

53485

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Departamento de Química

EXTRACCION Y CARACTERIZACION DEL ACEITE DE LA SEMILLA
DE HULE Hevea Brasiliensis

GUNTHER LOTTMANN MEINECKE

**BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Guatemala

1981

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

EXTRACCION Y CARACTERIZACION DEL ACEITE DE LA SEMILLA

DE HULE Hevea Brasiliensis

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Departamento de Química

EXTRACCION Y CARACTERIZACION DEL ACEITE DE LA SEMILLA
DE HULE Hevea Brasiliensis

GUNTHER LOTTMANN MEINECKE

Trabajo de investigación presentado para optar
al grado académico de

Licenciado en Química

Guatemala

1981

(f) Elvira G. de Mejía
Ing. Elvira G. de Mejía
Asesor

Tribunal:

(f) Elvira G. de Mejía
Ing. Elvira G. de Mejía

(f) Lillian Paiz
Ing. Lillian Paiz

(f) Sergio Aragón
Dr. Sergio Aragón

Fecha de aprobación: 21 de noviembre de 1981

A mis padres, a mi esposa y
a Dios quien en su gracia
hizo posible este trabajo

AGRADECIMIENTO

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron con sus recursos, con sus sugerencias y con su entusiasmo.

Al señor don Mauro Paz por las muestras de semilla, al Ingeniero Oscar Maldonado en el Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, I.C.A.I.T.I., por las facilidades de prensado, al Ingeniero Julio Tejada y la Licenciada Sonia Ubico por los cultivos de hongos, al Doctor Jorge Zúñiga del Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos, L.U.C.A.M., por los análisis cromatográficos, a la Universidad del Valle y la Ingeniera Elvira G. de Mejía por su asesoría, al Doctor Sergio Aragón por el "empujón final".

A Isabel, Francela y Sandra por su invaluable trabajo mecanográfico, a Verónica, mi esposa, y a mis padres por su paciencia y su entusiasmo y finalmente a Dios.

RESUMEN

Se estudiaron los procedimientos de extracción y las características físicas y químicas del aceite de la semilla de hule Hevea Brasiliensis, con miras a su posible uso industrial.

La semilla se desecó en horno con corriente de aire a $68 \pm 1^\circ\text{C}$ y al sol. Luego se decorticó y trituró a mano. Finalmente se extrajo el aceite utilizando tres métodos distintos: extracción con disolventes (éter de petróleo $40-60^\circ\text{C}$, n-hexano y alcohol isopropílico), extracción por prensado y extracción por prensado seguida de una extracción con n-hexano.

Las características físicas y químicas encontradas en el aceite estuvieron en concordancia con lo reportado en la literatura, con excepción del contenido de glucósido cianogénico. Por un procedimiento ^sespectrofotométrico que consiste en desarrollar la coloración anaranjada del cianuro con ácido pícrico en medio alcalino, se encontró que el contenido de ácido cianhídrico por gramo de semilla entera fresca es de 6.5MM. El cianuro se eliminó en un 79% utilizando sólo pasos de procesamiento convencionales. Cocción en agua o extracción con isopropanol fueron adecuados, para proveer una torta desengrasada comestible.

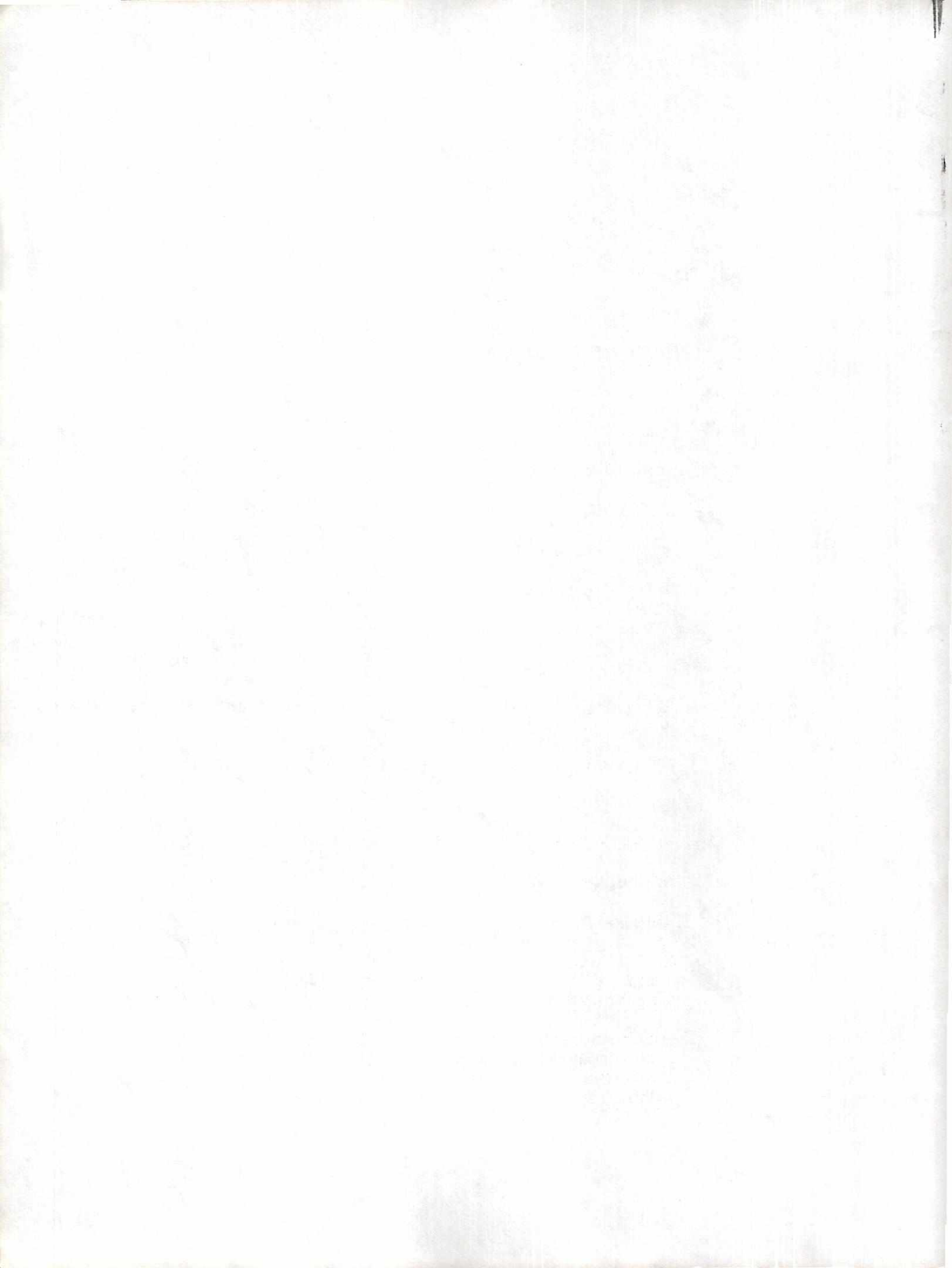
El aceite obtenido no tuvo contenidos de cianuro significativos.

Se concluyó que la aplicación industrial del aceite es factible, utilizando los procesos de extracción y procesamiento que existen para

otros aceites, pero que deben hacerse estudios adicionales para evaluar las posibilidades económicas que hay para su incorporación tanto a la industria de alimentos como a la de pinturas.

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMEN | IX |
| I. INTRODUCCION | 1 |
| PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | |
| II. MATERIALES Y EQUIPO | 11 |
| III. METODOS | |
| A. Recolección de la semilla | 13 |
| B. Secado | 14 |
| a. Secado en horno | 15 |
| b. Secado al sol | 15 |
| C. Limpieza y decortinado | 16 |
| D. Extracción del aceite | 17 |
| E. Caracterización del aceite | 18 |
| F. Determinación de la concentración de glucósidos cianogénéticos | 20 |
| IV. RESULTADOS | 31 |
| V. DISCUSION DE RESULTADOS | 68 |
| VI. CONCLUSIONES | 98 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 100 |
| APENDICES | |
| A. Toxicidad de los glucósidos cianogénéticos | 108 |
| B. Extracción, aislamiento y caracterización de compuestos cianogénéticos | 114 |



LISTA DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|---|--------|
| 4.1 | Secado de cotiledones de la semilla de hule en horno con corriente de aire a $68 \pm 1^\circ\text{C}$ | 34 |
| 4.2 | Secado de semillas de hule en horno a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 horas con corriente de aire | 39 |
| 4.3 | % de masa extraída por diferentes disolventes en una muestra de cotiledón de semilla desecado y triturado en mortero | 40 |
| 4.4 | Propiedades físicas del aceite extraído por diferentes métodos. | 44 |
| 4.5 | Propiedades químicas del aceite extraído por diferentes métodos. | 45 |
| 4.6 | Bandas de absorción en el infrarrojo detectadas en el aceite de <u>Hevea brasiliensis</u> obtenido por diferentes métodos de extracción | 46 |
| 4.7 | Contenidos de ácidos grasos del aceite de la semilla de hule (en %) | 58 |
| 4.8 | Datos para la elaboración de la curva estándar | 60 |
| 4.9 | Datos sobre la preparación y resultados del contenido de glucósidos cianogenéticos: | |
| | A. De la semilla de hule | 64 |
| | B. De los aceites de semilla de hule | 65 |
| | C. De las tortas de semilla de hule desengrasada | 66 |
| 4.10 | Contenidos de cianuro en base a masa equivalente de semilla entera fresca | 67 |
| 5.11 | Composición de la semilla de hule <u>Hevea brasiliensis</u> | 73 |
| 5.12 | Comparación de las características físicas y químicas, en forma de índices tradicionales, del aceite extraído de la semilla de hule <u>Hevea brasiliensis</u> | 78 |

| Cuadro | Página |
|---|--------|
| 5.13 Comparación del contenido en % de ácidos grasos de la semilla de hule <u>Hevea brasiliensis</u> | 82 |
| 5.14 Cantidades de aciete vegetal producidas mundialmente de 1979 a 1980 (en millones de toneladas) | 88 |
| 5.15 Producción de diferentes productos agrícolas relacionados con los principales aceites vegetales, (en miles de toneladas) | 89 |
| 5.16 Características químicas de varias grasas y aceites | 91 |

LISTA DE FIGURAS Y ESPECTROS

| Figuras | | Página |
|------------------|--|--------|
| 1 | Determinación de la humedad contenida en semillas recogidas el 20 de julio de 1980 | 35 |
| 2 | Determinación de la humedad en semillas recogidas el 14 de agosto de 1980 | 36 |
| 3 | Determinación de la curva de secado al sol de semillas recogidas el 14 de agosto de 1980 | 37 |
| 4 | Determinación de la curva de secado al sol de semillas recogidas el 14 de agosto de 1980 | 38 |
| 5 | Determinación de tres puntos en una curva de extracción de aceite con éter de petróleo | 43 |
| 6 | Cromatograma de los esteres metílicos de una muestra de aceite | 57 |
| 7 | Curva de calibración para CN^- con solución alcalina de picrato | 62 |
| Espectros | | |
| 1 | Aceite obtenido por prensado | 48 |
| 2 | n-hexano en torta prensada previamente | 49 |
| 3 | Aceite extraído con n-hexano | 50 |
| 4 | Aceite extraído con éter de petróleo | 51 |
| 5 | Aceite extraído con isopropanol, fase superior | 52 |
| 6 | Aceite extraído con isopropanol, fase inferior | 53 |
| 7 | Localización del máximo de absorción del aceite extraído con éter de petróleo | 54 |

Espectros

Página

- | | | |
|---|---|----|
| 8 | Absorción en el intervalo visible del espectro del aceite extraído con éter de petróleo | 55 |
| 9 | Absorción en el rango visible del aceite extraído con isopropanol | 56 |

I. INTRODUCCION

Desde 1974, en el que el alza del precio del petróleo provocó sus primeros efectos inflacionarios, se han buscado sustitutos para sus derivados. De esta forma se ha enfocado la vista de muchos investigadores en otros recursos naturales.

Algunas plantas pueden elaborar carbohidratos y convertirlos en hidrocarburos. Por ejemplo el árbol del caucho, que produce látex reduciendo el carbono hasta el último estadio de hidrocarburo. Las plantas verdes son, pues, en estos momentos, uno de los medios más efectivos de que disponemos para reestablecer el balance positivo de energía y materiales (Farm Chemicals 1979).

Entre las plantas que han llamado la atención, con este propósito, han surgido en primer plano aquellas como semillas oleaginosas. Se busca en ellas una fuente de aceites y carbohidratos en general, que sea renovable. La explosión de la investigación en este campo ha producido vertiginosos avances. Desde 1976 hasta ahora se han investigado, por ejemplo, 300 especies de plantas silvestres que no son explotadas comercialmente (Farm Chemicals 1979). Se ha encontrado que 34 de ellas pueden ser clasificadas como "teniendo un potencial definitivamente bueno".

Simultáneamente se investiga la posibilidad de utilizar la torta residual desengrasadas de estas plantas como alimento. Se sabe, pues, que toda plantación que represente un recurso renovable de aceite y alimento,

deberá fomentarse en el futuro respaldada en la amplia investigación que se ha suscitado.

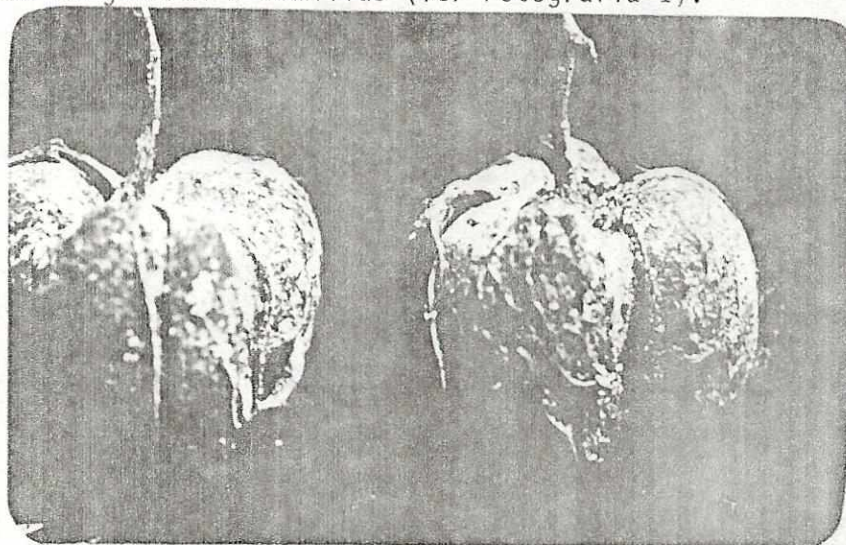
El presente trabajo forma parte de un proyecto (de Mejía 1979), que considerando el hecho que en los últimos años ha habido una disminución en la disponibilidad de grasas y aceites en el área centroamericana, intenta contribuir con estas investigaciones estudiando la posibilidad de utilizar la semilla del árbol de hule como fuente de aceite y de alimento.

El árbol de hule es cultivado extensamente en todo el mundo, principalmente para extraer su látex ya que este tiene muy buen mercado. Existen tres especies de árbol de hule que son de importancia económica: Hule Cereá, Manihot glaziovii, y hule Pará, Hevea brasiliensis, que pertenecen a la familia Euphorbiácea, y Guayule, Parthenium Argentatum (Vietmeyer 1981, Farm Chemicals 1979) que pertenece a la familia Compositae (Cronquist 1971). Actualmente se siembra casi exclusivamente hule Pará debido a que, por selección, por cultivo de variedades y mediante el uso de estimulantes químicos de crecimiento, se ha logrado aumentar su rendimiento de látex por un factor de 5 (Farm Chemicals 1979).

El árbol de hule Hevea brasiliensis, se cultiva en Guatemala desde 1940 (Ovalle 1975). Sus semillas se desperdician actualmente, así como en muchos otros países del mundo, a pesar de que se ha encontrado que son materiales de alto potencial como fuentes nutricionales. Estas semillas, y muchos otros productos secundarios del sector agrícola, se vienen desperdiciando cada año debido en parte a que no han

sido químicamente evaluados, o porque no existe tecnología adecuada para su utilización, o bien por la falta de estudios de factibilidad económica.

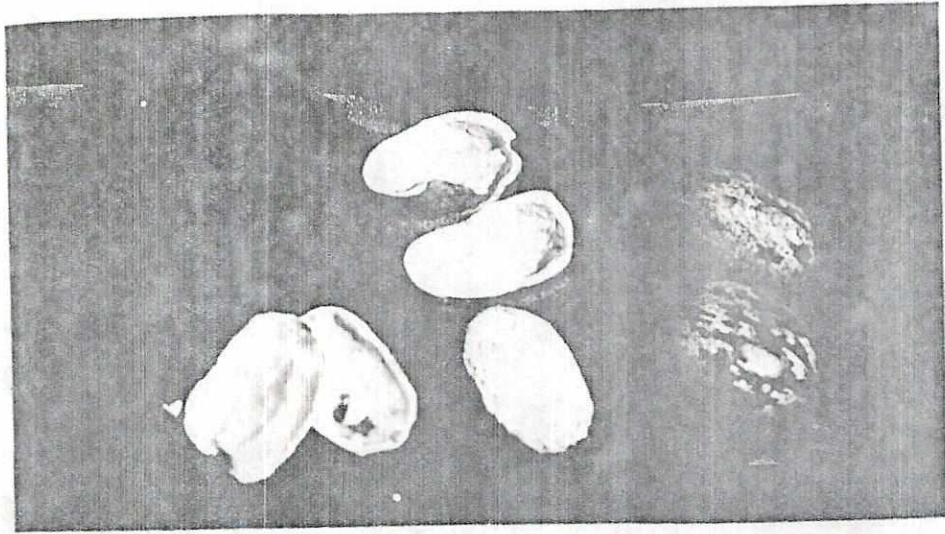
El fruto de la semilla de hule Pará llamado comúnmente "la pocha" contiene en general 3 semillas (ver Fotografía 1).



Fotografía 1: Foto de un fruto "pocha" de árbol de hule Hevea brasiliensis que contiene tres semillas.

Se ha estimado que un árbol de hule típico produce de 650 a 850 frutos por temporada, por una vida media de aproximadamente 30 años (Fetuga et.al. 1977). Esto representa alrededor de 2500 semillas por árbol por temporada. La semilla tiene una masa promedio de 3.6 gramos (en base seca), de la cual cerca del 50% comprende una dura cáscara café de 2 a 3 mm. de grosor, con manchas oscuras (Williams 1966, Hilditch 1956). Recién salida de la pocha las manchas oscuras están bien definidas. Más tarde, el contraste se reduce grandemente, pues se obscurece el color de fondo. La semilla es dicotiledónea. El cotiledón está separado de la cáscara por una vaina blanca. La vaina y la cá-

cara son fibrosas, el cotiledón es suave y aceitoso (ver Fotografía 2).



Fotografía 2: Foto de la semilla de hule Hevea Brasiliensis. (corte longitudinal).

El Banco de Guatemala y el Ministerio de Agricultura de Guatemala informan que cada año se desechan aproximadamente 14 millones de kg. de semilla, estimándose su costo en Q27.40 por mil kg. (Rosal, 1970).

Estos datos, y el hecho de que existen investigaciones previas de la semilla (Fetuga et. al. 1977, Orok et. al. 1974, Elías 1971, Luaw et. al. 1967, Auld 1912-1913, Ellett et. al. 1930, de Sequeira et. al. 1955, Rosal 1970) que tuvieron resultados positivos en cuanto a su evaluación nutricional, han estimulado la investigación de esta semilla, con miras a la posibilidad de utilizarla como una nueva fuente de proteína que venga a aliviar los problemas nutricionales que actualmente sufre un gran porcentaje de la población de recursos económicos limitados en todo el mundo.

Los trabajos de evaluación nutricional de esta semilla ya existentes han sido realizados con plantas africanas (Fetuga et. al. 1977, Luaw et. al. 1967), asiáticas (Orok et. al. 1974), y centroamericanas (Elías 1971, Rosal 1970). Los resultados obtenidos han sido distintos, pero se cree que las diferencias se deban principalmente al origen de la muestra.

El problema serio, sin embargo, en cuanto a la aplicación de la semilla para la alimentación, se basa en el hecho de que análisis químicos demuestran que contiene una enzima lipolítica y glucósidos cianogénicos. (Williams 1966, Eckey 1954, Gorter 1912, Hilditch 1949 1956). Estos últimos son extremadamente tóxicos porque se descomponen fácilmente produciendo ácido cianhídrico (ver apéndice A). Sin embargo, hay evidencia que la semilla ya ha sido usada para la alimentación de animales, en algunos casos previo tratamiento térmico. Como lo han demostrado las investigaciones de Luaw et.al. (1967), Auld (1912-1913), Ellett et.al. (1930), de Sequeira et.al. (1955), Rosal (1970) y Elías (1971).

Los trabajos realizados en Guatemala (Elías 1971, Rosal 1970) para evaluar el contenido nutricional de la semilla, así como para establecer métodos de decorticado y desecado no han sido continuados. Por esto no pueden considerarse más que como estudios preliminares.

Existen datos generales sobre la composición de la semilla de hule Hevea brasiliensis en los que se indica que la semilla entera

contiene cerca de 25% de aceite (Williams 1966, Eckey 1954, Bailey 1979, Hilditch 1949, 1956, Analyst, 1910). Por esto sería importante desde el punto de vista económico encontrar un uso también para el aceite.

Debido a su alto contenido en ácidos grasos polisaturados existe la posibilidad de utilizar el aceite para la alimentación. Este tiene además las características de un aceite semisecante existiendo la posibilidad de que pueda utilizarse en la industria de pinturas (Spring et. al. 1918, Luaw et. al. 1967, Williams 1966, Hilditch 1946, 1956, Sthapitanonda et. al. 1979). Pero también en este sentido debe investigarse los glucósidos cianogénéticos que contiene, ya que esto hace dudar de su utilización como alimento. Además la enzima lipolítica que contiene produce un valor ácido alto, poniendo en tela de juicio su aplicación en la industria de pinturas (Williams, 1966; Hilditch, 1954, 1956).

Sin embargo, ha sido sugerido que mejoras en los métodos de recolección y tratamiento de la semilla para obtener el aceite, podrían remediar estas desventajas (Williams, 1966, Hilditch, 1949).

El aceite ha sido caracterizado física y químicamente por algunos investigadores. (Eckey 1954, A.O.C.S.I 1-46 1980, Williams 1966, Hilditch 1956, Gunstone 1946, Zuñiga 1981).

Se ha informado (Auld 1912-1913, de Sequeira et. al. 1955) de problemas en la utilización del alimento preparado con la semilla de hule Hevea brasiliensis y esto, según los autores, pudo deberse al tratamiento que hicieron a la semilla para extraer su aceite. De manera

que la calidad de la torta residual depende de una extracción adecuada del aceite y esto solamente vale la pena si éste es utilizable.

Es conocido que residuos de disolvente, por ejemplo, afectan muy negativamente el sabor de la proteína (Neucere et. al. 1968). Se han hecho varios experimentos con proteína que, por su sabor, no puede aplicarse sola a la alimentación humana. Se ha intentado, por ejemplo, incorporarla en productos de interés comercial como salchichas (Terrel et. al. 1979), o formar parte de mezclas de proteínas vegetales de baja calidad nutricional que juntas constituyen un alimento de alta calidad proteínica como la INCAPARINA.

Un aspecto importante a estudiarse en la semilla, como lo justifica ampliamente el apéndice A, son los glucósidos cianogenéticos que contiene. Este tema puede estar íntimamente relacionado con el aceite de la semilla ya que existen otras semillas (como por ejemplo la de Heterodendron oleaefolium) donde el glucósido cianogenético se encuentra solamente en el aceite (Nahrstedt 1978). Esta afirmación se ve respaldada por otros estudios. Se ha observado por ejemplo, que estos compuestos están presentes casi exclusivamente en las vacuolas (Saunders 1977, 1978).

Una observación parecida se ha hecho en hule Hevea brasiliensis. Las vacuolas son lugares con altas concentraciones en sustancias tóxicas y parecen ser los centros de detoxificación de las hojas. (Matile, 1975 y Morice 1977).

La química de los glucósidos cianogenéticos ha progresado mucho en los últimos años. Los científicos más prolíferos en el campo de

La extracción e identificación de glucósidos cianogénéticos son: Nahrstedt (1978, 1976, 1975, a, b, c) Gondwe et. al. (1978), Sosa et. al. (1977) y Seigler (1976 a, b, 1975 a, b, 1974). En la biosíntesis de los glucósidos cianogénéticos han trabajado también Huges et. al. (1976), Schwartzmeir (1977), Saunders (1977, 1978), Russel (1970) y Reay (1970, 1969). Como puede verse existen actualmente muchas investigaciones en el área. Seigler (1975 a) escribió un artículo que resume los resultados y métodos de extracción, purificación e identificación realizados hasta 1975. (Apéndice B).

En lo que respecta a la identificación de los glucósidos cianogénéticos presentes en la semilla de hule Pará y su cuantificación no existe mucha información. Butler G.W. (1964) informa que usando cromatografía en papel para identificar los glucósidos cianogénéticos linamarina y lotaustralina, solo pudo detectarse linamarina en una concentración de 91 μ g por g. de semilla. Linamarina ya había sido identificada en hule Hevea brasiliensis, mucho antes, pero no había sido cuantificada (Gorter K. 1912). La duda sobre la posibilidad de que en la semilla de hule exista otro glucósido cianogénético, persiste pero es poco probable. Rosal (1970) informa haber detectado 1.21 mg de cianuro por g de cotiledón desengrasado de la semilla desecada. Trece veces lo reportado por Butler (1964) en la semilla entera.

