

Tesis de Posgrado

Estudio de la composición química de la semilla y de los aceites de semilla de frutos cítricos de producción nacional : Harinas de extracción y aislamiento de proteínas

Tortosa, Alicia E.

1976

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Tortosa, Alicia E.. (1976). Estudio de la composición química de la semilla y de los aceites de semilla de frutos cítricos de producción nacional : Harinas de extracción y aislamiento de proteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1518_Tortosa.pdf

Cita tipo Chicago:

Tortosa, Alicia E.. "Estudio de la composición química de la semilla y de los aceites de semilla de frutos cítricos de producción nacional : Harinas de extracción y aislamiento de proteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1976.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1518_Tortosa.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"ESTUDIO DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LA SEMILLA Y
DE LOS ACEITES DE SEMILLA DE FRUTOS CITRICOS DE
PRODUCCION NACIONAL . HARINAS DE EXTRACCION Y
AISLAMIENTO DE PROTEINAS"

Tesis presentada para optar al título de
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1976 -

1578

Agradezco al Dr. Pedro Cattaneo , Director de Tesis , quien puso a mi disposición todo su saber y experiencia para la realización de este trabajo .

Particularmente agradecida a la Dra.
María Susana Vigo por su inestimable
colaboración y amistad con las cuales
se pudo llevar a cabo esta tesis .

Agradezco :

- A la Dra. María H. Bertoni la constante y desinteresada colaboración prestada durante la realización de este trabajo .
- A la Dra. Inge M. Thiel su colaboración .
- A mis compañeros de Bromatología su cordial amistad .

Agradezco también :

- Al Sr. Director Don Jorge A. Bovino y al Sr. Gerente Técnico Don Claus V. Meyer de la firma Pindapoy S.A.A.I.C. por la obtención y remisión de partidas de semillas de limón , mandarina , naranja y pomelo de la provincia de Entre Ríos .
- Al Dr. Alfredo Iacobacci y al Ing. Químico Ernesto Moll de la Cooperativa Agrícola Eldorado F.A. C.Y.T. ; Eldorado , Misiones , por la provisión de muestras de aceites de prensa de semilla de naranja y de limón así como de partidas de semillas de limón , mandarina , naranja y pomelo de Misiones .
- Al Sr. Director Ing. Agrónomo Américo Banfi de la Estación Experimental Agropecuaria Concordia (I.N. T.A.) , Concordia , Entre Ríos ; la remisión de partidas de semillas de variedades de limón , lima , mandarina , naranja , naranja agria , pomelo y toronja .
- Al Sr. Director del Instituto de Botánica Darwinion , Ing. Agrónomo Arturo Burkart y a la Srta. Simonne Karman por la provisión de frutos de "kinoto" y de "kumquat" .
- Al Dr. Jorge A. Miller y al Dr. J.W.Kesterson (Univ. de Florida , Citrus Station , Lake Alfred , Florida U.S.A.) por el importante aporte bibliográfico sobre subproductos y aceites de semilla de frutos cítricos .

A Guillermo , Axel y Georgina .

A mis padres y hermanos .

A Leonor .

- INTRODUCCION -

- 1)- El género Citrus (Rutaceae) .-
- 2)- Estructura macro y microscópica de frutos cítricos .-
- 3)- Contenido de semilla en frutos cítricos .-
- 4)- Generalidades sobre obtención industrial de jugos cítricos .
Subproductos de la industrialización de frutos cítricos .-
- 5)- Preservación de la "corteza" ; "dried citrus meal" y melazas.-
- 6)- Obtención industrial de la semilla . Aceites de semillas cítricas , sus características físico-químicas y composiciones acídicas .-
- 7)- Harinas ("meals") y otros subproductos residuales de la extracción de aceite seminal .-
- 8)- Pectinas y flavonoides de frutos cítricos .-

1)- El género Citrus .-

El género Citrus pertenece a la familia Rutaceae que comprende hierbas , arbustos y árboles que se desarrollan en ambos hemisferios , en zonas templadas , subtropicales y tropicales . Diversas informaciones señalan que esta familia comprendería 100 a 144 géneros y 900 a 1.600 especies . De acuerdo a Eckey¹ , es característico de estas plantas la presencia de glándulas conteniendo aceites esenciales en sus hojas , frutos o en otras partes del vegetal . Algunas especies tienen valor ornamental pero , las más conocidas y útiles pertenecen al género Citrus .

Según Winton y Winton² , las especies más comunes de este género son :

- 1.- Citrus sinensis Osbeck = C. aurantium var. sinensis Engl. = C.aurantium Risso ("naranja dulce") .
- 2.- Citrus aurantium L. = C. aurantium var. amara L. = C. aurantium var. Bigaradia Hook.f. = C. vulgaris Risso ("naranja agria o amarga") .
- 3.- Citrus nobilis Lour var. deliciosa Swingle ("mandarina o tangerina") .
- 4.- Citrus limonia Osbeck = C. medica var. limón L. = C. limonium Risso ("limón") .
- 5.- Citrus aurantifolia Swingle = C. limetta Auct. = Limonia aurantifolia Christ. ("lima") .
- 6.- Citrus medica L. = C. medica var. macrocarpa Risso ("citrón") .
- 7.- Citrus grandis Osbeck = C. aurantifolia var. grandis L. = C. decumana L. ("pomelo") .

Además menciona otras especies (Filipinas) a saber : C. micrantha Wester , Ganid ; C. Webberi var. montana Wester , Camisan ; Citrus sp. Lambog ; C. pseudolimonum Wester y Suan-

gi y C. hystrix var. torosa Wester . Según la misma fuente el "mandarino" y el "tangerino" habrían derivado por selección a partir de la especie C. nobilis Lour ("naranja real" o "King orange") , el primero originario de China y el segundo de la India .

De acuerdo con Dimitri y Parodi³ el género Citrus comprende unas 16 especies originarias de Asia y Malasia , mencionando las siguientes :

- 1.- Citrus medica ("cidra") .
- 2.- Citrus limon (L.) Burn f. = C. medica var. limón = C. limonia Osbeck = C. limonium Risso ("limón" , "limonero") .
- 3.- Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle = Limonia aurantifolia Christm. ("lima" , "limerio") .
- 4.- Citrus reticulata Blanco = C. nobilis Andrewes , no Lour. = C. deliciosa Ten. ("mandarino") .
- 5.- Citrus sinensis (L.) Osbeck = C. aurantium var. sinensis Linn. ("naranja dulce") .
- 6.- Citrus aurantium L. = C. vulgaris Risso = C. bigaradia Risso et Poiteau ("naranja agrio" , "naranja amargo" , "apepú") .
- 7.- Citrus paradisi Macf = C. máxima var. uvacarpa Merrill. ("pomelo" , "grapefruit") .
- 8.- Citrus taitensis Risso ("naranja de Otaheite" ; sería de origen híbrido entre la lima y el limón y el mandarino) .

C. limón es posiblemente originario del SE de Asia y en el país se cultivan especialmente las var. "Génova" , "Lisbón" , "Eureka" , "Villafranca" y "Gallego" , de pulpa bien ácida. Algunas se conocen como "limonero de las cuatro estaciones" , no siendo este caracter exclusivo de una sola variedad . El "limón rugoso" , utilizado como patrón , pertenece también a esta especie y se caracteriza por su fruto subgloboso y muy rugoso .

- C. aurantifolia ("lima" , "limero") es de origen asiático y sus frutos pueden utilizarse para los mismos fines que el limón , en especial los ácidos . La "lima de Rangapur" o "lima de Persia" se emplea como porta injero y es sensible a las heladas .
- C. reticulata ("mandarino") procede del SE de Asia y Filipinas . Es una de las especies de Citrus más cultivadas en el país , especialmente en el litoral . Entre las variedades más cultivadas figuran la "Común de Concordia" , la "King of Siam" , la "Campeona" o "Bergamota" (esta última no debe confundirse con la verdadera bergamota que corresponde a otra especie : Citrus aurantium subsp. bergamia Risso et Poit) y en menor escala , la "Malvasio" y la "Satsuma" . Según Swingle la mandarina "King of Siam" es la única variedad que corresponde a la descripción original de C. nobilis Lour. , posiblemente híbrido entre C. reticulata y otra especie del género Citrus .
- C. sinensis ("naranja dulce") es originaria de China e Indonesia . A esta especie pertenecen una gran cantidad de variedades de maduración temprana , intermedia y tardía , con o sin semillas , ombligo , etc. .
- C. paradisi ("pomelo") , es originaria de las Indias Occidentales . C. máxima Merrill = C. grandis (L.) Osbeck , llamado "pummelo" en América del Norte , prácticamente no se cultiva en el país .
- C. aurantium ("naranja agrio o amargo") , procede del SE de Asia . Es una especie muy cultivada en razón de la utilización de sus frutos , la extracción del aceite esencial de sus flores, hojas o brotes y como porta-injerto (esta última aplicación ha fracasado por ser susceptible a la podredumbre de las raicillas lo que ha provocado graves daños a los naranjales y mandarinales del país) . Con sus flores (las más perfumadas de los Citrus) se prepara la conocida "agua de azahar" y la "esencia

de neroli" , usada en perfumería . De sus brotes tiernos y frutos inmaduros se obtiene la "esencia de petit grain" , con la que se preparan perfumes . La variedad Ker-Gawl , llamada vulgarmente "quinoto" o "chinoto" , sería resultante de una mutación de C. aurantium , siendo muy cultivada en Italia por la utilización de sus frutos en confitería (no debe ser confundida con el "kumquat" , erróneamente llamado "quinoto" en el país) . Este último no integra el género Citrus , sino que pertenece al género Fortunella Swingle : Fortunella margarita (Lour) Swingle . El C. aurantium subsp. bergamia (Risso et Poit) Wight et Arn. ("bergamota") se cultiva especialmente en Sicilia (de la corteza de sus frutos se obtiene el aceite de bergamota) . En el país se cultiva escasamente .

2)- Estructura macro y microscópica de frutos cítricos.-

La demanda y aceptabilidad de los frutos cítricos por parte del hombre en la integración de su dieta depende , fundamentalmente , de su valor nutritivo , "flavor" , aroma y de ciertas características estéticas , como el color y la textura . Estas son función de la estructura y composición química de los frutos .

Exteriormente los frutos cítricos presentan una corteza que protege la pulpa (porción comestible) . La corteza o "peel" (en inglés) está constituida por una capa epidérmica delgada , el flavedo , que comprende numerosos sacos o glándulas que contienen aceite esencial , así como pigmentos . Estos no se distribuyen uniformemente en el flavedo , sino que se concentran en pequeños corpúsculos , los cromóforos (verdes en frutos jóvenes , amarillos o anaranjados en los maduros) .

Inmediatamente debajo del flavedo se encuentra una capa de células parenquimatosas , de aspecto esponjoso , el albedo . Las

células que lo constituyen no muestran cohesión significativa , son de forma irregular y presentan entre ellas amplios espacios intercelulares . Esta capa contiene , aproximadamente , 20 % de sustancias pécticas .

La pulpa del fruto consta de segmentos (lóculos) separados entre sí por membranas delgadas de tejido epidérmico . Los lóculos contienen numerosos sacos o vesículas plenas de jugo y las semillas . Las vesículas de cada segmento o lóculo están ligadas a su membrana por medio de finos hilos de longitud variable . En la parte central del tejido celular de cada vesícula se observan gotitas aceitosas . Las vesículas aplastadas o trituradas revelan (por observación microscópica) cromóforos amarillos cristalinos .

El eje central del fruto o corazón está constituido por tejido esponjoso , similar al del albedo . El conjunto de corazón más membranas de lóculos (residual de la obtención de jugo crudo) se conoce en inglés como "rag"^{2,4}. La Figura 1 muestra la estructura descripta .

Una información muy general sobre la composición de frutos cítricos en sus distintas partes estructurales surge de la correspondiente a naranjas y pomelos de Florida (Hendrickson y Kesterson)⁵ : Jugo 40-50 ; Albedo 15-30 ; "Rag" 20-30 y Semilla 0-4 % . En mandarinas no se observa corazón⁴.

3)- Contenido de semilla en frutos cítricos .-

Los valores de contenido en semilla , expresados en % de fruto , así como los de contenido acuoso de las mismas , son de importancia respecto de los rendimientos en aceite seminal . Para frutos de Florida (U.S.A) la literatura menciona los siguientes :

- Pomelo⁶ .- var. Marsh 0,20-0,44 % (base húmeda) , contenido acuoso 51,6-62,0 % .
- " Excelsior 2,9-5,8 % (b.h.) , agua % 54,5-70,1
- " Duncan 1,9-7,3 % (") , " " 55,0-82,3
- " Walters 2,4-7,3 % (") , " " 53,0-72,6
- " Shaddock 2,0-4,9 % (") , " " 50,0-52,0

El contenido de semilla , así como el acuoso disminuyen con el peso de los frutos dentro de cada variedad , es decir con el grado de maduración .

- Mandarina⁷ .- 0,6-3,2 % (b.h.) , agua % 40-57 . El número de semillas por fruto es función de la variedad .
- Naranja⁸ .- 0,4-3,4 % , con una mayor concentración de valores entre 1,4 y 2,6 % ; agua % 40-63 .
- Limón⁹ .- 0,37-2,06 % , con mayor concentración de valores entre 0,9 y 1,6 % ; agua % 47-55 . Como en el caso de mandarinas el número de semillas por fruto es función varietal .

Estos valores comprenden a los mencionados por Winton y Winton², donde se citan además , contenidos de semilla (b.h.) de 0-1 % de "lima" (California , Filipinas) y de 5-7 % para los de "naranja amarga" (Sicilia) .

4)- Generalidades sobre obtención industrial de jugos cítricos . Subproductos de la industrialización de frutos cítricos .-

La industrialización de frutos cítricos maduros y sanos hacia la producción principal de jugos reviste un desarrollo tecnológico considerable , en gran parte resultante del conocimiento estructural , químico y biológico de tales frutos .

Si bien existe una amplísima información de la literatura al respecto , la Figura 2 presenta un esquema simplificado a fin

de señalar los productos principales y residuales de esos procesos . Ha sido elaborado en base a las excelentes publicaciones de Hendrickson y Kesterson¹⁰ y del Departamento de Agricultura de los EE.UU de Norteamérica .

No es del resorte de esta Introducción referirnos a los jugos cítricos en sí , sino a la ubicación y aprovechamiento de los distintos subproductos en el proceso . Los subproductos deben ubicarse desde el comienzo del proceso , esto es , en las operaciones destinadas al aislamiento de los aceites esenciales (principalmente contenidos en la capa externa del "flavedo") . Sin entrar a considerar los detalles existen , fundamentalmente , tres sistemas a saber :

- a) Aquellos en los que la recuperación de aceite ocurre sobre la "corteza" ("rag" + albedo + flavedo) , luego de la separación del jugo del fruto (sistemas por prensado) .
- b) Extracción simultánea de jugo y aceite esencial (este último emulsionado en agua a partir del "flavedo" obtenido por raspado o por abrasión exterior del fruto) .
- c) Separación previa del "flavedo" (por raspado o abrasión) seguida de emulsificación acuosa de los aceites esenciales .

La producción de aceites esenciales depende de numerosos factores que se vinculan a los frutos , la especie y los procesos de aislamiento . En términos generales , los rendimientos observados en los EE.UU de Norteamérica son⁴ : limón (0,90-3,20), naranja (0,45-3,60) , pomelo (0,45-0,90) , lima (0,05-0,13) y mandarina (0,45-0,90 kg / ton. de fruto) .

Entre el 45 y 60 % del peso del fruto se estima el rendimiento en "peel" o corteza . Este producto , modernamente , se lo resuelve en semilla y en la suma de albedo , "rag" y semilla residual . Se considerarán los tratamientos de ambos por separado , comenzando por el último conjunto .

5)- Preservación de la "corteza" : "dried citrus meal" y melazas .-

Contiene alrededor de 80-85 % de agua⁴ , si bien y según sus integrantes y frutos de procedencia contendría entre 14,8 y 18,5 % de materia seca : proteína cruda (N x 6,25) 0,96-1,23 ; fibra cruda 1,38-2,22 ; extracto etéreo 0,32-1,83 ; cenizas 0,51-0,73 y extracto libre de nitrógeno 10,0-13,6 %¹⁰ . Pectinas , pentosanos , azúcares , ácido cítrico y flavonoides serían los principales componentes del extracto libre de nitrógeno⁴ .

En los EE.UU de Norteamérica y en el período 1920-1930 la producción de esos desperdicios no fué motivo de preocupación y se los incorporaba a los suelos , cubriéndolos con tierra para evitar la proliferación de insectos . Su valor en beneficio del suelo residía en su capacidad de engendrar "humus" . Su bajo contenido en nitrógeno (aprox. 0,14 %) era insuficiente para mantener la degradación microbiana , por cuyo motivo se lo mezclaba con cianamida (90-180 kg de cianamida cálcica / ton.) . La mezcla íntima y molida se la dejaba secar antes de su incorporación al suelo . Se comprobó que en ese período ocurría una pérdida gradual de amoníaco y se llegó a reforzar su tenor en nitrógeno con agregado además de cianamida , de nitratos , sulfato de amonio y superfosfatos (procesos patentados) .

Entre 1922 y 1927 la Estación Experimental Agrícola de California (U.S.A.) destacó el valor de esos productos residuales en la alimentación del ganado y en especial de vacas lecheras , en base a observaciones de granjeros que operaban en las cercanías de las plantas elaboradoras . Pero el alto contenido acuoso y la naturaleza perecedera del producto impedían su transporte económico a esos fines (el material fermentaba rápidamente , se acidificaba y favorecía la proliferación de moscas y olores desagradables) . Algunos procesos de "ensilado" no merecieron adopción amplia . Era lógico buscar la solución por des-

hidratación , a fin de permitir el estacionamiento y la distribución , pero el alto contenido acuoso no lo permitía .

Entre 1938 y 1951 numerosas patentes de los EE.UU de Norteamérica cubrieron esa preservación , fundándose en la consideración de la índole hidrofílica de las pectinas presentes en los desechos , que podía anularse por agregado de lejía de hidróxido de calcio , (desmetilación , precipitación de pectatos de calcio y liberación de agua por sinéresis , fácilmente eliminable en parte por drenado y/o prensado) . El producto , posteriormente secado , contenía 92,0 % de materia seca : cenizas 4,3; fibra cruda 13,0 ; extracto etéreo 3,5 ; proteína cruda (N x 6,25) 6,2 y extracto libre de nitrógeno 63,0 % , según un análisis típico⁴ .

En la práctica¹⁰ la "corteza" o subproducto se desintegra finamente al tiempo que se mezcla íntimamente con hidróxido u óxido cálcico en polvo (0,3-0,5 %) . Según la forma de tratamiento el tiempo de reacción oscila entre 5 y 30 minutos ("curado") en el cual el valor de pH , inicialmente alcalino , cambia a ácido (desmetilación de pectinas y salificación) . Se prensa en equipos continuos reduciéndose el contenido acuoso de 80-85 a 65-75 % y finalmente se seca en secadores rotativos hasta un valor de humedad de 6-8 % . Por enfriamiento en corriente de aire se separan tres tipos de productos finales que difieren en granulometría y algo en composición química : polvo o fino (la parte más liviana , arrastrada por el aire de enfriamiento , aprox. 1%) , un producto intermedio llamado "citrus meal" (aprox. 14 %) y el material grueso o principal conocido como "dried citrus pulp" (aprox. 85 %) .

Por concentración de los líquidos resultantes del prensado anterior se obtienen las "melazas de cítricos" . Los líquidos a concentrar contienen 9-15 % de sólidos totales , de los cuales

más de la mitad son azúcares . Es coloreado , turbio y con un valor de pH entre 5,0 y 7,0 . Además , contiene cantidades variables de aceite esencial residual . El tratamiento¹⁰ comprende una clarificación (eliminación de partículas insolubles) , una destilación "flash" que separa el aceite esencial residual (llamado "stripper oil") , esterilización térmica y concentración final (múltiple efecto) a 72° Brix . Un análisis típico es como sigue : Brix (72°) ; Azúcares totales 45 % (sacarosa 20,5 ; reductores 23,5 %) , Humedad 29,0 % , Proteína bruta (N x 6,25) 4,1 % ; Extracto etéreo 0,2 % ; Fibra cruda 0,0 ; Cenizas 4,7 % ; Glucósidos 3,0 % ; Pentosanos 1,6 % ; Pectinas 1,0 % y Valor de pH 5,0 . Además⁴ , su viscosidad es de aproximadamente 2.000 centipoises a 25° y contendría alrededor de 35 mg / kg de niacina ; 11 mg / kg de riboflavina y 10 mg / kg de ácido pantoténico . Entre los componentes minerales (% de melaza) se indican : potasio (K) 1,1 ; calcio (Ca) 0,8 ; hierro (Fe) 0,04 ; fósforo (P) 0,06 ; manganeso (Mn) 0,002 ; cobre (Cu) 0,003 ; sílice (SiO₂) 0,04 ; azufre (S) 0,17 y boro (B) 0,0006 .

Las harinas o "meals" se expenden como tales o en forma de "pellets" debiendo protegerse del ataque de ciertos insectos (escarabajos) : Oryzaephilus surinamensis y Lasioderma serricorne (F.) , a cuyos fines se recomienda el uso de una formulación insecticida (malathion) , con una tolerancia residual de 50 mg / kg . Estos productos son ricos en carbohidratos y en calcio pero pobres en fósforo y carotenos ; el contenido proteico y en grasa es bajo . La digestibilidad de las harinas oscila entre 81 y 83 % y la parte de hidratos de carbono (extracto libre de nitrógeno) alcanza valores de digestibilidad entre 88 y 92 % . La fracción proteica de estos productos es de baja digestibilidad (25-37 %) .

Tanto el contenido de proteína cruda , como la composición

en aminoácidos esenciales de una pulpa desecada de citrus , fueron determinados por Lyman , Kuiken y Hale¹¹ . La composición en diez aminoácidos considerados como esenciales (expresados en g / 10 g de N) de estos autores fué : arginina 4,81 ; histidina 1,55 ; isoleucina 3,10 ; leucina 5,33 ; lisina 3,44 ; metionina 1,37 ; fenilalanina 3,09 ; treonina 3,09 y valina 4,30 .

La composición cualitativa en aminoácidos de estas proteínas había sido establecida previamente por Townsley , Joslyn y Smith,¹² quienes aislaron las proteínas de corteza y de cromóforos de naranja var. "Valencia" , que sometieron a hidrólisis ácida y alcalina , identificando los aminoácidos por cromatografía en papel . Señalaron como pH isoeléctrico el valor de 4,7 y verificaron un contenido en N en la de cromóforos de 15,2 % y de sólo 4,3 % en el aislado proteico de la corteza (este último valor es significativamente bajo y lo atribuyeron a una asociación de proteína con hidratos de carbono , presumiblemente pectinas) .

Parece indudable que el bajo valor de digestibilidad (25-37 %) señalado en la literatura para la fracción proteica , deba atribuirse a fenómenos de desnaturalización que ocurrirían principalmente en el proceso de secado de las cortezas prensadas , que tiene lugar en corriente de aire caliente con riesgos de entrecruzamiento en base a peroxidación de lípidos (semilla) y aceites esenciales que integran este material .

Estas harinas se emplean principalmente en la alimentación de ganado lechero y su rendimiento es similar al de otras pulpas desecadas como la de remolacha azucarera . Se menciona que no son tan satisfactorias en la alimentación de cerdos y pollos jóvenes , si bien no afectan el crecimiento de los polluelos y la producción de huevos . Su principal destino es la integración de dietas balanceadas para uso animal .

Las "melazas" son de sabor amargo fuerte (presencia de na-

ringina) pero ello no impide su uso en mezclas forrajeras . En Florida (U.S.A.) es uno de los nutrientes energéticos más baratos para el ganado . Se las ha usado para producir bebidas alcohólicas por fermentación , como fuente de hidratos de carbono para el desarrollo de levaduras , en la producción de ácido láctico , vinagre de citrus ; 2,3-butilenglicol , ácido cítrico , riboflavina , metano y otros productos . Además se las ha empleado como materia prima para la extracción , concentración y secado de mezclas de bioflavonoides cítricos^{10,13} .

La Figura 3 reproduce la industrialización de los desechos de la expresión de pomelo en Florida (U.S.A.) e ilustra sobre el balance de materiales .

6)- Obtención e industrialización de la semilla . Aceites de semillas cítricas , sus características fisicoquímicas y composiciones acídicas .-

Normalmente las semillas de cítricos se separan de la corteza , "rag" , pulpa , membranas de lóculos y de vesículas . La semilla así obtenida contiene 55-60 % de agua y se encuentra mojada en los jugos de los frutos respectivos . Se siguen distintos procedimientos para su preservación y así Nolte y von Loe-secke¹⁴ las acumulaban en un tanque con agua , estacionando por 24 a 48 horas con agregados de fosfato tricálcico a fin de provocar la fermentación de jugos y azúcares residuales (destrucción de azúcares) . Luego de un proceso de drenado , ocurría un tratamiento con vapor (ruptura de las cáscaras) lo que llevaba a un tenor acuoso de la semilla de 40-45 % . Finalmente y en secadores rotativos se obtenía semilla con 2,5-3,0 % de agua , que se estacionaba hasta su expresión .

En otros tipos de procesos , la semilla se lava con solu-

ciones de Ca(OH)_2 y seca en secadores a fuego directo hasta 8 % de contenido acuoso¹⁰ .

a)- Aceites de semillas cítricas .-

Aparentemente la producción de aceite de semilla de cítricos en los EE.UU de Norteamérica ocurrió , durante muchos años , a través de sistemas de prensado , posteriormente complementados por extracción con hexano de los "expellers" y tortas que normalmente retenían 8 a 19 % de aceite¹⁴ .

Durante los últimos 70 años la literatura registra abundante información sobre características físico-químicas y composiciones acídicas de aceites de semilla de frutos cítricos . Una actualización de esa información fué realizada por Braddock y Kesterson¹⁵ . Mucha de la información inicial sobre el tema data de principio de siglo y gran parte de la revisión que se presenta en esta Introducción no ha podido ser consultada en forma directa (sobre todo para las publicaciones iniciales) que figura mencionada en diversas obras^{2,16,17,18,19,20} . Inicialmente esos trabajos cubrían la información para índices de saponificación , de yodo (muchos a través del método de Hanus) , de Reichert-Meissl y de Polenske y en algunos casos valores de rendimiento en aceite (sobre semilla seca al aire , entera o libre de cáscara) , obtenidos por prensado y/o extracción . La Tabla 1 resume esa información .

Valores extremos de características físico-químicas sugeridas más recientemente²¹ figuran en la Tabla 2 . Valores de índice de yodo de aceites de semilla de citrus de Florida (EE.UU de Norteamérica) comprenden los siguientes límites :

- Limón (107,6-113,2 ; de 39 selecciones)⁹
- Mandarina (99,7-103,7 ; 8 variedades)⁷
- Naranja (91,8- 97,0 ; 4 ")⁸
- Pomelo (96,0-101,0 ; 4 ")⁶

Sobre los contenidos en algunos componentes menores (tocoferoles , esteroles) de estos aceites de semilla de cítricos , la información de la literatura es sumamente escasa y será mencionada más adelante en la Discusión de la Parte Experimental .

