Moreno recogida por P. N. Arata¹⁴ se asegura que lo anterior no es exacto y el único uso que tienen dichas frutas es el servir a la preparación de una especie de guindado echándolas en caña, anís, etc.. Según Reiche⁵ en Punta Arenas y otros lugares se la emplea para preparar dulces y jarabes. Y de acuerdo a Outes⁶ conjuntamente con los frutos de B. cuneata D. C. (alrededores de San Julián) y B. heterophylla Juss (costa patagónica), los modernos patagones los empleaban para preparar una mezcla con agua de jugos de sus frutos. Los de B. Darwinii Hook (cordillera patagónica) son comestibles y se utilizan para preparar una especie de vino; los de B. empetrifolia Lam (parte austral de la cordillera de los Andes hasta Mendoza) son bayas carnosas y sabrosas según Spegazzini⁷; los de B. flexuosa Ruiz et Pavon (noreste argentino) son frutas dulces y comestibles y usados para colorar vinos según Spegazzini⁸; los de B. heterophylla Juss (bosques andino patagónicos) son según Hierónimus⁹ comestibles y empleados por los indios para producir una bebida con el agregado de aguardiente; los de B. ilicifolia Forst (Patagonia austral y Tierra del Fuego) de acuerdo a J. A. Domínguez, mencionado por Autran¹⁰ son comestibles; los de B. laurina Billb (noreste argentino-Uruguay) son de sabor agradable y se usan para elaborar una especie de vino (Berro)¹¹, los de B. linearifolia Phil (región cordillerana de Neuquén y Río Negro)son comestibles según señala Pérez Moreau¹² a igual que los de B. michay Job (bosques cordilleranos de Río Negro, Chubut y Santa Cruz).

Los frutos de B. ruscifolia Lam (amplia distribución en el país) se emplean en La Pampa en la preparación de una bebida alcohólica y se consumen en forma directa de acuerdo a Monticelli¹³ y las de B. spinulosa St. Hill (noroeste argentino) son comestibles y se emplean para colorar vino según Spegazzini⁸.

Estudios previos sobre B. buxifolia y otras especies de Berberis

La bibliografía contiene muy pocas citas acerca de estudios realizados sobre la especie B. buxifolia. Históricamente el primero registrado pertenece a P.N. Arata¹⁴ quien realizó un estudio sobre madera de "Calafate" (aclarando el autor que hasta ese momento no se registraba ningún antecedente). Según este trabajo la madera contiene 9,308 % de agua, 3,232 % de extracto etéreo, del que 0,500 % corresponde a un cuerpo graso que funde a 55° y el resto es una resina, "que no contiene glucosa", tanino y un alcaloide (berberina), 1,140 % asignado a albúmina, almidón y goma, 9,200 % de un extracto acuoso-clorhídrico que contendría clorhidrato de berberina y 73,600 % de resto leñoso y cenizas. Sabemos de la existencia de otro trabajo del mismo autor sobre la presencia de berberina en tallos foliáceos de B. buxifolia, citado por J.A. Domínguez¹⁵, pero debido a su antigüedad no fue posible la consulta de una copia original.

Un artículo de Reichert¹⁶ sobre berberina y su extracción a partir de la corteza de B. Darwinii y B. buxifolia encuentra un rendimiento de 3,5-4 % de berberina en B. buxifolia y da un método para su extracción.

Desde entonces al presente sólo se registra un trabajo de Pomilio¹⁷ quien estudió las antocianinas presentes en frutos maduros de B. buxifolia. La identificación de las mismas realizada con los métodos convencionales demostró las siguientes antocianinas: peonidina-3-glucósido, malvidina-3-rutinósido, malvidina-3-glucósido, petunidina-3-rutinósido, petunidina-3-glucósido, peonidina-3-rutinósido-5-glucósido, delphinidina-3-glucósido, petunidina-3-rutinósido-5-glucósido y petunidina-3-genciobiósido.

Habiendo ampliado la búsqueda a todas las especies del género Berberis, lo siguiente es un resumen de lo encontrado.

En 1920 O'Neal¹⁸ informó que en frutos de Berberis japoneses (?) se encuentran pequeñas cantidades de ácido cítrico y cantidades mayores de ácido málico y tartárico, y un contenido de azúcares reductores del 39,5 % sobre fruto seco.

Un estudio sobre maderas de Berberis laurina¹⁹ informa sobre un contenido en glúcidos del 21,89 %, taninos 5,18 %, hidrastina 1,40 %, berberina (extracto alcohólico) 2,50 %, nitrógeno total 1,15 %, celulosa y lignina 52,73 %, cenizas 3,50 %.

Un análisis sobre hojas de B. vulgaris²⁰ da el siguiente contenido porcentual: alcaloides 0,08-0,18, taninos 2,2, azúcares 5,2, azúcares aldehídicos 0,67, trazas de aceites esenciales, lípidos 4, humedad 13,62, cenizas 4,5 y vitamina K 0,6 %.

Sobre frutos de B. vulgaris existe citado en el Chemical Abstracts un trabajo de E. Tomaszewska y M. Tomaszewski²¹ que informa haber realizado un estudio sobre la composición general del fruto, pero lamentable-

-mente no se informa en ese resumen los resultados observados y ha sido imposible obtener una copia del mismo.

De los autores hindúes Gupta²²⁻²³ hemos obtenido datos de interés en cuanto a la composición en azúcares y ácidos orgánicos de B. liciun, mediante cromatografías en papel informaron haber encontrado en el fruto glucosa y fructosa y solamente ácido málico.

Un artículo reciente²⁴ informa que en frutos de B. vulgaris la mayoría de los azúcares son monosacáridos y existe muy poca sacarosa (no se dan valores cuantitativos).

Además del mencionado existen otros tres trabajos sobre antocianos en el género Berberis a saber: Murrell y Wolf²⁵ encontraron cianidina-3-glucósido en hojas otoñales de B. thumbergi. Sobre la misma especie y sobre B. vulgaris, Mamaev y Semkina²⁶⁻²⁷ observaron una concentración máxima de antocianos en primavera; los pigmentos principales resultaron ser monoglucósidos de peonidina, cianidina y delfinidina.

Lo anterior es el total de artículos que informan sobre composición química del género Berberis, exceptuando alcaloides; sobre estos últimos existe abundante información que permite realizar la siguiente enumeración de los alcaloides encontrados al presente en el género Berberis: berbamina, berbamunina, berberenina, berbericina, berbericinina, berberina, berberis base A, berberis base III, berberis base IV, berberubina, berbalamina, bervulcina, columbamina, coptisina, dehidrocoridalina, himanthina, hidrastina, isotetrandina, jatrorrhizina, lambertina,

magniflorina, obamerina, obamegina, palmitina, tetrahidropalmitina, tetrahidroshobakunina, vulracina²⁸.

P A R T E I

DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

Este estudio se refiere al examen químico de composición de frutos maduros de Berberis buxifolia procedentes de la región de Lago Argentino (Provincia de Santa Cruz), cosechados en Febrero de 1972 en las costas próximas a la población de Calafate.

Como se expone en la Parte Experimental, los frutos debidamente preservados desde su cosecha hasta el análisis, se resolvieron manualmente en sus tres partes constitutivas principales, (cáscara, pulpa y semilla) obteniéndose los siguientes valores porcentuales:

Semilla	23,4 %
Película	4,6 %
Pulpa	72,0 %

Previamente se establecieron algunos valores referentes a los frutos enteros, que como valores promedio fueron los siguientes:

Peso medio de baya	0,80 g
Diámetro en cm	0,9-1,1
Nº de semillas por baya	8-10

El color de los frutos (rojo-violado) procedía exclusivamente de las pulpas desde que las cáscaras liberadas de pulpa eran semitransparentes de tono amarillo pardo, mientras las semillas eran brillantes y de color negro parduzco. El peso medio de la semilla fue de 0,02 g y 50 el número de semillas por gramo. La semilla en valor promedio tenía 6,5 mm de longitud, 2,0 mm de espesor y un valor de peso/hl de 68,2 Kg. La semilla por resolución manual rindió 45,1 % de cáscara de color prácti-

camente negro y 54,9 % de endospermo o pepa blanco-amarillento, la humedad de cáscara fue de 18,95 %, de la pepa 14,33 % y de la semilla entera 16,95 %.

La resolución de aproximadamente un kg de frutos maduros en los tres componentes ya mencionados, permitió disponer cantidad suficiente de pulpa y semilla a los fines de su examen. En orden sucesivo se exponen los resultados obtenidos para la composición de la semilla, en sus dos componentes principales (aceite de extracción y harina residual) y luego la composición de la pulpa. Como complemento se exponen los resultados de composición general encontrados para un producto de industrialización de esos frutos: dulce de "Calafate".

1- Estudios sobre semilla de "Calafate"

De acuerdo a la experimentación que se expone mas adelante, alrededor de 210 g de semilla entera, seca al aire, se molieron finamente y agotaron en Soxhlet, por hexano técnico, obteniendo el aceite crudo de extracción y la harina residual que se liberó de solvente por exposición al aire y en vacío parcial a 100°. El rendimiento en aceite de la semilla tal cual fue de 15,85 %, de la semilla seca 18,97 %, valores que expresados por ciento de pepa tal cual y seca fueron 28,86 y 33,70 respectivamente.

1,1- Estudios sobre el aceite crudo de semilla

a) Tratamiento previo - Extracción de alcaloides

El aceite crudo disuelto en éter etílico se liberó de alcaloides

por extracción con ácido clorhídrico al 5 % y de los extractos ácidos se recuperaron los alcaloides (extracción con cloroformo en medio alcalino de hidróxido de sodio) observando un rendimiento de 0,56 % sobre aceite crudo para alcaloides no fenólicos y por acidificación posterior del líquido etéreo seguida de alcalinización con carbonato ácido de sodio y reextracción con cloroformo se aislaron alcaloides fenólicos con rendimiento muy bajo (aprox. 0,002 % de aceite). El examen de alcaloides no fenólicos por cromatografía en capa delgada (sílica gel G), usando distintos medios de desarrollo permitió revelar cuatro manchas dos de las cuales correspondían a berberina y palmitina, en base a corridas en presencia de esos patrones con tres medios de desarrollo distintos. En la fracción de alcaloides fenólicos se reveló una única mancha que también acompañó al extracto de los alcaloides no fenólicos.

b) Características fisico-químicas y componentes menores

Sobre el aceite de semilla libre de alcaloides se practicaron algunas determinaciones fisico-químicas, reacciones cromáticas y contenido en algunos componentes menores (esteroles, tocoferoles y escualeno), con los resultados que se exponen en la Tabla 1.

El análisis de estos valores señala a este aceite como de alta insaturación (secante) y con un valor de índice de saponificación que revela una composición fundamental de ácidos C₁₆ y C₁₈. El contenido en tocóferoles totales es sumamente bajo (23,5 mg/g), alcanzando el

valor máximo observado para aceites de semilla de la más baja concentración en tocoferoles como son los aceites de oliva (7-28 mg/g)²⁹. Asimismo, resultó ser muy bajo el valor de número de escualeno 30,6 mg/g. Desde que la literatura es prácticamente carente de información sobre aceites de semilla de Berberidaceas los valores de la Tabla 1 se complementaron practicando la reacción general de aceites de semilla según Bellier que resultó francamente positiva y la de Malphen (ácidos ciclopropénicos) que al ser negativa descartó la existencia de tales componentes ácidos. Por otra parte el aceite disuelto en éter a 0° produjo un voluminoso precipitado por adición de bromo, indicando la existencia de ácidos trietilénicos, posteriormente reconocidos como linolé-nico.

c) Composición acídica

Se determinó por cromatografía de partición gas líquido (ver Parte Experimental) de los ésteres metílicos de los ácidos libres de insaponificable, con los resultados que se exponen en la Tabla 2. De acuerdo a los valores mencionados en la misma, son componentes "mayores" los ácidos oleico, linoleico y linolé-nico (contenidos en proporción superior al 10 % de los ácidos totales) y muy próximamente el ácido palmítico; el contenido en ácidos saturados totales fue bajo (10,6 %), siendo el principal componente el ácido palmítico (8,5 %).

Sobre los ésteres metílicos de ácidos totales se realizó una observación directa en U.V. (230-268 nm) a fin de verificar si existían

dienos y trienos conjugados, observando una muy baja concentración en estos últimos (0,14 % expresada en C_{18:3} conjugado).

La literatura no registra antecedentes sobre composición acídica de aceites de semilla del género Berberis. Sólo pudieron observarse algunos trabajos fraccionarios sobre aceites de semilla de otros géneros de la familia Berberidaceae. Ueno y Kyokaishi³⁰ publicaron para el aceite de semilla de Nandina domestica (pequeño arbusto con frutos en forma de baya, de color blanco o rojo brillante, que se cultiva en Japón con fines ornamentales), los siguientes valores de características físico-químicas: densidad relativa 25/4° 0,9355; índ. de saponificación 181,8; índ. de yodo 132,1; número de acidez 2ⁿ,6; índ. de refracción a 20° 1,4742 e insaponificable 4,56 %, señalando como componentes ácidos principales 16:0, 18:0, 18:1 y 18:2 con sólo trazas de 18:3 (linolénico). Ohta y Miyazaki³¹ señalaron que la semilla de esta especie contiene 8,7 a 9,4 % de aceite, indicando como valores de composición acídica: ácidos saturados (16:0 y 18:0) 32,3 %, ácidos insaturados (18:2 principal y 18:1 en menor proporción) 67,7 %. Grimme³² refiriéndose al aceite de Berberis vulgaris lo señala como similar al de Nandina domestica.

En la clásica obra de Hildich y Williams³³ figura como Berberidaceae la especie Akibia lobata, así como la composición de su aceite seminal. Se trata de un equívoco desde que esa especie pertenece a la familia Lardizabalaceae, tal como figura en las obras de Eckey³⁴ y Hegnauer³⁵.

En razón de la carencia de información de la bibliografía se consideró de interés reconocer a los componentes ácidos fundamentales. El ácido linolénico fue indudablemente reconocido por su transformación en ácido hexabromoesteárico de punto de fusión 181° y por fusión mezcla con hexabromoesteárico obtenido a partir de ácido linolénico de aceite de lino. El ácido oleico fue reconocido a través de su transformación en ácido 9:10dihidroxiesteárico de punto de fusión $131-2^{\circ}$ y por fusión mezcla con ácido 9:10dihidroxiesteárico obtenido a partir de oleico puro; este último reconocimiento exigió la obtención de una mezcla de ácidos oleico y saturados lograda por recristalización en metanol de los compuestos de inclusión de urea de fracciones de destilación de ésteres metílicos de ácidos totales del aceite ricas en los componentes en C_{18} .

Este procedimiento aseguró la eliminación de 18:3 y 18:2, posibilitando el reconocimiento de 18:1. Aplicado hacia la obtención de insaturados 18:1 y 18:2 carentes de 18:3, para posibilitar el reconocimiento de 18:2 a través de la formación de tetrabromo derivados en éter de petróleo, no tuvo éxito, por haber observado en los procesos de recristalización de aductos de urea que 18:2 y 18:3 se eliminaban en forma pareja. La marcha de los procesos de recristalización de aductos de urea fue seguida a través de exámenes por cromatografía gas líquido, como se expone en la parte Experimental. Sin embargo corresponde admitir la existencia de ácido linoleico como 18:2 en razón de haber identificado a 18:1 como oleico y a 18:3 como linolénico. La identificación de los demás componentes (12:0 como láurico, 14:0 como mirístico, 16:0 como pal-

mfico, 16:1 como palmitoleico, 17:0 como heptadecanoico y 18:0 como esteárico) se concluyó en base a los valores de tiempo de retención para los ésteres metílicos en la cromatografía gas líquido.

Desde que componentes acídicos en concentraciones inferiores al 0,05 % de los ácidos totales o componentes en bajas concentraciones de elevado peso molecular (C_{20} a C_{24}), en general no se revelan por C.G.L. en cromatogramas sobre ésteres metílicos de ácidos totales, se realizó un examen exhaustivo de composición acídica que comprende el fraccionamiento previo de los ésteres de ácidos totales por destilación en un equipo de eficacia probada (12 platos teóricos, 0,5-1,0 Torr), seguido del examen C.G.L. de cada fracción y residuo de destilación (ver Parte Experimental). De las composiciones acídicas de estos últimos y teniendo en cuenta los pesos de cada fracción y residuo se calculó la composición final de los ácidos totales con los resultados que figuran en la Tabla 3. Se evidenciaron, como componentes en muy bajas concentraciones 15:0, 20:0, 22:0, 24:0, 15:1, 17:1 y 20:1, no registrados en el cromatograma obtenido en forma directa sobre ésteres metílicos de ácidos totales. Se observó una muy buena concordancia de valores para los componentes comunes de este último cromatograma con los logrados en el examen exhaustivo como se deduce de las Tablas 2 y 3. Por otra parte los valores de reconstrucción del índice de yodo del aceite en ambos estudios fueron estrechamente similares al obtenido por determinación directa.

d) Examen de los esteroides presentes

A través del fraccionamiento del insaponificable del aceite en placa preparativa de sílica gel, se aisló la fracción de esteroides que se analizó por cromatografía gas líquido (ver Parte Experimental). Considerando los valores de Tr/Tr colesterol se observó la principal ocurrencia de β -sitosterol (Tr/Tr colesterol 1,60), en menor concentración campesterol (Tr/Tr colesterol 1,29) y en muy baja concentración stigmasterol (Tr/Tr colesterol 1,41). Además un pico con valor relativo a colesterol 1,80 (Δ^5 -avenasterol ?) y otro muy pequeño con Tr/Tr colesterol 0,99 (colesterol ?). A los fines de identificación se determinaron los Tr/Tr colesterol de los siguientes patrones: campesterol 1,29, stigmasterol 1,41, β -sitosterol 1,60. De la información bibliográfica se tomaron los siguientes: brassicasterol 1,13-1,15; Δ^5 -avenasterol 1,83 y Δ^7 -avenasterol 2,16³⁶⁻³⁷.