Las técnicas para determinar la concentración del glucósido cianogénético varían mucho, pero en general consisten en la determinación de la cantidad de ácido cianhídrico liberado por la hidrólisis del glucósido cianogénético. (Muñoz, 1972).

Los métodos más sencillos y reproducibles son los sugeridos por Cooke (1978 a, b, c, 1979) e Ikediobi (1980), desarrollados para Manihot esculenta Crantz, una variedad de yuca. Se aplicará uno de estos procedimientos en el presente trabajo, considerando el hecho que, al igual que el hule, la yuca solo contiene linamarina.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Comparación de los aceites de la semilla de hule Hevea brasiliensis, obtenidos por diferentes métodos de procesamiento.
2. Caracterización del aceite de la semilla de hule. Se caracterizará química y físicamente el aceite para tener bases de comparación con lo informado en otros estudios sobre su posible industrialización.
3. Determinar el contenido de glucósidos cianogénéticos libres y enlazados en el aceite y en la torta residual desengrasada, para cada uno de los diferentes métodos de extracción.

Para realizar estos objetivos deben tomarse en cuenta las restricciones que impone la ideología básica del proyecto (de Mejía 1979), como son el:

- proteger el contenido proteínico de la torta deshidratada y desengrasada para optimizar su calidad nutritiva y el de;
- crear una tecnología sencilla y económica que permita la rápida generalización de su uso.

Estas dos restricciones son bastante fuertes e implican básicamente que deben usarse procesos sencillos con condiciones experimentales relativamente suaves.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

II. MATERIALES Y EQUIPO

Equipo de laboratorio

| | |
|--------------------------|--|
| Baños Térmicos: | - NAPCO, Modelo 220 - Haake |
| Rotoevaporador: | - Buchi Laboratoriums-Technik A.G., Rotavapor-R |
| Hornos: | - Blue M, OV-18A - Blue M, OV-490-A-2 |
| Mufla: | - Thermolyne, F-A1528P-1 |
| Balanza analítica: | - Mettler H80 |
| Balanza de triple brazo: | - Ohaus |
| Centrífuga | - Damon/IEC Division, HN-S |
| Potenciómetro: | - Fischer Scientific Company, 230A |
| Polarímetro: | - Poliscience Corporation, SR6 |
| Refractómetro: | - Fischer Heater Head Refractometer (Cat. 13-947-5) |
| Espectrofotómetro | |
| Infrarrojo: | - Perkin-Elmer, 735 B |
| Espectrofotómetro | |
| Ultravioleta-visible: | - Perkin-Elmer, Coleman 570 |
| Graficador: | - Heath- Schlumberger, SR-205 |
| Cromatógrafo de gases: | - Tracor, 22 ^o Columna de 6' de largo 1/4" de grosor Material de relleno 12% DEGS en Ana- kron ABS de 90/100 mallas. |
| Integrador: | Hewlett Packard 3380-A |

Prensa hidráulica: - Carver

Cristalería de uso común en el laboratorio

Reactivos:

- Linamarina: Calbiochem
- β - Glucosidasa: Sigma
- Material de relleno de columna cromatográfica, 12% DEGS en Anakron
ABS de 90/100 mallas: Analab INC.
- Reactivos convencionales para efectuar las pruebas químicas.

500
150

225 number
150

III. METODOS

A. Recolección de la semilla:

Las muestras de semilla se recogieron en la Finca Brasilia entre Cuyotenango y la bifurcación de la carretera que conecta a Retalhuleu con Quezaltenango. La semilla se recogió a mano, escogiéndose aquellas que tenían apariencia sana, es decir, que no tenían señales visibles de ataques de depredadores o de fermentación. En general, se buscaron semillas que mostraran un buen contraste entre su color de fondo y las manchas oscuras. Según se observó este contraste de colores es una buena medida del tiempo que la semilla tiene de haber caído, pues con la luz del Sol y el calor, este contraste se pierde disimulándose la diferencia entre el color de fondo y las manchas. Esto se verificó en los procesos de secado tanto al sol como en el horno.

Se hicieron dos viajes de recolección: uno el 20 de julio de 1980 y otro el 14 de agosto de 1980.

La semilla se trasladó el mismo día a la capital en una hielera y fue almacenada en refrigeración.

Descripción del lugar de recolección de la semilla.

La semilla se recogió del suelo de la finca. Era un suelo sumamente húmedo y cubierto totalmente de hojas secas y en estado de descomposición. Se podía observar también bastante maleza y la proliferación de hongos de diferentes clases entre las hojas y las ramas caídas. A pesar de que la época de recolección fue durante las primeras

lluvias del año, el suelo tenía una consistencia bastante lodosa. En la segunda recolección esto fue más notorio pues ya había llovido fuertemente.

La semilla proviene de un fruto de cáscara sumamente dura que se seca en el árbol y que en los meses de julio y agosto, revienta lanzando las semillas al suelo. Estas caen de una altura de por lo menos 5 metros, rebotando en las ramas de manera que pueden aparecer a distancias bastante grandes del tronco del árbol del que provienen. Los restos del fruto también caen ya secos y son víctima del ataque de hongos con suma rapidez. En algunos casos el fruto cae sin haber expulsado las semillas pero esto no ocurre muy a menudo.

B. Secado

Recién recogidas las semillas están muy húmedas, principalmente porque caen en la época lluviosa. Esto trae muchos problemas consigo: la semilla no puede almacenarse húmeda porque es atacada por hongos y germina muy rápidamente; y la semilla húmeda no puede decortarse adecuadamente porque obstruye las máquinas utilizadas para ello (Rosal 1970).

Por esto se estudiaron procesos de secado. Sin embargo, para que el proceso sea realmente aplicable a mayor escala, debe insistirse en que se use un método de deshidratación sencillo, y sobre todo económico.

Las semillas se sometieron a dos tipos diferentes de secado: secado al sol y secado en horno (con corriente de aire) (Paiz et. al. 1977).

Estos métodos han sido elegidos de entre una variada gama de procedimientos tanto físicos como químicos (Karmas 1980), y resultaron electos principalmente porque son más económicos.

a. Secado en horno. La curva de secado se determinó dos veces en un horno con corriente de aire a $68 \pm 1^\circ\text{C}$. Se prepararon 18 bandejas de papel aluminio de aproximadamente 80 cm² de área y se secaron 2 horas en horno a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ en cada bandeja se pusieron ocho semillas en el primer experimento y diez semillas en el segundo. Se formaron entonces grupos de tres bandejas al azar, obteniéndose 6 grupos. Cada uno de estos grupos recibió tratamiento igual a lo largo de todo el experimento, de manera que funcionó como una medición en triplicado. Los seis grupos se colocaron en el horno con corriente de aire simultáneamente, pero fueron sacados de él después de diferentes tiempos determinándose así, un punto en la curva de secado. Aproximadamente cada hora se retiró un grupo de tres muestras, se dejó enfriar en una desecadora por 40 minutos y se pesó. Seguidamente se volvieron a poner en el horno. Cada grupo de muestras se pesó repetidas veces hasta que los cambios de masa fueron pequeños.

b. Secado al sol. La curva de secado al sol se determinó de la misma manera que en horno solo que colocando los 6 grupos de 3 muestras en azafates metálicos. Esta vez se utilizaron semillas seleccionadas por su masa (aproximadamente 5 gramos) para evitar que participaran en el experimento semillas severamente afectadas por hongos o depredadores y que en su interior estuvieran vacías. Las semillas estuvieron al sol entre las 10:00 y las 17:00 horas. Durante la noche

Las semillas se guardaron en una desecadora cerrada sin material desecante.

C. Limpieza y decortinado

Para extraer el aceite se necesita primero preparar la semilla limpiándola de palillos, tallos, hojas y basura usando tamices rotatorios (Rosal 1970, Bailey 1951). Luego se debe decortinar según descrito por Rosal 1970, y Bailey 1951.

Vale la pena mencionar por qué es necesario decortinar antes de extraer el aceite. La principal razón es que la cáscara puede absorber aceite bajando el rendimiento de su extracción en un proceso de prensado. En el procedimiento de extracción usando prensa y solvente, el decortinado puede no ser muy significativo porque la extracción del aceite es de todas maneras bastante completa; pero en este caso la presencia de la cáscara en la torta residual puede significar una cantidad demasiado grande de fibra, cosa que no necesariamente es buena. En el proceso de decortinar la condición de humedad de la semilla es crítica. Una semilla muy húmeda obstruye el decortinador; en una muy seca, la almendra tiende a desintegrarse, complicando la separación de la almendra y la cáscara que se hace después por tamizado (Rosal 1970).

Procedimiento de decortinado: En el presente estudio se decortinó la semilla a mano, con un cascanueces. Aprovechando este proceso pudo hacerse al mismo tiempo un sencillo estudio de la cantidad de semillas dañadas, contando la cantidad de unidades afectadas.

D. Extracción del aceite:

Las técnicas tradicionales de tratamiento de semillas aconsejan que se reduzca el tamaño de las almendras (semillas ya decorticadas) para facilitar su extracción. Esto es muy importante en el caso en el que se extrae solo con disolvente pues entonces la eficiencia de extracción es proporcional a la resistencia a la difusión, que a su vez depende del cuadrado del grosor de la muestra que se extrae (Boucher 1942, Karnofsky 1948 y Miller 1975).

Se compararon tres tipos de extracción en el laboratorio: Prensa, disolvente prensa-disolvente. La razón para elegir precisamente estos es que ya existen actualmente sus análogos a nivel industrial en el país. La elección del más conveniente seguramente va a depender del costo de los procesos individuales, incluyendo el de recolección y procesamiento previo de la semilla y no del costo de la maquinaria.

Procedimientos de extracción:

- Extracción con disolventes: El aceite se extrajo en un aparato Soxhlet con distintos disolventes. Por ser los más comunes para la extracción de aceites se usaron: a) éter de petróleo 40-60°C; b) n-hexano y; c) alcohol isopropílico. Se taró un pedazo de papel filtro y se colocó en él una muestra de entre 20 y 30 gramos de cotiledón de semilla, previamente secado y triturado en mortero. La muestra se envolvió bien en el papel y se pesó de nuevo. Seguidamente

se extrajo el aceite por un total de 10 horas.

Se hizo un experimento análogo con éter de petróleo 40-60°C sólo que con tres muestras en aparatos iguales por tiempo de extracción distintos (3, 6 y 10 horas). Se determinó así una curva de extracción del aceite.

El porcentaje de masa extraída después de cierto tiempo se determinó sacando la muestra del dedal del aparato y dejándola cerca de una lámpara encendida hasta que el disolvente se evaporó completamente y secándose hasta tener una masa constante. Restando la masa final de la inicial se obtuvo la cantidad de masa eliminada.

- Extracción por prensado: Una muestra de cotiledón de semilla previamente hervida en agua por 2.5 horas, desecada y pesada se prensó en frío en una prensa hidráulica utilizándose presiones hasta de 16,000 libras por pulgada cuadrada por un período de dos horas. La presión se aplicó lentamente aumentando 1,000 libras por pulgada cuadrada cada 5 minutos hasta llegar a la presión máxima. El aceite obtenido se recolectó lo mejor posible y se midió el volumen final.

- Extracción con disolvente después de prensar: Una muestra de la torta obtenida después del prensado se colocó en un papel filtro tarado y se extrajo con n-hexano por 16 horas en un aparato Soxhlet. Se sacó la muestra del aparato, se llevó a masa constante y se pesó.

E. Caracterización del aceite

Existen varios trabajos de caracterización de aceites y grasas

(Eckey 1954, Hilditch 1949, Bailey 1979, Viljalmsdottir et. al. 1971, Mba et. al. 1974, Sengupta et. al. 1977, Adomako 1977, Fishwick et. al. 1977 y Schwartzmeier 1977). Mucho del trabajo hecho en ésta área ha sido recopilado por instituciones como la "American Oil Chemistry Society, AOCS", "Association of Official Agricultural Chemists, AOAC", "International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC" y la "Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft E.V.". Estas instituciones han publicado manuales de métodos que rigen el trabajo en el área de la caracterización de aceites, su almacenamiento y su compra-venta.

Las siguientes determinaciones se escogieron por su importancia en la caracterización del aceite, para tener una base de comparación con otros aceites comerciales:

1. Humedad: (IUPAC 1.121)
2. Color: (AOCS Cc 13c-50)
3. Color después de calentar: (AOCS Te 1a-64)
4. Masa específica: (AOCS Cc 10a-25)
5. Índice de refracción: (AOCS Cc 7-25)
6. Punto de fusión: (AOCS Cc 14-59)
7. Punto de ebullición: (Schriner et. al. 1974)
8. Rotación óptica: (Lichtfield 1972, Schriner et. al. 1974)
9. Viscosidad: (Barrow 1973)
10. Espectro de absorción infrarrojo: (Kates 1972, Lichtfield 1972)
11. Espectro de absorción ultravioleta: (Kates 1972, Silverstein et. al. 1974)
12. Prueba de frío: (AOCS Cc 11-53)

13. Valor de yodo: (AOCS Cd 1-25)
14. Valor de saponificación: (AOCS Cd 3-25)
15. Materia insaponificable: (AOCS Ca 6a-40)
16. Valor ácido: (AOCS Ca 1a-64)
17. Valor de ceniza: (AOCS Ca 11-55)
18. Valor hidroxilo: (AOCS Cd 4-40)
19. Valor aceto: (AOCS Cd 4-40)
20. Cromatografía de gases: (AOCS Ce 1-62)

F. Determinación de la concentración de glucósidos cianogénicos.

En la cuantificación de los glucósidos cianogénicos se utilizó el método de Ikediobi (1980) para yuca.

Fue necesario sin embargo, hacer algunos cambios de procedimiento porque las técnicas mencionadas no contemplaban la extracción de aceites y porque a diferencia de los extractos de yuca, los extractos de semilla de hule fueron muy coloreados.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Preparación de una curva de calibración para la determinación del ión cianuro con ácido pícrico en solución alcalina. Con este propósito, se preparó una solución de 125 mg de KCN en 500 ml de NaOH 0.2M que sirvió de solución madre (250 Mg/ml). Se prepararon mezclas de reacción conteniendo diferentes cantidades de cianuro, 5 ml de una solución acuosa que contenía 5g de ácido pícrico y 25 g de Na_2CO_3 por litro, y suficiente regulador de fosfato de sodio

0.2M a pH 6.8 para completar un volumen de 7.00 ml.

Estas mezclas se hirvieron en un baño de vapor a 95.5°C por 5 minutos, se dejaron enfriar por una hora y se midió su absorbancia a 490nm.

2. Extracción de las muestras para determinar su contenido de cianuro. Las muestras sólidas de la semilla se extrajeron homogenizando aproximadamente 30 g con 150 ml de ácido ortofosfórico 0.1M. El vaso de la licuadora se lavó con dos porciones de 40ml de la solución ácida para asegurar la transferencia cuantitativa de la muestra extraída. Posteriormente se filtró al vacío y el líquido obtenido se centrifugó por 15 minutos. Se aseguró que el extracto obtenido fuera completamente transparente sin partículas de ninguna clase suspendidas.

Las muestras de aceite se extrajeron agitando unos 5 g con tres porciones de 15 ml de ácido ortofosfórico 0.1 M en una ampolla de decantación pequeña.

Los extractos tanto de muestras líquidas como de sólidos se aforaron con ácido ortofosfórico 0.1M a 50 y 250 ml respectivamente, y se almacenaron en refrigeración hasta su análisis.

3. Extracción de la enzima linamarasa para hidrolizar el cianuro enlazado. Se usaron para este propósito tubérculos de yuca, Manihot esculenta Crantz que se pelaron quitando sólo la delgada cáscara café. De esta manera quedó al descubierto una capa de corteza blanca de aproximadamente 0.5 cm. de grosor, que puede removerse con relativa facilidad del resto del tubérculo. Se aisló esta corteza y se cortó en pequeños cubos. Aproximadamente 100 g de éstos se licuaron con 300 ml de regulador de acetato de sodio 0.1M a pH 5.50 previamente enfriado. El licuado se filtró a través de una capa de 1cm de Keselguhr. El filtrado sirvió para extraer dos nuevas muestras de 100 g de corteza. Se licuaron y se filtraron de igual manera. Al filtrado obtenido se le agregó 2.5 volúmenes de acetona fría y la solución obtenida se agitó varias veces por 2 minutos por un período de 2 horas. El precipitado de un color grisáceo se

aisló por centrifugación a 500 g y se extrajo con tres porciones de 10 ml de regulador de acetato de sodio 0.1M a pH 5.50. Los extractos se combinaron y se centrifugaron a 500 g por 15 minutos. El líquido obtenido se dializó en relación (3x50 Vol) con regulador de acetato de sodio 0.1M de pH 5.50 por 2 horas. El extracto obtenido después de diálisis se almacenó a 4°C.

4. Determinación de la actividad de la enzima: la determinación debió hacerse usando p-nitrofenil, D glucósido como sustrato (Ikediobi 1980). Ante la ausencia de este sustrato la actividad mínima se determinó por comparación con una solución de B-glucosidasa comercial de actividad conocida (mayor a la actividad mínima sugerida por Ikediobi (1980)). Se determinaron los cambios de absorbancia provocados por el extracto de enzima y por la enzima comercial en una solución conocida de linamarina (con tiempos de acción iguales).

5. Determinación de cianuro en las muestras extraídas.

Entre 0.2 y 0.5 ml del extracto de las muestras de semilla de hule se colocaron en 4 tubos de ensayo con tapa de rosca. A dos de los tubos se agregaron 2 ml de regulador de fosfato de sodio a pH 6.8. A los otros dos tubos se les agregó 1.0 ml del mismo regulador y 1.0 ml de la solución de enzima con actividad conocida de un mínimo de 40 unidades/ml. Los tubos se taparon y se esperó de 10 a 15 minutos para permitir la hidrólisis completa del cianuro en las muestras. Posteriormente se agregaron 5 ml de solución básica de ácido pícrico, se calentó a 95.5°C por

5 minutos, se dejó enfriar una hora y se leyó la absorbancia a 490nm. Los tubos con enzima indicaron el contenido de cianuro total.

Los tubos sin enzima el contenido de cianuro libre

Estas determinaciones se hicieron con enzima extraída de yuca y con β -glucosidasa comercial. Con β -glucosidasa se hizo un duplicado completo de las mediciones.

La coloración de algunos de los extractos hizo necesaria la determinación de blancos. Se midió en este caso la absorbancia de las muestras preparadas como se indicó antes sólo que sin calentar con el picrato y sin agregar la enzima. Asimismo se determinaron blancos de la solución de β -glucosidasa comercial. Estos blancos se restaron a las absorbancias absolutas que se obtuvieron para dar las absorbancias corregidas.

Procedimientos para las demás caracterizaciones:

1. Humedad.

En un pesafiltros seco y tarado se colocó una muestra y se pesó. Se colocó en un horno y se dejó allí hasta que dos medidas del peso separadas un intervalo de tiempo de media hora a $102 \pm 2^\circ\text{C}$, no difirieron en 5 mg. (IUPAC 1.121).

2. Color.

Una muestra de aceite completamente transparente se colocó en un espectrofotómetro debidamente calibrado, para leer las absorbancias a 460, 550, 620 y 670 nm. El color fotométrico se calculó con la ecuación:

$1.29 A_{469} + 69.7 A_{550} + 41.2 A_{620} - 56.4 A_{670}$ (AOCS Cc 13C-50).

3. Color después de calentar.

Una muestra de aceite se calentó por 60 minutos en baño de aceite a $205 \pm 2^\circ\text{C}$. Seguidamente se determinó su color (AOCS Td 3a-64).

4. Masa específica.

Una muestra de aceite se colocó llenándolo al ras un picnómetro. Se puso en un baño térmico hasta que se estabilizó su temperatura, se sacó del baño, se limpió, se secó y se pesó con precisión. La determinación se realizó a 15 y a 25°C . (AOCS Cc 10a-25).

5. Índice de refracción.

Una gota de aceite se colocó en el prisma de un refractómetro previamente ajustado a la temperatura deseada $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, y se esperó el equilibrio térmico leyéndose el índice en la escala. Se informó el promedio de varias determinaciones (AOCS Cc 7-25).

6 y 7. Puntos de fusión y ebullición.

Los puntos de fusión y ebullición se determinaron en un baño de aceite a temperatura controlada, observando el cambio de estado visualmente. El punto de ebullición de un aceite generalmente no existe porque al aumentar la temperatura se descompone. (AOCS Cc. 14-59, Schriener et. al. 1974).

8. Rotación óptica

El recipiente del polarímetro se llenó completamente con aceite perfectamente transparente y se ajustó la escala para la lectura de varias determinaciones, tomando como valor de rotación óptica el promedio. (Lichtfield 1972, Schriener et. al. 1974).

9. Viscosidad

En un baño térmico a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ se midió el tiempo que tardaron en fluir el aceite y una muestra control de CCl_4 desde la primera a la segunda marca de un viscosímetro. Las densidades de los dos se asumieron conocidas ($M = 0.969 \times 10^{-2} \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{seg}}$ y $P = 1.591 \text{ g/ml}$ a 25°C para CCl_4) (Schriener et. al. 1973, Barrow 1973). La viscosidad se despejó finalmente de la fórmula: $\frac{(M_1)}{(M_2)} = \frac{(P_1)(T_1)}{(P_2)(T_2)}$ (Barrow, 1973).

10. Espectro de absorción infrarrojo

Una gota de aceite se puso sobre la ventana y se comprimió en una celda de grosor variable. Se midió luego su espectro (Kates 1972, Lichtfield 1972).

11. Espectro de absorción ultravioleta

Una cubeta de cuarzo se llenó de aceite completamente transparente y se midió su espectro. (Kates 1972, Silverstein et. al. 1974).

12. Prueba de frío

Una muestra se calentó a 130°C , se tapó con un corcho y se selló con parafina. Luego se colocó a 0°C por 5.5 horas. (AOCS Cc. 11-53).

13. Valor de yodo

Muestras de masa conveniente (aprox. 0.2100g) se disolvieron en 20 ml de CCl_4 . Se agregaron 25 ml de solución de Wijs, se mezcló y se guardó en un lugar obscuro a temperatura controlada ($25 \pm 5^\circ\text{C}$). Después de 30 minutos se agregaron 20 ml de KI (150 g/litro) y 100 ml de agua destilada. La solución resultante se tituló con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1N con agitación continua y vigorosa. Se tituló hasta que el color amarillento desapareciera casi por completo. Se agregaron entonces de 1 a 2 ml de solución de almidón y se tituló hasta que el color azul desapareció. Por lo menos 2 blancos se llevaron simultáneamente. El valor de yodo se calculó por la siguiente fórmula: $\frac{12.69 (B-S)N}{\text{masa de la muestra}}$ siendo B la titulación del blanco, S la titulación de la muestra y N la normalidad de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (AOCS Cd 1-25).

14. Valor de saponificación

Se saponificaron de 4 a 5g de muestra con 50 ml KOH (27 g KOH por litro de solución en etanol) por una hora en reflujo. El producto saponificado se tituló con HCl 0.5 N debidamente estandarizado. Se calentó de nuevo a reflujo y se volvió a titular cualquier coloración roja que se hubiera formado. El valor de saponificación se calculó por la siguiente fórmula: $\frac{56.10 N (B-S)}{\text{masa de la muestra}}$, siendo B la titulación del blanco, S la titulación de la muestra y N la normalidad de HCl (AOCS Cd 3-25).

15. Material insaponificable

Se saponificaron 15 g de muestra con KOH (50% en peso). Esto se hizo en 30 ml de etanol por una hora en reflujo. El producto se transfirió a una ampolla de decantación donde se extrajo 7 veces con éter de petróleo. Los extractos combinados se lavaron con etanol al 10% hasta que el producto del lavado fue neutro a la fenolftaleína. El extracto étereo se evaporó a masa constante en baño térmico o en horno al vacío.

Para corregir el resultado en el caso de que en el producto sin solvente hubieran ácidos residuales, se titula con NaOH 0.02 N. Una muestra blanco se lleva estrictamente paralela. El valor de materia insaponificable se calculó por las siguientes fórmulas: % insaponificable: corregido

$$\frac{100 (\text{Peso residual de muestra-corrección})}{\text{Peso de muestra}} \text{ corrección: } 0.282 (\text{ml NaOH})(\text{normalidad})$$

(AOCS Ca 6a-40).

16. Valor ácido

Aproximadamente 5 g de muestra se diluyeron en caliente en 75-100 ml de alcohol etílico 95% neutral y se tituló con KOH 0.5 N (debidamente estandarizado) hasta el viraje de la fenolftaleína. El valor ácido se calculó por la fórmula: $\frac{56.10 (\text{ml de titulante}) (\text{normalidad})}{\text{Peso de la muestra}}$

(AOCS Ca 1a064).

