

## Tesis de Posgrado

# Determinación de escualeno en aceites de oliva argentinos

Rodríguez, Juan Rogelio

1952

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Rodríguez, Juan Rogelio. (1952). Determinación de escualeno en aceites de oliva argentinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0731\\_Rodriguez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0731_Rodriguez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Rodríguez, Juan Rogelio. "Determinación de escualeno en aceites de oliva argentinos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1952. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0731\\_Rodriguez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0731_Rodriguez.pdf)

TESIS

PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN QUIMICA

DETERMINACION DE ESCUALENO EN ACEITES DE OLIVA ARGENTINOS

*tesis: 731*

JUAN ROGELIO RODRIGUEZ

1952

Agradezco al Doctor Andrés Fortunato por haberme honrado con la dirección de este trabajo, por sus oportunos consejos y su desinteresada y utilísima colaboración.

Asimismo, hago extensiva mi gratitud al doctor Pedro Cattaneo.

Agradezco también a la Dirección y personal del Instituto Tecnológico del Ministerio de Industria y Comercio de la Nación, en cuyos laboratorios fueron ejecutados los trabajos.

Con el objeto de ahondar en el estudio de los componentes que en menor proporción se encuentran en el aceite y que a la vez le confieren importantes propiedades, hemos realizado este trabajo sobre el insaponificable del aceite de oliva, prosiguiendo con la tentativa de caracterización del mismo por ese medio que fuera iniciada por Bolton y Williams (1), en el año 1930.

El objeto primordial es el de efectuar el estudio en aceites de oliva argentinos, pretendiendo al mismo tiempo obtener dos conclusiones importantes: 1) la aplicabilidad del método de Fitelson para determinaciones corrientes, y 2) la de proporcionar datos estadísticos que sirvan de ayuda para investigaciones posteriores. Al mismo tiempo, proseguiremos así con el plan iniciado por Cattáneo, en la determinación de los macrocompuestos de los aceites argentinos y continuado por él mismo con determinaciones sobre insaponificables.

El problema adquiere importancia especial tratándose del aceite de oliva, pues en su insaponificable se encuentra una gran cantidad de escualeno. Esta sustancia no crea por su sola presencia una diferencia cualitativa con los demás aceites vegetales, pues la gran mayoría de ellos la contienen; la diferencia es de carácter cuantitativo. Todos los autores concuerdan en que es cerca de diez veces mayor el contenido de escualeno del aceite de oliva, comparado con el de los demás aceites vegetales comestibles.

La larga nómina de autores que colaboraron para esclarecer este problema data del año 1906 en que Tsujimoto (2) se refirió a la existencia de un hidrocarburo no saturado que encontró en gran pro

porción en los aceites de hígados de pescados. El mismo Tsujimoto puntualizó sus propiedades y dió su fórmula bruta,  $C_{30}H_{50}$ , como perteneciente al escualeno. También lo aisló por formación del derivado hexaclorado, de composición definida e indefinido punto de fusión, desde  $112^{\circ}\text{C}$ , hasta hervir como un líquido límpido a  $125^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, en 1915, A. Chaston Charman, (3) trabajando independientemente, aisló un hidrocarburo no saturado del aceite de pescado, para el cual propuso el nombre de espinaceno y asignó la misma fórmula. Obtuvo más tarde el derivado hexaclorado y dió como fórmula del compuesto,  $C_{29}H_{48}$ .

Actualmente, se ha llegado a la conclusión que el espinaceno y el escualeno son la misma cosa.

Pocos años más tarde, André y Janal (4) aislaron varios compuestos clorados de diferentes puntos de fusión, aunque cercanos todos ellos y descartaron definitivamente la existencia del espinaceno.

Los que aclararon, en última instancia, el problema de la fusión indefinida del derivado clorado, fueron Heilbron, Kamm y Owens (5), quienes establecieron la presencia de tres sustancias isómeras, de puntos de fusión  $107-108$ ,  $113-114$ , y  $144-145^{\circ}\text{C}$ .

El escualeno se encuentra distribuido entre los Elasmobranquios y principalmente en la familia de los escuálidos, aunque no existe en algunos miembros de ella. También, se encuentra en los huevos (aceites) de los *Chlamidoselachus anguineus* y *Lepidorhinus kinkei* (Tsujimoto), *Etmopterus spinax*, *Lepidorhinus squamosus* y *Scymnorhinus licha* (Heilbron). En los intestinos de estas últimas

especies mencionadas, se encontró un aceite oscuro, que contiene gran cantidad de escualeno y aunque este producto pudo haber sido formado post mortem, pues el aceite fué extraído luego de varios días, de todas maneras, sabemos que es una sustancia propia del animal en vida.

En los aceites de hígados de pescados se han encontrado, además, otros hidrocarburos. Se tienen dudas acerca de su composición y posiblemente otros investigadores hayan dado distintos nombres al mismo compuesto, como en el caso del espinaceno.

Algunos de estos, más o menos definidos, se transcriben a continuación. Con excepción del pristane, que funde a 30°C aproximadamente, son todos líquidos a temperatura ordinaria y con un peso específico de alrededor de 0,8.

Hydrocarburo	fórm. molec.	n° de dobles enlaces	índice de yodo tébrido
Decane	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	0	0
Pristane	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	0	0
Zamene	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub>	1	101
Gadinene	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub>	3	307
Cetorhinene	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub>	6	398
Escualeno	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	6	371

(6)

Se han descrito, además, hidrocarburos con probablemente ocho dobles enlaces, en aceites de hígados de pescados del Japón, y, dos hidrocarburos no saturados, C<sub>13</sub>H<sub>14</sub> (anaranjado rojizo cristalino p.f.105°C) y C<sub>14</sub>H<sub>16</sub> (cristales rojos p.f.126°C) probablemente per-

tenecientes al grupo del naftalene.

La presencia de escualeno en los aceites de animales marinos, no parece relacionada con la naturaleza de los alimentos ingeridos por el pez. No se lo ha podido encontrar en las muestras del plankton donde viven esos peces, y, la distribución irregular de los hidrocarburos en especies que se alimentan de otros peces, parece indicar que aquellos son sintetizados con un propósito hasta ahora desconocido, por muchos Elasmobranquios, principalmente de la familia de los escuálidos.

En general, se ha encontrado mayor cantidad de escualeno en los aceites de hígados de pescados con un contenido alto de insaponificable, por ejemplo, el aceite de hígado de Basking shark (50 % de insaponificable), del cual un cuarto a un tercio es escualeno y otros hidrocarburos, tales como el pristane.

A excepción del Basking shark, los tiburones más pequeños, incluyendo a los Gray fishers, parecen contener las mayores cantidades del hidrocarburo.

Cuando el contenido de escualeno es alto en el aceite de hígado de tiburón, el grado de no saturación de los ácidos grasos es bajo y se encuentran grandes cantidades de ácidos de C24. Cuando disminuye el contenido de escualeno, aumenta la no saturación de los ácidos de C20 a 22 y disminuye la proporción de ácidos de C24.

Se ha afirmado que el escualeno no se encuentra en el aceite de hígado de Sleeper blue y Whale shark.

Su acción en el hombre no ha sido aun bien estudiada, aunque parece ser poco activo y de un valor nutritivo muy pequeño.



No se han observado propiedades antitumorísticas aun despues de irradiación con luz ultravioleta, pero cuando se activa bioquímicamente, se ha encontrado que es activo en el tratamiento de la tuberculosis.

Intimamente ligado a los procesos metabólicos del organismo, merece una atención especial la relación que existe entre su existencia y las cantidades de stigmasterol y colesterol. Experiencias realizadas con ratas por H. J. Channon, muestran que la administración de escualeno hace aumentar la cantidad de colesterol hasta el doble. Esta observación puede conducir a pensar en el papel del escualeno como precursor del colesterol en la síntesis animal. Muchas investigaciones fueron hechas más tarde con el objeto de comprobar o deshechar esa teoría.

Es de hacer notar, que los peces que contienen escualeno, están notablemente libres de parásitos y otros males.

