

## Tesis de Posgrado

# Composición química de la semilla y de los aceites de semilla de algunas cucurbitáceas de producción nacional : Aislamiento de proteínas de las harinas de extracción

Vigo, María Susana

1972

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:**

Vigo, María Susana. (1972). Composición química de la semilla y de los aceites de semilla de algunas cucurbitáceas de producción nacional : Aislamiento de proteínas de las harinas de extracción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1413\\_Vigo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1413_Vigo.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Vigo, María Susana. "Composición química de la semilla y de los aceites de semilla de algunas cucurbitáceas de producción nacional : Aislamiento de proteínas de las harinas de extracción". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1972.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1413\\_Vigo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1413_Vigo.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

2315

1413

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

COMPOSICION QUIMICA DE LA SEMILLA Y DE LOS  
ACEITES DE SEMILLA DE ALGUNAS CUCURBITACEAS  
DE PRODUCCION NACIONAL  
AISLAMIENTO DE PROTEINAS DE LAS HARINAS  
DE EXTRACCION

MARIA SUSANA VIGO  
1972

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"COMPOSICION QUIMICA DE LA SEMILLA Y DE LOS ACEITES DE  
SEMILLA DE ALGUNAS CUCURBITACEAS DE PRODUCCION NACIONAL-  
AISLAMIENTO DE PROTEINAS DE LAS HARINAS DE EXTRACCION"

1413=4

Tesis presentada para optar al título de

DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

1972

Agradezco al Dr. Pedro Cattaneo,  
Director de esta tesis y Conse-  
jero de Estudios, quien con sus  
enseñanzas y estímulo constante  
hizo posible la realización de  
este trabajo.

Agradezco también:

- A la Dra. María Helena Bertoni el asesoramiento y la colaboración prestados en lo referente al aislamiento de proteínas.
- A las firmas Industrias J. Matas (Mendoza), Refinerías de Maíz S.A. e igualmente al Dr. Daniel Bassi la provisión de las distintas partidas de semilla de zapallo que motivaron parte de este estudio.
- A mis compañeros de la Cátedra de Bromatología por su sincera amistad.

Asimismo rindo homenaje a la memoria de la Dra. Germaine K. de Sutton que con su colaboración contribuyó al éxito de este trabajo.

**A MIS PADRES**

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

La familia de las Cucurbitáceas comprende plantas dicotiledóneas, generalmente anuales, con especies cultivadas bastante conocidas como: zapallo, sandía, pepino, melón, etc., y otras salvajes no tan difundidas. La integran alrededor de 850 especies distribuidas en aproximadamente 100 géneros, que desarrollan en zonas templadas y cálidas, especialmente en los trópicos.

Los géneros de valor económico son: Cucurbita (calabazas, zapallos), Cucumis (pepinos, melones), Citrullus (sandía, coloquintida), Luffa (esponjas vegetales), etc.

En general los frutos de plantas de esta familia contienen abundante semilla, rica en aceite y proteína.

La semilla de especies de Cucurbita es fuente actualmente inexplorada para la producción de aceites y proteínas. En Rusia se ha tenido en cuenta la posibilidad de producir aceite de estas semillas, especialmente Cucurbita pepo, Cucurbita moschata, y Cucurbita maxima - (45 % de aceite). Se ha señalado que la semilla de Cucurbita pepo puede parangonarse con la de maní y de soya en rendimiento de aceite por hectárea. Surge que, aparentemente, se estaría despreciando una importante materia prima para la producción de aceite y de proteína al no industrializar este tipo de semilla (1).

Por diversas razones de composición de aceites seminales y derivadas de la presencia de principios tóxicos, los aspectos de industrialización con fines alimentarios sólo debe abarcar las especies cultivadas, como se expondrá más adelante.

En muchas especies de esta familia existen variedades y formas amargas y tóxicas con diversos efectos sobre el organismo.

Se han aislado en muchas de ellas alcaloides, resinas, saponinas, etc. Pero lo más interesante es la presencia de sustancias amargas características de esta familia (aunque últimamente fueron halladas en algunas especies de otras familias) y que han sido agrupadas bajo el



nombre de cucurbitacinas y diferenciadas mediante letras de A a L.

La mayoría de las formas amargas y tóxicas están restringidas a los géneros Bryonia, Citrullus, Cucumis, Cucurbita, Ecballium, Lagenaria, Momordica y Sphaerosicyos (2).

Estos principios se hallaron en varias partes de las plantas: frutos, raíces, hojas, semillas, etc.

Son triterpenos tetracíclicos y todos tienen la misma cadena lateral fundamental, que en algunos casos está acetilada (3).

Muchas especies tienen formas amargas y no amargas. Las diferencias cuantitativas de contenido en principio amargo que se hallaron en las mismas especies, pueden ser controladas genéticamente, o deberse a condiciones externas de crecimiento, o estar conectadas al estado de desarrollo de la planta.

En plantas totalmente desarrolladas, el más alto contenido en principio amargo generalmente se halla en frutos y raíces (4).

El embrión de todas las Cucurbitáceas investigadas hasta el momento está completamente libre de principios amargos. Estas sustancias, sin embargo, se forman rápidamente en las semillas en germinación, aún en la mayoría de las Cucurbitáceas cultivadas que no contienen principios amargos en estados posteriores de desarrollo (5).

En literatura se hallan pocos datos respecto a las especies que se utilizaron en este estudio y en su mayoría no se refieren a la semilla (4).

A modo de información previa se transcriben algunas características de los principales géneros que comprenden especies cultivadas de probable aprovechamiento industrial.

Género Cucurbita- Las especies de este género comprenden las cultivadas desde más antiguo en América. Se han hallado restos de C. ficifolia estratificada en el Valle de Chimaca (Huaca Prieta, Perú), cultivada 2000 años A.C.

La evidencia arqueológica e histórica indica que las cinco especies cultivadas de Cucurbita (C.pepo, C.maxima, C.mixta, C.moscha- y C.ficifolia) son de origen americano. Su larga historia como plantas cultivadas indica que fueron de gran importancia en el desarrollo de la agricultura en el Nuevo Mundo.

Aunque de origen tropical, las especies anuales actuales se han adaptado (siempre asociadas al hombre) a diferentes condiciones ambientales, y su cultivo se extendió a casi todo el mundo en los últimos cuatro siglos.

C.ficifolia, la única especie perenne del grupo, es la más resistente a bajas temperaturas. De las anuales, C.pepo y C.maxima son las más tolerantes a las temperaturas frías (1).

Los frutos de plantas de este género se utilizan como alimento humano (frescos o procesados), y también para ganado. Con la pulpa hacen dulces y bebidas fermentadas. Las semillas se utilizan como sustituto de la nuez y pueden servir como fuente de aceite, teniendo también uso limitado como alimento directo.

Este género comprende un grupo de plantas xerofíticas (Cucurbitacordata, C.palmata y C.digitata), notables por contener elevados niveles en ácidos grasos no saturados conjugados en sus aceites esenciales (grupo original de Baja California, México y el desierto de Sonora) (2, 6).

Género Citrullus- La planta cultivada y más conocida de este género es Citrullus vulgaris (sandía), nativa de África tropical, pero actualmente muy extendida en todas las regiones cálidas.

Las semillas (blancas o negras) se usan como fuente de aceite comestible y a veces también se tuestan y utilizan como sustituto del café (7).

La especie salvaje más importante de este género es Citrullus locynthis (coloquintida), que desarrolla en África Occidental, In

dia y China. Los nativos de esas regiones las usan aprovechando todas las partes de la planta (aun de las variedades amargas y tóxicas) con fines de alimentación, medicinales, obtención de aceite y fuente de agua, especialmente en el desierto de Kalahari (2).

Es una especie perenne cuyos frutos contienen 75 % de su peso de semillas (8).

Género Luffa- Comprende hierbas trepadoras que producen un fruto conocido como esponja vegetal. La especie más común es Luffa cylindrica, originaria del Viejo Mundo, ampliamente distribuída en la actualidad. Los frutos de variedades salvajes tienen alrededor de 15 cm. de largo, pero los de las cultivadas pueden alcanzar hasta 60.

El producto esponjoso y fibroso que llena el fruto es el conocido sustituto de las esponjas de baño. Se lo usa una vez seco y blanqueado para este fin.

La pulpa es comestible, y el aceite de semilla se suele usar como emético y catártico, atribuyéndose estas propiedades a la presencia de un glucósido.

La torta residual de la expresión de aceite es amarga y probablemente tóxica, pero rica en proteína y ácido fosfórico, por lo que podría usarse como fertilizante (7).

Género Cucumis- Las especies cultivadas de mayor difusión de este género son Cucumis melo (melón) y Cucumis sativus (pepino).

Ambos son usados principalmente para la alimentación. El aceite de semilla de C. melo también se usa en alimentación en Africa Occidental y el sur de Rusia (2, 9).

#### Antecedentes sobre aceites de semilla de Cucurbitáceas

Desde hace mucho tiempo, los aceites de semilla de Cucurbitáceas llamaron la atención de los investigadores por sus caracterís-

ticas que los hacían factibles de ser usados en la alimentación en algunos casos y como interesantes fuentes de ácidos triénicos conjugados en otros.

En proporción y composición, los aceites seminales muestran una interesante variedad. Muchos responden a una composición denominada "normal", semejante a la del aceite de algodón, con predominio de ácidos linoleico, oleico y saturados (principalmente esteárico). Mientras que otros contienen glicéridos de ácidos trienoicos conjugados en proporciones diversas (9). Se ha observado completa ausencia de ácido linolénico, con excepción del género Telfairia (Telfairia pedata con 3-6 % de ácido linolénico) (7).

Los ácidos conjugados se hallaron en varias especies de Momordica (10), Trichosanthes (10), Cayaponia (10), Cucurbita (6), Ecballium elaterium (11).

Estos ácidos fueron identificados como  $\alpha$ -eleosteárico (cis-9, trans-11, trans-13 octadecatrienoico) y punícico (cis-9, trans-11, -cis-13 octadecatrienoico) (10, 12) y su presencia se traduce en mayores valores de índice de refracción (11).

El último es el que en la literatura anterior a su identificación en las Cucurbitáceas se denominaba ácido tricosónico (9).

El ácido  $\alpha$ -eleosteárico está presente en aceites seminales de varias especies del género Momordica (10, 11) (excepto M.balsamina en la que se identificó el ácido punícico) (13). Este último se encontró también en el género Trichosanthes (10, 11), (de ahí su antigua denominación de tricosónico), Cayaponia grandifolia (10) y Ecballium elaterium (11).

Con especial referencia a los géneros de valor económico se transcriben las características generales de composición acídica.

Género Cucurbita- Excepto algunas especies, los aceites seminales de plantas de este género pertenecen al grupo de los de "composi-

ción normal". Los componentes mayores son ácido oleico y ácido linoleico (entre 30 y 50 %).

En C.pepo y C.maxima los aceites son ricos en ácido oleico (33-47 %) y ácido linoleico (26-45 %), habiéndose encontrado pequeñas cantidades de ácidos trienoicos conjugados (0,07-0,33 % de aceite) - (6).

Género Cucumis- Dentro de este género el de semilla de Cucumis melo ha sido el más considerado. Su aceite es rico en ácido linoleico (aproximadamente 70 %), mencionándose 0,5 % de ácidos triénicos conjugados sobre los ácidos totales (11).

Género Citrullus- El aceite seminal de la especie más difundida y estudiada (Citrullus vulgaris), es rico en ácido linoleico (alrededor de 67 %) (7, 14) sin mencionarse la presencia de ácidos conjugados, al igual que el Citrullus colocynthis (9).

Género Luffa- Los aceites seminales de las dos especies más conocidas (Luffa cylindrica L. Roem o Luffa aegyptiaca Mill. y Luffa acutangula Roxb.) responden a composiciones normales con altos contenidos en ácido linoleico (54-66 %) (7, 11, 15, 16). No se hallaron otros ácidos que palmítico, esteárico, oleico y linoleico. Se observó 0,2 % de trienos conjugados (11).

Como complemento de los antecedentes sobre composiciones acídicas se resumen en la Tabla 1 los registrados en la literatura para contenido en aceite de la semilla y para diversas características físicoquímicas de los aceites seminales de zapallo, melón, sandía y esponja vegetal.

obre contenidos en aceite y características fisicoquímicas de aceites de semilla de zapallo, melón, maní y

esponja vegetal

Zapallo	Ref.	Melón	Ref.	Sandía	Ref.	España vegetal	Ref.
24,6-46,2	6,9, 17,18	29,8-44,6	9,11	20,0-43,2	7,9, 14,19	20,1-38,9	7,1 15
9159 <sup>20º</sup> -0,9179 <sup>25/25º</sup>	9	-	-	0,9197 <sup>25/25º</sup> -0,9216 <sup>25/25º</sup>	7,9, 19	0,920 <sup>15,5º</sup>	7
4664 <sup>40º</sup> -1,4737 <sup>20º</sup>	9,17, 18	1,4725 <sup>20º</sup> -1,4863 <sup>23,5º</sup>	9,11	1,4664 <sup>40º</sup> -1,4748 <sup>25º</sup>	7,14, 19	1,4655 <sup>40º</sup> -1,4793 <sup>30º</sup>	7,1 15
174-196,5	9,17, 18	190,4-207,4	9	185-197,4	7,9, 14,19	186,6-190,6	7,1
98,3-132,6	9,17, 18	117,1-132,6	9,11	121,6-133,8	7,9, 14,19	117,1-126,6	7,1

P A R T E I

DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

El objeto de este trabajo ha sido, principalmente, adelantar información acerca de los rendimientos, características fisicoquímicas y composiciones acídicas de los aceites crudos de extracción de semillas de distintas variedades de zapallo cultivadas en el país, así como la composición química general de las harinas de extracción con especial referencia a sus contenidos en proteínas.

La importante producción de zapallos en el país, 350.000 toneladas en la cosecha 1970/71, podrá en un futuro originar el tratamiento de estos frutos hacia su industrialización, principalmente por deshidratación, con fines de preservación, distribución y diversificación en sus usos. Tal posibilidad conducirá a la obtención de subproductos, entre ellos, y el principal, la semilla que como ha sido expuesto, son fuente importante para la producción de aceites alimenticios y de proteínas.

Como complemento de estos estudios y teniendo en cuenta la similitud estrecha en técnicas de análisis y en objetivos, se han considerado exámenes similares sobre semillas de otras Cucurbitáceas, entre ellas de dos variedades de melón (género Cucumis), de sandía (género Citrullus) y de esponja vegetal (género Luffa).

En todos los casos se han estudiado, además, las condiciones óptimas (pH, temperatura, etc.) de extracción de proteínas a partir de las harinas residuales de extracción, determinando los valores de máxima precipitación de proteínas (pH isoeléctrico) y las condiciones de purificación y secado final de las mismas. Los sistemas de purificación a que se hace referencia han comprendido el aislamiento de los lípidos asociados a las proteínas aisladas (extracción por etanol), la determinación de sus concentraciones, sus composiciones acídicas (C.G.L.) y sus contenidos en fósforo lipídico.

Por razones de ordenamiento el trabajo realizado se expone en forma dividida considerando en primer lugar los aspectos referentes



los aceites seminales y en segundo los estudios relacionados al aislamiento de proteínas.

Estudios sobre los aceites de semilla de zapallo, melón, sandía y esponja vegetal

Semilla y aceites de semilla de variedades de zapallo (Cucurbita maxima y Cucurbita pepo)

Se dispuso de partidas de semilla seca al aire procedente de frutos maduros de zapallo: Cucurbita pepo (zapallo de Angola, dos variedades) y Cucurbita maxima (var.com.Inglés, Pink Banana, Pink Bananaumbo, Red Hubbard, Criollo y Plomo Criollo) procedentes de las provincias de Mendoza y Buenos Aires. Como se expone en la Parte Experimental en todos los casos se determinaron por separación manual los valores de las relaciones cáscara/pepa, y operando (según los casos) sobre la semilla entera molida o sobre pepa molida, se extrajeron los aceites por agotamiento con hexano, determinando sus rendimientos, sus principales características fisicoquímicas y las concentraciones de algunos componentes menores (esteroles totales, escualeno y tocotrienoles totales).

La Tabla 2 resume los valores obtenidos para estas determinaciones y su análisis permite concluir:

a) Las semillas de las variedades comerciales Inglés, Angola y Criollo son de alto contenido en pepa (71-82 %), no así las restantes que contienen entre 49 y 60 %.

b) Los rendimientos en aceite por extracción con hexano, expresados en % de pepa tal cual, oscilan entre 44 y 56 %, con una mayor concentración de valores alrededor de 50 %.

c) Los valores de índice de yodo de estos aceites oscilan entre los extremos de 96 y 125, acordes con los señalados por Eckey (9) -

(116-120) y comprendidos entre los extremos mencionados en la Tabla 1; los valores de acidez libre (1-2,5 mg HOK/g) son bajos; los contenidos en insaponificable (1,0-2,7 %) presentan un máximo superior al señalado en la Tabla 1 y son de valores de índice de yodo (Rosenmund) muy variables (10-175).

d) Entre los componentes menores (no registrados en la literatura disponible) los números de escualeno (Fitelson) presentan cifras elevadas (235-271 mg % g) lo que sugirió la investigación del hidrocarburo escualeno, confirmada a través de la obtención de su dodecaboroderivado (20).

Los contenidos en esteroles totales (digitonina) (21) (107-428 mg % g, con una mayor concentración de valores entre 300 y 400 mg % g), son inferiores al único valor registrado por Lange (22) (500 mg % g).

Los valores de tocoferoles totales (9-69 mg % g, como  $\alpha$ -tocoferol) presentan una mayor concentración entre 30 y 50 mg % g. Son acordes con los mencionados por Dicks (23) (18-78 mg % g) y por Kartha (43 mg % g) (24). Estas cifras de tocoferoles son bajas en relación a los contenidos en otros aceites de semilla.

En cuanto a las características físicas, todos los aceites son de color verde más o menos oscuro según los casos, con intensa fluorescencia roja.

#### Composiciones acídicas

Como se detalla en la Parte Experimental, los aceites crudos se examinaron por espectrofotometría en U.V., según Bemis et al. (6) observándose valores bajos de conjugación en la zona de dienos y trienos (232-270 nm). Los resultados expresados en ácido púncico % de ácidos totales son los siguientes: Cucurbita pepo: var.com.Angola, - 0,23 y 0,12; Cucurbita maxima: var.com.Inglés, 0,30; Pink Banana, 0,16; Red Hubbard, 0,20; Criollo, 0,21 y Plomo Criollo, 0,32. Esta observa-

ción concuerda con los resultados de Bemis et al. (6) quienes en un aceite de Cucurbita maxima var. com. Pink Banana mencionan una concentración de trienos conjugados expresada en ácido púncico de 0,07 % y para aceites de Cucurbita pepo valores de 0,16; 0,22 y 0,33 %. - Cifras entre 0,05 y 0,26 % han sido señaladas por estos autores para aceites de semilla de Cucurbita ficifolia, Cucurbita mixta y Cucurbita moschata (variedades de zapallo comestibles). Este comportamiento confirma lo expresado por Eckey (9) en el sentido que los aceites de semilla de zapallo de especies cultivadas no contienen ácidos conjugados.

Las composiciones acídicas (% de ácidos totales) de los aceites de semilla de todas las variedades estudiadas en este trabajo, se encontraron por cromatografía de partición gas-líquido (ver Parte Experimental) y los resultados hallados figuran en la Tabla 3.

De la observación de esta tabla surge que los extremos de composición para los aceites de semilla de zapallo son: ácidos saturados totales, 18,2 a 28,5; ácido oleico, 15,5 a 56,8 y ácido linoleico, - 22,5 a 61,4 % de ácidos totales. El aceite de menor contenido en ácidos saturados corresponde al de una partida de Cucurbita pepo var. Angola, siendo el de mayor concentración en esos ácidos el aceite de Cucurbita maxima var.com. Pink Banana Jumbo, aunque la mayor concentración de valores en ácidos saturados oscila entre 20 y 23 %. Las concentraciones más altas en ácido linoleico corresponden a los aceites de mayores valores de índice de yodo de los ésteres metílicos de los ácidos totales y, consecuentemente, las variaciones de índice de yodo de estos ésteres dependen fundamentalmente de las concentraciones en ácidos linoleico y oleico.

El ácido linoleico fue reconocido a través de su transformación en tetrabromoderivado de punto de fusión 113-114°. En ningún cromatograma se evidenció la presencia de ácido linoléico, lo que concuer-

de con la gran mayoría de los análisis registrados en la literatura, e excepción de los informados por Bemis et al. (6) para dos aceites de Cucurbita pepo en los que, por análisis espectrofotométrico, mencionan 5 y 9 % de este ácido. Con anterioridad Dasso y Cattaneo (25), verificaron que los glicéridos involucrados en la formación de bromo derivados insolubles en éter de petróleo a 0° de aceite de semilla de zapallo (ensayo de Vizern y Guillot) no contenían ácido linolénico, atribuyendo este resultado a la ausencia de ese ácido en el aceite de esa semilla.

Los valores de los índices de yodo de los ésteres metílicos de los ácidos totales de los aceites de zapallo considerados, calculados en base a las composiciones acídicas de la Tabla 3, fueron suficientemente concordantes con los obtenidos experimentalmente (Wijs) como se aprecia a continuación, (en primer lugar figura el valor determinado según Wijs y en segundo lugar el calculado en base a composición C.G.L.): Cucurbita maxima var. com. Inglés (111,1-111,7); C. maxima, var. com. Pink Banana (97,5-99,2); C. maxima, var. com. Pink Banana Jumbo (105,7-105,8); C. maxima, var. com. Red Hubbard (118,7-120,0); C. maxima, var. com. Criollo (104,5-105,2); C. maxima, var. com. Plomo Criollo (118,0-119,9); C. pepo, var. com. Angola (no determinado-117,7) y (85,2-87,9).

Todos los cromatogramas señalaron entre 0,1 y 0,3 % de ácido mirístico, 0 a 0,3 % de ácido tridecanoico, rastros de ácido heptadecanoico y rastros a 0,2 % de ácido eicosanoico. Asimismo en la mayoría de los aceites se verifica un componente con tiempo de retención ( $t_r$ ) ligeramente menor que el de palmitato de metilo, atribuido al éster metílico de un ácido ramificado en  $C_{16}$  (r 16:0).