Con relación a los valores de composición acídica de aceites de semilla de cítricos deben tenerse en cuenta , principalmente , los registrados en la literatura con posterioridad a 1960 (exámenes por cromatografía de partición gas-líquido y por espectrofotometría en U.V.) .

No obstante , desde 1930 comenzaron a publicarse valores de composición acídica de aceites de semilla de diversos cítricos , que fueron compilados por Hilditch y Williams²² y al que se añadió el primer estudio de composición acídica de aceite de semilla de mandarina debido a Swift²³ . La Tabla 3 proporciona esos valores y la Tabla 4 resume los valores extremos para aceites de semilla de cítricos de Florida (U.S.A.) , mostrando también (entre paréntesis) los ámbitos de valores más frecuentes .

Una consideración breve de esas cifras de composición lleva a señalar a estos aceites como semejantes a los de maní y de algodón , si se tienen en cuenta los altos valores de contenido en ácidos saturados totales (principalmente 16:0) . Sin embargo , difieren de estos últimos por sus contenidos significativos en 18:3 (3-12 %) , una característica encontrada en los aceites de semilla de especies de Rutáceas registrados en la literatura²² . Una discusión más amplia de valores de composición acídica figura en la Discusión de este trabajo .

7)- Sobre las harinas y otros subproductos de la obtención de aceite de semilla .-

La producción de aceite de semilla de cítricos ha sido prác-

ticamente como se ha dicho , por procesos de prensado y/o extracción por solventes . En el primer caso , se obtienen las llamadas tortas o "expellers" y en el segundo , las harinas o "meals" . Una información de la literatura sobre la composición general de semillas enteras de cítricos² , ha permitido calcular los valores de composición general de harinas de extracción (en base libre de humedad y de materia grasa) . La Tabla 5 resume esos valores y a otros logrados de otras publicaciones , recalculados en la misma forma^{10,15} . La Tabla 6 informa valores de composición expresados en la misma forma para partes de semilla entera. Surge que las harinas de semilla entera son fuentes que contienen entre 21 y 32 % de proteína cruda (N x 6,25) , siendo ricas en hidratos de carbono (extracto libre de N) con valores entre 36 y 40 % . Los contenidos en fibra cruda de esos productos son muy elevados (24-37 %) . También se observa que los contenidos en proteína cruda se incrementan notablemente (48 %) cuando se opera sobre semilla libre de cáscara , al tiempo que se observa una notable disminución del contenido en fibra (7,6 %) desde que ésta es componente principal de las cáscaras (49-53 % de las mismas) , que resultan de muy bajo contenido proteico (alrededor del 6 %) .

Las harinas de semillas cítricas son tan valiosas como las de algodón respecto a los requerimientos proteicos para el crecimiento de novillos con requerimientos calóricos satisfechos . Sin embargo , son dañosas para los cerdos cuando integran el 10 % de la ración total . En la alimentación de corderos con dietas cuya fracción proteica comprende el 88 % de harinas de semillas cítricas o de soya , se han encontrado idénticos valores biológicos y de digestibilidad . Las harinas desecadas de semillas cítricas contienen un factor tóxico para la cría de aves , que puede ser eliminado por extracción por solventes y que ha sido

identificado como limonina , el principio amargo de la semilla . Actualmente las harinas de semillas cítricas , se emplean mezcladas con "dried citrus pulp" en la alimentación del ganado . Las cáscaras se comercializan como fertilizantes , si bien se ha sugerido que que tienen un valor similar al de las cáscaras de semilla de algodón en la alimentación del ganado^{10,15} .

Recientemente Braddock y Kesterson²⁵ investigaron la composición en aminoácidos de las harinas de semillas de cítricos . Estas , previamente desgrasadas , se usan comúnmente como suplemento para dietas animales y tienen distintos usos potenciales en la industria alimentaria . Los datos de la Tabla 7 comparan la composición en aminoácidos de harinas de semilla de naranja y pomelo observándose diferencias notables . Las cantidades de cistina y metionina son 1,5 veces mayores en la harina de pomelo que en la de naranja , pero ésta contiene una 1,6 veces más triptofano que la harina de semilla de pomelo . Comparando los aminoácidos de las harinas de semillas de cítricos de la Tabla 7 con los aminoácidos de la harina de soja , se aprecia que las harinas de cítricos contienen mayor cantidad de glicina , cistina , metionina y triptofano (naranja) pero menos de la mitad de lisina que la de soja (siendo estos 5 aminoácidos importantes en la nutrición animal) . El contenido en lisina es también menor que en semilla de algodón y harina de maní . Los valores de aminoácidos azufrados totales en harinas de semillas cítricas son mayores que en proteínas de otras fuentes más comunes (nueces y granos) , excepto caseína , huevos enteros o harina de pescado .

En diversas partes de las plantas de frutos cítricos como semillas , corteza y raíces , fueron hallados ciertos compuestos de sabor amargo . El primero que se aisló (1841) a partir de limón fué denominado limonina y los que se conocieron posterior-

mente fueron llamados limonoides . Estos principios amargos son triterpenos degradados de 26 átomos de C y fueron aislados de plantas de las familias de las Rutáceas y Meliáceas .

Las semillas de cítricos se caracterizan por tener un alto contenido en aceite , pocas o ningunas cumarinas y un contenido en limonoides casi constante²⁶ . En la Tabla 8 se ve que el componente mayor es la limonina , con otros tres presentes en cantidades pequeñas y algo variables . Los datos disponibles hacen posible unas pocas generalizaciones de la distribución de los limonoides en las Rutáceas : a) cuando los limonoides aparecen en uno de los miembros del género , entonces todas las especies de ese género contienen limonoides ; b) el estado de oxidación de todos los limonoides es del mismo nivel , para una dada especie o género .

8)- Pectinas y flavonoides de frutos cítricos .-

No todos los subproductos resultantes de la industrialización de frutos cítricos se destinan a la producción de "dried citrus pulp" , melazas , aceites y harinas de semillas . Como se ha expresado , la capa externa de flavedo proporciona la mayor parte de los aceites esenciales de cítricos , tema de gran importancia industrial sobre el que existe una amplísima información bibliográfica que , por su especificidad , no forma parte de esta Introducción .

En cambio , buena parte de la corteza y del "rag" se destinan a la producción de sustancias pécticas para uso alimentario .

La producción de pectinas en base a subproductos (corteza , corazón y membranas de lóculos) de la industrialización de frutos cítricos , es de suma importancia en algunos países como los

EE.UU de Norteamérica donde en 1965 se produjeron 2.500.000 kg de pectinas a partir de esos materiales . Sin duda las pectinas de cítricos siguen a las de manzana en orden de producción .

El grupo de sustancias pécticas comprende varios tipos de productos que se diferencian según su grado de dispersibilidad en agua , (desde las totalmente insolubles hasta las de máxima solubilidad) , dependiendo de ello de aspectos estructurales (grado de metoxilación y grado de polimerización) y de otros ajenos a las pectinas mismas , cuales son el valor de pH y concentración de sacarosa en los medios de dispersión .

En los frutos cítricos se encuentran todos los tipos mencionados en proporciones que en cierta medida , son función del grado de maduración . El aislamiento de esos distintos tipos a diferentes grados de maduración y a partir de distintas partes constituyentes del fruto , ha sido motivo de muchos estudios , pero en la práctica industrial los métodos de obtención involucran tratamientos que modifican las estructuras preexistentes , tratándose lograr productos finales con apropiados grados de gelificación siendo ello , principalmente , dependiente de la magnitud de los procesos de desmetilación que pueden ocurrir y que se gradúan convenientemente .

Los contenidos en sustancias pécticas de pomelos y naranjas de Florida , han sido estudiados estableciéndose : 1) el % de sustancias pécticas totales en el albedo y en la pulpa permanecen constantes durante el período de crecimiento ; 2) el % de pectinas hidrosolubles aumenta en esos tejidos hasta un máximo que ocurre cuando se observa disminución del contenido de sustancias pécticas totales y 3) el ritmo de conversión de protopectinas en pectinas solubles es mayor en la pulpa que en el albedo . Los contenidos en pectinas totales de corteza de pomelos de California alcanzan a 3,9 % como pectato de Ca , citándose valores

3,19 y 3,56 % (como pectato de Ca) en corteza y en "rag" , respectivamente .

En base seca el "rag" de mandarinas (var. "Dancy") , de naranjas (var. "Valencia" y "Pineapple") y de pomelos (var. "Duncan") fueron los subproductos de mayores contenidos pécticos . En naranja var. "Hamlin" y "Temple" el mayor contenido se observó en albedo , mientras que en pomelo var. "Marsh" lo fué el flavedo .

Las pectinas extraídas de membranas de naranja var. "Valencia" fueron las de mejor rendimiento , pureza , grado de gelificación y viscosidad relativa . Los grados de gelificación de las pectinas aisladas decrecieron ligeramente con el grado de maduración para luego incrementarse . Los valores promedio de grados de gelificación para pectinas aisladas de corteza , membranas y sacos de jugo fueron 206 ; 314 y 222 respectivamente . Las pectinas aisladas de semillas no mostraron gelificación significativa .

Sin entrar a considerar en detalle los procedimientos de aislamiento de sustancias pécticas de origen cítrico , se informa que la industria produce pectinas de alto contenido en metoxilo (6,8-11,3 % , en base seca) y pectinas de bajo contenido en metoxilo (2,5-5,0 %) . De los mismos subproductos y según los tratamientos , se obtienen ambos tipos , siendo el grado de desmetilación operado el determinante de ellos (estos procesos impiden , en lo posible , la despolimerización de las cadenas galacturónicas) . En síntesis , los procesos operan sobre subproductos molidos , con inactivación de enzimas pécticas , procesos de extracción , precipitación por solventes miscibles en agua con aislamientos de precipitados , redisolución , reprecipitación , etc. hasta eliminación de otras sustancias precipitadas y finalmente secado . Otros procedimientos precipitan

las pectinas por agregado de sales de metales polivalentes (Ca^{2+} , Al^{3+}) en base a los grupos carboxilos no metoxilados , recuperándose finalmente las pectinas por descomposición ácida de las sales insolubles formadas^{4,10,24} .

Otro aspecto que merece considerarse , es el referente al grupo de sustancias conocidas como flavonoides presentes en frutos cítricos . Estos compuestos se obtienen industrialmente de la corteza y tienen importancia tanto en la industria farmacéutica como en la elaboración de bebidas , confituras y mermeladas .

Se encontraron más de 30 flavonoides en el género Citrus , el cual es una fuente rica de dos compuestos importantes : hesperidina y naringina . Los flavonoides están clasificados en flavonas , flavanonas , isoflavonas , etc. de estructuras químicas determinadas . Un pequeño grupo dentro de los flavonoides comprende compuestos con actividad fisiológica y bioquímica . Estos compuestos , tal como la hesperidina , están clasificados como bioflavonoides . La rutina y sus flavanonas derivadas como la hesperidina y el eriodictiol , demostraron poder disminuir la fragilidad de los capilares sanguíneos en cobayos y se pensó que estas sustancias podían actuar en los humanos como vitaminas . Surgió el término de vitamina P para estos compuestos , pero se demostró que tenían más actividad farmacológica que vitamínica . A varios de los presentes en cítricos , menos conocidos , se les atribuyen propiedades particulares . Así , la tangeretina tendría alta potencia citostática contra el "zebra fish embryo" , mientras que la nobelitina presentaría fuerte actividad antiinflamatoria . Ambos compuestos han sido considerados en diversos estudios oncológicos²⁷ . La Tabla 9 resume la distribución de estos flavonoides en el género Citrus .

Posteriormente Tatum y Berry²⁸ estudiaron los flavonoides en naranja var. "Valencia" y mandarina var. "Robinson" . La Tabla 10 compila los datos obtenidos .

- DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL -

- 1)- Producción de frutos cítricos en el país .-
- 2)- Características de la semilla y de los aceites de semilla de frutos cítricos argentinos .-
 - a) Materia prima.-
 - b) Relaciones cáscara/pepa en semilla . Rendimiento en aceite (hexano) . Características físico-químicas y componentes menores de los aceites seminales .-
- 3)- Composiciones acídicas de los aceites de semilla .-
- 4)- Composiciones exhaustivas de los aceites de semilla .-
- 5)- Examen C.G.L. de las fracciones de esteroides .-
- 6)- Estudios sobre aceites de semilla de otros cítricos y de "Fortunella margarita (Lour.) Swingle" ("kumquat") .-
- 7)- Estudios de composición de harinas de extracción .-
 - a) Valores de composición general .-
 - b) Composición en hidratos de carbono .-
- 8)- Aislamiento de proteínas de una harina de extracción mezcla .-
 - a) procedimiento de obtención .-
 - b) Análisis del aislado proteico .-
 - c) Examen analítico de los extractivos etanólicos del coágulo proteico .-

1)- Producción de frutos cítricos en el país .-

La producción de los frutos cítricos en el país es sumamente importante desde que la estimación para el bienio 1973/1974 alcanzó la cifra de 1.546.000 ton. métricas , repartidas así : limón 306.000 ; mandarina 230.000 ; naranja 833.000 y pomelo 177.000²⁹ .

La Tabla 11 resume los valores de esa producción por provincias . Los totales para fruto cítrico del bienio considerado registraron un sensible aumento respecto de los observados como valores promedio para el decenio 1963/1974 (siendo el incremento relativo : limón 103,4 ; mandarina 21,3 ; naranja 17,5 y pomelo 62,5 %) .

La Tabla 12 resume la producción de los mismos frutos cítricos para el período 1972/1973 e incluye la parte sometida a industrialización . Surge que el pomelo es el de mayor grado de industrialización seguido por limón , naranja y finalmente mandarina .

Una información mayor acerca de los distintos tipos de productos y subproductos resultantes de la industrialización de frutos cítricos en el país , así como cifras referentes a exportación durante el año 1973 de productos (jugos) y de subproductos (cortezas desecadas , forrajes para ganado y aceites esenciales) por países y sus valores en dólares americanos , ha sido suministrada por la Asociación de los Productores de Frutas Argentinos para el año 1973 .

2)- Características de la semilla y de los aceites de semilla de frutos cítricos argentinos .-

Al presente no se dispone , oficialmente , de cifras referentes a la producción anual de semilla de frutos cítricos en

el país . En la Introducción se ha hecho referencia a los contenidos en semilla de los distintos tipos de frutos cítricos (valores tomados de la literatura) , así como a la producción de aceites de semilla y de tortas , "expellers" o harinas residuales de extracción .

Si bien (tal como se ha informado en la Introducción) existe un conocimiento suficientemente amplio de esos dos principales productos de la industrialización de las semillas cítricas, no puede decirse lo mismo respecto de los que podrían obtenerse a partir de semillas de producción nacional . Por tal motivo este trabajo se refiere , fundamentalmente , al estudio de los valores de características y composición de la semilla de limón , mandarina , naranja y pomelo obtenidas como subproductos de la industrialización de los frutos respectivos de las provincias de Entre Ríos y Misiones . Incluye , además , el estudio de la composición general de las harinas de extracción , con énfasis en sus contenidos proteicos , así como el aislamiento de tales proteínas y el estudio de algunas de sus características tales como , valor de máxima precipitación (pH isoeléctrico) y contenidos en lisina disponible , entre otros .

a)- Materia prima .-

Inicialmente se contó con muestras de aceites crudos de semilla de limón y de naranja (cosecha 1972) obtenidas por prensado en Eldorado (Misiones , Cooperativa Agrícola Eldorado F.A. C.Y.T.) . Los valores de características físico-químicas y de composición acídica observados sugirieron la conveniencia de lograr partidas de semillas de los cuatro principales frutos cítricos , procedentes de plantas de las provincias de Entre Ríos y Misiones . Así , se obtuvieron partidas de alrededor de 2 kg de semillas de mezclas de variedades de pomelo (Marsh Seedless y

Robado) , naranja (común y Valencia) , mandarina (común , Dancy y Campeona) y de limón . Fueron proporcionadas por la Cooperativa Eldorado (Misiones) ya mencionada y por la firma Pindapoy S.A.A.I.C. (Concordia , Entre Ríos) .

La semilla obtenida en fábrica se sometió a lavado acuoso (eliminación de jugo residual) y dejó secar al aire en capa delgada, todo ello para evitar el desarrollo de mohos . En los laboratorios se procedió a su estudio en forma inmediata a su recepción .

Además se dispusieron partidas menores de semilla de toronja "Meteor" , lima "Dulce de Palestina" y de pomelo "Marsh Seedless" procedentes de la Estación Experimental Citrícola (INTA) de Concordia (Entre Ríos) , de dos frutos maduros de Citrus aurantium L. var. myrtifolia Ker-Gawl ("kinoto") cosechados en Martínez (Prov. de Bs.As.) que rindieron seis semillas y de semillas de Fortunella margarita (Lour.) Swingle ("kumquat") de frutos maduros cosechados en la zona del Gran Buenos Aires .

b)- Relaciones cáscara/pepa en semilla . Rendimiento en aceite (hexano) . Características físico-químicas y componentes menores de los aceites seminales .-

Desde que la mayor concentración de aceite se encuentra en el endospermo de la semilla , se determinaron los valores de las relaciones cáscara/pepa o endospermo . Según puede verse en la Parte Experimental se procedió a la molienda de semilla entera ; a la determinación de valores de humedad en semilla y a la extracción de los aceites crudos (hexano técnico) , calculando los rendimientos sobre semilla tal cual y sobre semilla seca .

La Tabla 13 resume los valores de las relaciones cáscara/pepa , los rendimientos en aceite , las características físico-químicas y concentraciones en fósforo lipídico , esteroides to-

tales y tocoferoles totales de los aceites crudos .

De su observación surge :

- En general los valores de las relaciones cáscara/pepa son similares en las cuatro especies habiéndose constatado la menor concentración de pepa en semilla de limón y de mandarina .
- Los valores de rendimiento en aceite crudo (expresados sobre sustancia seca) oscilaron entre 36,0 y 42,4 % , registrándose los valores menores para semilla de limón (32,6-36,0 %) . En el supuesto que los valores de humedad fuesen aproximadamente iguales en cáscara y en pepa se calcularon los rendimientos en aceite expresados en % de pepa seca , con los siguientes resultados : Pomelo (54,2-55,0 %) ; Naranja (55,8-58,6 %) ; Mandarina (53,5-57,9 %) y Limón (50,4-51,1 %) . Estos valores se consideran elevados y acordes con los que se registran en numerosas semillas oleaginosas libres de cáscara .
- Que los valores máximos de índice de yodo se registraron para los aceites de semilla de limón (este comportamiento quedó justificado al obtener valores de composición acídica , como se expone más adelante) , así como los de índice de refracción y de densidad relativa . En los aceites de semilla de naranja y de mandarina los valores de índice de yodo fueron muy similares (98,5-101,0) mientras que en los de pomelo fueron ligeramente superiores a éstos últimos (100,1-102,6) . Los mayores valores observados para aceite de semilla de limón concuerdan con los registrados en literatura , según se expuso en las Tablas 1 y 2 .
- Que los valores de índice de saponificación (191,3-198,0) son normales para aceites cuya composición acídica consiste fundamentalmente de ácidos en C_{16} y C_{18} .

- Que los valores de número de acidez (mg KOH/g) oscilaron entre límites amplios (0,99-14,54) y que un ámbito tal debe atribuirse exclusivamente a la acción de lipasas como consecuencia de daños sufridos en la semilla durante su obtención y en función de los lapsos ocurridos entre la obtención y la extracción de aceites , así como de los valores de humedad en semilla al momento de la extracción (6,50-10,89 %) .
- Que los valores de insaponificable total (logrados por extracción con éter etílico) oscilaron entre 1,36 y 2,00 % , cifras estas significativamente superiores a las consignadas en literatura (Tablas 1 y 2) y que ello debe atribuirse a que éstos últimos surgirían de extracciones con éter de petróleo .
- Que los valores de índice de yodo de los insaponificables (80,8-104,5) son sumamente parejos en todas las especies e indicativos de bajos número de escualeno .
- Que no habiéndose registrado en literatura cifras sobre el contenido de esteroides totales en aceites de semilla de cítricos , se los determinó por precipitación con digitonina (ver Parte Experimental) obteniendo valores entre 167 y 361 mg % g de aceite , con una mayor concentración de cifras entre 230 y 320 . La más baja correspondió a un aceite de semilla de mandarina . Como se informa más adelante se realizó un estudio de los esteroides constituyentes .
- Que en todos los aceites se registraron valores sumamente bajos en tocóferoles totales (8,4-33,4 mg % g expresados en α -tocoferol) , observándose los mínimos en los aceites de prensa . Estas cifras son del orden de las que se registran para aceite de oliva³⁰ (7-28 mg % g) . La única información registrada en literatura sobre este tema señala cifras de 30-60 mg % g de aceite , debidas a Braddock y Kesterson¹⁵ quienes , a-

demás , mencionan como principal componente α - tocoferol (20 - 40 mg % g) y cantidades significativamente menores de β - tocoferol (1-4 mg % g) , de γ - tocoferol (1-6 mg % g) y de α y β -tocotrienoles (0,15-1,00 mg % g) . Estos bajos contenidos indicarían la conveniencia de proteger a estos aceites frente a la autoxidación mediante el agregado de antioxidantes de uso permitido (concentrados de tocoferoles , BHA , BHT , ésteres de ácido gálico o sus mezclas y de sinergistas o antioxidantes secundarios) .

- Que los contenidos en fósforo lipídico (6,6-32,7 mg % g) indicarían valores extremos de 165-817 mg % g de fosfolípidos , con una concentración mayor de valores entre 400 y 750 mg % g (calculados como producto entre el factor 25 y el tenor en fósforo lipídico de los aceites³¹) .

Sin tener en cuenta los valores de composición acídica , cabría considerar a los aceites de semilla de cítricos como no seccantes o semiseccantes en base a la consideración de los valores de índice de yodo . Sin embargo esta apreciación es errónea , toda vez que los exámenes de composición acídica revelaron concentraciones significativas en ácido linolénico .

3)- Composiciones acídicas de los aceites de semilla .-

En la Introducción se hizo referencia a estos valores (Tablas 3 y 4) tomados de la literatura . Sólo los de la Tabla 4 responden a cifras obtenidas por cromatografía gas-líquido .

En este trabajo y con carácter previo a esos exámenes , los aceites se estudiaron por espectrofotometría en U.V.(ver Parte Experimental) , no observando conjugación preexistente (dienos y trienos) . Así mismo se comprobó ausencia de ácidos ciclopro-

pénicos (reacción de Halphen negativa) y presencia de ácidos con más de dos dobles enlaces (reacción bromada de Halphen positiva) .

De acuerdo con los detalles que figuran en la Parte Experimental y operando sobre los líquidos resultantes de las determinaciones de índice de saponificación (libres de insaponificable), se prepararon los ésteres metílicos de los ácidos totales que se examinaron por C.G.L. . La Tabla 14 resume los valores de composición acídica para aceites de semilla de limón , mandarina , naranja y pomelo expresados en ácidos % de ácidos totales .

De su observación surge que los componentes "mayores" (en concentraciones superiores al 10 % de los ácidos totales) son : 16:0 ; 18:1 ; 18:2 y prácticamente 18:3 en los aceites de semilla de limón . Las Figuras 4 y 5 reproducen los cromatogramas de los ésteres metílicos de los ácidos totales de aceite de semilla de mandarina (Entre Ríos) y de limón (Entre Ríos) que a modo de ejemplo destacan las sensibles diferencias de contenido en 18:3 .

Si bien la literatura menciona 18:3 como componente normal de muchos aceites de semilla de Rutáceas y de semillas del género Citrus , se procedió a identificar su identidad , lo que ^{se} logró a través de su transformación en ácido hexabromoesteárico , reconocido por su temperatura de fusión y por fusión mezcla con ácido hexabromoesteárico obtenido a partir de aceite de semilla de lino .

En general los valores para 16:0 ; 18:1 y 18:2 son acordes con los registrados en los primeros estudios de composición acídica de aceites de semilla de cítricos (Tabla 3) y con los determinados sobre aceite de semilla de frutos de Florida (U.S.A.) a través de las mismas técnicas (C.G.L.) . El análisis de la Tabla 14 señala que los contenidos en ácidos saturados totales (16:0 + 18:0) oscilaron entre un mínimo de 24,7 para limón y

un máximo de 34,0 para pomelo (si bien en un aceite de naranja de presión este valor fué de 34,6) . Entre estos extremos figuran los aceites de mandarina con prácticamente 28 % de ácidos saturados y los de naranja con 31-33,6 % (excepción hecha del de presión) . En consecuencia los contenidos en ácidos saturados totales aumenta en el orden limón ---> mandarina ---> naranja ---> pomelo , señalando que los valores obtenidos para los pares de muestras de extracción de Misiones y Entre Ríos fueron sumamente parejos .

Los aceites de semilla de mandarina y limón fueron los más ricos en 18:1 (28,7 a 32,6 %) y los de naranja y pomelo los más pobres (21,0 a 25,1 %) .

Los aceites de mandarina , naranja y pomelo revelaron cifras parejas para los contenidos en 18:2 (37,1 a 41,2 %) , mayores que los observados para aceite de limón (32,8 a 35,7 %) . Los aceites de semilla de limón registraron valores sensiblemente mayores para los contenidos en 18:3 (9,8 a 11,4 %) y los de mandarina los menores (2,3 a 2,8 %) .

Esa mayor riqueza en 18:3 en los aceites de limón , junto a sus concentraciones en 18:1 y 18:2 es la que justifica sus valores más elevados para índice de yodo (112,2 a 113,5) .

Todo lo expuesto indicaría que una industrialización probable en el país de estos aceites (que obligadamente deberían someterse a refinación) debería excluir a los de semilla de limón en razón de sus concentraciones significativas en 18:3 que , seguramente , conduciría a desodorizaciones deficientes tal como ocurre en los aceites de soja , a menos que mediase un proceso de hidrogenación selectiva previo . En un caso tal todas las semillas cítricas reunidas podrían proporcionar aceites refinados para uso alimentario que podrían designarse como "aceites de semillas cítricas" . Si la finalidad fuese la de transformar a es-

tos aceites semirefinados en productos aptos para la fabricación de margarinas por hidrogenación , no habría ningún inconveniente en procesarlos juntos .

Por sus altas concentraciones en ácidos saturados totales (24,7 a 34,6 %) los aceites de semillas cítricas son , en cierta medida , equiparables a los de semilla de maní y de algodón de producción nacional . Los primeros contienen 17,0 a 23,1 % de ácidos saturados totales y los segundos 23,1 a 31,5 % .

La diferencia fundamental reside en que en los aceites de maní una parte significativa (6,0 a 7,7 %)³² de los ácidos saturados totales corresponde a los ácidos en C₂₀ , C₂₂ y C₂₄ (araquídico , behénico y lignocérico) , mientras que en los de algodón los ácidos saturados totales (al igual que en los cítricos) están constituidos por 16:0 y 18:0 (el total de los ácidos saturados en más de C₁₈ oscila entre 0,1 y 1,9 %)³³.