17. Valor de la ceniza

En un crisol limpio y tarado sin tapadera, se colocó una muestra de aceite y se calentó. Se encendió el aceite y se controló la temperatura

de manera que pudiera mantenerse la llama sin provocar un rebalse de muestra incendiada. Cuando la llama se extinguió el crisol se transfirió a una mufla a 600°C y se dejó allí hasta masa constante. El porcentaje de ceniza se calculó por la fórmula:

$$100 \frac{\text{peso del residuo}}{\text{peso de la muestra}} \quad (\text{AOCS Ca 11-55})$$

18 y 19. Valores acetilo e hidroxilo

Una muestra de 10 ml de aceite se calentó en reflujo por dos horas con 10 ml de anhídrido acético 95%. La muestra se lavó después con 250 ml de agua destilada, se hirvió 15 minutos con el agua y luego se decantó. Este procedimiento se repitió hasta que la fase acuosa tuvo un pH neutro. Se lavó entonces con 2 porciones de agua destilada (60-70°C) y se secó la muestra agitándola esporádicamente por un intervalo de una hora con 5 g de sulfato de sodio anhidrido. El producto se filtró y se determinó el valor de saponificación de esta muestra y de una muestra de aceite sin acetilar. El valor acetilo se calculó con la fórmula:

$$\frac{(S' - S)}{T - 0.00075 S}$$

siendo S el valor de saponificación de la muestra y S' el

valor de saponificación de la muestra acetilada. El valor hidroxilo:

$$\frac{S' - S}{T - 0.00075 S} \quad (\text{AOCS Cd 4-40}).$$

20. Cromatografía de gases

20 gotas de aceite se saponificaron en un exceso de NaOH metanólico. El producto se esterificó con trifloruro de boro metanólico proveyendo en esta forma los esteres metílicos de los ácidos grasos. Estos esteres se extrajeron con n-heptano. Se aseguró la mejor separación de la fase metanólica agregando una solución saturada de sal común.

Una alícuota del extracto etéreo se secó sobre sulfato de sodio anhidrido. Simultáneamente el cromatógrafo de gases se calentó y se programó su temperatura. Una muestra de los esteres metílicos se inyectó utilizando una columna polar. Las cantidades de ácidos grasos presentes se calcularon a partir del gráfico resultante. (AOCS Ce 1-62).

Se utilizó una columna de vidrio de 6' de largo y 1/4" de grosor. El material de relleno fue de 12% DEGS en Anakon ABS de 90/100 mallas. Para el cálculo del porcentaje de ácidos grasos presentes se utilizó un integrador Perkin Elmer 3380-A.

IV. RESULTADOS

R1; Determinación de la masa promedio de la semilla de hule y de la relación de masas entre la almendra y la cáscara.

- Masa de una semilla fresca: 5.05 ± 0.01 g
(tomada promediando la masa de 750 semillas)
- Masa de una semilla seca (24 horas en horno con corriente de aire a $68^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$): 3.30 ± 0.01 g (750 semillas)
- Masa relativa de cáscara y almendra tomada promediando la masa de 100 cáscaras y 100 almendras.

Semillas no desecadas; cáscara: 2.65 ± 0.01 g ó 52.5%
almendra: 2.39 ± 0.01 g ó 47.5%

Semillas secas; cáscara: 1.71 ± 0.01 g ó 51.5%
almendra: 1.61 ± 0.01 g ó 48.5%

R2; Estudio de semillas dañadas:

Al decorticar las semillas del segundo día de recolección se efectuó un conteo de las semillas afectadas por hongos u otros predadores. Se hizo el estudio con semillas frescas, guardadas por 6 meses en bolsas plásticas en refrigeración y con semillas secas.

a. Semillas frescas. Total analizando: 1000 semillas

Total afectado: 163 semillas ó 16.3%.^{o/}

o/ Muchas de las semillas con hongos estaban también en estado de fermentación.

b. Semillas guardadas 6 meses en refrigeración:

Total analizado: 252 semillas

Depredadas: 39 semillas ó 15.5%

c. Semillas secas (desechadas en agosto 1980) analizadas 6 meses después de secarse.

Total analizado: 1202 semillas

Depredadas: 124 semillas ó 10.3%

R3; Identificación de la condición de la semilla:

a. Fermentación. El cotiledón tiene una consistencia muy jugosa y un olor muy fuerte. No hay manera fácil de reconocer una semilla fermentada sin decorticarla. El olor de cotiledones fermentados se reconoce inmediatamente por comparación con el de otras semillas. Estas características de las semillas fermentadas ya no pueden reconocerse después de secar la semilla o de almacenarla por 6 meses en refrigeración.

b. Depredadores mayores no identificados. La semilla carece de cotiledón y la cáscara tiene un agujero circular de entre 2 y 3 mm de diámetro en uno de sus extremos. Se encontraron algunas semillas con cotiledones con surcos como de un depredador. Sin embargo, no pudo detectarse en ningún caso al depredador mismo.

c. Hongos. La semilla afectada por hongos está llena de micelio gris-verdoso y a veces carece parcial o completamente de cotiledón. Esto puede deberse a la presencia previa de depredadores mayores. Una semilla muy afectada por hongos puede reconocerse sin decorticar, por su peso. Pero semillas donde la afección recién comien-

za pueden confundirse.

Un cultivo en placa Petri del hongo permitió clasificarlo como alguna especie del género Penicillium.

Es muy común encontrar semillas infestadas con Penicillium sp.

Resultados de secado

R4; Secado de la semilla entera en horno con corriente de aire: Los resultados de la determinación del contenido de humedad de la semilla entera y de la elaboración de curvas de secado se presentan en las figuras 1 y 2. Los dos diferentes experimentos de curvas de secado fueron determinados con muestras de semilla de distintos días de recolección. El primero con muestra del 20 de julio y el segundo con muestra del 14 de agosto de 1980. En estas figuras se presentan en forma gráfica el porcentaje de masa residual y el porcentaje de humedad eliminada por secado. Por simplicidad se presentan solo los promedios de las muestras en triplicado.

R5; Determinación del porcentaje de humedad removida promedio después de secar las semillas en horno con corriente de aire a $68 \pm 1^\circ\text{C}$ por períodos largos.

Resultados de las figuras 1 y 2:

Primera curva de secado 20 de julio 1980 (figura 1): $32.9 \pm 0.9\%$

Segunda curva de secado 14 de agosto 1980 (figura 2): $36.5 \pm 0.9\%$

R6; Secado de la semilla entera al sol: Este experimento y su duplicado se realizaron con una muestra de las semillas recogidas el 14 de Agosto de 1980. Las pruebas se hicieron, como se explicó anteriormente, con semillas seleccionadas por su masa. Por la dependencia tan significativa de este experimento de la temperatura ambiental y la humedad relativa, ésta se midió varias veces durante los días de secado. Los resultados

se presentan en las figuras 3 y 4, junto con los de las curvas de secado.

R7; Secado de semilla previamente decorticada: Los resultados del secado de 50 semillas (del 14 de agosto de 1980) sin cáscara se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1

Secado de cotiledones en horno con corriente de aire a $68 \pm 1^\circ\text{C}$.

| Muestra | Tiempo de secado | % de masa eliminada | % de masa residual |
|---------|--------------------|---------------------|---------------------|
| A | 1.92 ± 0.08 h. | 23.3548 ± 0.001 | 76.6452 ± 0.001 |
| B | 1.92 ± 0.08 h. | 21.6620 ± 0.001 | 78.3380 ± 0.001 |

R8; Determinación de humedad eliminada por calor por dos horas en horno con corriente de aire a $102 \pm 1^\circ\text{C}$. Semilla entera.

Las semillas que se utilizaron en esta prueba habían sido recolectadas 6 meses antes (14 de agosto de 1980) y guardadas en refrigeración, en bolsas plásticas. Los resultados se presentan en el cuadro 2.

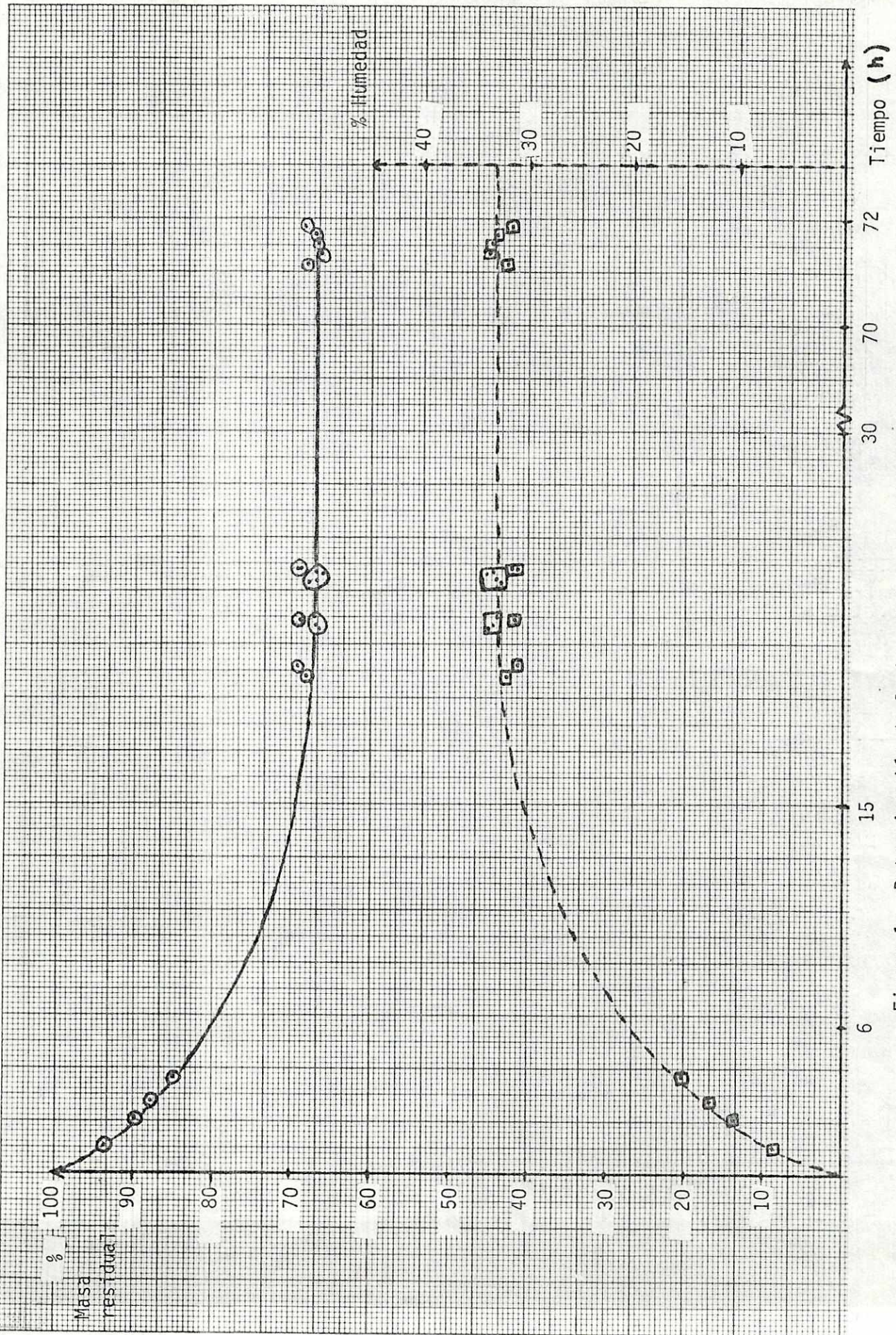


Figura 1: Determinación de la humedad contenida en semillas recogidas el 20 de julio de 1980. Se presentan los porcentajes de humedad eliminada (línea interrumpida) y de masa residual (línea continua). Horno a $68 \pm 1^\circ\text{C}$.

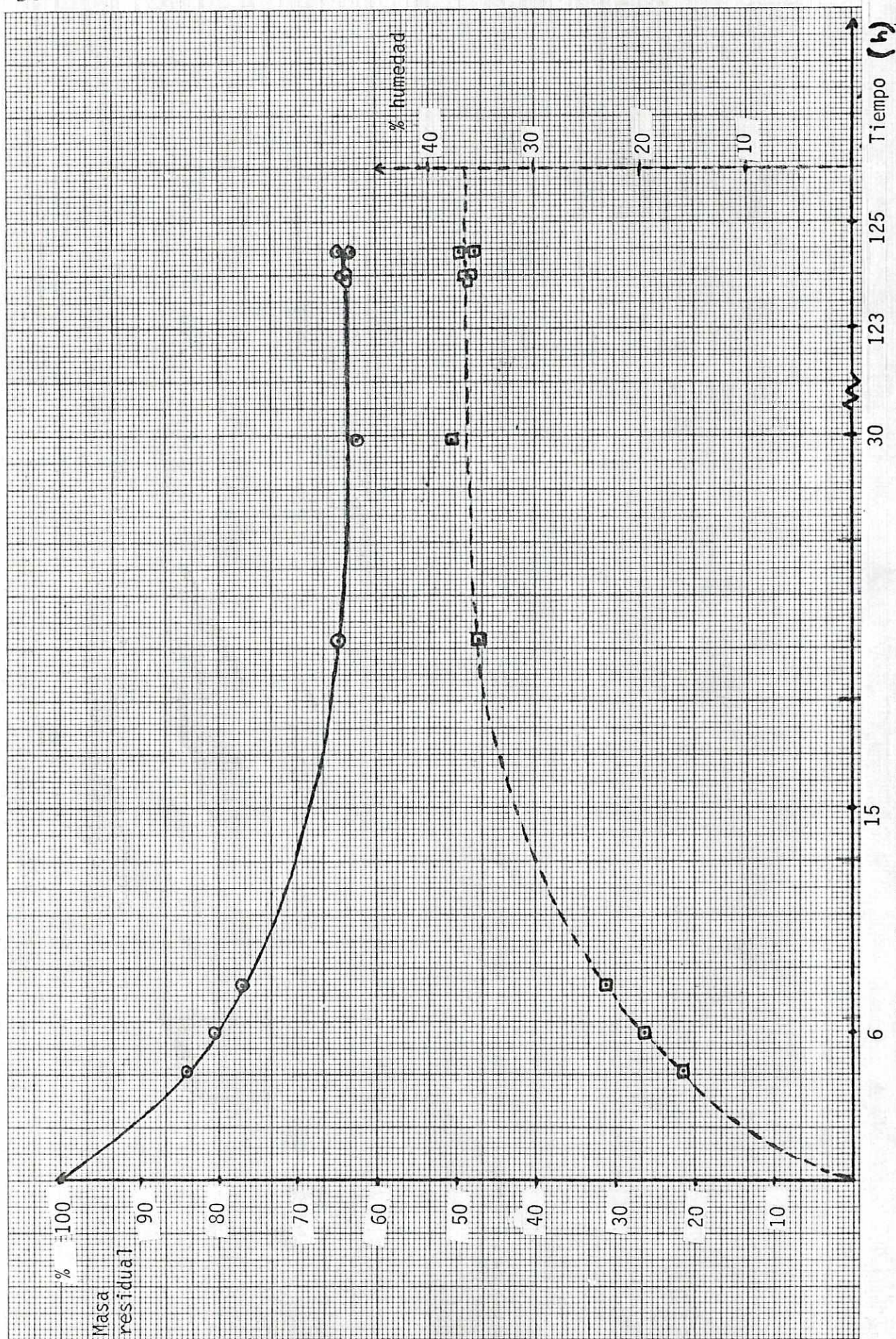


Figura 2: Determinación de la humedad contenida en semillas recolectadas el 14 de agosto de 1980. Se presentan los porcentajes de humedad eliminada (línea interrumpida) y de masa residual (línea continua). Horno a $68 \pm 1^\circ\text{C}$.

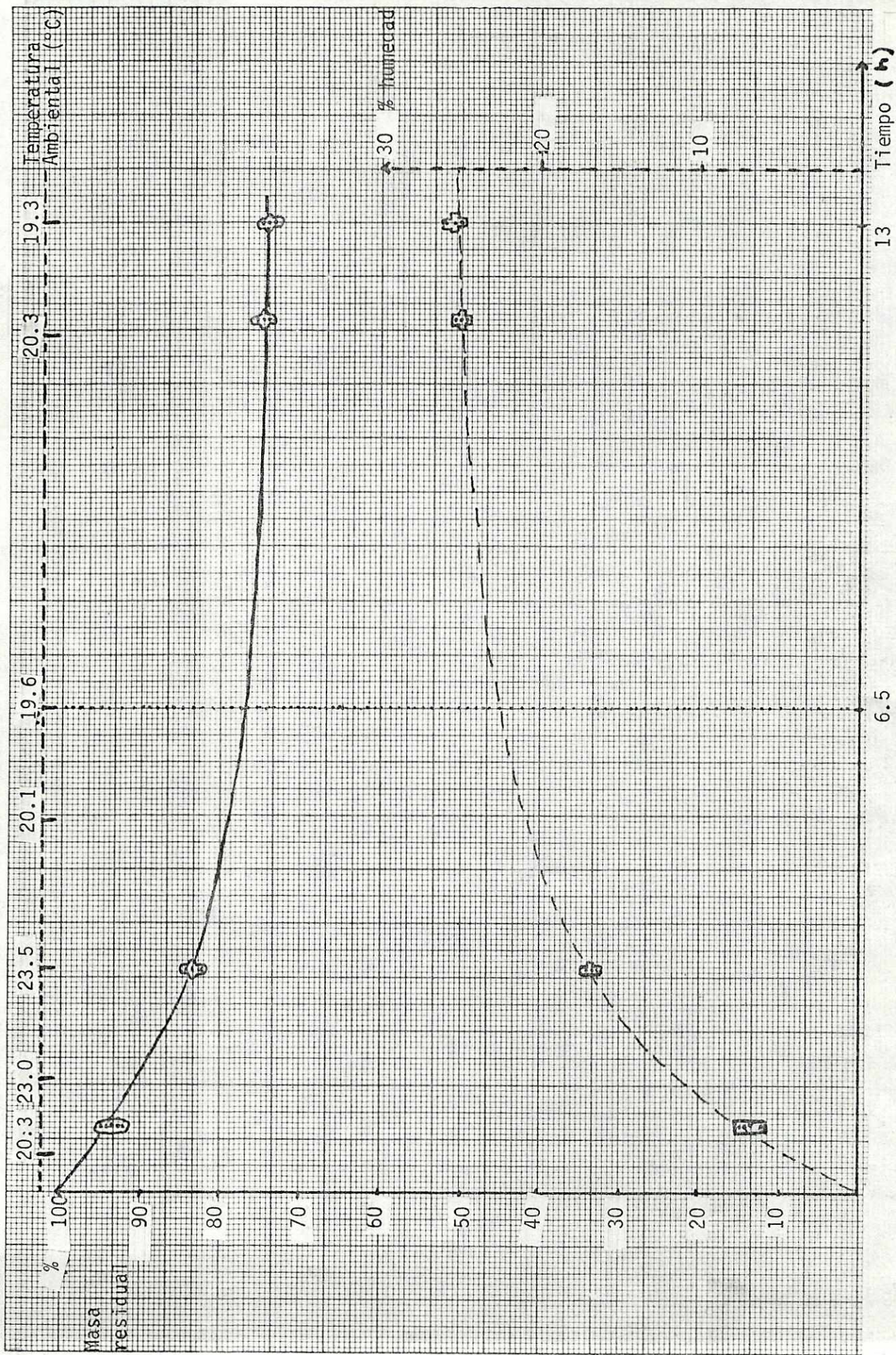
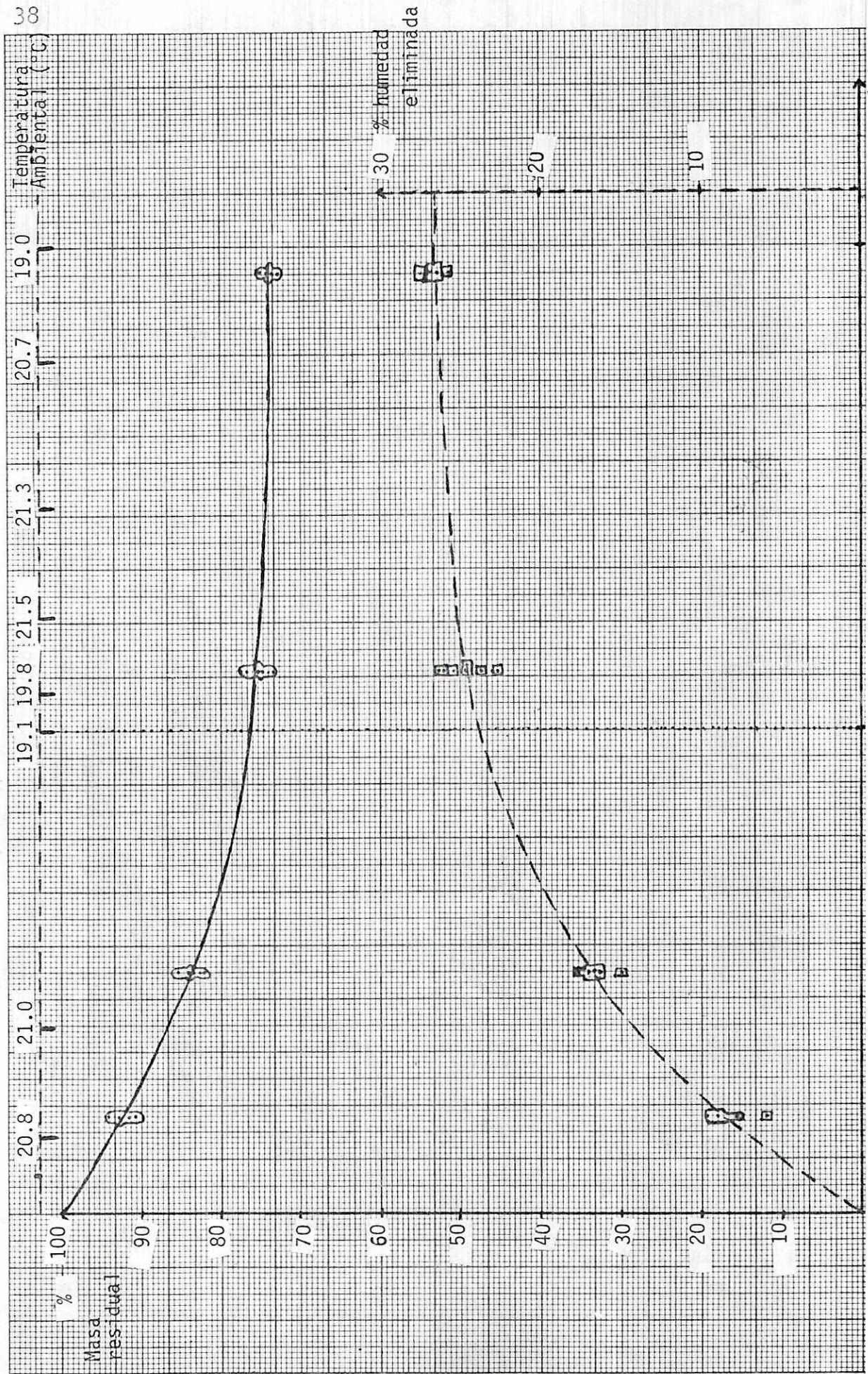


Figura 3: Determinación de la curva de secado al sol de semillas recogidas el 14 de agosto de 1980. Se presentan los porcentajes de humedad eliminada (línea interrumpida) y de masa residual (línea continua). En la parte superior de la figura se presentan las temperaturas ambientales.



38

Figura 4: Determinación de la curva de secado al sol de semillas recogidas el 14 de agosto de 1980. Se presentan los porcentajes de humedad eliminada (línea interrumpida) y de masa residual (línea continua). En la parte superior de la figura se presentan las tem-

peraturas ambientales

Cuadro 2

Secado de semillas enteras en horno a $102 \pm 1^\circ \text{C}$
por 2 horas con corriente de aire

| Muestra | Tiempo de secado | % de masa eliminada | % de masa residual |
|---------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| A | $1.59 \pm 0.01 \text{ h}$ | 19.1720 ± 0.0001 | 80.8280 ± 0.0001 |
| B | $2.05 \pm 0.01 \text{ h}$ | 17.7699 ± 0.0001 | 82.2301 ± 0.0001 |

R9; Extracción de aceite con disolventes:

Se utilizaron los siguientes disolventes:

- n-hexano
- éter de petróleo (40-60°C)
- alcohol isopropílico

Los tres disolventes extrajeron muestras de cotiledón desecado y triturado en un mortero. Los extractores Soxhlet eran del mismo tamaño y funcionaron aproximadamente a la misma velocidad, aunque esto es

difícil de aseverar porque, por los diferentes puntos de ebullición, los disolventes tardaron diferentes tiempos en empezar a reciclar en el aparato. Los resultados se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3

% de masa extraída por diferentes disolventes en una muestra de cotiledón de semilla desecado y triturado en mortero

| Disolvente que se utilizó | Tiempo de extracción | % de masa extraída |
|---------------------------|----------------------|--------------------|
| n-hexano | 9.75 \pm 0.08 h | 36.24 \pm 0.05 % |
| éter de petróleo | 9.75 \pm 0.08 h | 35.01 \pm 0.05 % |
| alcohol isopropílico | 9.75 \pm 0.08 h | 33.69 \pm 0.05 % |

R10; Evaporación del disolvente:

Los disolventes se evaporaron en un aparato de destilación simple calentando el aceite en un baño térmico con agua. El solvente más fácil de evaporar fue el éter de petróleo 40-60°C. Con un baño a 65 \pm 1°C fue suficiente para evaporarlo en una hora aproximadamente. Con n-hexano fue necesario un baño a 80°C y con alcohol isopropílico el baño de agua tuvo que hervir. No pudieron evitarse residuos de estos dos últimos disolventes en el aceite después de 1 hora de evaporación. Por eso se decidió usar éter de petróleo 40-60°C como disolvente en los experimentos de extracción de aceite que siguieron. El extracto de alcohol isopropílico, presentó dos fases al haberse evaporado el disolvente. Las dos fases se analizaron por separado.

R11; Determinación de tres puntos en una curva de extracción de aceite con éter de petróleo 40-60°C:

Tres Soxhlet iguales se pusieron a trabajar con éter de petróleo 40-60°C por tiempos distintos. Los resultados se presentan en la figura 5.