#### Escualeno en aceites vegetales.-

Bolton y Williams fueron los que iniciaron la corriente de caracterización de los aceites de oliva por su contenido en escualeno, a pesar que no fueron ellos quienes establecieron su presencia. Dividieron los aceites y grasas en cuatro grupos, teniendo en cuenta el índice de yodo de las fracciones insaponificables:

Primer grupo (64-70). Grasas animales y algunas grasas vegetales

Segundo grupo (90-96). Aceites de pescados y animales marinos.

Tercer grupo (117-124). Grasas y aceites vegetales.

Cuarto grupo (197-206). Grupo del aceite de oliva.

Del mismo modo, las experiencias de Lowe (7), Ricca y Lamónica (8) y Jamieson y Mc Kinney (9), ponen en evidencia la gran diferencia que existe entre el índice de yodo del insaponificable del aceite de oliva y el de los demás aceites.

Posteriormente, Sani (10) separó un hidrocarburo no saturado de la fracción insaponificable del aceite de oliva, efectuando una destilación a presión reducida. Realizó un análisis elemental y la determinación del peso molecular, cuyos resultados condujeron al autor a dar la fórmula  $C_{21}H_{36}$  para ese compuesto. Sin embargo, en sus detalladas experiencias, no aparece ninguna determinación de índice de yodo.

Finalmente, luego de haber algunos autores intuido la presencia del escualeno y hasta aislado otros aunque no con mucha certeza, como en los trabajos de Sani anteriormente mencionados, fueron Thorbjarnarson y Drummond (11) los que obtuvieron, por extracción con éter de petróleo del insaponificable del aceite de oliva y luego por cromatografía de éste, un hidrocarburo no saturado que después reconocieron como el escualeno y que separaron y purificaron por formación del hexahidro-hexacloro, derivado.

La muestra empleada por los autores en sus determinaciones, fué un auténtico producto original de Palestina. Las características del aceite empleado fueron las siguientes:

índice de saponificación 191

índice de yodo 82,6

índice de refracción  $n_D^{20}$  1,4707

% de insaponificable 1,12

índice de yodo del insaponificable	255
índice de yodo de ácidos grasos	85,3
equivalente de ácidos grasos	279

Después de la saponificación obtuvieron una sustancia amarilla, insaponificable, que contenía 16,9 % de material precipitable por la digitonina (esteroles).

Ensayaron luego la separación de las distintas fracciones del insaponificable por cristalización fraccionada con alcohol metílico. Para ello disolvieron 7 gr. de insaponificable en 500 ml. de alcohol metílico caliente. Una pequeña cantidad de sustancia no se disolvió, fracción A.

Del filtrado, separaron luego sucesivamente por concentración y enfriamiento dos fracciones más, B y C, quedando finalmente un aceite incoloro, soluble en alcohol metílico, fracción D.

Los índices de yodo obtenidos fueron los siguientes:

Fracción A:	130
Fracción B:	108
Fracción C:	181
Fracción D:	342

Estas fracciones, prolijamente analizadas por los autores, condujeron a resultados posteriormente confirmados por la experiencia.

Las fracciones A y B, están formadas fundamentalmente por sitosterol con impurezas de dihidrositosterol, ergosterol y dihidroergosterol, y, la D, como es lógico suponer por su elevado índice de yodo, está formada casi exclusivamente por escualeno.

Los esfuerzos realizados con posterioridad para aislar ese hidrocarburo fueron vanos, surgiendo entonces la idea de ensayar una separación cromatográfica, que a la postre fué la que proporcionó los resultados satisfactorios que indica la bibliografía.

Emplearon para disolver el insaponificable, que debía pasar a través de la columna rellena de alúmina adsorbente, una mezcla de 90% de éter de petróleo, de destilación intermedia entre 40 y 60°C, y 10% de benceno.

Aparecieron en la columna de percolación, cuatro zonas coloreadas y pasó a través de ella una cantidad de líquido, fracción no adsorbida o percolado, rica en escualeno, y que es precisamente la que nosotros estudiaremos. Las experiencias arrojaron valores comprendidos entre 31 y 64 miligramos de escualeno, por 100 miligramos de insaponificable.

La observación espectroscópica de las fracciones retenidas en la columna, proporcionó resultados interesantes: las superiores, pusieron en evidencia la presencia de ergosterol, mientras que en la tercera zona, apareció un pigmento del tipo de la xantófila.

Las sustancias retenidas fueron eluidas, empleando una mezcla de 75% de éter de petróleo y 25% de alcohol metílico, determinándose luego en ellas los índices de yodo parciales que transcribimos a continuación:

	índice de yodo
2,05 g. de insaponificable	205
1,23 g. de percolado	345
0,03 g. franja más baja	209

0,02 g. segunda zona	190
0,34 g. tercera zona	130
0,43 g. franja superior	104

El análisis elemental de la parte no adsorbida condujo a que se trataba de una mezcla de hidrocarburos saturados y no saturados es pecialmente, con la certeza de que una gran parte era escualeno, a demás de pequeñas cantidades de otras sustancias, algunas de ellas oxigenadas.

Los mismos autores dedicaron preferente atención a esta fracción no adsorbida, pues como es lógico suponer, quedaron sorprendidos por sus notables características. Ello los llevó a preparar el derivado dodecabromado y el hexahidro hexaclorado que confirmaron la presencia del escualeno.

El hexahidro hexacloro derivado tiene como fórmula bruta  $C_{30}H_{56}Cl_6$  y contiene 33,86 % de cloro .

Los autores dieron para el escualeno las siguientes constantes:

Carbono: 87,8 %

Hidrógeno: 12,2 %

Punto de ebullición: 235°7 (0-15 mm.)

Índice de refracción  $n_D^{20}$ : 1,4965-7

Índice de yodo: 367,9; 377,6

Peso molecular (criosc.): 394; 391

Posteriores trabajos de otros autores tropezaron con el inconveniente de que los resultados no se reproducían en forma satisfactoria. Grossfeld y Timm (12) entre ellos, modificaron el antiguo y

clásico método de Bolton y Williams, sustituyéndolo por uno que se basa en la obtención del insaponificable por una sola extracción con éter de petróleo, bajo condiciones prescriptas. La fracción obtenida contiene muchos hidrocarburos, junto con una pequeña cantidad de esteroides y de otros constituyentes. La presencia de otras sustancias existentes en esta fracción, además del escualeno, es demostrada por el bajo índice de yodo determinado por los autores: 210-215 para aceite de oliva y 42 a 88 para otros aceites.

Examinaron también otras muestras empleando el mismo método, pero no les fué posible obtener resultados satisfactorios en las determinaciones por duplicado.

Más tarde, fueron Khun y Gerhard (13) los que formularon nuevas objeciones a la técnica de Bolton y Williams, pero sus experiencias tampoco arrojaron valores reproducibles.

Seguramente estos resultados falsos hayan sido debidos a variaciones en la composición del insaponificable, ocasionadas sin duda por pequeñas diferencias en la técnica de extracción.

Iguales objeciones a las técnicas anteriores fueron hechas por Jamieson y Mc Kinney, y, fueron además propuestos muchos métodos para la separación de los componentes del insaponificable, como el de Täufel, Thaler y Widmann, pero ninguno de ellos con resultado cuantitativo satisfactorio.

Indudablemente, esto no hacía más que señalar que las experiencias ya descritas de Thorbjarnarson y Drummond, basadas en la adsorción selectiva, constituían aun con algunas deficiencias, lo más aplicable para análisis comunes de laboratorio, claro está, basán-

donos siempre en esa extraordinaria diferencia entre las cantidades de escualeno existentes en el aceite de oliva, comparadas con las que otros aceites contienen.

(14)

Fitelson standardizó este método previo de asociación selectiva, resumiéndolo en uno en el que opera con sólo cinco gramos de aceite y no requiere ninguna pesada más, solamente una titulación para determinar el halógeno fijado. Obtuvo datos perfectamente reproducibles, situación ésta a la que fué verdaderamente difícil llegar y que por todo eso coloca al método en condiciones de llenar todos los requisitos de las experiencias corrientes de caracterización de aceites en el laboratorio, especialmente en lo que se refiere a sencillez operativa y exactitud en los resultados.