1,2- Estudios sobre la harina de extracción de semilla

a) Composición general

La Tabla 5 resume los valores encontrados para los componentes corrientemente determinados. El total registrado alcanza al 31,40 % sin computar componentes menores, acerca de los que se informa más adelante.

El extracto acuoso de esta harina alcanza al 18,40 %, cuya acidez expresada en ácido málico por ciento de harina fue 1,25. Por cromatografía en papel de azúcares se identificó glucosa, fructosa, manosa y sacarosa y el examen luego de inversión confirmó este resultado desde

que se identificó glucosa, manosa y fructosa.

El contenido en hidratos de carbono sacarificables responde a polisacáridos distintos de almidón. Una determinación de rendimiento en furfural (ác. clorhídrico 12 %) permitió lograr la cifra de 4,04 % expresado en furfural. Desde que los exámenes cromatográficos de azúcares no revelaron presencia de pentosas, se atribuyó el origen del furfural a la existencia probable de poliurónidos. Estos se determinaron según Barker³⁸ (ver Parte Experimental), por evaluación del dióxido de carbono desprendido por tratamiento con ácido clorhídrico 19 %, obteniendo un valor de 17,60 % expresado en poliurónidos. Esta cifra resultó ser prácticamente coincidente con la calculada en base al rendimiento en furfural. Para ello se tuvieron en cuenta los factores de transformación (4,66 y 4,26) de furfural a glucurónidos y galactourónidos respectivamente, establecidos por Norish y Resch³⁹ al reestudiar el rendimiento de esos poliurónidos en furfural por tratamiento con ClH 12 %. Se considera a esta coincidencia de valores como una confirmación de la presencia de poliurónidos en esta harina.

La harina contenía alcaloides (0,42 %) que como se expuso para el caso de los alcaloides del aceite crudo, fueron examinados mediante técnicas cromatográficas en placa delgada, conducentes a los mismos resultados. Finalmente el examen sistemático de otros componentes evidenció la presencia de fitoesteroles además de alcaloides.

2- Estudios sobre pulpa

La Tabla 6 resume los valores de composición corrientemente determinados que suman 13,90 % frente a un valor de extracto seco de 15,44 %.

El valor de pH (electrodo de vidrio combinado, 20°) de la pulpa fue de 3,25 y la alcalinidad de cenizas de 12,5 ml de ácido normal por gramo de cenizas (9,4 ml de ácido N/100 g pulpa). La acidez fija resultó estar prácticamente constituida por ácido málico. Por cromatografía en papel de los ácidos fijos separados previamente por sal de plomo (ver Parte Experimental), se reconocieron ácido málico, ascórbico y cítrico. Por cromatografía en fase gaseosa, practicada sobre los ésteres metílicos sililados de los ácidos fijos previamente aislados (ver Parte Experimental), se evidenció un pico principal (96,5 % sobre ácidos totales) debido a ácido málico y seis picos menores correspondientes a componentes no identificados ajenos a ácidos cítrico y tartárico que constituyan en conjunto al 3,5 % de los ácidos totales.

La cromatografía en papel practicada sobre pulpa evidenció la presencia de ácido glucurónico, lo que fue confirmado en cromatografía en placa delgada de celulosa (ver Parte Experimental)

En la evaluación de acidez total por titulación con soluciones de hidróxido de calcio o hidróxido de sodio se obtuvieron valores de 1,52 % (como ácido málico) apreciando el final de la valoración en base al cambio de color (rojo→verde) de los pigmentos propios de la pulpa. Este viraje ocurrió a pH 7,04, apreciado durante una titulación potenciométrica. Un valor prácticamente similar (1,56 %) se obtuvo por titulación empleando indicador externo de azul de bromotimol (pH de virada 6,0-7,6). Una titulación potenciométrica (ver Parte Experimental) estableció que

el punto de inflexión principal ocurría a pH 8,25 y expresando el consumo de álcali en ácido málico hasta alcanzar ese punto el valor de acidez fue de 1,75 %. También se determinó específicamente ácido málico según A.O.A.C., obteniendo un valor de 1,03 % y de 0,12 % por técnica A.O.A.C. para ácido cítrico. Del conjunto de experiencias llevadas a cabo en relación a acidez total se concluye que el ácido málico es el componente fundamental de la acidez fija; que la cromatografía en fase gaseosa no evidenció la presencia de ácido cítrico contrariamente a lo encontrado en papel y a la evaluación de este componente por método A.O.A.C.. De todos modos el total evaluado (1,03 + 0,12 % = 1,15 %) dista de la acidez total determinada por titulación (1,75 %), no descartándose la presencia de otros componentes acídicos u otras sustancias capaces de consumir álcali.

La concentración encontrada para sustancias pécticas, determinadas como ácido péctico fue baja (0,29 %). La confrontación de este valor con el de acidez total, permite clasificar a esta pulpa como de alta acidez fija y baja concentración en sustancias pécticas, observación que puede ser de utilidad a los fines de su transformación en dulces, mermeladas y jaleas.

Respecto de la composición de la pulpa en azúcares se procedió a la identificación por cromatografía en papel de los mismos, para lo cual se desarrollaron cromatogramas antes y después de inversión. Los ensayos practicados antes de inversión revelaron como monosacáridos glucosa y

fructosa y como disacáridos sacarosa y genciobiosa. De estos azúcares glucosa y genciobiosa integran antocianinas de la pulpa¹⁷ (glucosa: peonidina-3-glucósido, malvidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, petunidina-3-rutinósido-5-glucósido, peonidina-3-rutinósido-5-glucósido y delfinidina-3-glucósido y genciobiosa: petunidina-3-genciobiósido. Los ensayos practicados después de inversión evidenciaron solamente glucosa y fructosa, glucosa y fructosa iniciales, glucosa y fructosa procedentes de inversión de sacarosa y glucosa originada por inversión de genciobiosa).

En el orden cuantitativo (ver Parte Experimental) y con fines a los cálculos de composición final se determinaron azúcares reductores (8,68 % como azúcar invertido), azúcares invertibles (0,66 % como sacarosa), ambos por el método de Bertrand; aldosas antes de inversión (5,72 % como glucosa) y aldosas luego de inversión (6,27 % como glucosa) ambos por yodometría y cetosas antes de inversión (3,48 % como fructosa) y cetosas después de inversión (3,74 como fructosa), ambos según Shaffer y Somogyi. A los fines de los cálculos se tuvieron en cuenta estos resultados y los azúcares identificados por cromatografía en papel. La concentración de sacarosa se dedujo de los contenidos en cetosas antes y después de inversión:

$$\text{sacarosa} = (3,74 - 3,48) \times 2 \times 0,95 = 0,49 \%$$

La concentración de fructosa surge de la evaluación directa de cetosas:

$$\text{fructosa} = 3,48 \%$$

La suma de glucosa + genciobiosa invertida surge del valor de aldosas

después de inversión 6,27 %, sustrayendo la glucosa procedente de la inversión de sacarosa ($0,49 \times 1,053 \% \cdot 2$) = 0,26 %

$$\text{glucosa} + \text{genciobiosa invertida} = 6,27 - 0,26 = 6,01 \%$$

Para calcular la concentración en genciobiosa se tuvo en cuenta el valor de azúcares de inversión según Bertrand (9,38 %) y los azúcares reductores directos según Bertrand (8,67 %). Llamando:

$$x = \text{glucosa } \%$$

$$y = \text{fructosa } \%$$

$$z = \text{sacarosa } \%$$

$$p = \text{genciobiosa } \%$$

y teniendo en cuenta que el poder reductor de la genciobiosa (disacárido reductor) es aproximadamente la mitad del de la glucosa, se postuló el siguiente sistema de ecuaciones.

Bertrand directo

$$x + y + 0,5 p = 8,67$$

Bertrand luego de inversión

$$x + y + 1,053 p + 1,053 z = 9,38$$

La resolución de este sistema lleva a un valor de genciobiosa de 0,35 %

La concentración en glucosa original se deduce restando del valor 6,01 (glucosa inicial + glucosa de genciobiosa invertida) la glucosa de genciobiosa ($0,35 \times 1,053$)

$$\text{glucosa} = 6,01 - (0,35 \times 1,053) = 5,64 \%$$

Resumiendo los valores calculados son:

glucosa	= 5,64 %
fructosa	= 3,48 %
sacarosa	= 0,49 %
genciobiosa	= 0,35 %

que hacen un total de 9,96 % de azúcares en la pulpa. Este total supera al total de productos de inversión (Bertrand), experimentalmente determinado (9,38 %). Transformando por cálculo los valores de sacarosa y genciobiosa calculados en productos de inversión (0,35 + 0,49) x 1,053 = 0,88, el total de azúcares después de inversión sería: 5,64 + 3,48 + 0,88 = 10,00 % en lugar de 9,38 determinado experimentalmente. Esta diferencia debe atribuirse a varios factores: errores experimentales, probables interferencias y principalmente a la consideración del poder reductor de la genciobiosa como $\frac{1}{2}$ del de la glucosa, criterio aproximado pero no estrictamente exacto.

La concentración de lípidos en la pulpa se determinó por extracción de la misma por éter etílico (ver Parte Experimental), obteniéndose un valor de extracto etéreo sumamente bajo (0,04 %). En base a este producto se procedió a su saponificación, aislamiento de ácidos totales y transformación en ésteres metílicos que se examinaron por cromatografía gas líquido obteniendo los valores de composición acídica que figuran en la Tabla 7. Estos lípidos comprenden todos los ácidos expuestos en la Tabla 2, como componentes del aceite de semilla, si bien con diferencias porcentuales marcadas y varios componentes meno-

res, señalados en la Tabla 3 (composición acídica exhaustiva del aceite de semilla). Como se verá mas adelante el cromatograma correspondiente a los ácidos totales de la pulpa exhibió los mismos componentes que los encontrados para los lípidos totales de un dulce comercial de "Calafate".

Finalmente una investigación sistemática de otros componentes de la pulpa reveló ausencia de alcaloides y presencia de taninos, flavonoides y fitoesteroles.

3- Examen de un dulce comercial de "Calafate"

Se estudió la composición de un dulce de expendio público en envases herméticos, rotulado como "Dulce de Calafate" y elaborado en Bariloche (Prov. de Rio Negro). Los valores hallados (ver Parte Experimental) fueron los siguientes:

sólidos totales	57,45 % (insolubles 0,33 %)
cenizas totales (500-550°)	0,25 % (sol. 0,17, insol. 0,08)
azúcares reductores (en az. inv.)	41,10 %
azúcares invertibles (en sacarosa)	9,80 %
acidez total (málico)	0,41 %
ácido péctico	1,17 %
nitrógeno total	<0,1 %
extracto etéreo (éter etílico)	0,02 %

El valor de pH del dulce fue 3,40 (ligeramente superior al de la pulpa de B. buxifolia 3,25), la alcalinidad de cenizas (11,0 ml ácido N / g) ligeramente inferior al valor registrado para pulpa de B. buxifolia (12,5 ml ácido N / g); los azúcares revelados en forma directa

por cromatografía en papel fueron glucosa, fructosa y sacarosa y luego de inversión glucosa y fructosa (ausencia de genciobiosa, probablemente por inversión durante la elaboración del dulce); se identificaron ácido málico, cítrico y un ácido urónico por cromatografía en papel (similar a lo ocurrido en pulpa por esa misma técnica) y se constató ausencia de alcaloides y presencia de taninos, al igual que en la pulpa.

El extracto etéreo (éter etílico) del dulce reveló muy baja presencia de lípidos (0,02 %) como se señaló para la pulpa; la composición ácida C.G.L. (ésteres metílicos) de esos lípidos reveló los mismos componentes que los observados para la pulpa de B. buxifolia, aunque con diferencias porcentuales (Tabla 7); las comprobaciones señaladas permiten presumir que la rotulación del dulce examinado sería correcta en el sentido de tratarse de un producto elaborado con pulpa (libre de semilla) de frutos maduros de Berberis, sin que pueda señalarse si han sido de B. buxifolia. A este respecto si tomamos en cuenta los datos obtenidos por Pomilio¹⁷ en frutos maduros de B. buxifolia se observa gran diferencia en el contenido antociánico. Mientras que en el fruto maduro se encuentran diez glicósidos de peonidina, malvidina, delphinidina y petunidina en el dulce estudiado sólo se encontraron tres glicósidos de delphinidina y cianidina; si bien durante el proceso de elaboración del dulce, podrían haberse perdido algunos de los pigmentos presentes en el fruto original (debido a degradaciones de las antocianinas por efecto de la temperatura, pH, alta concentración de

azúcares, atmósfera de oxígeno, etc.⁴⁰⁻⁴¹, no es justificable la aparición de cianidina-3,5-diglucósido (ver composición en antocianos en Tabla 8) en el dulce. Por lo que se juzga que el dulce en cuestión no fue confeccionado con la variedad buxifolia. La falta de información sobre los antocianos presentes en las restantes especies del género Berberis, no permite abrir juicio sobre especie empleada en el producto y justificaría la denominación genérica "Calafate" de uso amplio en el país para distintas especies de Berberis.

P A R T E I I

PARTE EXPERIMENTAL

Estudios sobre frutos

1- Materia prima

Se dispuso de una partida de aproximadamente de 2 Kg de frutos (bayas) maduros de Berberis buxifolia Lam, cosechados en Febrero de 1972 en Lago Argentino, Prov. de Santa Cruz (costas próximas a Calafate). Las bayas se preservaron en heladera (aprox 5°) hasta su transporte por vía aérea a Buenos Aires y su estudio se comenzó de inmediato.

2- Características de las bayas

El valor de peso medio (determinado sobre 30 bayas) fue de 0,80 g: eran prácticamente esféricas desde que sus 2 diámetros oscilaron entre 1,0-1,1 y 0,9-1,1 (determinados sobre 10 bayas). El contenido en semillas osciló entre 8 a 10 por baya. Las bayas eran de color violeta oscuro, así como sus pulpas. El color procedía exclusivamente de las pulpas desde que las cáscaras cuidadosamente liberadas de sus pulpas por lavado acuoso eran de color amarillo-pardo y semitransparentes. Las semillas eran de color negro-parduzco y brillantes.

3- Resolución del fruto en sus partes constitutivas

A los fines de esta separación y de la estimación porcentual de las partes componentes, 30 bayas (23,80 g) se resolvieron manualmente en semilla, película y pulpa. A tal fin cada baya se presionó entre dos dedos, separando la película y el conjunto de pulpa mas semilla, recogiendo estas últimas sobre un Buchner sin papel de filtro. Las películas

se lavaron cuidadosamente con agua (eliminación de restos de pulpa) y la semilla se separó de la mayor parte de la pulpa, eliminando los últimos restos de la misma por lavado acuoso y finalmente dejando secar al aire la semilla residual. Se obtuvieron 5,56 g de semilla y 1,09 g de película secos al aire y por diferencia, se computó 17,15 g de pulpa. Porcentualmente se obtuvieron los siguientes rendimientos: semilla 23,36, película 4,58 y pulpa (por diferencia) 72,06 %.

Siguiendo este procedimiento de separación se trató 1 Kg de frutos separando la semilla que se lavó con agua y con alcohol para acelerar su secado al aire y preservando la pulpa en frasco de tapón esmerilado a -15° hasta su análisis. Las películas se desecharon.

4- Estudios sobre semilla

Se practicaron algunas determinaciones sobre semilla así obtenida, hallando valores de promedio de longitud de 6,5 mm y espesor 2,0 mm (sobre 20 semillas). El peso/HL fue de 68,2 Kg, el peso medio de cada semilla fue 0,02 g (determinado sobre 20 semillas) y el número de semillas por gramo 50.

En forma manual y operando sobre 1,8596 g de semilla se resolvieron en cáscara y pepa, obteniendo 0,8443 g de cáscara (45,1 %) de color prácticamente negro y 1,0153 g de pepa (54,9 %) de color blanco-amarillento. El valor de humedad (100-105 $^{\circ}$) en cáscara fue de 18,95 % y el de la pepa 14,33 %. La humedad sobre semilla entera fue 16,45 %.

5- Extracción (hexano) de semilla entera - aislamiento de aceite crudo de extracción

208,8 g de semilla entera (seca al aire) se molieron y agotaron con hexano técnico en equipo Soxhlet. Después de 20 horas de extracción la semilla molida y así tratada se dejó secar al aire, remolió y agotó nuevamente (la molienda de esta semilla resultó difícil, en razón de la dureza de la cáscara). De la semilla molida y agotada se eliminó el solvente al aire y los últimos restos del mismo en estufa de vacío a 60° , obteniendo así la harina de extracción.