R12; Extracción de aceite con éter de petróleo 40-60°C en un extractor de mayor capacidad:

Una muestra de 0.5 kg. se extrajo con éter de petróleo 40-60°C. El extractor necesitó 1.5 horas para sifonear. Una extracción de 2 sifoneadas, extrajo $0.18 \pm 0.02\%$ de la masa total de la semilla.

Se obtuvieron $45.7 \pm 0.1g$ de aceite, en esta forma se obtuvo suficiente aceite para futuros análisis.

R13; Extracción del aceite por prensado:

Los cotiledones fueron hervidos en agua por 2.5 horas y posteriormente desecados en horno a $68 \pm 1^\circ C$. Una muestra de $1055.5 \pm 0.2g$ se prensó hasta 16000 libras por pulgada cuadrada, durante un período de una hora. Las primeras gotas de aceite se obtuvieron a 6000 libras por pulgada cuadrada.

La cantidad de aceite es difícil de medir, porque una parte considerable se queda en la prensa. Se recogieron $95.4 \pm 0.2g$ lo que representa un rendimiento de $9.04 \pm 0.02\%$. La muestra debió estar muy seca para permitir una extracción adecuada.

R14; Aceite residual en la torta prensada:

Una muestra de $52.6589 \pm 0.0001g$ de torta prensada se extrajo por 16 horas con n-hexano en un aparato Soxhlet. Se extrajo $21.48 \pm 0.05\%$ de aceite.

R15; Caracterización del aceite:

- a) Las propiedades físicas y químicas de los distintos aceites extraídos se presentan en los cuadros 4 y 5 respectivamente.
- b) Como el aceite extraído con éter de petróleo 40-60°C se extrajo varias veces durante el trabajo con muestras de diferentes tiempos de almacenamiento se le midió el valor ácido a las cuatro muestras. El extracto de semilla fresca (determinado el valor ácido a los 3 meses de almacenamiento del aceite en refrigeración) fue de 25.8 ± 0.3 . El aceite de semilla almacenada 2 meses (determinación 8 meses después) es de 28.8 ± 0.3 . El aceite de semilla almacenada 8 meses (determinación a los 2 meses) de 28.5 ± 0.3 y el de semilla almacenada 10 meses (determinación de inmediato) de 29.9 ± 0.3 .
- c) Un extracto de muestra triturada y dejada a la interperie, hecho con alcohol isopropílico, tuvo un valor ácido (en triplicado) de 123.6 ± 0.4 .

R16; Espectros IR

- a) Espectro de la línea basal del aparato. Se detectaron 3 desperfectos importantes en el aparato: 2600, 1670, 1040 cm^{-1} .
- b) Espectros del aceite extraídos por los diferentes métodos. Los resultados de asignación de bandas se presentan en el cuadro 6.
Espectros: 1 - aceite prensado, 2 - extracto de n-hexano después de prensado, 3 - extracto n-hexano, 4 - extracto éter de petróleo 40-60°C, 5 - extracto isopropanol fase superior y, 6 - extracto isopropanol fase inferior. (Ver Anexos H-M)

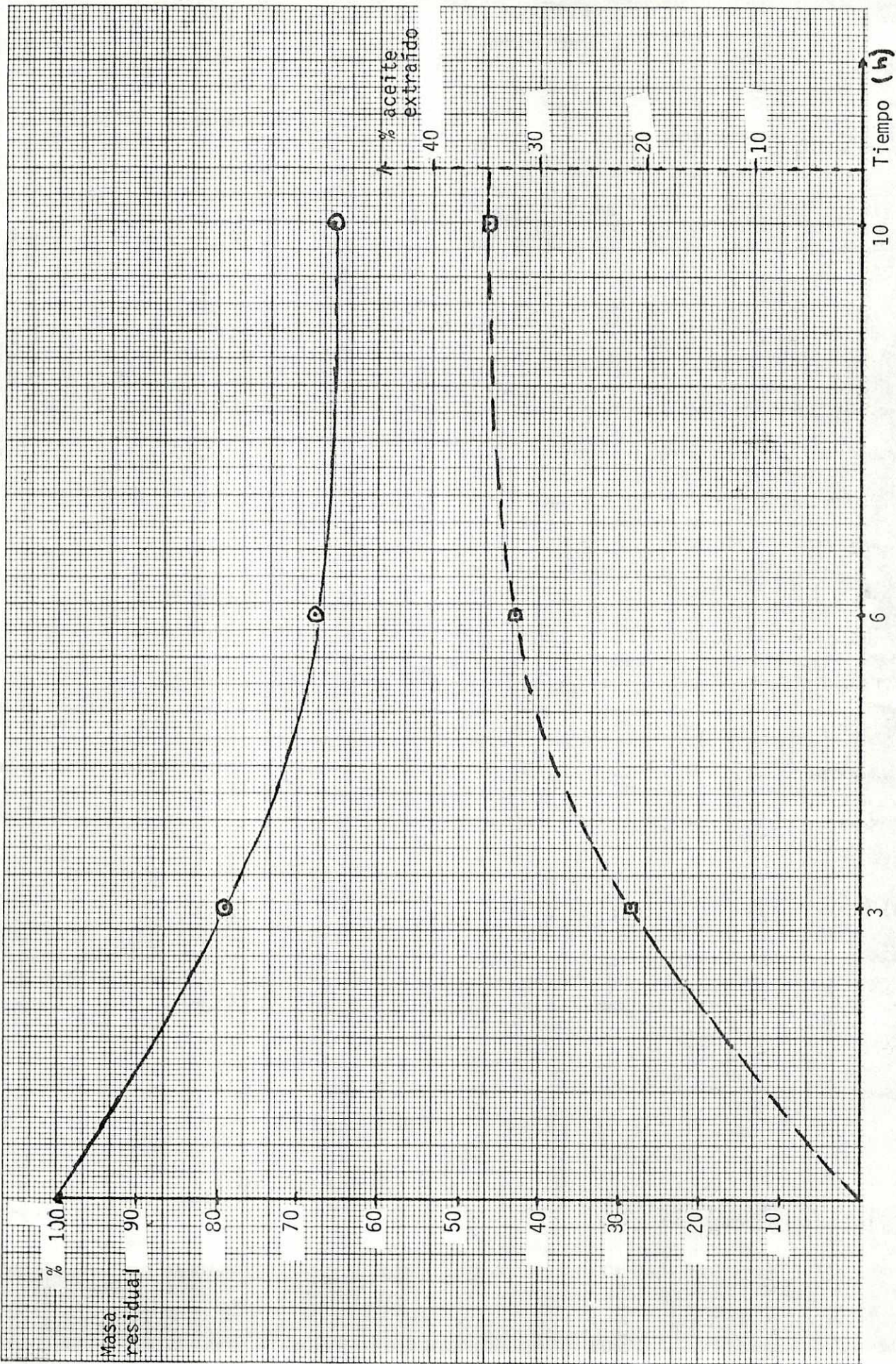


Figura 5: Determinación de tres puntos en una curva de extracción de aceite con éter de petróleo (40-60°C). Se presentan los porcentajes de aceite extraído (línea interrumpida) y de masa residual (línea continua).

Cuadro 4: Propiedades físicas del aceite extraído por diferentes métodos.

Método de extracción

| | con éter de petróleo | con isopropanol | prensado | con n-hexano después de pren- sado |
|----------------------------------|-------------------------|-----------------|---------------|--|
| Punto de fusión | 3-7°C | 2-6°C | 3-7°C | 3-7°C |
| Punto de ebullición (690 mmHg) | se descompone | ---- | se descompone | ---- |
| Densidad 15/15°C | 0.926 ± 0.001 | ---- | 0.935 ± 0.001 | ---- |
| Densidad 25/25°C | 0.923 ± 0.001 | 0.951 ± 0.001 | 0.933 ± 0.001 | 0.928 ± 0.001 |
| Viscosidad 25°C $\frac{g}{mseg}$ | 4.2 ± 0.5 | ---- | 5.2 ± 0.5 | 3.0 ± 0.5 |
| Indice de refracción (25°C) | 1.463 ± 0.005 | ---- | 1.469 ± 0.005 | 1.460 ± 0.005 |
| Indice de refracción (40°C) | 1.466 ± 0.005 | ---- | 1.468 ± 0.005 | ---- |
| Rotación óptica | + 8.6 ± 0.5° | ---- | + 6.0 ± 0.5° | ---- |
| Color | 48.77 ± 0.01 | 87.99 ± 0.05 | 49.33 ± 0.01 | 47.10 ± 0.01 |
| Color después de calentar | 95.32 ± 0.05 | ---- | ---- | ---- |
| Humedad (%) | 2.034 ± 0.001 | 9.345 ± 0.001 | 7.438 ± 0.001 | 4.575 ± 0.001 |

Cuadro 5: Propiedades químicas del aceite extraído por diferentes métodos

Método de extracción

| | con éter de petróleo 40-60°C | con isopropanol | prensado | con n-hexano después de prensado |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------|
| Valor ácido | 29.9 ± 0.3 | 34.8 ± 0.3 | 25.6 ± 0.3 | 25.2 ± 0.3 |
| Valor de yodo | 137 ± 4 | ----- | 140 ± 5 | 138 ± 4 |
| Valor de saponificación | 194 ± 1 | 180 ± 1 | 190 ± 1 | 193 ± 1 |
| Materia insaponificable (%) | 0.98 ± 0.05 | ----- | 1.12 ± 0.05 | ----- |
| Valor de ceniza (%) | 0.094 ± 0.002 | ----- | 0.234 ± 0.005 | ----- |
| Valor hidrójilo | 28 ± 2 | ----- | ----- | ----- |
| Valor acetilo | 27 ± 2 | ----- | ----- | ----- |

Cuadro 6: Bandas de absorción en el infrarrojo detectadas en el aceite de Hevea brasiliensis obtenido por diferentes métodos de extracción.

| | prensado | prensa/+ n-hexano | n-hexano | éter de pe- tróleo | isopropanol se superior | fa- isopropanol se inferior | fa- isopropanol se inferior | Grupo fun- cional |
|-----------|----------|----------------------|----------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| 3250-3450 | X | | | | X | | X | - OH |
| 2970-2990 | X | X | X | X | X | | | - CH ₃ |
| 2925 | X | X | X | X | X | | X | - CH ₂ - |
| 2875-2900 | X | X | X | X | X | | X | - CH ₃ |
| 2800-2850 | X | X | X | X | X | | X | - CH ₂ - |
| 1690-1740 | X | X | X | X | X | | | - CO - O - |
| 1650 | X | | X | X | X | | | C = C |
| 1620 | | | | | | | X | - COO- |
| 1450 | X | X | X | X | X | | X | - CH ₂ - |
| 1400 | | | X | X | X | | X | - CH ₂ - C ≡ N * |
| 1370 | X | X | X | X | X | | X | - CH ₃ |
| 1270-1280 | | | X | X | X | | | - CH |
| 1230 | X | X | X | X | | | | R - C (CH ₃) ₂ -R |
| 1150-1160 | X | X | | | X | | | ester, β insaturado |
| 1090-1120 | X | X | | X | X | | | ester primario o secundario |
| 920-240 | | | X | X | X | | X | - OH |
| 805 | | | | | X | | X | olefina trisubstituida |
| 720 | X | X | X | X | | | | - (CH ₂) ₇ - (o más) |

* (Sillverstein et. al, 1974, Aldrich 1975, Lange 1973).

R17; Espectro ultravioleta del aceite:

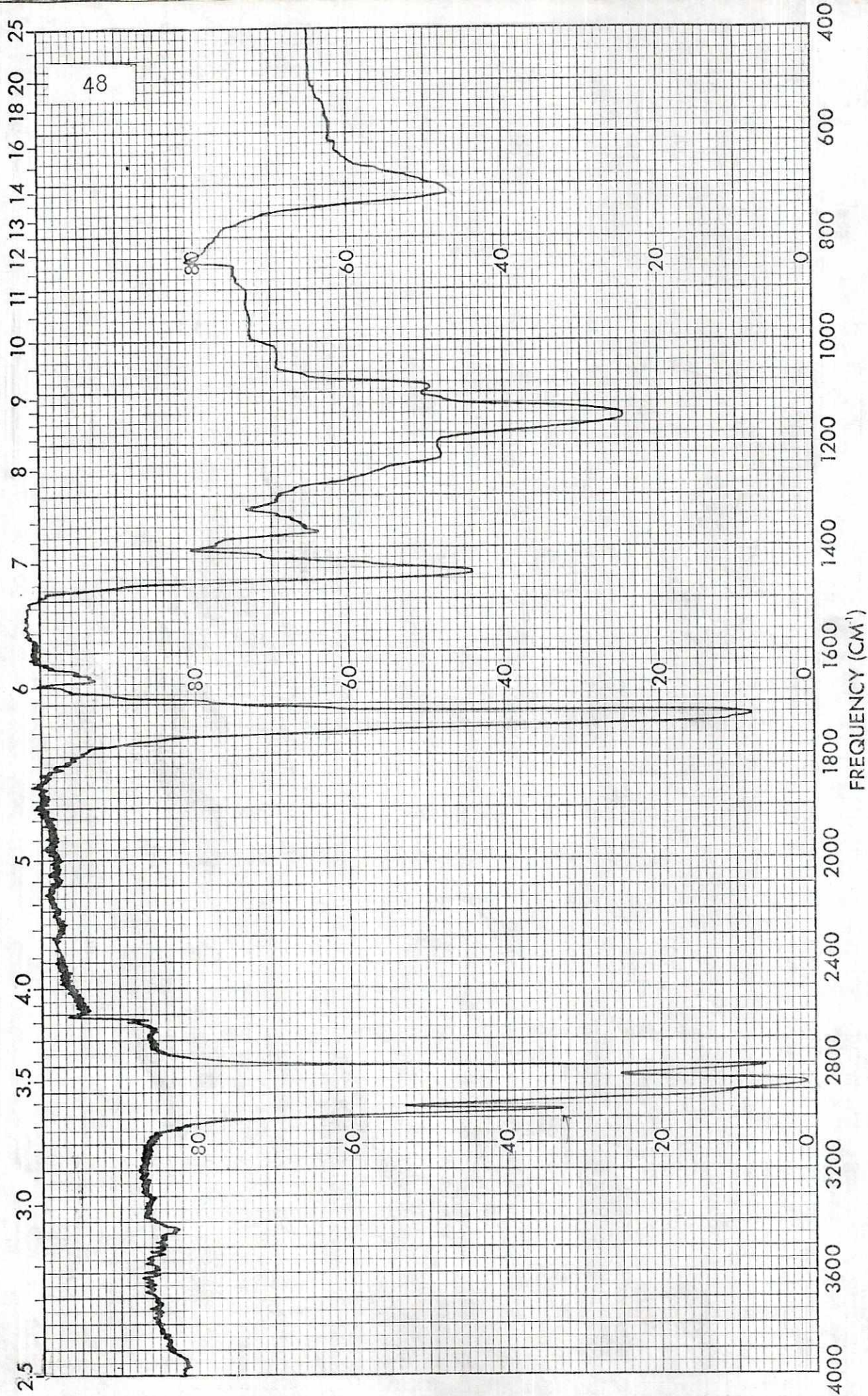
Se obtuvo el espectro de absorción ultravioleta del aceite extraído con éter de petróleo 40-60°C. (Espectro 7). Este aceite tiene un máximo de absorción muy intenso. El máximo de la banda se encontró en 261.8 ± 0.2 nm, sin que pudiera asignarse confiablemente este punto de absorción a ningún grupo funcional.

Para la determinación el aceite debió ser diluido al 50% en CCl₄ por la alta intensidad de la banda de absorción (AOCs Td 2a).

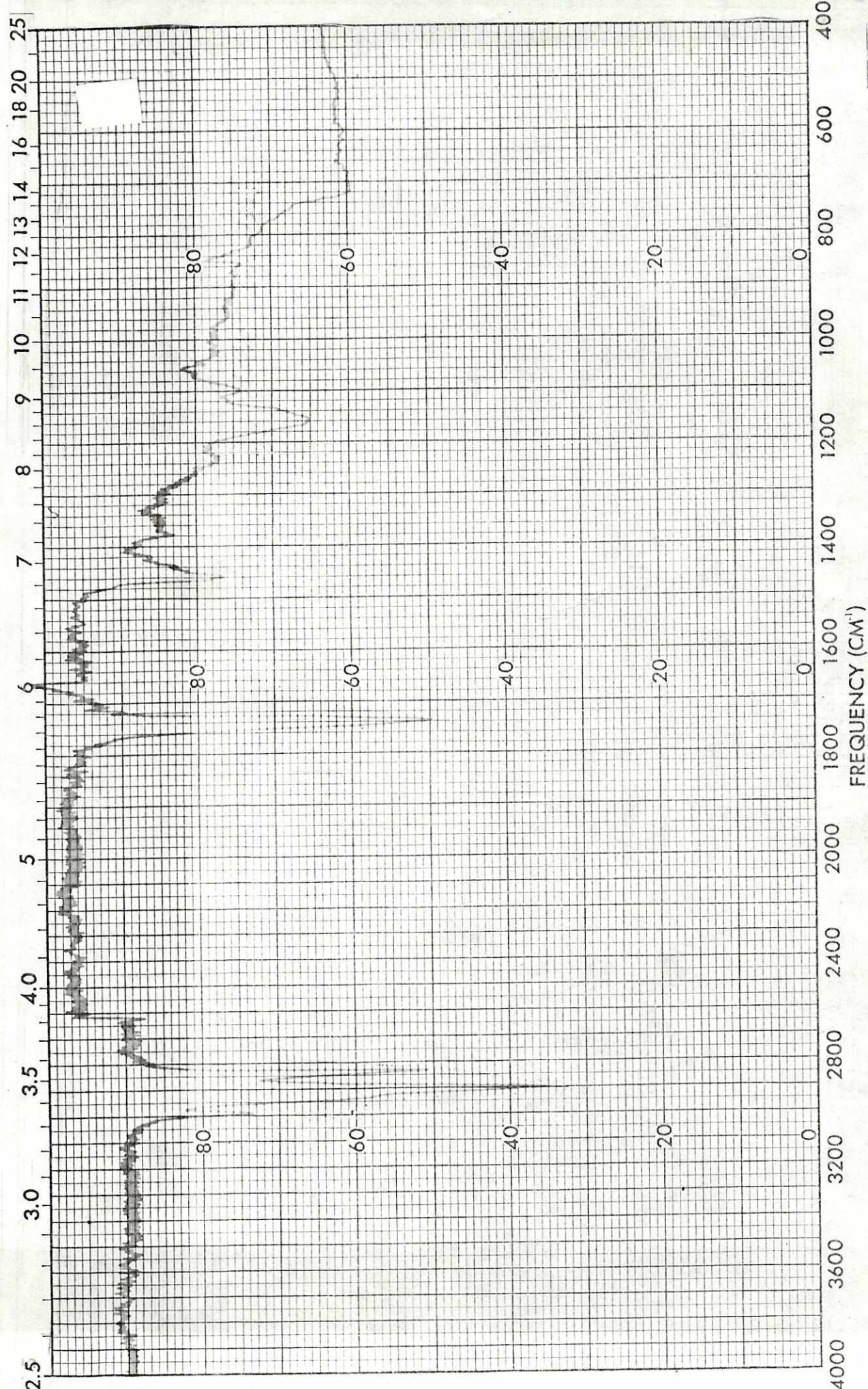
R18; Espectros en el intervalo visible:

Se midieron los espectros de todos los aceites para calcular su color. Los espectros 8 y 9 corresponden al aceite extraído con éter de petróleo y al extraído con isopropanol, respectivamente. En el espectro nueve se ilustra cómo se calcula el color fotométrico. R19; Cuantificación de ácidos grasos presentes en el aceite:

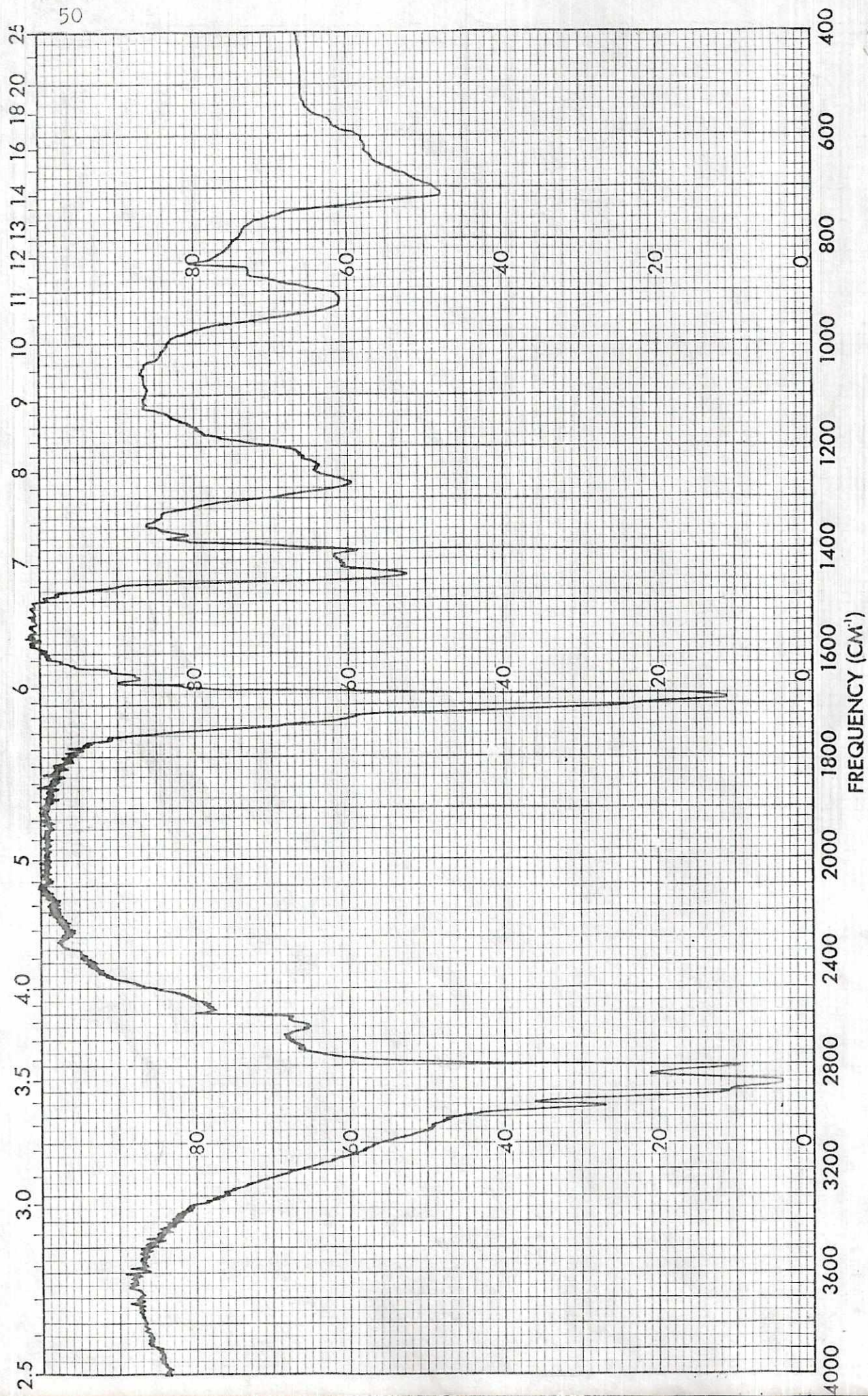
La determinación cromatográfica se hizo con la ayuda de un integrador automático. El cromatograma se presenta en la figura 6 y sus resultados en el cuadro 7.



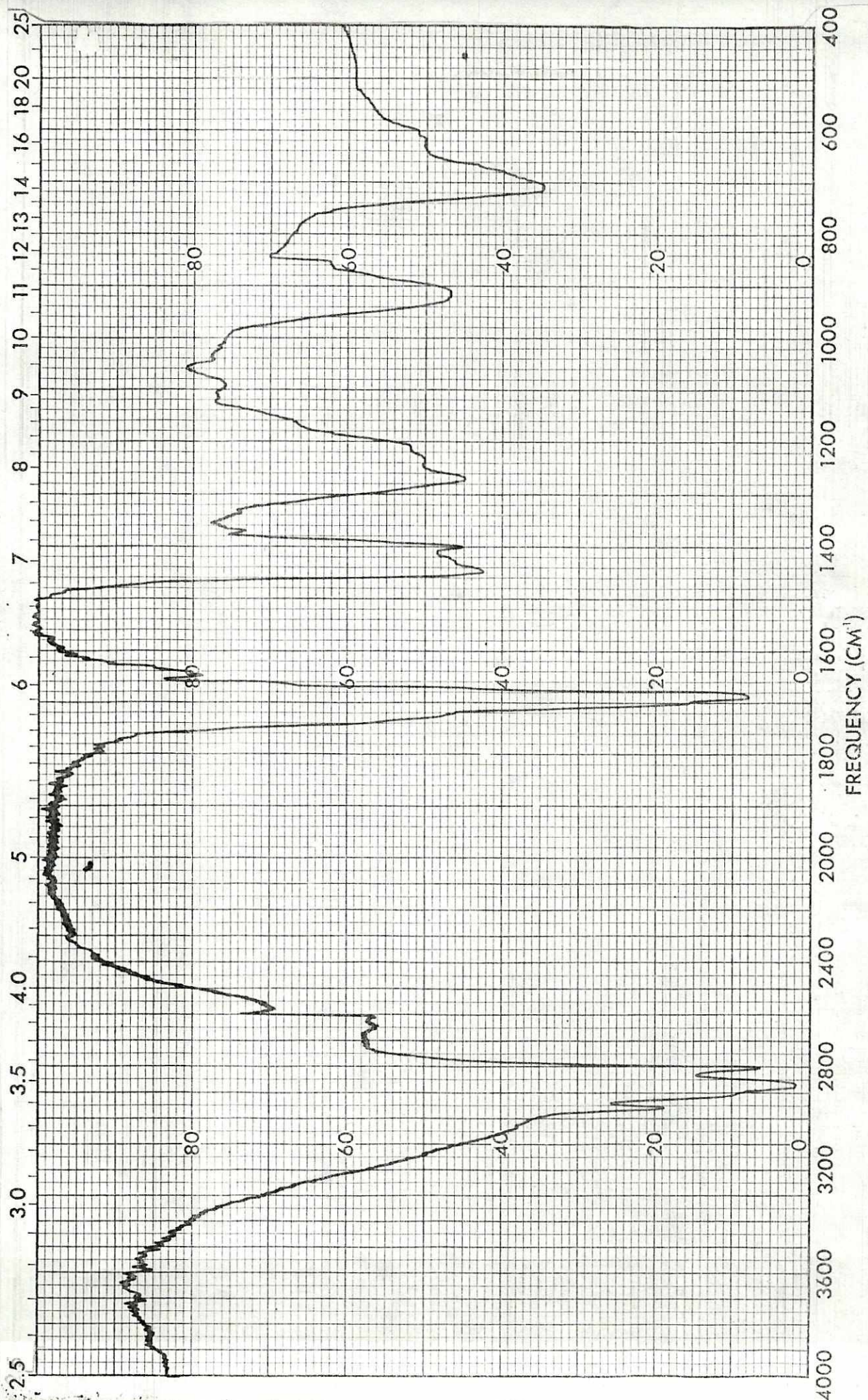
Espectro 1: Aceite obtenido por prensado. Semilla de hule.