Un análisis de los valores de composición acídica encontrados en este trabajo respecto de los consignados en literatura resumidos en la Tabla 4 permite deducir que los aceites de Cucurbita pepo (Angola) son de concentraciones ligeramente menores en ácidos saturados

totales y, por lo tanto, en ácidos palmítico y esteárico. También, los contenidos en ácidos oleico y linoleico son extremadamente variables, con máximos superiores para los aceites argentinos en ácido oleico y máximos concordantes para los contenidos en ácido linoleico.

Al presente no es posible concluir si las variaciones de composición acídica observadas responden a influencias climáticas y/o varietales desde que la elucidación acerca de la influencia de estas variables requiere la consideración de aceites de semilla de distintas variedades cultivadas en la misma región o localidad y de idénticas variedades en distintas localidades, experiencia de difícil realización.

Composición acídica exhaustiva del aceite de semilla de  
Cucurbita maxima var.com.Inglés

Con el objeto de evidenciar los componentes ácidos que se encuentran en muy bajas concentraciones, y que normalmente no se registran en los cromatogramas obtenidos operando sobre los ésteres metílicos de los ácidos totales, se procedió (ver Parte Experimental) al fraccionamiento en vacío de los ésteres metílicos de ácidos totales de este aceite y al estudio por C.G.L. de cada fracción de destilación y del residuo de la misma.

De este modo, en las distintas fracciones se obtuvieron ésteres de ácidos en función de los pesos moleculares, o sea, de sus volatilidades, produciéndose una concentración en las mismas de los distintos componentes ácidos, lo que facilitó su revelado en los cromatogramas. La Tabla 5 resume los valores obtenidos por este procedimiento, observándose una estrecha concordancia para los componentes mayores y menores registrados en este análisis, con los consignados en la Tabla 3. Además se han evidenciado los siguientes á-

s: 12:0; 22:0; 24:0; 17:1 y 20:1, ninguno de los cuales ha sido lado en la literatura para aceites de semilla de zapallo.

De la información analítica registrada en la literatura y de - roporcionada en este estudio se desprende que los aceites de se a de zapallo presentan características fisicoquímicas y de com- ción acídica comunes a un gran número de aceites seminales que estinan a fines alimentarios. En tal sentido se desprende la - eniencia de proseguir estudios de índole biológica de corto y o plazo, con el objeto de establecer la aptitud de estos acei- con fines alimentarios humanos. Estos últimos como condición o- ada por tratarse de un aceite que al presente no ha sido objeto tilización significativa en ese sentido. Estos aceites dan reac- de Halphen (A.O.C.S.; Official Method Cb.I-25, 1963) negativa, ue excluye la presencia de ácidos ciclopropanoicos.

#### Aceites de semilla de melón (Cucumis melo var. Reticulatus y var. Inodorus)

A los fines del estudio de la semilla y de los aceites de semi de Cucumis melo, se dispuso una partida reducida, mezcla de las variedades de mayor difusión en Buenos Aires (var. Reticulatus y Inodorus) (26).

Como en el caso de la semilla de zapallo, se establecieron la ción cáscara/pepa, el rendimiento en aceite por extracción con no y las características fisicoquímicas y concentración en algu- componentes menores del aceite obtenido, con los resultados que ron en la Tabla 6.

De ella se desprende que la concentración en pepa de la semi- entera es muy inferior a las halladas para semilla de zapallo.

El aceite es de color amarillo pálido.

El valor de índice de yodo de este aceite corresponde a 140.

ante al máximo registrado en la literatura haciendo presumir que se trata de un aceite de composición acídica típica de los "non-yellowing drying oils", es decir, de elevado contenido en ácido linoleico. Dada la escasez de esta información, la bibliografía es muy pobre en valores sobre este aceite en lo que respecta a características fisicoquímicas y componentes menores (Tabla 1). Sólo se ha registrado un análisis acerca del contenido en tocoferoles totales (23) (78 mg % g), concordante con el valor hallado en este trabajo (70 mg % g, como  $\alpha$ -tocoferol).

La composición acídica fue determinada (ver Parte Experimental) operando sobre ésteres metílicos de ácidos totales libres de insaponificable con los valores (% de ácidos totales) mencionados en la Tabla 3. El total de ácidos saturados (14,6 %) es sensiblemente menor al registrado para el caso de aceites de semilla de zapallo y, consecuentemente, el aceite resulta de mayor riqueza en el total de ácidos insaturados en  $C_{18}$  (oleico y linoleico). La concentración elevada en ácido linoleico (62,6 %) y la ausencia de ácido linolénico confirman lo expresado anteriormente en el sentido de ser un típico "non-drying oil". Los valores de composición acídica se aproximan a los observados en aceites de semilla de girasol y de uva de producción nacional (27, 28). En sus componentes principales encuadran los extremos de la Tabla 4, en la que se mencionan componentes en  $C_{10}$  y  $C_{12}$  no observados en el caso presente.

Como en el caso del aceite de semilla de zapallo, se combinó la destilación fraccionada en vacío de los ésteres metílicos de los ácidos totales con el análisis C.G.L. de las fracciones y residuos de destilación. La composición final (% de ácidos totales) figura en la Tabla 5 observándose los siguientes componentes no mencionados en la literatura: 12:0; 13:0; 15:0; 17:0; 21:0; 22:0; 23:0; 24:0; 16:1; 17:1; 18:1; 19:1; 20:1; 21:1; 22:1; 23:1; 24:1; 20:2; 21:2; 22:2; 23:2; 24:2. Los valores de composición se expresan en % de ácidos totales.

figuran en la Tabla 5 para el aceite de semilla de melón son muy concordantes en sus componentes mayores y menores con los obtenidos por determinación C.G.L. directa sobre ésteres metílicos de ácidos totales mencionados en la Tabla 3.

Como se informa en la Parte Experimental el examen espectrofotométrico directo del aceite revela la presencia de componentes conjugados (trienos) en pequeñas cantidades (0,42 %) expresado como ácido punfíco), lo que coincide con lo señalado por Chisholm y Hopkins (11) quienes mencionan una concentración de 0,5 % en ácidos trienoicos conjugados sin especificar de que ácido se trata.

De acuerdo a las características fisicoquímicas y composición ácida el aceite de semilla de melón presentaría características aceptables con fines de alimentación humana, sugiriéndose las mismas exigencias mencionadas para el caso de semilla de zapallo.

### 3- Aceites de semilla de sandía (Citrullus vulgaris)

Se dispuso de una partida de semilla de Citrullus vulgaris var. com.Favorita de la Florida (cosechada en Entre Ríos) que presenta la característica de ser de color blanco, a diferencia de las de otras variedades que son negras. Como en los casos anteriores se determinaron la relación cáscara/pepa por separación manual, el rendimiento - en aceite por extracción con hexano y las características fisicoquímicas y concentración en algunos componentes menores del aceite obtenido, con los resultados que figuran en la Tabla 6. El valor de la relación cáscara/pepa (57,2/42,8) indica una concentración menor para la pepa frente a lo registrado en la bibliografía (62 %) (9) y menor cantidad de pepa por semilla en relación a lo hallado en los zapallos; el contenido en aceite, 51,7 % de pepa (22,2 % sobre semilla entera) encuadra dentro de los extremos señalados en la Tabla 1. El aceite crudo se presenta como un líquido claro, al igual que el aceite de semilla de melón, lo que señala una diferencia neta frente a -



los aceites de semilla de zapallo y de esponja vegetal que son de intenso color verde con fluorescencia roja (clorofilas).

El valor de índice de yodo del aceite crudo (122,4) corresponde prácticamente al mínimo registrado en la bibliografía (121,6).

Dentro de los componentes menores determinados (escualeno, esteroles totales y tocoferoles totales) sólo estos últimos se registran en la literatura para este aceite con valores de 65 (23) y 60,3;30,1 y 62,9 mg % g (24), todas ellas cifras bajas al igual que la encontrada en el estudio presente, 24 mg % g como  $\alpha$ -tocoferol.

El valor de escualeno (164,2 mg % g) resulta significativo e intermedio entre los registrados para aceites de semillas de zapallo y melón.

La composición ácida fue determinada (ver Parte Experimental) por C.G.L. de los ésteres metílicos de los ácidos totales libres de insaponificable, obteniendo los valores (% de ácidos totales) que figuran en la Tabla 3. El contenido en ácidos saturados totales 16:0 y 18:0 con rastros de 14:0 y 15:0 (21,1 %) es del orden encontrado para aceites de semilla de zapallo y significativamente superior al registrado en aceite de semilla de melón (14,6 %). Este aceite presenta un elevado contenido en ácido linoleico (60,8 %) y al no verificarse la presencia de ácido linolénico, se lo puede incluir en el grupo de los llamados "non-yellowing drying oils". Los valores encontrados encuadran, para los ácidos señalados, dentro de los límites extremadamente amplios registrados en la literatura que figuran en la Tabla 4.

Como en los casos de aceites de semilla de zapallo y de melón, se combinó la destilación fraccionada en vacío de los ésteres metílicos de los ácidos totales con el examen C.G.L. de las fracciones de destilación pudiendo así obtener valores de composición que incluyen componentes en muy bajas concentraciones, con los resultados que fi-

guran en la Tabla 5, que señala vestigios de 11:0 y 13:0 y concentraciones sumamente pequeñas en 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0 y 15:1. - Este análisis evidencia además la presencia de ácidos en más de  $C_{18}$  (20:0, 22:0, 24:0 y 20:1).

Las concentraciones encontradas para los componentes mayores y menores principales, son concordantes con las halladas por C.G.L. directa de los ésteres metílicos de ácidos totales (ver Tabla 3).

Al igual que los aceites de semilla de melón y zapallo, el examen espectrofotométrico en el U.V. reveló cantidades no significativas de ácidos trienoicos conjugados (0,38 % como ácido punicico), acerca de lo cual la literatura no registra antecedentes.

Respecto de la probable utilización de los aceites de esta semilla, caben las mismas consideraciones que para los aceites de semilla de melón y de zapallo.

#### 4- Aceites de semilla de esponja vegetal (Luffa cylindrica)

Se trabajó sobre una partida de semillas adquirida en plaza, cuya relación cáscara/pepa por separación manual, rendimiento en aceite por extracción con hexano, características fisicoquímicas y concentración en algunos componentes menores de este último, figuran en la Tabla 6. El valor de la relación cáscara/pepa (50,9/49,1) se aproxima al encontrado para la semilla de melón, siendo la concentración en pepa muy inferior a la registrada en la semilla de las variedades de zapallo.

El rendimiento en aceite (48,2 % en pepa; 23,9 % de semilla entera tal cual) coincide prácticamente con el mínimo registrado en la literatura para semilla entera tal cual (20,1 %), Tabla 1. El aceite crudo de esta semilla se presenta a temperatura ambiente como un líquido intensamente verde con fuerte fluorescencia roja al igual que los de algunos aceites de semilla de zapallo.

El valor de índice de yodo (123,5) es aproximadamente el valor

medio de los extremos indicados en la Tabla 1 (117-127).

Entre los componentes menores la literatura sólo menciona una determinación en tocóferoles totales (39,8 mg % g) (24), algo superior al encontrado en este trabajo (23,6 mg % g como  $\alpha$ -tócoferol). El valor de esteroles totales, 223,8 mg % g, es del orden encontrado para el aceite de semilla de melón y zapallo e inferior al registrado para el de sandía. Respecto del contenido en escualeno se observaron cifras muy bajas e inferiores a las registradas en los demás aceites de semilla de Cucurbitáceas estudiadas en este trabajo.

La composición acídica determinada por C.G.L. de los ésteres metílicos de los ácidos totales libres de insaponificable (ver Tabla 3), mostró cifras (% de ácidos totales) muy similares a las señaladas para aceite de semilla de sandía.

No se evidenció la presencia de ácido linolénico y el contenido en ácido linoleico (63,5 %), al igual que en los aceites de semilla de melón y sandía, permiten señalarlo por su composición acídica como un "non-yellowing drying oil".

La composición encontrada encuadra dentro de los extremos registrados en la literatura e indicados en la Tabla 4. Del mismo modo que en los aceites de semilla de las otras Cucurbitáceas estudiadas en este trabajo, el examen espectrofotométrico directo en U. V. no reveló concentración significativa de ácidos trienoicos conjugados (0,18 % en ácido púncico), componentes estos evaluados en 0,2 % en una mención bibliográfica (11).

La conjugación trienoica pre-existente de los aceites crudos de semilla de zapallo, melón, sandía y esponja vegetal del estudio presente puede calificarse como no significativa. No obstante, y de acuerdo a lo indicado por Bemis et al. (6) se calcularon las concentraciones en ácido púncico, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción de su éster metílico ( $E_{1\text{ cm}}^{1\text{g/l}} = 161,3$ ). Cabe aclarar que -

las bajas concentraciones halladas son el resultado de un simple cálculo, no habiendo pruebas de que respondan a la existencia de un ácido conjugado identificado.

Por combinación de la destilación fraccionada en vacío de los ésteres metílicos de ácidos totales, con el examen C.G.L. de las fracciones y residuo de destilación se determinó la composición exhaustiva, incluyendo componentes en muy baja concentración con los resultados señalados en la Tabla 5, que en lo referente a componentes mayores y menores obtenidos por C.G.L. directa son concordantes con los correspondientes de la Tabla 3. Además se evidenció la presencia de los siguientes ácidos: 12:0, 14:0, 15:0, 17:0, 20:0, 22:0, 24:0, 16:1, 20:1 y 21:1.

La consideración analítica sobre este aceite que se acaba de exponer permite sugerir las mismas posibilidades de aplicación sujeta a las mismas exigencias indicadas para los aceites de semilla de zapallo, melón y sandía.

#### Estudios sobre harinas de extracción de semilla de zapallo y de otras Cucurbitáceas

La literatura menciona escasos antecedentes acerca de la composición general de semillas de Cucurbitáceas. Sólo como consecuencia de un programa de extensión iniciado en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (14,18) en la búsqueda de nuevos materiales de origen vegetal que hasta el presente hubiesen registrado pocos o ningún estudio en su composición química, se logró información sobre algunos valores de composición de estas harinas de extracción. Más recientemente, en un trabajo sobre grasas y aceites vegetales de origen egipcio, se hace referencia a la composición química aproximada de semilla y de harina de semilla de Luffa cylindrica (15). Como en ningún caso se menciona el aislamiento de proteínas

Por falta de tales fuentes, este hecho, unido a la escasa información disponible, indujo a realizar un trabajo que abarcara el estudio de la composición general de las semillas de diferentes Cucurbitáceas, atención y estudio de la composición de sus harinas de extracción, de las condiciones óptimas de aislamiento y purificación de proteínas respectivas.

Un gran volumen de trabajo se refiere a la búsqueda de posibilidades para desarrollar nuevos productos proteínicos o a la utilización de fuentes proteínicas "no tradicionales" para la alimentación humana. El esfuerzo inicial recae sobre los aspectos científicos, económicos y técnicos antes de encarar los problemas de aceptabilidad y de mercado. Siendo necesarias su consideración y la de los temas de la nutrición en conjunción con todos los otros aspectos importantes de la economía del país, se pensó en el aprovechamiento del abundante subproducto (semilla) de la industrialización de las papas de zapallo (fruto que se cosecha en cantidad significativa). Esta fuente económica y su contenido en proteínas es elevado, como ya ha mencionado.

La importancia de la calidad de sus proteínas, unida a su cantidad (a su vez ligada a un elevado rendimiento de cosecha), son aspectos fundamentales en el problema de la nutrición proteica y serán contemplados en una segunda parte de este trabajo (ya iniciado) a base de convenientes ensayos biológicos (Relación de Eficiencia Proteica, Utilización Neta Proteica y Digestibilidad) y valoración de aminoácidos esenciales, tan pronto resulte posible.

Consideraciones similares se podrían señalar para las proteínas de la calabaza y sandía.

Sobre la composición general de las harinas residuales de extracción

riedades de zapallo se obtuvieron por extracción de semilla entera o de pepa, según los casos. Las harinas resultantes se expusieron al aire para la eliminación del solvente residual, remolieron finamente y analizaron en sus componentes generales. La Tabla 7 resume los valores obtenidos. De su consideración surge que las harinas de pepa - de semilla de zapallo son de elevados contenidos en proteínas (68-80 % en base seca), con una mayor concentración de valores entre 70 y 80 %. Si se tiene en cuenta que no parece difícil la separación de cáscara y pepa y que los contenidos en fibra de las harinas de pepa son inferiores a 3,5 %, surge que estos productos son verdaderos con centrados proteínicos de posible utilización directa en la alimentación.

En otro punto se expone otro aspecto de este trabajo referente al aislamiento de proteínas de semilla de zapallo partiendo de semilla entera molida. Como se informará oportunamente las harinas de se milla entera contienen alrededor de 50 % de proteínas y 28 % de fibra, valor este último muy elevado que imposibilitaría la utilización directa de estos productos en la alimentación humana.

Los valores hallados en literatura para el contenido en proteínas de la semilla entera de zapallo oscilan entre 31 y 39 % (6, 18), cifras acordes con las calculadas para la semilla argentina motivo - de este estudio.

Un examen de composición general similar se practicó sobre las harinas de semilla entera de sandía, melón y esponja vegetal con los resultados que figuran en la Tabla 7 y cuyos análisis señalan a estos productos con mayor riqueza en fibra que las harinas de semilla ente ra de zapallo y menores contenidos en proteínas, lo que es consecuen cia principal de las distintas relaciones cáscara/pepa respecto de - las correspondientes a la semilla de zapallo.

Las referencias de literatura sobre composición general de semi

lla de melón, sandía y esponja vegetal son sumamente escasas.

También sobre estas harinas se practicaron ensayos de extracción de proteínas, como se expone más adelante.

## 2- Experiencias sobre aislamiento y purificación de proteínas a partir de harina de semilla de zapallo (Cucurbita pepo)

Se condujo una serie de ensayos previos a fin de ajustar las condiciones óptimas operatorias de acuerdo al método de extracción alcalina y precipitación en medio ácido, procedimiento que la literatura señala como el más conveniente para operar en gran escala.

Por aplicación de las técnicas cuyo detalle se incluye en la Parte Experimental, se observa que dentro del ámbito de pH 9,5-10,5 ocurre el óptimo para lograr una alta dispersión del material nitrogenado a partir de la harina de extracción (79-83 % del nitrógeno total - de la harina), sin exponer las proteínas a un medio de pH elevado que podría dañar su valor nutritivo (29, 30, 31, 32, 33).

También se observa que el valor de pH 5,0 es aquel donde se obtiene el máximo de precipitación (pH isoeléctrico). La representación gráfica (Fig.1) de los valores promedio consignados a continuación (N soluble % N extraído) en función del pH de precipitación, muestra una curva cuyo mínimo se registra a pH 5,0 (ver detalles en la Parte Experimental)

<u>pH</u>	<u>N soluble</u> <u>% N extraído</u>	<u>pH</u>	<u>N soluble</u> <u>% N extraído</u>
3,5	44,12	<u>5,0</u>	<u>10,46</u>
3,8	23,78	5,2	10,58
4,0	20,02	5,5	12,35
4,2	16,62	5,8	12,93
4,5	16,04	6,2	17,07
4,8	12,32	6,6	34,41

En otra serie de experiencias se pudo establecer que de efectuarse tres extracciones sucesivas del material nitrogenado de la harina, las dos primeras prácticamente totalizarían el máximo de extracción (96,3 y 3,2 % respectivamente), considerándose despreciable el material recuperado en la última (0,5 %). Los rendimientos se obtuvieron valorando el contenido de nitrógeno en alícuotas, después de separar en cada etapa el material insoluble remanente, con los siguientes resultados:

<u>Extracción</u> (Nº)	<u>Relación</u> <u>harina:agua</u>	<u>N extraído</u> <u>% N total</u>	<u>% N total</u> <u>extraído</u>
1	1:50	78,12	96,3
2	1:50	2,62	3,2
3	1:25	<u>0,39</u>	0,5
		81,13	

Cabe señalar que ensayos posteriores practicados con relaciones menores de harina:agua (1:20; 1:10 y 1:5 respectivamente) mostraron la independencia del rendimiento respecto de las mismas al obtener recuperaciones similares, con la ventaja para estas últimas, de utilizar menores volúmenes.

Para tener un balance cuantitativo experimental y a los fines de complementar los ensayos previos anteriormente citados, se procedió a evaluar el contenido en nitrógeno en las distintas fracciones separadas durante el proceso de aislamiento de las proteínas. A continuación se ilustran los valores logrados en experiencias realizadas por duplicado:

Extracción (tres extracciones sucesivas a pH 10-10,5 con relaciones harina:agua 1:20; 1:10 y 1:5 respectivamente)



extraído % N total (harina)	80,72; 78,99
de residuo % N total (harina)	18,16; 17,85
% residuo (seco a 100°)	2,75; 2,72
<u>Precipitación (pH 5,0)</u>	
soluble % N total	6,89; 7,26
soluble % N extraído	8,54; 9,19
precipitado % N total	62,39; 64,29
% de proteína (seca a 45°)	15,00; 15,54

La cantidad de nitrógeno precipitado se calculó en base a la diferencia entre el nitrógeno total de la dispersión original y la cantidad remanente en el sobrenadante después de la precipitación a pH isoelectrico y que fue prácticamente coincidente con el valor calculado en base al peso de las proteínas obtenidas y su % en nitrógeno.

El coágulo de proteínas precipitado resultó de color blanco y de consistencia compacta, y después de efectuados los lavados acuosos y etanólicos (ver Parte Experimental), de características altamente satisfactorias (prácticamente inodoro, insípido, blanco y en forma de polvo fino) una vez seco en vacío a 45°.

De no efectuar los lavados etanólicos, el precipitado se vuelve de color oscuro, color que se va intensificando durante la etapa de secado.

#### Purificación del precipitado de proteínas de semilla de zapallo.

##### Lípidos asociados a las proteínas

Un comportamiento similar observado en un trabajo anterior (purificación de proteínas aisladas a partir de harina de semilla de lino) (34) y la información recogida en literatura sobre extractos etanólicos de precipitados de proteína de soya (35, 36) condujo al estudio de la composición en ácidos grasos del extractivo presente, ya que la

naturaleza del material predominante en el mismo sería de tipo lipídico (lípidos asociados a las proteínas).