El minucioso estudio de las condiciones realizado por Fitelson, le permitió llegar a una técnica que puede considerarse perfecta, en lo referente a ese escabroso problema de la reproducibilidad de los valores. Esto ha sido uno de los aspectos que a nosotros más nos ha interesado y que hemos confirmado con toda certeza.

El material, el relleno de la columna, la velocidad de pasaje a través de la columna, las cantidades de solvente empleadas, etc., todos fueron problemas perfectamente resueltos unos, e ingeniosamente comprobados y explicados otros, por el propio Fitelson.

Evidentemente, pueden hacérsele objeciones en cuanto a la aplicabilidad del método para la determinación de la cantidad de aceite de oliva en mezclas de aceites, sobre todo ahora que contamos con abundante cantidad de datos, pero no en cuanto a la técnica de valoración de escualeno.

En la introducción a la parte técnica, Fitelson afirma que fueron examinadas diversas alúminas hallando en todos resultados satisfactorios, siempre que el tamaño del grano estuviese comprendido entre ochenta y doscientas mallas.

La cantidad de escualeno contenida en el percolado es apreciablemente influida por la velocidad de pasaje y de lavado de la columna por el solvente: un lavado rápido resulta insuficiente para arrastrar todo el escualeno presente en el insaponificable. Resultados concordantes, expuestos por Fitelson en cuadros de valores altamente ilustrativos, fueron obtenidos haciendo pasar lentamente el solvente, 1 ml. por minuto.

También le insumió detallado estudio el problema de la cantidad de líquido de lavado que debía pasar a través de la columna, pues es sabido que los hidrocarburos saturados y no saturados del tipo del escualeno, pasan muy rápidamente, y, por el contrario, un lavado prolongado incidiría en la cantidad de alcoholes no saturados en el filtrado, de manera que la solución debía ser buscada en la menor cantidad posible de líquido de lavado que arrastrara, eso sí, todo el escualeno presente en el insaponificable.

Todo ello fué resuelto, concluyendo en que cincuenta ml. era la cantidad de solvente que debía emplearse para el lavado.

Respecto de la obtención del insaponificable no adoptó el clásico método S.P.A., pues no encontró mayores diferencias entre éste y el propuesto por Grossfeld y Timm, pero con una extracción más, esto es, dos en total. Es ilustrativo a este respecto, un cuadro comparativo que muestra las despreciables diferencias halladas con



la aplicación de los dos métodos:

Mét. extracc.	mg. de escualeno/100 g. de aceite					
	oliva	oliva	maní	algodón	té	maiz
S.P.A.	133	519	24	12	16	19
Fitelson	135	517	26	13	16	19

En nuestro trabajo hemos optado por seguir el método de Fitelson, osea el de Grossfeld y Timm por él modificado para la obtención del insaponificable. Lo hemos hecho así para obtener valores comparable a los obtenidos por el autor, a pesar de saber por los trabajos de Cattáneo (15), que con sólo dos extracciones no podemos tener insaponificable total, aunque probablemente pueda encontrarse todo el escualeno presente en el aceite.

Los valores obtenidos por Fitelson en sus experiencias con aceites de distintos países, los publicamos aquí como referencia.

Escualeno contenido en el aceite de oliva

mg. de escualeno/100 g. de aceite

	España	Ital	Franc	Túnez	Grecia	Moroc	Palest	Turq	U.S.A.	otros
Máx.	404	518	388	258	431	370	708	278	448	435
Mín.	402	225	381	136	316	352	475	230	159	305
Prom.	403	378	385	193	376	361	592	261	335	376

-----

Escualeno contenido en otros aceites

mg. de escualeno/100 g. de aceite

	oliva	algodón	maíz	soja	girasol	té	sésamo	uva	
Máx.	708	12	49	36	17	19	16	--	--
Mín.	136	4	13	19	7	8	8	--	--
Prom.	330	8	28	28	11	13	12	3	28

-----

Finalmente, Fitelson efectúa consideraciones sobre la aplicación del método de Rosenmund Kunhemm (16), para la determinación del halógeno absorbido y proporciona un resumen en el que establece que las cantidades de percolado obtenidas en las determinaciones, oscilan entre 25 y 60 gramos por 100 gramos de insaponificable. También establece que los índices de yodo de las porciones no adsorbidas cuentan entre 336 y 365.

Posteriormente, en 1945, E. Phillippe y M. Henzi (17) efectuaron determinaciones de orden común y también de escualeno en siete muestras de aceites de oliva y doce de otro tipo.

Efectuaron valoraciones de acidez, índice de yodo, índice de refracción del insaponificable, número de Bellier, etc., con el objeto de relacionar esos resultados y poder establecer conclusiones.

La importancia del trabajo reside en el valor estadístico de los datos obtenidos, que arrojan cifras entre 294 y 450 mg. de escualeno por 100 g. de aceite para los de oliva y entre 30 y 144 mg. de escualeno por 100 g. de aceite para los demás aceites vegetales co

mestibles.

Dicen con este procedimiento poder descubrir cantidades pequeñas, tales como 5 % de aceite de oliva, en mezclas con otros aceites.

Los autores observan la posibilidad de emplear este método únicamente para individualizar aceite de oliva en mezclas, trabajando siempre en conjunción con otros análisis de tipo corriente, tales como la reacción de Halpen para aceite de algodón, la de furfural para el de sésamo, etc., que pueden utilizarse como datos confirmativos.

La técnica empleada comienza con una saponificación del aceite con potasa alcohólica, extrayendo luego el insaponificable con éter de petróleo. El extracto es evaporado y el residuo es luego disuelto en alcohol de 50°, efectuando la titulación con yodo y tiosulfato de sodio de acuerdo con Margoches.

Un trabajo moderno es el debido a Hadorn y Jungkung (18), que efectúan la valoración del halógeno absorbido empleando el método de Hanus. En resumen, la técnica operativa consta de cinco pasos que a continuación enumeramos:

- 1) saponificación y aislamiento del insaponificable.
- 2) resaponificación del insaponificable con potasa alcohólica
- 3) separación de los hidrocarburos del insaponificable con alúmina
- 4) determinación de la fracción hidrocarburo en mg. %
- 5) determinación del número de escualeno agregando BrI en cloroformo, y titulación del exceso de yodo.

Los valores obtenidos del número de escualeno se encuentran entre 230 y 458, y la mayoría entre 230 y 320.

En otros aceites comestibles analizados fueron obtenidos valores entre 4 y 36.

Posteriormente, los mismos autores, realizaron nuevas experiencias obteniendo valores del número de escualeno entre 104 y 499, promedio 300. En un aceite de oliva aislado por ellos en el laboratorio, obtuvieron un número de escualeno de 1.062.

El trabajo más reciente "sobre el valor del dosaje de escualeno en aceites vegetales", es debido a la investigadora brasileña M. de Almeida. (19)

La autora efectuó la determinación de escualeno en cuarenta y cinco muestras de aceites de olivas, exactamente con la misma técnica empleada por Fitelson.

Transcribiremos a continuación, a título de síntesis los valores por ella determinados:

Escualeno en aceites de oliva

N° de muestra	Procedencia	mg. escual./100g. aceite
1		414
2	Líbano	575
3		460
4	Palestina	559
5	Portugal	504
6	Italia	554
7	Portugal	468
8	Italia	492
9	España	587
10	Italia	340

11	Italia	400
12		540
13	Portugal	400
14	Siria	536
15	Siria	614
16	Portugal	567
17	Portugal	559
18	Portugal	443
19	España	430
20	Portugal	518
21	Italia	367
22	Italia	309
23	Portugal	615
24	Siria	544
25		440
26		621
27		412
28	España	378
29	Siria	591
30		635
31	Líbano	561
32	Portugal	473
33	Italia	504
34	Italia	338
35	Líbano	468
36	Siria	569
37	Italia	310

38	Siria	614
39	Líbano	557
40	Siria	623
41	Francia	534
42		401
43	Italia	457
44	Siria	582
45		540

-----

Las cantidades máxima y mínima obtenidas, son respectivamente 635 y 509, siendo el promedio de 498.