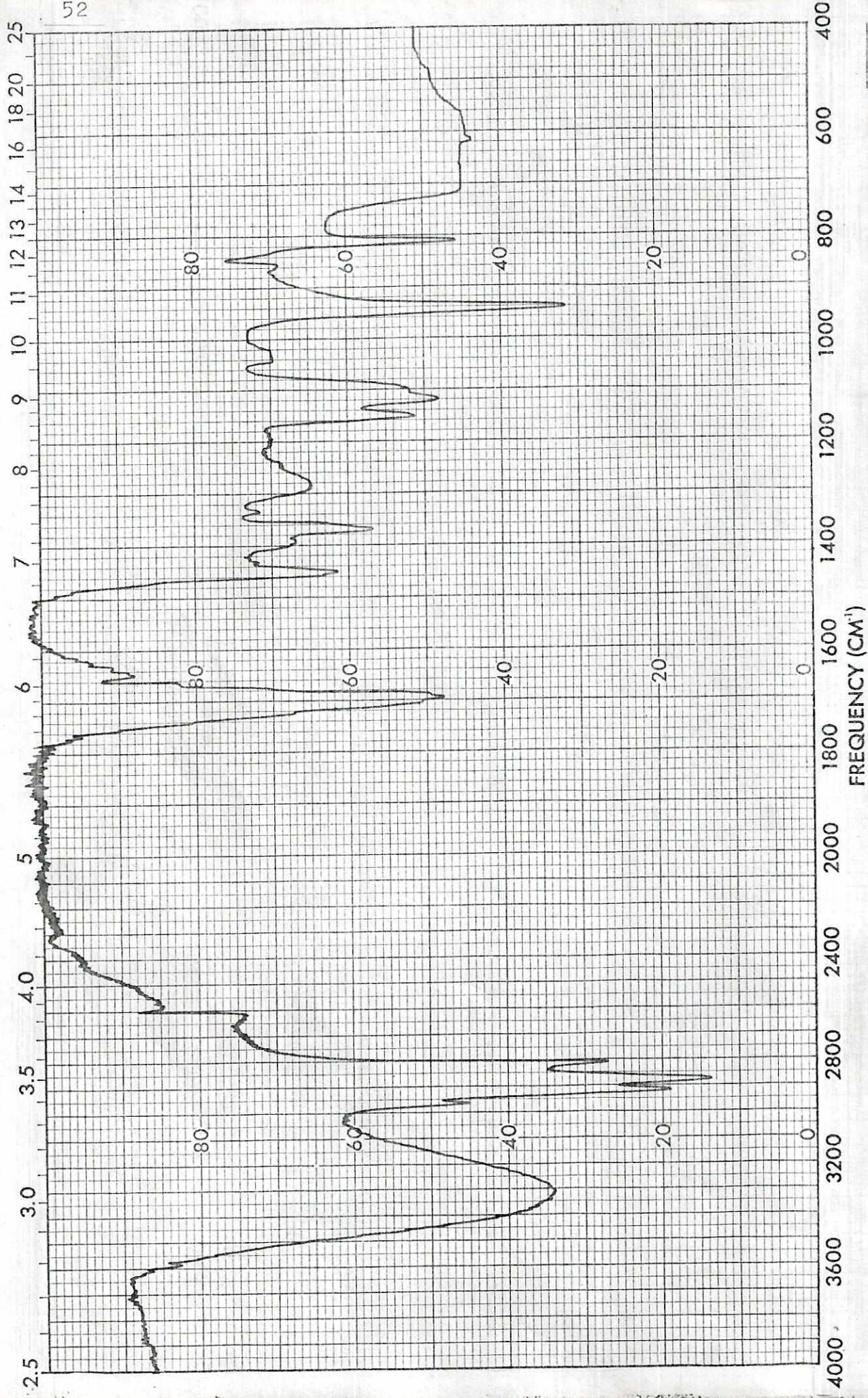
Espectro 2: n-hexano en torta prensada previamente. Semilla de hule



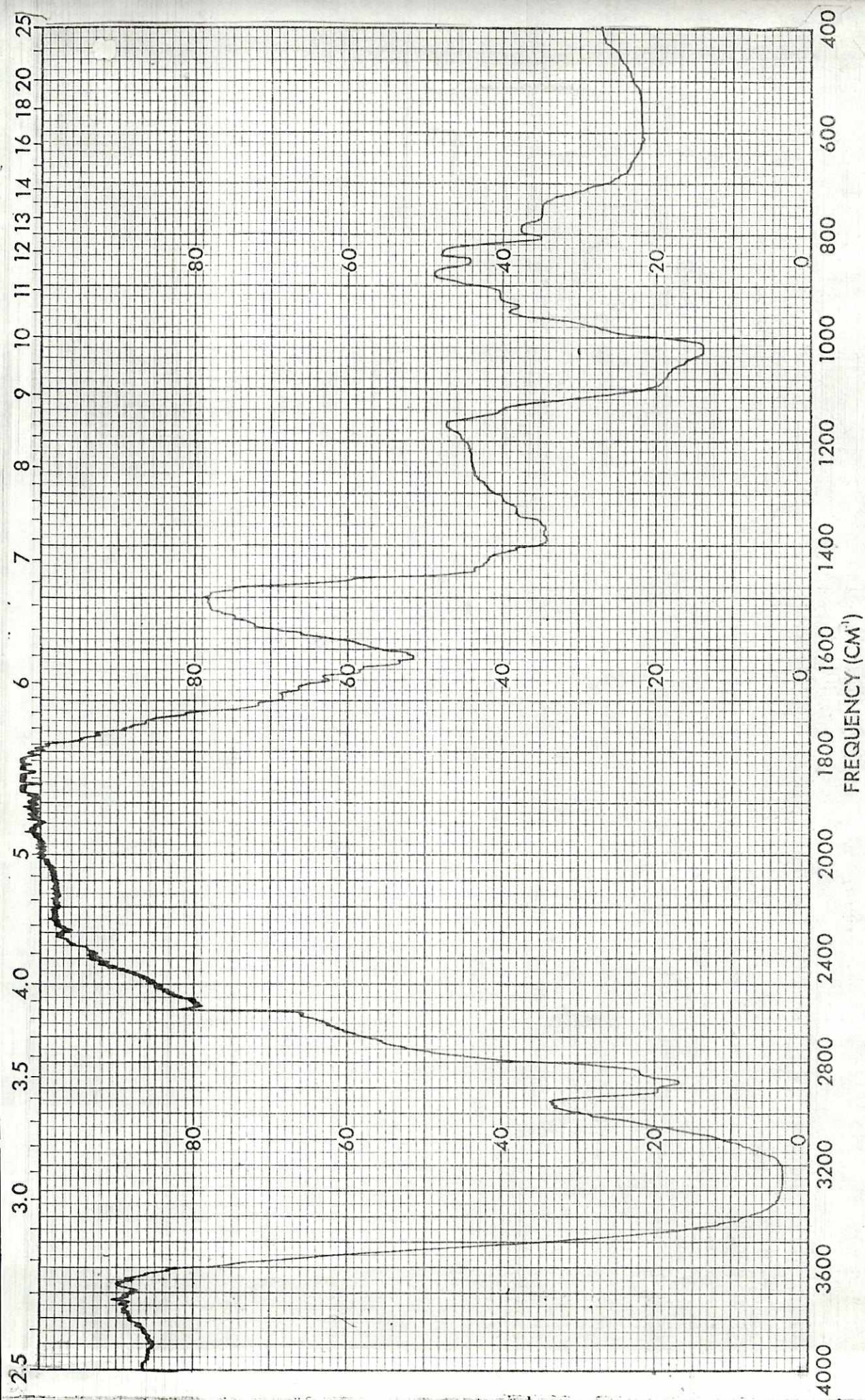
Espectro 3: aceite extraído con n-hexano. Semilla de huile.



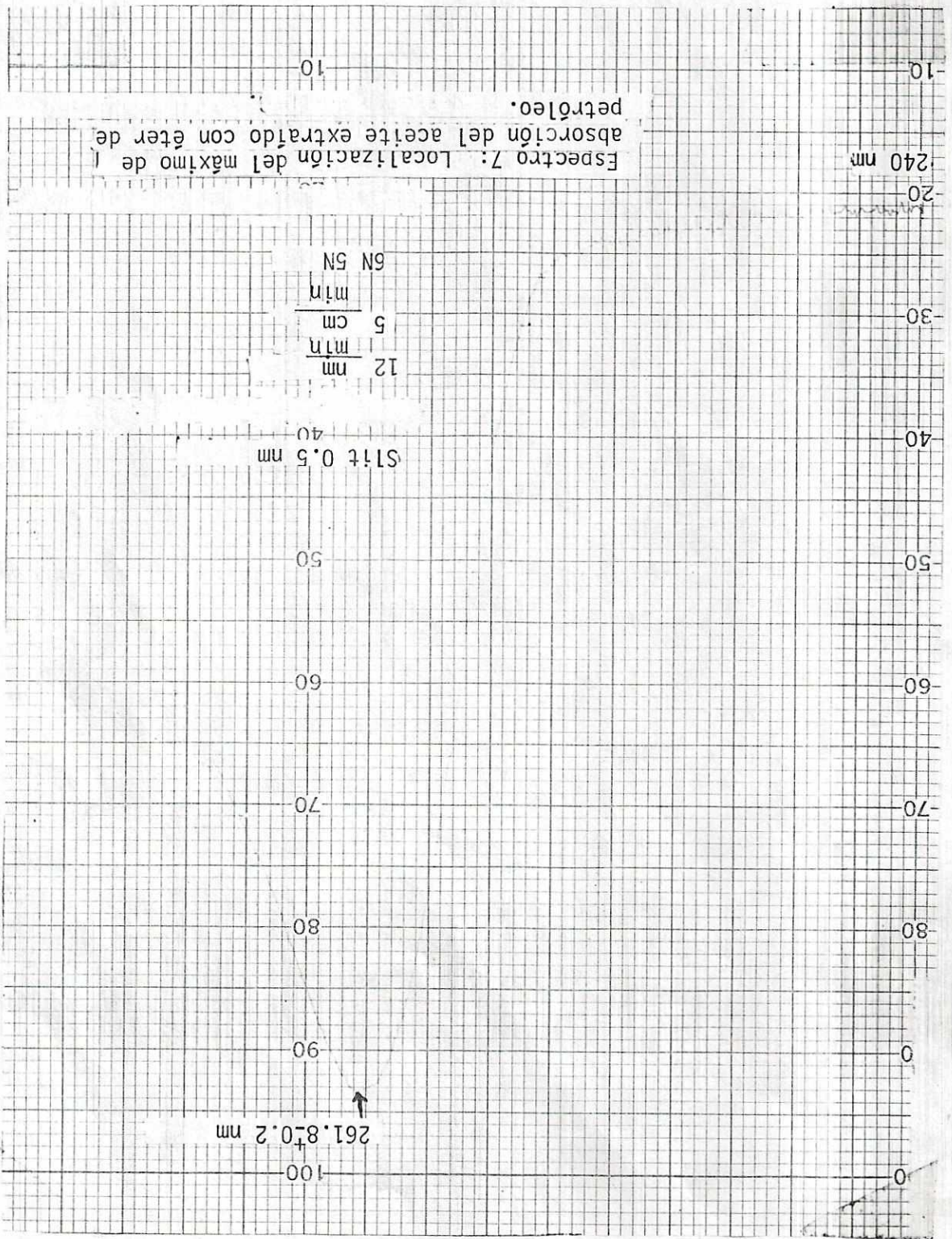
Espectro 4: Aceite extraído con éter de petróleo 40-60°. Semilla de hule.

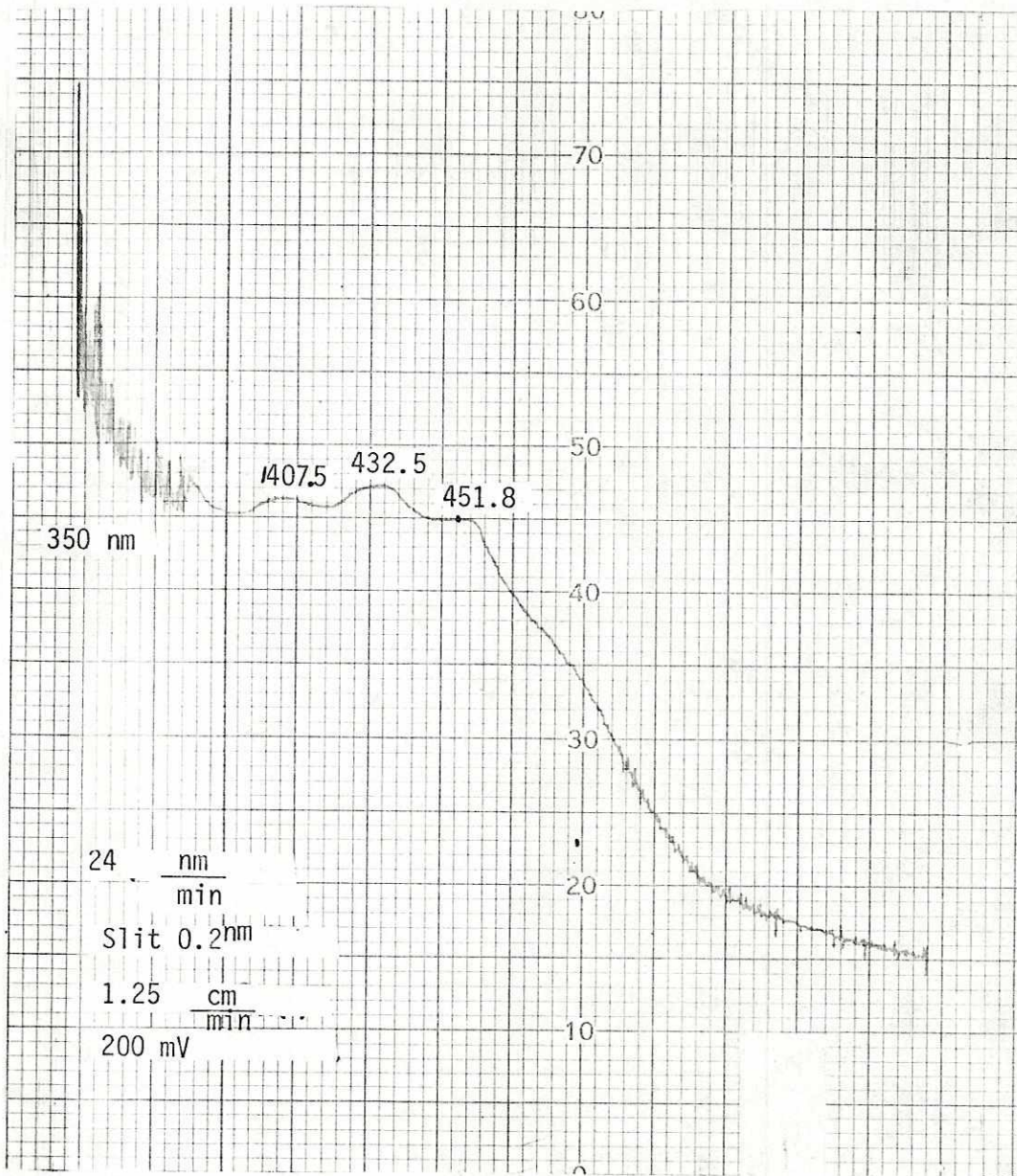


Espectro 5: aceite extraído con isopropanol, fase superior. Semilla de hule.

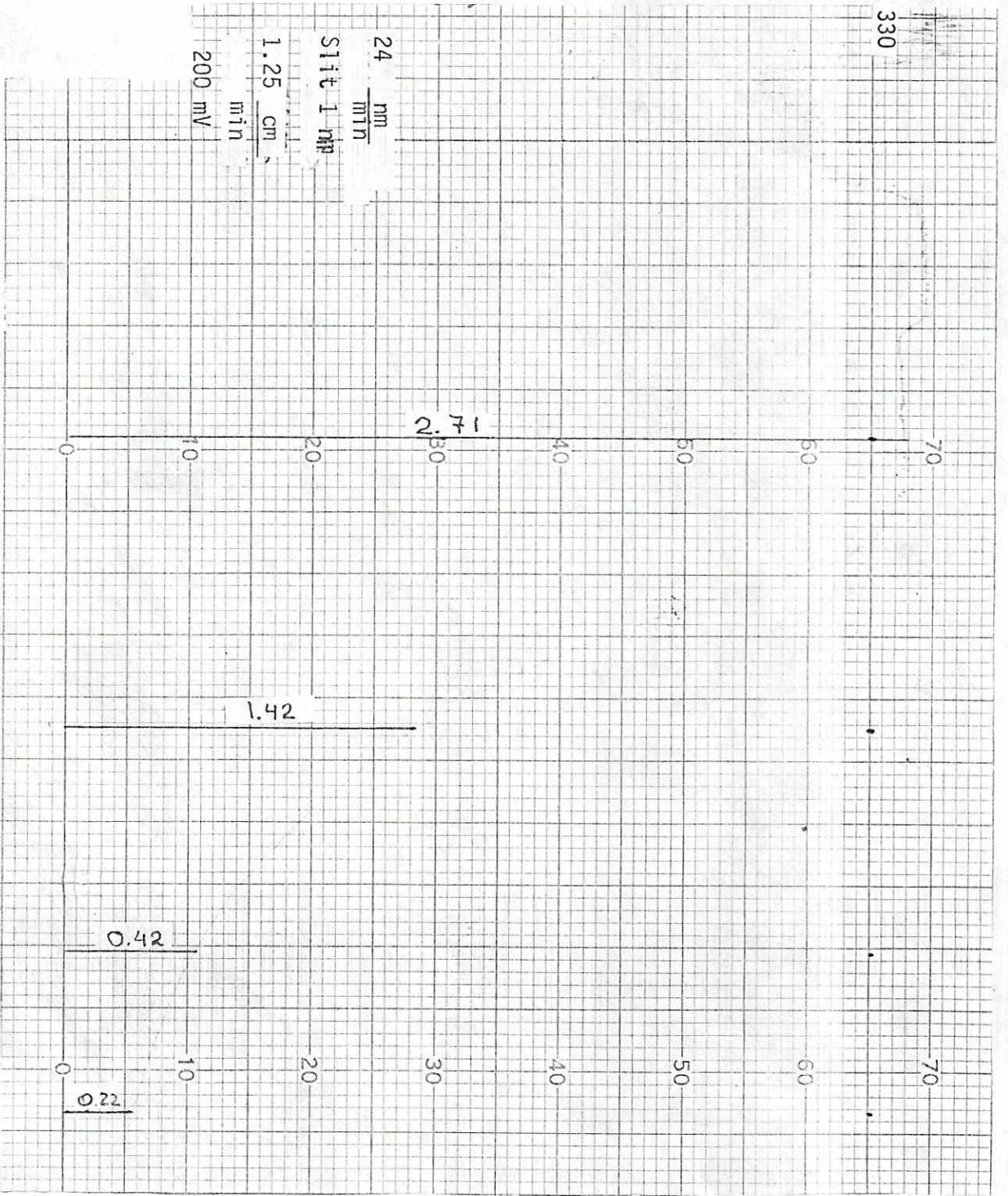


Espectro 6: Aceite extraído con isopropanol, fase inferior. Semilla de hule





Espectro 8: Absorción en el intervalo visible del espectro del aceite extraído con éter de petróleo.



Espectro 9: Absorción en el rango visible del aceite extraído con isopropanol. Se ilustra el método utilizado para el cálculo del color.

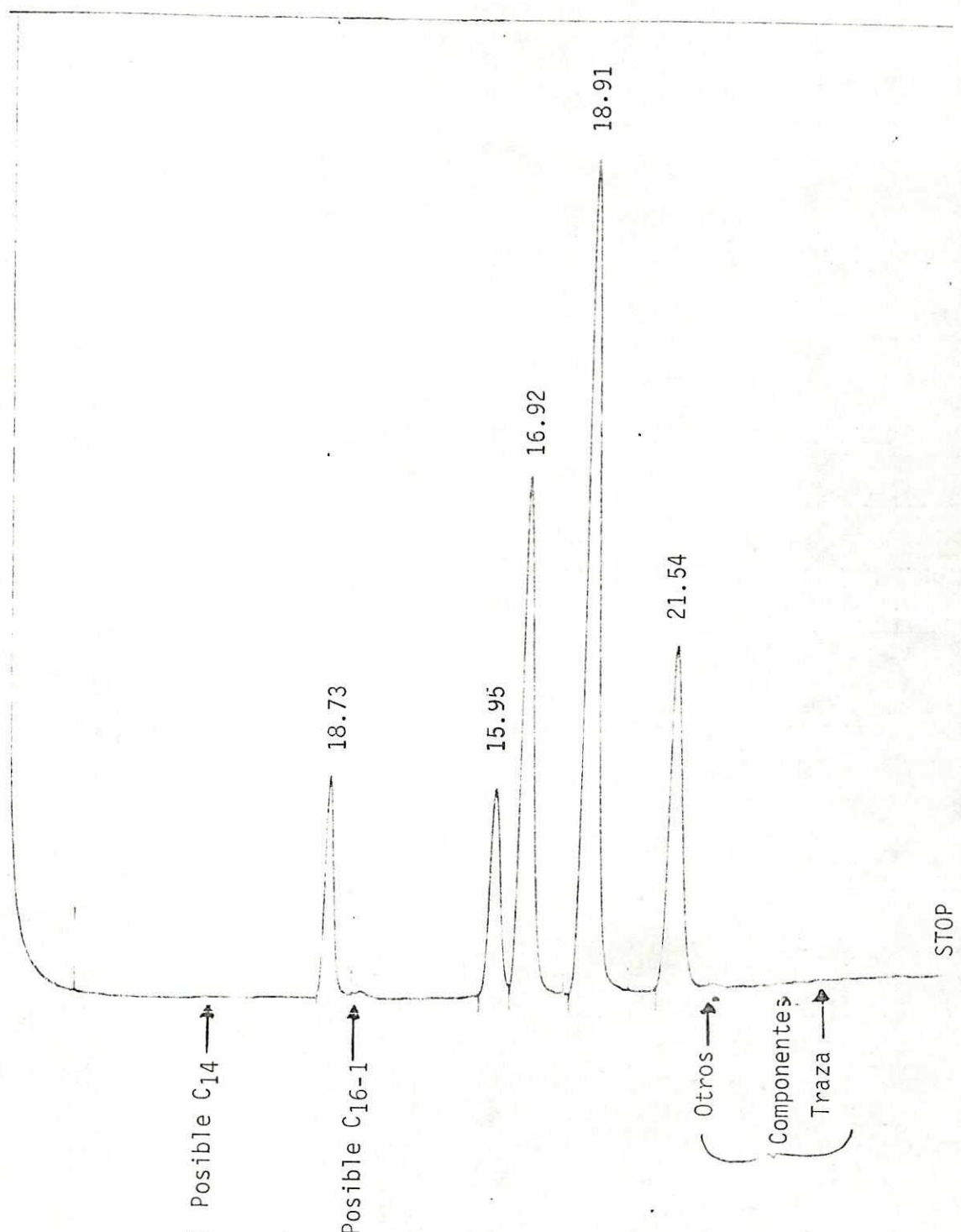


Figura 6: Cromatograma de los esteres metílicos de una muestra de aceite.