Se recuperó el hexano del extracto por destilación a bañomaría y los últimos restos se eliminaron con pasaje de vapor de agua. El aceite crudo se tomó por éter etílico, lavando en ampolla con solución semisaturada de SO_4Na_2 en agua, deshidrató con SO_4Na_2 , filtró y recuperó el éter por destilación a bañomaría.

Por calentamiento en estufa de vacío (100° , 5 Torr) hasta constancia de peso se obtuvieron 33,10 g de aceite crudo, de color amarillo-verdoso (15,85 % sobre semilla tal cual, 18,97 % sobre semilla seca, 28,86 % sobre pepa tal cual y 33,70 % sobre pepa seca).

6- Tratamiento previo del aceite - Extracción de alcaloides

El total del aceite se disolvió en 700 ml de éter etílico y extrajo por 3 veces en ampolla con 100 ml por vez, de ClH al 5 % v/v, reuniendo los extractos. La solución etérea se lavó con agua hasta reacción neutra al tornasol, trató por SO_4Na_2 (anh.), filtró, recuperó el éter por

destilación a bañomaría y calentó en estufa de vacío (100° , 5 Torr) hasta constancia de peso, obteniendo el aceite libre de alcaloides. Los extractos clorhídricos reunidos se reservaron para su examen ulterior.

7- Estudios sobre el aceite crudo de semilla (libre de alcaloides)

a) Características físico-químicas

El aceite crudo se presentó como un líquido límpido a 20° de color verde-parduzco. Sobre el mismo se determinaron: densidad relativa a $25/4^{\circ}$ (picnómetro); índice de refracción a 25° (A.O.C.S. Official Method Cc 7-25); índice de saponificación (A.O.C.S. Official Method Da 15-45); índice de yodo (Wijs); número de acidez (I.U.P.A.C. II D.1, sobre 0,5 g de aceite); insaponificable total (A.O.C.S. Ca 6b-53, adaptado a los líquidos residuales de la determinación de índice de saponificación); índice de yodo del insaponificable (Rosenmund); esteroles totales⁴² (digitonina); tocoferoles totales²⁹ y número de escualeno (Fitelson, A.O.A. C. Official Method 473, 1955).

La Tabla 1 resume los valores observados para estas determinaciones.

b) Composición acídica - Esteres metílicos

Previamente al estudio de composición acídica se practicó sobre el aceite la reacción de Bellier (aceites de semilla) con resultado positivo y la reacción de Halphen (A.O.C.S. Official Method Cb 1-25), con resultado negativo (ausencia de ácidos ciclopropénicos). Los líquidos resultantes de la titulación de índice de saponificación (efectuado

aproximadamente sobre 2 g de aceite, añadidos de 25 ml de solución de KOH al 4 % en etanol de 96 %), se diluyeron con 40 ml de H₂O y extrajeron por 3 veces con 70 ml por vez de éter etílico. (Separación del material insaponificable). La fase hidroalcohólica reunida con los líquidos procedentes del tratamiento de los extractos etéreos del insaponificable se acidificaron con ácido ClH (1:4, heliantina) extrayendo exhaustivamente los ácidos liberados mediante 3 extracciones con 40 ml de éter etílico por vez. Los extractos etéreos se lavaron a fondo con agua, trataron por SO₄Na₂ (anh.), recuperó el éter a bañomaría, eliminando las últimas trazas por soplado con nitrógeno en caliente.

El total de ácidos obtenidos se hirvió a reflujo por 2 horas con 10 ml de metanol anhidro conteniendo 1,5 % en peso de SO₄H₂ como catalizador³³. Luego de enfriar se diluyó con 20 ml de H₂O y extrajo exhaustivamente en ampolla por 2 veces con 30 ml de éter etílico por vez. Los extractos etéreos se lavaron con H₂O (tornasol) y con solución acuosa de CO₃K₂ al 0,05 % (eliminación de ácidos no esterificados) y finalmente por H₂O. Se recuperó el éter a bañomaría y los ésteres se estacionaron en ampolla de vidrio, cerrada a la lámpara, a -15° hasta su examen por C.G.L. (rendimiento de esterificación 99 %).

Previamente al examen C.G.L. los ésteres metílicos de ácidos totales obtenidos se examinaron en el U.V. a fin de observar conjugación preexistente, principalmente dienos y trienos (230-235 nm y 268 nm respectivamente). Las observaciones se hicieron en celda de cuarzo de 1 cm,

con solución de ésteres en metanol cuya concentración era de 2,144 g/l. (Se observó un pico a 268 nm, D.O. 0,622). La conjugación triénica preexistente se calculó con la expresión $C_3 \% = 0,47 \times K_3$ según lo prescrito en I.U.P.A.C. Anexo II, 1961, obteniendo de ella un valor de 0,136 % en 18:3 conjugado.

c) Examen C.G.L.

Se operó en equipo Perkin Elmer Vapor Fractometer Mod. 154, equipado con detector de llama, columna de vidrio de 3m x 4,5mm de diámetro interno, material de relleno formado por Chromosorb W, lavado ácido (60-80) y adipato de etilenglicol- poliéster (15 % sobre relleno total). Se operó a 200° regulando la temperatura de inyector con la indicación 85 (escala empírica) de registro⁴⁴, (a fin de evitar la producción de "artefacto" en base de linoleato de metilo), nitrógeno como fase móvil (16 psi de presión de entrada) y con inyección de 4 µl de solución de ésteres al 5 % en éter etílico, la Figura 1 reproduce el cromatograma obtenido en que los picos se identificaron por tiempo de retención y las evaluaciones cuantitativas se resolvieron por triangulación. Las respuestas cuantitativas han sido verificadas con anterioridad por examen C.G.L. de mezclas de ésteres metílicos de ácidos grasos de composición conocida, estableciendo concordancia de resultados para la determinación de ácidos linoleico y linolénico por C.G.L. y por examen espectrofotométrico luego de isomerización alcalina (A.O.C.S. Method Cd 7-58, 1960) y por determi-

nación del contenido en ácidos totales saturados según el método de Bertram, así como a través del cálculo de los valores de índice de yodo y saponificación. Los resultados de las evaluaciones por triangulación permitieron calcular la composición acídica (% de ácidos totales) que figura en la Tabla 2.

d) Examen de composición acídica exhaustiva

Como ha sido mencionado y a fin de evidenciar componentes en muy bajas concentraciones u otros de mayor peso molecular (ácidos entre C_{20} a C_{24}), se combinó la destilación fraccionada en vacío de ésteres metílicos de ácidos totales con el examen C.G.L. de las fracciones y residuo de destilación obtenidos. A tal fin 13,29 g de aceite se saponificaron por reflujo durante 2 horas con 4,5 g de KOH y 75 ml de etanol de 96 %; después de enfriar se diluyó con 150 ml de H_2O y efectuaron 5 extracciones con 80 ml de éter etílico por vez, (la primera con 200 ml), aislando 0,1506 g de insaponificable (1,13 %; 67,3 % del insaponificable total). Por acidificación de la capa hidroalcohólica reunida con los líquidos de tratamiento de la solución etérea de insaponificable se aislaron (éter etílico) 12,49 g de ácidos totales (93,98 % sobre aceite). El total de ácidos se esterificó por reflujo de 2 horas con 120 ml de metanol anhidro conteniendo 1,5 % de SO_4H_2 en peso³³ y los ésteres se fraccionaron por destilación en un equipo según Longenecker⁴⁵ (eficacia 12 platos teóricos, medida con mezcla benzol- CCl_4) en vacío de 0,5-1,0 Torr. Se obtu-

vieron 8 fracciones y un residuo, entendiendo por este último los ésteres aislados por lavado etéreo de la columna, balón de destilación y triángulo de separación una vez concluida la destilación. Desde que en el residuo se acumula la parte de insaponificable no extraída por éter después de saponificar el aceite, el residuo se saponificó con potasa alcohólica al 4 %, extrajo el insaponificable remanente con éter (que se determinó cuantitativamente) y recuperó los ácidos del residuo, libres de insaponificable que se reesterificaron con metanol. Se obtuvieron 0,1461 g de insaponificable en el residuo.

Cada fracción de destilación (previamente pesada) y los ésteres metílicos del residuo se examinaron por C.G.L. empleando el equipo y las condiciones antes indicadas y se calcularon sus composiciones en ácidos % de cada fracción y residuo. Teniendo presentes estos valores y los pesos de cada fracción y el residuo se calculó la composición final de los ácidos grasos totales del aceite que figura en la Tabla 3. La Tabla 4 resume la marcha de esa composición acídica (% ácidos totales de cada fracción y residuo de destilación). Los valores encontrados figuran en la Discusión.

e) Reconocimiento de los ácidos linolénico y oleico

Aproximadamente 0,5 g de la fracción número 4 de la destilación anterior (conteniendo aprox. 31 % de 18:3) se saponificó con potasa alcohólica al 4 %, aislando los ácidos totales que se disolvieron en 10 ml de éter etílico anhidro. La solución se enfrió a 0° (hielo) y agregó cuidadosamente bromo hasta ligero exceso. Después de 10 horas el precipitado

se aisló por centrifugación y lavó repetidamente con pequeñas porciones de éter etílico (anh.) enfriado a 0°. El precipitado fundió a 181°, no observándose depresión por fusión mezcla con ácido hexabromoesteárico preparado a partir de ácidos totales de aceite de semilla de lino, con lo cual quedó identificado el ácido linolénico.

Con el fin de identificar ácido oleico se reunieron partes iguales de las fracciones 5, 6 y 7 de la destilación y aproximadamente 6 g de esa mezcla se transformaron en compuestos de inclusión de urea por ebullición a reflujo con 18 g de urea y 65 ml de metanol (relación urea/mol medio de ésteres 15:1). Después de 24 horas los cristales separados por filtración al vacío se recrystalizaron 3 veces por metanol, enfriando a 0° durante la última recrystalización. Los ésteres separados de los aductos de la 2ª y 3ª recrystalización (aislados por descomposición con H₂O y gotas de ClH diluido y extracción etérea) se examinaron por C.G.L. obteniendo los cromatogramas de las Figuras 5 y 6, observando la eliminación total de 18:3 y prácticamente total de 18:2, con un pico principal de 18:1 y en menor proporción 18:0, 16:0 y 17:0 para la 3ª recrystalización. El total de ésteres aislados de la tercera recrystalización de los aductos se saponificó con potasa alcohólica al 4 %, obteniendo aproximadamente 0,4 g de ácidos grasos que se oxidaron con solución de permanganato de potasio en medio alcalino⁴⁶ a temperatura inferior a 10° (los ácidos se añadieron de 40 ml de H₂O, 4 ml de solución acuosa de KOH al 10 %, 320 ml de agua+hielo y 32 ml de solución

acuosa de MnO_4K al 1 %). Después de 5 minutos se añadieron 12 ml de ClH concentrado y 0,5 g de SO_3HNa , aislando por filtración a la trompa el precipitado blanco obtenido, que se lavó exhaustivamente con agua, secó al aire e hirvió con hexano técnico (eliminación de ácidos saturados), el insoluble se recristalizó de metanol obteniendo un producto cristalino que fundió a $131-132^\circ$, no observándose depresión por punto de fusión mezcla con el ácido 9,10-dihidroxiesteárico obtenido a partir de ácido oleico puro.

Los intentos realizados a través de la recristalización de compuestos de inclusión de urea para lograr productos libres de 18:3 y por tanto útiles para reconocer por bromación en éter de petróleo 18:2 fracasaron (18:3 y 18:2 se eliminan en forma conjunta en las recristalizaciones). (ver Discusión).

f) Investigación de esteroides

Se procedió a separar los esteroides a partir de insaponificable por cromatografía en capa delgada de estos últimos según la técnica de Fedeli et al⁴⁷. Se emplearon placas de 20 x 20 cm recubiertas de sílica gel G (5 g de sílica gel en 10 ml de H_2O) utilizando 60 g de esta suspensión por placa, con espesor de 1 mm. Las placas se activaron por calentamiento a 110° durante 90 minutos, sembrando en forma de banda, insaponificable disuelto en mezcla éter etílico-metanol. Se sembraron 93 mg de insaponificable, equivalente a 24 mg de esteroides totales. Paralelamente y en forma separada se sembró una banda de 2 cm de largo con solución de insa-

ponificable y a su lado una mancha de 0,5 cm con patrón colesterol y se desarrolló con mezcla hexano-éter etílico (1:1), durante 35 minutos. Una vez seca al aire la placa, se revelaron las 2 bandas pequeñas por pulverización con 2,7-diclorofluoresceína al 2 % observando bajo luz U.V. de 368 nm la posición del colesterol y la banda de esteroides del insaponificable (fluorescencia verde clara sobre fondo verde oscuro). Por raspado de la banda principal, en la zona de esteroides, seguida por elución con éter etílico y eliminación del solvente se obtuvieron 23 mg de esteroides, destinados al examen C.G.L..

Se empleó un equipo Hewlett Packard 5750-Research Chromatograph, equipado con detector de ionización de llama, columna de 1,80 m x 3 mm de diámetro interno, relleno constituido por Chromosorb W silanizado (80-100), conteniendo 3 % de sílica OV-17 como fase fija, temperatura de la columna 260°, del detector y el inyector 315°, presión de entrada de nitrógeno (fase móvil) 1,6 unidades, atenuación 8×10^3 y con inyecciones de 10 μ l de solución de esteroides al 5 % en cloroformo. Los valores de presión de entrada y temperatura de columna fueron fijados a fin de encontrar las condiciones más convenientes para la resolución de una mezcla de campesterol+ β sitosterol y stigmasterol.

Elegidas las condiciones finales se corrieron patrones de colesterol, mezcla campesterol+ β sitosterol y stigmasterol inyectando 10 μ l de solución al 5 % en cloroformo y registrando los siguientes valores de tiempo de retención (expresados en cm a partir del comienzo del pico de

solvente): colesterol 15,90; campesterol 20,55; stigmasterol 22,40 y β -sitosterol 25,50. Idénticas condiciones operativas se emplearon para los esteroides del insaponificable del aceite, obteniendo el cromatograma de la Figura 7, cuyo análisis revela la principal ocurrencia de β -sitosterol (Tr/Tr colesterol 1,60) y en menor concentración campesterol (Tr/Tr colesterol 1,29) y en muy baja concentración stigmasterol (Tr/Tr colest. 1,41). Además un pico con valor de Tr/Tr colest. 1,80 (Δ^5 -avenasterol ?). otro con Tr/Tr colest. 0,80; uno muy poco perceptible con Tr/Tr colest. 0,99 (colesterol ?) y el más lejano con un valor relativo de tiempo de retención de 2,30.

g) Alcaloides en aceite crudo de semilla

Los líquidos acuosos ácidos (ClH) resultantes del tratamiento del aceite crudo para la extracción de alcaloides se concentraron en Rotavapor observando la formación de cristales. Se alcalinizó con NaOH y extrajo exhaustivamente con Cl_3CH en ampolla (4 extracciones), y de los extractos clorofórmicos lavados con agua se recuperó el solvente obteniendo un residuo de alcaloides no fenólicos (rendimiento 0,56 % respecto de aceite crudo). Los líquidos acuosos agotados se acidificaron (ClH) y trataron con cantidad suficiente de CO_2HNa (para destruir el ClH), añadiendo ligero exceso, extrayendo nuevamente con Cl_3CH (alcaloides fenólicos); por recuperación del solvente se obtuvo un residuo (rendimiento 0,002 % de aceite).

A los fines de fijar el número de alcaloides presentes se hicieron

corridas cromatográficas en capa delgada, usando placas de vidrio de 20 x 20 cm cubiertas por una capa de 0,25 mm de sílica gel G, activadas 1 hora a 110°. Como solventes de desarrollo se usaron las mezclas: Cl_3CH , metanol (7:3); n-butanol, ác. acético, H_2O (10:1:3) y benceno, metanol (3:2, ambiente saturado de NH_3).

Las placas se observaron con luz U.V. (365 nm) antes y después de rociar con el reactivo de Dragendorff modificado por Munier y Machebouer⁴⁸ y para revelar alcaloides fenólicos se utilizó el reactivo de Folin⁴⁹.

Todos los medios de desarrollo produjeron la separación de 4 manchas en la fracción de alcaloides no fenólicos, 2 de las cuales fueron identificadas como berberina y palmitina, por comparación con muestras testigo de esos alcaloides, en los tres medios de desarrollo nombrados, teniendo los siguientes Rf: 0,50 y 0,54 (Cl_3CH -metanol); 0,34 y 0,25 (n-butanol-ác. acético- H_2O) y 0,59 y 0,44 (benceno-metanol) que coincidieron respectivamente con los de berberina y palmitina. Una de las manchas restantes tuvo Rf de 0,36; 0,17 y 0,33 en los tres medios según fueron ordenados antes y la 4ª mancha (que revelaba como fenol) tuvo Rf: 0,72; 0,74 y 0,47, y es la única mancha que apareció en la fracción de alcaloides fenólicos.