Estos resultados son apreciablemente mayores que los obtenidos por todos los autores anteriormente nombrados.

El estudio continúa con el examen de otros aceites vegetales comestibles, obteniendo en éstos, casi sin excepción, valores alrededor de diez veces menores que en el caso del de oliva.

Efectúa mezclas con diferentes proporciones de distintos aceites, de oliva y otros, a fin de verificar la recuperación del escualeno. Calcula cual debería ser su tenor en la mezcla, de acuerdo a las de terminaciones parciales y luego efectúa el dosaje en ella. Los resultados obtenidos son alentadores. Veamos algunos de ellos: en una mezcla de 70 % de aceite de "amendoin" con 30 % de oliva, fué calculado un tenor de escualeno teórico de 155, y, en la práctica se encontró 157. Otra mezcla con las mismas proporciones, pero con diferentes muestras, indicaba un 211 teórico y fué obtenido en el aná lisis, 210.

Todas estas situaciones conducen a la autora a afirmar que la re-  
producibilidad del método es completa, por cuanto ejecutaron ensa-  
yes en paralelo, los que también fueron repetidos por otros analis-  
tas y en todos los casos con una variación entre las determinacio-  
nes que nunca fué mayor de 2 a 3 miligramos por 100 gramos de a-  
ceite.

-----

Siendo nuestro propósito ensayar previamente la determinación de escualeno por el método de Fitelson, utilizando escualeno puro, nos propusimos obtener este hidrocarburo puro del aceite de hígado de tiburón, el cual según la literatura, es extraordinariamente rico en tal componente. Para ese fin, se ensayó su extracción en dos muestras obtenidas en el comercio, procedentes de Mar del Plata.

No fué posible establecer el origen de esas muestras, en cuanto a las especies marinas de las cuales fueron obtenidas.

Fuó aplicada la técnica que a continuación describiremos, pero en ninguno de los casos fué posible obtener una fracción identificable como escualeno. (20)

El hígado es extraído del tiburón inmediatamente y después pesado, luego cortado en pequeños trozos, que se calientan en un recipiente especial con una serpentina de vapor, por espacio de media hora. El aceite así obtenido es separado de los tejidos por centrifugación.

Nosotros trabajamos directamente con el aceite en esas condiciones, de manera que antes de proceder a la tarea de extracción del insaponificable, tuvimos que separar la estearina por enfriamiento.

El método de obtención de la sustancia insaponificable que seguimos, fué el siguiente:

Calentar el aceite (500)ml. en un recipiente de níquel a 105-110°C a reflujo y agregar poco a poco solución al 20 % de hidróxido de sodio. Después de una hora la saponificación es completa.

Agregar 150 g. de cloruro de sodio en 150 ml. de agua. Cuando la



mezcla está fría, filtrar a través de un género. Se separa el insaponificable, se lava con agua repetidas veces y luego se seca con sulfato de sodio anhidro.

Luego se destila a 3 mm de presión. A esta presión destila el escualeno, de índice de refracción 1,497, conteniendo una pequeña cantidad de compuestos oxigenados.

Otro método, que puede ser alternado con el anterior, es el basado en la destilación directa del aceite en cantidades no mayores de 200 gramos, a 3 mm de presión. La mayor cantidad destila entre 240 y 250°C, debiendo ser detenida la destilación cuando el aceite comienza a humear. El destilado es un aceite que contiene gran cantidad de impurezas y ácidos grasos.

Se disuelve luego en éter, se lava con solución diluida de hidróxido de sodio y finalmente con agua, hasta que las aguas de lavado no den más reacción alcalina a la fenolftaleína.

Finalmente se seca con cloruro de calcio, se evapora el éter y el aceite se redestila.

Nosotros no obtuvimos destilado alguno a la temperatura que indica la técnica. Solamente calentando cerca de 260°C comenzó a destilar una sustancia sólida a la temperatura normal, de bajo índice de yodo y de índice de refracción: 1,4789.

Como detalle complementario efectuamos la determinación del índice de yodo del insaponificable obtenido. El valor hallado indica claramente la existencia de pequeñas cantidades de sustancias no saturadas.

También ensayamos la formación del derivado hexaclorado, directa-

mente sobre el insaponificable, pero la poca cantidad de precipitado obtenido indicó que la presencia de escualeno era prácticamente despreciable.

La técnica seguida para la obtención del derivado clorado fué la siguiente:

15 g. de acetona anhidra se saturan a  $-5^{\circ}\text{C}$  con ácido clorhídrico seco y se agrega luego el producto conteniendo escualeno (5 g.). La corriente de gas debe continuar pasando hasta que se forme un precipitado abundante. El color de la solución debe cambiar de rojo a casi negro. El hexahidro hexacloro derivado resultante, se lava con éter anhidro para eliminar el aceite coloreado que pueda contener. El filtrado, es nuevamente saturado con ácido clorhídrico y el precipitado formado es reunido con el anterior. Si la acetona no es previamente saturada, la cantidad de precipitado obtenido es mucho menor.

Además, determinamos el escualeno presente en el insaponificable de aceite de hígado de tiburón, empleando la técnica de Fitelson.

Los resultados obtenidos, fueron los siguientes:

	Insaponificable	Percolado	Indice de yodo del percolado
Muestra 1	0,1071 g.	0,0274 g.	88,1
Muestra 2	0,0937 g.	0,0254 g.	82,4

Los valores indican claramente que el contenido en escualeno de estas muestras obtenidas en el comercio, es sumamente bajo.

Discusión de la parte experimental

Hemos, en general, seguido la técnica de Fitelson adoptada como método tentativa por la A. O. A. C. para la determinación de escualeno en aceite de oliva. (21)

Evidentemente, ofrece serias objeciones la obtención del insaponificable con sólo dos extracciones, pero es muy posible, de todas maneras, que en la fracción obtenida se encuentre la totalidad del escualeno presente en el aceite.

Fué perfectamente comprobado por Cattáneo, Karman y Rosovski (loc. cit.), que el índice de yodo del insaponificable disminuye a medida que aumenta el número de extracciones. Las últimas porciones extraídas tienen un índice de yodo bajo con respecto a las anteriores, debido a la menor cantidad de sustancias no saturadas. Los autores necesitaron ocho extracciones sucesivas para obtener el insaponificable total.

Nosotros efectuamos la determinación de las cantidades de insaponificable contenidas en todos los aceites analizados, y, los valores obtenidos, mostraron ser demasiado bajos, de manera que esas cantidades no representan el total existente en los aceites.

De todas maneras, el hecho que todas las fracciones obtenidas en las últimas extracciones, tengan un índice de yodo bajo, conduce a pensar que el escualeno, que es altamente no saturado, con seis dobles ligaduras y con un índice de yodo teórico de 371, sea extraído con facilidad por el éter de petróleo en las primeras fracciones.

El método descrito por Fitelson y empleado por nosotros, utiliza pequeñas cantidades de aceite para las determinaciones, ventaja apre-

ciable sobre el de Thorbjarnarson y Drummond, también basado en la adsorción selectiva, pero inaplicable para valoraciones corrientes de rutina por la gran cantidad de sustancia empleada, con el consiguiente despliegue de material necesario.

Sólo cinco gramos de aceite son necesarios para cada determinación. Además, calculando el contenido de escualeno en base a la titulación del halógeno no absorbido por el percolado y aceptando que esa absorción se debe exclusivamente al escualeno, se pueden obtener valores comparables refiriéndolos a 100 gramos de aceite, sin haber efectuado en toda la determinación más que una sola pesada.

En la preparación de la columna para la cromatografía fué empleado como material adsorbente, alúmina Merck, especial para uso cromatográfico (80-200 mallas), ya que en estudios anteriores vimos que no surgían diferencias debidas al origen del material empleado, siempre que llenaran las condiciones establecidas sobre el tamaño del grano y la pureza.

Como solvente utilizamos para las extracciones y el lavado de la columna, éter de petróleo redestilado entre 40 y 60°C.