El residuo de las extracciones etanólicas, previamente tomado - por cloroformo, filtrado y una vez llevado a peso constante a 100° en vacío (0,47-0,50 % de proteínas secas a 45°) contiene 20,7 % de materia insaponificable (0,10 % sobre proteínas secas a 45°). Los ácidos grasos totales obtenidos por saponificación (57,6 % sobre lípidos totales; 0,29 % sobre proteína seca a 45°) liberados de insaponificable y convertidos en sus respectivos ésteres metílicos, revelaron la siguiente composición acídica al ser analizados por cromatografía gas-líquido (ver Parte Experimental):

12:0 (0,9); 14:0 (1,1); 15:0 (0,5); 16:0 (0,5); 16:0 (36,3); - 16:1 (2,5); 17:0 (0,3); 17:1 (vest.); 18:0 (10,9); 18:1 (16,6); 18:2 (29,2); 18:3 (0,5); 20:0 (0,7) (% de ácidos totales) y rastros de otros componentes con  $t_r$  inferiores a los correspondientes a 15:0; 14:0 y 12:0.

Esta composición incluye los componentes mayores encontrados para aceites de semilla de zapallo, los componentes menores señalados para los mismos y otros no mencionados en aquellos.

La determinación de fósforo lipídico en dicho extractivo registró un valor de 1,91 de P % de lípidos totales (9,5 mg de P % g de proteína seca a 45°), valorado de acuerdo al método descrito en la Parte Experimental.

#### Aislamiento de proteínas a partir de harina de pepa de zapallo (separada manualmente)

Disponiendo de pequeñas cantidades de semilla de zapallo de cinco variedades diferentes se aplicó el mismo procedimiento de separación de proteínas usando en este caso particular como materia prima la mezcla de las harinas resultantes de la extracción con hexano de las pepas separadas manualmente de las semillas.

Esta muestra- mezcla contenía las siguientes proporciones de las distintas variedades: pepas de semillas var.com.Pink Banana(11,9 %); var.com.Pink Banana Jumbo (3,7 %); var.com.Red Hubbard (30,7 %); var.com.Criollo (32,7 %) y var.com.Plomo Criollo (20,8 %).

La determinación previa de nitrógeno total y humedad %, de acuerdo a las técnicas que se mencionan en la Parte Experimental, condujeron a los siguientes resultados:

Humedad %	10,12
N total %	10,58
Proteína % (Nx 6,25)(s/sust.seca)	73,56

El aislamiento y purificación de las proteínas a partir de este material (dispersión en medio alcalino y precipitación en medio ácido, a pH isoeléctrico, 5,0) reveló un mayor porcentaje de nitrógeno total extraído y un mayor rendimiento en la precipitación de proteínas, como ilustra el siguiente conjunto de valores de nitrógeno recuperado en las diferentes fracciones durante el proceso de aislamiento:

Extracción (tres etapas sucesivas a pH 10-10,5 con relaciones harina:agua 1:20; 1:10 y 1:5 respectivamente)

N extraído % N total (harina)	98,98
N residuo % N total (harina)	1,20
N % residuo (seco a 100°)	3,04

Precipitación (pH 5,0)

N soluble % N total	8,11
N soluble % N extraído	8,19
N precipitado % N total	84,30
N % de proteína (seca a 45°)	17,13

Los lípidos asociados a las proteínas, aislados a partir de los lavados etanólicos de estas últimas (1,01 % sobre proteína seca a 45°)

contenían 0,96 % de P lipídico (9,7 mg de P % g de proteína seca a 45°).

Aislamiento de proteína de semilla de zapallo (*Cucurbita maxima*) en macro-escala de laboratorio.

Frente a estos resultados se procedió al aislamiento en escala macro (en laboratorio) de aproximadamente 700 g de proteínas blancas y secas a 45° con destino a su evaluación biológica, composición en aminoácidos esenciales y ensayos de inocuidad.

En una primera etapa se pudo establecer que operando la extracción de material nitrogenado sobre harina de semilla de Cucurbita maxima (20 g), a temperatura ambiente y con sólo dos dispersiones sucesivas (pH 10-10,5) en las relaciones harina:agua 1:20 y 1:5 respectivamente, se lograban valores similares a los mencionados anteriormente para la extracción de nitrógeno (82-83 g N extraído % de N total en harina).

Las proteínas precipitadas a pH isoelectrico (5,0), purificadas a través de dos lavados acuosos (agua destilada ajustada previamente a pH 5,0) en la relación g proteína:ml agua 1:5 y tres lavados con etanol 96 % (relaciones g proteína:ml etanol 1:20; 1:10 y 1:10), rindieron 6,44 g de proteínas blancas, secas a 45° (32,2% sobre harina) con un contenido de 16,46 % de N, (ver detalles en Parte Experimental)

Se procedió entonces a aislar las proteínas en escala macro sobre 11 partidas de 200 g de harina, de acuerdo a la técnica expuesta, obteniendo rendimientos similares a los del ensayo previo (60-66 g de proteína/200 g de harina; 30-33 % sobre harina). Se logró reunir 680 g de proteínas blancas y secas a 45°, que analizadas dieron los siguientes resultados:

Pérdida a 100° (vacío) %

4,84

Cenizas (500-550°) %	0,20
Nitrógeno (Kjeldahl) %	16,38
Nitrógeno (en base libre de humedad y cenizas) %	17,25
Fósforo total % (37)	0,49
Fósforo de ácido fítico % (38)	0,44

De los líquidos de lavado etanólico reunidos se aisló un material lipídico (1,10 % sobre proteína seca a 45°) que presentó las siguientes características analíticas:

Nº de acidez (mg HOK/g)	85,0
Índice de saponificación	189,5
Índice de yodo (Wijs)	86,6
Insaponificable %	10,14 (0,11 % sobre proteína seca a 45°)
Índice de yodo del insaponif. (Rosenmund)	100,8
Ácidos totales (por saponificación)	74,09
Fósforo lipídico total (como P) % (37)	0,92 (10,1 mg % g proteína seca a 45°)

La composición ácida de los ácidos totales de este material (C.G.L. de los ésteres metílicos) responde a los siguientes valores (Fig. 2):

12:0 (2,1); 14:0 (0,6); 15:0 (0,1); 16:0 (0,1); 16:0 (33,2);  
16:1 (1,1); 17:0 (0,2); 18:0 (6,8); 18:1 (14,7); 18:2 (40,1);  
18:3 (0,1) y rastros de 17:1 y 20:0 (% de ácidos totales). Además 0,6 % de un componente con  $t_r$  para el éster metílico inferior al de 12:0 y 0,1 y 0,2 % de dos componentes con  $t_r$  para los ésteres metílicos comprendidos entre los correspondientes a 12:0

y 14:0.

Sobre la base de esta composición se calculó el valor de índice de yodo de los ácidos totales (87,2), cifra muy inferior a la correspondiente a los ácidos totales del aceite de esta semilla (115,4).

### 3- Aislamiento de proteínas a partir de harinas de extracción de otras Cucurbitáceas

No registrándose antecedentes en la literatura, se decidió realizar un estudio similar al efectuado con las harinas de zapallo sobre harinas de extracción de semillas de esponja vegetal, sandía y melón.

a) Harina de semilla de esponja vegetal (Luffa cylindrica)- Se dispuso de una partida de semilla de esponja vegetal, que una vez molida se extrajo con hexano técnico hasta agotamiento del aceite. En la determinación de nitrógeno total no se lograron valores reproducibles (7,26; 4,72; 4,17 y 6,21 %). Considerando la inseguridad de los resultados como la consecuencia de la falta de homogeneidad de la muestra, se procedió a su tamizado (Tamiz Tyler, malla 40). El residuo se volvió a moler y tamizar, reuniéndose con la fracción que había pasado por la malla. No obstante, quedó parte de la cáscara que no se pudo dividir finamente y que se desechó.

El análisis de la muestra reveló los siguientes resultados promedios:

Humedad (vacío, 100°) %	9,83
Cenizas (500-550°) %	6,84
Fibra cruda (A.O.A.C.) %	11,93
Nitrógeno (Kjeldahl) %	8,06

Los valores individuales hallados para cada determinación, fueron suficientemente concordantes como para confirmar la eficacia del remolido y tamizado antes mencionados. La observación del valor del

nitrógeno total, de mayor tenor que los obtenidos con anterioridad - al remolido de la muestra (7,26 % como máximo) permitiría señalar la influencia de la eliminación de parte de la cáscara (residuo fibroso final no incorporado) como material de menor riqueza en componentes nitrogenados.

Las experiencias preliminares realizadas para determinar el valor de pH de máxima precipitación y rendimientos de extracción y precipitación de proteínas indicaron, para el caso de la harina de esponja vegetal, un pH isoeléctrico de 5,0 (Fig. 3), y rendimientos del orden de 91 (dispersión del material nitrogenado) y de 69 (precipitación de proteínas) % de nitrógeno total de la harina, como se ilustra a continuación:

<u>pH</u>	<u>N soluble</u> <u>% N extraído</u>	<u>pH</u>	<u>N soluble</u> <u>% N extraído</u>
3,5	48,48	4,8	8,66
3,8	25,22	<u>5,0</u>	<u>8,53</u>
4,0	19,31	5,2	9,75
4,2	17,01	5,5	9,19
4,5	12,46	5,8	11,59
		6,2	22,92

Extracción (tres extracciones sucesivas a pH 10-10,5 con relaciones harina:agua 1:20; 1:10 y 1:5)

N extraído % N total	91,13
N de residuo % N total	11,14
N % residuo (seco a 100°)	2,63

Precipitación (pH 5,0)

N soluble % N total	10,94
N soluble % N extraído	12,00

N precipitado (proteína) % N total	69,14
N % proteína (seca a 45°)	16,14

De la observación de los valores consignados surge un comportamiento similar al de las proteínas aisladas de semillas de zapallo, encontrándose en cambio, un mayor contenido en lípidos asociados a las proteínas (1,41 % sobre proteína secada a 45°) extraíbles por etanol 96 %. Este residuo lipídico contiene 32,5 % de materia insaponificable (0,30 % sobre proteínas secas a 45°), constituyendo los ácidos totales el 54,6 % del mismo (0,50 % sobre proteínas secas a 45°).

La composición acídica de los ácidos totales (C.G.L. de los ésteres metílicos) reveló los siguientes valores (Fig. 4):

12:0 (0,4); 14:0 (1,2); 15:0 (0,8); 16:0 (41,8); 16:1 (2,5); -  
17:0 (0,4); 17:1 (0,2); 18:0 (6,8); 18:1 (19,0); 18:2 (26,9);  
y además rastros de 18:3 y 20:0 y de componentes no identificados con  $t_r$  entre los de 15:0 y 14:0; 14:0 y 12:0 y menores que el de 12:0.

Sobre la base de esta composición, el valor de índice de yodo - de los ácidos totales calculado resulta 90,9, cifra muy inferior a la correspondiente al índice de yodo de los ácidos totales del aceite de esta semilla (126,5).

Sobre la proteína aislada se determinaron los valores de fósforo total (37) y fósforo de ácido fítico (38) que resultaron 0,47 % y 0,40 % respectivamente.

b) Harina de semilla de sandía (Citrullus vulgaris) y melón (Cucumis melo)

	<u>Humedad</u> (100°, vacío) %	<u>Cenizas</u> (500-550°) %	<u>Fibra cruda</u> (A.O.A.C.) %	<u>N total</u> (Kjeldahl) %
Melón	10,74	4,70	43,91	4,30
Sandía	5,72	3,23	45,26	4,68



La representación gráfica (Fig.5 y 6) de los valores hallados - para N soluble % N extraído en función de los valores de pH de precipitación permitió establecer los valores de pH de máxima precipitación (4,3 para proteínas de melón y 4,8 para las de sandía) usados - posteriormente en el aislamiento de las proteínas respectivas. Estos valores figuran tabulados en las dos primeras columnas para proteínas de melón y en las dos últimas para las de sandía.

<u>pH</u>	<u>N soluble</u> <u>% N extraído</u>	<u>pH</u>	<u>N soluble</u> <u>% N extraído</u>
3,5	27,76	3,5	31,03
3,8	23,50	3,8	23,03
4,0	22,51	4,0	21,23
4,2	22,80	4,2	17,44
<u>4,3</u>	<u>21,97</u>	4,5	14,00
4,5	22,41	<u>4,8</u>	<u>13,91</u>
4,8	24,20	5,0	19,55
5,0	23,27	5,2	26,19
5,4	25,59	5,5	28,12
		5,8	34,26
		6,2	50,44

Los ensayos de rendimiento de material nitrogenado extraído y - precipitado, demuestran que se recuperó en cada caso el 62-63 % del nitrógeno total de la harina, como nitrógeno precipitado en medio ácido, según se resume como sigue:

Extracción de proteínas de melón (tres extracciones sucesivas a pH 10-10,5 con relaciones harina:agua 1:20; 1:10 y 1:5 respectivamente)

N extraído % N total

85,08

N residuo % N total	9,24
N % residuo (seco a 100°)	0,66

Precipitación (pH 4,3)

N soluble % N total	20,87
N soluble % N extraído	24,53
N precipitado (proteínas) % N total	62,39
N % proteínas (secas a 45°)	16,89

Extracción de proteínas de sandía (tres extracciones sucesivas a pH 10-10,5 con relaciones harina:agua 1:20; 1:10 y 1:5 respectivamente)

N extraído % N total	77,35
N residuo % N total	8,36
N % residuo (seco a 100°)	0,61

Precipitación (pH 4,8)

N soluble % N total	11,21
N soluble % N extraído	14,49
N precipitado (proteínas) % N total	62,98
N % proteínas (secas a 45°)	17,02

Los materiales extraídos por etanol 96%, provenientes de la etapa de purificación de las proteínas precipitadas rindieron, una vez - llevados a constancia de peso a 100° en vacío, 1,50 y 1,14 % respectivamente de lípidos totales referidos a proteínas secas a 45°. Estos extractivos registraron un contenido en materia insaponificable de 23,8 y 61,4 % de lípidos totales (0,35 y 0,70 % sobre proteínas secas a 45° respectivamente).

Las determinaciones de fósforo lipídico revelaron cifras simila-

res en ambos casos (0,74 y 0,80 % sobre lípidos totales; 11,1 y 9,1 % sobre proteínas secas a 45°, respectivamente).

Las composiciones acídicas de los ácidos totales de estos materiales (C.G.L. de los ésteres metílicos) fueron las siguientes (Fig. 7 y 8):

#### Melón

12:0 (0,3); 13:0 (0,1); 14:0 (1,2); 15:0 (0,5); 16:0 (45,3);  
16:1 (3,1); 17:0 (2,8); 17:1 (0,1); 18:0 (11,1); 18:1 (14,7);  
18:2 (20,6); 18:3 (0,2)

#### Sandía

11:0 (1,3); 12:0 (0,4); 13:0 (0,2); 14:0 (1,3); 15:0 (0,8);  
16:0 (29,2); 16:1 (3,2); 17:0 (0,3); 18:0 (7,8); 18:1 (11,7);  
18:2 (43,3); 18:3 (0,5)

En base a estas composiciones se calcularon los valores de índice de yodo de los ácidos totales respectivos (54,1 para el caso de melón y 93,4 para el de sandía), cifras significativamente menores que las correspondientes a los ácidos totales de los aceites de ambas semillas (melón: 134,2; sandía: 123,9).

Los valores de fósforo total y fósforo de ácido fítico, determinados como se detalla en la Parte Experimental, fueron 1,25 y 1,02 % respectivamente para las proteínas de harina de melón y 0,30 y 0,28 % para las de sandía.



Tabla 3- Aceites de semilla de zapallo, melón, sandía y esponja vegetal de producción nacional - Composiciones acídicas

Variedad comercial	Acidos % de ácidos totales												
	13:0	14:0	15:0	16:0	16:0	17:0	18:0	20:0	16:1	17:1	18:1	18:2	
Cucurbita maxima var.Inglés	-	0,2	vest.	14,0	-	vest.	7,1	0,2	0,4	vest.	26,9	51,2	
Cucurbita maxima var.Pink Banana	0,2	0,1	-	15,0	0,4	vest.	7,6	vest.	0,4	-	37,8	38,5	
Cucurbita maxima var.Pink Banana Jumbo	0,3	0,3	-	19,6	0,5	vest.	7,8	vest.	0,6	-	19,6	51,3	
Cucurbita maxima var.Red Hubbard	vest.	0,1	-	14,7	vest.	vest.	6,5	vest.	0,5	-	17,7	60,5	
Cucurbita maxima var.Criollo	-	0,2	-	14,5	vest.	vest.	8,2	vest.	0,5	-	31,6	45,0	
Cucurbita maxima var.Plomo Criollo	0,1	0,1	-	15,4	0,1	vest.	6,6	vest.	0,8	-	15,5	61,4	
Cucurbita pepo var.Angola	-	0,1	-	12,9	vest.	vest.	5,2	vest.	0,3	-	26,7	54,8	
Cucurbita pepo var.Angola	0,1	0,1	-	13,4	0,3	vest.	6,4	vest.	0,4	-	56,8	22,5	
Cucumis melo	-	vest.	-	8,7	-	vest.	5,9	-	-	-	22,8	62,6	
Citrullus vulgaris	-	vest.	vest.	12,4	-	vest.	8,7	-	0,2	-	17,9	60,8	
Luffa cylindrica	-	-	-	15,1	-	vest.	7,2	-	-	-	14,2	63,5	

Tabla 4- Valores de composición acidica de aceites de semilla de zapallo, melon, sandía y espino y espino vegetal. REFERENCIAS EN LA LITERATURA

Acidos	Cucurbita maxima	Referencias	Cucurbita pepo	Referencias	Cucumis melo	Referencias	Citrullus vulgaris	Referencias	Luffa cylindrica	Referencias
8:0	-	-	-	-	0 - 1,0	46	0 - 0,2	49	-	-
10:0	-	-	-	-	0 - 2,0	46	0 - 1,1	49	-	-
12:0	-	-	-	-	-	-	0 - 2,5	49, 50	-	-
14:0	-	-	-	-	0 - 2,0	46, 47	0 - 0,9	49, 51	-	-
16:0	12,8-16,9	6, 17, 39, 40	7,3-13,0	6, 42, 43, 44	3,2 - 11	11, 39, 46, 47	4,0 - 12,7	7, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55	9,6-22,6	7, 11, 15
18:0	6,0-14,0	6, 17, 39, 40, 41	3,0-7,5	6, 42, 43, 44	0,2 - 5,4	11, 39, 46, 47	5,8 - 22,3	7, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55	6 - 18,9	7, 11, 15
20:0	0 - vest.	39	-	-	0 - 0,9	47	0 - 0,8	53, 54	-	-
14:1	-	-	-	-	-	-	0 - 0,4	51	-	-
16:1	-	-	-	-	-	-	0 - 0,8	51	-	-
18:1	24,7-47,0	6, 17, 39, 40, 41	18,5-47,0	6, 18, 42, 43, 44, 45	15 - 43,2	11, 39, 46, 47, 48	6,2 - 43,3	7, 14, 17, 19, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55	6,9-35	7, 11, 15, 50, 56
18:2	31,0-59,2	6, 17, 39, 40, 41	42,0-62,8	6, 18, 42, 43, 44, 45	45,2- 70	11, 39, 46, 47, 48	45,0- 71,0	7, 14, 17, 19, 49, 51, 52, 53, 54, 55	45,0-66,0	7, 11, 15, 50, 56

Tabla 5- Composiciones acídicas, incluyendo componentes en muy bajas concentraciones de aceites de semilla de zapallo, melón, sandía y esponja vegetal (% de ácidos totales)

Acidos	Cucurbita maxima var. Inglés	Cucumis melo	Citrullus vulgaris	Luffa cylindrica
11:0	-	-	vest.	-
12:0	0,01	} 0,01	0,01	0,01
13:0	-		vest.	-
14:0	0,16	0,04	0,07	0,05
15:0	0,01	0,02	0,03	0,02
16:0	13,81	8,03	11,62	13,68
17:0	0,04	0,02	0,01	0,02
18:0	7,60	5,54	9,79	7,54
20:0	0,95	0,41	0,67	0,58
21:0	-	0,11	-	-
22:0	0,30	vest.	0,22	0,13
23:0	-	0,05	-	-
24:0	0,17	0,12	0,13	0,40
r16:0	-	-	0,01	-
15:1	-	-	0,01	-
16:1	0,26	0,26	0,28	0,50
17:1	0,01	0,01	-	-
18:1	25,77	22,30	17,45	14,60
20:1	0,13	0,12	0,13	0,10
21:1	-	-	-	0,08
22:1	-	vest.	-	-
23:1	-	0,16	-	-
18:2	50,78	62,78	59,57	62,29
20:2	-	0,02	-	-

Teniendo en cuenta las composiciones acídicas de la Tabla 5 se calcularon los valores de índice de yodo y saponificación de los aceites respectivos que resultaron concordantes con los determinados experimentalmente como se puede observar a continuación:

	Índice de yodo		Índice de saponificación	
	determinado	calculado	determinado	calculado
C.maxima	113,2	112,7	191,0	193,7
C.melo	130,7	129,9	189,2	190,1
C.vulgaris	122,4	120,0	191,6	191,4
L.cylindrico	122,0	121,0	190,7	189,9



**Tabla 6- Características de la semilla y de los aceites de extracción (hexano) de melón, sandía y esponja vegetal de producción nacional**