8- Harina de extracción de semilla - Análisis general

a) Obtención de la muestra

El producto resultante por el agotamiento con hexano (Soxhlet) de la semilla, se expuso al aire y finalmente se secó en estufa de vacío (45-50°) para eliminar el solvente remanente. Se remolió y preservó en

frasco de buen cierre hasta su análisis. Sobre este producto se practicaron las siguientes determinaciones:

b) Humedad- (A.O.A.C. Official Method 13,3, 1950). Operando sobre 2 g (estufa de vacío, 100° hasta constancia de peso), se obtuvo un valor de 7,58 %.

c) Cenizas- (A.O.A.C. Official Method 13.6, 1950). Operando sobre 1 g de muestra se calcinó en cápsula de platino a 500-550° hasta obtención de cenizas blancas que representaron 2,64 %.

d) Nitrógeno total- (Macro método Kjeldahl, A.O.A.C. Official Method 2.24, 1950). Efectuando la digestión con mezcla SO_4K_2 , SO_4Cu y SO_4H_2 , el valor promedio de 2 determinaciones fue 2,71 %. Empleando el factor 6,25 y expresando los resultados sobre sustancia seca el contenido de proteína "bruta" fue de 18,32 %.

e) Fibra cruda- (A.O.A.C. Official Method 21.038, 1965). Se operó directamente sobre harina por estar prácticamente libre de aceite. El valor promedio de 2 operaciones fue de 10,66 %.

f) Extracto acuoso-⁵⁰ Alrededor de 5 g de harina exactamente pesados se colocaron en Erlenmeyer de 250 ml, agregó 100 ml de H_2O destilada y taró el conjunto. Se llevó a ebullición suave, que se mantuvo durante 30 minutos, se dejó enfriar y reestableció el peso inicial con H_2O destilada, filtrando por papel, del filtrado se midieron 20 ml que se llevaron a seco en Rotavapor, secando finalmente hasta peso constante en estufa de vacío (100°); el valor obtenido fue 18,40 %.

g) Acidez del extracto acuoso- 20 ml del filtrado obtenido según f) se titularon con solución de NaOH 0,1 N (fenolftaleína); el resultado expresado en mg KOH / g de harina fue de 10,30 (equivalente a 1,23 % de harina como ácido málico).

h) Extracto clorofórmico- 20 g de harina se agotaron en Soxhlet por cloroformo (24 horas). Por recuperación del solvente en Rotavapor y calentamiento en estufa de vacío (100°) hasta constancia de peso se obtuvo un valor de extracto clorofórmico de 1,44 % (lípidos residuales).

i) Azúcares reductores- (A.O.A.C. Official Method 22.043, 1965). Se operó sobre 10 g de harina neutralizada con 1 g de CO_3Ca , procediendo al agregado de 125 ml de etanol 50 % (en volumen) y calentando en baño de agua a 83-85° durante 1 hora. Una vez frío se dejó en reposo por varias horas y llevó a volumen de 250 ml con etanol neutro de 95 %, mezcló y centrifugó (15 min. 1500 rpm). 200 ml de sobrenadante se concentraron (Rotavapor) a $\frac{1}{10}$ del volumen inicial (eliminación de alcohol) y el líquido resultante se defecó con solución saturada de acetato de plomo, eliminando el exceso con oxalato de potasio y filtrando por papel seco, sobre alícuotas de 20 ml se determinaron por duplicado azúcares reductores según Munson y Walker⁵¹ (pesada de Cu_2O), obteniendo valores coincidentes de 4,14 % expresado en azúcar invertido.

j) Azúcares invertibles- (A.O.A.C. Official Method 29.23, 1950). 20 ml de la solución obtenida en i) se trataron por inversión con 2,5 ml

de ClH 6:1,10, calentando a bañomaría por 20 minutos, enfriando y neutralizando la solución con NaOH 10 % (tornasol), llevando a volumen final de 50 ml; operando sobre alícuotas de 20 ml (Munson y Walker, por pesada) se obtuvieron valores coincidentes de 2,44 % para azúcares invertibles, expresados en sacarosa.

k) Hidratos de carbono sacarificables- (A.O.A.C. Official Method 22.45, 1965). Se operó sobre 1,5 g de harina que se suspendieron en 100 ml de H₂O destilada, añadidos de 10 ml de ClH 6:1,125; luego de 2 horas de ebullición (reflujo) se neutralizó con solución 10 % NaOH (tornasol), llevó a volumen de 200 ml y filtró. Sobre alícuotas de 40 ml de filtrado se determinaron azúcares por sacarificación (Munson y Walker por pesada), obteniendo un valor de 17,85 % expresado en almidón.

La investigación específica de almidón resultó negativa.

l) Rendimiento en furfural por destilación con ClH 12 % -(A.O.A.C. Official Method 22.050, 1965) Por estricta aplicación de esta técnica a 3 g de harina y a través de la formación de floroglúcido se encontró un valor de rendimiento en furfural de 4,04 %. Este valor se ha tenido en cuenta en la Discusión de la Parte Experimental en relación a la determinación de poliurónidos.

m) Determinación de poliurónidos- Se llevó a cabo a través de la determinación de CO₂ desprendido por tratamiento con ClH 19 % en peso, empleando la micro-técnica de Barker et al³⁸. Se realizaron 3 determinaciones empleando tiempos de tratamiento de 2, 3 y 5 horas, obteniendo va-

lores constantes para las 2 últimas; el valor hallado, expresado en poliurónico (ácidos urónicos x 0,908) fue de 17,60 %.

n) Análisis cualitativo de hidratos de carbono por cromatografía en papel- Fracciones de 10 ml de las soluciones usadas para la determinación de azúcares reductores totales y azúcares invertibles se llevaron a sequedad (vacío, 40°), los residuos se tomaron con piridina anhidra, filtró por papel, (eliminación de sales inorgánicas), y volvió a llevar a sequedad (vacío, 40°). Estos residuos se trataron por 2 veces con etanol 96 %, con el objeto de eliminar los restos de piridina y se volvieron a llevar a sequedad. Los residuos finales se tomaron con 2 ml de etanol (96 %), sembrando sobre papel Whatmann Nº 1, junto con patrones de comparación de los siguientes hidratos de carbono: glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, xilosa, manosa y arabinosa (disueltos en agua a razón de 10 mg/ml).

Los cromatogramas se corrieron en forma descendente, con un tiempo de desarrollo de 20 horas, dejando secar al aire por 2 horas y revelando por inmersión o pulverizado según el caso. Como solvente de desarrollo se usó n-butanol, piridina, H₂O(10:3:3)(buena separación) y n-butanol, ác. acético, H₂O (4:1:5), para verificación de manosa.

El revelador general usado fue NO₃Ag en CH₃OH 0,3 % + Na metálico en CH₃OH 7 % + NH₃ en CH₃OH 16 % (5:2:1)⁵² para azúcares reductores; para cetosas se usó resorcina (40 mg) + 10 ml de butanol + 10 ml de ClH 0,25 N y para grupos hidroxilos vecinales metaperyodato de sodio al 2 %

en agua + MnO_4K al 1 % en CO_3HNa al 2 % en agua (4:1)⁵³.

Sobre el líquido de determinación de azúcares reductores se identificaron: glucosa, fructosa, manosa y sacarosa; el líquido anterior luego de invertir presentó los mismos monosacáridos (glucosa, fructosa y manosa) y una mancha que no pudo ser identificada en base a los patrones usados, persistente en cromatogramas obtenidos sobre hidrolizados con SO_4H_2 (2 %) por ebullición durante 1 hora.

ñ) Evaluación de alcaloides- 10 g de harina se suspendieron en 100 ml de metanol y dejaron en reposo durante una noche, luego se calentó a reflujo sobre bañomaría durante 4 horas, filtró en caliente y evaporó (vacío, 50°). El residuo se tomó con 20 ml de ClH al 1 %, calentando a $50-60^\circ$ para favorecer la disolución, filtró luego por una capa de Celite, el residuo se trató nuevamente con 10 ml de ClH 1 %, juntando ambas fracciones luego de filtrar. El filtrado se alcalinizó hasta pH 10 (papel universal) con NH_3 concentrado, extrajo por 2 veces con 60 ml de Cl_3CH , la fracción clorofórmica se lavó con 20 ml de agua. La fracción clorofórmica se secó sobre SO_4Na_2 (anh.), filtró, concentró en vacío (50°) y secó sobre bañomaría, dejando finalmente una noche en desecador. El residuo correspondió a 0,42 % de la harina.

Con el residuo se corrieron placas de sílica gel tal como se explicó en el punto 7-g). Los valores encontrados para las 4 manchas presentes, son prácticamente iguales a los anteriores.

o) Investigación sistemática de otros componentes- Se aplicó estric

tamente una marcha analítica para la Investigación Química de Vegetales⁵⁴. Como resultado se evidenció la presencia de alcaloides y fitoesteroles.

9- Estudio sobre composición de pulpa

Sobre pulpa preservada como se indicó en 3- se practicaron las siguientes determinaciones analíticas:

a) Extracto seco- (A.O.A.C. Official Method 20.010, 1965). Alrededor de 20 g de pulpa se colocaron en cristizador (8 cm de diámetro) y evaporó a no más de 70° y finalmente en estufa de vacío 70° (presión menor de 100 Torr) hasta observar diferencias no mayores de 3 mg entre pesadas luego de 2 horas de tratamiento. Se obtuvo un valor de 15,44 %.

b) Cenizas- (A.O.A.C. Official Method 11.021, 1965). Se operó sobre alrededor de 6 g de pulpa con temperatura final de 500-550°. El valor obtenido fue 0,75 %.

c) Alcalinidad de cenizas- (A.O.A.C. Official Method 11.021, 1965). Por aplicación de esta técnica se obtuvo un valor de 12,5 ml de ácido 1 N/ g cenizas. Equivalente a 9,4 ml de ácido 1 N por 100 g de pulpa.

d) Densidad relativa- (Picnómetro). Se obtuvo un valor de densidad relativa $d_4^{25} = 1,053$.

e) Valor de pH- Se determinó con equipo Metrohm Herisau E 396 B con electrodo de vidrio combinado; el valor obtenido a 20° fue de 3,25.

f) Nitrógeno total- (Macrométodo Kjeldahl, A.O.A.C. Official Method 2,24, 1950). Se operó sobre 6 g de pulpa observando un valor promedio de 0,17 %. Expresado empleando el factor 6,25, el contenido en proteína

"bruta" fue de 1,06 %.

g) Acidez volátil- (Cazenave-Ferré) Por estricta aplicación de este método se encontró un valor de acidez volátil de 0,014 % expresada en ácido acético.

h) Acidez total- Se efectuaron 3 formas de valoración: Con solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,05 N y considerando el viraje de los pigmentos propios de la pulpa (viraje del rojo al verde, a pH 7,04 estimado durante la titulación potenciométrica); por titulación con solución de NaOH 0,1 N y azul de bromotimol como indicador externo (pH de viraje 6 → 7,6) y finalmente titulación potenciométrica.

A los fines de las 2 primeras se partió de aproximadamente 7-9 g de pulpa diluida en 50 ml de agua destilada recientemente hervida y enfriada. Para la titulación con solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e indicador propio de la pulpa se encontró un valor de 1,52 % expresado en ácido málico, prácticamente equivalente al hallado por titulación con NaOH y azul de bromotimol (1,56 % como ácido málico).

La titulación potenciométrica se practicó sobre 1 g de pulpa diluida con 10 ml de agua destilada, empleando electrodo de vidrio combinado (equipo Metrohm E 396 B) y agitador magnético, se operó a temperatura ambiente (20°) registrando las variaciones de pH en función de los agregados de solución de NaOH 0,01 N (cada 0,5 ml). De la representación de los valores de pH en función de los ml de álcali agregados y en base a los incrementos correspondientes se calculó la derivada primera y segun-

da, que permitió obtener el pH y la cantidad de álcali agregado al punto de inflexión principal que son respectivamente 8,25 y 26,17 miliequivalentes (correspondientes a 1,75 % de ácido málico en la pulpa). El valor al que se observó el primer indicio de cambio de color de la pulpa fue de 7,04.

i) Acidos pécticos- (A.O.A.C. Official Method 20.040, 1965). Se practicó este método (solubilización en medio ClH, saponificación con 1% de NaOH en frío, precipitación de ácidos pécticos, redisolución y reprecipitación, aislamiento e incineración) sobre 20 g de pulpa obteniendo un valor de 0,29 % de ácido péctico.

j) Determinación de azúcares- A los fines de calcular las concentraciones en los azúcares presentes identificados por cromatografía en papel (ver más adelante) se practicaron determinaciones de azúcares reductores (Bertrand) y azúcares invertibles (Bertrand). Además, por yodometría se determinaron aldosas antes y después de inversión y por aplicación de la técnica de Shaffer y Somogyi las concentraciones de cetosas antes y después de inversión.

j₁) Azúcares reductores e invertibles- Se partió de alrededor de 3 gramos de pulpa, que se llevó a neutralidad con solución de NaOH 0,1 N (indicador propio), agregó 5 ml de agua destilada y solución saturada de acetato de plomo neutro gota a gota para producir un precipitado flo-culento, centrifugando a cada agregado hasta producir precipitación completa, luego con solución de oxalato de sodio se comprobó que no quedara

plomo en el sobrenadante. El precipitado se lavó y centrifugó 3 veces con 7-8 ml de H_2O , juntando todas las soluciones sobrenadantes y llevando a volumen de 100 ml.

50 ml de la solución anterior se invirtieron por agregado de 5 ml de ClH 1,10, calentando 15 minutos a $60 \pm 3^\circ$, neutralizó con $NaOH$ (torna sol) y se llevó a 100 ml.

Los hidratos de carbono fueron determinados por el método de Bertrand⁵¹ usando para el examen de azúcares reductores 20 ml de la solución respectiva y para azúcares invertibles 25 ml. Como azúcares reductores se encontró un valor de 8,68 ‰, expresado en azúcar invertido y como invertibles 0,66 ‰ en sacarosa.

j₂) Aldosas y cetosas antes y después de inversión- 16 g de pulpa fueron liberados de proteínas y clarificados por agregado de 2 g de crema de albúmina, llevando a 200 ml con agua. Se filtró descartando los primeros 40 ml, del filtrado siguiente 75 ml se llevaron a 100, determinándose aldosas por el método de Marshall y Norman⁵⁵ sobre 20 ml de esta solución. 50 ml de una solución así preparada fueron invertidos con 7 ml de ClH 1,10 en la forma detallada en j₁) llevando a un volumen final de 100 ml, usándose para cada determinación yodimétrica 20 ml. Se registró un contenido de aldosas antes de inversión de 5,72 ‰ y de 6,27 ‰ después de inversión, ambas expresadas en glucosa. Para la determinación de cetosas, a partir de soluciones de azúcares preparadas de igual manera que para aldosas, se tomaron 20 ml a los que se agregó 40 ml de solu-

ción 0,25 N de yodo y 25 ml de NaOH 0,1 N. luego de 10 minutos de reposo se acidificó con 5 ml de SO_4H_2 1 N y redujo cuidadosamente el yodo liberado con solución de SO_3Na_2 al 1 % (almidón como indicador), se neutralizó el ácido con solución de NaOH 1 N (bromocresol verde) y llevó a 250 ml con agua. Sobre 5 ml de solución así preparada se aplicó la técnica de Shaffer-Somogyi⁵⁶. El contenido en cetosas encontrado fue de 3,43 % antes de inversión y de 3,74 % después de inversión, ambos expresados en fructosa.

k) Identificación de azúcares por cromatografía en papel- A fracciones de 10 ml de las soluciones preparadas según j₁), se les aplicó el mismo tratamiento que el descrito en 8-n) las soluciones así preparadas fueron sembradas sobre papel Whatmann Nº 1 junto con patrones de comparación de los siguientes azúcares puros: glucosa, fructosa, arabinosa, manosa, ramosa, sacarosa, rufinosa, celobiosa y genciobiosa.

Los medios de desarrollo fueron las mezclas de los siguientes solventes: n-butanol-piridina-agua (6:4:3): n-butanol-etanol-agua (10:4:4) y acetato de etilo-piridina-agua (1):4:4), con tiempos de desarrollo entre 20 y 36 horas. Los reveladores utilizados fueron los mismos que para hidratos de carbono en harinas 8-n). Con lo cual se demostró la presencia de glucosa, fructosa, sacarosa y genciobiosa en la muestra sin invertir y solamente glucosa y fructosa luego de inversión.

l) Identificación de ácidos fijos-

l₁) Aislamiento de ácidos polibásicos- 20 g de pulpa se trataron

de acuerdo a la técnica A.O.A.C. Official Method 20,046, 1965, para la eliminación de pectinas y la solución resultante luego de neutralizada se acidificó con ácido acético como indica la técnica de aislamiento de ácidos polibásicos A.O.A.C. Official Method 20.050, 1965, luego por agregado de $(\text{AcO})_2\text{Pb}$ sólido y centrifugado tras cada agregado, se consiguió precipitación total. El precipitado se lavó con alcohol 80 % por suspensión y centrifugación, finalmente se suspendió en 150 ml de agua, pasó una corriente de SH_2 hasta saturación, filtró por papel y concentró al vacío (50°) hasta un volumen de 4 ó 5 ml, que se usó para las cromatografías siguientes:

1₂) Cromatografía en papel- La solución de ácidos se sembró junto con testigos puros de ácidos: quínico, ascórbico, tartárico, cítrico, málico, siríngico, succínico, fumárico y glucurónico sobre papel Whatmann Nº 1. Los cromatogramas se desarrollaron en una mezcla de solventes resultante de mezclar y dejar saturar volúmenes iguales de 1-pentanol y ácido fórmico acuoso 5 M, con corridas durante una noche; luego de secar en corriente de aire frío por 2 horas, se roció con los siguientes reveladores: a) azul de bromofenol (0,04 % en etanol 95 %; pH ajustado a 7), b) nitrato de plata amoniacal (partes iguales de NO_3Ag 0.1 N y NH_4OH 0,1 N y c) vanadato de amonio (sol. saturada)⁵⁷.