Cuadro 7

Contenidos de ácidos grasos obtenidos
del integrador (en %)

| | | |
|---------------|-------|--------------------------|
| a. Palmítico | 7.474 | Total saturados: 16.237% |
| a. Esteánico | 8.763 | |
| a. Oléico | 24.76 | |
| a. Linoléico | 41.14 | |
| a. Linolenico | 17.86 | |

R20; Cuantificación de glucósidos cianogénéticos:

a) Curva de calibración. La curva de calibración se preparó a partir de una solución de 25.22 ± 0.03 $\mu\text{g/ml}$ de KCN en NaOH 0.2 M (solución A) y dos diluciones: 12.61 ± 0.04 $\mu\text{g/ml}$ (solución B) y 6.30 ± 0.03 $\mu\text{g/ml}$ (solución C). Se prepararon 9 tubos de reacción como explica el cuadro 8 obteniéndose las absorbancias allí especificadas. Los datos obtenidos se comportan en una forma bastante lineal como puede verse en la figura 7. La recta que se obtiene por regresión es la siguiente:

Absorbancia = $(0.64 \pm 0.02)(\text{concentración}) + (0.43 \pm 0.03)$ con $r^2 = 0.995$ y expresándose concentración en $\mu\text{g/ml}$ de KCN.

b) Solución de enzima. La poca reproducibilidad de las mediciones con la enzima extraída del cortex de la yuca, y la imposibilidad de medir directamente la actividad de esta enzima, obligó a que se preparara una disolución de β - glucosidasa comercial.

La disolución de 660.7 ± 0.1 mg en 100.0 ± 0.1 ml hecha con enzima de 6.30 ± 0.05 unidades por mg dió una solución con 48.2 ± 0.5 unidades por ml.

Cuadro 8: Datos para la elaboración de la curva estándar

| Identificación | Volumen de disolución básica de pícrito en en ml ± 0.05 ml | Volumen de disolución de regulador de fos- fato pH: 6.8 en ml ± 0.01 ml | Volumen de disolución KCN y su identifica- ción en ml ± 0.01 ml | Concentración KCN en el vo- lumen final de 7.00 ± 0.07 ml en µg/ml | Absorbancia promedio en 4 lecturas |
|----------------|--|--|---|--|--|
| B | 5.00 | 2.00 | 0.00 | 0.00 | 0.394 ± 0.002 |
| 1 | 5.00 | 1.50 | 0.50 disolución C | 0.45 ± 0.02 | 0.694 ± 0.002 |
| 2 | 5.00 | 1.25 | 0.75 disolución C | 0.68 ± 0.02 | 0.844 ± 0.002 |
| 3 | 5.00 | 1.00 | 1.00 disolución C | 0.90 ± 0.02 | 1.014 ± 0.002 |
| 4 | 5.00 | 0.75 | 1.25 disolución C | 1.13 ± 0.03 | 1.180 ± 0.002 |
| 5 | 5.00 | 0.50 | 1.50 disolución C | 1.35 ± 0.03 | 1.291 ± 0.002 |
| 6 | 5.00 | 1.00 | 1.00 disolución B | 1.80 ± 0.04 | 1.664 ± 0.002 |
| 7 | 5.00 | 0.50 | 1.50 disolución B | 2.70 ± 0.05 | 2.20 ± 0.005 |
| 8 | 5.00 | 1.00 | 1.00 disolución A | 3.60 ± 0.08 | 2.64 ± 0.01 |

a: disolución A = 25.22 ± 0.03 mg/ml
 disolución B = 12.61 ± 0.04 mg/ml
 disolución C = 6.30 ± 0.03 mg/ml

c) Determinación de concentración de cianuro. La forma en la que se aforaron los extractos de los distintos productos de procesamiento de la semilla se presentan en el cuadro 9. Se presentan allí mismo los resultados de concentración de cianuro obtenidos en cada producto (en $\mu\text{g KCN}$ por g de la muestra extraída).

Para comparar el contenido de CN^- que queda en la semilla después de los diferentes pasos de procesamiento, los resultados del cuadro 9 se expresaron de nuevo en función de la masa de semilla fresca correspondiente a la muestra que se utilizó. Los resultados de estos cálculos aparecen en el cuadro 10.

R22; Pruebas de la actividad de las enzimas:

No se hicieron pruebas formales para la medición de la actividad de la enzima.

Lo que sí se hizo fue mostrar que las enzimas tenían la actividad mínima de hidrolizar una disolución de linamarina cuya concentración era mayor a lo esperado para la semilla de hule.

a) Prueba para la actividad de linamarina extraída de yuca. La hidrólisis de 0.50 ± 0.01 ml de una disolución 0.051 ± 0.001 mM de linamarina produjo una absorbancia ya corregida de 1.023 ± 0.002 . El valor calculado de absorbancia a partir de la curva de calibración es de 0.98 ± 0.05 . El valor obtenido está por encima del calculado, pero dentro del error experimental si coinciden. Sin embargo, las mediciones hechas con la linamarina extraída de yuca tuvieron una variación muy grande al comparar un valor con otro. Esto se atribuyó a que la linamarasa no se hubiera aislado adecuadamente y por lo tanto existieran residuos de li-

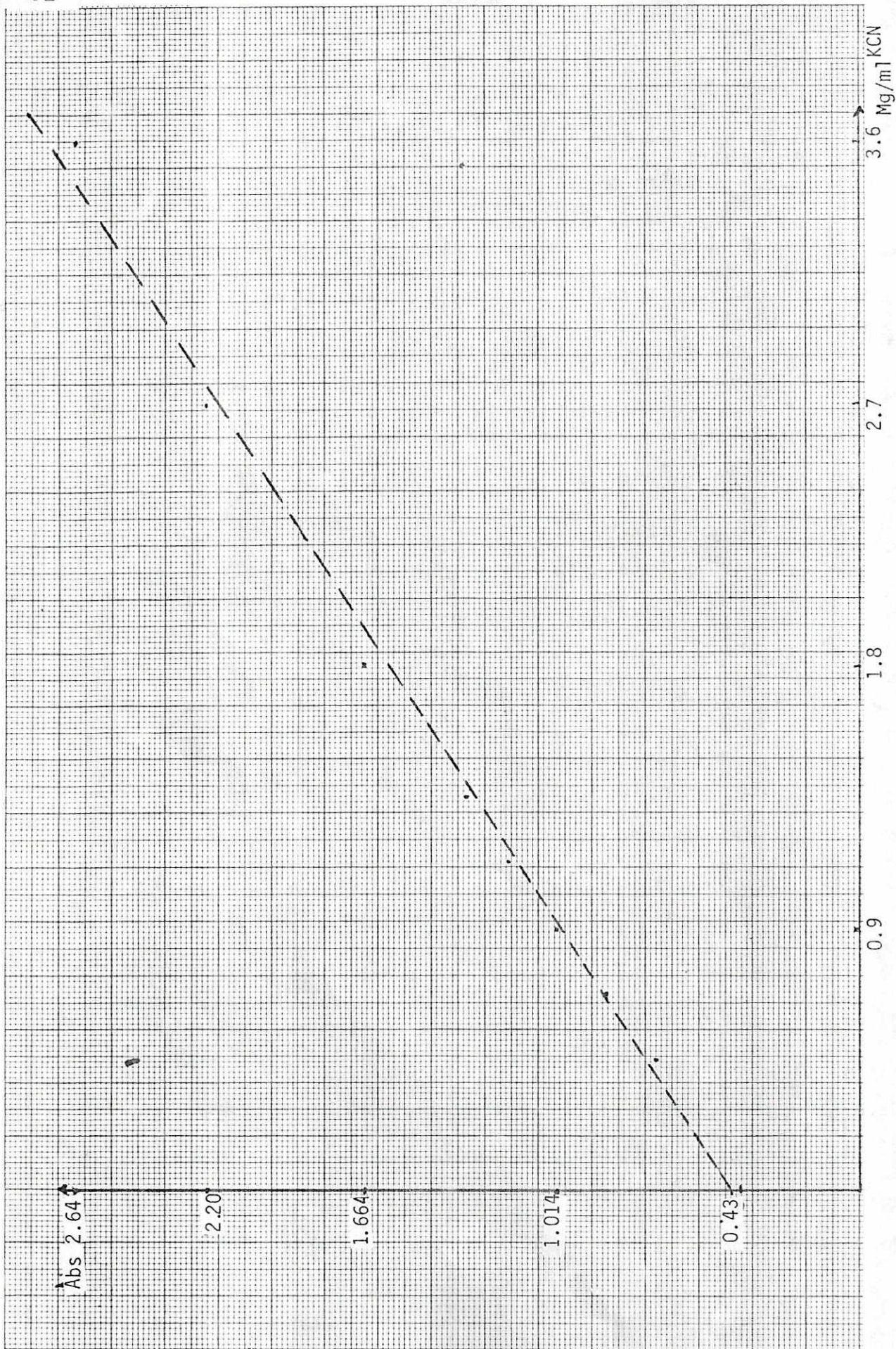


Figura 7: Curva de calibración para CN^- con solución alcalina de picrato.

namarina no homogéneamente distribuidos en el extracto de la enzima. Como se tenía una enzima comercial, de actividad conocida, de pureza asegurada y dando resultados más reproducibles, la linamarina extraída de la yuca se descartó.

b) Prueba de la actividad de la enzima comercial. 0.50 ± 0.01 ml de disolución 0.051 ± 0.001 mM de linamarina se hidrolizaron con la disolución de B - glucosidasa dando una absorbancia ya corregida de 0.985 ± 0.002 .

El valor calculado de 0.98 ± 0.05 coincide perfectamente asegurando hidrólisis completa.

Cuadro 9: Datos sobre la preparación y resultados del contenido de glucósidos cianogénicos^a, de los productos de la semilla de hule

| Muestra | Masa de la muestra en g ± 0.0001 g | Volumen de aforo del extracto en ml | Volumen de alícuota ml ± 0.01 ml | Absorbancia a 490 nm ya corregida por blancos CN ⁻ libre | | Concentraciones de KCN en mg/g de muestra libre | | Concentraciones de KCN en mg/g total | |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---|-----------------------|---|----------|--------------------------------------|-------|
| | | | | CN ⁻ libre | CN ⁻ total | libre | enlazada | libre | total |
| Semilla entera fresca | 52.7580 | 250.0 ± 0.2 | 0.50 (1libre) 0.20 (total) | 2.64 ± 0.01 | 2.070 ± 0.005 | 229 ± 16 | 197 ± 60 | 426 ± 44 | |
| Semilla entera seca | 46.4333 | 250.0 ± 0.2 | 0.25 | 2.010 ± 0.005 | 2.33 ± 0.01 | 372 ± 35 | 75 ± 77 | 447 ± 42 | |
| Cotiledón seco | 36.0375 | 250.0 ± 0.2 | 0.25 | 2.070 ± 0.005 | 2.45 ± 0.01 | 500 ± 46 | 113 ± 98 | 613 ± 56 | |
| Cáscara seca | 34.7136 | 250.0 ± 0.2 | 0.25 | 0.561 ± 0.002 | 0.939 ± 0.003 | 41 ± 13 | 119 ± 35 | 160 ± 22 | |

a: Los datos representan un promedio de cuatro mediciones.

Los contenidos totales de cianuro se determinaron con B-glucosidasa.

Cuadro 9B: Datos sobre la preparación y resultados del contenido de glucósidos cianogénicos^a, de los productos de la semilla de hule.

| Muestra | Masa de la muestra en 9 ± 0.0001 g | Volumen de aforo del extracto en ml | Volumen de alícuota $m \pm 0.01$ ml | Absorbancia a 490 nm ya corregida por blancos | | Concentraciones de KCN en Mg/g de muestra | | |
|---|--|-------------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------|---|---------------|----------------|
| | | | | CN ⁻ líbre | CN ⁻ total | líbre | enlazada | total |
| Aceite extraído con éter petróleo 40-60°C | 7.0658 | 50.0 \pm 0.1 | 0.50 | 0.465 \pm 0.002 | 0.457 \pm 0.002 | 5 \pm 5 | -1 \pm 10 | 4. \pm 5 |
| Aceite extraído con n-hexano | 6.3382 | 50.0 \pm 0.1 | 0.50 | 0.484 \pm 0.002 | 0.486 \pm 0.002 | 9 \pm 6 | 1 \pm 12 | 10 \pm 6 |
| Aceite extraído por prensado | 7.0393 | 50.0 \pm 0.1 | 0.50 | 0.492 \pm 0.002 | 0.493 \pm 0.002 | 10 \pm 5 | 0 \pm 10 | 10 \pm 5 |
| Aceite extraído con isopropanol fase superior | 6.2792 | 0.0 \pm 0.1 | 0.50 | 0.528 \pm 0.002 | 0.630 \pm 0.002 | 34 \pm 13 | 36 \pm 28 | 70 \pm 15 |
| Aceite extraído con isopropanol fase inferior | 2.2809 | 250.0 \pm 0.2 | 0.50(líbre) 0.20(total) | 1.867 \pm 0.005 | 1.169 \pm 0.003 | 3445 \pm 262 | 984 \pm 822 | 4429 \pm 560 |

a: Los datos representan un promedio de cuatro mediciones.
Los contenidos totales de cianuro se determinaron con B-glucosidasa.

Cuadro 9C: Datos sobre la preparación y resultados del contenido de glucósidos cianogénicos^a, de los productos de la semilla de hule.

| Muestra | Masa de la muestra en $g \pm 0.0001$ g | Volumen de aforo del extracto en ml | Volumen de alícuota $ml \pm 0.01$ ml | Absorbancia a 490 nm ya corregida por blancos | CN ⁻ libre | CN ⁻ total | Concentraciones de KCN en Mg/g de muestra | Libre | enlazada | total |
|---|--|-------------------------------------|--------------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|---|--------------|----------|-------|
| Torta residual de la extracción con éter | 22.8838 | 250.0 ± 0.2 | 0.25 | 2.080 ± 0.005 | 2.46 ± 0.01 | 7.89 ± 73 | 181 ± 162 | 970 ± 89 | | |
| Torta residual de la extracción con n-hexano | 36.8136 | 250.0 ± 0.2 | 0.25 | 2.42 ± 0.01 | 2.62 ± 0.01 | 526 ± 48 | 125 ± 107 | 651 ± 59 | | |
| Torta residual del prensado | 42.7755 | 250.0 ± 0.2 | 0.25 | 1.982 ± 0.005 | 2.186 ± 0.005 | 397 ± 37 | 52 ± 78 | 449 ± 41 | | |
| Torta residual de la extracción con isopropanol | 31.2809 | 250.0 ± 0.2 | 0.25 | 1.237 ± 0.003 | 1.675 ± 0.003 | 282 ± 32 | 153 ± 75 | 435 ± 43 | | |

a: Los datos representan un promedio de cuatro mediciones. Los contenidos totales de cianuro se determinaron con B-glucosidas.

Cuadro 10

Contenidos de cianuro (presentados en el cuadro 9 en base a g de muestra) en base a masa equivalente de semilla entera fresca

| Muestra | Contenidos de cianuro en Mg. KCN/g de semilla entera fresca | | |
|--|---|--------------|--------------|
| | libres | enlazadas | totales |
| Semilla entera fresca | 229 \pm 16 | 197 \pm 60 | 426 \pm 44 |
| Semilla seca | 221 \pm 21 | 63 \pm 48 | 284 \pm 27 |
| Cotiledón seco | 156 \pm 14 | 35 \pm 31 | 191 \pm 17 |
| Cáscara seca | 13 \pm 4 | 39 \pm 11 | 52 \pm 7 |
| Aceite extraído con éter de petróleo 40-60°C | 1 \pm 1 | 0 \pm 2 | 1 \pm 1 |
| Torta residual de la extracción con éter de petróleo | 159 \pm 15 | 37 \pm 33 | 196 \pm 18 |
| Aceite extraído con n-hexano | 1 \pm 1 | 0 \pm 2 | 1 \pm 1 |
| Torta residual de la extracción con n-hexano | 103 \pm 9 | 25 \pm 21 | 128 \pm 12 |
| Aceite extraído por prensado | 1 \pm 1 | 0 \pm 2 | 1 \pm 1 |
| Torta residual de la extracción de aceite por prensado | 78 \pm 7 | 10 \pm 15 | 88 \pm 8 |
| Aceite extraído con isopropanol (fase superior) | 3 \pm 1 | 2 \pm 2 | 5 \pm 1 |
| Aceite extraído con isopropanol (fase inferior) | 35 \pm 7 | 27 \pm 22 | 122 \pm 15 |
| Torta residual de la extracción con isopropanol | 58 \pm 7 | 31 \pm 16 | 89 \pm 9 |



V. DISCUSION DE RESULTADOS

a) Recolección de la semilla

La forma en la que el fruto madura y expelle las semillas desde lo alto del árbol, hace que las semillas se dispersen por toda la plantación.

Por el relieve y la constitución del suelo, lleno de basura en descomposición, el recoger la semilla mecánicamente se dificulta un poco, sobre todo si no se ha eliminado la maleza. De manera que si se deja que la semilla caiga no quedan alternativas para la recolección: debe hacerse a mano. Este procedimiento es lento y a la larga costoso y compromete la calidad del producto recolectado.

La semilla cae durante un tiempo relativamente corto del año, en cantidades muy grandes y debe recogerse a diario completamente. El costo por recoger la semilla hace 5 años oscilaba entre 3 y 4 quetzales el quintal; de manera que el bajo costo de la semilla misma informado antes (Rosal 1970, de Mejía 1979) deja de ser un factor importante.

Otra posibilidad es cosechar el fruto antes de que caiga, pero la altura de los árboles y su estructura de ramas, imposibilita una recolección mecánica. Recoger el fruto a mano, antes de que caiga, requiere tecnología y no baja el costo de recolección.

b) Limpieza y decortinado.

La semilla recogida a mano está bastante limpia. Tallos, hojas y pabillos que pudiesen estar presentes pueden ser eliminados por tamizado. Pa-

ra decorticar la semilla puede utilizarse maquinaria para semilla de algodón. La condición de humedad de la semilla es esencial para el decorticado. Si el cotiledón está muy húmedo, el cotiledón y la cáscara son muy difíciles de separar.

La vaina fibrosa se adhiere muy fuertemente a las dos partes imposibilitando la separación. Una semilla muy seca tiene la desventaja de que el cotiledón queda muy quebradizo y se rompe, imposibilitando igualmente la separación. Para que ésta pueda tener éxito, el cotiledón debe permanecer entero y la cáscara romperse para que una separación por tamizado sea posible. Semilla con humedad entre 10% y 20% mostró cualidades adecuadas para el decorticado, pero no puede darse un porcentaje más exacto porque en este trabajo no se trabajó con la maquinaria, sino que se decortizó a mano. Las secciones RI-R3 presentan algunos de los resultados del decorticado a mano. La determinación de masa de la semilla y de las masas relativas entre cáscara y cotiledón (Sec. RI) confirma datos bibliográficos (Eckey 1956, Hilditch 1949, 1956, Williams 1966).

Uno de los problemas difíciles de resolver, que está relacionado con la recolección, limpieza y decorticado, es la cantidad de semilla que desde su recolección está dañada.

Merece considerarse el ataque de la semilla por depredadores (Sec. R-3). El hecho de que en ninguna de las semillas afectadas pudo capturarse un predador mayor, sugiere que éste abandona la semilla antes de que esta cae del árbol.

El ataque simultáneo de Penicillium sp. parece estar de acuerdo con informes que afirman que éste hongo generalmente está relacionado con ataques de insectos depredadores Penicillium-sp. es una infestación muy

común en semillas. Se ha demostrado que controla el crecimiento de otros hongos en semillas almacenadas.

La refrigeración y el secado mostraron ser efectivos controles para el ataque de estos hongos (Sec.R-2).

El porcentaje de semillas dañadas baja un poco en los análisis después de seis meses de almacenamiento y de secado, además debe reconocerse que en el caso de semillas secas, es muy difícil de reconocer una semilla fermentada.

Desde el punto de vista de la búsqueda de un control para estas afecciones de la semilla no se ha hecho nada porque no afectan directamente al rendimiento de latex de la planta. Pero una industria de semilla, con un porcentaje de semilla afectada mayor a 12, ya consideraría la enfermedad, como un problema con repercusiones de tipo económico y digno de estudio. El trabajo que se haga en esta área dependerá de la aplicación definitiva de la semilla.

c) Secado

Los dos procedimientos utilizados para secar la semilla probaron ser aplicables para preparar la semilla para decortado, pues tanto en horno con corriente de aire a $68 \pm 1^\circ\text{C}$ como al sol (Sec. R-4; 5) la humedad de la semilla se redujo a cerca de 10% en un período de unas 13 horas de exposición a temperatura.

La sorprendente velocidad con la que las muestras secadas al sol perdieron humedad pudo ser ocasionada por el hecho de que las semillas estuvieron sobre azafates metálicos en la azotea de un edificio con sol directo y sin mucho aire.

Sin embargo, ninguno de los métodos probados parece ser completamente realista. El secado al sol, en la costa en época lluviosa, es muy difícil de concebir. Un horno con corriente de aire involucra el gasto de mucha energía aumentando considerablemente el costo del producto final. Y sin embargo, la regulación de la humedad es necesaria para control de hongos y para evitar que la semilla germine. Una alternativa es el uso de un proceso de extracción de aceite que no requiera secado.

La humedad de una muestra de semilla aumenta conforme entra el invierno. De las dos muestras de semilla, la que se recogió en julio tuvo una humedad de cerca de 4% menos que la recogida en agosto (Sec. R8).

La extracción de la humedad es retardada considerablemente por la cáscara (Sec. R6, 7), pero como la humedad debe estar regulada para decorticar la semilla, es preferible para fines prácticos secar antes de decorticar.

De los métodos de secado utilizados en este trabajo, ninguno de los dos, cumple las especificaciones sugeridas por Karmas (1980) para procesos de secado. Las técnicas analíticas más exactas, y cuidadosas en proteger la identidad de la muestra, que él sugiere, serían incosteables.

d) Extracción del aceite

La extracción más completa de aceite se logró con n-hexano, obteniéndose un total de 36.24 ± 0.05 % en base seca en cotiledón (Sec.R9). Asumiendo una distribución de masa de 50% en la cáscara y 50% de la almendra, este dato corresponde a 18.1% de aceite en la semilla entera (si se asume despreciable la cantidad de aceite en la cáscara). Este dato queda corto del 25% encontrado por Analyst (1910).

La composición general de la semilla que se presenta en este artículo de principio de siglo se reproduce en el cuadro 11.

Williams (1966), Hilditch (1956, 1960, 1947), Eckey (1954) y Bailev (1979), informaron entre 40 y 50% de aceite en la almendra que corresponde de 20 a 25% en la semilla, un dato más cercano al que se obtuvo aquí.

Cuadro 11

Composición^a de la semilla de hule

Hevea brasiliensis

| | |
|------------------|--------|
| Humedad | 11.00% |
| Aceite | 24.87% |
| Albuminoides | 9.63% |
| Carbohidratos | 22.55% |
| Fibra | 30.40% |
| Material Mineral | 1.55% |

a. Tomado de (Analyst, 1910)

El resultado, que está por debajo de los informados en la bibliografía, pudo deberse a:

- Resíduos de aceite que no se extrajeran después de 10 horas. Un tratamiento térmico previo, como el que se usó en la extracción por prensado, probablemente hubiera contribuido en mejorar el rendimiento.
- Utilización de disolventes poco cuantitativos. Lichtfield (1972) y Kates (1972) recomiendan la utilización de mezclas de cloroformo con metanol para extraer los lípidos más cuantitativamente, pues los disolventes apolares extraen los triglicéridos, lípidos neutros, muy cuantitativamente, pero no así una gran parte del insaponificable: esteroles y pigmentos. Para extraer esta parte deben usarse otros solventes más polares, como el sugerido antes. Pero este procedimiento utiliza disolventes que tienen las desventajas de ser más caros y potencialmente venenosos; además, la extracción de un insaponificable muy completo, no siempre es deseable.

El tiempo de extracción necesario para extraer un porcentaje deseado de aceite varía enormemente con el disolvente (Sec. R9) y con el tamaño del aparato de extracción (Sec. R11 y R12). Por eso no puede tomarse decisión de qué tiempo de proceso de extracción se recomienda usar sin considerar las características del proceso que se utilizará. En el presente trabajo se insistió en utilizar éter de petróleo (40-60°C) como disolvente principalmente porque fue el disolvente que pudo eliminarse del aceite extraído con mayor facilidad (Sec. R10).

La extracción del aceite por prensado fue muy pobre, pudiendo extraerse solamente un 25% del aceite contenido en la semilla. El rendimiento podría mejorarse prensando muestras de semilla que se ha reducido en tamaño previamente. El prensado en caliente tiene la ventaja de extraer más aceite, pero liberaría gran parte del cianuro residual de la semilla, que como se ve en el cuadro 9 es de más de 450 Mg de KCN por g de muestra que se prensa. Con la tecnología convencional esto representa un gran peligro de intoxicación para personas que están cerca de la prensa.

La condición de humedad de los cotiledones es básica en el proceso de prensado. Si la humedad es muy grande, es imposible obtener el aceite pues los cotiledones se licúan en la prensa y salen por los poros de prensado, inclusive a presiones muy bajas. El procedimiento de cocer la semilla antes de prensarla presenta la desventaja, de que el aceite se obtiene con muchas pequeñas partículas suspendidas, que son difíciles de extraer en una forma práctica y rápida.

Comparando los rendimientos de los diferentes procesos de extracción, asumiendo que el rendimiento del experimento con n-hexano como disolvente extractor tuvo una extracción completa del aceite, se obtienen los siguientes resultados: n-hexano extrae 100% del aceite contenido en el cotiledón de la semilla, éter de petróleo extrae $96.613 \pm 0.004\%$, con isopropanol $92.959 \pm 0.004\%$ y por prensado se extrae $24.95 \pm 0.06\%$.

Se extrajo con distintos disolventes en busca del que reduzca a un mínimo no sólo el aceite en la torta, sino también la cantidad de cianuro

nuro presente. Para esto se tomó muy en cuenta que en la semilla de algodón una mezcla de disolventes se ha desarrollado, que elimina no sólo el gósipol (sustancia tóxica) sino también el aceite en un solo paso. (Gastrok 1965). La desventaja de este proceder es su elevado costo, principalmente por el costo de la mezcla de solventes. El mejor disolvente en este sentido fue el alcohol isopropílico, pues su rendimiento fue aceptable y eliminó gran parte del cianuro.