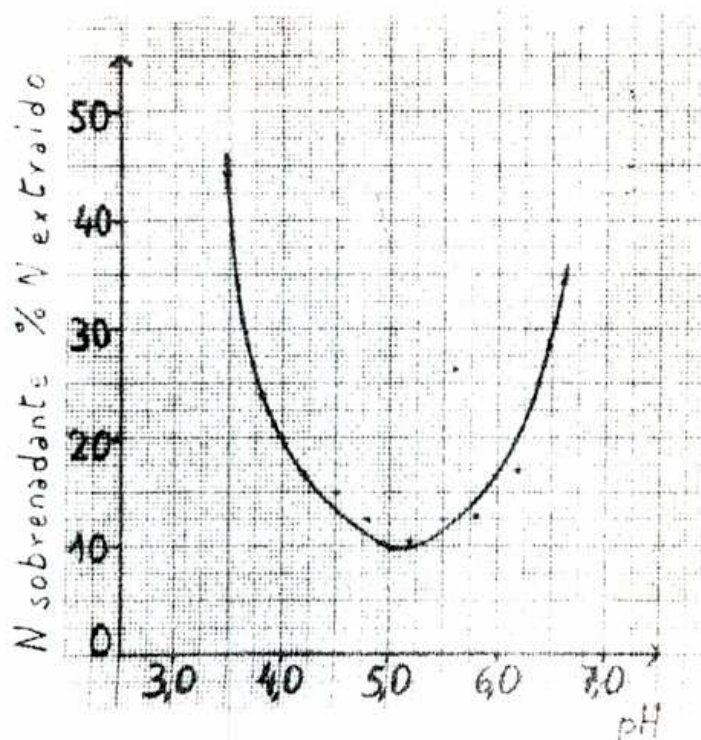
Especie Procedencia	Cucumis melo Bs.As.	Citrullus vulgaris Entre Ríos	Luffa cylindrica Bs.As.
Relación cáscara/pepa (% en peso)	48,3/51,7	57,2/42,8	50,9/49,1
Aceite (hexano) % pepa tal cual	46,1	51,7	48,2
Peso específico (25 <sup>o</sup> /4 <sup>o</sup> )	0,9169	0,9164	-
Ind.refracción (25 <sup>o</sup> )	1,4730	1,4717	1,4705
Ind.saponificación	189,2	191,6	190,7
Ind.yodo (Wijs)	130,7	122,4	123,5
Acidez libre (mg HOK/g)	0,62	3,51	8,82
Insaponificable total (%)	1,60	1,44	1,87
Ind. yodo insaponificable	148,3	138,5	109,5
Esteroles totales (mg % g)	209	409,7	223,8
Escualeno (mg % g)	127,2	164,2	73,4
Tocoferoles totales (mg % g)	70,0	26,4	23,6

**Tabla 7- Composición de las harinas de extracción de semilla de diversas variedades de zapallo y de melón, sandía y esponja vegetal de producción nacional**

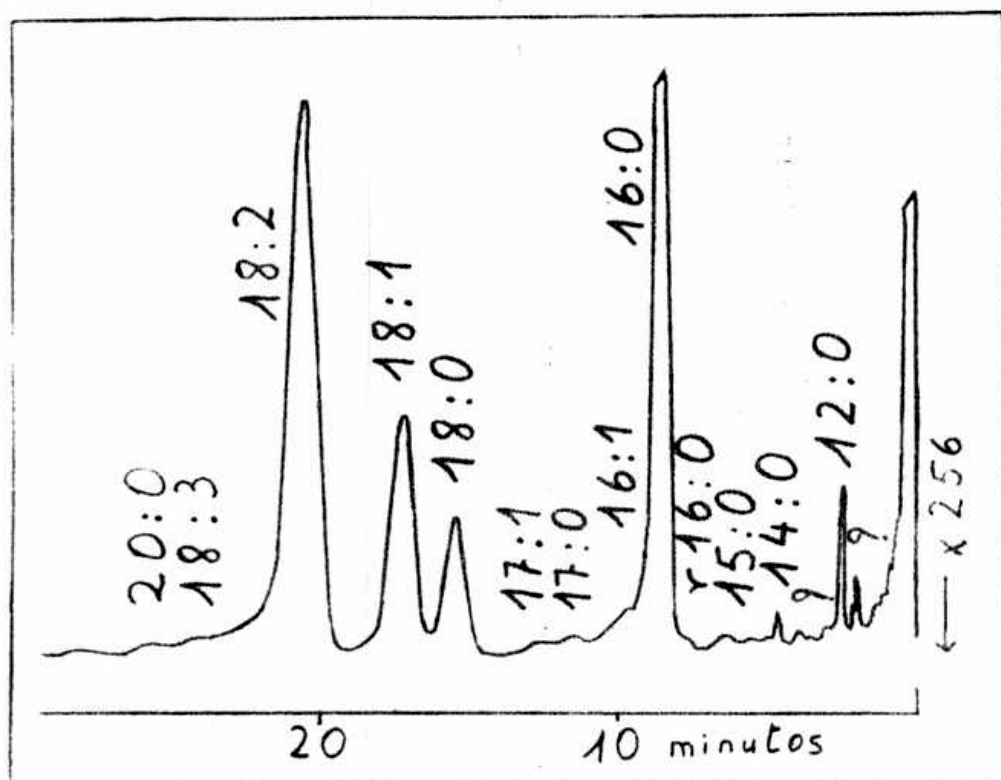
Especie	Humedad %	Cenizas %	Fibra cruda %	N total %	Proteínas (Nx6,25) (s/s.seca) %
.maxima var.Inglés	5,66	8,32	2,71	12,07	79,96
.maxima var.Pink Banana	7,33	8,61	3,55	10,07	67,91
.maxima var.Pink Banana Jumbo	4,99	8,48	2,75	10,75	70,71
.maxima var.Red Hubbard	3,81	4,28	3,39	10,92	70,95
.maxima var.Criollo	5,75	9,40	2,91	11,17	74,07
.maxima var.Plomo Criollo	3,72	8,38	2,89	11,13	72,25
.pepo var.Angola	7,32	8,64	3,08	11,63	78,42
.pepo var.Angola <sup>(x)</sup>	11,00	6,48	27,85	7,13	50,07
ucumis melo	10,74	4,70	43,91	4,30	30,11
itrullus vulgaris	5,72	3,23	45,26	4,68	31,02
uffa cylindrica <sup>(xx)</sup>	9,83	6,84	11,93	8,06	55,86

x) Sobre semilla entera

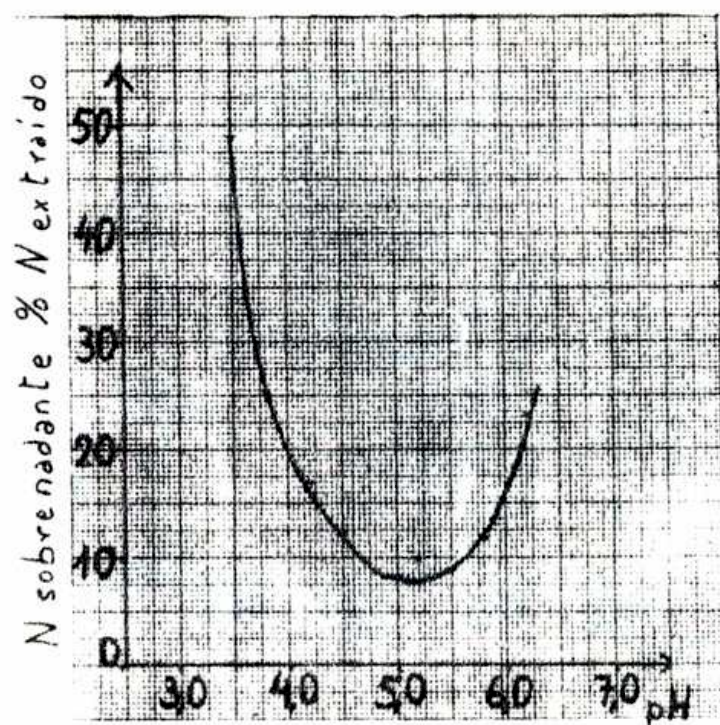
xx) Harina de semilla entera remolida y tamizada (Tamiz Tyler, malla 40)



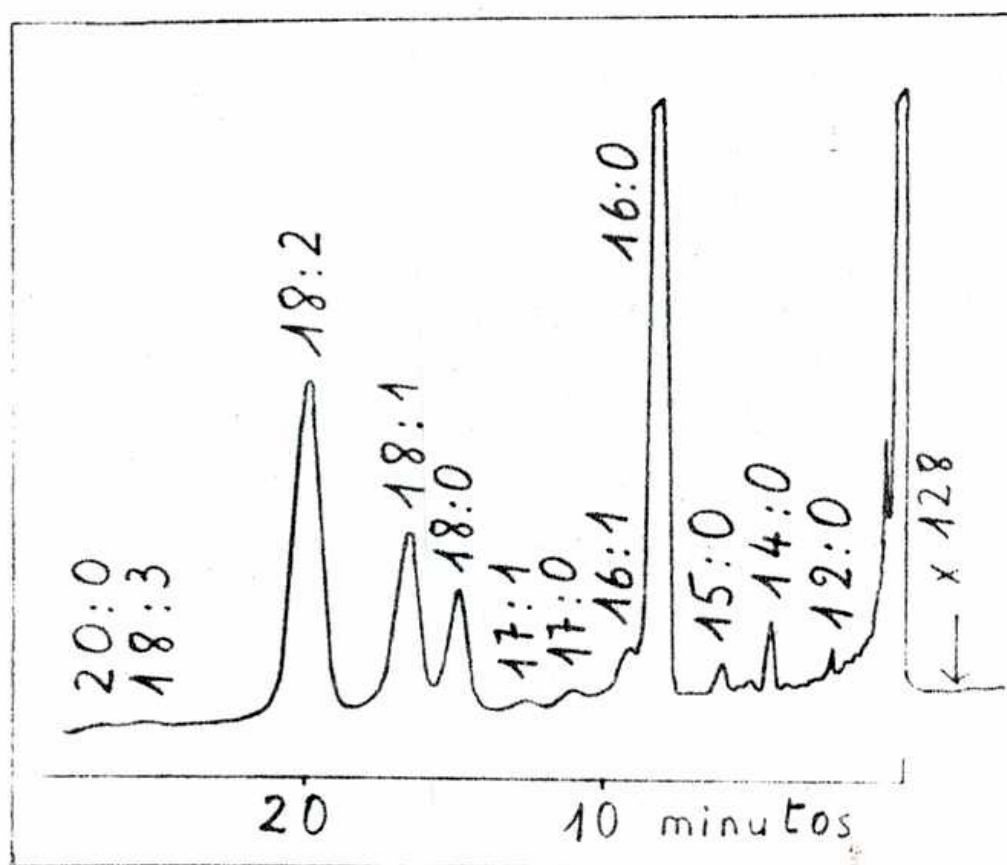
**Fig. 1-** Valor de pH de máxima precipitación de proteínas de harina de semilla de zapallo var. Inglés



**Fig. 2-** Cromatografía C.G.L. de los ésteres metílicos de los ácidos totales de lípidos asociados a proteínas de harina de semilla de zapallo var. Inglés



**Fig. 3-** Valor de pH de máxima precipitación de proteínas de harina de semilla de esponja vegetal



**Fig. 4-** Cromatografía C.G.L. de los ésteres metílicos de los ácidos totales de lípidos asociados a proteínas de harina de semilla de esponja vegetal



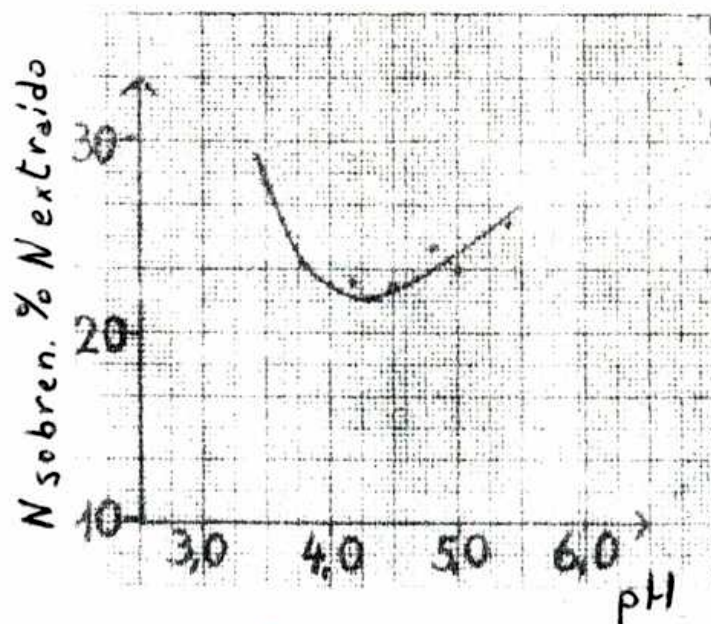


Fig.5- Valor de pH de máxima precipitación de proteínas de harina de semilla de melón

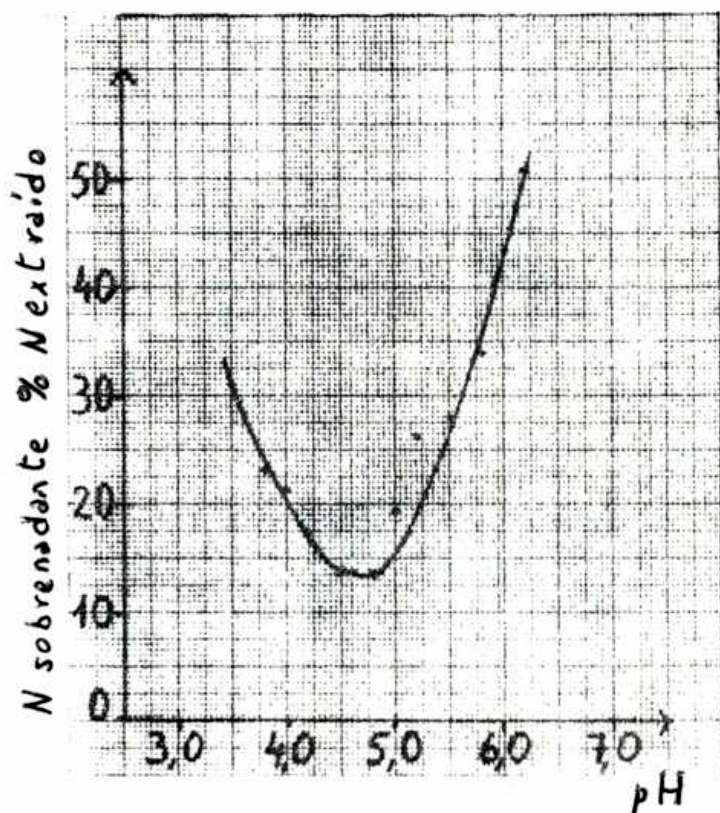
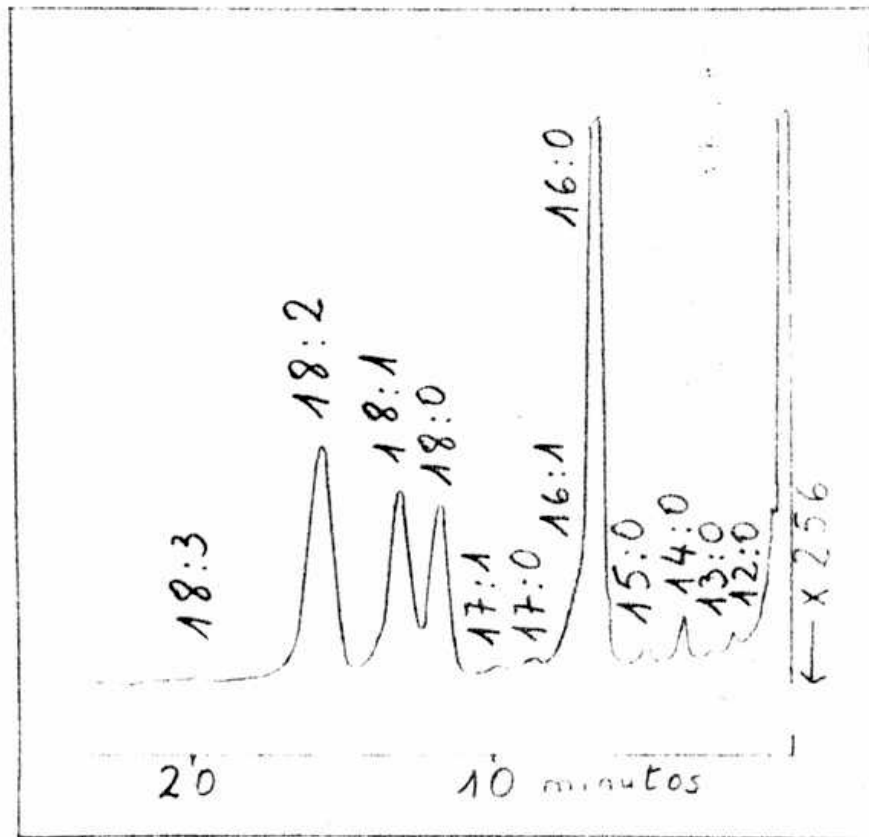
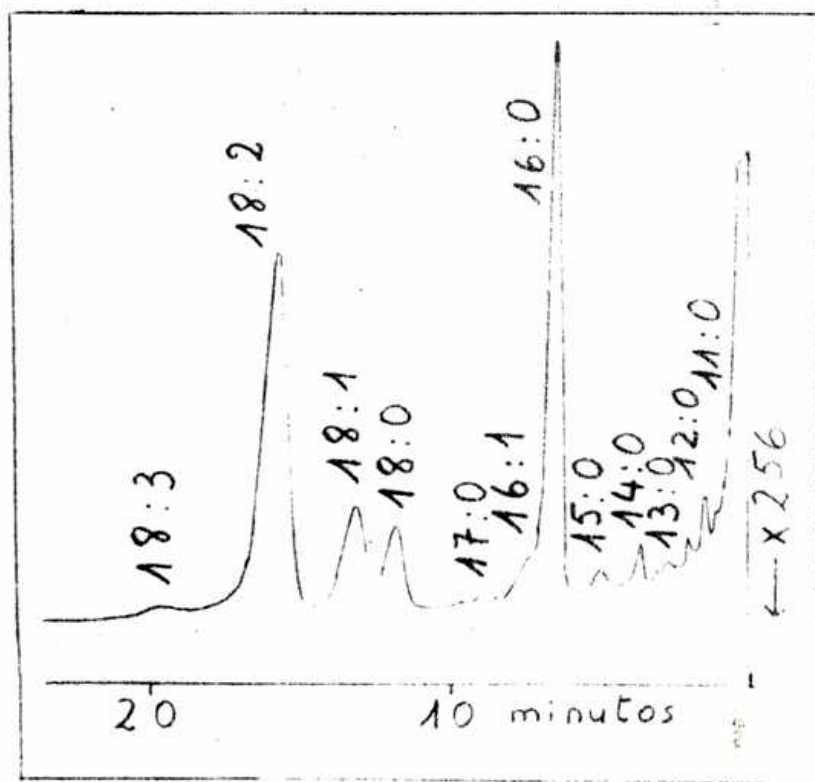


Fig.6- Valor de pH de máxima precipitación de proteínas de harina de semilla de sandía



**Fig.7-** Cromatografía C.G.L. de los ésteres metílicos de los ácidos totales de lípidos asociados a proteínas de harina de semilla de melón



**Fig.8-** Cromatografía C.G.L. de los ésteres metílicos de los ácidos totales de lípidos asociados a proteínas de harina de semilla de sandía

P A R T E II

PARTE EXPERIMENTAL

## Estudios sobre aceites de extracción

### 1- Semilla

Se dispuso de partidas de semilla seca al aire procedentes de frutos maduros de diversas variedades comerciales de zapallo: Inglés (Cucurbita maxima), Angola (Cucurbita pepo) (dos partidas), Pink Banana (Cucurbita maxima), Pink Banana Jumbo (Cucurbita maxima), Red - Hubbard (Cucurbita maxima), Criollo (Cucurbita maxima) y Plomo Criollo (Cucurbita maxima) cultivados en las Provincias de Mendoza y Buenos Aires<sup>(x)</sup>. Asimismo, una partida mezcla de semilla de melón (Cucumis melo) procedentes de frutos maduros de las dos variedades de mayor consumo en Buenos Aires, var. Reticulatus e Inodorus; semilla de sandía (Citrullus vulgaris), variedad comercial Favorita de Florida (Entre Ríos), adquirida en plaza y semilla de esponja vegetal (Luffa cylindrica) de la Provincia de Buenos Aires y adquirida en plaza. La semilla de zapallo de las variedades Pink Banana, Pink Banana Jumbo, Red Hubbard, Criollo y Plomo Criollo cosechada en Mendoza procede de frutos que se consideran aptos para la deshidratación de sus pulpas.

Con carácter previo a la extracción de los aceites la semilla se resolvió manualmente en sus componentes principales (cáscara y pepa), determinando las relaciones porcentuales cáscara/pepa.

### 2- Extracción de aceites, obtención de aceites crudos y harinas de extracción

De acuerdo a la disponibilidad de semilla los aceites se extrajeron con hexano técnico operando sobre semilla entera molida o sobre pepa libre de cáscara (en todos los casos se realizó un primer a

---

(x) Proporcionadas por las firmas: Industrias J. Matas (Mendoza), Refinerías de Maíz S.A. (Buenos Aires) y Daniel Bassi S.A. (Buenos Aires).



gotamiento para eliminar la mayor parte de aceite, remoliendo nuevamente y re-extrayendo hasta agotamiento en Soxhlet). De los extractos se recuperó el solvente por destilación a bañomaría, se pasó vapor (eliminación de restos de hexano), se tomó por éter etílico y trató con solución semi-saturada de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  en agua. De la fase etérea deshidratada con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro se recuperó el éter por destilación a bañomaría y los aceites crudos se llevaron a constancia de peso en estufa de vacío ( $100^\circ$ , 5 Torr), pesando y calculando los rendimientos.

La Tabla 2 (Parte I), se refiere a los valores de las relaciones cáscara/pepa, contenidos de humedad de semilla entera o pepa (según los casos) y contenidos de aceite por extracción.

Los productos finamente molidos resultantes de la extracción de aceites se orearon al aire y finalmente se trataron a no más de  $45^\circ$  en estufa de vacío (eliminación exhaustiva de solvente), obteniéndose así las harinas de extracción que se reservaron para su análisis y estudios referentes al aislamiento de proteínas.

### 3- Características fisicoquímicas de los aceites

Previamente a los análisis de composición acídica se determinaron (según la disponibilidad de aceite) los valores de: peso específico ( $25^\circ/4^\circ$ , picnómetro), índice de refracción ( $25^\circ$ , Abbe), índice de saponificación (A.O.A.C.), índice de yodo (Wijs), número de acidez (IUPAC II D.1), insaponificable total (A.O.C.S., Tentative Method Ca 6b-53), índice de yodo de los insaponificables (Rosenmund), esteroides totales (digitonina) (21), escualeno (Fittelson, A.O.A.C., Official Method 473, 1955) y tocoferoles totales (57) con los resultados que figuran en la Tabla 2, Parte I.