Por observación directa de los cromatogramas o bajo luz U.V. (368 nm) se encontraron en las manchas sembradas con el extracto de ácidos polibásicos, los ácidos málico, ascórbico y cítrico. Se corrieron también cro

matogramas en los cuales se sembró una gota de la pulpa tal cual, en esas condiciones aparecía una nueva mancha que se correspondía con la de ácido glucurónico.

1₃) Cromatografía en capa delgada de celulosa- Para confirmar la presencia de un ácido urónico se adaptó la técnica de cromatografía en capa delgada de Petri et al⁵⁸.

Sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm se extendió una suspensión de polvo de celulosa Whatmann CC 41, secando luego en estufa a 105° durante 1 hora. Se sembró pulpa del fruto junto con testigos de los ácidos málico, glucurónico y galactourónico y los siguientes azúcares: glucosa, galactosa, fructosa, sacarosa y genciobiosa. El solvente de desarrollo fue una mezcla de ácido fórmico-agua-terbutanol-metiletiletona (15:15:40:30), con 2 corridas sucesivas durante 80 minutos. Las placas se revelaron por partes con solución de azul de bromofenol (ver cromatografía en papel) y con solución de clorhidrato de p-anisidina al 2% (110° durante 10 minutos). Con el primer revelador se detectaron manchas correspondientes a ácido málico y ácido glucurónico y con el segundo una mancha color marrón-verdoso correspondiente a glucosa, muy próxima a ella una color rojo-ce-reza correspondiente al ácido glucurónico (buena separación entre los testigos de ácido glucurónico y ácido galactourónico), 2 manchas marrón débil (sacarosa y genciobiosa) y una amarillo fluorescente (fructosa).

1₄) Cromatografía en fase gaseosa- Se logró por C.G.L. de los ésteres metílicos sililados de los ácidos fijos.

Una alícuota del concentrado de ácidos fijos (obtenido según 1₁) conteniendo aproximadamente 56 mg de ácidos (5 g de pulpa) se deshidrató en Rotavapor a temperatura no mayor de 60° y luego en desecador (Cl₂Ca) por una noche. El residuo se trató con 30 ml de metanol anhidro hasta máxima disolución y filtró por papel de un insoluble. el filtrado se llevó a seco en un Rotavapor y el residuo se disolvió en 10 ml de éter anhidro, enfrió en hielo y trató con solución etérea de diazometano al 3 %⁵⁹. El agregado de diazometano se continuó en pequeñas dosis hasta observar color amarillo persistente y cese de desprendimiento de nitrógeno; se llevó a seco en Rotavapor a temperatura no mayor de 40° y el residuo se pesó y disolvió en piridina anhidra a razón de 1 ml por cada 10 mg de residuo. En un tubo de centrifuga se midió el equivalente a 10 mg de ésteres, agregó 0,2 ml de hexametildisilazano, agitó, añadió 0,1 ml de clorotrimetilsilano, agitó nuevamente y tapó bien el tubo; se dejó reposar por 30 minutos y centrifugó (15 minutos, 3000 rpm), tomó con pipeta la mitad del sobrenadante que se trasvasó a un dedo de vidrio con esmeril, eliminando los líquidos en Rotavapor a temperatura de 40°. El residuo se disolvió en 3 ml de ciclohexano anhidro, empleando esta solución para inyectar en el cromatógrafo. Se utilizó un equipo Perkin Elmer Vapor Fractometer Mod. 154 con columna de 2 metros por 4 milímetros de diámetro interno con relleno de Chromosorb G-HP silanizado (80-100) conteniendo 4 % de "silicona rubber" como fase fija, N₂ como fase móvil, temperatura 120°, presión de entrada 10 psi y empleando

4, μ l de solución en las inyecciones. Previamente se corrieron patrones de ácidos málico, tartárico y cítrico esterificados y sililados, obteniendo el cromatograma de la Figura 8. La Figura 9 corresponde al cromatograma de los ácidos fijos de la pulpa examinada, en el que se observan además de ácido málico 6 picos menores con Tr/Tr málico de 1,42- 1,84- 2,01- 3,21- 4,19- 5,42 correspondientes a componentes no identificados. Por triangulación de este cromatograma, la concentración de ácido málico fue de 96,5 %, 2,2 % para el componente de Tr/Tr málico 1,42 y 1,3 % para el conjunto de los restantes.

1.5) Determinación de ácidos cítrico y málico- Como complemento de las determinaciones de acidez fija e identificaciones de ácidos fijos, se aplicó los Official Method A.O.A.C. 20.048 al 20.051 a la determinación de ácido cítrico (revelado como existente por la cromatografía en papel y no presente por la cromatografía gaseosa) obteniendo un valor de 0,12 % expresado en ác. cítrico. Así mismo y por aplicación de los Official Method A.O.A.C. 20.052 al 20.055 se determinó el contenido de ácido málico que resultó ser 1,03 % como ác. málico.

n) Lípidos extraíbles por éter etílico- 17 g de pulpa se disolvieron en 70 ml de agua extrayendo con éter etílico (3 extracciones con 50 ml por vez), los extractos reunidos se lavaron por agitación con agua, trataron con SO_4/Na_2 (anh.) recuperando el solvente a bañomaría y calentando el residuo hasta constancia de peso (100° , 5 Torr). Se obtuvieron 7,2 mg de lípidos (0,04 %).

Este residuo se saponificó con KOH al 4 % en etanol, aislando los ácidos totales que se esterificaron con metanol, obteniendo los ésteres que se examinaron por C.G.L. en las condiciones descritas en 7-c). La Figura 10 reproduce el cromatograma obtenido.

ñ) Investigación sistemática de otros componentes- Se aplicó estrictamente una marcha analítica para la investigación química de vegetales⁵⁴; se evidenció la presencia de taninos, flavonoides / fitosteroles. La pulpa examinada no contenía alcaloides.

10- Examen de un dulce de "Calafate"

Se procedió al examen de composición general de un dulce de "Calafate" de venta pública, adquirido en la Capital Federal y elaborado en Bariloche (Prov. de Rio Negro). El producto tiene aprobación oficial y se expende en recipientes de vidrio herméticos con contenido de 454 g.

La composición general determinada por aplicación de las técnicas A.O.A.C. reveló los siguientes valores:

Sólidos totales: 57,45 %, sólidos insolubles 0,33 %, cenizas totales (500-550°) 0,25 %, (solubles 0,17 %, insolubles 0,08 %), alcalinidad de cenizas solubles 11,0 ml de ácido 1N /gramo, azúcares reductores (en azúcar invertido) 41,10 %, azúcares invertibles (en sacarosa) 9,80 %, acidez total (en ácido málico) 0,41 %, valor de pH (20°) 3,40, ácido péctico 1,17 %, nitrógeno total Kjeldahl 0,1 %, extracto en éter etílico (lípidos) 0,02 %.

La investigación de azúcares por cromatografía en papel revela,

fructosa, glucosa y sacarosa por examen directo y fructosa y glucosa por examen después de inversión.

La investigación de ácidos orgánicos por cromatografía en papel revela la existencia de ácido málico, cítrico y un ácido urónico.

La investigación sistemática de otros componentes⁵⁴ mostró ausencia de alcaloides (al igual que en la pulpa de frutos de B. buxifolia) y presencia de taninos.

b) Antocianos presentes en el dulce

b₁) Extracción de los pigmentos- Cantidades entre 5 a 10 g del dulce se trataron con volúmenes iguales de metanol y evaporó al vacío (40°) hasta sequedad. Se tomó el residuo con ác. clorhídrico metanólico 1 % (10 a 12 veces el peso del residuo), guardó en heladera bajo atmósfera de N₂ durante 24 hs, al cabo de ese tiempo se filtró bajo trompa de vacío y concentró (Rotavapor, 40°) hasta obtener una solución siruposa.

b₂) Aislamiento y purificación- Los pigmentos fueron aislados por cromatografía preparativa mediante técnica descendente, para ello el extracto metanólico se sembró en banda sobre papel Whatmann 3 MM, se usó como solvente de desarrollo la capa superior de la mezcla n-butanol-ác. acético-agua (4:1:5), con tiempos de desarrollo de 40 hs, con lo cual se obtuvieron 2 bandas (S e I). Las bandas obtenidas luego de la corrida cromatográfica fueron eluidas con la mezcla agua-metanol-ác. acético (5:90:5). En todos los casos se purificó las bandas por cromatografía de los eluidos anteriores, una vez concentrados (Rotavapor, 40°),

por cromatografía preparativa sobre papel Whatmann 3 MM, usando como solvente de desarrollo ácido acético al 15 % en agua. En este medio la banda I se desdobló en 2 bandas (I_1 e I_2), eluyendo en la forma antes mencionada, se obtuvieron 3 fracciones que fueron estudiadas.

b₃) Identificación de las antocianinas-

Espectroscopía- Se realizó empleando un espectrofotómetro Beckman DK 2 de registro automático en la zona U.V. y visible. Los pigmentos llevados a sequedad (vacío 40°) se tomaron a razón de 1 mg/ml con metanol-ClH 0,01 % (p/v)⁶⁰. Los desplazamientos batocrómicos del máximo del visible se determinaron agregando a 2,5 ml de la solución metanólica, 3 gotas de una solución al 5 % en etanol absoluto de Cl_3Al (anh.).

Cromatografía- De cada uno de los pigmentos se desarrollaron cromatografías sobre papel Whatmann N° 1 contra testigos auténticos aislados de diferentes especies, usando los siguientes medios de desarrollo: a) n-butanol-ác. acético-agua (4:1:5), fase superior preparada inmediatamente antes de su empleo. b) n-butanol-ClH 2N (1:1), capa superior (estabilización de los papeles 24 hs.. c) ClH (c)-agua (3:96, 1/3), d) ác. acético-ClH (c)-agua (15:3:82)⁶¹.

Oxidación degradativa- Se efectuó sobre cada uno de los pigmentos con H_2O_2 siguiendo la técnica descrita por Karrer y Meuron⁶², modificada por Chandler y Harper⁶³. Los productos de oxidación se estudiaron cromatográficamente en papel Whatmann N° 1, desarrollando en n-butanol-piridina-agua (9:5:8) utilizando los azúcares testigo correspondientes, que

se revelaron con el reactivo de Petronici ⁴³.

Los datos espectroscópicos, valores de Rf en los diferentes solventes así como los obtenidos por oxidación degradativa de cada uno de los pigmentos se consignan en la tabla 8.

Los espectros U.V. y visible de los pigmentos no presentaron absorción en la zona de 300-330 nm, indicando ausencia de antocianinas aciladas.

De acuerdo a los resultados obtenidos y a la confirmación contra testigos auténticos los pigmentos se identificaron como: I₁=delfinidina-3-glucósido; I₂=cianidina-3,5-diglucósido y S=delfinidina-3,5-diglucósido.

Tabla 1- Aceite de semilla de Berberis buxifoliaCaracterísticas físico-químicas

Densidad relativa (25/4°)	0,9235
Índice de refracción 25°	1,4774
Índice de saponificación	198,2
Índice de yodo	166,1
Nº de acidez (mg KOH/g)	4,4
Insaponificable total %	1,68
Índice yodo insaponificable	110,3
Esteroles totales mg % g	436
Tocoferoles totales como α -tocoferol mg % g	28,5
Nº de escualeno mg % g	30,6
Reacción de Bellier (aceites de semilla)	positiva
Reacción de Halphen (ácidos ciclopropénicos)	negativa

Tabla 2- Aceite de semilla de Berberis buxifoliaComposición acídica

<u>Acido</u>	<u>% de ác. totales</u>
12:0	vest
14:0	0,1
16:0	8,5
16:1	0,1
17:0	vest
17:1	vest
18:0	1,9
18:1	23,5
18:2	29,1
18:3	36,8
20:0	vest
20:1	vest

Indice de yodo ácidos totales (calculado) 174,7

Indice de yodo aceite (determinado) 166,1; (calculado) 166,0

Tabla 3- Aceite de semilla de Berberis buxifolia -Composición acídica exhaustiva

<u>Acido</u>	<u>% de ác. totales</u>
12:0	vest
14:0	0,07
15:0	0,01
16:0	7,87
17:0	0,02
18:0	1,68
20:0	vest
22:0	vest
24:0	vest
15:1	0,01
16:1	0,15
17:1	0,02
18:1	23,16
20:1	vest
18:2	29,21
18:3	37,80

Indice de yodo ácidos totales (calculado) 175,3

Indice de yodo aceite (determinado) 166,1; (calculado) 166,7

Tabla 4- Destilación fraccionada de ésteres metílicos de ácidos totales de aceite de semilla de B. buxifolia. Composición acídica (C.G.L.) de las fracciones y residuo de destilación.

Fracción Nº	Peso g	%	Ácidos % ácidos totales en fracción											
			12:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	15:1	16:1	17:1	18:1	18:2	18:3
1	0,19	1,49	0,1	3,1	0,3	91,9	-	-	0,7	1,8	-	0,4	1,1	0,6
2	0,44	3,46	vest	0,6	0,1	83,3	vest	-	0,1	2,1	vest	2,8	6,5	4,5
3	0,65	5,11	vest	0,1	-	50,8	0,2	0,2	-	0,9	0,2	11,9	18,6	17,1
4	1,30	10,21	-	vest	-	6,9	0,1	1,1	-	-	0,1	25,1	26,0	30,7
5	1,90	14,93	-	-	-	0,9	-	1,2	-	-	-	24,5	34,8	38,6
6	1,98	15,55	-	-	-	0,5	-	1,5	-	-	-	25,2	31,6	41,2
7	2,20	17,28	-	-	-	0,2	-	2,0	-	-	-	25,7	30,7	41,4
8	1,31	10,23	-	-	-	0,1	-	2,7	-	-	-	23,8	28,0	45,4
Resid. (x, xx)	2,76	21,68	vest	-	-	0,3	-	2,4	-	-	-	25,0	27,9	44,4

(x) libre de insaponificable

(xx) contiene además vestigios de 20:0, 22:0, 24:0 y 20:1.

Tabla 5- Harina de extracción de semilla de Berberis buxifoliaComposición general

	<u>% harina tal cual</u>
Humedad (100°, vacío)	7,58
Cenizas (500-550°)	2,61
Nitrógeno total (Kjeldahl)	2,71
Proteína "bruta" (N x 6,25, S.S.S.)	18,32
Fibra cruda (A.O.A.C.)	10,66
Azúcares reductores (az. invertido)	4,14
Azúcares invertibles (en sacarosa)	2,44
Hidratos de carbono sacarificables (en almidón)	17,85
Poliurónidos	17,60
Extracto clorofórmico	1,44

Tabla 6- Pulpa de frutos maduros de Berberis buxifoliaComposición química

Densidad relativa (25/4°)		1,053
Extracto seco	%	15,44
Cenizas (500-550°)	%	0,75
Nitrógeno total (Kjeldahl)	%	0,17
Proteína "bruta" (N x 6,25)	%	1,06
Acidez volátil (en ác. acético)	%	0,014
Acidez total (en ác. málico)	%	1,75
Acido péctico (A.O.A.C.)	%	0,29
Monosacáridos (glucosa+fructosa)	%	9,12
Disacáridos (sacarosa+genciobiosa)	%	0,84
Extracto etéreo	%	0,04

Tabla 7 Lípidos de pulpa de B. buxifolia y de dulce de "Calafate"

Composición acídica - % de ácidos totales

Acidos	Pulpa B. buxifolia (*)	Dulce de Calafate
12:0	0,4	1,0
13:0	0,1	0,1
14:0	1,9	3,9
14:1	0,5	0,1
15:0	0,5	1,2
15:1+r-16:0	0,1	0,4
16:0	29,3	21,6
16:1	3,8	7,2
17:0	0,3	0,7
17:1	0,3	0,8
18:0	3,3	5,5
18:1	13,1	25,1
18:2	28,4	25,6
18:3	14,4	6,8

(*) además 3,6 % de 20:2 ?

en ambos trazas de 10:0, 11:0, 12:1, r-14:0, r-15:0,

20:0 y 20:1.

Tabla 2- Identificación de antocianos en dulce de "Calafate"

Pigmento	Espectro de absorción (x)		Producto de oxidación	RF x 100 (xx)		
	λ max. (nm)	$\Delta\lambda$ AlCl ₃ (nm)		BAA	Bu-ClH	AcOH-ClH
S	272; 530	45	glucosa	9	4,5	7
I ₁	276; 534	37	glucosa	20	14	2
I ₂	274; 520	38	glucosa	23	7,5	11

(x) en metanol conteniendo 0,01 % de ClH concentrado.

(xx) sobre papel Whatmann No 1. Abreviaturas: BAA (n-butanol-ác. acético-agua; 4:1:5); Bu-ClH (n-butanol-ClH 2N: 1:1); 1 % ClH (ClH conc.-agua 3:97); AcOH-ClH (ác. acético-ClH conc.-agua; 15:2:82).