Es sabido que por su alta concentración en ácidos saturados , principalmente palmítico y por su configuración glicerídica (rica en glicéridos conteniendo dos radicales acilo saturados) , los aceites de semilla de algodón se someten al final de su refinación a un proceso de desmargarinización ("winterización") para producir los llamados aceites de algodón de invierno . Por su similitud en composición acídica respecto de los ácidos saturados , cabría pensar en un proceso análogo en la refinación de aceites de semillas cítricas , siempre que su composición glicerídica lo justificase . Este parece ser el caso desde que Hilditch et al.²² han verificado concentraciones molares de 25 y 27 % en glicéridos conteniendo dos radicales acilo saturados para aceites de semilla de lima y de naranja .

4)- Composiciones exhaustivas de los aceites de semilla .-

Desde que el exámen C.G.L. de los ésteres metílicos de los ácidos totales no permite cuantificar componentes del orden de las trazas (concentraciones $<$ al 0,05 %) y a veces identificarlos , ni tampoco evidenciar en la mayoría de los casos ésteres de ácidos de elevado P.M (C₂₀ a C₂₂) , se resolvió estudiar las composiciones exhaustivas de los aceites de semilla de limón , mandarina , naranja y pomelo (Misiones) combinando la destilación fraccionada en vacío en equipo apropiado (0,5 a 1,0 Torr.) de los ésteres metílicos de los ácidos totales libres de la mayor parte de insaponificable con el examen C.G.L. de cada fracción y de los residuos de destilación . De este modo y operando separación de fracciones en forma apropiada , los componentes en el orden de las trazas se concentran en determinadas fracciones de la destilación , pudiéndoselos identificar y cuantificar . La Tabla 15 resume los valores así encontrados .

En términos generales existe una concordancia muy aceptable para los valores de contenido en los ácidos tabulados en la Tabla 14 con los mismos componentes de la Tabla 15 . Los análisis de composición acídica exhaustiva revelaron en el orden de las trazas en todos los casos los siguientes ácidos : 12:0 ; 13:0 ; 13:1 ; r-15:0 ; 15:1 ; y r-16:0 y prácticamente r-17:0 ; 17:0 ; r-18:0 ; r-22:0 ; r-23:0 ; r-24:0 y r-25:0 . En total se señalaron ocho ácidos ramificados (saturados) : r-15:0 ; r-16:0 ; r-17:0 ; r-18:0; r-22:0 ; r-23:0 ; r-24:0 y r-25:0 .

Una confirmación de la existencia de estos ácidos ramificados a partir de r-18:0 y de otros no revelados en los cromatogramas de los residuos de destilación respectivos se tuvo , a través del examen C.G.L. del residuo de destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales (previamente hidrogenados) correspondiente al aceite de semilla de limón (Misiones) .

Las Figuras 6 , 6' , 7 , 8 y 9 reproducen los cromatogramas de las fracciones 1 , 2, 3 y del residuo de destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales .

La Figura 10 reproduce el cromatograma de los ésteres hidrogenados del residuo de destilación de este último aceite , en el que por representación gráfica de los logaritmos de los valores de tiempo de retención en función de los números de átomos de C , se evidenciaron tres rectas paralelas , dos de ellas por debajo de la correspondiente a los ácidos saturados de cadena normal y que , por consiguiente , corresponden a componentes ramificados de distintas series . Este cromatograma evidenció los diferentes ácidos ramificados en r-18:0 ; r-19:0 ; r-20:0 , dos ácidos ramificados en 22:0 ; r-23:0 ; dos ácidos ramificados en 24:0 ; r-25:0 y r-26:0 . Dentro de cada magnitud molecular y considerando los pares de ácidos ramificados , los de menor tiempo de retención corresponden a la serie iso y a la anteiso los de tiempo de retención más próximos a los de los saturados normales correspondientes .

En relación a la presencia de ácidos ramificados de distintas series en aceites de semilla de cítricos Nordby y Nagy realizaron en 1969 un extenso estudio sobre "presencia en aceites de semilla y de jugos cítricos de pomelo , lima , naranja y mandarina"³⁴ . Este estudio persiguió la finalidad de correlacionar los deterioros del "flavor" en jugos cítricos con la composición acídica de los lípidos de los mismos , en parte procedentes de los aceites seminales (por ruptura de las semillas durante la extracción de jugos) y en parte componentes de lípidos de la pulpa . Operaron sobre lípidos totales extraídos por cloroformo-metanol y por tanto , sus resultados incluyen los compuestos ácidos propios de los lípidos polares (fundamentalmente fosfolípidos) . Tanto en los lípidos de semilla como en los propios

de la pulpa , revelan (por valores de T_r y por espectrometría de masa) la existencia en cantidades de trazas hasta 1 % de ácidos ramificados entre C_{13} y C_{26} que comprenden componentes de la serie iso y anteiso saturados , mono , di y trietilénicos . El total de compuestos acídicos encontrados en este trabajo osciló , en jugos , entre 81 (lima) y 102 (limón) . En los aceites seminales mencionan entre 62 (naranja) y 68 (lima) componentes acídicos ; 38 distintos componentes de la serie iso y 26 de la serie anteiso fueron señalados por primera vez en estos materiales comestibles en concentraciones desde menos del 0,001 % hasta el 1% .

5)- Examen C.G.L. de las fracciones de esteroides .-

Como se describe en la Parte Experimental , los insaponificables de los distintos aceites de semilla de cítricos considerados y de "kumquat" (género Fortunella) se fraccionaron en placas preparativas de sílica gel aislando por raspado la banda de esteroides que , por elución con éter etílico , proporcionó a estos últimos para sus respectivos análisis por C.G.L. .

En todos los casos se observaron picos identificados como campesterol , stigmasterol y β -sitosterol ; además dos picos , uno con valor T_r/T_r colesterol 0,99-1,00 (colesterol?) y otro T_r/T_r col. 0,80 (?) . Por computación de áreas se calcularon las concentraciones (% de esteroides totales) de los componentes mencionados . La Tabla 16 los resume . La concentración mayor en el pico supuesto colesterol fué de 1,4 % (limón) siendo menor en los demás 0,3-0,0 % . El componente con valor T_r/T_r col. 0,80 (?) fué muy constante (2,1-2,7 %) para limón , mandarina, naranja y pomelo , algo mayor para naranja agria (6,1 %) y sensiblemente superior para "kumquat" (Fortunella margarita) .

La menor concentración en campesterol se observó para pomelo siendo en los demás componentes poco variable 12,7-14,8 %. Stigmasterol observó su menor concentración en pomelo 1,0 % y cifras de 1,5 a 3,5 % en los casos restantes. β -sitosterol osciló entre 78,9 y 85,9 % para los aceites de semilla de naranja agria, limón, mandarina, naranja y pomelo registrándose una concentración baja (61,5 %) para los esteroides de aceite de semilla de "kumquat" (género Fortunella) .

Las Figuras 11 y 12 se refieren a los cromatogramas (C.G.L.) de una mezcla de patrones de esteroides y de los esteroides de aceite de semilla de limón, respectivamente .

La literatura registra un solo antecedente en este campo debido a Barroso et al.³⁵, referente al estudio de composición de esteroides en pomelo, a través de un examen por C.G.L. de los derivados silinados de los esteroides totales. Identificaron stigmasterol (2,5 %), campesterol (7,4 %) y β -sitosterol (90,1 %) .

Al presente se reconoce que el colesterol está presente en la fracción de esteroides de numerosos aceites y lípidos vegetales generalmente en cantidades del orden de las trazas o en proporciones cercanas al 1 %. Así, se lo ha señalado en el aceite de palma africana (Elaeis guineensis)³⁶, en aceites de semilla de palma "Caranday" (Copernicia alba) y de pulpa de palma de "Yatay" (Butia yatay)³⁷, en aceite de semilla de calafate (Berberis luxifolia Lam.)³⁸; en lípidos de hojas de soja³⁹, en aceite de salvado de arroz (10,4 %)⁴⁰, en "capsicum seed oil" (9,0 %), en el de semilla de Fagara coco (1,0 %)⁴¹ y en aceite de semilla de tomate (Lycopersicum esculentum) (6,7 -17,3 %)⁴² entre otros .

6)- Estudios sobre aceites de semilla de otros cítricos y de "Fortunella margarita (Lour.) Swingle" ("kumquat") .-

En forma análoga a lo expuesto para semilla de pomelo , naranja , mandarina y limón , se examinaron partidas de semilla de naranja agria (subproducto de la elaboración de mermeladas , Santiago del Estero) , de Citrus aurantium L. var. myrtifolia Ker-Gawl ("kinoto") , de toronja "Meteor" , de lima "Dulce de Palestina" , de pomelo "Marsh Seedless" y de Fortunella margarita ("kumquat") .

De la observación de la Tabla 17 surge :

- Que los valores de la relación cáscara/pepa % para naranja agria , lima , pomelo "Marsh Seedless" y Fortunella margarita ("kumquat") son del orden señalado en la Tabla 13 para naranja, pomelo , mandarina y limón . En cambio , la semilla de toronja "Meteor" contiene mucha menos pepa que las demás especies (relación 50,4 / 49,6 %) .
- Que los rendimientos en aceite para naranja agria , lima , pomelo "Marsh Seedless" , C.aurantium L. y Fortunella margarita son acordes con los encontrados para los de semilla de los demás cítricos , no así para el caso de semilla de toronja "Meteor" (19,67 %) .
- Que el valor de índice de yodo del aceite de semilla de pomelo "Marsh" es similar a los registrados para aceite de pomelo , el de lima "Dulce de Palestina" es más elevado (107,6) y próximo al observado en semilla de limón , así como el registrado para el aceite de semilla de "kumquat" (107,6) .
- Que el contenido en insaponificable para aceite de naranja agria es del orden de los encontrados para los cítricos principales , mientras que para toronja , lima , pomelo "Seedless"

y "kumquat" se observaron valores significativamente superiores (2,5 a 4,2 %) . Así mismo , los índices de yodo de los insaponificables de los aceites de esta Tabla (90,0-97,1) son muy similares a los observados para insaponificables de otros aceites de semillas cítricas .

- Que los valores de esteroles observados para Fortunella margarita (321,2 mg % g) son del orden observado para todos los aceites de semillas cítricas .

Las composiciones acídicas encontradas para los aceites de semilla de estas especies figuran en la Tabla 18 . De su análisis surge que presentaron los mismos componentes acídicos que los señalados para limón , mandarina , naranja y pomelo .

Las composiciones acídicas de la Tabla 18 confirman los valores para aceite de semilla de pomelo "Marsn Seedless" como coincidentes con los de pomelo ; destacan al aceite de semilla de toronja "Meteor" por ser el de mayor contenido en 18:2 entre todos los aceites estudiados en este trabajo y muestran para el aceite de semilla de "kumquat" (género Fortunella) valores parangonables a los de semilla de cítricos , si bien fué el de menor contenido en 16:0 (20,3 %) , muy próximo a los valores observados para aceite de semilla de limón (21,2-21,9 %) .

Ninguno de los aceites de las Tablas 17 y 18 pueden considerarse desde el punto de vista de aprovechamiento industrial , pues los frutos que proporcionan la semilla no son motivo de industrialización significativa y sólo se los ha examinado con fines de información y comparación .

7)- Estudios de composición de harinas de extracción .-a)- Valores de composición general .-

La Tabla 19 se refiere a las composiciones de análisis general de harinas de semilla entera de los cuatro principales cítricos de Misiones , de toronja , lima , "kumquat" y pomelo "Marsh Seedless" ; revela valores de contenido acuoso de prácticamente del mismo orden en todas las harinas (7,00-11,70 %) , cifras algo más variables para el contenido en materia mineral (cenizas % 3,9-6,4) , correspondiendo el mayor valor a la harina de semilla de mandarina y el menor a la de toronja . Los contenidos en fibra cruda (18,6-39,8 %) mostraron una mayor concentración de valores entre 23 y 28 % , correspondiendo el más elevado al de semilla de naranja (39,8 %) y el más bajo a la de semilla de pomelo "Marsh Seedless" (18,6 %) .

Sin duda el valor de mayor interés en la composición de estas harinas es el de contenido proteico que osciló entre prácticamente 16,0 y 32,2 % (N x 6,25 ; base seca) con una concentración mayor de valores entre 23 y 28 % . El contenido menor se observó en harina de semilla de toronja (16,0 %) y el mayor en la de limón (32,2 %) , debido a que en el caso de la toronja se observó una relación cáscara/pepa de 50,4/49,6 % , notablemente diferente a los valores observados para las semillas de los demás cítricos y "kumquat" estudiados .

La Tabla 20 resume los valores de composición general de harinas de semilla entera , de pepa y cáscara molida para limón , mandarina , naranja y pomelo (Entre Ríos) y naranja agria (Santiago del Estero) . Una observación de interés que surge de la misma reside en la significativa mayor concentración de materias minerales en las harinas de pepa , respecto de las cáscaras molidas . Como era previsible los contenidos en fibra cruda fueron muy superiores en cáscara molida que en harina de pepa , registrán-

do la cifra más elevada para cáscara de semilla procedentes de naranja agria (51,5 %) y el valor más bajo para cáscara de naranja (41,9 %) .

Los tenores en proteínas (base seca ; N x 6,25) de harinas de semilla entera de cítricos de Entre Ríos , oscilaron entre 25,1 y 31,7 % correspondiendo el valor mayor al de harina de semilla de limón coincidente con lo observado para el caso de harina de semilla de limón de Misiones . Así mismo , fueron muy similares los contenidos en proteínas en naranja , pomelo y mandarina procedentes de Entre Ríos con los señalados para los procedentes de harinas de semillas de Misiones . La harina de semilla entera de naranja agria observó un contenido proteico similar a los registrados para las harinas de semilla entera de naranja , mandarina y pomelo.

Fueron notables las diferencias de contenidos proteicos entre harina de pepa y de las cáscaras molidas respectivas , con valores muy superiores para las primeras que oscilaron entre 36,6 y 57,2 % para mandarina y limón respectivamente . Esto confirma lo ya señalado para las mayores concentraciones de proteína en harina de semilla de limón , debiendo destacar que la harina de pepa de naranja agria fué también de elevado contenido en proteínas (48,5 %) , muy superior al observado para harina de pepa de naranja común .

Estas cifras avalarían la conveniencia del descascarado previo de la semilla entera antes de la extracción de aceite, a los fines de obtener harinas de contenidos elevados en proteínas , cuya utilización como tales solamente sería aplicable en alimentación animal , por la presencia en ellas de principios amargos . Las harinas de pepa de semillas cítricas , de poder liberarse de los principios amargos , deberían considerarse como productos cercanos a concentrados proteínicos en razón de sus elevados contenidos en proteínas (especialmente limón y naranja agria) y a sus

bajos tenores en fibra cruda (inferiores al 7 %) .

La Tabla 21 informa sobre los valores de extracto acuoso de harinas de semilla integral de limón , mandarina , naranja , pomelo y naranja agria . Se observaron cifras entre 18,2y 26,8 % con un mínimo para limón y un máximo para mandarina . Figuran en la misma valores de acidez del extracto acuoso y de contenido de nitrógeno soluble , expresado en % de N total de las harinas de partida . Estos últimos valores oscilaron entre 16,10 y 33,24 % , correspondiendo el máximo al caso de mandarina (33,2 %) y el mínimo al de limón (16,1 %) , hecho llamativo desde que la semilla de limón fué la de mayores contenidos proteicos y la de mandarina la de tenores más bajos .

b)- Composición en hidratos de carbono .-

En la Tabla 20 figuran los valores de extracto libre de nitrógeno para harinas de semilla entera , de pepa y para cáscara molida de naranja , mandarina , limón , pomelo (Entre Ríos) y naranja agria (Santiago del Estero) . Estos valores fueron obtenidos por diferencia entre 100 y la suma de los contenidos en humedad , cenizas , proteínas y fibra cruda % . En su mayor parte están constituidos por hidratos de carbono y por esa razón se efectuaron las determinaciones de contenido en azúcares reductores (expresados en glucosa) , azúcares invertibles (expresados en sacarosa) e hidratos de carbono sacarificables (expresados en almidón) . Los valores obtenidos figuran en la Tabla 22 cuya observación destaca las mayores concentraciones en hidratos de carbono sacarificables (11,85 en pomelo a 16,13 en naranja) . En ningún caso se observó la presencia de almidón (reacción con reactivo de Bouchardat) . Los contenidos en azúcares reductores fueron bajos (0,20-1,58 %) con máximos para pomelo y mandarina (1,38 y 1,58 % respectivamente) y mínimos para limón y naranja agria (~ 0,20%).

Los valores para azúcares invertibles (2,07 a 3,60 %) fueron también bajos , máximo para pomelo (3,60 %) y mínimo para limón (2,07 %) .

Estas determinaciones se complementaron (ver Parte Experimental) con la identificación cromatográfica de los azúcares reductores e invertibles preexistentes (cromatografías antes y después de la inversión) y de los azúcares componentes de los hidratos de carbono sacarificables .

Los resultados obtenidos se evidencian en la Tabla 23 . Pomelo y limón mostraron los mismos azúcares componentes (glucosa , fructosa y sacarosa) ; naranja reveló glucosa , galactosa y fructosa ; naranja agria galactosa y fructosa y mandarina glucosa y fructosa operando sobre extractivos de muestra tal cual . Los exámenes sobre los mismos extractivos sometidos a inversión , revelaron los mismos componentes para naranja (glucosa , galactosa y fructosa) , glucosa y fructosa para pomelo ; glucosa fructosa y galactosa para limón y mandarina (la presencia de galactosa después de la inversión fué confirmada en repetidas experiencias debiendo atribuírse su presencia a su liberación a partir de hidratos de carbono sacarificables en las condiciones de inversión operadas) y galactosa y fructosa en naranja agria . Por hidrólisis de los hidratos de carbono sacarificables (libres de azúcares) se identificó en todos los casos , xilosa , arabinosa y galactosa y una probable pentosa (no identificada con los patrones: xilosa , arabinosa , ribosa y lixosa) para los hidratos de carbono sacarificables de pomelo y limón .

8)- Aislamiento de proteínas de una harina de extracción mezcla .-

a)- Procedimiento de obtención .-

La literatura no registra antecedentes sobre aislados protei-

cos de semillas de frutos cítricos . Desde que las harinas de partida contienen principios amargos , la utilización de éstas en alimentación humana sería objetable . Un caso similar ocurre con todas aquellas harinas de semillas que contienen principios tóxicos . En este caso la experiencia⁴³ mostró que los aislados proteicos de la semilla de lino , resultaron libres de los dos principales principios tóxicos , los glicósidos cianogénicos linamarina y lotaustralina . Por tal motivo se decidió aislar las proteínas de una mezcla de partes iguales de harinas de limón , mandarina , naranja y pomelo , a fin de observar los rendimientos de extracción de N total , el valor de pH de máxima precipitación , el rendimiento en aislado proteico junto a su análisis , de acuerdo con los detalles que figuran en la Parte Experimental .

La harina mezcla acusó los siguientes valores analíticos : agua % 16,91 ; P total (como P) % 0,36 ; N total % 3,92 y lisina disponible 4,23 g / 16 g de N total .

Según la experiencia recogida , se eligió un valor de pH de extracción de 10,5-11,0 , basado en lo observado para el caso de la semilla de lino⁴³ , de girasol⁴⁴ , de semilla de zapallo⁴⁵ , de semilla de sésamo⁴⁶ , de semilla de la palma Acrocomia totai Mart. ("mbocaya")⁴⁷ , de semilla de cártamo⁴⁸ y de semilla de tomate⁴⁹ .

El valor de nitrógeno extraído % de N total a pH 10,5-11,0 (65,94 % , promedio de dos evaluaciones) , resultó bajo si se lo compara con los observados para los casos de la mayoría de las otras semillas mencionadas . Ese comportamiento decidió a determinar los valores de N extraído % N total para las distintas harinas constituyentes de la harina mezcla , registrando las siguientes cifras : naranja , 76,26 ; mandarina , 67,37 ; limón , 66,03 y pomelo , 68,24 % . En consecuencia en todos los casos se observaron valores bajos con excepción el de naranja que registró un va-

lor de extracción ligeramente superior .

Con los detalles que figuran en la Parte Experimental , se determinó el valor de pH de máxima precipitación (isoeléctrico) operando sobre los extractivos a pH 10,5-11,0 de la harina mezcla, observando el rango de pH 4,0-4,2 como el que proporciona las cifras mínimas de N soluble respecto de N extraído (Figura 13) .

Con el objeto de disponer suficiente cantidad de aislado proteico y operando sobre un total de 400 g de harina mezcla , se obtuvo un total de 57,0 g (14,2 %) de aislado prácticamente blanco , bajo la forma de polvo liviano , inodoro e insípido (eliminación de principios amargos) . Estas características del aislado se lograron tratando los respectivos coágulos a pH isoeléctrico mediante tratamientos con agua a ese pH seguidos de centrifugación y lavados con etanol 90 % (eliminación de pigmentos y fundamentalmente lípidos asociados) . Este sistema de purificación había sido ya establecido para el caso de semilla de lino⁴³ . Finalmente las proteínas así purificadas se llevaron a peso constante en vacío (0,5 Torr.) y a 40° .

b)- Análisis del aislado proteico .-

Con los métodos que se mencionan en la Parte Experimental el aislado se analizó con los siguientes resultados :

Humedad (100°, vacío)	3,57 %
Cenizas (500-550°)	1,38 %
N total (Kjeldahl)	13,58 % (14,20 % en base libre de humedad y cenizas)
P total (como P) ^{50,51}	0,14 %
P (ác. fítico)(como P) ⁵²	0,07 % (50 % del P total)
Lisina disponible ⁵³	3,00 g / 16g de N total
Hidratos de Carbono (mét. fenol-sulfúrico) ^{54,55}	13,42 % (expresado como gal.)
Lípidos residuales ⁵⁶	0,98 %

De la comparación de valores de lisina disponible encontrados para la harina mezcla de partida (4,23 g / 16 g de N) y para el aislado proteico final (3,00 g/16 g de N ; 71,0 % de la lisina disponible de la harina) podría interpretarse que el proceso de extracción de proteínas habría provocado una disminución del valor de lisina disponible . Con el fin de verificar esa suposición se analizó el residuo de extracción (porción residual de la harina de extracción luego del agotamiento alcalino del N soluble) . Este producto contenía 6,44 % de humedad ; 1,55 % de N y 6,66 g de lisina disponible/16 g de N y en consecuencia, buena parte de la lisina de partida permanece ligada al residuo de extracción , un comportamiento que ha sido observado y registrado en la literatura para aislados de diversas semillas .

En relación al contenido en N del aislado proteico final , se observó un valor bajo (14,20 % en base libre de humedad y de cenizas) . Esta comprobación sugirió un ensayo de redisolución del aislado a pH 10,5-11,0 ; reprecipitación a pH isoelectrico , aislamiento de las proteínas en la forma ya expuesta y determinación del valor de N del nuevo aislado proteico . Se observó un contenido de 13,18 % de N , similar al encontrado en base tal cual para el aislado proteico original (13,50 %) . La experiencia recogida en el estudio de un aislado proteico de semilla de lino^{43,57} , llevó a suponer la existencia de un resto formado por hidratos de carbono firmemente ligado a la parte proteica del aislado , lo que quedó confirmado al determinar el contenido en hidratos de carbono de 13,42 % (expresado en galactosa) . Al igual que en el caso del aislado de semilla de lino no resultó posible liberar a esa fracción de hidratos de carbono del aislado por redisolución y reprecipitación .

La fracción de hidratos de carbono se hidrolizó y estudió en los azúcares constituyentes (ver Parte Experimental) obser-

vando la presencia de galactosa , glucosa , xilosa y arabinosa , todos ellos , excepto glucosa , presentes en los hidratos de carbono sacarificables de las harinas de semilla de limón , mandarina , naranja , pomelo y naranja agria .

Durante el proceso de purificación (lavados etanólicos de los coágulos proteicos) se eliminan pigmentos y fundamentalmente lípidos (ver más adelante) . Según se ha mencionado las proteínas así purificadas contienen aún 0,98 % de lípidos residuales constituidos por material insaponificable (73,2 % de los residuales totales) y por ácidos grasos (26,8 % de los lípidos residuales totales) . Esto no significa que tales componentes preexistan en el aislado como tales desde que su aislamiento medió un proceso de saponificación drástico . Se consideró de interés el estudio de la composición acídica de esos lípidos residuales y con ese objeto los ácidos grasos totales se transformaron en ésteres metílicos y examinaron por C.G.L. , obteniendo los siguientes valores (% de ácidos totales) :

12:0 (0,6) ; 13:0 (0,5) ; 14:0 (2,2) ; 15:0 (1,0) ; 16:0 (34,0)
16:1 (1,7) ; 17:0 (0,2) ; 18:0 (4,9) ; 18:1 (18,0); 18:2 (35,2)
18:3 (1,7) . Además rastros de 10:0 ; r-12:0 ; r-13:0 ; r-14:0
y r-16:0 . El valor de índice de yodo de los ácidos totales (calculado en base a la composición C.G.L.) fué de 86,2 .

La Figura 14 reproduce el cromatograma correspondiente .

c)- Examen analítico de los extractivos etanólicos del coágulo proteico .-

Como se expone en la Parte Experimental , de los líquidos etanólicos resultantes de la purificación de los coágulos proteicos , se aisló un residuo (5,18 % referido a proteína blanca y seca) sobre el que se practicaron algunas determinaciones analíticas con los siguientes resultados :

Indice de saponificación	236,7
Indice de yodo (Wijs)	97,2
Nº de acidez (mg KOH/g)	108,0
Insaponificable total	3,64
Acidos totales (por saponificación)	85,98 %
P lipídico (como P)	0,22 %

También se examinó la composición acídica de los ácidos totales por C.G.L. de sus ésteres metílicos , con los siguientes valores (% de ácidos totales) :

16:0 (30,0) ; 18:0 (2,7) ; 18:1 (24,0) ; 18:2 (42,9) ; 18:3 (0,4) . Además rastros de 12:0 ; 14:0 ; 15:0 ; r-16:0 ; 17:0 y 17:1 o r-18:0 .

El índice de yodo de los ácidos totales calculado en base a esta composición C.G.L. fué de 100,3 . El elevado valor de nº de acidez (108,0 mg KOH/g , equivalente a 54 % de acidez libre expresada en ácido oleico) sugiere que se habría originado por saponificación de glicéridos y/o fosfolípidos durante el proceso alcalino de extracción de ^{las} proteínas , liberándose los ácidos al valor de pH isoelectrico y coprecipitando con las proteínas . Este comportamiento ha sido siempre observado en lípidos extraíbles por etanol a partir de coágulos proteicos de otras semillas. Se sugiere entonces que los lípidos preexistentes en las harinas de partida sufren transformaciones en el sentido señalado durante el aislamiento de proteínas .

En general los valores de composición acídica de los lípidos aislados de los extractos etanólicos , muestran concentraciones algo mayores para 16:0 y para 18:2 y menores para 18:0 y sobre todo para 18:3 respecto de la composición acídica de los aceites seminales . Los lípidos residuales (extraíbles por saponificación drástica del aislado proteico) fueron más ricos en 16:0 y más pobres en 18:1 y 18:3 que los aceites seminales . La

Figura 15 muestra el cromatograma de los lípidos extraíbles por etanol .