### 4- Composiciones acídicas

Todos los aceites se examinaron previamente por espectrofotome

tría en el U.V. (A.O.C.S., Official Method Cd 7-58, 1960) y según Bemis et al. (6) (verificación de conjugación triénica pre-existente).

De los líquidos resultantes de las determinaciones de valores de índice de saponificación se extrajeron los insaponificables y recuperaron los ácidos totales libres de insaponificable que se esterificaron con metanol conteniendo 1 a 1,5 % en peso de  $SO_4H_2$  como catalizador (16). Los ésteres se examinaron por cromatografía de partición gas-líquido empleando un equipo Perkin-Elmer "Vapor Fractometer", Mod.154, equipado con detector de ionización de llama, columna de vidrio Pyrex de 2 ó 3 m de largo y 4,5 mm de diámetro interno, con material de relleno formado por Chromosorb G-HP (80-100) y adipato de polietilenglicol (14 % sobre el relleno total). Se operó a 200° empleando nitrógeno (4 bandas) como fase móvil y con inyecciones de 1,5 a 3 nm de solución de ésteres al 5 % en éter etílico. Los componentes se identificaron según sus tiempos de retención y los valores de composición por triangulación. Las respuestas cuantitativas del equipo en las condiciones operadas han sido debidamente confirmadas verificando concordancia de valores para los contenidos en ácido linoleico (por determinación espectrofotométrica en el U.V.) y de ácidos saturados totales de acuerdo al método de Bertram. La Tabla 3, Parte I, resume los valores hallados (% de ácidos totales).

Las figuras 9 a 13 reproducen los cromatogramas obtenidos en estos análisis.

##### 5- Composiciones acídicas exhaustivas (incluyendo componentes en muy baja concentración)

Operando sobre el aceite de semilla de zapallo (var.com.Inglés) y de los aceites de semilla de melón, sandía y esponja vegetal se aislaron los ácidos totales libres de insaponificable procedentes de 13 a 25 g de aceite (según los casos). Los ácidos se esterificaron con metanol (16) y se fraccionaron por destilación en vacío (0,5-1,0 Torr)

empleando un equipo según Longenecker (58) (eficacia 12 platos teóricos medidos con mezcla benzol - tetracloruro de carbono). Se obtuvieron series de fracciones (que se pesaron y examinaron por C.G.L. en las condiciones señaladas) y residuos de destilación. Estos últimos se saponificaron extrayendo los insaponificables residuales y recuperando los ácidos totales libres de insaponificable que se rees terificaron con metanol y examinaron por C.G.L.

La información siguiente se refiere al detalle de estos fraccionamientos por destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales de los aceites considerados. Figuran en forma sucesiva el número de cada fracción y las composiciones acídicas de las fracciones (ácidos % de ácidos totales en fracción)

Aceite de semilla de zapallo var.com.Inglés.

Fracción 1: (0,47 g); 12:0 (0,2), 14:0 (6,1), 15:0 (0,2), 16:0 (90,3), 17:0 (vest.), 16:1 (2,9), 18:1 (vest.), 18:2 (0,3)

Fracción 2: (0,52 g); 12:0 (vest.), 14:0 (1,0), 15:0 (0,1), 16:0 - (93,5), 17:0 (vest.), 16:1 (3,4), 18:1 (0,3), 18:2 (1,7)

Fracción 3: (0,67 g); 14:0 (0,2), 15:0 (vest.), 16:0 (92,6), 17:0 (vest.), 18:0 (vest.), 16:1 (1,8), 18:1 (1,1), 18:2 (4,3)

Fracción 4: (1,25 g); 14:0 (vest.), 16:0 (67,7), 17:0 (0,1), 18:0 (0,5), 16:1 (1,1), 17:1 (vest.), 18:1 (7,3), 18:2 (23,3)

Fracción 5: (1,69 g); 16:0 (23,9), 17:0 (0,2), 18:0 (1,8), 17:1 (0,1), 18:1 (20,4), 18:2 (53,6)

Fracción 6: (4,82 g); 16:0 (3,3), 17:0 (0,1), 18:0 (3,9), 17:1 (vest.), 18:1 (29,9), 18:2 (62,8)

Fracción 7: (9,52 g); 16:0 (0,3), 17:0 (vest.), 18:0 (8,5), 17:1 - (vest.), 18:1 (30,9), 18:2 (60,3)

Residuo: (2,88 g); 16:0 (1,6), 18:0 (21,7), 20:0 (7,2), 22:0 (2,3),  
24:0 (1,3), 18:1 (27,6), 20:1 (1,0), 18:2 (37,3)

Aceite de semilla de melón

Fracción 1: (0,41 g); 12:0 (0,1), 13:0 (0,1), 14:0 (1,2), 15:0 (0,6),  
16:0 (87,4), 17:0 (vest.), 18:0 (0,1), 16:1 (6,0), 17:1 (vest.),  
18:1 (0,6), 18:2 (3,9)

Fracción 2: (0,60 g); 14:0 (0,2), 15:0 (0,2), 16:0 (73,2), 17:0 (0,1),  
18:0 (0,2), 16:1 (2,5), 17:1 (vest.), 18:1 (4,5), 18:2 (19,1)

Fracción 3: (0,76 g); 14:0 (vest.), 16:1 (35,1), 17:0 (0,1), 18:0 -  
(0,6), 17:1 (0,1), 18:1 (12,3), 18:2 (51,8)

Fracción 4: (1,11 g); 16:0 (7,7), 17:0 (0,1), 18:0 (1,3), 17:1 (vest.),  
18:1 (18,7), 18:2 (72,2)

Fracción 5: (1,22 g); 16:0 (1,4), 17:0 (vest.), 18:0 (1,9), 18:1 -  
(21,8), 18:2 (74,9)

Fracción 6: (2,46 g); 16:0 (0,1), 18:0 (2,6), 18:1 (23,4), 18:2 (73,9)

Fracción 7: (3,04 g); 18:0 (3,7), 18:1 (24,9), 18:2 (71,4)

Fracción 8: (2,74 g); 18:0 (9,2), 18:1 (26,0), 18:2 (64,8)

Residuo: (2,68 g); 16:0 (1,4), 18:0 (13,4), 20:0 (2,3), 21:0 (0,6),  
22:0 (vest.), 23:0 (0,3), 24:0 (0,7), 18:1 (26,4), 20:1 (0,7),  
22:1 (vest.), 23:1 (0,9), 18:2 (53,2), 20:2 (0,1)

Aceite de semilla de sandía

Fracción 1: (0,13 g); 11:0 (0,4), 12:0 (0,9), 13:0 (0,7), 14:0 (8,0),  
15:0 (2,5), 16:0 (80,7), 16:0 (0,9), 17:0 (2,3), 15:1 (0,5),  
16:1 (3,1)

Fracción 2: (0,23 g); 11:0 (vest.), 12:0 (vest.), 13:0 (vest.), 14:0

(1,7), 15:0 (0,7), 16:0 (92,9), 16:0 (0,2), 17:0 (vest.)  
(vest.), 15:1 (0,4), 16:1 (4,1)

Fracción 3: (0,45 g); 14:0 (0,4), 15:0 (0,4), 16:0 (96,1), 17:  
16:1 (3,1), 18:1 (vest.), 18:2 (vest.)

Fracción 4: (0,94 g); 14:0 (vest.), 15:0 (vest.), 16:0 (96,2),  
(vest.), 18:0 (vest.), 16:1 (2,4), 18:1 (vest.), 18:2 (1,

Fracción 5: (1,21 g); 16:0 (72,9), 17:0 (vest.), 18:0 (0,6), 1  
18:1 (4,2), 18:2 (20,9)

Fracción 6: (4,46 g); 16:0 (3,5), 18:0 (4,3), 18:1 (17,7), 18:

Fracción 7: (7,14 g); 16:0 (0,3), 18:0 (7,4), 18:1 (19,6), 18:

Fracción 8: (5,45 g); 18:0 (12,4), 18:1 (21,5), 18:2 (66,1)

Residuo: (3,41 g); 16:0 (0,2), 16:0 (vest.), 17:0 (vest.), 18  
20:0 (4,6), 22:0 (1,5), 24:0 (0,9), 16:1 (vest.), 18:1 (11  
(0,9), 18:2 (46,0)

#### Aceite de semilla de esponja vegetal

Fracción 1: (0,35 g); 12:0 (0,5), 14:0 (2,1), 15:0 (0,8), 16:0  
16:1 (5,0)

Fracción 2: (0,74 g); 14:0 (0,5), 15:0 (0,1), 16:0 (95,0), 16:

Fracción 3: (1,20 g); 16:0 (94,7), 16:1 (3,1), 18:2 (2,2)

Fracción 4: (1,49 g); 16:0 (39,7), 17:0 (0,3), 18:0 (1,0), 16:  
18:1 (8,5), 18:2 (49,5)

Fracción 5: (2,35 g); 16:0 (2,5), 18:0 (2,6), 18:1 (15,1), 18:

Fracción 6: (3,29 g); 18:0 (4,3), 18:1 (17,0), 18:2 (78,7)

Fracción 7: (3,47 g); 18:0 (6,3), 18:1 (16,3), 18:2 (77,4)

Fracción 8: (5,55 g); 18:0 (11,4), 18:1 (18,7), 18:2 (69,9)

Residuo: (2,32 g); 16:0 (1,3), 18:0 (21,4), 20:0 (5,2), 22:0 (1,2),  
24:0 (3,6), 18:1 (16,7), 20:1 (0,8), 21:1 (0,7), 18:2 (49,1)

Con estos valores se calcularon las composiciones acídicas finales de los ácidos totales de los aceites respectivos, expuestos - en la Tabla 5, Parte I.

A título de ejemplo se reproducen en las figuras 14-21 los cromatogramas correspondientes a las fracciones y residuos de destilación de los ésteres metílicos del aceite de semilla de zapallo var. Inglés.

#### 6- Reconocimiento de escualeno en aceite de semilla de zapallo

En razón de los elevados valores para los contenidos en escualeno de estos aceites (235-271 mg % g), se decidió identificar al escualeno como componente normal de acuerdo a Thorbjarnarson y Drummond (20). Aproximadamente 0,20 g de insaponificable de aceite de semilla de zapallo var. Inglés se disolvieron en 7 ml de éter etílico anhidro, enfrió a  $-18^{\circ}$  y añadió lentamente bromo hasta ligero exceso. Por estacionamiento a esa temperatura se depositó un precipitado blanco que, aislado por filtración a  $-15^{\circ}$ , lavado con éter etílico anhidro frío y secado en estufa de vacío fundió con descomposición a  $186^{\circ}$  previo oscurecimiento a  $150^{\circ}$ . Los autores mencionados dan para el derivado dodecabromado aislado a partir del hidrocarburo puro, oscurecimiento a  $150^{\circ}$  y fusión con descomposición a  $187-189^{\circ}$ .

### Estudios sobre harinas de extracción y aislamiento de proteínas

#### 1- Obtención de muestras. Análisis de su composición general

Las harinas resultantes de la extracción del aceite por hexano

(Soxhlet), una vez secas al aire y finalmente en estufa de 45° (eliminación del solvente remanente), se remolieron en muello y guardaron en frascos con buen cierre hasta el momento de análisis. Sobre ellas se determinaron los contenidos de humedad, cenizas, nitrógeno total y fibra cruda % de harina tal cual, de acuerdo a las siguientes técnicas:

Humedad: Se efectuó sobre aproximadamente 1 a 2 g de muestra en estufa de vacío a 100° hasta peso constante (A.O.A.C., Official Method 13.3, 1950).

Cenizas: Se obtuvieron por incineración de aproximadamente 2 g de muestra en muflo a 500-550° hasta lograr un residuo prácticamente blanco y de peso constante (A.O.A.C., Official Method 1950).

Nitrógeno total: Se operó sobre 0,2-0,3 g de harina, se usó el método de Kjeldahl (A.O.A.C., Official Method 2.24, 1950) efectuando la digestión con mezcla  $\text{SO}_4\text{H}_2$ ,  $\text{SO}_4\text{K}_2$  y  $\text{SO}_4\text{Cu}$ .

Fibra cruda: Se operó directamente sobre la harina, ya que el agotamiento del material de partido por hexano técnico (extraído del aceite en laboratorio) es prácticamente total según lo requerido para aplicar la técnica oficial A.O.A.C. para fibra (A.O.A.C. Official Method 22.038, 1965).

Los valores hallados en todas las determinaciones, expresados en % de harina tal cual, se refirieron a % de harina libre de cenizas usando para este último cálculo las cifras promedio de determinaciones efectuadas por duplicado o triplicado.

## 2- Ensayos previos al aislamiento de proteínas. Ajuste de condiciones óptimas de extracción y precipitación

En los ajustes de pH se usaron soluciones de NaOH o HCl y las respectivas soluciones diluidas. Se controlaron los valores de pH con electrodo de vidrio (pHmeter E 396 B-Methrom). La temperatura

ra durante la extracción del material nitrogenado se mantuvo con baño termostático a 30° (equipo Sargent Heater and Circulator).

La precipitación de proteínas se efectuó a temperatura ambiente (aproximadamente 20-25°).

En las etapas de extracción y precipitación se utilizó un agitador mecánico de vidrio y en las separaciones por centrifugación se operó con centrífuga Universal Junior III S, a aproximadamente 2800 rpm.

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

#### Técnica de extracción de proteínas y elección del pH de máxima precipitación (punto isoeléctrico)

En balón de tres bocas provisto de agitador, se colocaron 60 g de harina que se suspendieron en 1200 ml de agua destilada previamente ajustada al pH correspondiente, en la relación harina:agua 1:20. Se agitó permanentemente durante 1 hora a 30°, manteniendo el pH de dispersión en el valor prefijado por agregado de solución de NaOH. El conjunto se trasvasó a tubos de centrífuga y centrifugó durante 30 minutos a 2800 rpm.

El líquido sobrenadante (de color amarillo parduzco y turbio) se trasvasó a recipientes aforados filtrándolo a través de tela metálica de acero inoxidable (200 mallas por cm). El residuo se lavó por agitación con 100-120 ml de agua destilada previamente llevada al mismo pH, centrifugó nuevamente (20 minutos, 2800 rpm) y el líquido decantado, pasado por embudo con malla, se reunió al anterior. El residuo se pasó nuevamente al balón de extracción donde se procedió a dos nuevas extracciones sucesivas conducidas en las mismas condiciones operatorias (30°, 1 hora, agitación permanente y pH correspondiente) pero con las relaciones harina:agua 1:10 y 1:5 respecti-



vamente y centrifugando al final de los períodos de extracción. No se efectuaron lavados posteriores del residuo. Los líquidos sobrenadantes decantados, provenientes de las tres extracciones y lavado - reunidos se llevaron a volumen con agua destilada (2500 ml) y sobre alícuotas, por triplicado, se determinó el nitrógeno total extraído.

El líquido proveniente de las extracciones se fraccionó en alícuotas de igual volumen (colocadas en sendos vasos de precipitado), para operar la precipitación de proteínas a diferentes valores de pH, cubriendo el ámbito de valores de 3,5 a 6,6. Las precipitaciones se efectuaron a temperatura ambiente, por agregado de ClH 5N (ajuste final del pH con ClH diluido en cada caso), con agitación que se continuó hasta 5 minutos después de alcanzado el valor de pH deseado.

Los precipitados obtenidos se separaron por centrifugación (2800 rpm., 30 minutos), lavando en todos los casos con la misma cantidad mínima de agua destilada ajustada al pH correspondiente, y los líquidos sobrenadantes respectivos se decantaron en matraces aforados (250 ml).

Los precipitados se lavaron dos veces (por agitación) con agua destilada ajustada al pH respectivo (50 ml cada lavado), centrifugando luego 12 minutos (2800 rpm). Los líquidos reunidos se llevaron a volumen y midieron alícuotas para determinar el nitrógeno sobrenadante para cada valor de pH.

Los coágulos precipitados presentaron consistencia compacta y color blanco. Al secarlos en estufa de vacío a 45° su color cambió al pardo verdoso, intensificándose a medida que proseguía el secado. Todos los precipitados una vez secos presentaron textura granular, dura, vítrea (difícil de moler a polvo fino) y de color pardo verdoso intenso.

La observación de las características de los líquidos sobrenadantes permitió señalar que los separados en las precipitaciones car

canas al pH isoeléctrico resultaron lípidos, mientras que los correspondientes a valores de pH superiores o inferiores a aquellos, de turbiedad creciente (lechoso).

Los datos obtenidos, consignados en los gráficos respectivos, muestran el % de material nitrogenado soluble en el sobrenadante en función de los valores de pH (registrando su valor mínimo a pH 5,0 (zapallo), 4,3 (melón), 4,8 (sandía) y 5,0 (esponja vegetal).

Se presenta un esquema del procedimiento descripto (Esquema N<sup>o</sup> 1).

### 3- Balance de la distribución del nitrógeno total en harinas en procesos de aislamiento de proteínas

La harina (30 g) se dispersó en agua ajustada al pH óptimo de extracción pre-elegido (10-10,5) en la relación harina:agua 1:20. La mezcla fue agitada por 1 hora a 30<sup>o</sup>, reajustando el pH cuando era necesario. Esta extracción fue seguida por centrifugación y filtrado (malla de acero inoxidable) para remover el material insoluble. Sobre el residuo se practicó un lavado acuoso (agua destilada ajustada al pH 10,5) y luego dos extracciones más con agua a pH 10,5 en las relaciones harina:agua 1:10 y 1:5 sucesivamente, separando el extraído por centrifugación y filtración después de cada etapa.

En el residuo, una vez seco a 100-110<sup>o</sup> y molido a polvo fino, se determinó su contenido en nitrógeno total a fin de controlar y cerrar el balance nitrogenado en las distintas fracciones.

Los líquidos de extracción y lavado reunidos se llevaron a volumen (1250 ml). Una parte del mismo se destinó para valorar el nitrógeno total extraído y el remanente se ajustó al pH elegido como punto isoeléctrico según la experiencia anterior, separando el coágulo de proteínas por centrifugación. Después de decantar en matraz afarado el líquido sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces (con agitación) con agua destilada previamente ajustada al valor de

pH isoeléctrico correspondiente, centrifugando al finalizar cada lavado.

Los sobrenadantes, reunidos a los líquidos de lavado acuosa, - se llevaron a volumen y en tres alícuotas se determinó su contenido en nitrógeno.

Las proteínas así lavadas se purificaron a través de tres lavados etanólicos (etanol 96 %) por agitación (desmenuzando a fondo los grumos formados) usando la relación mínima g proteína:ml solvente - 1:20 y a temperatura ambiente. Los extractos etanólicos se separaron por centrifugación (aproximadamente 8 minutos a 2800 rpm), juntaron y evaporaron al vacío en rotavapor a menos de 50° quedando un residuo sólido verde claro, lechoso, parcialmente soluble en cloroformo. Las soluciones etanólicas correspondientes a las dos primeras extracciones resultaron claras y de color amarillo o amarillo verdoso según los casos, mientras que la última resultó incolora y muy turbia por la presencia de proteína finamente dividida que no sedimentó en las condiciones de centrifugación señaladas (ver Esquema N° 2).

#### 4- Estudio de la fracción separada en lavados etanólicos

El residuo de los lavados etanólicos se tomó por cloroformo y filtró a través de papel de filtro embebido en cloroformo, recogiendo en matraz aforado de 200 ml.

Una alícuota de 100 ml (una vez evaporado el solvente y llevada a peso constante en estufa de vacío a 100°) permitió calcular el rendimiento del material lipídico extraído, por pesada del residuo. Operando sobre este mismo residuo, previa saponificación con HOK etanólico, se extrajo la fracción insaponificable (éster etílico) determinando su % por pesada después de eliminado el solvente por destilación al baño María y finalmente en vacío (100°). A partir de la capa hidroalcohólica remanente de la separación del insaponificable se obtuvieron los ácidos totales que se transformaron en ésteres metili-

cos por esterificación con metanol y  $\text{SO}_4\text{H}_2$  (16). El examen por cromatografía gas-líquido permitió determinar su composición acídica empleando el equipo, columna y condiciones operatorias que se detallan en la Parte Experimental correspondiente al estudio de composición acídica. Los componentes acídicos se identificaron y calcularon de igual forma, expresando los resultados en ácidos % de ácidos totales en extracto etanólico, en base a los cromatogramas de las Figuras 2, 4, 7 y 8 (Parte I).

#### 5- Determinación de fósforo

La técnica que sigue se aplicó a determinaciones de fósforo lipídico en extractivos etanólicos de proteínas y de fósforo total en proteínas aisladas.

##### Soluciones y reactivos

Las soluciones se prepararon con drogas "pro análisis" y agua bidestilada.

$\text{SO}_4\text{H}_2$  conc. (d.1,84)

$\text{NO}_3\text{H}$  65 %

Urea

Agua bidestilada

Sol.  $\text{SO}_4\text{H}_2$  10N

Sol. Molibdato de amonio 5 %

Reactivo de Fiske-Subarrow (preparado por agregado de 0,5 g de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$  puro a una solución de 15 g de  $\text{SO}_3\text{HNa}$  puro en 80 ml de agua bidestilada y completando a volumen a 100 ml. A esta solución se agregó 0,25 g de ácido 1-amino,2-naftol,4-sulfónico agitando energicamente durante 10 minutos. Se dejó en reposo 30 minutos, agitó nuevamente y filtró por papel de filtro. Se guardó en frasco caramelo de buen cierre)

##### Técnica

Destrucción de la materia orgánica- Se midió una alícuota correspondiente a 0,05 - 0,10 g de residuo soluble en cloroformo (pro

veniente de los extractos alcohólicos del lavado de las proteínas, - tomados por cloroformo y filtrado) o se pesó una cantidad equivalente de proteína. Se adicionó de 3,47 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  conc. (5 ml para las proteínas) y de 1 ml  $\text{NO}_3\text{H}$  65 % (10 ml para las proteínas). Se calentó hasta aparición de vapores blancos (sulfúricos), agregando muy pequeñas cantidades de  $\text{NO}_3\text{H}$  y calentando nuevamente hasta comienzo de vapores sulfúricos en etapas sucesivas hasta la obtención de un líquido límpido e incoloro. Se agregó 1 ml de agua bidestilada y unos pocos cristallitos de urea, llevando nuevamente por calentamiento hasta aparición de vapores sulfúricos (eliminación de restos de  $\text{NO}_3\text{H}$ ).