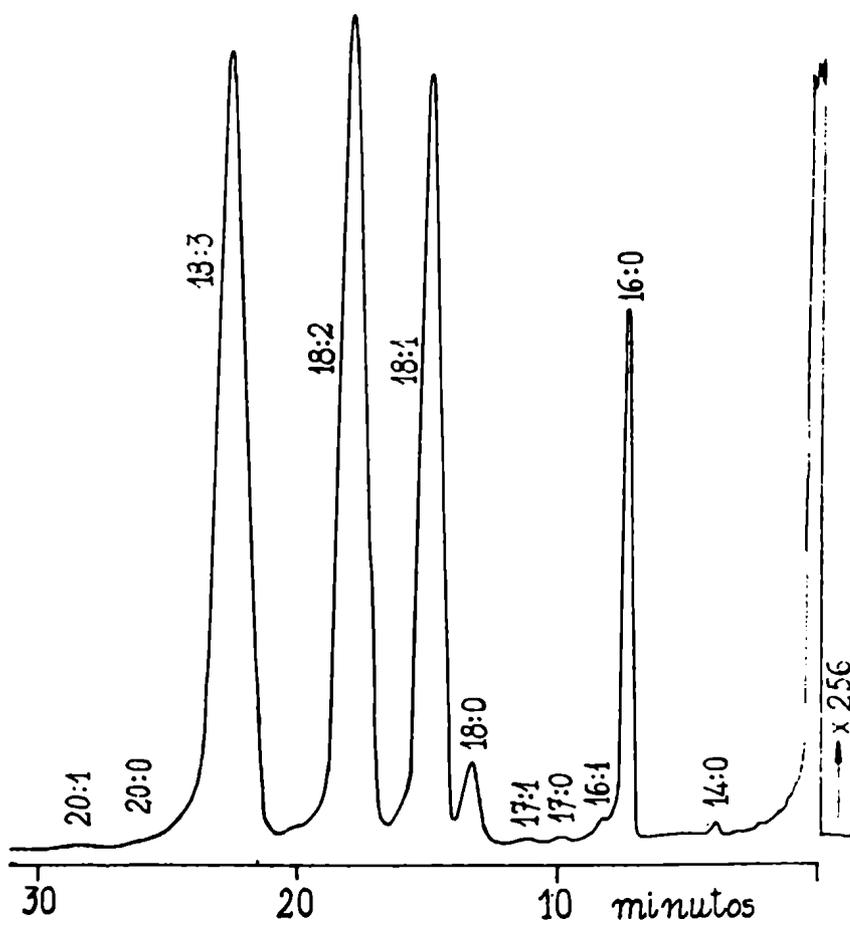


Figura 1- Cromatografía gas líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales del aceite de semilla de Berberis buxifolia.

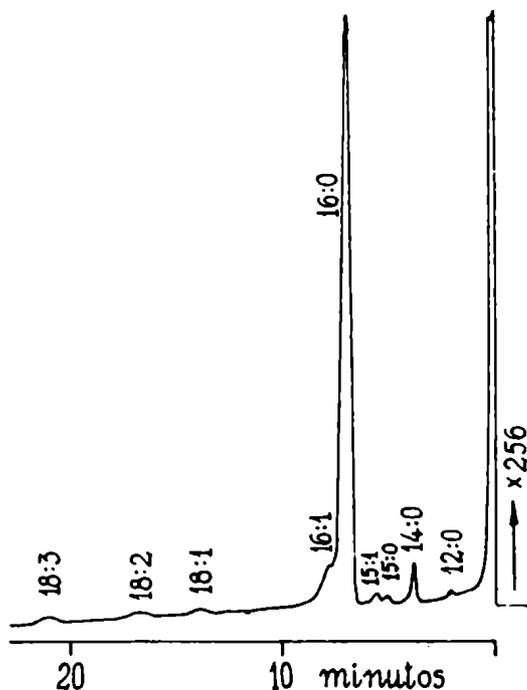
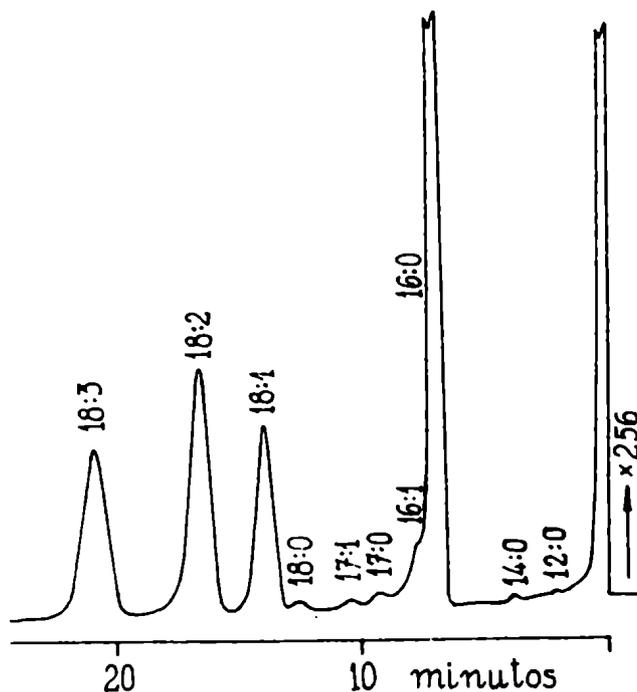


Figura 2- Examen exhaustivo de la composición de aceite de semilla de Berberis buxifolia. Cromatograma de la fracción 1 de la destilación fraccionada de ésteres metílicos de ácidos totales, (por hidrogenación catalítica con paladio en ciclohexano desaparecen los picos señalados como 15:1, 16:1, 18:1, 18:2 y 18:3; esto prueba la ausencia de r-16:0).

Figura 3- Examen exhaustivo de la composición de aceite de semilla de Berberis buxifolia. Cromatograma de la fracción 3 de la destilación fraccionada de ésteres metílicos de ácidos totales, (se observan nítidamente los componentes 17:0 y 17:1).



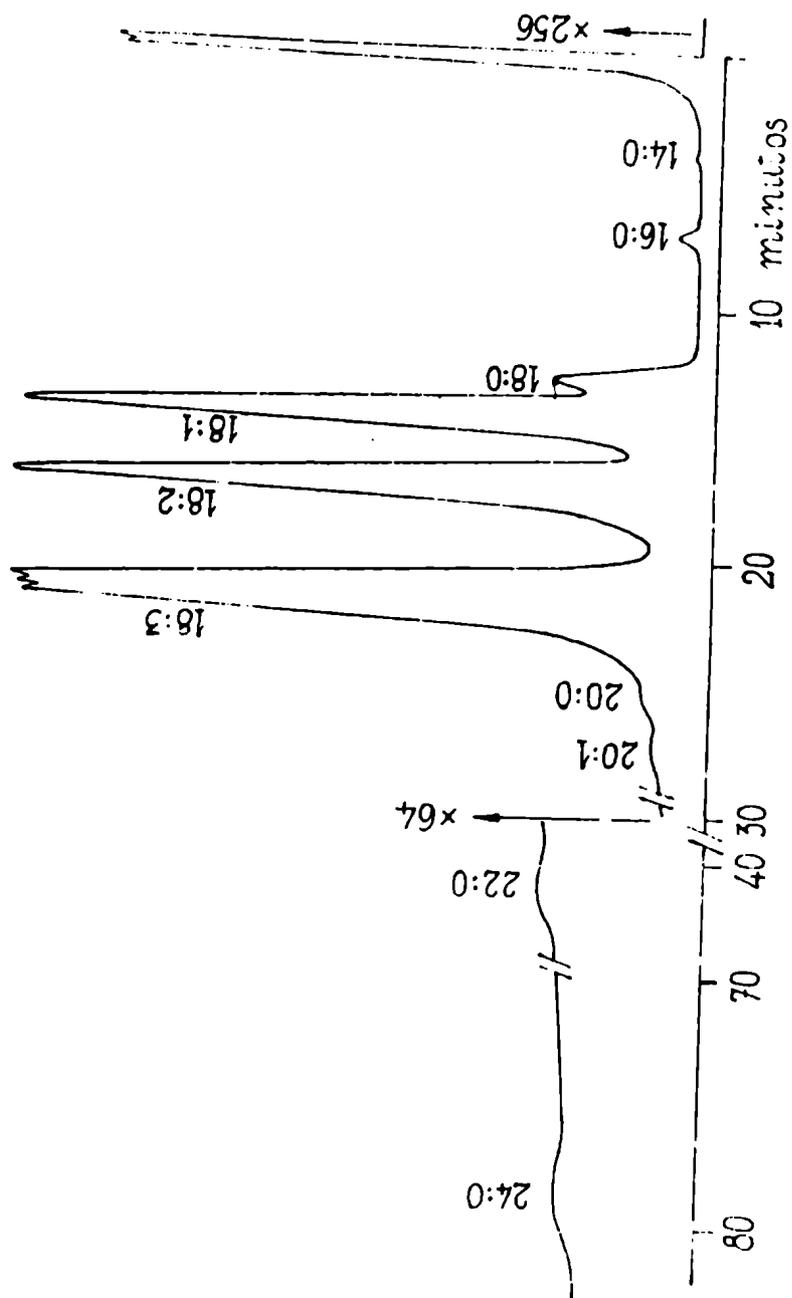


Figura 4- Examen exhaustivo de la composición de aceite de semilla de Berberis buxifolia. Cromatograma del residuo de destilación de ésteres metílicos de ácidos totales, (se observan nítidamente 20:0, 20:1, 22:0 y 24:0).

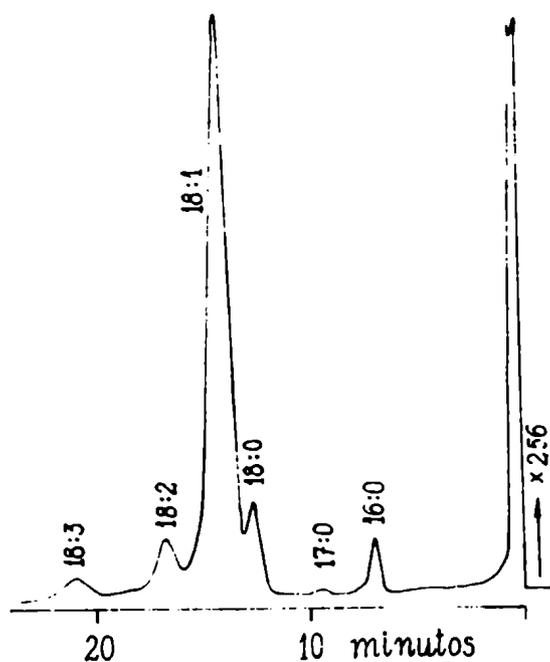
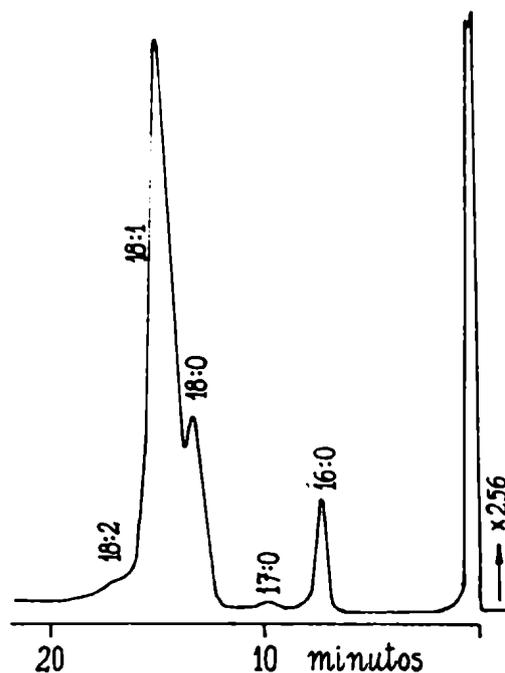


Figura 5- Reconocimiento de ác. oleico. Cromatografía gas líquido de los ésteres metílicos incluidos como compuestos de inclusión de urea después de la 1ª recristalización de los aductos obtenidos sobre ésteres metílicos de fracciones ricas en ésteres en C₁₈.

Figura 6- Reconocimiento de ác. oleico. Cromatografía gas líquido de los ésteres metílicos incluidos como compuestos de inclusión de urea después de la 2ª recristalización de los aductos obtenidos sobre ésteres metílicos de fracciones ricas en ésteres en C₁₈, (se observa la total eliminación de 18:3 y prácticamente total de 18:2).



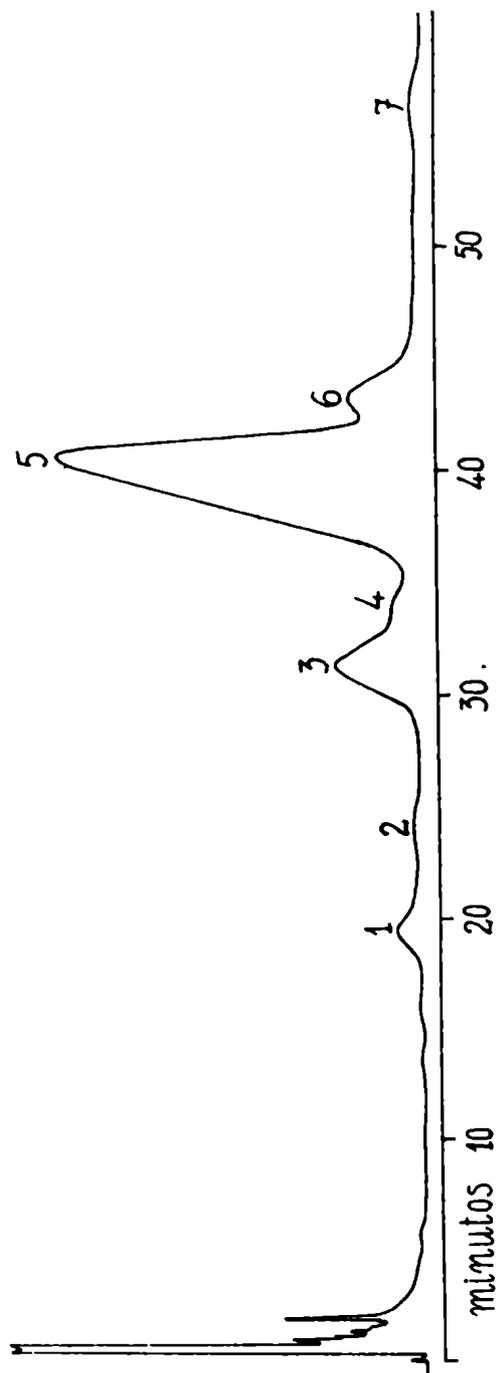


Figura 7- Aceite de semilla de Berberis buxifolia. Cromatografía gas líquido de la

fracción de esteroides, (detalles experimentales en el texto). Valores de

Tr/Tr colesterol: pico 1=0,80 (?), pico 2=0,99 (colesterol ?), pico 2=1,29 (campesterol), pico 4=1,41 (stigmasterol), pico 5=1,60 (β -sitosterol), pico 6=1,80 (Δ^5 -avenasterol ?), pico 7=2,30(?).

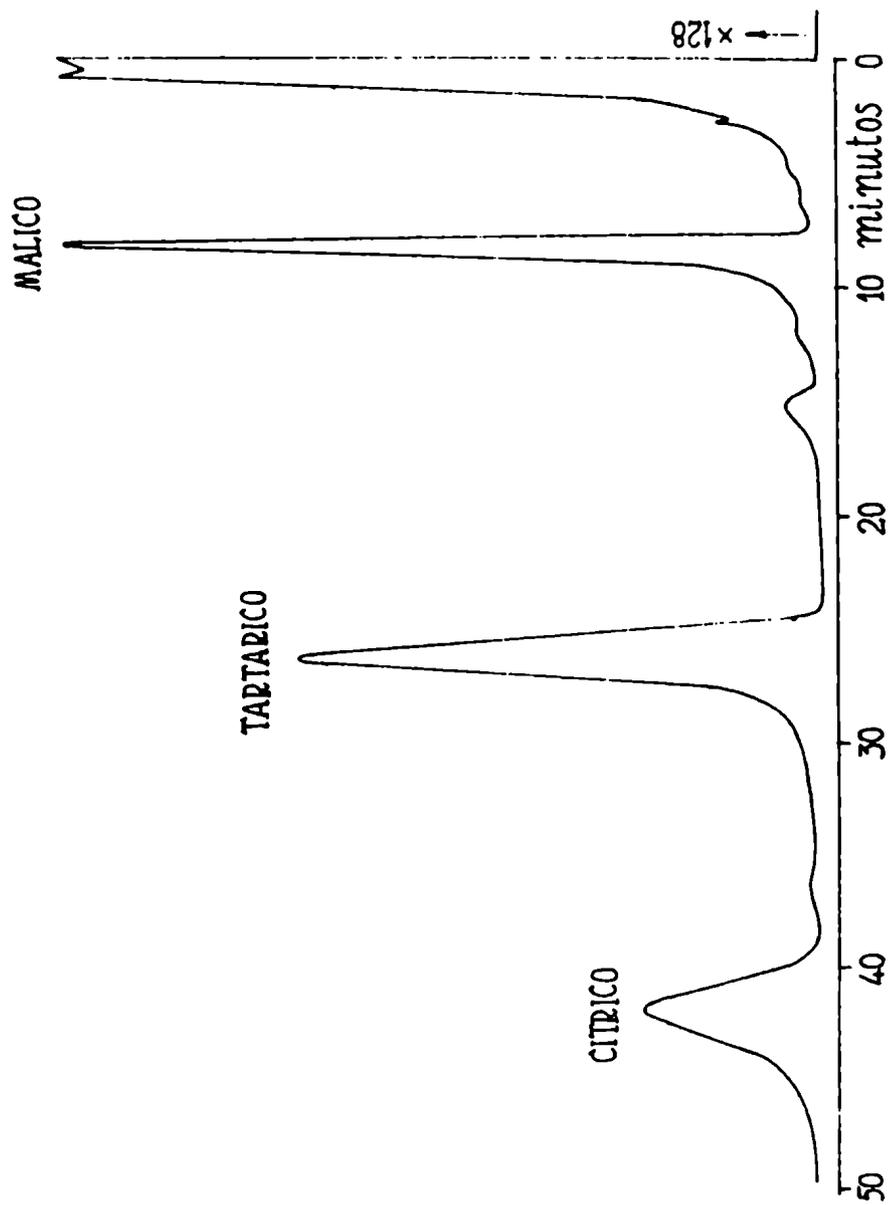


Figura 8- Cromatografía gas líquido de ésteres metílicos siliados de una mezcla de ácidos málico, tartárico y cítrico (detalles experimentales en el texto).