Las experiencias expuestas respecto de la obtención de un aislado proteico a partir de harinas de semillas cítricas , han esclarecido las condiciones operatorias a escala de laboratorio . Además , proporcionaron una primera información acerca de valores de extracción de nitrógeno y de rendimiento en aislado así como características analíticas del mismo . Este estudio merece ser complementado con los siguientes objetivos :

- Determinación de la composición en aminoácidos esenciales del aislado .
- Evaluación biológica del aislado (valor de utilización neta proteica) y valores de digestibilidad .
- Determinaciones de funcionalidad (valores de reispersibilidad en función del pH) .

En relación a las harinas de extracción de semilla libre de cáscara (pepa) cabría estudiar la posibilidad de liberarlas de sus principios amargos desde que , como se ha expresado , pueden considerarse como concentrados proteicos en razón de su tenor en proteína y sus bajos contenidos en fibra cruda .

En otro orden de trabajos cabría intensificar estudios que se vinculen al logro de un mayor grado de solubilización del nitrógeno total de las harinas de partida registrado en las experiencias realizadas .

- PARTE EXPERIMENTAL -

- 1)- Materia Prima .-
- 2)- Obtención de los aceites crudos de extracción . Rendimientos.-
- 3)- Estudio de los aceites crudos .-
 - a) Características físico-químicas .-
 - b) Determinación de las composiciones acídicas .-
 - c) Examen exhaustivo de las composiciones acídicas .-
 - d) Reconocimiento del ácido linolénico .-
 - e) Investigación y determinación de esteroides .-
- 4)- Harinas de extracción de semilla .-
 - a) Análisis de composición general .-
 - b) Análisis cuantitativo en hidratos de carbono .-
 - c) Identificación de hidratos de carbono .-
- 5)- Aislamiento de proteínas de una harina mezcla de semillas integrales .-
 - a) Procedimiento de extracción de proteínas . Nitrogeno total extraído . Valor de pH de máxima precipitación .-
 - b) Macroextracción de proteínas . Purificación y secado del aislado .-
 - c) Examen analítico del aislado proteico .-
 - d) Determinación del contenido y características de los lípidos residuales en el aislado purificado y seco .-
 - e) Estudio de los lípidos extraídos por etanol en el proceso de purificación del aislado .-

1)- Materia prima .-

Se dispusieron partidas de 2 kg de semilla de limón , de mandarina , de naranja y de pomelo , procedentes de firmas elaboradoras de jugos en las provincias de Entre Ríos (Concordia) y de Misiones (Eldorado)⁺ . Así mismo , de una partida de aproximadamente 4 kg de semilla de naranja agria , residual de la elaboración de dulces en Fernández (Santiago del Estero)⁺⁺ . También se lograron pequeñas partidas de semilla de lima , de toronja y de pomelo "sin semilla" (una variedad de muy pobre contenido en semilla)⁺⁺⁺ .

Las distintas partidas se expusieron al aire en capa delgada durante varios días , después de lo cual se procedió a la determinación de las relaciones cáscara/pepa , operando por separación manual sobre aproximadamente 30 g de semilla en cada caso .

2)- Obtención de los aceites crudos de extracción . Rendimientos.-

Se operó entre 260 y 350 g de semilla entera de limón , mandarina , naranja y pomelo y en los casos de semilla de toronja "Meteor" , lima "Dulce de Palestina" , "kumquat" , pomelo "Marsh Seedless" y Citrus aurantium L. var. myrtifolia Ker-Gawl, debió operarse sobre cantidades mucho menores (0,5-43 g según los casos) en razón de la poca disponibilidad de semilla . Se

+) Remitidas por la firma Pindapoy , Concordia , Entre Ríos y por la Cooperativa Eldorado F.A.C.Y.T. , Misiones .

++) Remitida por la Cía. Envasadora Argentina S.A.I.C. , Fernández , Santiago del Estero .

+++) Remitidas por la Estación Experimental Agropecuaria Concordia (I.N.T.A.) .

procedió a su molienda , a la determinación del contenido acuoso del producto molido (100° , vacío) y a su agotamiento con hexano técnico en equipo Soxhlet . Luego de 24 horas de extracción , las harinas , liberadas de solvente por exposición al aire , se remolieron y extrajeron nuevamente por otras 24 horas ; las harinas así agotadas se expusieron al aire (eliminación final del solvente) y en estufa de vacío (40°) , se remolieron y preservaron en envases de vidrio a los fines de su examen posterior . De los extractos se recuperó el hexano por destilación en baño de agua hirviente , eliminando los últimos restos de solvente por arrastre con vapor de agua . Los aceites crudos se disolvieron en éter etílico recientemente destilado y se agitaron en ampolla de decantación con solución acuosa de SO_4Na_2 a media saturación , descartando la parte acuosa decantada . De las capas etéreas previamente tratadas con SO_4Na_2 anh. , se recuperó el éter por destilación en baño de agua y finalmente los aceites se llevaron a peso constante en estufa (100° , 5 Torr.) . La Tabla 13 resume los valores de las relaciones cáscara/pepa en semilla y los rendimientos en aceite observados sobre semilla tal cual y sobre semilla seca .

Los aceites crudos se presentaron como aceites lípidos a 20° , de color amarilla intenso , excepto los de semilla de mandarina que eran de tono verde .

Todos los aceites crudos así obtenidos se preservaron en ampollas de vidrio cerradas a la lámpara (mínimo espacio muerto) a - 15° , hasta su examen .

3)- Estudio de los aceites crudos .-

a)- Características físico-químicas .-

Previamente a las determinaciones de composición acídica se determinaron : Índice de Yodo (Wijs) ; Índice de Saponificación (A.O.C.S. Official Method Da 15-48) ; Índice de Refracción a 25° (A.O.C.S. Official Method Cc 7-25) ; Densidad Relativa a 25°/4° (Picnómetro) ; N° de Acidez (I.U.P.A.C. 11.D.1 , sobre 0,5 g de aceite) ; Insaponificable total (A.O.C.S. Ca 6b-53 , adaptado a los líquidos residuales de la determinación de índice de saponificación) ; Índice de Yodo del Insaponificable (Rosemund) ; Esteroles totales (Digitonina) ; Tocoferoles totales³⁰ y Fósforo Lipídico^{50,51} . La Tabla 13 resume los valores observados para estas determinaciones . Figuran también las de aceites de prensa de semilla de limón y de naranja remitidos por la Cooperativa Agrícola Eldorado F.A.C.Y.T. , Misiones , cosecha 1972 .

b)- Determinación de las composiciones acídicas .-

Previamente se efectuaron sobre los aceites las reacciones de Bellier (aceites de semilla) con resultado positivo ; la reacción de Halphen (A.O.C.S. Official Method Cb 1-25) con resultado negativo (ausencia de ácidos ciclopropénicos) y la reacción Bromada de Halphen (glicéridos de ácidos trietilénicos), positiva . Los aceites se examinaron por espectrofotometría en el U.V. (A.O.C.S. Official Method Cd 7-58 , 1960) , no observando conjugación en la zona de dienos y trienos (ausencia de ácidos grasos conjugados preexistentes) .

Los líquidos resultantes de las determinaciones de los valores de índice de saponificación (sobre aproximadamente 2 g de aceite , añadidos de 25 ml de solución de KOH al 4 % en etanol 96 % libre de aldehidos) , se diluyeron con 40 ml de agua y se extrajeron por tres veces con 70 ml de éter etílico por vez.

Los extractos etéreos reunidos se lavaron con agua por dos veces (40 ml por vez) , con solución al 1 % de KOH en etanol-agua , y nuevamente con agua (hasta reacción neutra al tornasol de los líquidos acuosos) . Se recuperó el éter sobre baño de agua y los insaponificables residuales se llevaron a peso constante (100° , vacío) . La fase hidraalcohólica reunida con los líquidos procedentes del tratamiento de los extractos etéreos del insaponificable , se acidificaron con ácido ClH (1:4 , heliantina) , extrayendo exhaustivamente los ácidos liberados (tres extracciones con 40 ml de éter etílico por vez) . Los extractos etéreos reunidos , se lavaron con agua , se trataron con SO_4Na_2 anh. y se recuperó el éter en baño de agua , eliminando las últimas trazas por soplado con N en caliente .

En operaciones separadas y operando aproximadamente sobre 2 g de cada aceite , se procedió a la determinación conjunta de ácidos totales más insaponificable (saponificación con 25 ml de solución de KOH al % en etanol) , dilución con 50 ml de agua , acidificación (heliantina) y extracción con éter etílico (4 extracciones con 70 ml por vez) . Los extractos reunidos se lavaron con agua , se recuperó el éter y los residuos se llevaron a peso constante (100° , vacío) . Los resultados calculados en % de aceite , permitieron lograr los valores de ácidos totales descontando los respectivos porcentajes de insaponificable previamente determinados .

Los ácidos totales libres de insaponificable se hirvieron a reflujo (2 hs.) con 20 ml de metanol anh. conteniendo 1,5 % en peso de ácido SO_4H_2 como catalizador²² . Luego de enfriar se diluyó con 40 ml de agua y se extrajo en ampolla por dos veces con 60 ml de éter etílico por vez . Los extractos etéreos reunidos se lavaron con agua (tornasol) , con solución acuosa de CO_3K_2 al 0,05 % (eliminación de ácidos no esterificados) y fi-

nalmente con agua (rendimiento de esterificación superior al 99 %) . Se recuperó el éter y los ésteres se estacionaron en ampolla de vidrio cerrada a la lámpara a -15° , hasta su examen por C.G.L. .

Las composiciones acídicas se determinaron en un equipo Perkin Elmer Vapor Fractometer , Mod 154 , equipado con detector de ionización de llama , columna de vidrio Pyrex de 3 m x 4,5 mm de diámetro interno , material de relleno formado por Chromosorb W lavado ácido (granulometría 60-80) y adipato de etilenglicol políester (15 % sobre el relleno total) . Se operó a 194° regulando la temperatura del "block" de inyección en la indicación 90 (escala empírica de registro)⁵⁸ , (a fin de evitar la probable formación de "artificios" a base de linolenato de metilo) , nitrógeno como fase móvil (presión de entrada 23 psi.) y con inyecciones de 4 μ l de ésteres al 5 % en éter etílico . Los componentes se identificaron en base al tiempo de retención (T_r) y las evaluaciones cuantitativas se resolvieron por triangulación . Las respuestas cuantitativas han sido verificadas por examen C.G.L. de mezclas de ésteres metílicos de ácidos grasos de composición conocida , estableciendo concordancia de resultados para la determinación de ácidos linoleico y linolénico por C.G.L. y por examen espectrofotométrico luego de isomerización alcalina (A.O.C.S. Method Cd 7-58 , 1960) y por determinación del contenido en ácidos saturados totales según el método de Bertram , así como a través del cálculo de los valores del índice de yodo y de índice de saponificación . La Tabla 14 resume las composiciones acídicas así encontradas⁺ .

+) Figuran también las de aceites de prensa de semilla de limón y de naranja remitidos por la Cooperativa Agrícola Eldorado F.A.C.Y.T. , Misiones , cosecha 1972 .

c)- Examen exhaustivo de las composiciones acídicas .-

A fin de evidenciar componentes ácidos en el orden de las trazas (concentraciones $<$ de 0,05 %) y aquellos en más de C₂₀ (hasta C₂₄) , se combino la destilación fraccionada en vacío (0,5-1,0 Torr.) de ésteres metílicos de los ácidos totales libres de insaponificable , con el examen C.G.L. de las distintas fracciones y residuos de destilación . Entre 9 y 12 g (según los casos) de aceites de semilla de limón , de mandarina , de naranja y de pomelo procedentes de la provincia de Misiones , se saponificaron por reflujo (2 hs.) con 4,5 g KOH y 75 ml de etanol 96 % . Después de enfriar , se diluyó con 150 ml de agua y efectuaron cinco extracciones con 80 ml de éter etílico por vez (la primera con 200 ml) , aislándose los insaponificables y recuperándose los ácidos totales prácticamente libres de insaponificable , que se esterificaron por reflujo (2 hs.) con 120 ml de metanol anh. conteniendo 1,5 % de ácido SO₄H₂²² . Los totales de ésteres así obtenidos se fraccionaron por destilación en un equipo Longenecker⁵⁹ (eficacia 12 platos teóricos , medida con mezcla benzol/Cl₄C) , en vacío de 0,5-1,0 Torr. . Se obtuvieron series de fracciones de destilación y residuos de destilación , entendiéndose por estos últimos los ésteres aislados por lavado de la columna , balón de destilación y triángulo de separación de fracciones con éter etílico , una vez concluida cada destilación . Desde que en estos residuos se acumulan las partes de insaponificable no extraídas por éter luego de la saponificación de los aceites , los residuos se saponificaron con potasa al 4 % en etanol , extrayendo los insaponificables remanentes con éter etílico y recuperando los ácidos totales del residuo , que se reesterificaron con metanol .

Cada fracción de destilación (previamente pesada) , así como los ésteres del residuo se examinaron por C.G.L. emplean-

do el equipo y las condiciones antes señaladas , calculando sus composiciones acídicas en ácidos % de ácidos totales en cada fracción y residuo . Teniendo en cuenta estos valores y los pesos de cada fracción y residuos , se calcularon las composiciones finales de los ácidos grasos totales de cada aceite , que figuran en la Tabla 15 .

A continuación se resume para los cuatro aceites considerados los pesos de cada fracción y residuo y las composiciones acídicas de los mismos .

- Limón -

Fracción 1 : (0,45 g); 14:0 (0,8) ; 16:0 (94,4) ; 16:1 (1,6) ;
18:0 (0,1) ; 18:1 (1,1) ; 18:2 (1,7) ; 18:3 (0,3) ;
12:0 (vest.) ; 15:0 (vest.) ; r-16:0 (vest.) ; r-17:0
(vest.) .

Fracción 2 : (0,81 g) ; 14:0 (0,3) ; 16:0 (87,3) ; 16:1 (2,1) ;
18:1 (3,9) ; 18:2 (5,4) ; 18:3 (1,0) ; 15:0 (vest.) ;
r-16:0 (vest.) ; r-17:0 (vest.) ; 17:0 (vest.) ;
17:1 (vest.) ; 18:0 (vest.) .

Fracción 3 : (1,90 g) ; 16:0 (47,2) ; 18:0 (1,1) ; 18:1 (19,5) ;
18:2 (25,6) ; 18:3 (6,6) ; r-17:0 (vest.) ; r-18:0
(vest.) .

Fracción 4 : (3,91 g) ; 16:0 (4,1) ; 18:0 (3,5) ; 18:1 (38,5) ;
18:2 (42,1) ; 18:3 (11,8) ; r-17:0 (vest.) ; 17:0
(vest.) ; r-18:0 (vest.) .

Fracción 5 : (2,34 g) ; 16:0 (0,3) ; 18:0 (6,4) ; 18:1 (39,4) ;
18:2 (41,2) ; 18:3 (2,7) ; r-18:0 (vest.) .

Fracción 6 : (0,74 g) ; 16:0 (0,9) ; 18:0 (10,0) ; 18:1 (39,6) ;
18:2 (33,4) ; 18:3 (11,9) ; 20:0 (3,2) ; 20:1 (1,0) ;
r-18:0 (vest.) .

Residuo : (0,58 g) ; 16:0 (1,2) ; 18:0 (6,2) ; 18:1 (36,8) ; 18:2
(36,2) ; 18:3 (12,4) ; 20:0 (2,2) ; 20:1 (1,0) ;

22:0 (1,2) ; r-23:0 (0,1) ; 23:0 (0,4) ; r-24:0
(0,1) ; 24:0 (2,0) ; r-25:0 (0,2) ; r-22:0 (vest.).

- Mandarina -

Fracción 1 : (0,32 g) ; 14:0 (0,5) ; 15:0 (0,2) ; 16:0 (95,2) ;
16:1 (1,9) ; 18:1 (0,4) ; 18:2 (1,8) ; 17:0 (vest.) ;
18:0 (vest.) .

Fracción 2 : (0,51 g) ; 14:0 (0,9) ; 15:0 (0,6) ; 16:0 (79,8) ;
16:1 (2,1) ; 18:1 (4,5) ; 18:2 (10,3) ; 18:3 (1,8) ;
15:1(vest.) ; r-16:0 (vest.) ; 17:0 (vest.) ; 17:1
18:0(vest.) .

Fracción 3 : (0,80 g) ; 16:0 (84,5) ; 16:1 (1,9) ; 18:1 (4,7) ;
18:2 (8,6) ; 18:3 (0,3) ; r-17:0 (vest.) ; 17:1
(vest.) ; 18:0 (vest.) .

Fracción 4 : (1,93 g) ; 16:0 (23,1) ; 16:1 (0,4) ; r-17:0 (0,1) ;
17:0 (0,1) ; 18:0 (3,7) ; 18:1 (28,0) ; 18:2 (42,0) ;
18:3(2,6) ; r-18:0 (vest.) ; 17:1 (vest.) .

Fracción 5 : (3,94 g) ; 16:0 (2,2) ; r-18:0 (0,1) ; 10:0 (7,9) ;
18:1 (36,6) ; 18:2 (49,2) ; 18:3 (4,0) ; 16:1 (vest.)
r-17:0 (vest.) ; 20:0 (vest.) .

Fracción 6 : (0,75 g) ; 16:0 (1,6) ; 18:0 (12,0) ; 18:1 (35,9) ;
18:2 (43,5) ; 18:3 (3,6) ; 20:0 (3,1) ; 20:1 (0,3) ;
r-18:0 (vest.) .

Residuo : (0,80 g) ; 16:0 (0,6) ; 18:0 (12,1) ; 10:1 (35,2) ; 1
18:2 (40,7) ; 18:3 (2,9) ; 20:0 (3,5) ; 20:1 (0,6) ;
r-22:0 (0,1) ; 22:0 (1,2) ; 23:0 (0,3) ; 24:0 (2,1) ;
r-25:0 (0,7) .

- Naranja -

Fracción 1 : (0,37 g) ; 14:0 (5,6) ; 15:0 (0,6) ; 16:0 (89,0) ;
16:1 (3,7) ; 18:0 (0,1) ; 18:2 (0,6) ; 18:3 (0,1) ;
12:0 (vest.) .

Fracción 2 : (0,94 g) ; 14:0 (0,2) ; 16:0 (94,1) ; 16:1 (3,5) ;
18:1 (0,6) ; 18:2 (1,6) ; 15:0 (vest.) ; 18:0 (vest.)
18:3 (vest.) .

Fracción 3 : (2,19 g) ; 16:0 (65,2) ; 16:1 (1,3) ; 18:0 (0,7) ;
18:1 (10,3) ; 18:2 (21,4) ; 18:3 (1,1) ; r-17:0
(vest.) ; 17:0 (vest.) ; 17:1 (vest.) .

Fracción 4 : (3,95 g) ; 16:0 (6,9) ; 18:0 (4,9) ; 18:1 (28,3) ;
18:2 (55,8) ; 18:3 (4,1) ; r-17:0 (vest.) ; 17:0
(vest.) ; r-18:0 (vest.) .

Fracción 5 : (2,55 g) ; 16:0 (0,5) ; 18:0 (9,1) ; 18:1 (32,2) ;
18:2 (52,9) ; 18:3 (5,3) ; r-18:0 (vest.) .

Fracción 6 : (0,81 g) ; 16:0 (1,2) ; 18:0 (12,0) ; 18:1 (33,4) ;
18:2 (47,4) ; 18:3 (4,4) ; 20:0 (1,6) ; 20:1 (vest.) .

Residuo : (0,60 g) ; 16:0 (0,9) ; 18:0 (4,9) ; 18:1 (30,5) ; 18:2
(50,2) ; 18:3 (4,8) ; 20:0 (1,9) ; 20:1 (0,2) ; 22:0
(1,7) ; 23:0 (0,5) ; 24:0 (4,2) ; r-25:0 (0,2) ;
17:0 (vest.) ; r-18:0 (vest.) ; r-22:0 (vest.) ;
r-23:0 (vest.) ; r-24:0 (vest.) .

- Pomelo -

Fracción 1 : (0,46 g) ; 14:0 (1,3) ; 16:0 (17,5) ; 16:1 (0,4) ;
18:0 (0,1) ; 18:1 (0,2) ; 18:2 (0,5) ; 15:0 (vest.) .

Fracción 2 : (0,95 g) ; 14:0 (0,2) ; 15:0 (0,1) ; 16:0 (96,8) ;
16:1 (1,8) ; 18:1 (0,3) ; 18:2 (0,8) ; 18:0 (vest.) .

Fracción 3 : (1,09 g) ; 16:0 (94,2) ; 16:1 (1,7) ; 18:1 (1,2) ;
18:2 (2,9) ; r-17:0 (vest.) ; 18:0 (vest.) .

Fracción 4 : (1,94 g) ; 16:0 (39,1) ; 16:1 (0,8) ; 18:0 (1,2) ;
18:1 (18,1) ; 18:2 (36,9) ; 18:3 (3,9) ; r-17:0
(vest.) ; 17:0 (vest.) ; r-18:0 (vest.) .

Fracción 5 : (2,54 g) ; 16:0 (2,4) ; 18:0 (3,3) ; 18:1 (30,7) ;
18:2 (57,5) ; 18:3 (6,1) ; r-17:0 (vest.) ; 17:0
(vest.) ; r-18:0 (vest.) .

Fracción 6 : (2,31 g) ; 16:0 (0,3) ; 18:0 (5,2) ; 18:1 (33,6) ;
18:2 (54,3) ; 18:3 (6,6) ; r-18:0 (vest.) .

Fracción 7 : (0,79 g) ; 16:0 (0,9) ; 18:0 (10,1) ; 18:1 (35,3) ;
18:2 (46,8) ; 18:3 (6,9) ; r-18:0 (vest.) .

Residuo : (1,04 g) ; 16:0 (0,6) ; 18:0 (8,3) ; 18:1 (31,4) ; 18:2
(48,3) ; 18:3 (6,4) ; 20:0 (2,0) ; 20:1 (0,6) ;
22:0 (0,5) ; 23:0 (0,2) ; 24:0 (1,4) ; r-25:0 (0,3).

Con el fin de esclarecer el mayor número de componentes presentes en el residuo de destilación , 50 mg del residuo de la destilación de ésteres del aceite de semilla de limón se hidrogenaron según S.S.Tiong y H.I.Waterman⁶⁰ (Pd 10 %/C , ciclohexano , presión y temperatura normales) . Los éteres hidrogenados se examinaron por C.G.L. obteniendo el cromatograma de la Figura 10 .

A modo de control de los valores de composición acídica hallados se calcularon en base a éstos los de índice de yodo de los aceites de partida , teniendo en cuenta los contenidos en ácidos totales % de aceite , los de insaponificable % de aceite y los valores de índice de yodo de éstos últimos . A continuación figuran para cada aceite los valores de índice de yodo determinados subrayados y entre paréntesis , los calculados en la forma señalada .

- Aceites de Entre Ríos -

Limón : 113,5 (111,5) ; Mandarina : 100,4 (100,5) ; Naranja :
98,5 (96,9) ; Pomelo : 102,6 (99,1) ; Pomelo "Marsh Seedless":
100,6 (98,5) ; Lima "Dulce de Palestina" : 107,6 (105,2) y
Toronja "Meteor" 104,5 (104,4) .

- Aceites de Misiones -

De prensa : Limón : 112,4 (114,3) ; Naranja : 97,0 (98,5) .
De extracción : Limón : 112,2 (109,7) ; Mandarina : 98,7 (98,6);

Naranja : 101,0 (99,6) ; Pomelo : 100,1 (97,8) .

- Aceite de Santiago del Estero -

Naranja agria : 102,9 (100,0) .

- Aceite del Gran Buenos Aires -

"Kumquat" : 107,9 (109,5) .

d)- Reconocimiento del ácido linolénico .-

Se operó sobre aceite de semilla de limón (de prensa) . Aproximadamente 5 g de aceite se saponificaron con 50 ml de solución de KOH al 4 % en etanol de 96° , se separó el material insaponificable con éter etílico y se recuperaron los ácidos totales libres de insaponificable . Según Crespo y Cattaneo⁶¹ el total de ácidos obtenido se disolvió en 80 ml de metanol puro , se agregó 22 g de urea , hirvió a reflujo hasta disolución total, estacionó a temperatura ambiente durante 24 hs. y separó por filtración la masa de aductos formada. El filtrado se diluyó con agua , acidificó con HCl 1:4 (heliantina) y se aislaron los ácidos no aductados con éter etílico . Los ácidos grasos obtenidos por destilación del solvente se disolvieron en 30 ml de éter etílico anh. , enfrió a 0° (hielo) y añadió bromo hasta ligero exceso . Por centrifugado , luego de 24 hs. a esa temperatura , se aisló el insoluble que se lavó con pequeñas porciones de éter etílico a 0° . El precipitado seco fundió a 180-181°, no observándose depresión por fusión mezcla con ácido hexabromoesteárico obtenido a partir de ácidos totales de aceite de limón .

e)- Investigación y determinación de esteroides .-

Se procedió a separar los esteroides en forma conjunta a partir de los materiales insaponificables de los aceites de se-

milla de extracción de limón , de mandarina , de naranja y de pomelo de Misiones ; de naranja agria de Santiago del Estero y de "kumquat" , según la técnica de Fedelli et all.³⁶ . Se emplearon placas de 20 x 20 cm recubiertas de sílicagel G (5 g de sílicagel en 10 ml de agua) utilizando 60 g de esta suspensión por placa (espesor 1mm) . Las placas se activaron por calentamiento a 110° durante 90 min. , sembrando en forma de banda el insaponificable disuelto en mezcla de éter etílico-metanol . Se sembraron alrededor de 100 mg de insaponificable (aproximadamente de 10-15 mg de esteroides totales) . Paralelamente y en forma separada se sembró una banda de 2 cm de largo con solución de insaponificable y a su lado una mancha de 0,5 cm con patrón colesterol , desarrollando durante 35 min. con mezcla hexano-éter etílico (1:1) . Las placas secas al aire , se revelaron en las bandas pequeñas con 2,7 diclorofluoresceína al 2 % observando (bajo luz U.V. , 368 nm) la posición del colesterol y la banda de esteroides del insaponificable (fluorescencia verde clara sobre fondo azul oscuro) . Excepcionalmente los raspados de la banda principal se recromatografiaron en otra placa en las condiciones ya señaladas . Los raspados de las zonas de esteroides se eluyeron con éter etílico obteniendo los esteroides que posteriormente se examinaron por C.G.L. .

A estos fines se empleó un equipo Aerograph Gas Chromatograph , modelo 204 , equipado con detector de ionización de llama , columna de vidrio Pyrex de 2 m de largo x 3 mm de diámetro interior , relleno constituido por Chromosorb G-HP (silanizado granulometría 80-100) , conteniendo 2 % de fase fija (polaridad media) OV-17 , temperatura de horno 260° , temperatura de inyector y detector 315° , N como fase móvil (presión de entrada 75-80 , escala empírica) , atenuación 12,8 y con inyecciones de 10 μ l de esteroides en solución al 5 % en cloroformo puro .

Habiendo sido señalado⁶² que la C.G.L. de esteroides libres puede verse afectada por el empleo de columnas de acero inoxidable, se utilizó la de vidrio Pyrex ya mencionada, reemplazando el inyector metálico original del equipo por una prolongación vacía de la columna de vidrio hasta el "septum".