El producto de la mineralización se trasvasó a un matraz aforado de 100 ml con agua bidestilada, llevando a volumen.

Paralelamente se condujo un ensayo en blanco en igualdad de condiciones.

La cantidad de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado, fijada por anticipado a la destrucción, fue calculada para asegurar que aproximadamente 4 ml de la solución resultante de la digestión contuviesen una cantidad de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  equivalente a 0,5 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  10N (condición requerida en el desarrollo de la reacción colorimétrica). (37)

#### Reacción colorimétrica

Operando sobre el producto de la mineralización anterior se procedió a la valoración colorimétrica de fósforo total según la técnica de Bartlett (37), de acuerdo a la medición sucesiva de muestra y reactivos, agitando a fondo después de cada adición y en el siguiente orden:

- Medición del blanco o de la muestra (efectuado con diferentes alícuotas iguales o menores de 4 ml, de la solución tal cual o convenientemente diluida) en tubos de 10 ml de capacidad.
- Agua bidestilada hasta completar 2,00 ml de volumen total (excepto si la alícuota tomada es mayor de este volumen).

- $\text{SO}_4\text{H}_2$  10N, cantidad necesaria para que en la solución final queden 0,5 ml de este ácido.
- Agua bidestilada, hasta completar un volumen total de 4,60 ml
- Solución de molibdato de amonio, 0,2 ml
- Reactivo de Fiske-Subarrow, 0,2 ml

Los tubos tapados con bolita de vidrio, se colocaron en baño de agua hirviente durante 7 minutos. Se enfriaron y leyó la absorbancia en cubetas de vidrio de 1 cm de espesor, en espectrofotómetro (Zeiss PM QII) a 830 nm, usando agua bidestilada como referencia. Para cada serie de determinaciones se midió el blanco respectivo.

Los contenidos en fósforo total se calcularon en base a la curva de calibrado lograda con solución patrón de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , (200 $\mu$ P/100 ml), operando en igualdad de condiciones.

Los resultados se expresaron como P total % de extracto etanólico y % de proteína (seca a 45 $^\circ$ ).

#### Determinación de fósforo de ácido fítico

Se utilizó el método de R.Casares y L.Moreno modificado (38).

#### Soluciones y reactivos

Sol.ClH 2 %

Sol.salicilato de sodio 10 %

Sol. $\text{Cl}_3\text{Fe}$  conteniendo 0,050 a 0,2 % de Fe, previamente valorado con solución 0,1M de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, usando ácido sulfosalicílico (sol.en agua destilada, rel. 5:95 - g:ml) como indicador (59).

#### Técnica

Se extrajeron 1,8 g de proteína aislada (seca a 45 $^\circ$ ) con 200 ml de ClH 2 % en un matraz de 500 ml durante una hora con agitación constante. Se filtró por tamiz de acero inoxidable (200 mallas/cm) y luego por papel de filtro hasta obtener un líquido transparente. 50 ml del filtrado se pasaron a un erlenmeyer de 300 ml añadiéndose 116 ml

de agua destilada para llevar la concentración final de ClH a 0,6 %. Se calentó a 70-80° y se agregaron 4 ml de solución de indicador. Se valoró con la solución de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ .

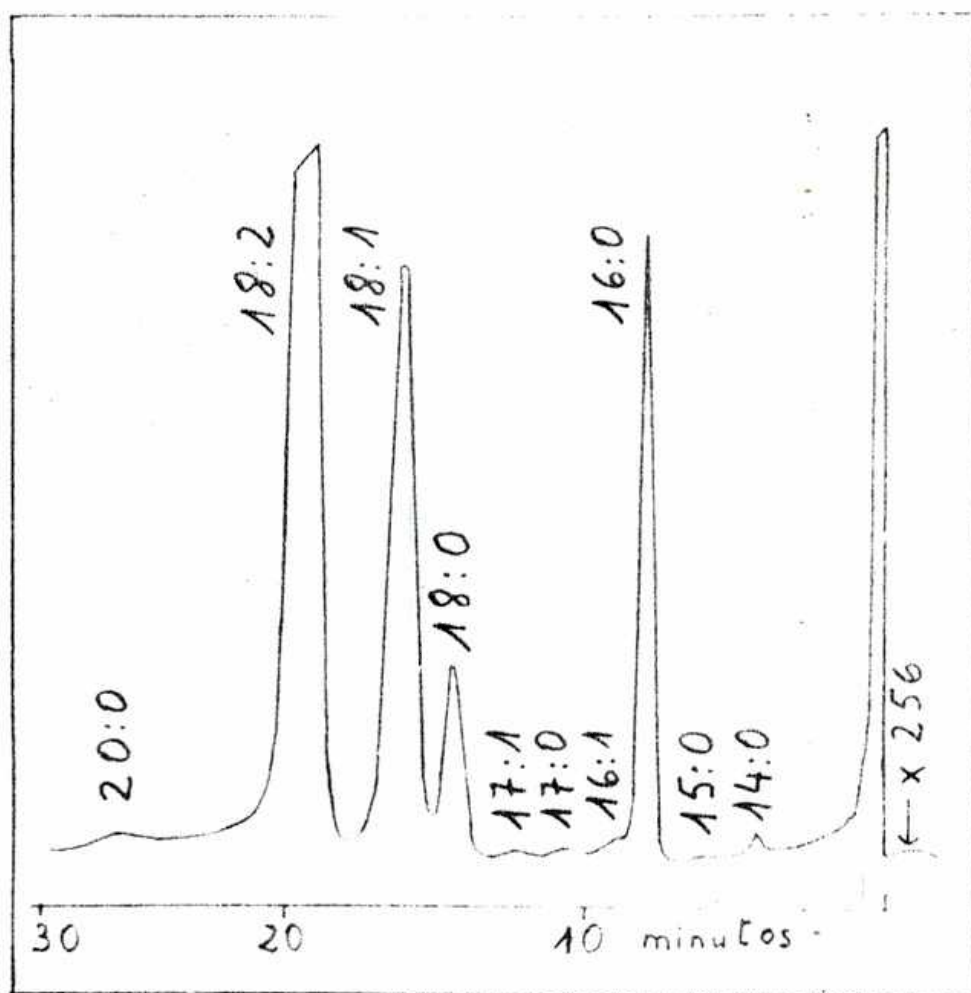
Paralelamente se hizo un blanco, en las mismas condiciones con 50 ml de ClH 2 % en lugar de la muestra, para cada partida de solución de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ .

Los valores de ácido fítico se calcularon en base a la relación de cuatro átomos de Fe por molécula de ácido fítico ( $\text{Fe}_4\text{P}_6\text{C}_{66}\text{H}_{66}\text{O}_{24}$ ) - (60,61).

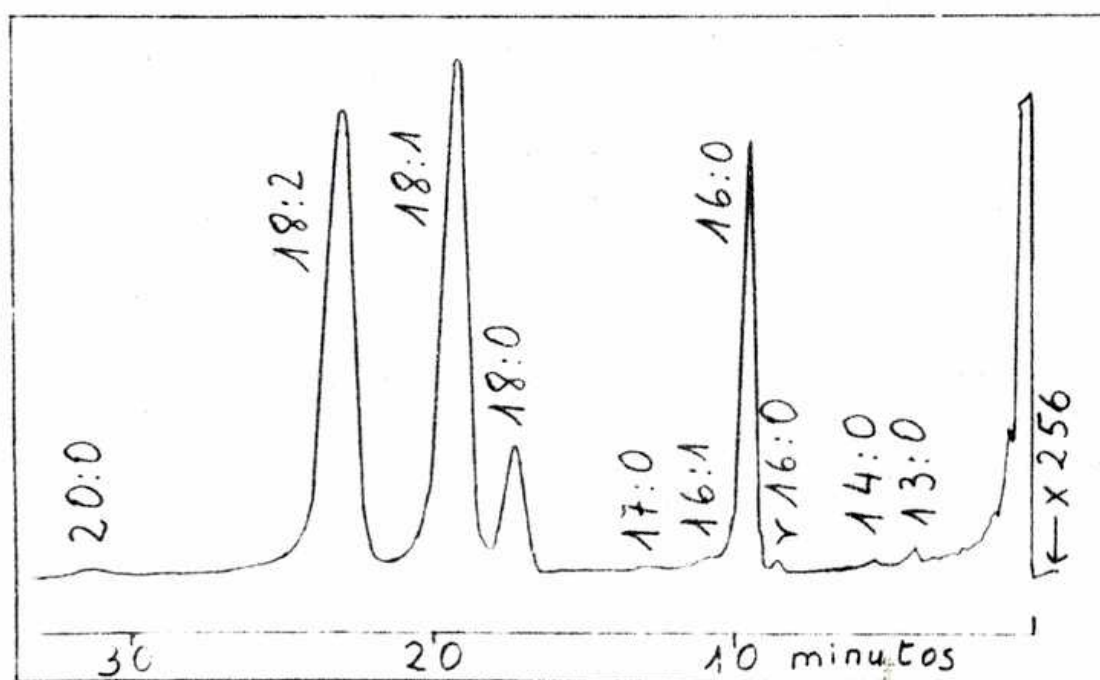
Los resultados se expresaron en g P de ácido fítico/100 g de proteína.

#### 6- Aislamiento en escala macro (de laboratorio) de proteínas a partir de harina de semilla de zapallo

De acuerdo a la secuencia de operaciones que se detallan en el Esquema N° 3, se realizó el aislamiento de aproximadamente 700 g de proteína destinado al ensayo de su valor biológico, digestibilidad, inocuidad y valoración de aminoácidos esenciales a realizar en la Cátedra de Bromatología y Nutrición Experimental (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires).



**Fig.9-** Esteres metílicos de los ácidos totales de aceite de semilla de zapallo var. Inglés



**Fig.10-** Esteres metílicos de los ácidos totales de aceite de semilla de zapallo var. Pink Banana



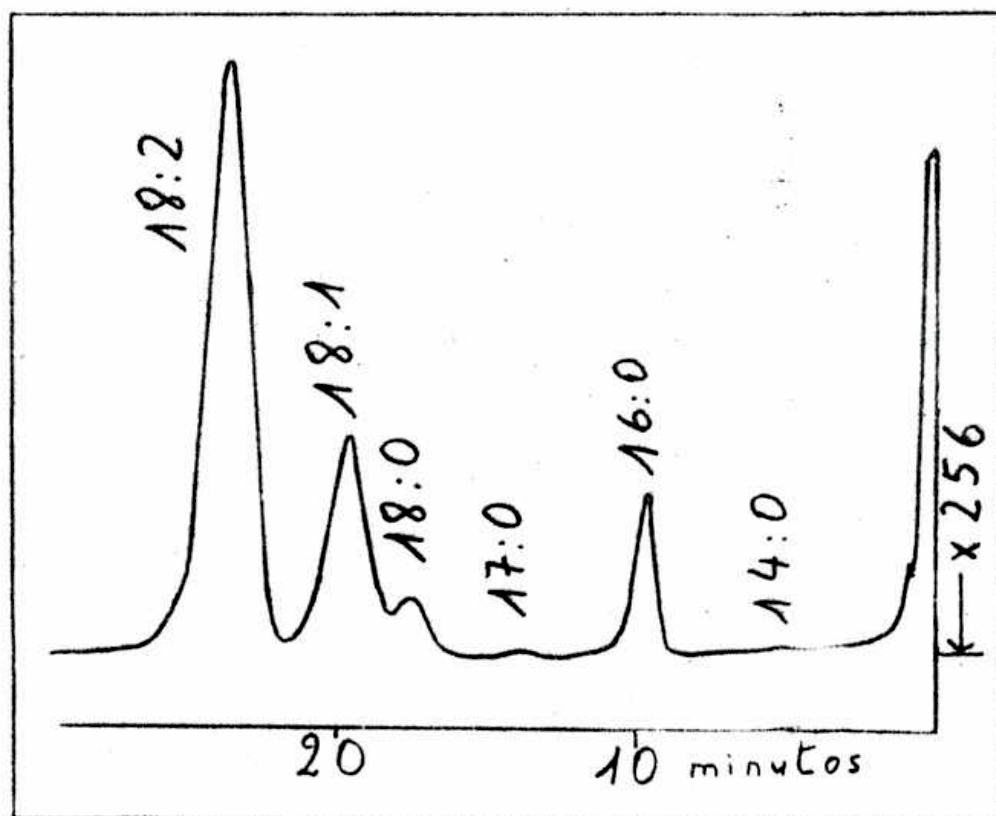


Fig.11- Esteres metílicos de los ácidos totales de aceite de se milla de melón

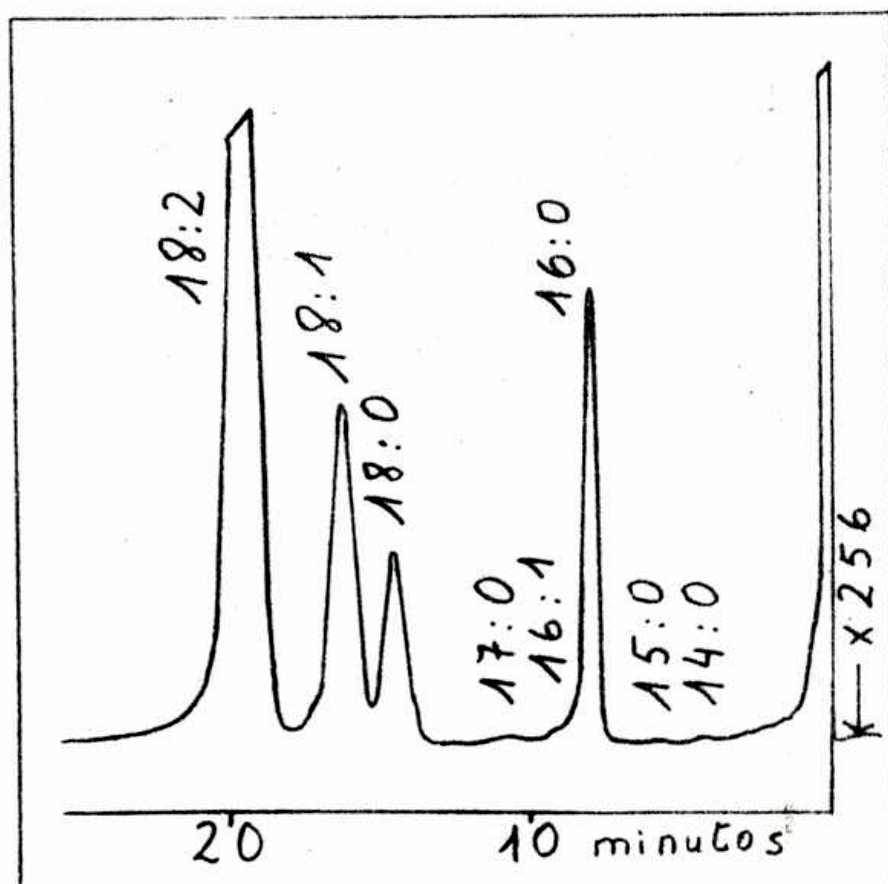


Fig.12- Esteres metílicos de los ácidos totales de aceite de se milla de sandía

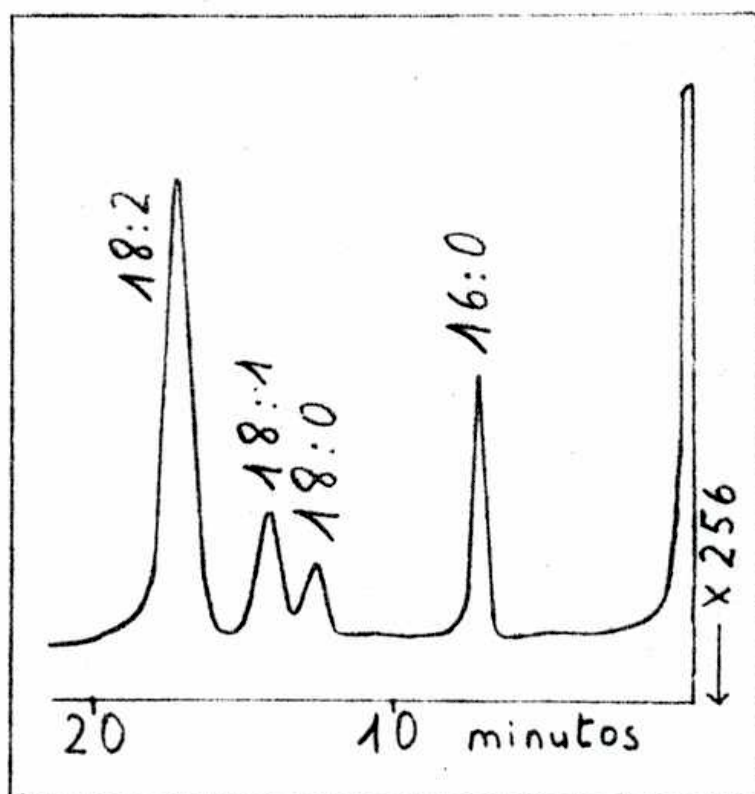


Fig.13- Esteres metílicos de los ácidos totales de aceite de semilla de esponja vegetal.

COMPOSICION EXHAUSTIVA DE ACEITE DE SEMILLA DE ZAPALLO VAR. INGLES-  
CROMATOGRAMAS C.G.L. DE LOS ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS TOTALES  
DE CADA FRACCION Y RESIDUO DE DESTILACION