Como ya dijimos, es de suma importancia la velocidad de pasaje del insaponificable disuelto en el éter y también la de los líquidos de lavado a través de la columna. Williams <sup>(22)</sup> explica cuales son las sustancias que pasan con mayor o menor velocidad por una columna rellena de óxido de aluminio. Asegura el autor que el percolado está formado por la totalidad del escualeno presente en el insaponificable, acompañado por algunas otras sustancias, Parece que los hidrocarburos saturados presentes pasan muy rápidamente, por lo que

no sería extraño que entre las sustancias no retenidas se halle una cantidad considerable de hidrocarburos de ese tipo.

Además de la velocidad, tiene una influencia notable, la cantidad de líquido utilizada para el lavado de la columna. Resultados satisfactorios y concordantes se obtuvieron empleando 50 ml. de éter de petróleo para disolver el insaponificable y lavar la columna, cumpliendo con la condición de que la velocidad fuera de 1 mililitro por minuto.

En lugar de evaporar las últimas porciones de solvente y secar el insaponificable y el percolado en un baño de arena haciendo pasar una corriente de un gas inerte, tal como indica la técnica, nosotros efectuamos el secado en una estufa de vacío a 95-100°C y 6 mm de presión. Consideramos que la pérdida de sustancias volátiles en esas condiciones, no podía afectar apreciablemente los resultados, teniendo en cuenta que el escualeno es perfectamente estable en esas condiciones.

Antes de retirar el erlenmeyer de la estufa, llenamos ésta con anhídrido carbónico hasta recuperar la presión ambiente y luego lo transportamos a un desecador en el que efectuamos el vacío hasta que se enfríe totalmente.

-----

#### Elección del método para determinar el halógeno absorbido.

Bolton y Williams hablan acerca de la absorción de los halógenos por los esteroides en las determinaciones de índice de yodo.

Establecen las grandes irregularidades que ofrecen algunos métodos, tales como el de Wijs, que proporciona valores inexactos, más altos que los requeridos por la teoría, cuando entre las sustancias presentes se encuentran algunas del tipo de los esteroides.

Precisamente en la materia insaponificable de los aceites vegetales, hay gran cantidad de sustancias de esa naturaleza, que son capaces de fijar halógeno y para las que es preciso valerse de un método que no adolezca de las fallas del de Wijs. En cambio, fueron obtenidos valores aceptables con los métodos de Hanus y de Hübl y con el empleo del sulfato de piridina bromuro, reactivo descrito por Rosenmund Kunhnhenm (loc. cit.) y que tiene ventaja sobre los anteriores por ser sencillo y más rápido.

Actualmente, es el método adoptado por casi todos los investigadores en esta clase de experiencias y los resultados obtenidos son altamente satisfactorios, en las determinaciones de índices de yodo, en las sustancias en las que se hallan presentes compuestos del tipo de los esteroides, con la excepción del ergosterol.

-----

### Materialles y reactivos

El material empleado para las determinaciones, fué el común del laboratorio analítico: vasos de precipitados, pipetas, buretas, refrigerantes, mecheros, baño-maría, etc., y, además:

Frascos erlenmeyer de 125 ml. con la boca esmerilada para admitir un refrigerante a reflujo.

Embudos de decantación de 300 ml.

Columnas de adsorción de 0,8 cm. de diámetro por 30 cm. de largo.

Estufa de vacío.

Desecador de vacío (con ácido sulfúrico o cloruro de calcio).

Bomba de vacío.

-----

Los reactivos empleados fueron los siguientes:

- 1) Solución de hidróxido de potasio concentrado. Disolver 60 g. de hidróxido de potasio en 40 ml. de agua.
- 2) Solución diluida de hidróxido de potasio. Disolver 28 g. de hidróxido de potasio en agua y diluir hasta un litro.
- 3) Eter de petróleo. Fracción redestilada entre 40 y 60°C.
- 4) Oxido de aluminio adsorbente. 80 a 200 mallas. Alúmina adsorbente para análisis cromatográficos, Merck.
- 5) Solución de bromo sulfato de piridina 0,1 N. Disolver 8 g. de Br en 20 ml. de ácido acético (99,5 %). Preparar otra solución agregando gradualmente y enfriando 5,45 ml. de ácido sulfúrico a una mezcla de 20 ml. de ácido acético y 8,15 ml. de piridina. Mezclar

las dos soluciones en frío y diluir hasta un litro con ácido acético.

- 6) Solución de tiosulfato de sodio 0,05 N. Disolver 13 g. de tiosulfato de sodio ( $S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$ ) en agua libre de  $CO_2$ , conteniendo 1 % de alcohol isoamílico. Diluir a un litro, mezclar y filtrar.

Contrastarlo con solución exactamente 0,05 N de yodato de potasio (1,7835 g./litro) como sigue: en un frasco erlenmeyer con tapa agregar 10 ml. de solución de yoduro de potasio 10 %, 5 ml. de agua, 2 g. de bicarbonato de sodio y lentamente 5 ml. de ácido clorhídrico 6 N aproximadamente. Mezclar, agregar 25 ml. de la solución de yodato de potasio, lavar las paredes del frasco con agua y titular a continuación con tiosulfato de sodio, usando almidón como indicador del punto final de la reacción.

a) Preparación del almidón. Mezclar cerca de 1 g. de almidón soluble, con agua suficientemente caliente, hasta hacer una pasta liviana; agregar 100 ml. de agua hirviendo y hervir mientras se agita por espacio de 1 minuto.

- 7) Solución de yoduro de potasio 10 %.
- 8) Lubricante para las llaves. 9 g. de almidón soluble se suspenden en 22 g. de glicerina y se calientan a  $140^\circ C$ . Luego se deja estar media hora y se decanta. Se enfría y deja por lo menos una noche hasta que adquiera la constitución de una grasa espesa.
- 9) Alcohol etílico de  $95^\circ$ .
- 10) Tubo de anhídrido carbónico.
- 11) Eter de petróleo ( $40$  a  $60^\circ C$ ).
- 12) Cloroformo puro redestilado.



Preparación de la columna de adsorción.

Debe prepararse una columna nueva para cada determinación.

Colocar una pequeña cantidad de algodón en el estrechamiento final de un tubo de vidrio de 0,8 cm. de diámetro por 30 cm. de largo. Agregar la alúmina adsorbente en diez pequeñas porciones, hasta que llegue en la columna a una altura de 10 cm. Aplicar una pequeña succión y aplastar la alúmina con una varilla de vidrio. Colocar una pequeña porción de algodón en la parte superior de la columna.

Lavar la columna con 15 ml. de éter de petróleo, efectuar la leve succión y dejar que sobrepase la parte superior de la columna una capa de éter de petróleo, hasta el momento de usarla.

-----

Prueba de la Umididad

Pesar con exactitud 5 g. (más o menos 20 mg.) de muestra dentro de un Erlenmeyer de 125 ml. , agregar 3 ml. de solución concentrada de hidróxido de potasio y 20 ml. de alcohol. Calentar a refujo 30 minutos agitando el frasco de vez en cuando.

Enfriar un poco y mientras está todavía caliente, agregar 50 ml. de éter de petróleo. Mezclar y llevar al embudo separador. Lavar el frasco con 20 ml. de alcohol y luego con 40 ml. de agua, agregando los líquidos de lavado a la solución que está en el separador. Agitar vigorosamente, luego permitir que las dos capas se separen y lentamente retirar la solución jabonosa.

Levar el extracto de éter de petróleo de la parte superior del separador a otro separador conteniendo 20 ml. de agua. Repetir la extracción de la solución jabonosa con 50 ml. de éter de petróleo.

Agitar lentamente el extracto con 20 ml. de agua y después que las dos capas se hayan separado, descartar el agua de lavado. Repetir el lavado agitando vigorosamente con 20 ml. de agua y luego descartar la capa más baja cuando se haya separado.

Lavar la solución de éter de petróleo con 20 ml. de la solución diluida de hidróxido de potasio y luego con 20 ml. de agua varias veces, hasta que el líquido quede libre de álcali, agitando vigorosamente en cada ocasión. Después del último lavado reunir las gotas de agua imprimiendo un movimiento de rotación al embudo separador.