Los valores de presión de entrada y de temperaturas de columna, inyector y detector fueron fijadas para encontrar las condiciones más convenientes de resolución de una mezcla de campesterol más β -sitosterol y stigmasterol obteniendo el cromatograma de la Figura 11, registrando los siguientes valores de T_r (expresados en cm a partir del comienzo del pico del solvente) : colesterol 17,05 ; campesterol 21,90 ; stigmasterol 26,6 y β -sitosterol 27,05 correspondientes a los siguientes valores de T_r/T_r colesterol : colesterol 1,00 ; campesterol 1,28 ; β -sitosterol 1,59 y stigmasterol 1,41 .

Los valores de T_r para distintos esteroides, expresados en cm señalaron variaciones en los distintos días de trabajo, sin duda debido a pequeñas variaciones de la presión de entrada de nitrógeno. Por ello inmediatamente después de la puesta en marcha del equipo se corrió siempre una mezcla de los patrones señalados.

En todos los cromatogramas se registraron picos correspondientes a campesterol, stigmasterol y β -sitosterol y dos picos menores, uno con valor de T_r prácticamente 1,00 (colesterol?) y otro con T_r/T_r col. 0,80.

Por evaluación de áreas se determinaron las composiciones en esteroides particulares de los esteroides totales de los aceites examinados, con los resultados que figuran en la Tabla 16. La presencia, en todos los casos, de un pico con valor de $T_r=1,00$ obligó a extremar precauciones experimentales para confirmar su presencia. En tal sentido se corrieron algunas placas en el

fraccionamiento de los insaponificables reemplazando el patrón colesterol por β -sitosterol . Aún en esas condiciones , la cromatografía gas-líquido reveló la presencia de picos de $T_r = 1,00$. A modo de ejemplo se reproduce el cromatograma correspondiente a los esteroides totales del aceite de semilla de limón (Fig.12).

4)- Harinas de extracción de semilla .-

a)- Análisis de composición general .-

Según se informó , las harinas resultantes de la extracción de aceites , se liberaron de solvente y sometieron a un análisis de composición general . En los casos de semilla de limón , de mandarina , de naranja y de pomelo procedentes de Entre Ríos y de naranja agria procedente de Santiago de Estero , las composiciones generales se determinaron sobre harina de semilla entera , harina de semilla libre de cáscara (pepa) y sobre cáscara molida .

Un estudio de composición general de harinas de semilla entera se practicó en los casos de limón , mandarina , naranja y pomelo procedentes de Misiones y además en toronja , lima , "kumquat" y pomelo "Marsh Seedless" . Se efectuaron las siguientes determinaciones :

- Humedad (A.O.A.C. Official Method 13.3 , 1950) , operando sobre 2 g de muestra (estufa , vacío , 100° hasta constancia de peso) .
- Cenizas (A.O.A.C. Official Method 13.6 , 1950) , operando sobre 1 g de muestra por calcinación en cápsula de Pt a 500-550° hasta obtención de cenizas blancas .
- Nitrógeno total (Macrométodo Kjeldahl , A.O.A.C. Official Method 2.24 , 1950) .

- Fibra cruda (A.O.A.C. Official Method 21.038 , 1965) .
- Extracto acuoso⁶³ . Alrededor de 5 g de harina exactamente pesados se colocaron en un Erlenmeyer de 250 ml , agregó 100 ml de agua dest. y taró el conjunto . Se llevó a ebullición suave que se mantuvo durante 30 min. , dejó enfriar y restableció el peso inicial con agua dest. , filtrando por papel . Del filtrado se midieron 20 ml (\approx 1 g de muestra) que se vertieron en un vaso seco y tarado , evaporando en baño de agua hirviente y secando a 100-105° hasta constancia de peso .
- Acidez del extracto acuoso . 20 ml del filtrado procedentes del extracto acuoso , se titularon con NaOH 0,1 N (fenolftaleína) , expresando los resultados en mg KOH / g de harina .

b)- Análisis cuantitativo en hidratos de carbono .-

- Azúcares reductores . Aproximadamente 20 g de harina se pesaron en un Erlenmeyer , neutralizando por agregado de 1 g de CO_3Ca , se agregaron 140 ml de etanol 50 % (v/v) y se mantuvo en baño de agua (1 hora , 83-87°) empleando un pequeño embudo en el cuello del Erlenmeyer como condensador . Una vez frío se estacionó por una noche , diluyó a 250 ml con etanol 95 % neutro , centrifugó 15 min. a 1500 rpm , lavó por dos veces el residuo con 25-30 ml de etanol neutro por vez , reuniendo los líquidos de lavado al sobrenadante original . El líquido se concentró en Rotavapor (45° , vacío parcial) hasta un volumen de 20-40 ml (eliminación de etanol) y se transfirió a un tubo de centrifuga en donde se procedió a la defecación por agregado de solución de acetato neutro de Pb (c.a. 2 ml) , agitó , estacionó por 15 min. observado la formación de un precipitado flocculento . El exceso de Pb se eliminó por agregado de solución sat. de oxalato de K seguida de centrifugación

(20-25 min. a 2500 rpm) . Finalmente se llevó a volumen en matraz aforado (250 ml) . (A.O.A.C. Official Method 22.043 , 1965) (Modificado) . Los azúcares reductores se determinaron gravimétricamente por el método de Munson y Walker (A.O. A.C. Official Method 29.038 , 1965) .

- Azúcares invertibles (A.O.A.C. Official Method 29.026 , 1965)

A una alícuota de 50 ml de la solución obtenida para la determinación de azúcares reductores , se agregaron 5 ml de HCl $\delta = 1,10$ y calentó en baño de agua a 60° durante 30 min. Se neutralizó la solución con NaOH 10 % (tornasol) y se llevó a volumen en matraz aforado . Sobre una alícuota de esta solución se determinaron los azúcares invertibles (expresados como sacarosa) por el método de Munson y Walker .

- Hidratos de carbono sacarificables⁶⁴ . Se partió de 1,5 g de harina que se suspendieron en 100 ml de agua agregando 10 ml de HCl $\delta = 1,125$. Se hirvió durante 2 hs. a reflujo y una vez fría, la solución se neutralizó con NaOH 10 % (tornasol) y centrifugó llevando el sobrenadante a un volumen final de 200 ml . Los hidratos de carbono sacarificables se determinaron por el método anteriormente citado .

c)- Identificación de los hidratos de carbono .-

Se operó sobre las soluciones preparadas para las determinaciones de azúcares reductores y de azúcares invertibles y directamente sobre el residuo remanente de la extracción etanólica de azúcares se realizó la sacarificación (HCl $\delta = 1,125$) para obtener la solución de los hidrolizados de los hidratos de carbono sacarificables . En todos los casos se procedió a la purificación de las soluciones para su posterior análisis cromatográfico .

- Purificación de las soluciones.-

Una vez obtenidas las soluciones problema se las concentró en Rotavapor (45° , vacío parcial) hasta unos 20 ml . Cada solución se pasó por columnas de intercambio iónico (para eliminar interferencias debidas a las sales presentes) . Las resinas utilizadas fueron : De-Acidite G aniónica , y Amberlite IR-120 catiónica , previamente activadas . Se sembró la columna con la totalidad de la muestra problema (~ 20 ml) y eluyó con agua destilada , recogién dose los primeros 500 ml (goteo lento) ; las columnas se lavaron con 2-3 litros de agua dest. para eliminar los azúcares retenidos mecánicamente por las resinas . Los primeros 500 ml recogidos se evaporaron en Rotavapor (40° , vacío parcial) con pequeños agregados de alcohol para ayudar la evaporación hasta sequedad . El residuo se tomó con etanol para la siembra cromatográfica .

- Identificación cromatográfica de los hidratos de carbono .-

Se prepararon placas de 20 x 20 cm con aplicador Desaga (250 μ de espesor) , según la técnica de Lewis y Smith⁶⁵ .

Se sembraron 2-3 gotas de patrones (10 mg / ml) cada 2 cm con capilar de vidrio y en las muestras la siembra varió entre 5-15 gotas según la concentración de azúcares presentes .

Para la identificación de glucosa , galactosa , xilosa y arabinosa se prepararon placas de espesor indicado con 20 g de Kieselghur G con 40 ml de buffer fosfato pH= 5,0 (para 5 placas) , dejándolas secar al aire durante una noche . El solvente de desarrollo utilizado fué : n-butanol + acetona + buffer fosfato pH= 5,0 (40:50:10) y se reveló con ácido ftálico + anilina⁶⁶ , obteniéndose un color rojo ciruela para las pentosas y marrón para las hexosas .

Para la identificación de sacarosa , las muestras se sembra-

ron en placas de sílicagel G (30 g de sílicagel en 60 ml de solución de acetato de Na 0,02 M para 5 placas) . Estas placas se activaron por 30 min. a 110° antes de su uso . El solvente de desarrollo fué : acetona + cloroformo + agua + metanol (75:10:5:10) y el revelador anilina + difenilamina + PO_3H_3 ^{67,68,69}, dando la sacarosa una mancha característica de color gris .

La fructosa se identificó en cromatografía en papel descendente , usando la misma concentración de siembra que en placa tanto para el patrón como las distintas muestras .

Se corrió durante 20 hs. en forma descendente , con una mezcla de butanol + etanol + agua (10:4:4)⁷⁰ y una vez seco el papel se reveló con resorcina + butanol + HCl 0,25 N (reactivo de grupos ceto) , dando la fructosa una mancha rosada .

Los resultados de este análisis cualitativo fueron considerados en la Discusión .

5)- Aislamiento de proteínas de una harina mezcla de semillas integrales .-

a)- Procedimiento de extracción de proteínas . Nitrógeno total extraído . Valor de pH de máxima precipitación .-

Se tomaron 300 g de cada una de las harinas de limón , de mandarina , de naranja y de pomelo , homogeneizando la mezcla por agitación (obteniéndose así la harina mezcla) . Sobre ésta se realizaron las siguientes determinaciones : Humedad ; N total ; P total^{50,51} y lisina disponible⁵³ .

En los ajustes de pH se usaron soluciones de NaOH y HCl 5 N y las respectivas soluciones diluídas . Se controlaron los valores de pH con electrodo de vidrio (pHmeter E 396 B-Metrom) . La temperatura durante la extracción del material nitrogenado

se mantuvo en baño termostatzado 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 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 .

En balón de tres bocas provisto de agitador , se colocaron 60 g de harina que se suspendieron en 1200 ml de agua dest. a pH 10,5 (relación harina/agua = 1:20) . El valor de pH 10,5 fué elegido para la extracción de la materia nitrogenada a raíz de los resultados observados en trabajos anteriores^{43,44,45,46,47,48,49} . Se agitó la mezcla mecánicamente durante una hora a 30° , manteniendo el pH de dispersión en 10,5-11,0 por agregado de solución de NaOH . El conjunto se trasvasó a tubos de centrifuga y centrifugó durante 30 min. 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/cm) . El residuo se lavó por agitación con 100-120 ml de agua dest. previamente llevada al mismo pH , centrifugó nuevamente (20 min. , 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 una segunda extracción en las mismas condiciones operativas (30° , 1 hora , agitación permanente , pH 10,5) siendo , la relación harina/agua de 1:10 , centrifugando al final del período de extracción . No se efectua-

ron lavados posteriores del residuo . Los líquidos sobrenadantes decantados , provenientes de las dos extracciones y lavados reunidos , se llevaron a volumen con agua dest. (2250 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 precipitados) , para operar la precipitación de las proteínas a diferentes valores de pH cubriendo el ámbito de valores de 3,5 a 4,8 . Las precipitaciones se efectuaron a temperatura ambiente, por agregado de HCl 5 N (ajuste final de pH con HCl diluido en cada caso) , con agitación que se continuó hasta 5 min. después de alcanzado el valor de pH deseado .

Los precipitados obtenidos se separaron por centrifugación (2000 rpm , 30 min.) , lavando en todos los casos con la misma cantidad mínima de agua dest. 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 dest. ajustada al pH respectivo (50 ml cada lavado) , centrifugando por 12 min. a 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 de color blanco agrisado . Uno de estos coágulos se secó en estufa de vacío a 45° y su color cambió al marrón oscuro , intensificándose a medida que procedía el secado . Este precipitado , una vez seco , presentó una textura granular , dura y vítrea (difícil de moler a polvo fino) .

La observación de las características de los líquidos sobre-

nadantes permitió señalar que los separados en las precipitaciones cercanas al pH isoelectrico resultaron límpidos mientras que en los correspondientes a valores de pH superiores o inferiores a aquellos la turbiedad era creciente (aspecto lechoso).

Los datos obtenidos están graficados en la Figura 13 , registrándose a pH 4,0-4,2 la máxima precipitación (valor isoelectrico) .

b)- Macroextracción de proteínas . Purificación y secado del aislado .-

Una vez determinado el valor de pH isoelectrico , se procedió a realizar dos macroextracciones para obtener cantidad suficiente de proteína para su análisis posterior .

Se partió de 200 g de harina mezcla (por vez) operando según la técnica ya descrita para la extracción . El líquido de extracción se ajustó al pH elegido como de máxima precipitación según la experiencia anterior , separando el coágulo de proteínas por centrifugación . Después de decantar el líquido sobrenadante , el precipitado se lavó dos veces (con agitación) con agua destilada previamente ajustada al valor de pH 4,0-4,2 , centrifugando al final de cada lavado (30 min. a 2800 rpm) . El aislado así lavado se purificó (tres lavados etanólicos ; etanol 96 %) por agitación (desmenuzando a fondo los grumos formados) usando una relación mínima de g de aislado proteico a ml de solvente de 1:20 y a temperatura ambiente . Los extractos etanólicos se separaron por centrifugación (8 min., 2800 rpm) y juntaron para su posterior análisis . El aislado así obtenido se secó en estufa de vacío a 45° , obteniéndose un polvo prácticamente blanco , inodoro e insípido . Se obtuvieron 56,97 g de proteína (14,2 % sobre harina mezcla de partida .) .

c)- Examen analítico del aislado proteico .-

Se efectuaron las siguientes determinaciones :

- Humedad (100° , vacío)
- Cenizas (550°)
- N total (Kjeldahl)
- P total^{50,51}
- P de ácido fítico⁵²
- Lisina disponible⁵³
- Lípidos residuales
- Hidratos de carbono^{54,55} e identificación de los azúcares constituyentes .

Para la identificación de los azúcares constituyentes de los hidratos de carbono asociados al aislado proteico , 1 g del mismo se hidrolizó según (A.O.A.C. Official Methods of Analysis 364 , 1965) prosiguiendo con las mismas técnicas mencionadas para la purificación de soluciones de azúcares y para su posterior identificación por cromatografía en placa .

d)- Determinación del contenido y características de los lípidos residuales en el aislado purificado y seco⁵⁶.-

5,0787 g de proteína blanca y seca se refluajaron durante 1 hora con 50 ml de solución al 6 % de KOH en etanol . Se enfrió , acidificó con ácido SO₄H₂ (1:1 , heliantina , placa de toque) y centrifugó a 2800 rpm durante 20 min. . El residuo se lavó por centrifugación por dos veces con 15 ml de etanol por vez . Los líquidos alcohólicos reunidos se dilayeron con 60 ml de agua y extrajeron por tres veces con 60 ml de hexano por vez previamente pasado por el insoluble inicial . Los extractos en hexano reunidos se trataron en ampolla con agua y la fase hexano se llevó a seco (Rotavapor , 40° , vacío parcial) . El residuo se disol-

vió en 50 ml de una mezcla etanol/agua (2:1 , v/v) se alcalinizó (KOH , fenolftaleína) y extrajo el material insaponificable con éter etílico , recuperando los ácidos grasos libres del insaponificable . Se obtuvieron 0,0366 g de insaponificable (0,72 % sobre proteína de partida ; 73,2 % sobre lípidos residuales) y 0,0134 g de ácidos grasos (0,26 % sobre proteína de partida ; 26,8 % sobre lípidos residuales) . El contenido en lípidos residuales totales de la proteína de partida fué de 0,98 % . Los ácidos grasos obtenidos se esterificaron con 10 ml de metanol anh. conteniendo 1,5 % de ácido SO_4H_2 conc. como catalizador y los ésteres metílicos se examinaron por C.G.L. .

e)- Estudio de los lípidos extraídos por etanol en el proceso de purificación del aislado .-

Los líquidos etanólicos procedentes de la purificación de los dos aislados proteicos obtenidos (correspondientes a 55,97 g de proteína) se concentraron a un volumen de 100 ml (Rotavapor , 60° , vacío parcial) , transfiriendo el concentrado a una ampolla de decantación donde se extrajo exhaustivamente con éter etílico . Los extractos etéreos reunidos se trataron en ampolla con solución acuosa de SO_4Na_2 a media saturación y la capa etérea , tratada con SO_4Na_2 anh. se filtró , destilando el éter en baño de agua hirviente y secando el residuo en estufa de vacío (100° , 0,5 Torr.) . Se obtuvieron 3,1293 g de un residuo lipídico (5,18 % referido a proteína blanca y seca) .

Sobre este material se determinaron los valores de acidez libre ; índice de saponificación ; índice de yodo ; contenido en material insaponificable ; ácidos grasos totales ; P de ácido fítico y composición acídica (C.G.L.) . A estos fines 2,8449 g de producto se solubilizaron en cloroformo completando a volu-

men de 50 ml . Sobre alícuotas se determinaron dichos valores con los resultados que se mencionaron en la Discusión .

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

BLA 1: Valores de algunas características físico-químicas y de rendimiento de aceites de semilla de frutos cítricos
(primeras referencias de la literatura).

Aceite de semilla de:	Rend. %	Densidad relativa (15,5°)	Ind. de refracción (25°)	Ind. de Reichert-Weissl	Ind. de Polenske	Ind. de Saponificación	Ind. de yodo	Ind. Insaponificable %	Referencias (a)
MON	28-54(*)	0,921-0,923 0,916-0,919(25/25°)	1.4712-1.4723	0,55-0,60	0,30-0,50	188-199	103-110(**)	0,4-0,8	14,15,16,27,18
RAMA	33-57,3(•)	0,921-0,925 0,915-0,920(25/25°)	1.4643-1.4712	0,70	0,40	192-197,587	5-113(••)	0,4-1,0	14,15,16,27,18
RAMA	31-40(+)	0,9212-0,9236(15/15°) 0,917-0,919(25/25°)	1.4620-1.4740 (40°)	0,27-0,50	0,42-0,50	193,5-193	100,8 (+)	0,40-0,80	14,15,2,18
MELO	28-43 (x)	0,9170 (25°) 0,917-0,920	1.4645-1.4706	0,47-0,50	0,20-0,50	193-197,292	7-106,3	0,30-0,70	15,17,18

) Semilla entera (prensado) 28%; semilla entera (extracción) 30-35 %; semilla descascarada (prensado) 40 %; semilla descascarada (extracción) 54 %.

*) Mayor concentración de valores entre 107 y 110.

) Semilla entera (extracción) 33-37 %; semilla descascarada (extracción) 54-57 %.

•) Mayor concentración de Valores entre 97 y 105.

) Semilla entera (extracción).

+) Mayor concentración de valores, alrededor de 109.

) Semilla entera (prensado?)

) Las referencias originales figuran en las obras citadas en esta columna

TABLA 2: Aceites de semilla de frutos cítricos - Valores de características físico-químicas propuestos por la American Oil Chemists' Society.

Aceite de semilla de:	POMELO	LIMON	LIMA	NARANJA
Densidad relativa (25/25°)	0,917-0,920	0,914-0,017	0,917-0,919	0,916-0,920
Ind. de refracción (25°)	1,469-1,476	1,471-1,472	1,467-1,475	1,468-1,470
Ind. de yodo (Wijs)	100-107	103-110	101-111	98-107
Ind. de saponificación	193-197	188-196	193-198	192-197
Insaponificable %	< 1	< 1	< 1	< 0,5
Indice de acetilo	10-35	13-33	-	2-11
Ind. de Reichert-Keissl	0,5-4,0	< 0,5	< 0,5	0,5-1,9
Ind. de Polenske	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Acidos saturados %	25-30	-	35-38	25-33
Acidos insaturados %	70-75	-	62-64	66-74

TABLA 3: Aceites de semilla de frutos cítricos - Composiciones acídicas determinadas por métodos ajenos a CGL (hasta 1960) - (% de Ácidos totales).

	Procedencia	14:0	16:0	16:1	16:0	18:1	18:2	18:3	20:0
C. aurantium (naranja)	S. California	-	20.7	-	4.7	36.6	36.5	0.6	0.9
C. aurantium (naranja)	India	0.7	14.2	-	19.0	8.0	54.2	-	1.2
C. aurantium (dulcis) J	Jamaica	-	23.8	-	8.3	24.8	37.1	5.3	0.7
C. aurantium (naranja)	India	0.5	19.0	0.8	8.0	32.7	32.1	6.1	0.8
C. aurantium (naranja)	Ceylan	7,4	21.8	-	6.4	27.4	34.2	2.1	0.6
C. decumana (pomelo)*	Subropical	-	20.2	-	7.5	20.7	51.4	-	-
C. dec. Var Foster (pomelo)	Trinidad	0.8	28.9	-	2.1	25.1	36.6	5.9	0.6
C. decumana (pomelo)	Trinidad	1.2	25.7	-	2.9	21.1	39.3	5.9	2.1
C. dec. (Indian Shaddock)	India	-	20.7	-	15.3	55.4	8.1	0.5	-
C. limetta (lima)	Trinidad	0.3	26.1	-	9.6	11.1	39.3	13.1	0.5
C. nobilis (tangerine) tandarira (xx)	Florida	-	19.6	-	5.2	22.5	46.6	2.1	1.1

* Además 0,2 % de 24:0

(xx) Además 2,9 % de un hidroxiaácidos

TABLA 4: Aceites de semilla de frutos cítricos - (Florida, USA) - Composiciones acídicas determinadas por C.G.L. - (%de ácidos totales).-

	<u>16:0</u>	<u>16:1</u>	<u>18:0</u>	<u>18:1</u>	<u>18:2</u>	<u>18:3</u>	<u>No de variedades</u>
POMELO	28-35 (30-35)	vest-0,3 (vest-0,2)	3-4 (3-4)	21-26 (22-26)	29-37 (36-37)	4-6 (4-6)	7
NARANJA	28-32 (30-32)	vest-2 (vest-0,1)	4-5 (4-5)	24-28 (25-28)	29-37 (36-37)	3-5 (3-5)	5
MANDARINA	24-32 (30-32)	vest-3 (vest-0,8)	2-6 (4-6)	19-27 (21-23)	34-44 (39-43)	3-6 (4-6)	9
LIMON	18-25 (23-25)	vest-4 (vest-0,2)	3-6 (3-4)	24-49 (26-30)	19-42 (30-34)	4-12 (10-12)	9
LIMA	25-29	0,1-0,3	5-5	22-22	37-39	5-11	2

TABLA 5: Valores de composición de semillas cítricas en base libre de humedad y materia grasa.-

	Prot. Cruda	Extracto libre de N	Fibra Cruda	Cenizas	Referencias
NARANJA	21.0	37.8	36.6	4.6	2
MANDARINA	32.1	65.7		2.2	2
LIMON	25.8	72.5		1.7	2
LIMA	29.2	37.6	28.4	4.8	2
POMELO	26.2	36.9	32.1	4.8	13
Mezcla de sem.	29.5	40.3	24.0	6.2	10

TABLA 6: Valores de composición de partes de semillas cítricas, en base libre de humedad y materia grasa.-

	Prot. Cruda	Extracto libre de N	Fibra Cruda	Cenizas	Referencias
Cáscara de semilla de naranja	5.8	36.9	52.6	4.7	2
Cáscara de semilla mezcla	6.2	40.0	49.2	4.5	10
Semilla mezcla libre de cáscara	47.8	37.7	7.6	6.9	10

TABLA 7: Comparación de las composiciones en aminoácidos de harinas de semilla de cítricos con la harina de soya.-

Aminoácidos	NARANJA (x)	POMELO (x)	SOYA (x)
Acido Aspártico	548	560	731
Treonina	186	181	241
Serina	239	290	320
Acido Glutámico	1539	1623	1169
Prolina	256	253	343
Glicina	322	272	261
Alanina	231	230	266
Cistina	110	174	83
Valina	307	333	300
Metionina	112	165	79
Isoleucina	219	224	284
Leucina	394	446	489
Tirosina	168	166	196
Fenilalanina	306	296	309
Lisina	178	175	399
Histidina	128	108	158
Arginina	695	596	452
Triptofano	125	79	80

(x) Mg AA/g N en producto.-

TABLA 8: Limonoides más comunes presentes en frutos cítricos.-

	Obacunona	Limonina	Diacetil nomilina
<i>C. medica</i> Linn	+	+	-
<i>C. limón</i> (Linn) Burnt	+	+	-
<i>C. aurantifolia</i> (Christm) Swing	-	+	+
<i>C. aurantium</i> Linn	-	+	+
<i>C. Sinensis</i> (Linn) Osbeck	+	+	+
<i>C. reticulata</i> Blanco	+	+	+
<i>C. Grandis</i> (Linn) Osbeck	+	+	+
<i>C. Paradisi</i> Marf	+	+	+
<i>C. Indica</i> Tan	+	+	+
<i>C. Tachibana</i> (Mack) Tan	+	+	+
<i>C. Ichangensis</i> Swing	+	+	+
<i>C. Macroptera</i>	-	+	+
<i>C. Lystrix</i> D.C.	-	+	+

TABLA 9: Distribución de Flavonoides en algunas especies del género Citrus²⁷.-

ESPECIES ¹	FLAVONAS METILADAS ⁴	FLAVANONAS GLICOSIDOS ⁵
Citrus aurantium ³	nobiletina+5-demetil derivado auranetina+5 demetil derivado 5-hidroxy auranetina	hesperidina, neohesperidina y naringonina
deliciosa (anteriormente reticulata)	tangeretina nobiletina	hesperidina
grandis	desconocido	naringenina
Jambiri v. "nagaland"	tangeretina+5-demetil derivado	hesperidina
v. "assam"	tangeretina	hesperidina + neohesperidina
limón ²	limocitrol, limocitrina e isolimocitrol	eriocitrina y hesperidina
f. ponderosa	desconocido	neohesperidina
medica	desconocido	hesperidina
paradisi	3,5,6,7,8',3,4', heptametoxyflavona tangeretina	naringina, poncirina, hesperidina y neohesperidina

REFERENCIAS TABLA 9:

- 1.- No fue posible controlar la validez de los nombres de las siguientes especies: Jambiri, Poconensis y Tankan.
- 2.- También contiene diosmina y glicósidos de apigenina, luteolina, chryseriol, quertina e isornametina.
- 3.- También contiene apigenina-7-rutinósido.
- 4.- Nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxy), auranetina (3,6,7,8,4'-pentametoxy); tangeretina (5,6,7,8,4'-pentametoxy); sinensetina (5,6,7,3',4'-pentametoxy) y sudachina (6,7,3'-trimetoxy-5,8,4'-trihidroxiflavona).
- 5.- Hesperidina= hesperetina-7-rutinósido; neohesperidina= hesperidina-7-neohesperidósido; poncirina= isosakuranetina-7-neohesperidósido; eriocitrina= eriodictyol-7-rutinósido.