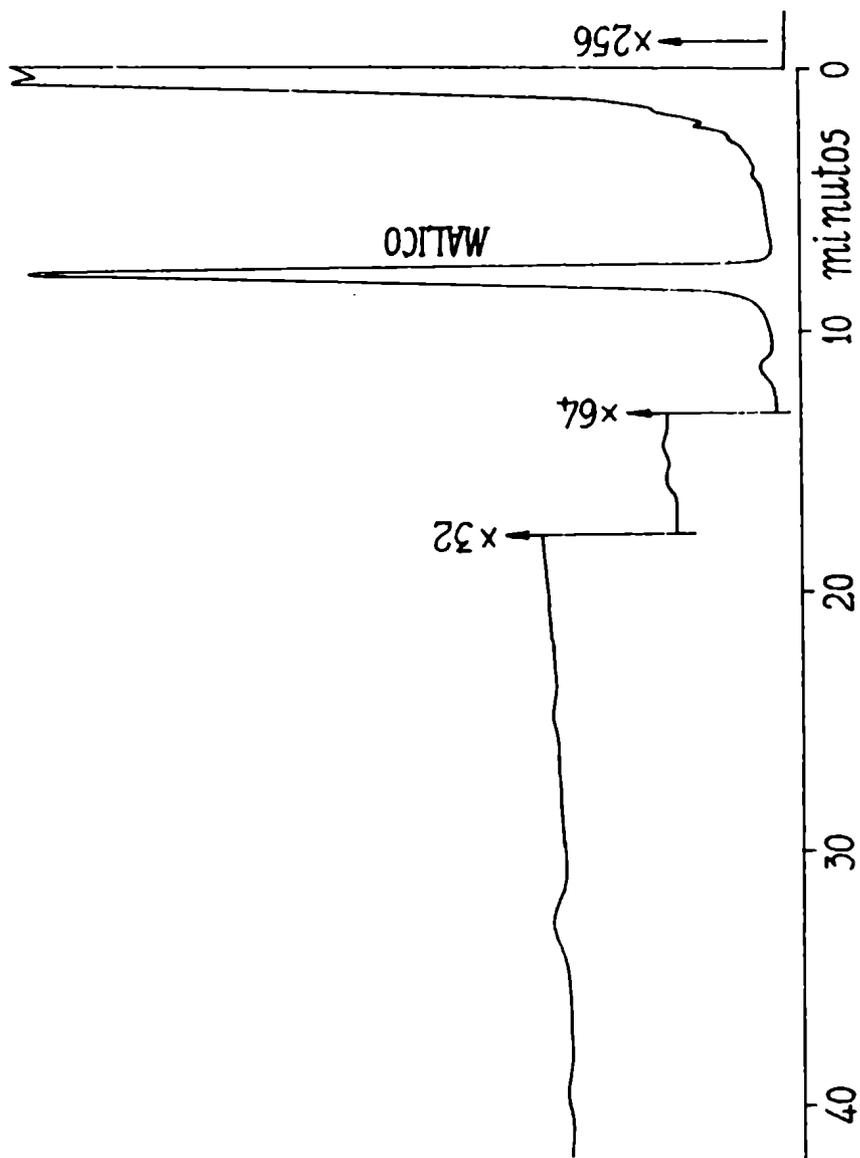


Figura 2- Acidos fijos de pulpa de frutos maduros de Berberis buxifolia. Cromatografía gas líquido de ésteres metílicos sililados (detalles experimentales e interpretación en el texto).

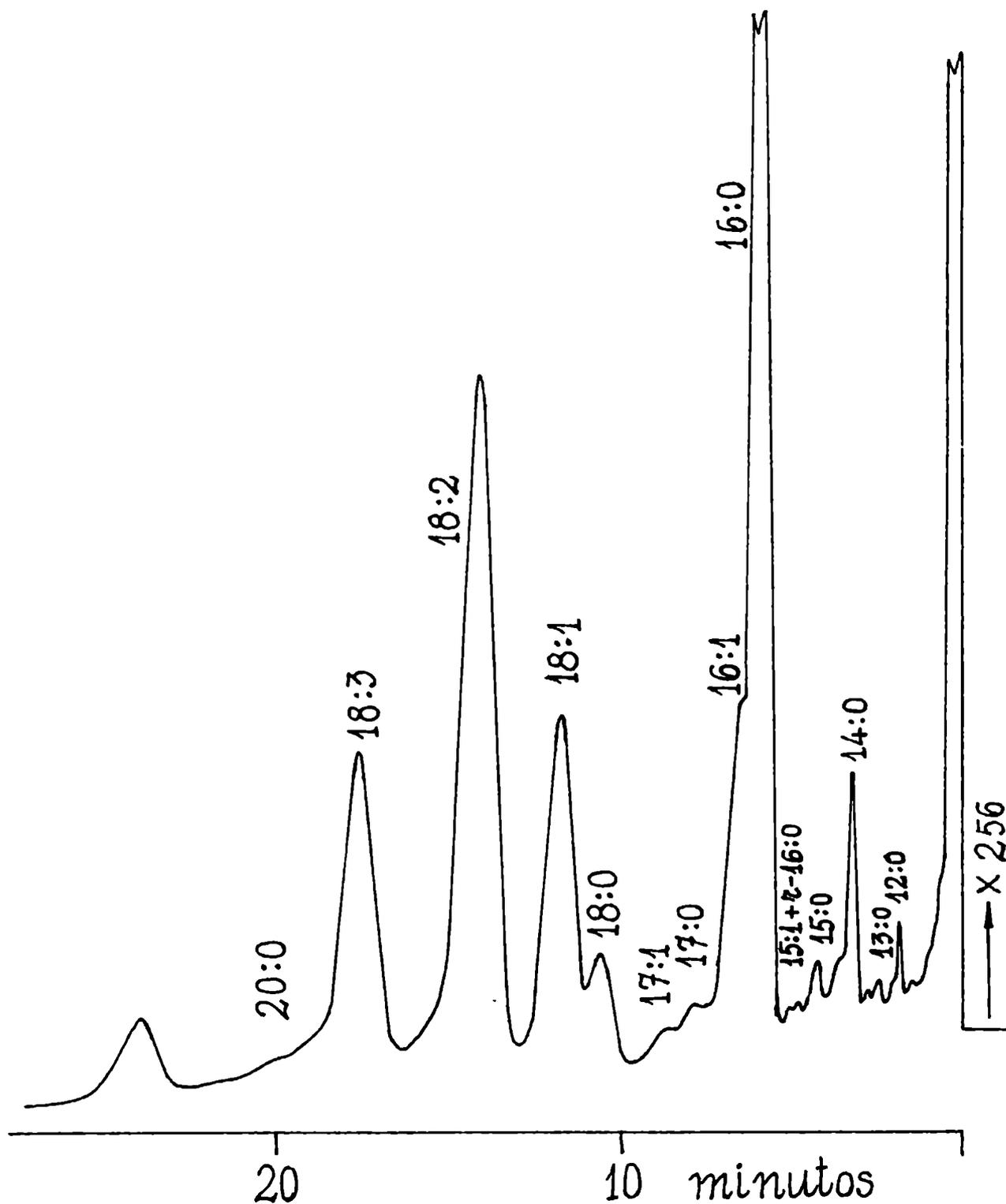


Figura 10- Lípidos extraíbles por éter etílico de pulpa de frutos maduros de Berberis buxifolia. Cromatografía gas líquido de ésteres metílicos de ácidos totales.

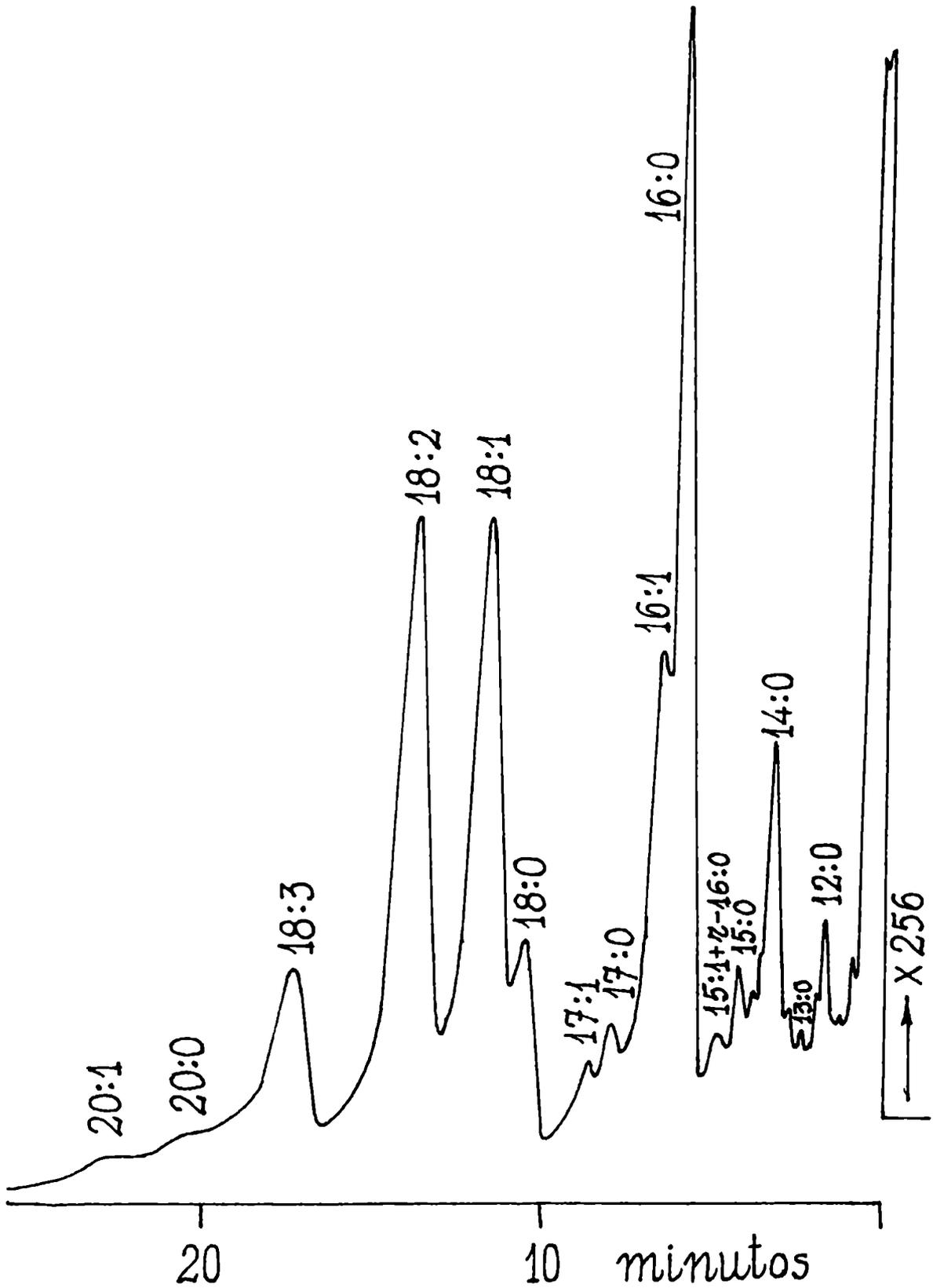


Figura 11- Lípidos extraíbles por éter etílico de dulce de "Calafate"
 Cromatografía gas líquido de ésteres metílicos de ácidos totales

P A R T E III

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta la amplia distribución de diversas especies del género Berberis (el único género de Berberidaceas en la República Argentina), la señalada carencia de información bibliográfica acerca de la composición química de frutos de plantas de la familia Berberidaceae y en especial de las especies argentinas de Berberis, se decidió el estudio en ese sentido de los frutos maduros de Berberis buxifolia Lam (Calafate) cosechados en Febrero de 1972 en las costas del Lago Argentino (Prov. de Santa Cruz), próximas a la población de Calafate. Con carácter previo se presenta una información acerca de la distribución de las especies de Berberis en la República Argentina; la descripción de la especie Berberis buxifolia Lam y de las distintas formas de utilización alimentaria de los frutos maduros de la misma.

Se emplearon frutos cosechados en madurez y preservados a 5° (heladera) hasta el momento de su estudio, que se inició en un lapso no mayor de 10 días a partir de su recolección.

Sobre los frutos se determinaron algunas características físicas y se resolvieron manualmente en sus partes constitutivas principales: película, pulpa y semilla. Se pudo establecer:

1) Que el peso medio de las bayas fue 0,80 g, prácticamente esféricas, con diámetro oscilando entre 0,9-1,1 cm, de color violeta intenso procedente exclusivamente de la pulpa.

2) Que los frutos estaban constituidos por 4,6 % de película, 23,4 % de semilla y 72,0 % de pulpa, siendo el número de semillas por fruto

de 8- 10, con color negro parduzco brillante.

3) Que la semilla medía en valor promedio 6,5 x 2 mm, tenía un valor de peso/Hl de 68,2 Kg; que el peso medio por semilla era 0,02 g, siendo 50 el número de semillas/g. Que por resolución manual la semilla constaba de 45,1 % de una cáscara de color negro parduzco brillante y 54,9 % de pepa color blanco amarillento. Que el contenido de humedad de la semilla entera era de 16,45 % (cáscara 18,95 %; pepa 14,33 %).

Los estudios sobre semilla (seca al aire) consistieron en su agotamiento por hexano técnico (aislamiento de aceite seminal crudo), obtención de la harina de extracción residual y examen de cada uno de estos dos productos. Respecto del aceite crudo de extracción se pudo establecer:

1) Que el agotamiento por hexano de la semilla entera molida rindió 15,85 % de aceite crudo sobre semilla tal cual, 33,70 % sobre pepa seca, 28,86 % sobre pepa tal cual, 18,97 % sobre semilla seca.

2) Que el aceite crudo, líquido límpido a 20° de color amarillo verdoso, se liberó de alcaloides por extracción con ácido clorhídrico diluido obteniendo así el aceite sometido a examen físico-químico y de composición acídica. Sobre el mismo se determinaron valores de densidad relativa 25/4°, índice de refracción 25°, índice de saponificación y de yodo, índice de yodo del insaponificable, esteroides totales, tocoferoles totales, número de escualeno y reacción de Bellier (aceites de se-

milla) y de Halphen (ácidos ciclopropénicos)

3) Que el examen físico-químico del aceite seminal libre de alcaloides destacó un elevado valor de índice de yodo (166,1), un valor de índice de saponificación (198,2) indicativo de una composición acídica fundamental en C₁₆-C₁₈, bajo valor de número de acidez, reacción positiva de Bellier y negativa de Halphen. Ante la total carencia de valores bibliográficos para aceites seminales de Berberidaceas, respecto de contenidos en esteroides y tocoferoles totales, se destaca haber hallado para los primeros un contenido normal para muchos aceites seminales (4,36 mg/g) y una cifra sumamente baja para tocoferoles totales (28,5 mg/g como α -tocoferol) y así mismo un muy bajo valor de número de escualeno (30,6 mg/g).

4) Que previamente al examen de composición acídica los ésteres metílicos de ácidos totales del aceite se examinaron en U.V. (230-268 nm) a fin de observar conjugación preexistente. No se registró presencia de dienos conjugados (230-235 nm) y se constató una muy baja concentración de trienos conjugados (0,136 % en 18:3), por observación a 268 nm.

5) Que el examen por cromatografía gas líquido de los ésteres metílicos de ácidos totales reveló como "componentes mayores" a los ácidos 18:1 (23,5 %), 18:2 (29,1 %), 18:3 (36,8 %) y prácticamente 16:0 (8.5 %); paralelamente, se registró 1,9 % para 18:0, 0,1 % para 14:0 y 0,1 % para 16:1 y vestigios para 12:0, 17:0, 17:1, 20:0 y 20:1.

6) Que fueron indudablemente reconocidos los ácidos linolénico,

como hexa-bromo derivado de 181° de punto de fusión y oleico como 9,10-dihidroxiesteárico de punto de fusión de $131-132^{\circ}$; el primero por bromación en éter etílico a 0° y el segundo a través del aislamiento de una mezcla de oleico mas saturados por recristalización de compuestos de inclusión de urea (en ambos casos partiendo de los ácidos de una fracción de destilación de ésteres metílicos de ácidos totales).