Trasladar la solución de éter de petróleo desde la parte superior del separador a un vaso cónico. Lavar el separador con solución de éter de petróleo y agregar los líquidos de lavado al contenido del

vaso cónico. Evaporar casi todo el solvente en baño maría.

Llevar a la estufa de vacío y allí secar a 95-100°C y más o menos 6 mm de presión durante dos horas y media. Restablecer la presión normal en la estufa de vacío llenándola con CO<sub>2</sub>. Luego retirar el Erlenmeyer y colocarlo en un desecador de cloruro de calcio, donde se efectuará nuevamente el vacío hasta que se haya enfriado.

Pesar el insaponificable y repetir la operación de secado hasta una constancia de 0,1 mg.

Disolver la materia insaponificable en 5 ml. de éter de petróleo y hacerla pasar por la columna cromatográfica tal como se indicó anteriormente .

El filtrado, que se toma en un frasco de vidrio de 250 ml. debe pasar a una velocidad de 1 ml./minuto, aplicando para ello una leve succión, si fuera necesaria. Cuando la solución casi ha pasado por la columna, agregar 5 ml. de éter de petróleo de los que se usaron para lavar el frasco. Continuar la adición de solvente en porciones de 5-10 ml. que ya han sido usadas para lavar el frasco, siempre manteniendo la superficie de la columna cubierta de líquido, hasta que un volumen total de 50 ml. haya pasado a través del tubo de adsorción.

Evaporar la mayor cantidad de solvente en el frasco Erlenmeyer y luego trasladarlo a la estufa de vacío, donde se efectuará el secado durante el mismo tiempo y con la misma técnica que en el caso del insaponificable.

Pesar el percolado y repetir la operación de secado, hasta que la diferencia entre dos pesadas no sea mayor de 0,1 mg.

Disolver el residuo no adsorbido en 5 ml. de cloroformo y agregar una cantidad de bromo sulfato de piridina suficiente para que quede al final un exceso de 50 % (10 ml. serán usualmente suficientes). Dejar en la oscuridad 5 minutos y luego agregar solución 10% de yoduro de potasio (5 ml.), junto con 40 ml. de agua. Mezclar cuidadosamente, lavar debajo del tapón el yodo libre y titular con tiosulfato de sodio 0,05 N. Antes del final de la reacción, agregar almidón como indicador, agitar vigorosamente y luego continuar la titulación hasta que desaparezca el color azul.

Realizar un ensayo en blanco, con bromo sulfato de piridina, de la misma manera y calcular los mililitros de tiosulfato de sodio que corresponden al halógeno absorbido por el percolado.

El ensayo en blanco con todos los reactivos usados, practicamente no consume halógeno.

1 mililitro de tiosulfato de sodio 0,05 N = 1,71 mg. de escualeno. Expresar los resultados en mg. de escualeno por 100 g. de muestra.

-----

El porcentaje de insaponificable retenido en la columna, se calculó por diferencia entre el insaponificable obtenido y el percolado.

El contenido en escualeno en el insaponificable y en el aceite, se calculó de acuerdo con Fitelson, suponiendo que la no saturación del percolado corresponde íntegramente al escualeno, cuyo índice de yodo teórico es de 371.

Experiencias realizadas

Se analizaron once muestras por duplicado, es decir, veintidós determinaciones.

-----

Las determinaciones efectuadas en cada aceite fueron las siguientes:

- 1) Cantidad de insaponificable del aceite, extraído según Fitelson.
- 2) Cantidad de sustancia no retenida en la columna (percolado).
- 3) Índice de yodo del percolado.
- 4) Cantidad de escualeno del aceite.
- 5) Índice de yodo del aceite.
- 6) Índice de peróxido del aceite.
- 7) Índice de refracción del aceite.
- 8) Índice de acidez del aceite.
- 9) Reacción de Kreiss.

-----

Efectuamos en dos aceites la determinación del índice de yodo del insaponificable, y luego, en otras muestras de los mismos, la del índice de yodo del percolado.

Por la pequeña diferencia entre las cantidades de halógeno fijadas en una y otra determinación del mismo aceite, vemos que casi toda la sustancia capaz de fijar halógeno, pasa a través de la columna.

	Muestra n° 1		Muestra n° 2	
	1ra. det.	2da. det.	1ra. det.	2da. det.
Insaponificable	0,0361g.	0,0349g.	0,0380g.	0,0400g.
Índice de yodo	213	218,3	195,5	188,9
Yodo absorbido	7,69 mg.	7,62 mg.	7,43 mg.	7,55 mg.
Percolado	0,0230g.	0,0218g.	0,0190g.	0,0184g.
Índice de yodo	330,1	349,5	360,8	369,2
Yodo absorbido	7,59 mg.	7,61 mg.	6,85 mg.	6,79 mg.

-----

Sin embargo, las cantidades de insaponificable retenidas en la columna son importantes, lo que prueba que la casi totalidad de los compuestos saturados, no pasan en el percolado.

PROVINCIA DE MENDOZA. VARIEDAD FRANTOIO. AÑO 1949.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	4,9971 g	5,0031 g
Insaponificable	0,0351 g	0,0363 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,702	0,725
Percolado (sustancia no retenida)	0,0242 g	0,0244 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	68,9	67,2
g.de percolado/100 g.de aceite	0,484	0,487
Retenido en la columna	0,0109 g	0,0119 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	31,1	32,8
g.de retenido/100 g. de aceite	0,218	0,237
Indice de yodo del percolado	266,3	264,1
Escualeno	17,3 mg	17,3 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	71,4	70,9
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	49,2	47,6
mg.de escualeno/100 g.de aceite	346	345
Indice de yodo del aceite	87,6	87,1
Indice de peróxido del aceite	6,0	6,0
Indice de acidez del aceite	3,83	3,83
Indice de refracción del aceite a 20°C	1,4687	1,4687
Reacción de Kreiss	negativa	negativa

-----

PROVINCIA DE MENDOZA. VARIEDAD MANZANILLA. AÑO 1949.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	4,9940 g	5,0002 g
Insaponificable	0,0570 g	0,0589 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	1,14	1,17
Percolado (sustancia no retenida)	0,0418 g	0,0413 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	73,3	70,1
g.de percolado/100 g.de aceite	0,836	0,826
Retenido en la columna	0,0152 g	0,0176 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	26,7	29,9
g.de retenido/100 g. de aceite	0,304	0,351
Indice de yodo del percolado	233,2	236,7
Escualeno	26,2 mg	26,3 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	62,8	63,7
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	46,0	44,7
mg.de escualeno/100 g.de aceite	525	526
Indice de yodo del aceite	84,7	85,4
Indice de peróxido del aceite	5,6	5,6
Indice de acidez del aceite	3,76	3,76
Indice de refracción del aceite a 20°C	1,4690	1,4690
Reacción de Kreiss	negativa	negativa

-----



PROVINCIA DE MENDOZA. GODOY CRUZ. AÑO 1951.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	5,0123 g	5,0104 g
Insaponificable	0,0361 g	0,0349 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,720	0,696
Percolado (sustancia no retenida)	0,0227 g	0,0218 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	62,8	62,4
g.de percolado/100 g.de aceite	0,452	0,436
Retenido en la columna	0,0134 g	0,0131 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	37,2	37,6
g.de retenido/100 g. de aceite	0,267	0,261
Indice de yodo del percolado	330,0	349,5
Escualeno	20,2 mg	20,5 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	88,9	94,0
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	55,9	58,7
mg.de escualeno/100 g.de aceite	403	409
Indice de yodo del aceite	90,8	90,7
Indice de peróxido del aceite	14,2	14,2
Indice de acidez del aceite	11,3	11,3
Indice de refracción del aceite a 20°C	1,4692	1,4692
Reacción de Kreiss	positiva	positiva