TABLA 10: Flavonoides aislados de naranja "Valencia" y mandarina "Robinson".-²⁸

<u>METOKSYFLAVONAS</u>	<u>NARANJA</u>	<u>MANDARINA</u>
I.- 5-OH, 3, 7, 8, 3', 4'	+	-
II.- 5-OH, 3, 6, 7, 8, 3', 4'	+	
III.- 5-OH, 6, 7, 8, 3', 4'	-	+
IV.- 5-OH, 6, 7, 8, 4'	-	+
V.- 5, 6, 7, 8, 4'	+	+
VI.- 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'	+	-
VII.- 5, 6, 7, 4'	+	
VIII.- 3, 5, 6, 7, 3', 4'	+	
IX.- 5, 6, 7, 8, 3', 4'	+	+
X.- 5, 6, 7, 3', 4'	+	+
XI.- 3, 5, 7, 8, 3', 4'	+	
XII.- 5, 7, 8, 4'	+	+
XIII.- 5, 7, 8, 3'	+	+

TABLA 11 : Producción argentina de frutos cítricos en el período 1973/74 .-

	LIMÓN		MANDARINA		NARANJA		POMELO	
	TON.	%	TON.	%	TON.	%	TON.	%
Corrientes	14.800	4,8	35.000	15,2	365.000	43,8	36.000	20,4
Misiones	-	-	-	-	110.000	13,2	-	-
E.Ríos	16.700	5,5	95.000	41,3	94.000	11,3	54.000	30,5
Tucumán	218.600	71,4	16.600	7,2	76.000	9,1	23.400	13,2
Bs.As.	-	-	21.600	9,4	63.000	7,6	11.700	6,6
Salta	23.400	7,7	13.000	5,7	47.000	5,6	21.100	11,9
Jujuy	22.000	7,2	10.000	4,3	41.000	4,9	12.800	7,2
Santa Fe	-	-	31.000	13,5	23.000	2,8	-	-
Entre Ríos	-	-	-	-	-	-	9.100	5,2
CORD. PROV.	10.500	3,4	7.800	3,4	14.000	1,7	8.900	5,0
TOTALES	306.000	100,0	230.000	100,0	833.000	100,0	177.000	100,0

TABLA 12: Producción argentina de frutos cítricos en el período 1972/73 en relación a su industrialización.-

	Fracción industrializada	
	T O T A L	%
Limón	232.200	101.230 44,0
Mandarina	248.700	8.264 1,2
Naranja	782.800	122.085 15,6
Pomelo	179.400	116.059 64,7

A 13: Características de la semilla y de los aceites de semillas de frutos cítricos de producción nacional.

DEDENCIA	POMELO		NARANJA		MANDARINA		LIMON		LIXON		NARANJA	
	E. R.	M.	E. R.	M.	E. R.	M.	E. R.	M.	E. R.	M.	E. R.	M.
Ac. Asc/pepa %	28.0/72.0	24.8/75.2	27.7/72.3	31.0/69.0	30.2/69.8	27.7/72.3	29.5/70.5	35.2/64.8	-	-	-	-
Acid. en semilla %	10.68	6.76	8.86	10.50	6.50	6.82	10.89	7.43	-	-	-	-
Acid. %sem. tal cual	34.82	38.57	38.62	34.49	34.93	39.00	32.22	30.21	-	-	-	-
Acid. %sem. seca	39.00	41.36	42.37	38.53	37.35	41.85	36.04	32.63	-	-	-	-
Acid. relativa 25/40	0,9122	0,9135	0,9140	0,9142	0,9136	0,9138	0,9151	0,9151	0,9142	0,9142	0,9117	0,9117
Refracc. (25°)	1,4690	1,4690	1,4690	1,4690	1,4689	1,4690	1,4703	1,4705	1,4700	1,4700	1,4680	1,4680
Saponific.	198,0	192,9	197,6	198,0	196,2	193,6	196,6	193,8	191,3	191,3	194,3	194,3
de yodo (Wijs)	102,6	100,1	98,5	101,0	100,4	98,7	113,5	112,2	112,4	112,4	96,3	96,3
Acid. (mg KOH/g)	14,54	4,97	0,99	8,07	12,3	10,5	9,11	2,62	4,10	4,10	7,60	7,60
Saponif. total %	2,07	1,56	1,53	1,48	1,54	1,78	1,95	1,36	1,55	1,55	1,36	1,36
de yodo insap.	92,2	92,5	93,5	92,9	96,5	80,8	97,9	95,5	104,5	104,5	99,2	99,2
Acid. tot.(sap.) %	92,75	93,52	93,27	91,36	92,75	92,33	91,50	93,85	94,51	94,51	95,29	95,29
Acid. tot (mg/g)	361,3	317,2	315,0	251,3	263,7	166,5	353,9	229,1	344,0	344,0	248,0	248,0
Acid. tot. (mg/g)	31,6	33,4	31,1	28,4	19,2	18,3	23,8	19,9	3,4	3,4	17,8	17,8
lipídico (mg/g)	6,6	25,5	16,9	16,3	18,2	32,6	32,7	27,8	-	-	-	-

aceites crudos de prensa.-

TABLA 14 : Aceites de semilla de pomelo , naranja , mandarina y limón de producción nacional . Composiciones acídicas (% de ácidos totales)(x) .

		<u>14:0</u>	<u>16:0</u>	<u>18:0</u>	<u>18:1</u>	<u>18:2</u>	<u>18:3</u>	<u>I.Yodo</u> <u>Aceite</u>
Limón	Mis.	0,1	21,2	3,5	32,6	32,8	9,8	112,2
	E.Ríos	0,1	21,9	2,9	29,3	34,4	11,4	113,5
Mandarina	Mis.	vest.	22,4	5,5	30,1	30,7	2,3	98,7
	E.Ríos	vest.	22,3	5,7	28,7	40,5	2,8	100,4
Naranja	Mis.	vest.	26,3	4,7	24,2	41,6	3,2	101,0
	E.Ríos	vest.	29,5	4,1	24,4	37,2	4,8	98,5
Pomelo	Mis. ⁺	vest.	30,7	3,7	22,3	38,2	4,8	100,1
	E.Ríos	vest.	31,6	2,4	21,0	40,3	4,7	102,6
Limón ⁺⁺	Mis.	0,05	21,2	3,7	29,6	35,7	9,8	112,4
Naranja ⁺⁺	Mis.	0,05	29,0	5,6	25,1	37,1	3,2	96,9

(x) - En todos los aceites , rastros de 16:1 ; r-17:0 y 17:1 o r-18:0 .

(+) - Además 16:1 (0,7)

(++) - Aceites crudos de prensa .

TABLA 15: Aceites de semilla de pomelo, naranja, mandarina y limón
(Misiones) - Composiciones ácidas exhaustivas (% de ac.
totales).-

	LIMON (Misiones)	NARANJA (Misiones)	POMELO (Misiones)	MANDARINA (Misiones)
<u>12:0</u>	vest.	vest.	vest.	vest.
<u>13:0</u>	vest.	vest.	vest.	vest.
<u>13:1 (x)</u>	vest.	vest.	vest.	vest.
<u>14:0</u>	0,06	0,20	0,07	0,07
<u>r-15:0</u>	vest.	vest.	vest.	vest.
<u>15:0</u>	vest	0,02	0,01	0,04
<u>15:1 (x)</u>	vest.	vest.	vest.	vest.
<u>r-16:0</u>	vest.	vest.	vest.	vest.
<u>16:0</u>	20,59	25,78	28,09	21,40
<u>16:1</u>	0,22	0,66	0,46	0,44
<u>r-17:0</u>	vest.	vest.	vest.	0,02
<u>17:0</u>	vest.	vest.	vest.	0,02
<u>r-18:0 (xx)</u>	vest.	vest.	vest.	0,04
<u>18:0</u>	3,89	4,98	3,54	0,29
<u>18:1</u>	31,14	23,01	23,03	28,68
<u>18:2</u>	33,60	41,40	39,79	38,98
<u>18:3</u>	9,82	3,38	4,53	2,98
<u>20:0</u>	0,34	0,21	0,19	0,57
<u>20:1</u>	0,12	0,01	0,06	0,08
<u>r-22:0</u>	vest.	vest.	-	0,01
<u>22:0</u>	0,06	0,09	0,05	0,11
<u>r-23:0</u>	0,01	vest.	vest.	
<u>23:0</u>	0,02	0,03	0,02	0,03
<u>r-24:0</u>	0,01	vest.	vest.	-
<u>24:0</u>	0,11	0,22	0,13	0,18
<u>r-25:0</u>	0,01	0,01	0,03	0,06

(x) Considerando los valores PR, no se descarta la posibilidad que tales picos de los cromatogramas comprendan a r-14:0 y r-10:0
 (xx) Probablemente comprendería vest. de 17:1

TABLA 16 : Cromatografía gas-líquido de esteroides totales de aceites de semilla de cítricos (3 de esteroides totales) .

	Tr/T _R colest. 0,80 (?)	Tr/T _R colest. 0,70-1,00 (colest.?)	Campesterol	Stigmasterol	β-sitosterol
Naranja	2,7	0,9	14,5	2,3	80,2
Mandarina	2,4	0,4	14,1	3,5	79,6
Pomelo	2,5	0,3	10,3	1,0	85,9
Limón	2,1	1,4	14,7	1,9	79,9
Naranja agria	0,1	0,8	12,7	1,5	78,9
"Kumquat"	21,3	0,6	14,5	1,8	61,5

TABLA 17: Características de la semilla y aceites de semilla de los cítricos: naranja agria, Citrus aurantium var. myrtifolia Ker-Gawl (x), toronja "Meteor, lima "Dulce de Palestina", pomelo "Marsh Seedless" y de kumquat (género Fortunella)

Procedencia	Naranja agria		Toronja "Meteor"		Lima Dulce de Palestina		Pomelo Marsh Seedless		Fortunella margarita (kumquat)	
	Sgo. del Este	ro	Concordia (E. Rios)	Concordia (E. Rios)	Concordia (E. Rios)	Concordia (E. Rios)	Concordia (E. Rios)	Concordia (E. Rios)	Concordia (E. Rios)	Gran Bs.As.
Relac. Casc./pepa %	29,3/70,7		50,4/49,6	26,9/73,1	27,9/72,1	27,9/72,1	27,9/72,1	27,9/72,1	27,9/72,1	27,4/72,6
Humedad en semilla %	8,00		11,36	7,97	9,23	9,23	9,23	9,23	9,23	5,41
Aceite % sem.tal cual	38,88		17,44	36,43	30,40	30,40	30,40	30,40	30,40	37,47
Aceite%sem. seca	42,25		19,67	39,60	33,50	33,50	33,50	33,50	33,50	39,61
Densidad relativa 25/4°	0,9136		-	-	-	-	-	-	-	-
Ind. Refracc. (25°)	1,4693		1,4706	1,4700	1,4692	1,4692	1,4692	1,4692	1,4692	1,4702
Ind. Saponific.	193,4		194,2	195,7	192,1	192,1	192,1	192,1	192,1	195,6
Ind. de yodo (Wijs)	102,9		104,5	107,6	100,6	100,6	100,6	100,6	100,6	107,9
Acidez (mgKOH/g)	1,06		2,90	2,11	2,57	2,57	2,57	2,57	2,57	2,65
Insaponific. total %	1,33		3,76	3,25	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	4,19
Ind. yodo insap.	92,3		97,1	92,9	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	96,8
Acidos tot. (sap.) %	94,15		-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroles tot.(mg%g)	312,8		-	-	-	-	-	-	-	321,2
Tocoferoles tot.(mg%g)	26,2		-	-	-	-	-	-	-	-
P. lipídico (mg%g)	26,9		-	-	-	-	-	-	-	-

(x) Dada la poca disponibilidad de semilla se procedió a la extracción de aceite y a la determinación de la composición acídica en Citrus aurantium L. var. myrtifolia Ker-Gawl. La relación cáscara/pepa en esta especie es 31,2/68,8 y el rendimiento en aceite % pepa tal cual 52,3 % .-

Tabla 18: Aceites de semilla de Naranja agria, Citrus aurantium L. var myrtifolia Ker-awl, Toronja "Meteor", Lima "Dulce de Palestina", Pomelo "Marsh" Seedless y Fortunella margarita (Lour) Swingle (Kumquat) - Composiciones acídicas (% de ácidos totales).

		14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Naranja agria	vest.		27,8	4,8	20,0	34,3	7,1
C. aurantium L.	vest.		26,1	3,0	25,5	39,1	6,3
Toronja "Meteor"	vest.		28,7	3,0	20,5	42,4	5,4
Lima "Dulce de Fal"	vest.		26,2	2,9	29,1	38,5	3,3
Pomelo "Marsh" (x)	0,1		31,9	2,9	20,7	40,1	4,0
Kumquat (xx)	vest.		20,3	4,4	29,6	40,9	4,6

En todos los aceites rastros de : 16:1, r-17:0, 17:0, 17:1 y r-18:0.

(x) Además 16:1(0,3)

(xx) Además 16:1(0,2)

TABLA 19: Composición general de harinas integrales de naranja, pomelo, mandarina y limón
Procedentes de Misiones y de harinas integrales de toronja, lima, pomelo "Marsh
Seedless" y kumquat (Género Fortunella).

	Humedad %	Cenizas %	Proteínas % Nx6,25	Fibra Cruda% de N por dif.	Extracto Libre de N por dif.	Proteínas % (Nx6,25) base seca	Relac. Casc/pe- pa
NARANJA							
Har. sem. entera	11,70	4,54	22,69	39,8	21,19	25,70	31,0/69,0
POMELO							
Har. sem. entera	8,72	-,93	23,81	25,1	37,44	26,08	24,8/75,2
MANDARINA							
Har. sem. entera	9,40	6,36	21,06	27,2	35,98	23,24	27,7/72,3
LIMON							
Har. sem. entera	10,12	3,91	28,94	28,6	28,43	32,20	35,2/64,8
TORONJA							
Har. sem. entera	9,19	3,71	14,50	30,5	42,10	15,97	50,4/49,6
LIMA							
Har. sem. entera	7,23	4,46	25,90	23,1	39,31	27,92	26,9/73,1
KUMQUAT							
Har. sem. entera	7,00	4,90	22,00	-	-	23,66	27,4/72,6
POMELO MARSH SEED.							
Har. sem. entera	9,08	4,44	20,75	18,6	47,13	22,57	27,9/72,1

TABLE 20: Composición general de harinas integrales, harinas de papa y cáscara molida de naranja, pomelo, limón y mandarina, procedentes de Entre Ríos y naranja agria de Santiago del Estero.

	Humedad %	Cenizas	Proteínas (x6.25)	Fibra Cruda %	Extracto Libre del por dif.	Proteína% (Nx6.25) base seca
NARANJA						
Har. sem. entera	12,68	4,65	21,88	20,70	40,09	25,09
Har. papa	10,35	7,32	35,56	6,50	40,27	39,67
Casc. molida	10,87	2,34	5,75	41,90	39,14	6,45
POMELO						
Har. sem. entera	9,93	4,59	22,75	24,30	38,43	25,27
Har. papa	14,45	6,50	36,59	5,30	37,06	43,00
Casc. molida	10,00	2,10	5,56	42,00	40,34	6,18
MANDARINA						
Har. sem. entera	9,81	5,52	21,25	23,50	40,32	23,56
Har. papa	8,75	7,88	33,44	6,10	43,83	36,65
Casc. molida	10,89	2,39	5,50	42,40	38,81	6,17
LIMON						
Har. sem. entera	10,45	3,30	28,25	25,40	31,60	31,66
Har. papa	11,88	5,84	50,44	6,20	25,64	57,25
Casc. molida	10,65	0,81	4,75	49,10	34,69	5,33
NARANJA AGRIA (Sgo. del Estero)						
Har. sem. entera	10,50	3,98	22,12	31,40	32,03	24,78
Har. papa	14,88	3,98	41,25	6,00	31,06	48,47
Casc. molida	11,04	1,39	2,94	51,50	33,13	3,30

TABLA 21 : Harinas de semilla integral de frutos cítricos (E.Ríos).
Valores de extracto acuoso y sus contenidos proteicos .

	NARANJA	POMELO	LIMON	MANDARINA	NARANJA AGRIA
Extracto acuoso %	25,20	24,76	18,20	26,82	20,21
Acidez Ext.acuoso (mg KOH/g harina)	5,37	6,95	6,55	6,89	5,08
% N en Ext.acuoso	3,53	4,35	4,03	3,73	5,20
N de extrac.% de harina	0,89	1,08	0,73	1,13	1,05
N sol.% N total en harina	26,49	29,67	16,15	33,24	29,66

TABLA 22: Composición en Hidratos de Carbono de harinas de limón, mandarina, naranja y pomelo (E.Rios) y naranja agria (Sgo. del Estero)

	NARANJA	LIMON	POMELO	MANDARINA	NARANJA AGRIA
% AZ. Reductores (en glucosa)	0,76	0,20	1,38	1,58	0,22
% AZ. Invertibles (en sacarosa)	3,46	2,07	3,60	3,02	2,46
% Hidratos de Car- bono sacarificables (en almidón)	16,13	15,56	11,85	14,16	12,49

TABLA 23: Identificación de los hidratos de carbono presentes en harina delimón, mandarina, naranja y pomelo (E.Rios) y naranja agria (Sgo. del Estero). -

<u>Muestra tal cual</u>	<u>GLU</u>	<u>GAL</u>	<u>FRU</u>	<u>SAC</u>
NARANJA	+	+	+	
POMELO	+		+	+
LIMON	+		+	+
MANDARINA	+		+	
NARANJA AGRIA		+	+	
<u>Muestra invertida</u>				
NARANJA	+	+	+	
POMELO	+		+	
LIMON	+	+	+	
MANDARINA	+	+	+	
NARANJA AGRIA		+	+	
<u>H. de C. Sacarif.</u>				
	<u>GAL</u>	<u>XIL</u>	<u>ARA</u>	
NARANJA	+	+	+	
POMELO	+	+	+	
LIMON	+	+	+	
MANDARINA	+	+	+	
NARANJA AGRIA	+	+	+	

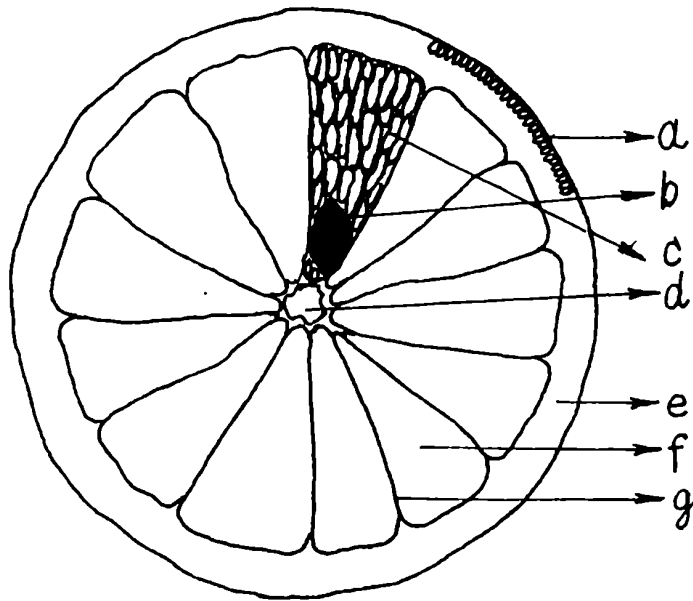


Figura 1 : Naranja . Corte transversal .-

- a) Flavedo y sacos de aceite esencial .
- b) Semilla .
- c) Sacos de jugo .
- d) Corazón o centro .
- e) Albedo .
- f) Lóculos o segmentos .
- g) Membranas de lóculos .

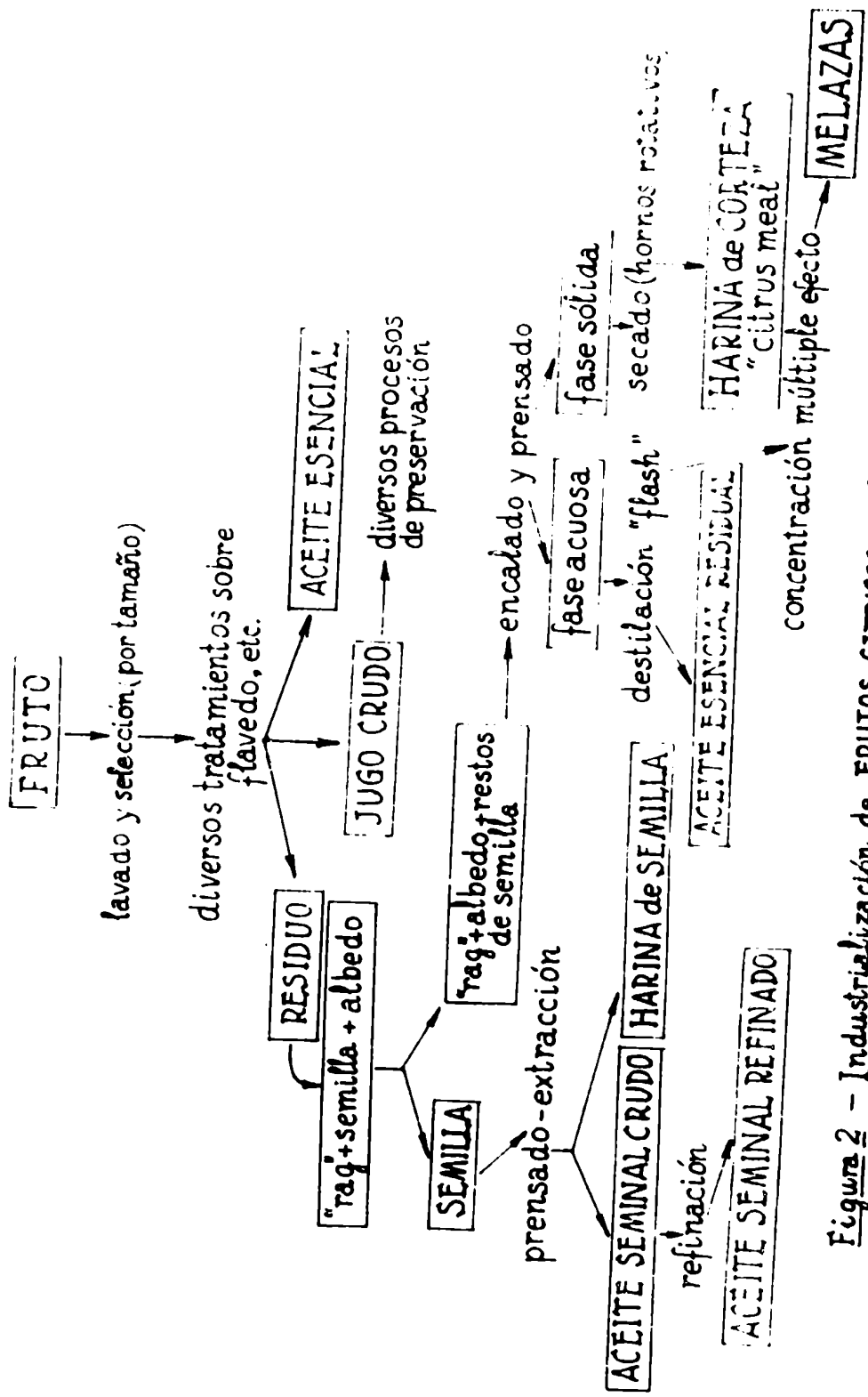


Figura 2 - Industrialización de FRUTOS CITRICOS - SUBPRODUCTOS

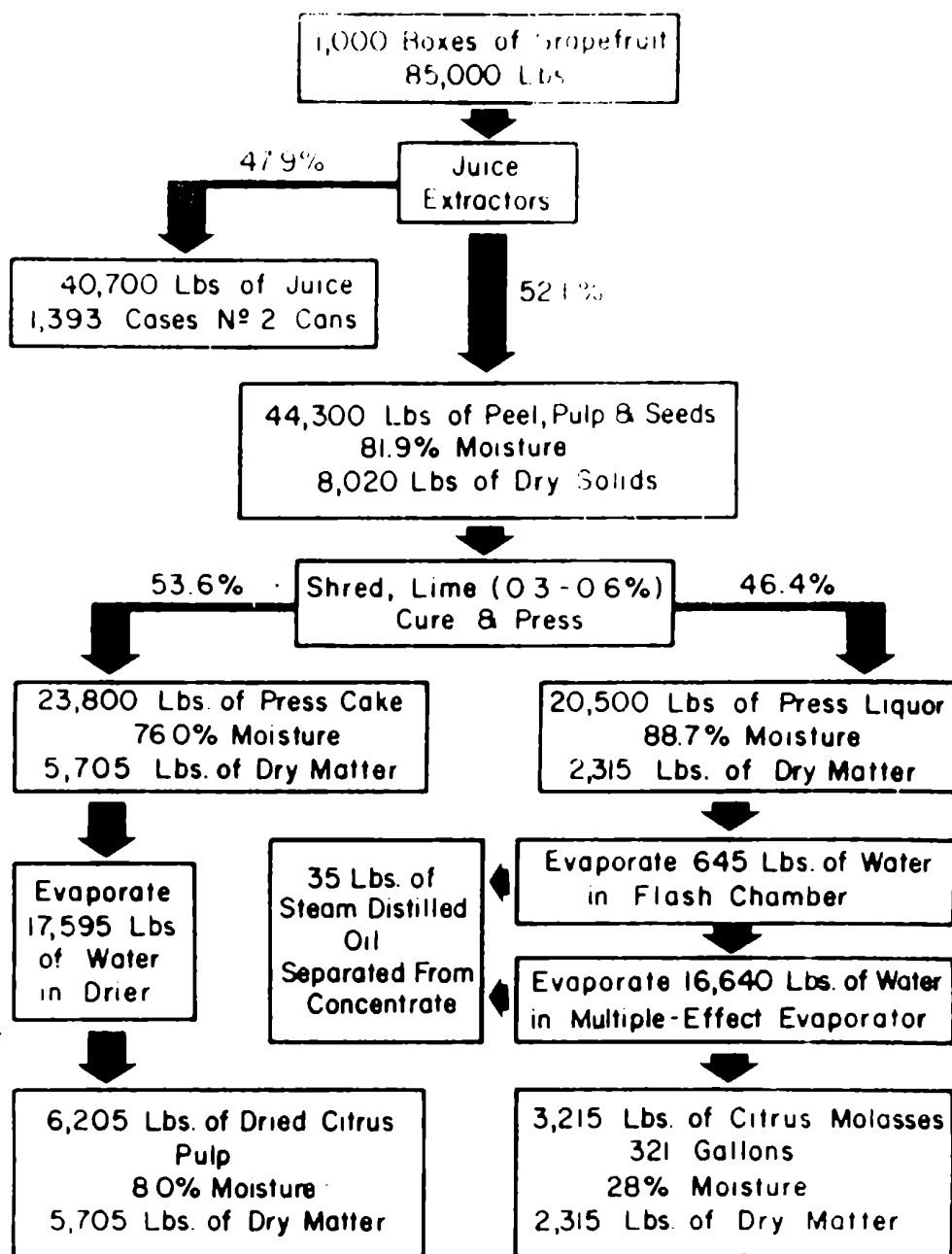


Figura 3 : Procesamiento y balance de materiales de residuos de la industrialización de pomelo . Transformación en "dried pulp" y melazas . (Tomado de R.Hendrickson y J.W.Kesterson , "By-products of Florida Citrus" , Agricultural Experimente Stations , Univ. of Florida , U.S.A. , 1965) .