7) Que por combinación de la destilación fraccionada en vacío (0,5 -1,0 Torr) de los ésteres metílicos de los ácidos totales del aceite y examen por cromatografía gas líquido de cada fracción y residuo de destilación se logró un examen exhaustivo de la composición acídica registrando, además de los ya mencionados muy bajas concentraciones de ácidos 15:0 (0,01 %), 22:0 (vest.), 24:0 (vest.) y 15:1 (0,01 %) y observando cifras muy concordantes para los demás componentes con los registrados en el examen C.G.L. operando en forma directa sobre ésteres metílicos de ácidos totales. Así mismo se observó una estrecha concordancia entre los valores de índice de yodo del aceite y el calculado en base a las composiciones acídicas encontradas por C.G.L..

8) Que por fraccionamiento en capa delgada de sílica gel del insaponificable del aceite se aisló la fracción de esteroides que se sometió a examen por C.G.L. observando la principal ocurrencia de β -sitosterol y en menor concentración campesterol y stigmasterol, así como un componente con valor de Tr/Tr colesterol 0,99 (colesterol ?), otro con Tr/Tr col. 1,80 (⁵-avenasterol ?) y uno que respondió a Tr/Tr col. 2,30 (sin iden-

tificación probable).

Se prestó atención al estudio de composición química de la harina de extracción de semilla entera y a tal fin se practicó un análisis general que incluyó determinaciones de humedad, cenizas, nitrógeno total, fibra cruda, hidratos de carbono y extracto clorofórmico. Se pudo establecer:

1) Que los valores de humedad y cenizas 7,58 y 2,61 % son normales y similares a los de muchas harinas de extracción de otras semillas y que el contenido en proteína bruta (nitrógeno x 6,25) resultó ser bajo (18,32 %). Así mismo el contenido en fibra no fue muy elevado (10,66 %).

2) Que el extracto acuoso de esta harina (18,40 %) encuadra en cifras normales para harinas de otras semillas. La acidez total determinada sobre extracto acuoso y expresada en ácido málico % de harina fue de 1,23 %. Que el contenido en lípidos residuales de la harina determinado a través de un extracto clorofórmico fue de poca significación (1,44 %).

3) Que la composición en hidratos de carbono reveló un contenido en azúcares reductores de 4,14 % (como azúcar invertido), en invertibles de 2,44 % (como sacarosa) y en hidratos de carbono sacarificables 17,85 % (en almidón), lo que hace un total de 24,43 %.

4) Que la identificación de azúcares por cromatografía en papel antes de invertir reveló la presencia de glucosa, fructosa, sacarosa y manosa, habiéndose identificado glucosa, manosa y fructosa después de la

inversión, lo que confirma la presencia de sacarosa.

5) Que una determinación del rendimiento en furfural por tratamiento con ClH 12 % condujo a un valor de 4,04 % sobre harina y que la formación de furfural no proviene de pentosas o polímeros de pentosas preexistentes; ello quedó demostrado al determinar poliurónidos a través de la evolución de dióxido de carbono en medio ácido (ClH 19 %), registrando un valor de poliurónido de 17,60 % sobre harina. Esta cifra es coincidente con la encontrada a partir del rendimiento en furfural por aplicación de un factor de conversión.

6) Que la harina contenía 0,42 % de alcaloides totales que examinados por cromatografía en capa delgada con distintos solventes de desarrollo revelaron la presencia de berberina y palmitina y de otros dos componentes no identificados, comportamiento similar al observado en el examen de los alcaloides separados del aceite crudo (0,56 %), por los mismos métodos. Que una investigación sistemática, reveló además la presencia de fitoesteroles.

Desde que la pulpa del fruto es la parte del mismo que se vincula a su empleo como alimento directo o a su transformación en productos elaborados como bebidas y dulces, se procedió a un examen exhaustivo de su composición química, se pudo establecer:

1) Que se trata de un producto líquido ligeramente viscoso y de intenso color violeta (presencia de antocianas). Se determinaron sus valo-

res de densidad relativa a $25/4^{\circ}$ (1,053 %), extracto seco (15,44 %), cenizas 500-550 $^{\circ}$ (0,75 %), nitrógeno total (0,17 %: proteína "bruta" 1,06 %), acidez volátil (despreciable), ácido péctico (0,29 %), azúcares totales (9,96 %; monosacáridos 9,12 %, disacáridos 0,84 %). El valor de acidez total (titulación potenciométrica 1,75 %, como ácido málico), el valor de pH 3,40 y extracto etéreo (lípidos) 0,04 %.

2) Que la acidez fija resultó estar formada casi exclusivamente por ácido málico, reconocido por cromatografía en papel y en fase gaseosa. La cromatografía en papel reveló además ácido ascórbico y cítrico mientras la cromatografía en fase gaseosa además del pico principal correspondiente a ácido málico evidenció 6 componentes menores (un total de 3,5 % de los ácidos totales) que no comprendían a los ácidos cítrico y tartárico y que no fueron identificados. Por cromatografía en papel y capa delgada se evidenció la presencia de un ácido urónico. Los valores de acidez total determinados por titulación, apreciando el punto final en base a la virada de los antocianos propios de la pulpa o empleando azul de bromotimol (indicador externo) fueron 1,52 y 1,56 % como ácido málico. Las determinaciones específicas (A.O.A.C.) de ácido málico y cítrico dieron 1,03 y 0,12 % respectivamente.

3) Que la acidez fija de esta pulpa y su contenido en ácido péctico la señalan como rica en acidez y pobre en sustancias pécticas, dato que puede ser de interés a los fines de su transformación en dulces, jaleas o mermeladas.

4) Que la investigación de azúcares por cromatografía en papel antes de inversión evidenció la presencia de glucosa y fructosa como monosacáridos y sacarosa y genciobiosa como disacáridos, la glucosa y la genciobiosa integran a diversos antocianos de la pulpa; luego de inversión y por la misma técnica solo se identificaron glucosa y fructosa, como era de esperar.

5) Que la composición final en azúcares (mono y disacáridos) se pudo calcular en base a los reconocimientos previos por cromatografía en papel y a los valores resultantes de las determinaciones de azúcares reductores e invertibles, aldosas y cetosas antes y después de inversión, con los siguientes resultados: glucosa 5,64 %, fructosa 3,48 %, sacarosa 0,49 % y genciobiosa 0,35 %.

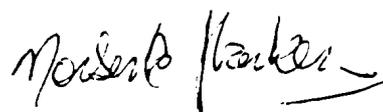
6) Que la muy baja concentración en lípidos se examinó en su composición acídica por cromatografía en fase gaseosa, identificando los mismos componentes ácidos fundamentales registrados para los aceites de semilla, aunque en distintas proporciones y algunos otros componentes menores. Que la investigación sistemática de otros componentes reveló la presencia de taninos, esteroides y flavonoides y ausencia de alcaloides.

Habiendo dispuesto un envase original de un dulce de "Calafate" elaborado en Bariloche (Prov. de Rio Negro) de venta pública, se procedió a su examen particular y general de composición.

Se pudo establecer:

1) Que los valores de sólidos totales (solubles e insolubles), azúcares reductores e invertibles, acidez total y contenido en ácido péctico, responden a cifras admisibles para estos tipos de productos.

2) Que en base a las investigaciones de azúcares antes y después de inversión y de ácidos fijos, ambos por cromatografía en papel, al contenido en lípidos y al examen por C.G.L. de su composición acídica puede concluirse que se estaría en presencia de un dulce elaborado con frutos de alguna o algunas especies de Berberis, seguramente ajenas a B. buxifolia; que este criterio se vió confirmado al examinar los antocianos presentes en el dulce, habiendo registrado 3 glicósidos de delfinidina y cianidina, comportamiento distinto al señalado para los antocianos de la pulpa madura de B. buxifolia, que consta de 10 glicósidos de peonidina, delfinidina, malvidina y petunidina. Aun teniendo presente posibles alteraciones de estos principios durante el proceso de elaboración del dulce no cabe justificar un comportamiento tan diferencial.



P A R T E I V

BIBLIOGRAFIA

- 1- R.HEGNAUER, "Chemotaxonomie der Pflanzen", Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart, Band 3, 241 (1964)
- 2- M.J.DIMITRI, "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería" Ed. Acme, Bs. As., Vol 1, 382 (1964)
- 3- M.M.JOB, "Los Berberis de la región de Nahuel Huapi", Rev. Mus. de La Plata, (nueva serie) V, Secc. Botánica, Nº 18, 21 (1942)
- 4- A.E.RAGONESE y R.MARTINEZ CROVETTO, "Plantas indígenas de la Argentina con frutos o semillas comestibles", Revista de Invest. Agric. t.I, Nº 3, 147 (1947)
- 5- C.REICHE, "Los productos vegetales de Chile", Bol. Soc. Fom. Fabril 32 (7) 481; (10) 689; (11) 776, Sgo de Chile (1915), mencionado por A.E.RAGONESE y R.MARTINEZ CROVETTO (4)
- 6- F.F.UTES, "La edad de piedra en la Patagonia - Estudio de arqueología comparada", Anales Mus. Nac. Buenos Aires, Serie III, 5, 203 (1905)
- 7- C.SPEGAZZINI, "Plantae per Fuegiane a Carolo Spegazzini, Anno 1882 Collectae", Anales Mus. Nac. Bs. Aires, 5, 39 (1896)
- 8- C.SPEGAZZINI, "Apuntes para un corto resumen de la flora agropecuaria de la Rep. Argentina", Censo agropecuario Nacional en 1908, 3, 467 (1909) Bs.As., mencionado por A.E.RAGONESE y R.MARTINEZ CROVETTO (4)
- 9- J.HIERONYMUS, "Plantas diafóricas - Flora Argentina", Pg 421(1907) Bs. Aires, mencionado por A.E.RAGONESE y R.MARTINEZ CROVETTO (4)

- 10- E.AUTRAN, "Énumération des plantes recoltées par Miles Stuart Pennington pendant son premier voyage á la Terre de Feu en 1903", Rev. Univ. Bs. Aires, 4, 287 (1905)
- 11- M.B.BERRO, "La vegetación Uruguaya - Plantas que se hacen distinguir por alguna propiedad útil o perjudicial", Anales Mus. Nac. Montevideo, 2 (11), 91 (1899)
- 12- R.PEREZ MOREAU, "Flora de Nahuel Huapi y Lanin", Publ. Soc. Arg. de Horticultura, Bs. Aires (1943) mencionado por A.E.RAGONESE y R. MARTINEZ CROVETTO (4)
- 13- J.V.MONTICELLI, "Anotaciones fitogeográficas de La Pampa Central" Lilloa, 3, 251 (1938)
- 14- P.N.ARATA, Anales Soc. Cient. Arg., 7, 97 (1879)
- 15- P.N.ARATA, Bol. Ac. Nac. de Cs. en Córdoba, 3, 90 (1879), mencionado por J.A.DOMINGUEZ, "Materia Médica Argentina", Casa J.Peuser Ltda. 1928, 91
- 16- F.REICHERT, Revista del Centro de Estudiantes de Agronomía y Veterinaria de Bs. Aires, II, 11 (1918)
- 17- A.B.POMILIC, Phytochemistry, 12, 218 (1973)
- 18- M.O'NEAL, Chem. News, 121, 61 (1920)
- 19- L.GURGEL, O.ALMEIDA COSTA y R.DIAZ DA SILVA, Rev. Flora Med., 1 447 (1935), C.A. 29, 6278² (1935)
- 20- R.K.ALIEV y D.A.YUSBASHINSKAYA, Doklady Akad. Nauk Azerbaidzhan S.S.R., 9, 306 (1953) C.A. 49, 1961f (1955)
- 21- E.TOMASZENKA y M.TOMASZEWSKI, Roczniki Nauk Rolniezyck, Ser A, 76,

- 709 (1957) C.A., 52, 13952 (1958)
- 22- J.C. GUPTA, P.R.GUPTA y S.C.GUPTA, Sciand Culture (Calcuta), 23, 430, (1958), C.A. 52, 14390f (1958)
- 23- P.R.GUPTA, J.C.GUPTA y S.C.GUPTA, Agra Univ. J. Research, 8, Pt,1, 43 (1959)
- 24- V.BUTKUS, A.BARANAUSKAITI y Z.BUTKIENE, Lietuvos TSR Mokslu Akad. Darbai, Ser.c. 1, 31 (1965), C.A. 64, 8642b (1966)
- 25- J.MURRELL y F.T.WOLF, Bull. Torrey Bot. Club, 96, (5) 594 (1969) C.A. 72, 681j (1970)
- 26- S.A.MAMAIEV y L.A.SEMKINA, Rast. Resur, 7, 230 (1971), C.A. 75, 95377p (1971)
- 27- L.A.SEMKINA, Ecologica, 2, 45 (1971), C.A. 75, 85143v (1971)
- 28- H.G.BOIT, "Ergebnisse der Alkaloid chemie bis 1960", Akademik Verlag, Berlin (1961)
- 29- M.H.BERTONI y P.CATTANEO, Anales Asoc. Quim. Argentina, 47, 52 (1959)
- 30- S.UFENO y Y.K.KYOKAISHI, J. Oil Chem. Soc. Japan, 2, 241 (1953) C.A. 48, 9717b (1954)
- 31- T.CHIFAY y T.MIYAZAKI, J. Phar. Soc. Japan, 71, 769 (1951), C.A. 46, 1782f (1952)
- 32- C.GRIMME, Seifens Ztg, 44, 398 (1917), mencionado por E.W.ECKEY (34)
- 33- T.P.HILDICH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural Fats", 4ª ed., Chapman & Hall, London (1954) p204, 251 y 268
- 34- E.W.ECKEY, "Vegetable Fats and Oils", Reinhold Publ. Corp. N.York,

- (1954) p401 y 402
- 35- R.HEGNAUER, Obra citada en (1), Band 4, p347 (1965)
- 36- FAO/OMS, Comité del Codex sobre Grasas y Aceites CX/FO, 74/11, enero 1974, (Documento sobre determinación de esteroides en aceite de oliva)
- 37- T.ITOH, T.TAMURA y T.MATSUMOTO, Lipids, 9, 173 (1974)
- 38- S.A.BARKER, A.B.FOSTER, I.R.SIDDIQUI y M.STACEY, Talanta, I, 216 (1958)
- 39- F.W.NORIS y C.F.RESCH, Biochem. J., 29, 1590 (1953)
- 40- E.E.MESCHTER, J. Agric. Food Chem., 1 (8) 574 (1953)
- 41- E.SONDHEIMER y S.KERTESZ, Food Research, 17, 288 (1952)
- 42- V.C.MEHLNBACHER, "The Analysis of Fats and Oils", The Garrard Press Publ. Champaign, III, 1960, p592
- 43- C.PETRONICI y G.SAFINA, Conserve e Deriv. Agrumari (Palermo), 2, 3; C.A. 47, 11297f (1953)
- 44- H.FORCHIERI, M.H.BERTONI, G.KARMAN de SUTTON y P.CATTANEO, Anales Asoc. Quim. Arg., 53, 313 (1970)
- 45- H.E.LONGENECKER, J. Soc. Chem. Ind., 56, 199T (1939)
- 46- A.IAPWORTH y E.N.MOTTRAM, J. Chem. Soc., 127, 1628 (1925)
- 47- E.FEDELI, A.LANZANI, P.CAPELLA y G.JACINI, J. Amer. Oil Chem. Soc. 43 (4) 254 (1966)
- 48- R.MUNIER y M.MACHEBOUEF, Bull. Soc. Chem. Biol., 38, 864 (1951)
- 49- O.FOLIN y W.DENIS, J. Biol. Chem., 22, 305 (1915)
- 50- G.ISSOGLIO, "La Chimica degli Alimenti", Ed. Torinese, Torino 1927, Vol 2, p805

- 51- G.DENIGES, C.CHELLE y A.LABAT, "Précis de Chimie Analytique" Ed. Medicales, Norbert Maloine, 1931, Tomo 1, p686
- 52- R.CADENAS y J.O.DEFERRARI, Analyst, 86, 132 (1961)
- 53- H.LEMIEUX y J.BANER, Anal. Chem., 26, 920 (1961)
- 54- V.DEULOFEU, "Investigación Química de Vegetales", Dep. Quím. Org. Fac. Ciencias Exactas y Naturales (1964)
- 55- C.R.MARSHALL y A.G.NORMAN, Analyst, 63, 315 (1938)
- 56- P.A.SHAFFER y M.SOMOGYI, J. Biol. Chem., 100, 695 (1933)
- 57- M.L.BUCH, R.MONTGOMERY y W.L.PORTER, Anal. Chem. 24 (3) 489 (1952)
- 58- B.PETRI, R.DENIS et al, Planta Medica, 21, 81 (1972)
- 59- ORGANIC SINTESIS, Ed A.H.BLATT, Vol II, John Wiley & Sons, N. York 1943, p166
- 60- J.B.HARBORNE, Biochem. J., 70, 22 (1958)
- 61- J.B.HARBORNE, "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", Academic Press, London & N. York, 1967, p15
- 62- P.KARRER y G.MEURON, Helv. Chim. Acta, 15, 507 (1932)
- 63- B.V.CHANDLER y K.A.HARPER, Aust. J. Chem., 14, 586 (1961)

INDICE

Introducción	1
Discusión de la Parte Experimental	12
Parte Experimental	30
Tablas	62
Figuras	70
Conclusiones	79
Bibliografía	89