Los métodos de prensado en general son bastante empíricos y grandes cantidades de aceite se quedan en la prensa y sus aditamentos para prensado. Pero esta dificultad no es muy determinante porque una segunda extracción con el aparato ya usado, o sea sucio de aceite del extracto anterior, es mucho más cuantitativa. En general en los experimentos de prensado no se pone atención a las cantidades pequeñas de desperdicios. Otro punto en el que puede disminuir el rendimiento de aceite es en el procedimiento de cocción de la semilla. Una parte del aceite puede perderse en el agua de cocción.

La caracterización física y química de los aceites extraídos, en forma de índices de tipo tradicional, produjo, con muy pocas excepciones, resultados que estuvieron en perfecta concordancia con los rangos presentados en recopilaciones de trabajos previos. Para tener una base de comparación se presentan estos, junto a los obtenidos en este trabajo en el cuadro 12. Representados allí, por este trabajo, aparecen sólo los valores obtenidos para aceite extraído por prensado, n-hexano después de prensar y éter de petróleo 40-60°C, porque los valores obtenidos del aceite extraído con isopropanol son en general distintos por el solvente utilizado. La masa específica 15/15°C y el %

de material insaponificable que están ligeramente por encima de los límites presentados en la bibliografía pertenecen al aceite obtenido por prensado y podrían explicarse por impurezas en el aceite. Como los cotiledones fueron calentados antes de ser prensados, éste aceite tuvo muchas partículas sólidas suspendidas. Aunque gran parte de éstas se quitó por filtración, pequeños residuos podrían explicar la densidad y el % de material insaponificable obtenidos.

El índice de acetilo de 27 corresponde al de hidroxilo de 28 y a pesar de que parece estar afuera de los límites que informa la A.O.C.S. (1980), si se observa la incertidumbre del valor 27 ± 2 presentada en el cuadro 5, se vé que concuerda justamente con los valores bibliográficos.

La información de los cuadros 4 y 5, que presentan los valores de propiedades físicas y químicas de los aceites obtenidos de cuatro maneras distintas, muestra la diferencia que hay entre los aceites extraídos por solventes apolares o por prensado y el aceite extraído con alcohol isipropólico.

Cuadro 12: Características físicas y químicas, en forma de índices tradicionales, del aceite extraído de la semilla de hule *Hevea brasiliensis*

| | Eckey | A.O.C.S. I 1-46 1980 | Williams 1966 límites usuales típico | Hilitch 1956 | Gunstone 1946 | Límites ^a en el presente trabajo |
|--------------------------------------|-------------|-------------------------|--|-----------------|------------------|--|
| 1. Masa específica 15/15°C | 0.924-0.939 | 0.924-0.930 | 0.924-0.927 | 0.9258 | ---- | 0.926-0.935 |
| 2. Masa específica 25/25°C | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 0.923-0.933 |
| 3. Índice de refrac- ción 25°C | ---- | 1.462-1.474 | ---- | ---- | ---- | 1.460-1.469 |
| 4. Índice de refrac- ción 40°C | 1.466-1.469 | 1.466-1.470 | ---- | ---- | 1.466-1.469 | 1.466-1.468 |
| 5. Índice de acidez | 4-40 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25.2-29.9 |
| 6. Índice de yodo | 132-141 | 128-142 | 135-140 | 134.5 | 132-148 | 137-140 |
| 7. Índice de sapo- nificación | 140-195 | 186-195 | 190-195 | 191.7 | 190-195 | 190-194 |
| 8. Material insapo- nificable (%) | 0.5-1.0 | bajo 1 | ---- | 0.53 | 0.5-1.0 | 0.65-1.12 |
| 9. Índice de hidro- xilo | 12-32 | ---- | ---- | ---- | ---- | 28 |
| 10. Índice de acetilo | ---- | 28-32 | ---- | ---- | ---- | 27 |
| 11. Titer (°C) | 28-32 | 28-33 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 12. Índice de Reichert- Meissl | ---- | bajo 0.5 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 13. Ácidos grasos li- bres (%) | ---- | ---- | varía grandemente | ---- | 2-20 | ---- |
| 14. % ácidos saturados | 23 | 13-16 | 16-23 | 24 | 14-25 | 16.2 |
| 15. % ácidos insatura- dos | 27 | 76-82 | 47-70 | 76 | 75-86 | 83.8 |

a. Se presentan los valores para el aceite prensado, extraído con n-hexano después de prensar o el extracto de éter de petróleo de los cuadros 4 y 5. Se omiten las incertidumbres.

Algunas de las diferencias como la densidad por ejemplo, se explican por residuos de disolvente en el aceite extraído con isopropanol y otras por la polaridad del disolvente extractor, como el color del aceite y su mayor humedad. Con un disolvente más polar se extrajeron más pigmentos y se extrajo agua esperándose un % de material insaponificable mayor, y por lo tanto un índice de saponificación menor, como el que en efecto se obtuvo.

Entre los aceites extraídos por disolventes apolares no hay diferencias demasiado significativas. La viscosidad del aceite extraído con n-hexano después de prensar es menor, probablemente debido a residuos de disolvente. La humedad que contiene es mayor, propiedad que podría explicarse por el procedimiento de cocer la semilla en agua antes de extraerse por presión y luego con n-hexano.

Finalmente el aceite extraído por prensado, tiene mayor densidad, viscosidad, índice de refracción, índice de color, humedad, % de material insaponificable y % de ceniza. A pesar de que todas las diferencias son pequeñas, son consistentes con el método de extracción. El valor mayor en los primeros cuatro índices listados arriba probablemente este relacionado con que en este caso no se utilizaron disolventes en la extracción del aceite. La mayor humedad probablemente se deba al procedimiento de cocción previo al prensado. En general todas las propiedades físicas y químicas del aceite se ven afectadas, además, por las impurezas, que por el procedimiento de extracción son inevitables, explicando así los valores distintos obtenidos.

Los valores ácidos obtenidos en el aceite son tema aparte. Hilditch (1949-1956), Williams (1966) y Eckey (1954) aseguran que el aceite contiene una enzima lipolítica. Estas enzimas liberan los ácidos grasos de los triglicéridos (Whitaker 1973). Eckey (1954) informa que la enzima lipolítica se activa en cuanto la semilla cae del árbol. Por esto es muy importante que la semilla sea recogida muy rápidamente y la enzima sea desactivada. Esto según Hilditch (1949) podría hacerse calentando la semilla fuertemente por un período corto de tiempo, en cuanto se recoge.

El valor ácido del aceite extraído con éter de petróleo 40-60°C de semillas almacenadas en refrigeración por tiempos diferentes, no cambió considerablemente (Sección R 15b), de manera que la refrigeración es una buena forma de controlar la actividad de la enzima. De los dos valores obtenidos para aceite extraído con isopropanol uno es de 123.6 ± 0.4 (Sección R 15c). Este valor tan alto, podría deberse a que la semilla se extrajo después de triturarse y dejarse a la intemperie un tiempo más largo que en los demás extractos. La trituración debió activar la enzima y el tiempo debió ser lo suficientemente largo para permitir una hidrólisis de tres veces más ácido graso que en las otras muestras. Sin embargo, estos resultados deben ser corroborados con más investigación, en la que se planifiquen blancos adecuados.

El valor ácido del aceite extraído con isopropanol es mayor que el del aceite extraído por otros métodos, como se ve en el cuadro 5. Esto pudo deberse a que por ser más polar, el isopropanol pudo extraer junto con los ácidos grasos otros compuestos de carácter ácido, aumentando así el valor de acidez del aceite.

La composición de ácidos grasos que se detectó en el aceite (sec. R20), está bastante de acuerdo con los datos bibliográficos. Las diferencias máximas son del orden de 3% con respecto a trabajos previos. Estos datos se representan en el cuadro 13.

Las diferencias básicas están en que se detectó un porcentaje ligeramente mayor de linoleico (41%), y oleico 24.8% y menor de linoleico (17.8%). Sin embargo estas diferencias pueden deberse al origen de la muestra, pues la concordancia con los datos del Dr. Jorge Zuñiga de LUCAM con semillas de Guatemala es muy buena. (Comunicación personal).

Los espectros infrarrojos (espectros 1 a 6) que se obtuvieron del aceite son con excepción del último, espectros normales para aceites (triglicéridos) que contienen ácidos insaturados. El último espectro que se tomó de la fase del extracto de alcohol isopropílico, tiene características especiales. Tiene mucho menor resolución y se observan bandas distintas (1620 y no 1750 cm). La banda en 1620 puede atribuirse al ion carboxilato, con el sorprendente resultado de que hay sales en este aceite. Sin embargo la extracción de compuestos como estos pueda explicarse por la polaridad del disolvente.

Los espectros ultravioleta-visibles variaron enormemente con el método de extracción, sobre todo comparando con el extracto de alcohol isopropílico. La coloración misma varió grandemente por la extracción, en algunos casos, de pigmentos. (Patai, 1969).

Cuadro 13: Contenido en % de ácidos grasos de la semilla de hule Hevea brasiliensis

| | Eckey 1954 | Williams 1966 | Hilditch 1949 | Gunstone 1946 | Zuñiga 1981 ^a | Resultado del presente trabajo |
|------------|------------|---------------|---------------|----------------|--------------------------|--------------------------------|
| Palmitico | 11 | 7-11 | 24 | 9-12 | 7.785 | 7.474 |
| Esteárico | 12 | 9-12 | | 5-12 | 10.600 | 8.763 |
| Oléico | 17 | 17-30 | 18.7 | 17-21 | 25.450 | 24.76 |
| Linoléico | 35 | 30-40 | 36.6 | 35-38 | 38.280 | 41.14 |
| Linolénico | 24 | ----- | 20.1 | 21-24 | 17.880 | 17.86 |
| Otros | 1 | ----- | ----- | 1 (arachídico) | ----- | Posible traza de palmitoléico |

A. Datos no publicados aún

La cuantificación del contenido de glucósido cianogenético en la semilla entera y en los distintos productos resultantes del procesamiento es difícil de interpretar en función de los datos bibliográficos:

Se detectaron 426 ± 44 Mg KCN/g de muestra de semilla fresca, 447 ± 42 Mg/g de muestra de semilla seca y 613 ± 56 Mg/g de muestra de cotiledón seco.

Estas cantidades no concuerdan con lo medido por Butler (1964) que fue 91 Mg/g de semilla entera de linamarina, ni con lo que observó Rosal (1970) que fue 121 mg de ácido cianhídrico por 100g de cotiledón seco.

El valor obtenido por Butler -obtenido por cromatografía, es muy bajo. Esto pudo deberse a la variedad de semilla que utilizó, o también a que por este método podía detectar linamarina y lotaustralina solamente. En caso de que lo segundo fuera cierto, habría que considerar la posibilidad de que otro compuesto cianogenético estuviera presente en la semilla en una concentración mayor a la linamarina. Sobre el dato de Rosal (1970) no existe información de cómo fue medido, de manera que es difícil hacer una comparación. En general puede decirse que siendo su valor mucho mayor que el detectado aquí, una posible explicación sería que en este trabajo el glucósido no se hubiera extraído adecuadamente. Una investigación posterior, podría decidir en la controversia.

Sobre el contenido de glucósidos cianogenéticos en el aceite de la semilla, no hay reportes bibliográficos. Se observó, sin embargo,

que el contenido varía enormemente dependiendo del proceso de extracción utilizado. El aceite extraído con disolventes apolares o por prensado no contiene cantidades significativas de cianuro; $5 \pm 10 \text{ } \mu\text{g KCN/g}$ de aceite. Esto explica el que Eckey (1954) y Bailey (1979) lo califiquen de comestible. Elías (1971) informa, sin embargo, que al preparar una dieta con aceite de hule para ratas, se manifiesta un efecto tóxico, probablemente termolábil, no identificado. El aceite extraído con isopropanol tiene propiedades muy distintas. Su fase superior contuvo $70 \text{ } \mu\text{g/g}$ y su fase inferior 4.4 mg/g . Esto demuestra que la polaridad de este disolvente es suficiente para extraer los glucósidos cianogénéticos. En consecuencia el contenido de estos en la torta extraída con isopropanol fue mucho menor que en el caso de los otros métodos de extracción. El contenido de cianuro que se detectó para la torta sin aceite, residual del proceso de prensado, fue también mucho menor, probablemente debido al tratamiento térmico previo.

Para discutir los efectos del procesamiento de la semilla en su contenido de glucósidos cianogénéticos se preparó el cuadro 10 y la figura 8. Allí se tomó el contenido de cianuro detectado en los productos de cada paso de procesamiento de la semilla y se calculó cuál sería el valor en base a masa de semilla fresca. Para esto se asumió que el aceite se había extraído completamente, para poder calcular a partir de su masa, la masa de cotiledón a la que corresponde, que la proporción cotiledón/cáscara en todas las semillas es la misma, para poder calcular a partir de la masa de cotiledón una masa equivalente de semilla y, por último, que la semilla está completamente seca, para poder calcular una masa correspondiente de semilla entera fresca.

Habiendo expresado todos los resultados en base a un mismo patrón (la semilla entera fresca), en la figura 8 puede estudiarse el tipo de procesamiento de la semilla con respecto a su efecto en el contenido de cianuro.

Puede verse que en cada paso del procesamiento se libera una cantidad de cianuro. Considerando el bajo punto de ebullición del ácido cianhídrico, es razonable que el paso en el que hay mayor liberación de cianuro sea el proceso de secado.

Se observó allí una reducción de 33% en el contenido del cianuro total. El proceso de decorticado también libera cianuro: 10% en total, probablemente por la acción de enzimas hidrolíticas que se activan al triturarse la semilla adicionalmente 12% del cianuro se elimina en la cáscara. En el proceso de extracción del aceite también hay liberación de cianuro pero éste varía grandemente, probablemente debido a que son muchos los factores que influyen; como el tiempo tomado en triturar la muestra, la temperatura del disolvente en el proceso de extracción y la temperatura necesaria para eliminar el disolvente del aceite, por ejemplo.

La cantidad tan baja de cianuro residual del proceso de extracción por prensado se debe probablemente a la cocción previa de la muestra. Sólo la cocción y el prensado, redujeron la cantidad de cianuro total en la muestra de cotiledón en 53%. El proceso completo para la semilla que se extrajo por prensado redujo el contenido de cianuro 79%. Es interesante notar que al comparar los contenidos de cianuro libre y cianuro enlazado, la cantidad de cianuro libre detectado fue siempre mayor. Esto se hace extremadamente marcado, después del proceso de

desechar la semilla entera en el que la cantidad de cianuro libre se reduce en 3% y la de enlazado se reduce 68%.

Los resultados de la determinación de glucósidos cianogénéticos tuvo, en general, incertidumbres experimentales bastante grandes. Pero este error no se debe al método mismo (Gunther 1955, JAOAC 1936, 1937, 1938). Aproximadamente 50% de estas incertidumbres se deben a las alícuotas de entre 0.2 y 0.5 ml sugeridas por Cooke (1975) e Ikediobi (1980). Con estas medidas se comprometen mucho los resultados.

Otro detalle de mucha influencia en la veracidad de los resultados finales es que en algunos casos, los extractos de la semilla seca tuvieron una fuerte coloración rojo-anaranjada que interfirió con la prueba. Asimismo la β -glucosidasa era ligeramente anaranjada. Estos problemas obligaron a hacer controles de muestra para corregir las absorbancias medidas. Estos controles se midieron sin haber hervido las muestras por 5 minutos con el picrato, para evitar liberación del cianuro lo que implica que no se tienen blancos equivalentes. La duda sobre una posible interferencia, debida al color de de la muestra al calentarla, persiste.

Los valores de absorbancia mostraron una fuerte dependencia de la temperatura. Por eso las lecturas debieron hacerse con muestras a temperaturas iguales. Como la temperatura del aparato con que se realizaron las mediciones era mayor a la temperatura ambiental, se optó por medir el valor de absorbancia muy rápidamente, minimizando el efecto térmico.

La linamarasa extraída de yuca para hacer las determinaciones de

cianuro total, no produjo resultados reproducibles. Esto se atribuyó a residuos de linamarina distribuidos en el extracto de una forma no homogénea. En efecto una medida blanco sólo con esta linamarasa reflejó que cianuro en concentraciones de hasta 0.5 Mg/ml estaba contenido en el extracto. Sin embargo, estos blancos, y las mediciones en las muestras mismas tuvieron resultados tan variados que el uso de la linamarasa como enzima hidrolizante se descartó. Una nueva centrifugación y diálisis contra acetato, de pH 5.5, podrían ayudar a mejorar la calidad del extracto.

Posibilidades de aplicación del aceite

El mercado actual de aceites ha aumentado en los últimos años en una forma muy considerable.

Los principales aceites vegetales que se aplican comercialmente se dividen en dos grupos:

| | |
|-----------------------|--|
| Aceites comestibles: | Soya |
| | Girasol |
| | Manía (Cacahuete) |
| | Algodón |
| | Sésamo |
| | Maíz |
| | Oliva |
| Aceites industriales: | Nabo silvestre (<u>Brassica Napus</u>) |
| | Linaza |
| | Castor |

Tung
Oiticica
Perilla

Los datos del mercado actual se presentan en el Cuadro 14.

El aumento en la producción de los aceites es un reflejo del aumento en la producción de la semilla misma. Datos que presentan el aumento general de la producción de plantas con semillas oleaginosas se presentan en el Cuadro 15.

Se ha calculado además, que la disponibilidad de aceites y grasas en los países desarrollados es de 126 g por día per cápita. En los países subdesarrollados la cifra es de 35 g por día per cápita. De manera que el aumento en la disponibilidad de la cantidad de aceite vegetal es una necesidad en nuestros países.

Cuadro 14

Cantidades^a de aceite vegetal producidas mundialmente de 1979 a 1980
(en millones de toneladas)

| | |
|--|-------|
| Soya | 14.75 |
| Girasol | 5.5 |
| Maní | 3.2 |
| Algodón | 3.25 |
| Nabo silvestre "Rapeseed" (<u>Brassica Napus</u>) | 3.5 |
| Otros: Sésamo Maíz Cártamo | 0.5 |

^a: Tomado de Beard (1981)

Cuadro 15: a Producción de diferentes productos agrícolas relacionados con los principales aceites vegetales, (en miles de toneladas)

| | <u>1969</u> | <u>1974</u> | <u>1979</u> |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <u>Total mundial</u> | | | |
| Soya | 39171 | 57281 | 94171 |
| Girasol | -- | 11664 | 15135 |
| Maní | 18.000 | 18090 | 19015 |
| Algodón (semilla) | 19400 | 25637 | 25787 |
| Linaza | 3100 | 2513 | -- |
| <u>En América</u> | <u>1969</u> | <u>1974</u> | <u>1979</u> |
| Soya | 26123 | 42898 | 77220 |
| Girasol | -- | 1305 | 4293 |
| Maní | 2395 | 2648 | 3133 |
| Algodón semilla | 5899 | 7415 | 8132 |
| Linaza | 1288 | 1122 | -- |

a: Tomado de los Almanques Mundiales 1969-1976 y 1981

Si se toman en consideración las tendencias de la producción mundial, debe enfocarse la atención en la búsqueda de un mercado para el aceite de hule como fuente alimenticia.

Un cuadro con las características de los principales aceites y grasas comerciales se presenta a continuación. (Cuadro 16).

El índice de saponificación del aceite de hule es del orden de los de la semilla de algodón, soya y girasol, pero su índice de yodo es muy alto. Esto se debe a que su contenido de ácidos insaturados es mayor. La concentración mayor de ácidos poliinsaturados, como el linolénico convierte el aceite de la semilla de hule en un aceite semi-secante como puede verse en los resultados de la sección R23.

Bailey (1979) informa que el aceite es comestible pero no tiene aplicación comercial. Williams (1966) duda de que puedan aplicarse los productos de la semilla para alimentación por los glucósidos cianogénéticos que contiene.

El contenido en ácidos esenciales, como el linolénico y el linoléico hacen al aceite de hule un candidato atractivo para la aplicación en la industria alimentaria. Pero siendo rico en ácidos grasos no saturados, se oxida fácilmente, siendo en consecuencia muy susceptible a la rancidez. Asimismo, por sus niveles de acidez altos, el aceite debe tratarse antes de su aplicación comercial. (Weiss 1970).

El refinamiento del aceite, solucionaría el valor ácido alto, particularmente si se trata de un aceite extraído con disolventes

Cuadro 16: Índices de yodo y de saponificación de grasas y aceites y composición de los ácidos grasos obtenidos por hidrólisis

| Grasas o Aceites | | Índice de Saponificación | Índice de Yodo | Composición de ácidos grasos (porcentaje) | | | | | | | |
|-------------------|--------------|--------------------------|----------------|---|-----------|-----------|--------------|--------|-----------|-------------------|---|
| | | | | Mirístico | Palmítico | Estearico | Palmitoleico | Oleico | Linoleico | Otros componentes | |
| Grasas Vegetales | Coco | 250-60 | 8-10 | 17-20 | 4-10 | 1-5 | | 2-10 | 0-2 | a | |
| | Babasu | 245-55 | 10-18 | 15-20 | 6-9 | 3-6 | | 12-18 | 1-3 | b | |
| | Palma | 196-210 | 48-58 | 1-3 | 34-43 | 3-6 | | 38-40 | 5-11 | | |
| Grasas Animales | Mantequilla | 216.35 | 26-45 | 7-9 | 23-26 | 10-13 | 5 | 30-40 | 4-5 | c | |
| | Manteca | 193-200 | 46-66 | 1-2 | 28-30 | 12-18 | 1-3 | 41-48 | 6-7 | d | |
| | Sebo | 190-200 | 31-47 | 2-3 | 24-32 | 14-32 | 1-3 | 35-48 | 2-4 | | |
| Aceites Vegetales | No Secantes | Ricino | 176-87 | 81-90 | | 0-1 | | | 0-9 | 3-7 | e |
| | | Oliva | 185-200 | 74-94 | 0-1 | 5-15 | 1-4 | 0-1 | 69-84 | 4-12 | |
| | | Cacahuete | 185-95 | 83-98 | | 6-9 | 2-6 | 0-1 | 50-70 | 13-26 | f |
| | | Colza | 172-5 | 94-106 | 0-2 | 0-1 | 0-2 | | 20-38 | 10-15 | g |
| | Semisecantes | Maíz | 188-93 | 116-30 | 0-2 | 7-11 | 3-4 | 0-2 | 43-49 | 34-42 | |
| | | Sésamo | 187-93 | 104-16 | | 8 | 4 | 1 | 45 | 41 | h |
| | | Semilla de algodón | 191-6 | 103-15 | 0-2 | 19-24 | 1-2 | 0-2 | 23-33 | 40-48 | |
| | | Soja | 189-94 | 124-36 | 0-1 | 6-10 | 2-4 | | 21-29 | 50-59 | i |
| | | Girasol | 190-2 | 122-36 | | | 10-13 | | 21-39 | 51-68 | |
| | | Cártamo | 186-94 | 130-50 | | | 5-10 | | 14-21 | 73-78 | |
| | | Cáñamo | 190-3 | 149-67 | | | 4-10 | | 13 | 53 | j |
| | Secantes | Linaza | 189-96 | 170-204 | | 4-7 | 2-5 | | 9-38 | 3-43 | k |
| | | Tung | 189-95 | 160-80 | | | 2-5 | | 4-16 | 1-10 | l |
| | | Oiticica | 186-94 | 139-55 | | | 11 | | 6 | | m |
| | | Aceite de manteca | 190-95 | 46-70 | | | 22-26 | 15-17 | 45-55 | 8-10 | |
| Aceites Animales | Terrestres | Aceite de pata de buey | 192-7 | 67-73 | | 17-18 | 2-3 | 74-77 | | | |
| | | Ballena | 188-94 | 110-50 | 4-6 | 11-18 | 2-4 | 13-18 | 33-38 | n | |
| | Marinos | Pescado (sardina) | 185-95 | 120-90 | 6-8 | 10-16 | 1-2 | 6-15 | | o | |

- (a) Ácidos caprílico, 5-10; cáprico, 5-11; láurico, 45-51.
 (b) Ácidos caprílico, 4-7; cáprico, 3-8; láurico, 44-46.
 (c) Ácidos butírico, 3-4; caproico, 1-2; caprílico, 1; cáprico, 2-3; láurico, 2-3.
 (d) Ácidos grasos no saturados de C_{20} y C_{22} . 2.
 (e) Ácido ricinoleico, 80-92.
 (f) Ácidos araquídico, 2-5; tetracosanoico, 1-5.
 (g) Ácidos tetracosanoico, 1-2; linoléico, 1-4; erúxico, 43-57.

- (h) Ácido araquídico, 1.
 (i) Ácido linoléico, 4-8.
 (j) Ácido linoléico, 24.
 (k) Ácido linoléico, 25-58.
 (l) Ácido eleosteárico, 74-91.
 (m) Ácido licánico, 70-78.
 (n) Ácidos no saturados de C_{20} , 11-20; C_{22} , 6-11.
 (o) Ácidos no saturados. C_{16} - C_{22} , con 1 a 6 dobles enlaces, 70.

apolares o por prensado.

Hidrogenación parcial selectiva, resolvería la propensión al enranciamiento y al secado. Una solución alternativa sería que se utilizara algún antioxidante aprobado, con la ventaja de que no existe la posibilidad de cambiar el estado físico, como ocurriría aplicando hidrogenación. La desventaja es por supuesto el alto costo de los antioxidantes que se usan actualmente.