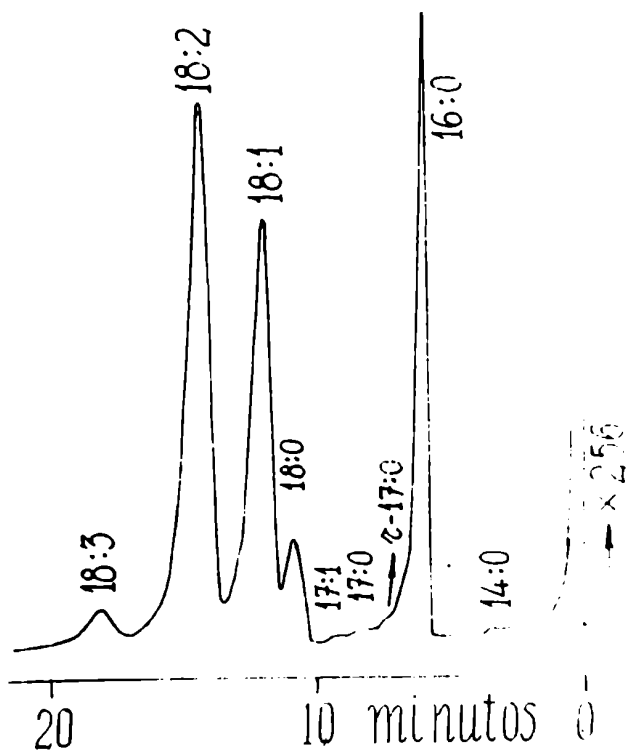
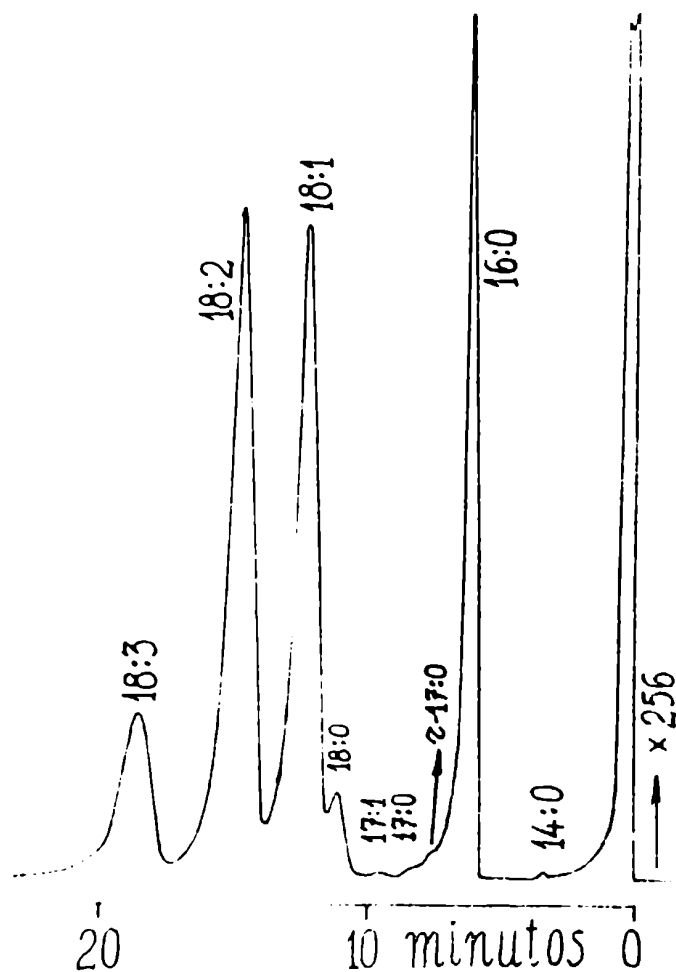


Figura 4 : Aceite de semilla de mandarina (E.Ríos) . Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales.

Figura 5 : Aceite de semilla de limón (E.Ríos) . Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales .



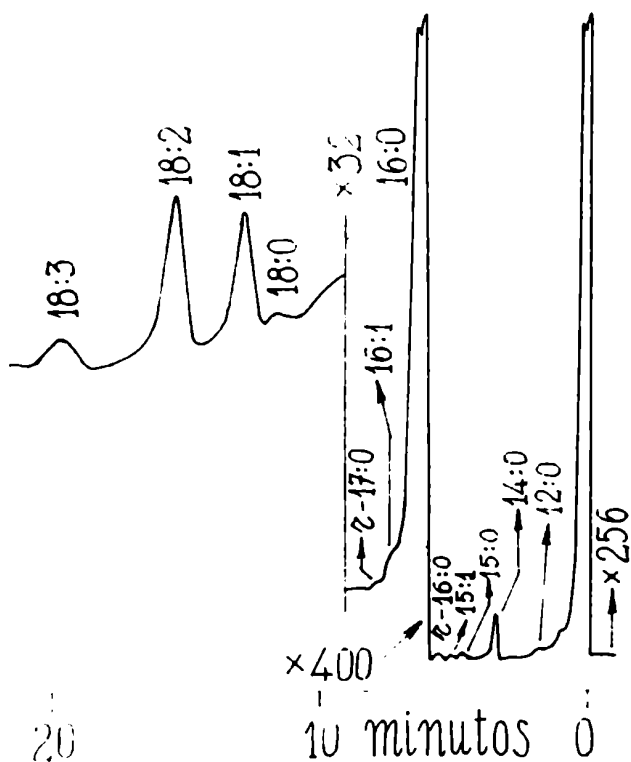
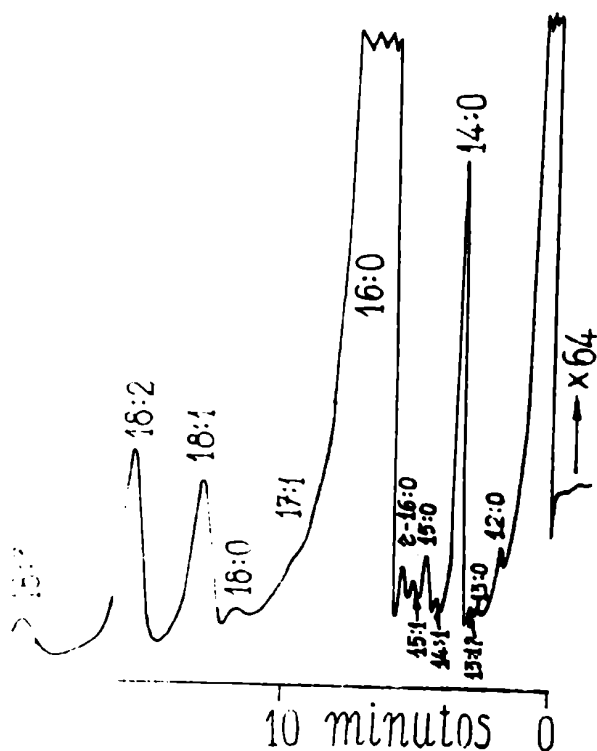


Figura 6 : Examen exhaustivo de la composición acídica de aceite de semilla de limón . Cromatografía gas-líquido de la fracción 1 de la destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales .

Figura 6' : Examen exhaustivo de la composición acídica de aceite de semilla de limón . Cromatografía gas-líquido "amplificada" de la fracción 1 de la destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales.



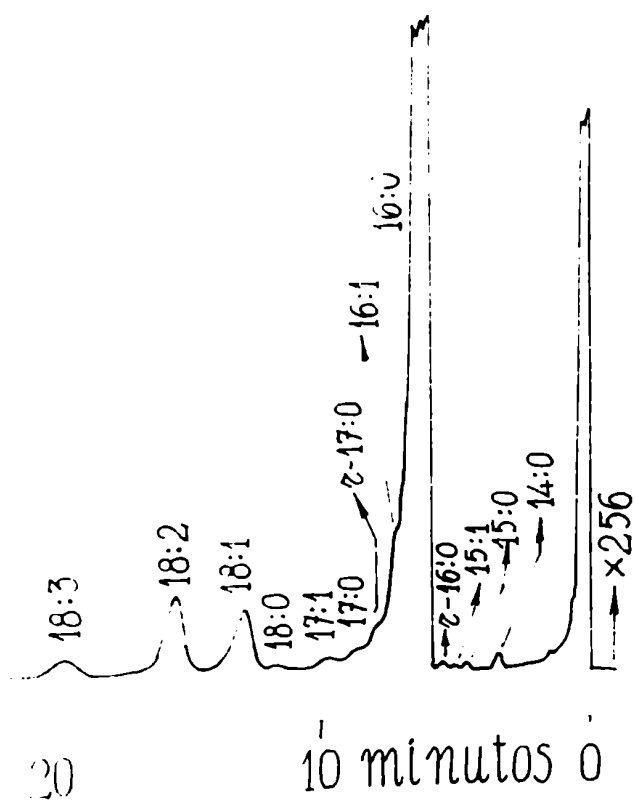
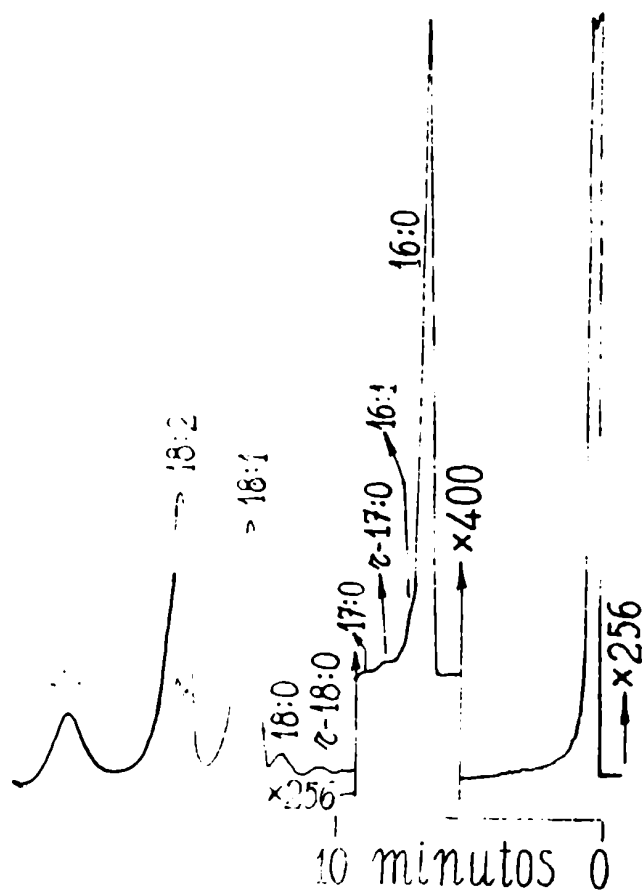


Figura 7 : Examen exhaustivo de la composición acídica de aceite de semilla de limón . Cromatografía gas-líquido de la fracción 2 de la destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales .

Figura 8 : Examen exhaustivo de la composición acídica de aceite de semilla de limón . Cromatografía gas-líquido de la fracción 3 de la destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales .



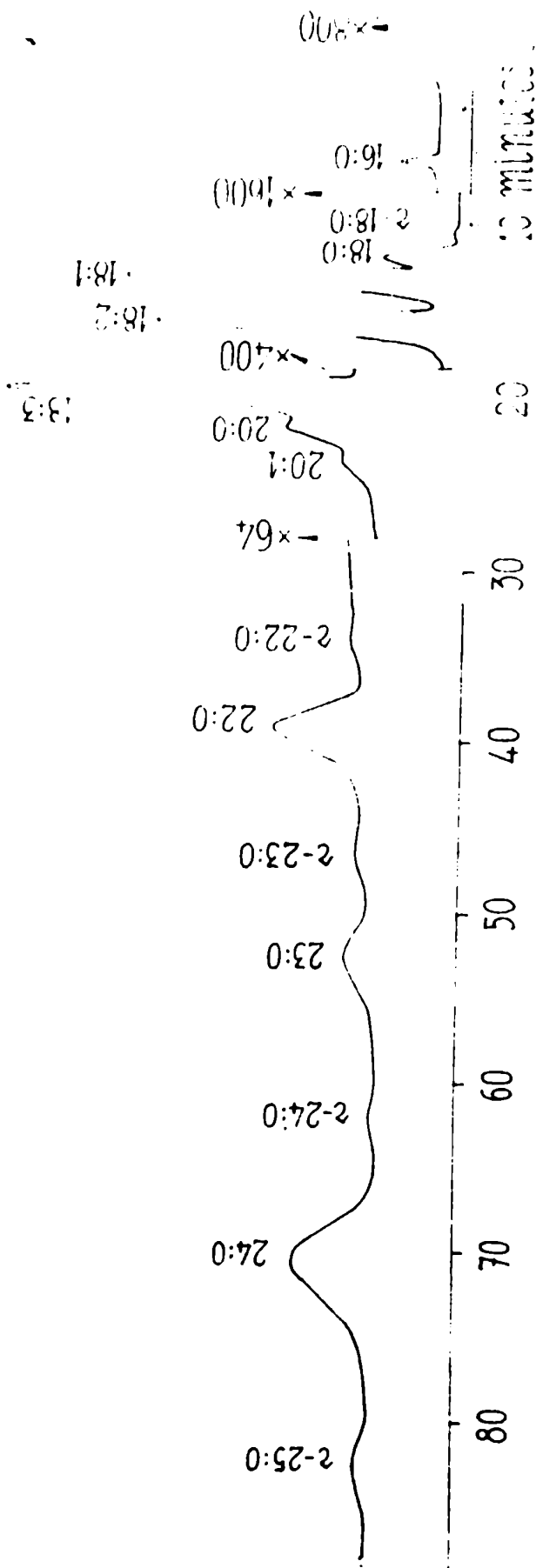


Figura 9 : Examen exhaustivo de la composición ácida de aceite de semilla de limón .
Cromatografía gas-líquido del residuo de destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales .

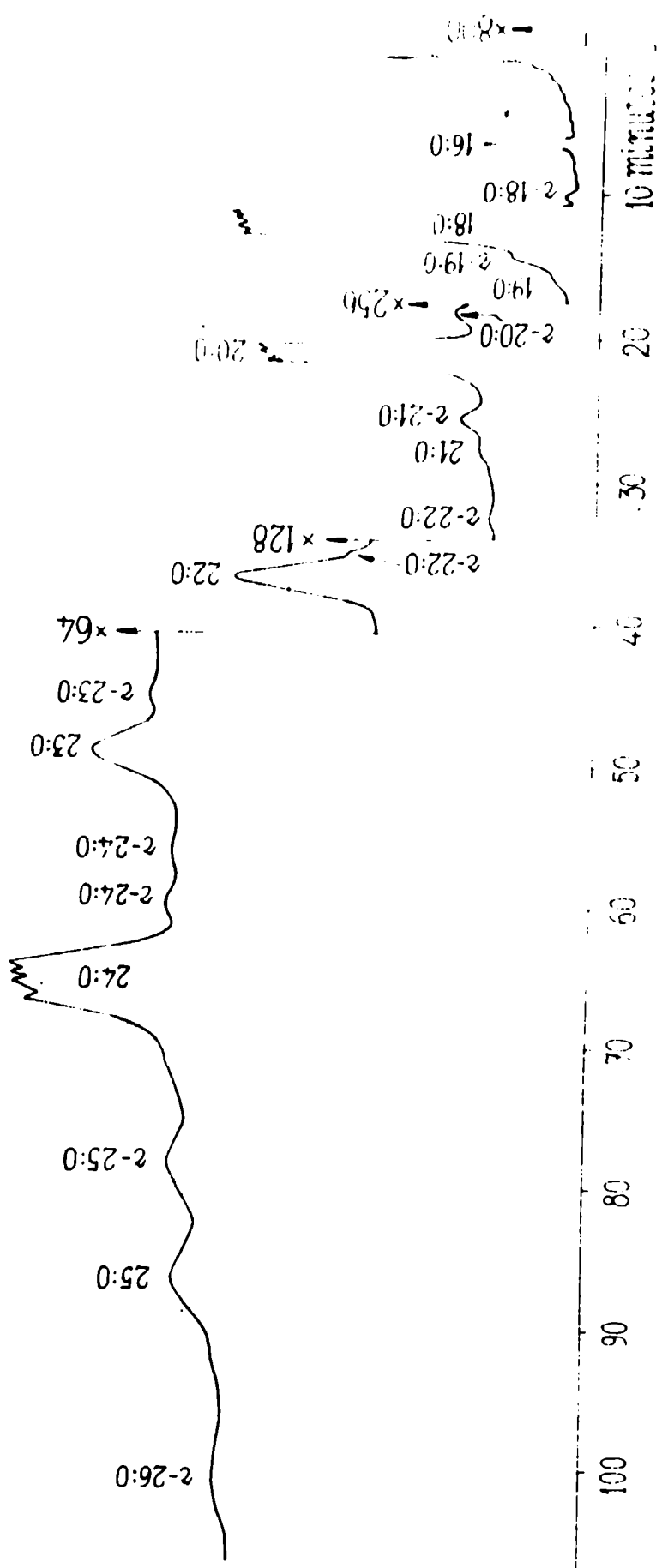


Figura 10 : Examen exhaustivo de la composición ácida del aceite de semilla de limón .
Cromatografía gas-líquido de los ésteres hidrogenados del residuo de destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales .

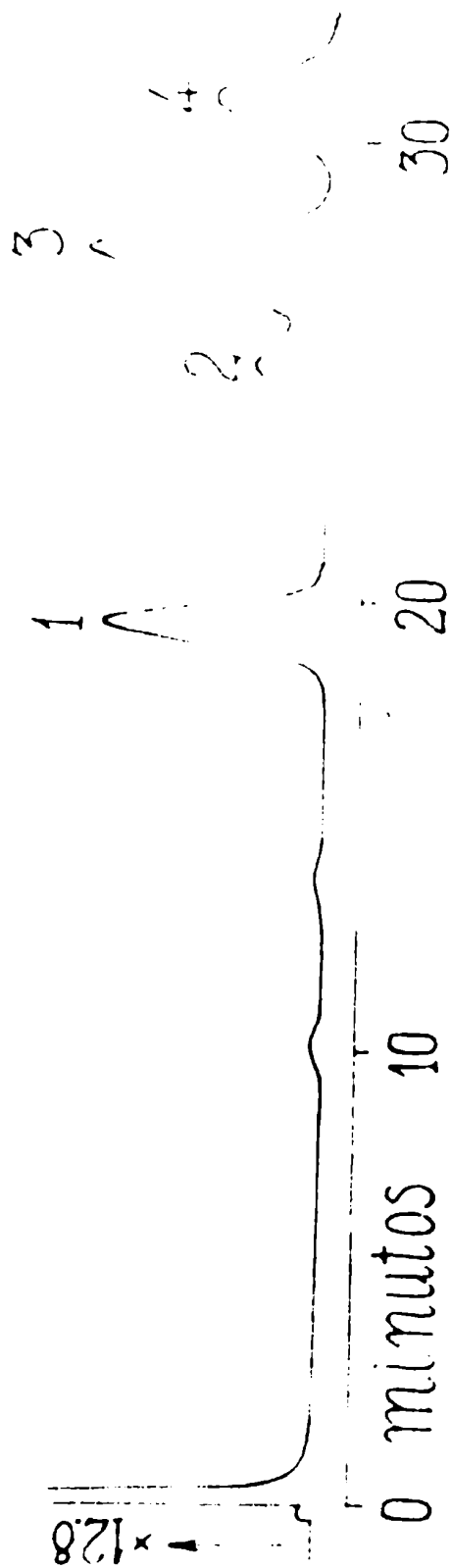


Figura 11 : Cromatografía gas-líquido de una mezcla de esteroides patrones . Valores de T_r colesterol : pico 1 = 1,00 (colesterol) ; pico 2 = 1,28 (campesterol) ; pico 3 = 1,41 (stigmasterol) ; pico 4 = 1,59 (β -sitosterol) .

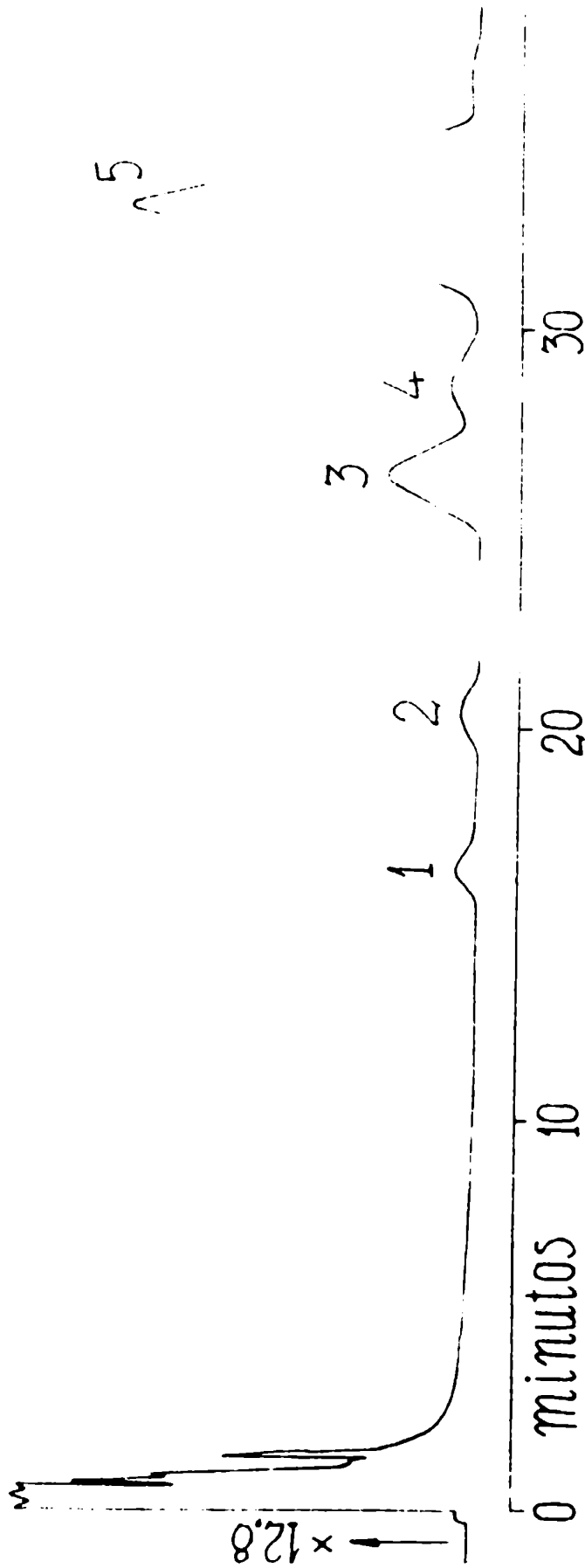


Figura 12 : Aceite de semilla de limón . Cromatografía gas-líquido de la fracción de esteroides (detalles en el texto) . Valores de T_r/T_r colesterol : pico 1 = 0,80 (?); pico 2 = 1,00 (colesterol?); pico 3 = 1,29 (campesterol); pico 4 = 1,40 (stigmasterol); pico 5 = 1,62 (β -sitosterol) .

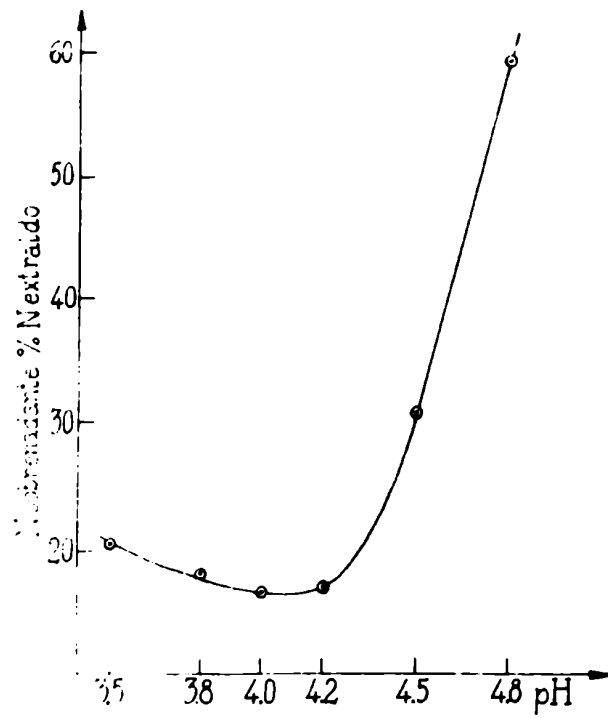


Figura 13 : Proteínas de una mezcla (partes iguales) de harinas de semilla de limón , mandarina , naranja y pomelo . Determinación del valor de pH de máxima precipitación (4,0-4,2) .-

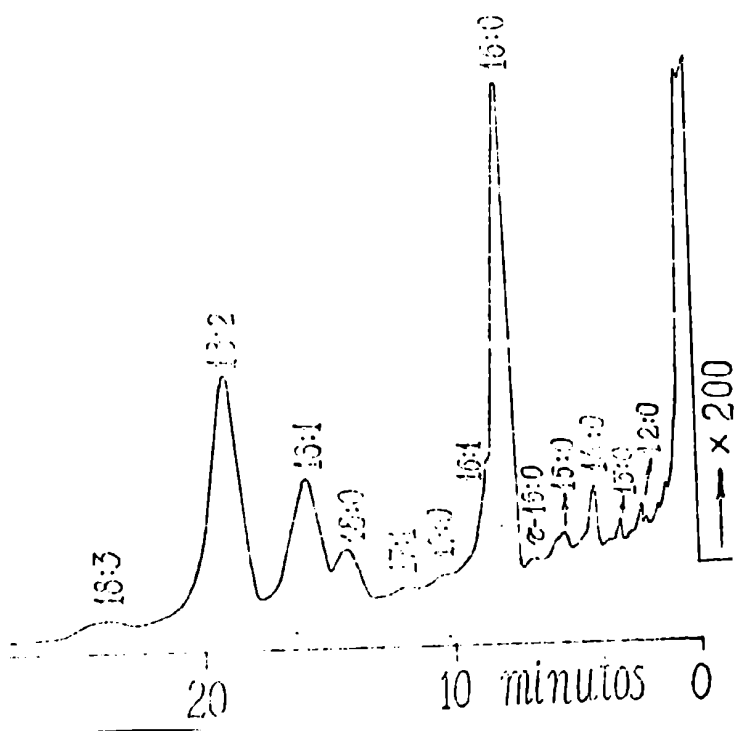
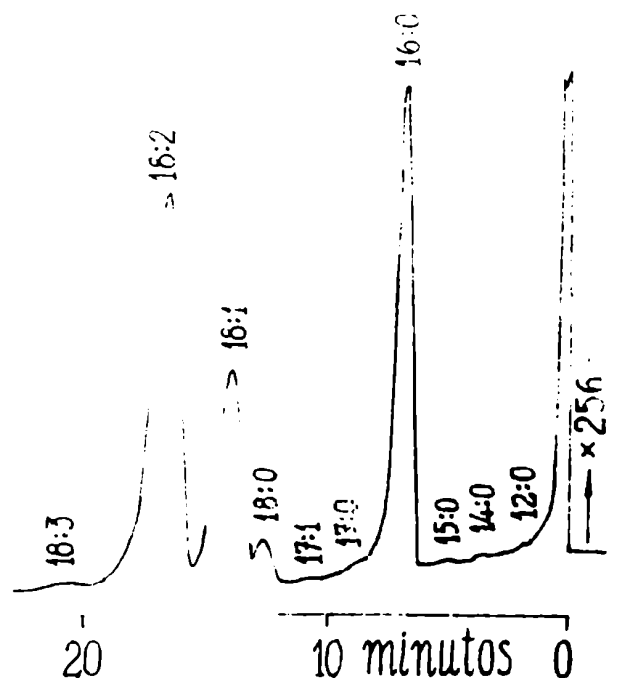


Figura 14 : Composición acídica de los lípidos residuales (separados por saponificación drástica) de proteínas purificadas (agotadas por etanol) de una mezcla (partes iguales) de harinas de semilla de limón , naranja , mandarina y pomelo . Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales.