-----

PROVINCIA DE MENDOZA. VARIEDAD CRIOLLA PINTONA. AÑO 1949.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	5,0043 g	5,0013 g
Insaponificable	0,0494 g	0,0480 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,988	0,978
Percolado (sustancia no retenida)	0,0260 g	0,0271 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	52,6	56,4
g.de percolado/100 g.de aceite	0,519	0,540
Retenido en la columna	0,0234 g	0,0240 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	47,4	43,6
g.de retenido/100 g. de aceite	0,467	0,417
Indice de yodo del percolado	297,5	288,2
Escualeno	20,8 mg	21,0 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	80,0	77,5
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	42,1	43,7
mg.de escualeno/100 g.de aceite	416	419
Indice de yodo del aceite	83,4	84,3
Indice de peróxido del aceite	2,0	2,0
Indice de acidez del aceite	2,27	2,27
Indice de refracción del aceite a 20°C	1,4695	1,4695
Reacción de Kreiss	negativa	negativa

-----

PROVINCIA DE MENDOZA. VARIEDAD ARVEQUINA. AÑO 1949.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	5,0014 g	5,0101 g
Insaponificable	0,0354 g	0,0350 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,708	0,718
Percolado (sustancia no retenida)	0,0260 g	0,0263 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	73,4	75,1
g.de percolado/100 g.de aceite	0,519	0,525
Retenido en la columna	0,0094 g	0,0087 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	26,6	24,9
g.de retenido/100 g. de aceite	0,187	0,173
Indice de yodo del percolado	354,1	350,0
Escualeno	24,8 mg	24,8 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	94,6	94,2
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	70,0	70,8
mg.de escualeno/100 g.de aceite	495	495
Indice de yodo del aceite	94,9	94,6
Indice de peróxido del aceite	8,4	8,4
Indice de acidez del aceite	11,5	11,5
Indice de refracción del aceite a 20°C	1,4700	1,4700
Reacción de Kreiss	positiva	positiva

-----

PROVINCIA DE MENDOZA. GENERAL GUTIERREZ. AÑO 1951.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	5,0034 g	5,0010 g
Insaponificable	0,0332 g	0,0321 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,663	0,641
Percolado (sustancia no retenida)	0,0155 g	0,0151 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	46,6	47,0
g.de percolado/100 g.de aceite	0,310	0,302
Retenido en la columna	0,0177 g	0,0170 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	53,4	53,0
g.de retenido/100 g. de aceite	0,353	0,340
Índice de yodo del percolado	245,8	243,9
Escualeno	10,2 mg	9,9 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	66,1	65,5
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	30,9	30,8
mg.de escualeno/100 g.de aceite	205	198
Índice de yodo del aceite	93,8	92,9
Índice de peróxido del aceite	4,7	4,7
Índice de acidez del aceite	2,31	2,31
Índice de refracción del aceite a 20°C	1,4697	1,4697
Reacción de Kreiss	negativa	negativa

-----

MUESTRA DEL COMERCIO .-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	5,0186 g	5,0007 g
Insaponificable	0,0380 g	0,0400g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,758	0,800
Percolado (sustancia no retenida)	0,0190 g	0,0184 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	50,0	46,0
g.de percolado/100 g.de aceite	0,380	0,368
Retenido en la columna	0,0201 g	0,0216 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	52,8	54,0
g.de retenido/100 g. de aceite	0,402	0,432
Indice de yodo del percolado	360,8	369,2
Escualeno	18,4 mg	18,3 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	91,5	99,4
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	47,0	45,7
mg.de escualeno/100 g.de aceite	366	366
Indice de yodo del aceite	87,0	87,3
Indice de peróxido del aceite	8,1	8,1
Indice de acidez del aceite	9,31	9,31
Indice de refracción del aceite a 20°C	1,4702	1,4702
Reacción de Kreiss	positiva	positiva

-----

PROVINCIA DE BUENOS AIRES. VIVERO EXPERIMENTAL C. SPEGAZZINI. AÑO 1951.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	5,0135 g	5,0020 g
Insaponificable	0,0390 g	0,0396 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,777	0,792
Percolado (sustancia no retenida)	0,0225 g	0,0229 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	60,2	57,7
g.de percolado/100 g.de aceite	0,468	0,457
Retenido en la columna	0,0155 g	0,0167 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	39,8	42,3
g.de retenido/100 g. de aceite	0,309	0,334
Indice de yodo del percolado	302,6	316,1
Escualeno	19,1 mg	19,4 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	81,2	84,7
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	48,9	48,9
mg.de escualeno/100 g.de aceite	381.	388
Indice de yodo del aceite	92,5	92,9
Indice de peróxido del aceite	5,6	5,6
Indice de acidez del aceite	6,06	6,06
Indice de refracción del aceite a 20°C	1,4690 .	1,4690
Reacción de Kreiss	positiva	positiva

-----

PROVINCIA DE SAN JUAN. S.A.I.S. AÑO 1951.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	4,9963 g	5,0092 g
Insaponificable	0,0309 g	0,0321 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,618	0,640
Percolado (sustancia no retenida)	0,0140 g	0,0148 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	45,3	46,1
g.de percolado/100 g.de aceite	0,281	0,295
Retenido en la columna	0,0169 g	0,0173 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	54,7	53,9
g.de retenido/100 g. de aceite	0,338	0,345
Indice de yodo del percolado	276,6	268,1
Escualeno	10,4 mg	10,7 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	74,2	72,2
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	33,6	33,3
mg.de escualeno/100 g.de aceite	208	213
Indice de yodo del aceite	89,4	88,3
Indice de peróxido del aceite	5,0	5,0
Indice de acidez del aceite	5,97	5,97
Indice de refracción del aceite a 20°C	1,4690	1,4690
Reacción de Kreiss	positiva	positiva

-----

PROVINCIA DE SAN JUAN. AÑO 1951.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	5,0095 g	5,0170 g
Insaponificable	0,0354 g	0,0370 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,706	0,737
Percolado (sustancia no retenida)	0,0194 g	0,0199 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	54,8	53,7
g.de percolado/100 g.de aceite	0,387	0,396
Retenido en la columna	0,0160 g	0,0171
g.de retenido/100 g.de insaponificable	45,2	46,3
g.de retenido/100 g. de aceite	0,319	0,340
Índice de yodo del percolado	255,3	248,8
Escualeno	13,3 mg	13,3 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	68,5	66,8
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	37,5	35,6
mg.de escualeno/100 g.de aceite	265	265
Índice de yodo del aceite	84,1	83,8
Índice de peróxido del aceite	2,9	2,9
Índice de acidez del aceite	2,81	2,81
Índice de refracción del aceite a 20°C	1,4695	1,4695
Reacción de Kreiss	negativa	negativa

-----



PROVINCIA DE SAN JUAN. AGROS. AÑO 1951.-

Determinaciones	muestra n°1	muestra n°2
Cantidad empleada	5,0115 g	5,0132 g
Insaponificable	0,0401 g	0,0419 g
g.de insaponificable/100 g.de aceite	0,800	0,835
Percolado (sustancia no retenida)	0,0227 g	0,0225 g
g.de percolado/100 g.de insaponificable	56,6	53,7
g.de percolado/100 g.de aceite	0,453	0,449
Retenido en la columna	0,0174 g	0,0194 g
g.de retenido/100 g.de insaponificable	43,4	46,3
g.de retenido/100 g. de aceite	0,346	0,387
Indice de yodo del percolado	307,7	310,4
Escualeno	18,8 mg	18,8 mg
g.de escualeno/100 g.de percolado	82,8	83,5
g.de escualeno/100 g.de insaponificable	46,8	46,2
mg.de escualeno/100 g.de aceite	375	375
Indice de yodo del aceite	90,0	91,1
Indice de peróxido del aceite	3,8	3,8
Indice de acidez del aceite	6,35	6,35
Indice de refracción del aceite a 20°C	1,4690	1,4690
Reacción de Kreiss	positiva	positiva

-----

Número de escualeno de los aceites examinados

Muestra n°	Procedencia	n° de escualeno
1	Mendoza	346
2	Mendoza	345
3	Mendoza	525
4	Mendoza	526
5	Mendoza	403
6	Mendoza	409
7	Mendoza	416
8	Mendoza	419
9	Mendoza	495
10	Mendoza	495
11	Mendoza	205
12	Mendoza	198
13	Comercio	366
14	Comercio	366
15	Buenos Aires	381
16	Buenos Aires	388
17	San Juan	208
18	San Juan	213
19	San Juan	265
20	San Juan	265
21	San Juan	375
22	San Juan	375

### Conclusiones

En determinaciones del índice de yodo efectuadas sobre el insaponificable y el percolado, a través de la columna de alúmina, se han obtenido valores que confirman que quedan retenidos la casi totalidad de los compuestos saturados del insaponificable, y, que por el contrario, el escualeno pasa atravésde ella.