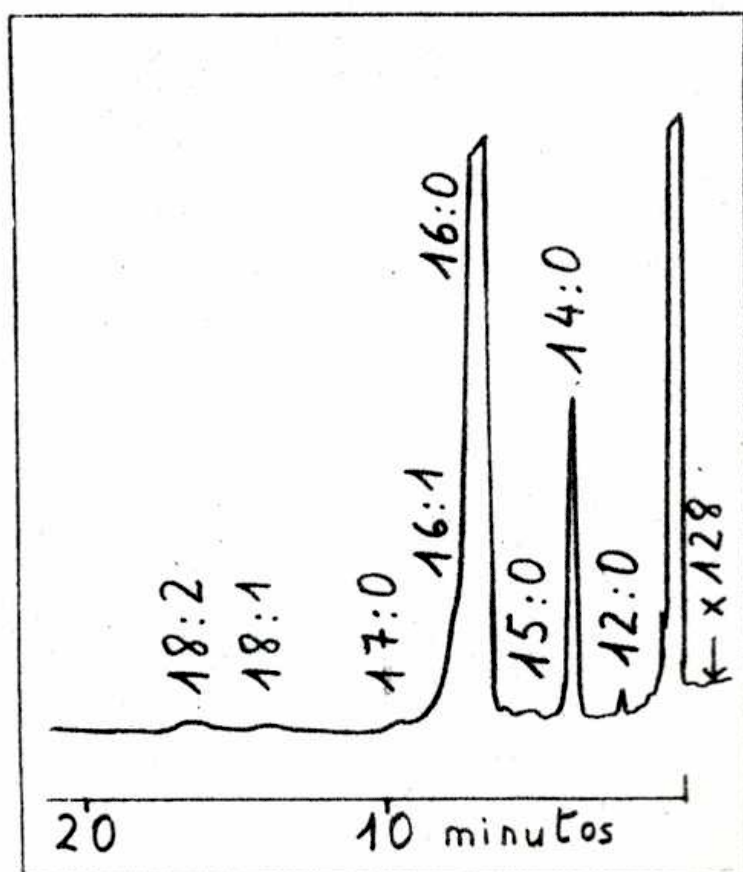


Fig.14- Fracción 1

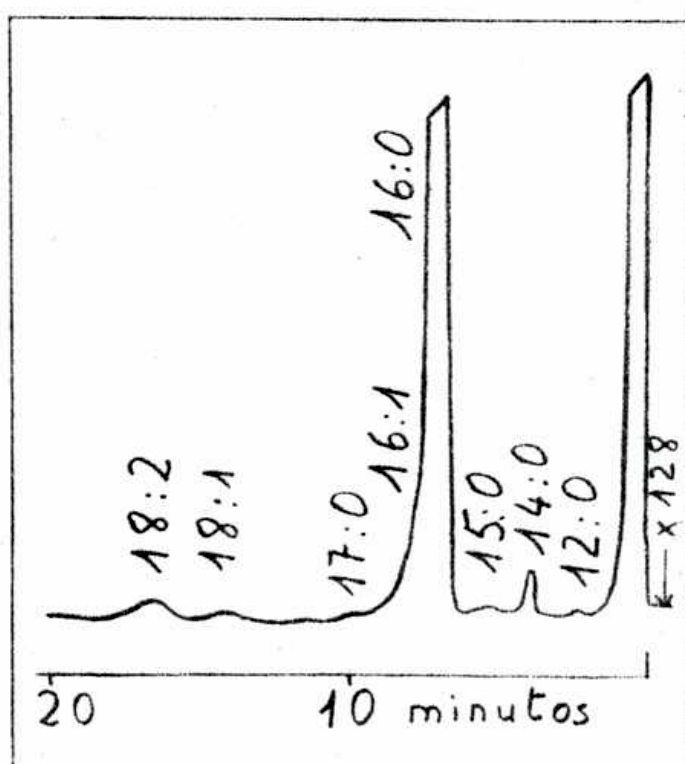


Fig.15- Fracción 2

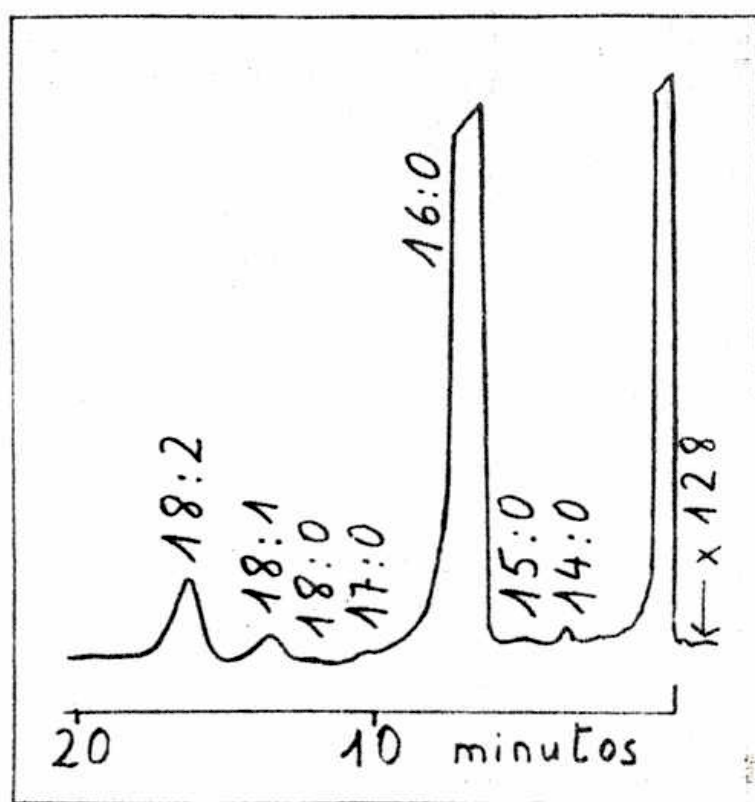


Fig.16- Fracción 3

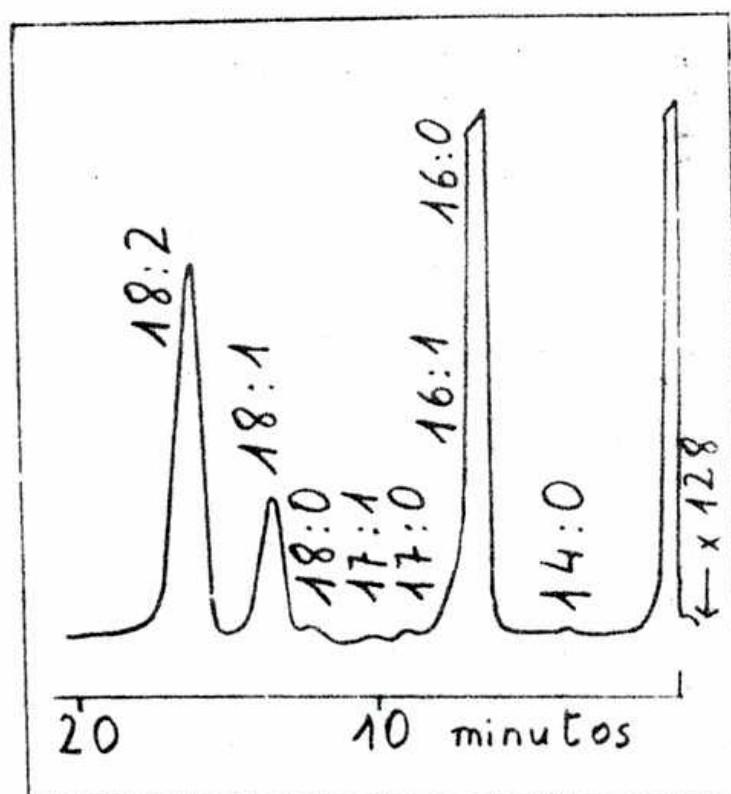


Fig.17- Fracción 4

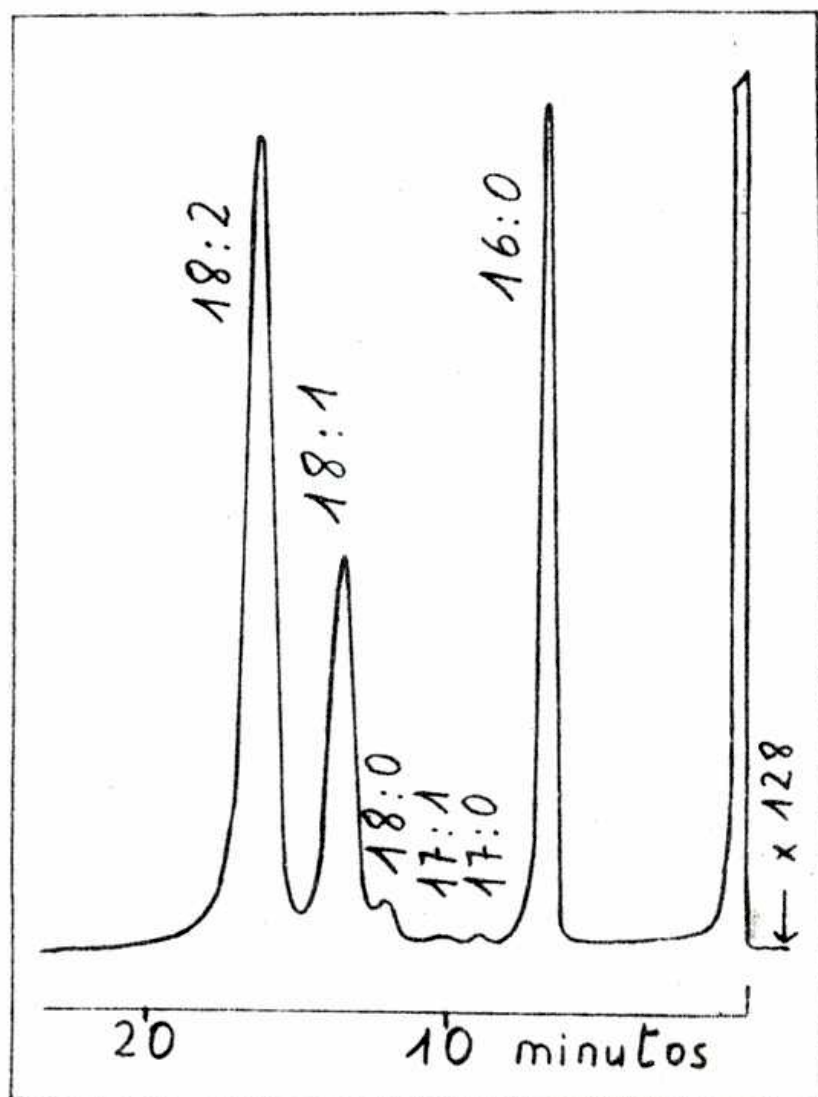


Fig.18- Fracción 5

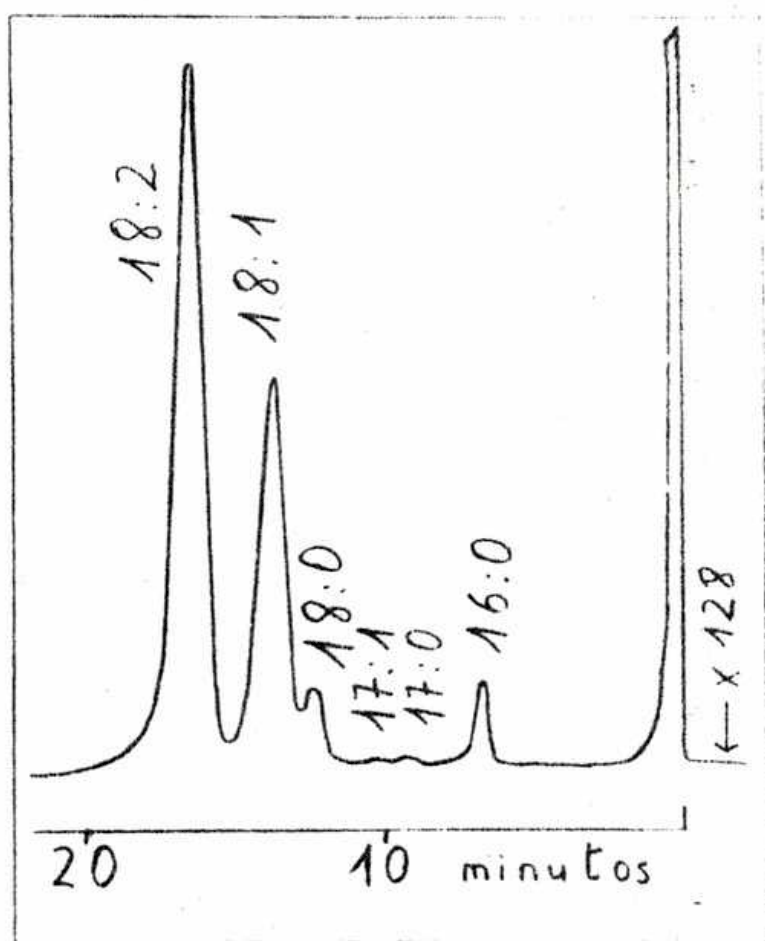


Fig.19- Fracción 6

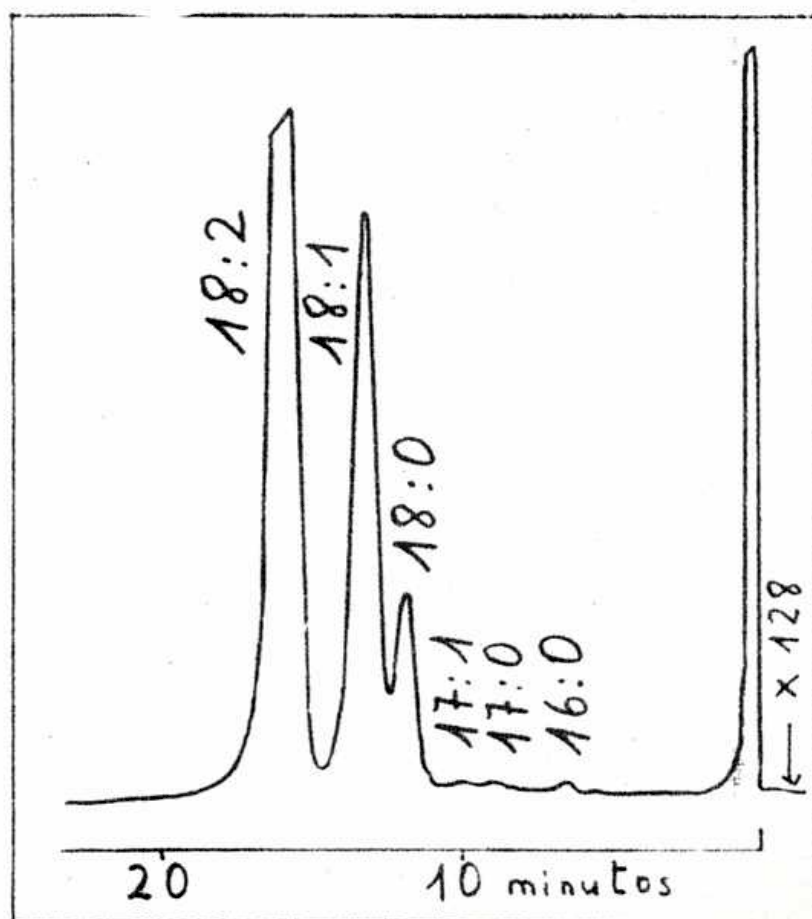
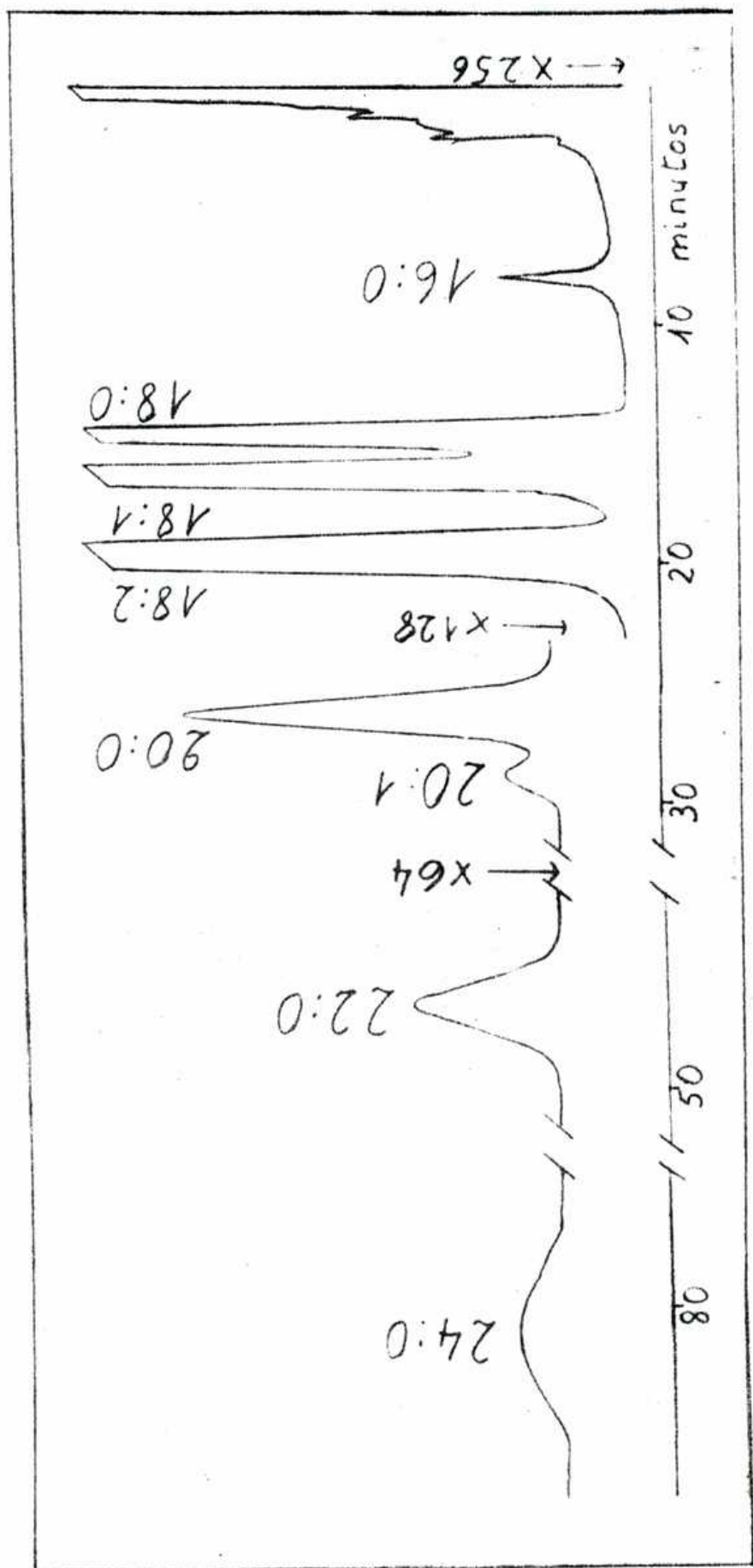


Fig.20- Fracción 7



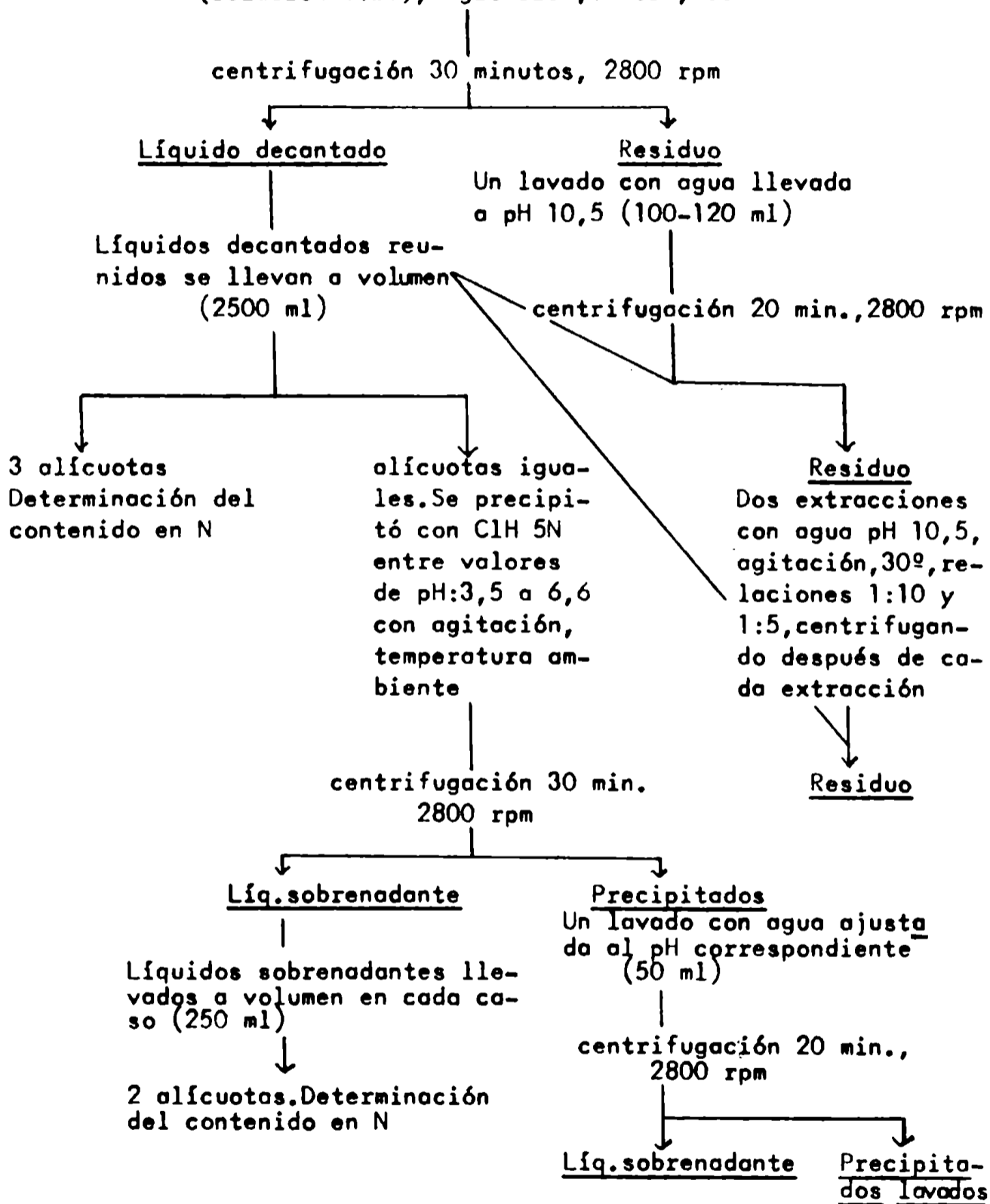


**Fig. 21-** Residuo

## Esquema N° 1

Extracción de proteínas a partir de harina de semilla de Cucurbitáceas. Precipitación a diferentes valores de pH (elección del pH isoeléctrico).

60 g de harina + 1200 ml de agua a pH 10,5 (con HONa 5N)  
(relación 1:20), agitación, 1 hora, 30°



## Esquema Nº 2

Aislamiento de proteínas a partir de harina de extracción

harina + agua a pH 10,5 (rel. 1:20), agitación, 1 hora, 30°

centrif. 30 min., 2800 rpm

Líquido decantado

Residuo

Un lavado con agua a pH 10,5

Líquidos decantados reunidos se llevan a volumen

centrif. 20 min., 2800 rpm

3 alícuotas  
Det. cont. N

Total remanente se ajustó a pH isoelectrico

Residuo

Dos extracciones con agua, pH 10,5, relaciones 1:10 y 1:5, agitación, 30°. Centrifugación después de cada extracción

centrif. 30 min., 2800 rpm

Liq. sobrenadante

Coágulo

(proteína)

Líquidos sobrenadantes a volumen

2 lavados acuosos a pH 5,0, centrifugando 12 min. c/vez

Residuo

Se seca a 100° hasta peso constante. Det. cont. en N

3 alícuotas  
Det. N total

Liq. sobrenadante

Coágulo lavado

3 lavados con etanol 96%. Centrifugación 8 min., 2800 rpm

Extractivos etanólicos reunidos

Coágulo de proteína purificado

Concentración en rotavapor, vacío parcial (45-50°)

12 hs. en desecador

Residuo

Etanol y agua remanente

Se seca en vacío hasta peso constante. (45°, 5 Torr)

Se toma por cloroformo, lleva a volumen y determina % de residuo, insaponificable, composición acídica y P lipídico

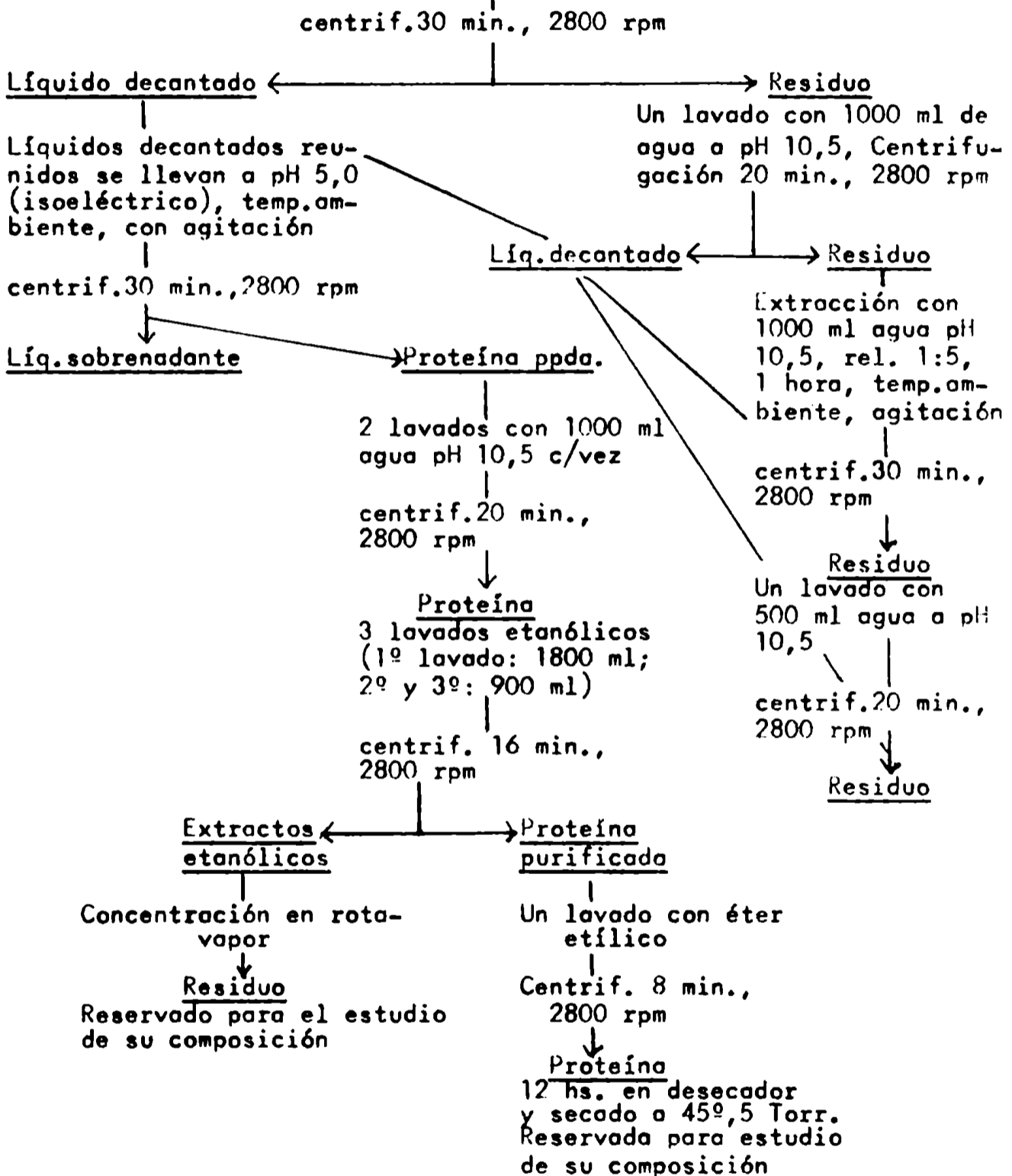
Valoración de N total y cenizas



## Esquema Nº 3

Aislamiento de proteínas de harina de semilla de zapallo en escala -  
macro de laboratorio

200 g de harina de semilla entera de zapallo + 4 l de agua a pH 10-10,5 (rel. 1:20), agitación, 1 hora, temperatura ambiente (20-25°)



P A R T E   III

CONCLUSIONES

El objeto de este trabajo ha sido, fundamentalmente, estudiar la composición general de la semilla de algunas especies cultivadas en la Argentina de Cucurbitáceas (Cucurbita pepo, Cucurbita maxima, Cucumis melo, Citrullus vulgaris y Luffa cylindrica), con especial referencia a sus rendimientos en aceite por extracción con hexano - técnico, al estudio de las características fisicoquímicas y composiciones acídicas de estos últimos, a los contenidos en proteínas de las harinas de extracción y al estudio de las condiciones óptimas - para el aislamiento de estas proteínas como paso previo al examen biológico correspondiente.