Figura 15 : Composición acídica de lípidos asociados (extraíbles por etanol) a proteínas precipitadas de una mezcla (partes iguales) de harinas de semilla de limón , mandarina , naranja y pomelo . Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales .



- IV -

- CONCLUSIONES -

Fundamentalmente el objetivo de este trabajo ha sido el estudio de uno de los principales subproductos residuales de la industrialización de los frutos cítricos de producción nacional : la semilla , tema no considerado en el país hasta el presente .

A modo de Introducción se presenta un listado de las especies botánicas de género Citrus que comprende a las que se cultivan en el país , un esquema general de industrialización de frutos cítricos maduros en el que se ubican los subproductos principales y una información actualizada sobre los tratamientos a que éstos se someten con fines de aprovechamiento . Esta Introducción informa , además , valores de composición química de semilla entera , de los demás subproductos , características físico-químicas y composiciones acídicas de aceites seminales de los principales frutos cítricos de producción e industrialización masiva registrados en la literatura .

La experimentación llevada a cabo se refirió a semilla residual de la industrialización (hacia la producción de jugos , dulces y mermeladas) de los siguientes frutos : pomelo , naranja , mandarina , limón y naranja agria , cosechados e industrializados en establecimientos de las provincias de Entre Ríos , Misiones y Santiago del Estero . Además , estudios similares sobre semillas de frutos de otras especies no industrializadas : toronja , lima , "kinoto" (C. aurantium var. myrtifolia Ker-Gawl) y de "kumquat" (Fortunella margarita (Lour.) Swingle , género Fortunella) .

Las conclusiones logradas son las siguientes :

- 1- Desde que los contenidos en aceites seminales ocurren principalmente en el endospermo de las semillas , se determinaron en todos los casos los valores de las relaciones cáscara/pepa o endospermo . Se registraron cifras similares en las cuatro

especies principales observando las mayores concentraciones en pepa para pomelo (72,0-75,2 %) y los más bajos para mandarina y limón (69,8 y 64,8 %, respectivamente) . Para naranja agria , lima y "kumquat" también se observaron altos contenidos en pepa (70,7-73,1 %) . La semilla de toronja reveló un valor para esa relación totalmente distinto (49,6 % de pepa) .

- 2- Los rendimientos en aceites crudos de extracción (hexano) expresados sobre sustancia seca operando sobre semilla entera oscilaron entre 36,0 y 42,4 % , observándose los valores más bajos para semilla de limón (32,6-36,0 %) . En los demás (incluso naranja agria , lima y "kumquat") los rendimientos oscilaron entre 37,3 y 42,4 % . En cambio , se observó un rendimiento sumamente bajo para semilla de toronja (19,7 % , en parte debido al menor contenido en pepa de la semilla). Los rendimientos en aceite crudo calculados en % de pepa seca para naranja , pomelo , limón y mandarina oscilaron entre 50,4 y 58,6 % , cifras acordes con las registradas en la literatura .
- 3- Que los valores de índice de yodo de los aceites crudos de todas las semillas consideradas oscilaron en margen estrecho 98,5-113,5 , observando los más elevados para aceite de semilla de limón (112,2-113,5) . Los de naranja y mandarina observaron valores muy similares (98,5-101,0) mientras los de pomelo fueron algo superiores (100,1-102,6) . Las cifras observadas para naranja agria , toronja , lima y "kumquat" fueron crecientes en el orden : 102,9 ; 105,5 ; 107,6 ; 107,9 . Estas cifras son acordes con las observadas en la bibliografía y confirman los mayores valores para aceite de semilla de limón .

- 4- Que los valores de nº de acidez de los aceites crudos oscilaron entre límites amplios (1,0-14,5 mg KOH/g) y que ello debe atribuirse a la acción de lipasas como consecuencia de daños sufridos por la semilla durante su obtención , por los lapsos transcurridos entre la obtención de la semilla y la extracción de los aceites y , por los valores de humedad en semilla al momento de extracción (6,5-10,9 %) .
- 5- Que los contenidos en tocoferoles totales de todos los aceites crudos considerados oscilaron entre 8,3 y 33,4 mg % g (como α -tocoferol) , observando los mínimos (8,4-17,8 mg % g) para aceites de prensa de semilla de limón y naranja respectivamente . Estas cifras de contenidos en tocoferoles son muy bajas y del orden de las registradas para aceite de oliva e indicativas de la conveniencia de proteger a estos aceites con antioxidantes primarios y secundarios de uso permitido frente a la autoxidación .
- 6- Que ninguno de los aceites examinados exhibió insaturación conjugada preexistente (dienos y trienos) y que los exámenes de composición acídica (C.G.L. de ésteres metílicos de los ácidos totales) señalaron como componentes "mayores" a 16:0 (20,3-31,9 %) , 18:1 (20,5-32,6 %) ; 18:2 (30,7 - 42,4 %) y prácticamente a 18:3 para aceite de semilla de limón (9,8-11,4 %) . Como componentes "menores" o en muy bajas concentraciones se observaron 18:0 (2,4-5,7 %) , y concentraciones en general inferiores a 0,1 % para 16:1 ; r-17:0 ; 17:0 ; 17:1 o r-18:0 .
- 7- Los aceites de naranja y pomelo fueron los más ricos en 16:0 (26,3-31,6 %) y los de limón y mandarina los más pobres en ese componente (21,2-22,4 %) . Los de mandarina y naranja fueron los de mayor concentración en 18:0 (4,1-5,7 %) y los

de limón y pomelo de contenidos parejos (2,4-3,7 %) . Los de mandarina y limón observaron las cifras más elevadas para 18:1 (20,1-32,6 %) y los de naranja y pomelo las más bajas (21,0-25,1 %) . Respecto a los contenidos en 18:2 , los aceites de mandarina , naranja y pomelo observaron cifras parejas (37,1-41,2 %) , mayores que las registradas para aceite de limón (32,8-35,7 %) . Los contenidos más elevados en 18:3 se registraron para aceite de limón (9,8-11,4 %) y los más bajos en los de mandarina (2,3-2,8 %) .

Los tenores en ácidos saturados totales (16:0 + 18:0) oscilaron entre 24,7 % para limón y 34,0 % para pomelo , siendo los de mandarina y de naranja de contenidos intermedios en esos componentes . En razón de los elevados contenidos en ácidos saturados y en las concentraciones para glicéridos conteniendo dos radicales acilo saturados para aceites de semilla de lima y de naranja (registrados en literatura) cabría suponer que la refinación de estos aceites debe incluir el proceso de "winterización" , como ocurre en la refinación de aceite de semilla de algodón .

- 8- Que exámenes de composición acídica de aceites de semilla de limón , naranja , pomelo y mandarina realizados por combinación de la destilación fraccionada de los ésteres metílicos de los ácidos totales y de los exámenes C.G.L. de las fracciones y residuos de destilación revelaron , además de los componentes citados , otros en muy bajas concentraciones o en el orden de las trazas , a saber : 12:0 ; 13:0 ; 13:1 ; r-15:0 ; 15:1 ; r-16:0 ; r-17:0 ; r-18:0 ; r-22:0 ; r-23:0 ; r-24:0 y r-25:0 y que un examen por C.G.L. de un residuo de destilación de los ésteres metílicos de los ácidos totales de aceite de limón confirmó a r-18:0 ; r-19:0 ; r-20:0 ; dos

ácidos ramificados en 22:0 (iso y anteiso) r-23:0 ; dos ácidos ramificados en 24:0 (iso y anteiso) ; r-25:0 y r-26:0. La presencia de estos ácidos ramificados y de otros (existentes en glicéridos y fosfolípidos de aceites seminales y lípidos de pulpa de frutos cítricos) había sido registrada en la literatura .

- 9- Que los contenidos en esteroles totales (digitonina) de todos los aceites crudos estudiados oscilaron entre 167 y 361 mg % g , con una mayor concentración de valores entre 230 y 320 mg % g .

Que un examen de composición de los esteroles totales por C.G.L. , mostró en todos los casos , cinco componentes , uno con valor Tr/Tr colesterol 0,80 (?) , otro con Tr/Tr colest. prácticamente 1,00 (colesterol ?) , campesterol , stigmasterol y β -sitosterol . Las concentraciones en estos componentes (determinadas por computación de áreas) , señalaron para el componente supuesto colesterol un valor máximo (1,4 % sobre esteroles totales) para aceite de semilla de limón y cifras entre 0,3 y 0,8 % para los casos restantes ; concentraciones entre 2,1 y 2,7 % para el componente Tr/Tr colest. 0,80^(?) en los casos de limón , mandarina , naranja y pomelo , de 6,1 % para naranja agria y 21,3 % para el de "kumquat" (género Fortunella) . Los contenidos en campesterol fueron mínimos para pomelo (10,4 %) y muy semejantes en los demás casos (12,7-14,8 %) . Las concentraciones en stigmasterol fueron mínimas para pomelo (1,0 %) y de 1,5-3,5 % en los casos restantes . β -sitosterol registró cifras parejas 78,9-85,9 % para naranja agria , naranja , mandarina , pomelo y limón y una cifra muy inferior (61,5 %) para aceite de semilla de "kumquat" (género Fortunella) .

Se concluye que la semilla residual de los frutos cítricos que se industrializan en el país constituye una fuente potencial hacia la producción de aceites que , debidamente refinados (eliminación de principios amargos) reunirían condiciones para uso alimentario en razón de sus composiciones acídicas y de la experiencia que en tal sentido se ha logrado en los EE.UU de Norteamérica . Dichos aceites , así mismo constituirían (luego de procesos de semirefinación) una materia prima que a través de adecuados procesos de hidrogenación serían de utilidad a la industria alimentaria .

Desde que la extracción de aceites seminales deja como subproducto las llamadas harinas de extracción se consideró de interés el examen químico de las mismas con énfasis en sus contenidos proteicos y en el aislamiento de "aislados proteicos" a los fines de su estudio analítico preliminar . La experimentación sobre estos productos llevó a las siguientes conclusiones :

- 1- Los análisis generales de composición de harinas de extracción de semilla integral , revelaron contenidos acuosos uniformes (7,0-11,7 %) , cifras algo más variables de contenido: en cenizas (3,7-6,4 %) con un máximo para harina de semilla de mandarina (6,4 %) y un mínimo para el de toronja (3,7 %) . Los tenores en fibra cruda oscilaron entre 18,0 y 39,8 % (mayor concentración de valores entre 23 y 28 %) , con el contenido más elevado para harina de semilla de naranja (39,8 %) y el más bajo para el caso de pomelo "Marsh Seedless" (18,6 %) . Los contenidos en proteínas (N x 6,25 ; base seca) oscilaron entre 16,0 y 32,2 % , observándose el valor mínimo en harinade semilla de toronja (16,0 %) y el más elevado en la de limón (32,2 %) . Los tenores en proteína (% de pepa ; base

seca) oscilaron entre 36,6 y 57,2 % (mandarina y limón respectivamente) , cifras que avalan la conveniencia del descascarado previo de la semilla antes de la extracción de aceite . De tal modo , las harinas de pepa (libre de cáscara) constituyen prácticamente concentrados proteínicos con contenidos en fibra cruda inferiores al 7 % , de sabor amargo y útiles en forma directa en la alimentación animal .

- 2- La composición en hidratos de carbono de estas harinas revela como componentes principales a los hidratos de carbono sacarificables (ausencia de almidón) con tenores de 11,85 % en pomelo a 16,13 % en naranja (expresados como almidón) . Se observaron tenores bajos en azúcares reductores 0,20-1,58 % (como glucosa) y cifras entre 2,07-3,60 % (como sacarosa) para azúcares invertibles . Estas evaluaciones se complementaron con la identificación de los azúcares y de los azúcares componentes de los hidratos de carbono sacarificables . Se observó la presencia de glucosa , fructosa y sacarosa en pomelo y limón ; glucosa, galactosa y fructosa en naranja ; galactosa y fructosa en naranja agria y glucosa y fructosa en mandarina . Los azúcares identificados en los hidrolizados de los hidratos de carbono sacarificables fueron en todos los casos galactosa , xilosa y arabinosa .
- 3- No existiendo información de la literatura sobre "aislados proteicos" de harinas de semilla de cítricos se procedió , en esta oportunidad , a la preparación y análisis de una harina mezcla (partes iguales) de pomelo , limón , mandarina, y naranja . Se determinó el valor de extracción de compuestos nitrogenados 10,5- 11,0 y determinó el valor de pH de máxima precipitación (4,0-4,2) . Se observó un valor de extracción de N total relativamente bajo (65,9 %) y como consecuencia se determinaron esos valores para las distintas harinas inte-

grantes de la mezcla registrando las siguientes cifras : limón 66,0 ; mandarina 67,4 ; naranja 76,3 y pomelo 68,2 % .

- 4- Sobre la base de los rendimientos de extracción registrados y del valor de máxima precipitación se obtuvieron 57 g (14,2 % de aislado a partir de 400 g de harina mezcla) a los fines de su purificación y análisis . Se obtuvo mediante lavados etanólicos del coágulo (eliminación de pigmentos y lípidos asociados) seguido de secado (45° , vacío) , un aislado en forma de polvo prácticamente blanco , inodoro e insípido (eliminación de principios amargos) .
- 5- El análisis del aislado señaló : Humedad (100° , vacío) 3,57 % ; Cenizas (500°) 1,38 % ; N total (Kjeldahl) 13,58 % (14,20 % en base libre de humedad y cenizas) ; P total (P) 0,14 % ; Ac.Fítico (como P) 0,07 % ; Lisina disponible 3,00 g / 16 g N ; Lípidos residuales 0,98 % e Hidratos de carbono asociados 13,42 % . En el residuo seco de la harina agotada en medio alcalino se observó un contenido de 6,66 g de lisina disponible / 16 g N total y por tanto el valor observado para lisina disponible en el aislado no debe atribuirse únicamente a una reducción de la disponibilidad de lisina de la harina de partida (4,23 g de lis./ 16 g N) . El bajo contenido en N (13,58 %) sugirió la existencia en el mismo de componentes no nitrogenados , lo cual fué confirmado al probar la presencia de un polisacárido íntimamente asociado (13,42%), cuyos azúcares componentes se identificaron (luego de hidrólisis) como galactosa , glucosa , xilosa y arabinosa . Este polisacárido no pudo disociarse por redisolución en medio alcalino y reprecipitación a pH isoelectrico .
- 6- Tanto los lípidos extraíbles por etanol en el proceso de purificación del coágulo proteico como los asociados al aisla-

do seco final , se analizaron en sus composiciones acídicas por C.G.L. de los ésteres metílicos de sus ácidos totales , complementando el estudio de los primeros con otras determinaciones analíticas (Índices de yodo , de saponificación ; nº de acidez , ácidos grasos totales , insaponificable y P lipídico) .

- B I B L I O G R A F I A -

- BIBLIOGRAFIA -

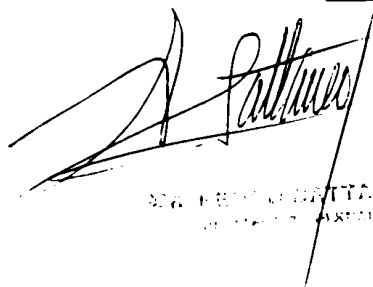
- 1- E.W.ECKEY , "Vegetable Fats and Oils", American Chemical Society Monograph Series , Reinhold Publ. Corp., N.York , 1954 , pág. 548-552 .
- 2- A.L.WINTON y K.B.WINTON , "The Structure and Composition of Foods", vol. II , Vegetables , Legumes , Fruits ; J.Wiley & Sons , Inc., N.York , 1935 , pág. 682-718 .
- 3- M.J.DIMITRI y L.R.PARODI , "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería" , 2^a ed., Edit. Acme S.A.C.I., 1972 , pág. 550-552 .
- 4- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE , U.S.A., "Chemistry and Technology of Citrus , Citrus Products and By-products" , Agriculture Handbook N° 8 , Washington , 1962 , pág. 2,3,11 .
- 5- D.K.TRESSLER y M.A.JOSLYN , "Fruit and Vegetable Juice Processing , Technology" , Westport , Connecticut , The Avi Publ. Co., Inc. 1961 , pág. 842 .
- 6- R.HENDRICKSON y J.W.KESTERSON , "Proc. of the Florida Horticultural Society" , Miami Beach , (Florida , U.S.A.) , 74 , 219 (1961) .
- 7- R.HENDRICKSON y J.W.KESTERSON , "Proc. of the Florida Horticultural Society" , Miami Beach (Florida , U.S.A.) , 77 , 347 (1964) .
- 8- R.HENDRICKSON y J.W.KESTERSON , "J.Am.Oil Chem.Soc." , 40 , 746 (1963) .
- 9- R.HENDRICKSON y J.W.KESTERSON , "Proc. of the Florida Horticultural Society" , Miami Beach (Florida , U.S.A.) , 76 , 249 (1963) .
- 10- R.HENDRICKSON y J.W.KESTERSON , "By-products of the Florida Citrus . Composition , Technology and Utilization" , Agricultural Experiment Stations , Univ. of Florida , U.S.A., Bull. 698 , 1965 , pág. 12,45 .


- 11- C.M.LYMAN , K.A.KUIKEN y F.HALE , J.Agr.Food Chem. , 4 ,
1008 (1956) .
- 12- P.M.TOWNSLEY , M.A.JOSLYN y C.J.B.SMITH , Food Res. , 18 ,
522 (1953) .
- 13- A.M.ALTSCHUL , "Processed Plant Protein Foodstuffs" , Acade-
mic Press Inc., Publ. N.York , 1958 , pág. 869-871 .
- 14- A.J.NOLTE y H.W.von LOESECKE , Ind.Eng.Chem. , 32 , 1244(1940) .
- 15- R.J.BRADOCK y J.W.KESTERSON , "Citrus Seed Oils" , Bull.756 ,
Agric. Experiment Stations , Inst. of Food and Agric. Sci.,
Univ. of Florida , Gainesville , U.S.A.(1973) .
- 16- J.LEWKOWITSH , "Chemical Technology and Analysis of Oils , Fats
and Waxes" , 6^a ed., McMillan and Co., Ltd. London , 1922 ,
vol. II , pág. 232 .
- 17- G.S.JAMIESON , "Vegetable Fats and Oils" , Reinhold Publ. Corp.
2^a ed., N.York , 1943 , pág. 232-233 .
- 18- G.B.MARTINENGI , "Chimica e Tecnologia degli Oli , Grassi
e Derivati" , U.Hoepli , Milano , 1947 , pág. 206 .
- 19- H.G.KIRSCHENBAUER , "Fats and Oils . An Outline of their Che-
mistry and Technology" , Reinhold Publ. Corp., N.York , 1954 ,
pág. 550-553 .
- 20- E.W.ECKEY , "Vegetable Fats and Oils" , Reinhold Publ. Corp.,
N.York , 1954 , pág. 550-553 .
- 21- A.O.C.S. "Official and Tentative Methods of the American Oil
Chemists Society" , vol.II with additions and revisions 1947-
1963 , Tabla I , pág. 1-46 .
- 22- T.P.HILDITCH y P.N.WILLIAMS , "The Chemical Constitution of
Natural Fats" , Chapman and Hale , 4^a ed., London , 1964 ,
pág. 268 , 378, 380, 451, 453, 688 .
- 23- L.J.SWIFT , J.Am.Oil Chem.Soc. , 26 , 438 (1949) .
- 24- C.L.HINTON , "Fruit Pectins . Their Chemical Behaviour and
Jellying Properties" , Chemical Publ. Co., Inc., N.York ,
1940 , pág. 31 .

- 25- R.J.BRADDOCK y J.W.KESTERSON , J.Am.Oil Chem.Soc. , 49 , 671 , (1972) .
- 26- D.L.DEYER , Phytochem. , 5 , 366 (1966) .
- 27- J.B.HARBONE , "Comparative Biochemistry of the Flavonoids" , Academic Press London and N.York , 1967 , pág. 175-177 .
- 28- J.H.TATUM y R.E.BERRY , Phytochem. , 11 , 2283-2288 (1972) .
- 29- Asociación de Productores de Frutas Argentinas , "Tercera Estimación de la Producción de la Fruta Cítrica . Campaña Agrícola 1973/1974" .
- 30- M.H.BERTONI y P.CATTANEO , Anales Asoc.Quim.Argentina , 47 , 52 (1959) .
- 31- W.W.MARION , S.T.MAXON y R.M.WANGEN , J.Am.Oil Chem.Soc. , 47 , 391 (1970) .
- 32- P.CATTANEO y G.KARMAN de SUTTON , Anales Asoc.Quim.Argentina , 46 , 96 (1950) .
- 33- P.CATTANEO , G.KARMAN de SUTTON , N.S.COSTANZO , M.H.BERTONI y J.M.CANAL , Anales Asoc.Quim.Argentina , 49 , 192 (1961) .
- 34- H.E.NORDBY y S.NAGY , Phytochem. , 8 , 2027 (1969) .
- 35- M.A.T.BARROSO , J.A.MOURA FE , F.M.WHITING , W.H.BROWN y J. W.STULL , J.Am.Oil Chem.Soc. , 49 , 85 (1972) .
- 36- E.FEDELÌ , A.LANZANI , P.CAPELLA y G.JACINI , J.Am.Oil Chem.Soc. , 43 , 254 (1966) .
- 37- M.L.RODENSTEIN y P.CATTANEO , Anales Asoc.Quim.Argentina , 62 , 333 (1974) .
- 38- N.D.SZTARKER y P.CATTANEO , Anales Asoc.Quim.Argentina , (en prensa) . N.D.Sztarker Tesis , Fac. de Ciencias Exactas y Naturales , U.B.A. (1974) .
- 39- J.A.SVOBODA , M.J.THOMPSON , T.C.ELDEN y W.E.ROBBINS , Lipids , 9 , 752 (1974) .
- 40- S.A.BABACKHODZHAIEVA , T.A.ABDULLALV (URSS) , Tr.Tashk.Politekh.Inst. , 90 , 68 (1972) ; C.A.: 83:176879 w .

- 41- TAE MYOUNG JEONG ; TOSHIRO ITOH ; TOSHITAKE TAMURA ; TARO MAYSUMO , Lipids , 9 , 921 (1974) .
- 42- I.DASSO , M.S.VIGO y P.CATTANEO , Comunicación privada .
- 43- M.H.BERTONI y P.CATTANEO , Anales Asoc.Quim.Argentina , 60 , 363 (1972) .
- 44- A.O.RUCCI y M.H.BERTONI , Anales Asoc.Quim.Argentina , 61 , 165 (1973) .
- 45- M.S.VIGO , M.H.BERTONI y P.CATTANEO , Anales Asoc.Quim.Argentina , 61 , 241 (1973) .
- 46- L.VILLEGAS VARELA y M.H.BERTONI , Anales Asoc.Quim.Argentina , 62 , 309 (1974) .
- 47- L.A.ZAPUTOVICH , M.H.BERTONI y P.CATTANEO , Anales Asoc. Quim.Argentina , 60 , 43 (1972) .
- 48- M.H.BERTONI y P.CATTANEO , Comunicación privada .
- 49- M.S.VIGO , M.H.BERTONI y P.CATTANEO , Comunicación privada .
- 50- G.R.BARTLET , J.Biol.Chem. , 234 , 466 (1969) .
- 51- M.S.VIGO , Tesis , Fac. de Ciencias Exactas y Naturales , U.B.A. (1972) .
- 52- A.O.RUCCI y M.H.BERTONI , Anales Asoc.Quim.Argentina , 62 , 365 (1974) .
- 53- E.Y.CONKERTON y V.L.FRAMPON , Archives of Biochemistry and Biophysics , 81 , 130 (1959) .
- 54- M.DUBOIS , K.A.GILES , J.K.HAMILTON , P.A.REBERS y F.SMITH , Anal.Chem. , 28 , 350 (1956) .
- 55- R.L.WHISTLER , M.L.WOLFROM , "Methods in Carbohydrate Chemistry" , vol. I , Academic Press , N.York . 388 (1962) .
- 56- W.SZUTOWICZ , J.Am.Oil Chem.Soc. , 42 , 264 (1965) .
- 57- M.H.BERTONI y P.CATTANEO , Anales Asoc.Quim.Argentina , 61 , 129 (1973) .
- 58- H.FORCHIERI ; M.H.BERTONI , G.KARMAN de SUTTON y P.CATTANEO , Anales Asoc.Quim.Argentina , 58 , 313 (1970) .

- 59- H.E.LONGENECKER , J.Soc.Chem.Ind. , 56 , 199 T (1939) .
- 60- S.S.TIONG y H.I.WATERMAN , "Chimie et Industrie" , 81 , 204, (1959) .
- 61- F.CRESPO y P.CATTANEO , Anales Asoc.Quim.Argentina , 46 , 368 , (1958) .
- 62- FAO/OMS , Comité del Codex sobre Grasas y Aceites CX/FO , 74-11 , enero 1974 . Documento sobre determinación de esteroides en aceite de oliva .
- 63- G.ISSOGLIO , "La Chimica degli Alimenti" , Ed. Torinese , Torino 1927 , vol. 2 , pág. 805 .
- 64- M.L.RODESTAIN , Tesis , Fac. de Ciencias Exactas y Naturales , U.B.A. , 1974 .
- 65- E.STHAL , "Thin Layer Chromatography" , Ed. Springer-Verlag, Berlín , 1969 , pág. 827 .
- 66- L.FOUGH , J.K.JONES , W.W.WADMAN , J.Chem.Soc. , 1702 (1950).
- 67- R.W.RAILEY y E.J.BOURNE , J.Chromatogr. , 4 , 206 (1960) .
- 68- J.L.SUCHAN y R.J.SAVAGE , Analyst , 77 , 401 (1952) .
- 69- S.SCHWINNER y A.BEVENNE , Science , 123 , 543 (1956) .
- 70- P.PARTLIDGE , Biochem.J. , 42 , 238 (1948) .


 P. CATTANEO
 ANALES ASOC. QUIM. ARGENTINA


 Alicia Tortosa.