Siguiendo la técnica de extracción del insaponificable utilizada por Fitelson, se ha constatado en una serie de determinaciones efectuadas por duplicado, que la cantidad de insaponificable extraída en dos operaciones paralelas, no es la misma.

El porcentaje de percolado respecto del insaponificable, utilizando la columna cromatográfica de alúmina y siguiendo la técnica de Fitelson, no es constante en dos determinaciones sucesivas y no guarda relación con el porcentaje de insaponificable extraído. El valor mínimo obtenido fué de 45,3 % y el máximo de 75,1 %, siendo el valor promedio de 58 %.

En general, los índices de yodo calculados en el percolado, no son concordantes en dos determinaciones sucesivas, habiéndose obtenido una diferencia máxima de 19,5 unidades, y estando, en general, bastante lejos del valor teórico del escualeno (371). El valor promedio fué de 294.

Sin embargo, el número de escualeno -mg. de escualeno por 100 g.

do aceite- hallado en dos determinaciones sucesivas, es concordante, habiéndose reproducido perfectamente los valores, con una diferencia máxima entre dos determinaciones, de 7 unidades.

Esto indica, confirmando las suposiciones de Fitelson, que junto con el escualeno pasan otras sustancias a través de la columna, principalmente hidrocarburos saturados y que la no saturación de esa fracción del insaponificable, se debe exclusivamente al escualeno.

Por otra parte, estos hechos confirman que, si bien la extracción del insaponificable por la técnica de Fitelson, utilizada en el presente trabajo, no es completa, ni el porcentaje extraído constante, basta, sin embargo, para obtener totalmente el escualeno, pues si así no fuera, se obtendrían valores diferentes en dos determinaciones sucesivas.

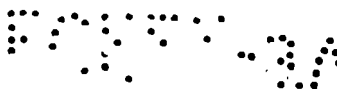
Considerados en su aspecto estadístico, puede decirse que, confirmando los trabajos anteriores, los valores de escualeno en aceites de oliva, son muy variables, habiéndose obtenido cifras entre 198 y 526.

El valor promedio del número de escualeno, es semejante a los valores obtenidos por Fitelson, Phillire y Henzi y Hadorn y Jungkung, aunque apreciablemente más bajo que los de Almeida.

	Fitelson	Phillire	Hadorn	Almeida	ac.argentinos
número de escualeno	366	369	300	498	363

Desde el punto de vista fitoquímico, en trabajos anteriores se hace la suposición, basada en hechos experimentales, que el escualeno es el precursor de los esteroides, y, si bien en el presente trabajo no han sido determinados éstos, teniendo en cuenta que los mismos constituyen la mayor parte de la fracción insaponificable retenida en la columna, se ve que en general, cuanto mayor es el contenido en escualeno, menor es el porcentaje de aquella.

Si bien esta conclusión es un poco apresurada, la mencionamos como interesante para ser confirmada en posteriores trabajos, relacionándola con el grado de madurez del fruto.



Sumario

Se realizaron determinaciones de escualeno en aceites de oliva argentinos y en una muestra de aceite de hígado de tiburón de la costa atlántica, aplicando en todas ellas el método de Fitelson, adoptado como método tentativo por la A.O.A.C.

11 muestras de aceites de oliva fueron examinadas, obteniéndose valores del número de escualeno entre 198 y 526 (promedio 365).

Tales valores fueron satisfactoriamente reproducibles, con una diferencia máxima de 7 unidades entre dos determinaciones paralelas.

Se comprobó también que, toda la sustancia capaz de fijar halógeno, existente en el insaponificable, pasa con el percolado a través de la columna.

Asimismo, se efectuaron en todos los aceites, los índices de yodo, acidez, peróxido, refracción, reacción de Kreiss, y, además, determinaciones del contenido de insaponificable, percolado a través de la columna e índice de yodo del percolado.

Los valores obtenidos confirman los hallados por otros autores y señalan el alto contenido en escualeno de los aceites de oliva como un importante factor de identificación de los mismos, también en la Argentina.

Bibliografía

(1) BOLTON E.R., F.I.C. y K.A. WILLIAMS-1930-

The Analyst 55, 5.-

(2) TSUJIMOTO, M. -1906-

J. Chem. Ind. (Tokío) 9, 953 en Cattaneo, P., G.

Karman y R. Rosovsky-1945- An. Ass. Quím. Argentina 33, 85-109.-

TSUJIMOTO, M. -1916-

I. Ind. Eng. Chem. 8, 889 y-1920- 12, 63 en Thor

bjarnarson y Drummond-1935- The Analyst 60, 23-29.-

(3) A. CHASTON CHAPMAN-1917-

J. Chem. Soc. (London) 111, 56 y-1918-113, 458.

(4) ANDRÉ, E y H. CANAL-1925-

Compt. rend. 181, 612 en Fitelson, J.-1943- J. Assoc.

Off. Agr. Chem. 28, 499-506.-

(5) HEILBRON, I.M., KAMM, E.D. y W.M. OWENS-1926-

J. Chem. Soc. (London) 129, 1630.-

(6) FISHER RESEARCH BOARD OF CANADA

59, 92.-

(7) LOEW, -1931-

Olii minerali, Olii grassi, Vernici 11, 10.-en Cattaneo, P., G. Karman y R. Rosovsky (loc. cit.)-.

(8) RICCA y IAMONICA-1932-

Olii minerali, Olii grassi, Vernici 12, 73 en Cattaneo P., R. Rosovsky y G. Karman (loc. cit).-

(9) JAMIESON, G.S. y R.S. MC KINNEY-1933-

Oil and soap 10, 69 en Fitelson, J.-1943-(loc. cit)

(10- SANI-1930-

Atti Accad. Lincei. 12, 238.-

(11) THORBJARNARSON, T. y J.C.DRUMMOND-1935-

The Analyst 60, 27-29.-

THORBJARNARSON, T., A.SANTOS RUIZ y J.C.DRUMMOND-1935-

The Analyst 60, 382.-

(12) GROSSFELD y TIMM-1939-

Z. fur. Unters. der Lebensm. 77, 249.-

(13) KHUN, A. y GERHARD, H.-1941-

Deut. Apoth. Ztg. 56, 589.-

(14) FITELSON, J.-1943-

J. Assoc. Off. Agr. Chem. 26, 499-506.-

FITELSON, J.-1945-

J. Assoc. Off. Agr. Chem. 28, 283-284.-

(15) CATTANEO, P., G.KARMAN y R.ROSOVSKY-1945)

An. Ass. Quim. Argentina 33, 85-109.-



(16) ROSEN MUND KUNHEMM-1923-

Z. Nahr. u. Genussm. 46, 154 en Bolton, E.R. y Williams, K.A. (loc. cit.).-

(17) PHILLIPS, E. y M. HENZI-1944-

Mitt. Lebensm. Hyg. 35, 94 de C.A., 39, 3597.-

(18) HADORN, H y R. JUNGKUNG-1950-

Mitt. Lebensm. Hyg. 41, 435-43.-

(19) ALMEIDA DE, M.E.W.-1950-

Revista do Instituto Adolfo Lutz 9, 123-36.-

(20) HEILBRON, I.M., E.D. KAMM y W.M. OWENS-1926-

(loc. cit.).-

(21) OFFICIAL AND TENTATIVE METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS-1945-

Sixth Edition, 505.-

(22) WILLIAMS, K.A.-1946-

The Analyst 71, 259.-

*Handwritten signatures and notes:*  
A large signature, possibly "Latter", is written over the text of item 22.  
Another signature, possibly "M. J. ...", is written to the right of the text of item 22, with the date "1952" written below it.