La experimentación llevada a cabo y las conclusiones logradas son las siguientes:

- 1- Desde que los contenidos en aceite son función del contenido en pepa de la semilla se determinaron los valores de la relación cáscara/pepa. La semilla de zapallo (siete variedades comerciales distintas: Inglés, Angola, Pink Banana, Pink Banana Jumbo, Red Hubbard, Criollo y Plomo Criollo) es la más rica en pepa - distinguiendo dos grupos, uno de alto contenido (71-82 %) y otro de menor contenido (49-60 %). Al primer grupo corresponde la semilla de las variedades comerciales Inglés, Angola y Criollo. - La semilla de melón y esponja vegetal contiene aproximadamente 50 % de pepa, mientras que la de sandía es ligeramente menor (43 %).
- 2- Los rendimientos en aceite por extracción con hexano oscilan para la semilla de zapallo entre 44 y 56 % con una mayor concentración de valores alrededor de 50 % expresados en % de pepa - tal cual. Los rendimientos para el caso de la semilla de melón, sandía y esponja vegetal acusan valores similares. Los aceites crudos de extracción de semilla de zapallo y esponja vegetal - presentan color verde variable (clorofila), no así los de melón

y sandía que son de color amarillo.

- 3- Los aceites crudos de semilla de las distintas variedades de zapallo presentan valores de índice de yodo comprendidos entre 96 y 125, no pudiéndose establecer al presente si las variaciones observadas responden a influencias varietales y/o climáticas. - Los de semilla de sandía y esponja vegetal son de índice de yodo muy similares (122-123) mientras que el de semilla de melón muestra el más alto valor (130). Estas cifras están comprendidas entre las registradas en la bibliografía.
- 4- El examen de las composiciones acídicas de los ácidos totales - (C.G.L. de los ésteres metílicos) conduce a los siguientes valores extremos (% de ácidos totales) para los aceites de semilla de zapallo: 16:0 12,9-19,6; 18:0 5,2-8,2; 18:1 15,5-56,8 y 18:2 22,5-61,4. La mayor concentración de valores en 16:0 se encuentra alrededor de 15 % y en 7 % la de 18:0. Las variaciones observadas en los contenidos en 18:1 y 18:2 justifica los ámbitos registrados para el índice de yodo de los aceites, no siendo posible afirmar si tales variaciones responden a efectos climáticos y/o varietales. El examen de composición C.G.L. sobre ésteres metílicos de ácidos totales revela la presencia de 0,3 a 0,8 % de un ácido hexadecenoico (16:1) y de concentración entre vestigios y 0,3 % para los siguientes ácidos: 13:0, 14:0, 15:0, 17:0, 20:0 y 17:1, así como de un ácido supuesto 16:0.

Los aceites de semilla de melón, sandía y esponja vegetal responden a los siguientes valores de composición acídica (las cifras corresponden al orden señalado): 16:0 8,7-12,4-15,1; - 18:0 5,9-8,7-7,2; 18:1 22,8-17,9-14,2 y 18:2 62,6-60,8-63,5. El de semilla de melón es el más pobre en ácidos saturados totales y el más rico en 18:1. Las concentraciones en 18:2, en todos los casos, son superiores al 60%, valor éste que corresponde al máximo observado en el aceite de semilla de zapallo. Estos aceites

contienen rastros de 14:0, 15:0, 17:0 y 16:1. Ninguno de estos aceites revela la presencia de 18:3.

- 5- Desde que la literatura registra antecedentes sobre la existencia de ácidos grasos con insaturación conjugada en aceites de semilla de algunos géneros de Cucurbitáceas, se determinaron - espectrofotométricamente en U.V. las concentraciones en ácidos trienoicos conjugados pre-existentes. En todos los casos se registran concentraciones muy bajas, expresadas en ácido punfíco: zapallo: 0,12-0,32, melón: 0,42, sandía: 0,38 y esponja vegetal: 0,18 % de ácidos totales, lo que confirma observaciones anteriormente registradas en la literatura.

Se concluye que estos aceites de semilla presentan características de composición acídica acordes con los deseables para aceites de uso alimentario. En especial los aceites de semilla de melón, sandía y esponja vegetal por su alta concentración en 18:2 y ausencia de 18:3 se comportan como "non yellowing drying oils".

- 6- La composición acídica determinada en forma exhaustiva por combinación de técnicas de destilación fraccionada en vacío de los ésteres metílicos de ácidos totales y el examen C.G.L. de las fracciones y residuo de destilación revela la presencia de varios componentes menores que incluyen ácidos saturados y no saturados desde  $C_{11}$  a  $C_{24}$ , según los casos.
- 7- Los aceites de semilla de zapallo presentan, en algunos casos, altos valores de índice de yodo de los insaponificables (140-175). Los contenidos en el hidrocarburo escualeno de estos aceites son también elevados (230-270 mg % g). Este hidrocarburo fue reconocido a través de su dodecabromoderivado. Por el contrario los aceites de semilla de melón, sandía y esponja vegetal contienen 70-165 mg % g de escualeno.

Los contenidos en esteroides totales responden a los siguientes valores: aceites de zapallo 107-428, melón 209, sandía 410 y esponja vegetal 224 mg % g respectivamente.

En general estos aceites son de bajos contenidos en tocoferoles totales: zapallo 9-70, melón 70, sandía 26 y esponja vegetal 24 mg % g.

Desde que la literatura indica que la semilla de zapallo podría constituirse en una fuente de importancia para la producción de proteínas de consumo humano, se consideró de interés el estudio de la composición general de las harinas de extracción de aceite en las variedades argentinas estudiadas, algunas de las cuales han sido indicadas como apropiadas para la deshidratación industrial de pulpas de frutos.

Los análisis mostraron que:

- 1- Las harinas de extracción de semilla libre de cáscara contienen 68 a 80 % de proteínas (Nx6,25) en base seca y menos del 3,5 % de fibra cruda. Estos valores señalan a estos productos como verdaderos concentrados proteínicos de posible utilización directa en la alimentación. Esto último estaría condicionado a la separación de cáscara y pepa en los procesos de industrialización de la semilla.
- 2- La extracción de aceites a partir de semilla entera molida conduciría a la obtención de harinas de menores contenidos en proteínas (alrededor de 50 %) cuyos tenores en fibra oscilarían alrededor de 30 %. Este último elevado valor sugirió la conveniencia de examinar las condiciones de aislamiento de proteínas de harinas de zapallo de semilla entera.
- 3- El aislamiento de proteína de harina de semilla entera de zapallo

llo comprendió: extracción a pH 10-10,5 (máxima extracción de nitrógeno total) mediante dos extracciones sucesivas en las relaciones harina:agua en peso 1:20 y 1:5 y precipitación al valor de pH isoelectrico (máxima precipitación 5,0). Tanto en la extracción como en la precipitación se trabajó a temperatura ambiente. La extracción solubiliza 80 a 85 % del nitrógeno total de la harina de partida y la precipitación alcanza el 70 % de este último valor.

- 4- Las proteínas precipitadas debieron someterse a un proceso de purificación para asegurar la obtención de proteínas prácticamente blancas y en forma de polvo liviano y uniforme por secado en vacío a no más de 45°. Este proceso comprendió lavados de las proteínas precipitadas con agua a pH 5,0 y lavados posteriores con etanol de 96° (extracción principal de lípidos asociados a las proteínas brutos precipitadas).
- 5- Las proteínas de harina de zapallo según lo expuesto responden a los siguientes valores analíticos: Pérdida a 100° (vacío) : - 4,84 %; Cenizas (500-550°): 0,20%; Nitrógeno (Kjeldahl): 16,38 %; Nitrógeno (en base libre de humedad y ceniza): 17,25 %; Fósforo total: 0,49 %; Fósforo de ácido fítico: 0,44 %.
- 6- De los extractivos etanólicos resultantes de la purificación de las proteínas de semilla de zapallo se aisló un material lipídico (1,10 % sobre proteína seca a 45°) que presenta los siguientes valores analíticos (sobre lípidos): Número de acidez: 85,0 mg HOK/g; Indice de saponificación: 189,5; Indice de yodo (Wijs): 86,6; Insaponificable: 10,14 %; Indice de yodo del insaponificable (Rosenmund): 100,8; Acidos totales (por saponificación): 74,09 %; Fósforo lipídico total: 0,92 % (como P). Asimismo se ha determinado (C.G.L. de ésteres metílicos) la composición aci

dica de los ácidos totales de estos lípidos.

- 7- Siguiendo un plan similar al operado para el caso de las proteínas de semilla de zapallo se examinaron las harinas de semilla de melón, sandía y esponja vegetal, observando los siguientes valores: pH de máxima extracción 10-10,5; pH de máxima precipitación (isoelectrico) melón 4,3; sandía 4,8 y esponja vegetal 5,0; N extraído % N total melón 85, sandía 77 y esponja vegetal 91 y N precipitado % N total melón 62, sandía 63 y esponja vegetal 69. Como en el caso de las proteínas de zapallo debieron operarse procedimientos similares de purificación (lavados acuosos y etanólicos) para asegurar la obtención de proteínas prácticamente blancas en forma de polvos uniformes y livianos. Los lípidos totales solubles en etanol fueron evaluados (% de proteína seca) y estudiados en su composición acídica (C.G.L.).

- 8- Los contenidos de nitrógeno, fósforo total (como P) y fósforo de ácido fítico (como P) % de las proteínas de harinas de melón, sandía y esponja vegetal son, respectivamente: Nitrógeno 16,9-17,0-16,1; Fósforo total 1,25-0,30-0,47 y Fósforo de ácido fítico 1,02-0,28-0,40. Estas cifras en lo que respecta a contenido de nitrógeno, al igual que en el caso de las proteínas de zapallo, resultan ser normales y satisfactorias.

Resulta de importancia señalar la concordancia existente en cada proteína mencionada, entre los valores de fósforo total y de fósforo de ácido fítico, lo que lleva a sugerir que en estas proteínas los contenidos en ácido fítico finales son los responsables del contenido en fósforo total de las mismas.



P A R T E      I V

L I T E R A T U R A C I T A D A

Literatura citada

- 1- T.W.WHITAKER y G.W.BOHN, Econ.bot., 4, 52 (1950)
- 2- J.M.WATT y M.G.BREYER-BRANDWIJK, "Medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa", E.& S.Livingstone Ltd., 2<sup>o</sup> ed., London, 1962, p.336
- 3- W.T.de KOCK, P.R.ENSLIN y K.B.NORTON, J.Chem.Soc., 3828 (1963)
- 4- S.REHM, P.R.ENSLIN, A.D.MEEUSE y J.H.WESSELS, J.Sci.Food Agric., 8, 679 (1957)
- 5- S.REHM y J.H.WESSELS, J.Sci.Food Agric., 8, 687 (1957)
- 6- W.P.BEMIS, J.W.BERRY, M.J.KENNEDY, D.WOODS, M.MORAN y A. J. - DEUTSCHMAN Jr., J.Amer.Oil Chem.Soc., 44, 429 (1967)
- 7- D.N.GRINDLEY, J.Sci.Food Agric., 1, 152 (1950)
- 8- A.M.ABU-NASR y W.M.POTTS, J.Amer.Oil Chem.Soc., 30, 118 (1953)
- 9- E.W.ECKEY, "Vegetable Oils and Fats", Reinhold Publ.Corp., New York, 1954, p.763
- 10- C.Y.HOPKINS, M.J.CHISHOLM y J.A.OGRODNIK, Lipids, 4, 89 (1969)
- 11- M.J.CHISHOLM y C.Y.HOPKINS, Can.J.Chem., 42, 560 (1964)
- 12- C.Y.HOPKINS y M.J.CHISHOLM, J.Amer.Oil Chem.Soc., 45, 176, (1968)
- 13- C.Y.HOPKINS y M.J.CHISHOLM, Can.J.Chem., 40, 2078 (1962)
- 14- F.R.EARLE, C.A.GLASS, G.C.GEISINGER e I.A.WOLFF, J.Amer.Oil Chem Soc., 37, 440 (1960)
- 15- A.M.GAD, F.OSMAN, Z.E.SHOEB y M.M.HASSAN, Grasas y Aceites, 15, 185 (1964)
- 16- T.P.HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural Fats", Chapman & Hall, 4<sup>o</sup> ed., London, 1964, p.251
- 17- D.K.CHOWDHURY, M.M.CHAKRABARTY y B.K.MUKJERHI, J.Amer.Oil Chem. Soc., 32, 384 (1955)
- 18- F.R.EARLE, E.H.MELVIN, L.H.MASON, C.H.VAN ETTEN e I.A.WOLFF, - J.Amer.Oil Chem.Soc., 36, 304 (1959)
- 19- P.GIRGIS y F.SAID, J.Sci.Food Agric., 19, 615 (1968)

- 20- T.THORBJARNARSON y J.C.DRUMMOND, Analyst, 60, 23 (1935)
- 21- V.C.MEHLENBACHER, "The Analysis of Fats and Oils", The Garrard Press Publ.Champaign, Ill., 1960, p.592
- 22- W.LANGE, J.Amer.Oil Chem.Soc., 27, 414 (1950)
- 23- M.W.DICKS, "Vitamin E content of Foods and Feeds for Human and Animal Consumption", Division of Biochemistry, Agr.Exp.Station, Univ.of Wyoming, Laramie, Bull.435, 1965, p.79
- 24- A.R.S.KARTHA, J.Sci.Food Agric., 15, 759 (1964)
- 25- I.DASSO y P. CATTANEO, Anal.Asoc.Quím.Argentina, 59, 35 (1971)
- 26- L.R.PARODI, "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería" vol.I, ACME S.A.C.I., Buenos Aires, 1959, p.821
- 27- M.H.BERTONI, G.K.de SUTTON, P.CATTANEO y J.G.GOMEZ ARTERO, Anal Asoc.Quím.Argentina, 54, 101 (1966)
- 28- M.H.BERTONI, G.K.de SUTTON y P.CATTANEO, Anal.Asoc.Quím.Argentina, 54, 89 (1966)
- 29- M.J.HORN, D.B.JONES y S.J.RINGEL, J.Biol.Chem., 138, 141 (1941)
- 30- K.J.CARPENTER, J.DUCKWORTH, G.M.ELLNIGER y D.H.SHREMPTON, J.Sci Food Agric., 3, 278 (1952)
- 31- Z.BOHAK, J.Biol.Chem., 239, 2878 (1964)
- 32- K.C.ZIEGLER, I.MELCHERT y C.LÜRKEN, Nature, 214, 404 (1967)
- 33- A.C.DE GROST y P.SLUNIP, J.Nutrition, 98, 45 (1969)
- 34- M.H.BERTONI y P.CATTANEO, Comunicación privada.
- 35- W.J.WOLFF, A.C.ELDRIDGE y G.E.BABCOCK, Cereal Chem., 40, 504 - (1963)
- 36- A.M.NASH, A.C.ELDRIDGE y W.J.WOLFF, J.Agric.Food Chem., 15, 102 (1967)
- 37- G.R.BARTLET, J.Biol.Chem., 234, 466 (1959)
- 38- R.CASARES y L.MORENO, Anal.Bromat.(Madrid), 3, 245 (1951)
- 39- W.F.BAUGHMAN y G.S.JAMIESON, J.Amer.Chem.Soc., 42, 152 (1920); T.P.HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural Fats", Chapman & Hall, 4<sup>a</sup> ed., London, 1964, p.258

- 40- C.ANTONIANI, L.GOLDBERG FEDERICO, A.DAGHETTA y T. BERRELLI, -  
Biochem. Appl., 12 (5), 168 (1965); C.A.64: 18024h
- 41- R.D.TEWARI y P.C.GUPTA, J.Proc.Oil Tech.Assn., India, 10, 25 -  
 (1954); T.P.HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution -  
 of Natural Fats", Chapman & Hall, 4<sup>a</sup> ed., London, 1964, p.258
- 42- J.L.RIEBSOMER y G.A.NESTY, J.Amer.Chem.Soc., 54, 1784 (1934)
- 43- H.P.KAUFMANN y H.FIEDLER, Fette u.Seifen, 46, 125 (1939); T. P.  
 HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural  
 Fats", Chapman & Hall, 4<sup>a</sup> ed., London, 1964, p.258
- 44- C.WOJNAROWICZ, Z.RUDZKA y P.KRASNODEBSKY, Tluszcz i Srodki -  
Piorace, 9 (6), 335, (1965); C.A.64: 18313 e
- 45- F.B.POWER y A.H.SALWAY, J.Amer.Chem.Soc., 32, 346 (1910); T. P.  
 HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural  
 Fats", Chapman & Hall, 4<sup>a</sup> ed., London, 1964, p.258
- 46- D.R.DHINGRA y P.NARAIN, J.Indian Chem.Soc., 22, 123 (1945); T.P.  
 HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural  
 Fats", Chapman & Hall, 4<sup>a</sup> ed., London, 1964, p.258
- 47- S.A.AHMAD y D.R.DHINGRA, J.Indian Chem.Soc., 22, 237 (1945); T.  
 P.HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natura  
 Fats", Chapman & Hall, 4<sup>a</sup> ed., London, 1964, p.258
- 48- D.K.CHOWDHURY y R.BAGCHI, Naturwiss, 43, 350 (1956); T.P.HILDITCH  
 y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural Fats", -  
 Chapman & Hall, 4<sup>a</sup> ed., London, 1964, p.258
- 49- D.R.DHINGRA y A.K.BISWASS, J.Indian Chem.Soc., 22, 119 (1945);  
 T.P.HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natur  
 Fats", Chapman & Hall, 4<sup>a</sup> ed., London, 1964, p.258
- 50- J.PIERAERTS, Bull.Soc.Pharmacol., 24, 204 (1917); T.P.HILDITCH ;  
 P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural Fats", Chapman  
 & Hall, 4<sup>a</sup> ed., London, 1964, p.258
- 51- C.M.TSAO y W.M.POTTS, J.Amer.Oil Chem.Soc., 29, 444 (1952)

- 52- G.RANKOV y A.POPOV, Fette u.Seifen, 48, 489 (1941); T.P.HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural Fats", - Chapman & Hall, 4<sup>o</sup> ed., London, 1964, p.258
- 53- A.J.NOTTE y H.W.VON LOESECKE, J.Amer.Chem.Soc., 61, 889 (1939)
- 54- W.M.L.CROMBIE, R.COMBER y S.G.BOATMAN, Biochem.J., 59, 309 (1955)
- 55- M.CARRIERE y A.COULIER, Compt.rend.Fac.Sci.Marseille, 1, 83(1947)  
T.P.HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural Fats", Chapman & Hall, 4<sup>o</sup> ed., London, 1964, p.258
- 56- M.M.CHAKRABARTY, D.K.CHOWDHURY y B.K.MUKHERJI, Naturwiss, 42, 3 (1955); T.P.HILDITCH y P.N.WILLIAMS, "The Chemical Constitution of Natural Fats", Chapman & Hall, 4<sup>o</sup> ed., London, 1964, p.258
- 57- M.H.BERTONI y P.CATTANEO, Anal.Asoc.Quim.Argentina, 47, 52 (1950)
- 58- H.E.LONGENECKER, J.Soc.Chem.Ind., 56, 199T (1939)
- 59- F.J.WELCHER, "The analytical uses of Ethylenediamine Tetraacetic acid", D.Van Nostrand Co.Inc., New York, 1958, p.226
- 60- R.U.MAKOWER, Cereal Chem., 47, 288 (1970)
- 61- E.L.WHEELER y R.E.FERREL, Cereal Chem., 48, 312 (1971)