La preocupación sobre los glucósidos cianogénéticos en el aceite extraído con disolventes apolares o por prensado se desvanece al estudiar los resultados del cuadro 9, donde se ve que la cantidad máxima de glucósidos presente es de 10 Mg/g de aceite en forma de cianuro libre. Esta cantidad no sólo es fácilmente eliminado, por lavado con agua, sino que está por debajo de las informadas en otros productos alimenticios (ver Apéndice A).

El factor tóxico mencionado por Elías (1971) en dietas de aceite de hule para ratas, necesita investigación posterior. Podría tratarse de un residuo de glucósido cianogénético, pues como se ve de los resultados de este trabajo el procedimiento de cocción sumado a los demás pasos de procesamiento de la semilla, eliminó sólo un 79% del cianuro total. En su trabajo, Elías (1971) informa haber remojado la semilla 24 horas en agua, haberlo hervido en agua por 30 minutos y luego haberlo secado, reduciendo así la cantidad de ácido cianhídrico a un nivel de 7.5 Mg/g de cotiledón desengrasado. Pero no se informó del glucósido en el aceite, además el procedimiento utilizado por estos investigado-...

res para reducir la cantidad de cianuro, es el mismo que se usa con la yuca, (Manihot esculenta Crantz) donde no elimina por completo el cianuro según se explica en el Apéndice A. De manera que el factor tóxico podría ser una cantidad pequeña de cianuro residual. Sin embargo, también podría tratarse de otro compuesto no identificado aún. La duda justificaría investigaciones futuras a este respecto.

De manera que la aplicación del aceite en la industria alimentaria es factible, si éste se investiga y se procesa adecuadamente.

Otra posibilidad de aplicación del aceite está en la industria de pinturas.

Hilditch (1949) y Williams (1966) califican la utilidad del aceite de hule en la industria de pinturas de obvia, aunque no tiene la misma calidad que el aceite de linaza.

Esta es una posibilidad mucho más natural considerando las propiedades del aceite crudo. Su valor de yodo, medida aproximada de su calidad como aceite secante, está debajo de los aceites de linaza y tung, los principales aceites naturales utilizados tradicionalmente. Pero el valor sí se encuentra por encima del de aceite de soya y a la par del aceite de oiticica eventualmente utilizados. (AOCS 1959). Para una aplicación en la industria de pinturas el procesamiento del aceite se reduciría al refinamiento para controlar el elevado valor ácido.

Pero esta posibilidad de industrialización se ve fuertemente opacada por el gran decaimiento de la cantidad de aceite vegetal utilizado en la industria pinturera. Debe notarse que la cantidad de linaza producida en el mundo ha disminuido hasta desaparecer de las estadísticas. La disminución principió con la popularización de substitutos sintéticos del aceite de linaza en la industria de pinturas y había sido notada y explicada por Godín y Spensky (1971) hace una década. En la opinión de los productores de pinturas los aceites sintéticos son productos más homogéneos, más baratos y de mejor calidad. El inconveniente económico se superará pronto con el aumento continuo de los precios del petróleo. La calidad del aceite vegetal se ha puesto a la par de la de los productos contemporáneos, haciendo mezclas o polimerizaciones con otros compuestos. En el caso particular de la semilla de hule, Hevea brasiliensis, se ha informado que la polimerización del aceite con 20-45% dicitlopentadieno a escala de planta piloto en un sistema cerrado, a 270-280°C, 50-70 psig por 6-24 horas, dió un aceite secante adecuado para pinturas de interior (Sthapitanonda et. al. 1979).

La industrialización definitiva del aceite dependerá, sin embargo, de que pueda competir en precio con sus substitutos sintéticos.

Una tercera posibilidad de aplicación del aceite es como combustible. Se ha determinado que el aceite de girasol, de propiedades muy parecidas al aceite de hule puede substituirse en el diesel y utilizarse satisfactoriamente como combustible (Zúñiga 1981). Esta posibilidad se ve favorecida por el bajo valor de cenizas detectado. Una vez más, la aplicación depende de que compita económicamente en forma favorable el aceite con los derivados del petróleo.

Otras posibilidades de aplicación existen. SoongyYeoh (1975) sugiere el uso de emulsiones de latex y un aceite aromático para controlar la erosión del terreno en zonas de lluvias torrenciales. La posibilidad de utilizar el aceite del hule mismo, con las correspondientes ventajas de disponibilidad de la materia prima y economía está abierta.

Ha existido interés de parte de la iniciativa privada en Guatemala para industrializar el aceite de hule. Dos intentos fracasaron hace 5 ó 6 años por diferentes razones, principalmente porque el costo de recolección, el costo de secado de la semilla, y el elevado valor ácido del aceite (que obligó al refinamiento) no permitieron competir al aceite con el de semilla de algodón ni con el de linaza, de amplia utilización en aquél entonces.

Actualmente las cosas han cambiado. Se presenta una escasez de semilla de algodón; se ha predicho una vuelta a la utilización de aceite vegetal en la industria (Godin 1971) confirmada con la rápida escalada de los productos del petróleo; la posibilidad de utilización de la torta de la semilla como alimento se estudia actualmente (de Mejía 1979).

Estas son indicaciones positivas en cuanto a la posibilidad de utilización del aceite de hule.

La utilización de la cáscara como combustible en el proceso de secado de semillas, en los lugares de recolección, ayudaría a mantener bajo el valor ácido del producto con los costos muy reducidos. La industrialización de la torta ayudaría a distribuir los costos de recolección y secado asegurándose de esa manera una posibilidad de pro-

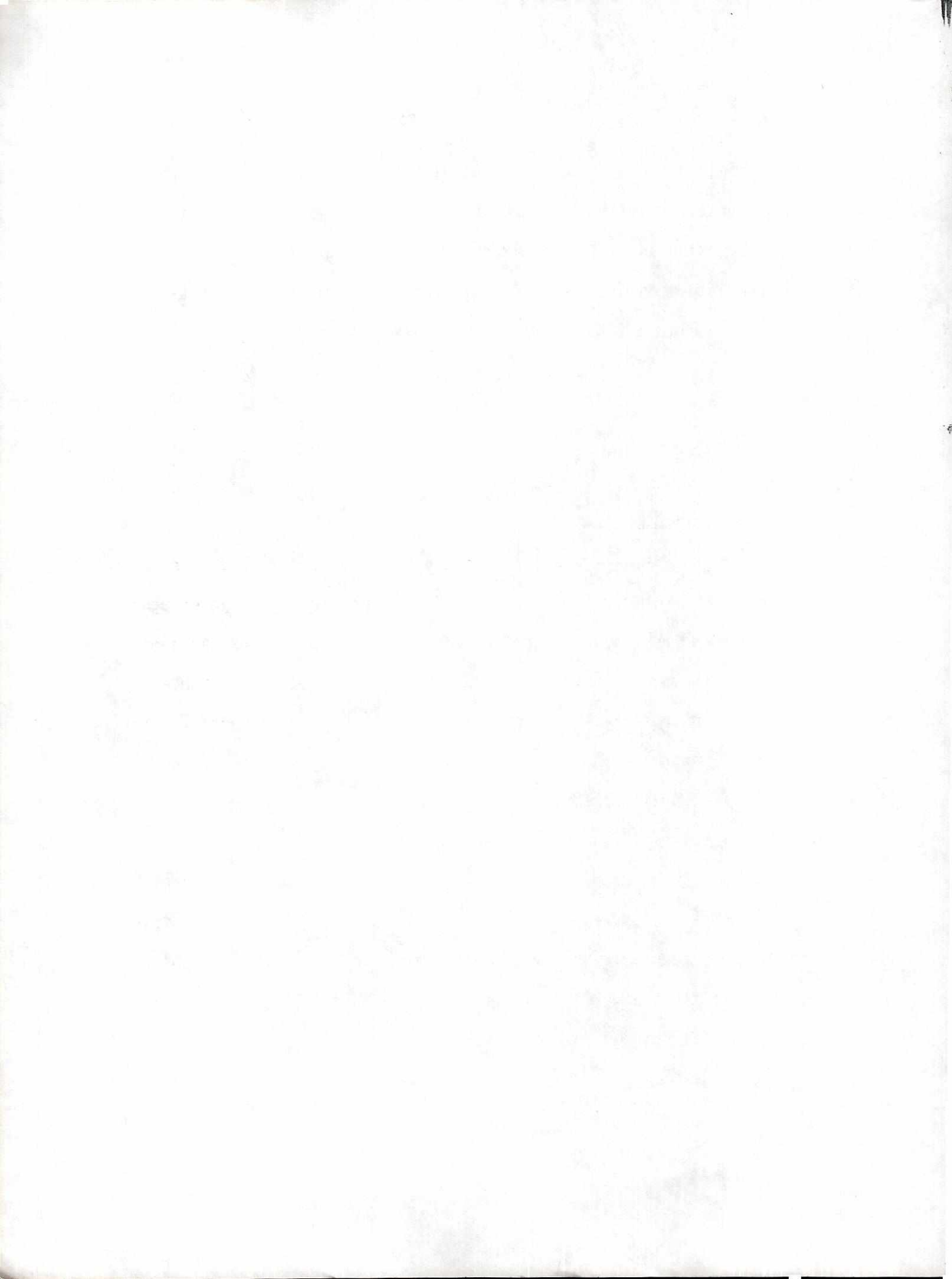
ducción a un precio muy competitivo. Siendo la semilla de hule un producto secundario de una floreciente agricultura, como lo es la producción de hule natural, su disponibilidad a precio reducido está asegurada.

La producción mundial de caucho natural ha aumentado de 2 495 mil toneladas en 1967 a 3763 mil toneladas en 1979, 51% en 12 años. En Guatemala, el gobierno actual, ha tratado de motivar un aumento en la producción de hule natural, como parte de su plan de desarrollo de la Franja Transversal del Norte, asegurándose así el crecimiento de la disponibilidad de semilla de hule y haciendo más atractiva su comercialización en nuestro medio.

El estudio económico de la rentabilidad de estos sistemas es un estudio sumamente delicado y que varía sensiblemente con el tiempo y no solo de país a país sino aún de compañía a compañía, dentro de un mismo país. En general, sin embargo, puede comentarse el hecho de que la tendencia mundial es a la creación de plantas mayores que extraen por un proceso continuo utilizando disolventes.

En el caso de Guatemala la posibilidad más accesible no es hacer inversiones para desarrollar una industria nueva, sino utilizar la tecnología ya existente para el procesamiento de semilla de algodón. Considerando el que la semilla de hule cae del árbol por un período relativamente corto del año, la posibilidad más atractiva parece ser la utilización de la maquinaria para extraer el aceite de la semilla de algodón forma parcial para extraer también semilla de hule. De esta manera se obvian las dificultades que trae consigo la necesidad de almacenamiento de semillas. El problema básico del precio de recolección

de la semilla sigue siendo una incógnita, pero se está investigando actualmente. Asimismo la digestibilidad de la torta y del aceite mismo se estudian, y los resultados ayudarán a dar un panorama mucho más completo y en mi opinión más alentador sobre la posible industrialización de la semilla de hule en Guatemala.



VI. CONCLUSIONES

El aceite de la semilla de hule Hevea brasiliensis puede extraerse por los métodos convencionales en la industria de aceites vegetales.

Sus características físicas y químicas muestran que puede ser utilizado actualmente en forma industrial, principalmente en la industria de alimentos y la de pinturas.

El aceite contiene glucósidos cianogénéticos que por hidrólisis liberan ácido cianhídrico. Estos pueden eliminarse por remojo en agua y cocción de la semilla antes de extraer el aceite o por extracción con disolventes polares. Este punto es particularmente importante, pues se piensa utilizar la torta residual de la extracción del aceite de semilla de hule como alimento. Cocción en agua o extracción con alcohol isopropílico redujeron los contenidos de cianuro en la torta residual a niveles convenientes.

La aplicación comercial del aceite depende del aumento de precio (que en estos tiempos es muy notorio por la escasez que se ha suscitado) de los productos parecidos que se consumen actualmente. Estos son principalmente el aceite de algodón en la industria alimentaria y los derivados del petróleo en la industria de pinturas.

VII. BIBLIOGRAFIA

Adomako, D. J. Sci. Fd. Agric. 28: 384-386.
1977

Almanaque Mundial 1969
1969

Almanaque Mundial 1976
1976

Almanaque Mundial 1981
1981

American Oil Chemistry Society (A.O.C.S.). Methods, Vol. I & II.
1980 Washington, D.C., U.S.A.

_____, Lectures of the 1959 Short Course on Drying Oil at University
1959 of Minnesota, Minneapolis August 10-14.

Analyst 35:59. Cit. en Williams (1966).
1910

Auld, S. J. Agr. Sci. 5:429
(1912-1913)

Bailey's Industrial oil and fat products. 4th Ed., Swern D.
1979 Editor, New York, U.S.A. John Wiley & Sons.

_____, Industrial oil and fat products. New York, U.S.A. Inter-
1951 science Publishers, Inc.

Barrow, G. Physical chemistry. 3rd Ed. McGraw Hill Kogabusha Ltd.
1973

Beard, B. Scientific American 244(5): 124-131.
1981

Boucher, D.; Brier J. Trans Am. Inst. Chem. Eng. 38:967-993.
1942

Butler, 1964.

Cooke, R. J. Sci. Fd. Agric. 29:345-352.
1978

_____, Blake, G. y Battershill, J. Phytochemistry.
1978b 17: 381-383.

_____, Madugawu, E. J. Food Technology. 13: 299-306.
1978c

_____, Enzymatic assay for determining the cyanide content of
1979 cassava and cassava products. Cali, Colombia. Centro
Internacional de Agricultura Tropical.

Cronquist, A. Introductory Botany. 2nd Ed. New York, U.S.A.
1971 Harper and Row Publishers.

de Mejía, E. Utilization of by-products of Hevea brasiliensis as
1979 a source of protein and oil animal and human consumption.
Universidad del Valle de Guatemala. Proyecto de investi-
gación.

De Siqueira, R.; Pechnik, E. y Guernelli, O. Química. 9:13.
1955

Deutsche Gesellschaft für die Fettwissenschaft E.V. Deutsche
1950 Einheitamethoden zur Untersuchung von Fetten. Fettprodukten
und verwandten Stoffen. Stuttgart, Alemania. Wissenschaft-
liche Verlagsgesellschaft.

Eckey, E. Vegetable fats and oils. New York, U.S.A. Reinhold
1954 Publishing Corp.

Elías, L. Evaluación nutricional de la torta y del aceite de la semi-
1971 lla de hule. En: Segunda Reunión Centroamericana en Tec-
nología de Aceites, Grasas y Proteínas. I.C.A.I.T.I. Gua-
temala.

Ellett, W.; Holdanmay, C.; Eheart, J. y Lastings, E. Tech. Bull.
1930 Va. Polytechnic Institute. Va. Agr. Expt. Sta. 41:3.

Eyjolfsson, R. Fort der Chem. Org. Naturst. 27:74 cit. en Seigler
1971 (1975a).

Farm Chemicals Feb. 1979 76-81.

Fetuga, B.; Ayeni, T.; Olaniyan, M.; Balogun, M.; Babtunda, G. y
1977 Oyenua, V. Nutrition Reports International. 15:497-516.

Fishwick, M., y Swoboda, P. J. Sci. Fd. Agric. 28:387-393.
1977

Food Safety. I.F.T. Short Course. Institute of food technologists.
1975 Ammerman, G. Editor.

Gastrock, E., D'Aquin, E., Keating, E., Kirshnamoorthi, V., y Vix, H.
1965 Cereal Science today. 10:572-581.

Godin, V. y Spensky, J. Oils and oilseeds crop and Product Digests.
1971 The tropical products institute, Foreign and Commonwealth
Office, London.

Gondue, Phytochemistry. 17:271-274.
1978

- Gorter, 1912.
- Gortnter, A.R. y Gortner, A.W. Outlines of biochemistry. New York,
1950 U.S.A. John Wiley and Sons, Inc.
- Gunstone, F. y Hilditch, T. J. Soc. Chem. Ind. 65:8-13.
1946
- Gunther, R. y Blinn, J. Analysis of insecticides and acaricides.
1955 New York, U.S.A. Interscience.
- Hilditch, T. The industrial chemistry of the fats and waxes. 3rd.
1949 London, England. Bailliere, Tindall and Cox.
- _____, Seavell A. J. Oil Col. Chem. Assocn. 33:24.
1950
- _____, Meara, M. y Holmberg J. J. Am. Oil. Chem. Soc. 24:321.
1947
- _____, The chemical constitution of natural fats. 3rd. Ed.
1956 London, England. Chapman and Hall.
- Huges, M. y Conn, E. Phytochemistry. 15: 667-670.
1976
- Ikediobi, C.O., Onyia G.O. y Eluwah C.E. Agric. Biol. Chem.
1980 44(12) 2803-2809.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (I.U.P.A.C.)
1966 Standard methods for the Analysis of Oils, Fats and
Soaps. London, England. Butlerworths.
- Karmas, E. Food Technology. 52-59.
1980
- Karnofsky, G. Am. Chem. Soc. University of Illinois. 61-69.
1948

- Kates, M. Techniques of lipidology. New York, U.S.A. North-Holland/American Elsevier. 1972
- Kofod, H. y Eyjólfsson, R. Phytochemistry. 8:1509. 1969
- Labianca, D. J. Chem. Ed. 56:788-791. 1979
- Lange's Handbook of Chemistry. 11th Ed. Lange, N.; Dean J. editor. New York, U.S.A. McGraw Hill. 1973
- Lehninger, A. Biochemistry. 2nd Ed. New York, U.S.A. Worth Publishers, Inc. 1975
- Lemberg, R. y Barrett, J. Cytochromes. New York, U.S.A. Academic Press. Cit. en Labianca (1979). 1973
- Lichtfield, C. Analysis of triglycerides. New York, U.S.A. Academic Press. 1972
- Luaw, T.; Samsudin, M., Husaini, B. and Tarwotjo I. Am. J. Clin. Nutr. 20:1300-1303. 1967
- Matile, P. Biochemistry and Function of Plant Vacuoles. Guest lecture V in, International Rubber Conference. Kuala Lumpur. 1975
- Mba, A.; Njike, M. y Oyenuga U. J.Sci. Food and Agric. 25:1547-1555. 1974
- Mikolajczak, K.; Smith, C. Jr. y Tjarks, L. Lipids. 5:812. 1970
- Miller, R. Separation Techniques in chemistry. New York, U.S.A. John Wiley and Sons. 1975
- Morice, I. Phytochemistry. 16:571-574. 1977.
- Muñoz, A. y Casas, I. Comunicaciones. 22:221-223 1972
- Nährstedt, A. Phytochemistry. 17:314-315. 1978
- _____, Phytochemistry. 14:1870-1871 1975
- _____, Phytochemistry. 14:2627-2628. 1975b

_____, *Phytochemistry*. 14:1339-1340.
1975c

_____, *Phytochemistry*. 15:1983-1984.
1976

Neucere, N. y Ory, R. *J. Agr. Food Chem.* 16:364-365.
1968

Official Methods of Analysis of the Association of Official
1980 Analytical Chemists. 13th Ed. and supplements.
Horwitz, W. editor. Washington, D.C., U.S.A. Association
of analytical chemists.

Orok, E. y Bowland, J. *Can. J. Arism. Sci.* 54:239-249
1974

✓ Ovalle, C. Manual de cultivo de hule hevea en Guatemala. Sector
1975 Público Agrícola, Ministerio de Agricultura,
DIGESA. Guatemala, C.A.

Paiz, L.; Avin, D., de Egaña, G. y del Cid, N. INCAP s.n.t.
1977

Patai, S. The Chemistry of the carboxylic acids and esters.
1969 Patai, S. editor. London, England. Interscience-
Publishers.

Reay, P. y Conn. E. *Phytochemistry*. 9:1825.
1970

Reay, P. *Phytochemistry*. 8:2259.
1969

Rieders, F. Drills in pharmacology in medicine. 4th Ed.
1971 Di Palma, J. editor. New York, U.S.A. McGraw Hill
Book Company.

✓ Rosal, O. Determinación del valor nutritivo de la torta de se-
1970 milla de hule. Universidad de San Carlos, Facultad
de Ingeniería, Guatemala, C.A.

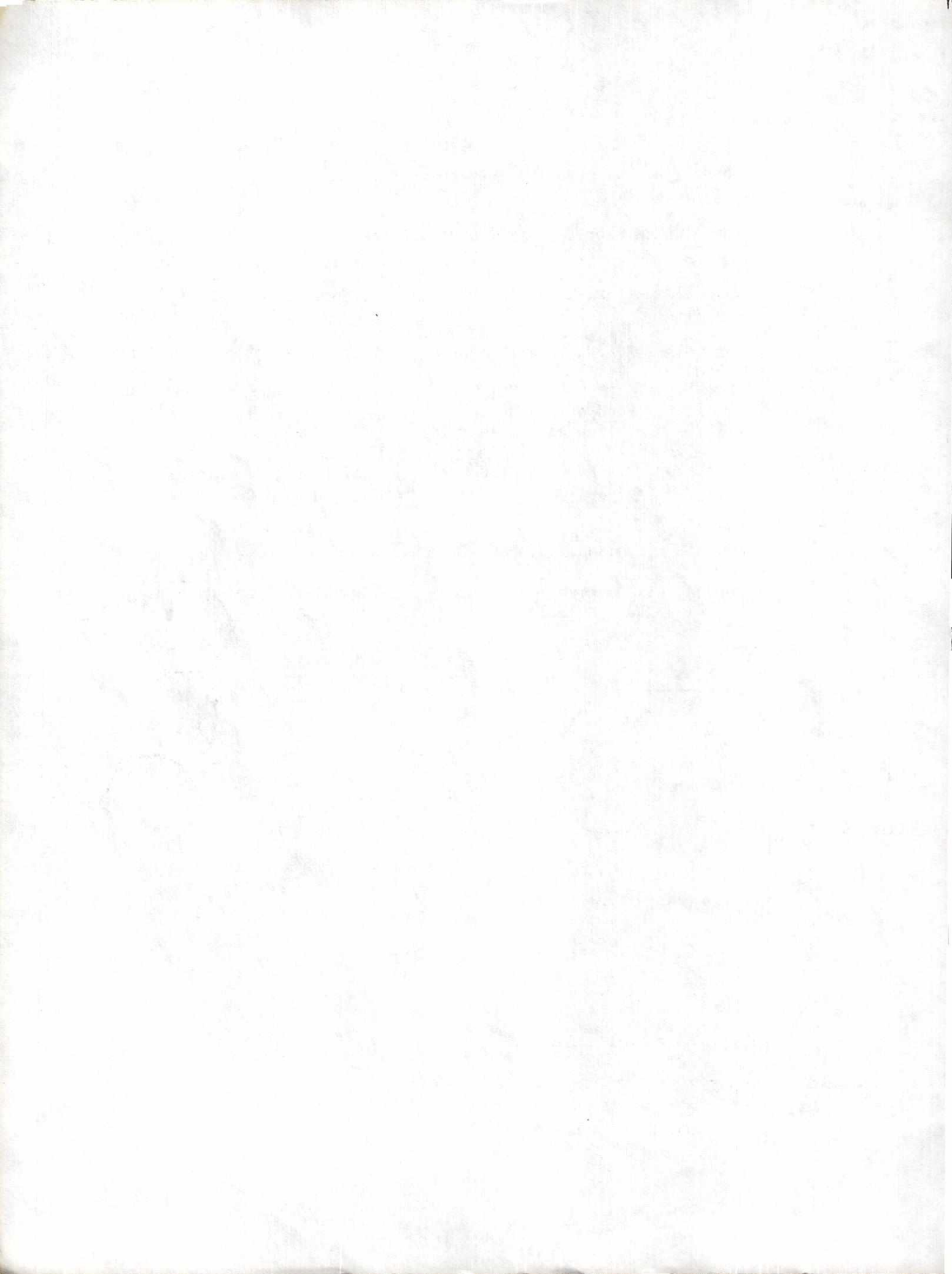
Russel, R. y Reay, P. *Phytochemistry*. 10:1373.
1971

Saunders, J. and Conn. E. *Plant physiol.* 61:154-157.
1978

Saunders, J. *Plant physiol.* 59:647-655.
1977

- Schriner, R.; Fuson, R. and Curtin, D. Identificación sistemática de compuestos orgánicos. México, D.F., México. Editorial Limusa.
1974
- Schwartzmeier, U. Phytochemistry. 16:571-574.
1977
- Secor, J. Phytochemistry. 15:1764-1767.
1976
- Segupta, A. y Roychoudhury, K. J. Sci. Food and Agric.
1977 28:463-468
- Seigler, D. Phytochemistry. 13:841.
1974
- _____, Phytochemistry. 14:9-29.
1975a
- _____, Phytochemistry. 14:1419-1420.
1975b
- _____, Phytochemistry. 15:219-220.
1976a
- _____; Secor, J., Conn, E. y Dunn, J. Phytochemistry.
1976b 15:1703-1706
- Senter, S. y Horwat, R. J. Food Sci. 43:1614-1615.
1978
- Silverstein, R.; Bassler, G. y Morrill, T. Spectrometric identification of organic compounds. 3rd Ed. New York, U.S.A. John Wiley and Sons.
1974
- Soong, N. y Yeoh, C. Latex-oil emulsions for controlling soil erosion on exposed soil surfaces. En: International Rubber Conference, Kuala Lumpur.
1975
- Sosa, A. Phytochemistry. 16:707-709.
1977
- Spring, F. y Say, F. Agr. Bull. Fed. Mclay States 6(5):244
1918
- Sthapitanonda, K.; Vimolchalao, Ch., Munsabul, S. y Udomsekdhi, B. J. Sci. Soc. Thailand. 5(4):185-90.
1979

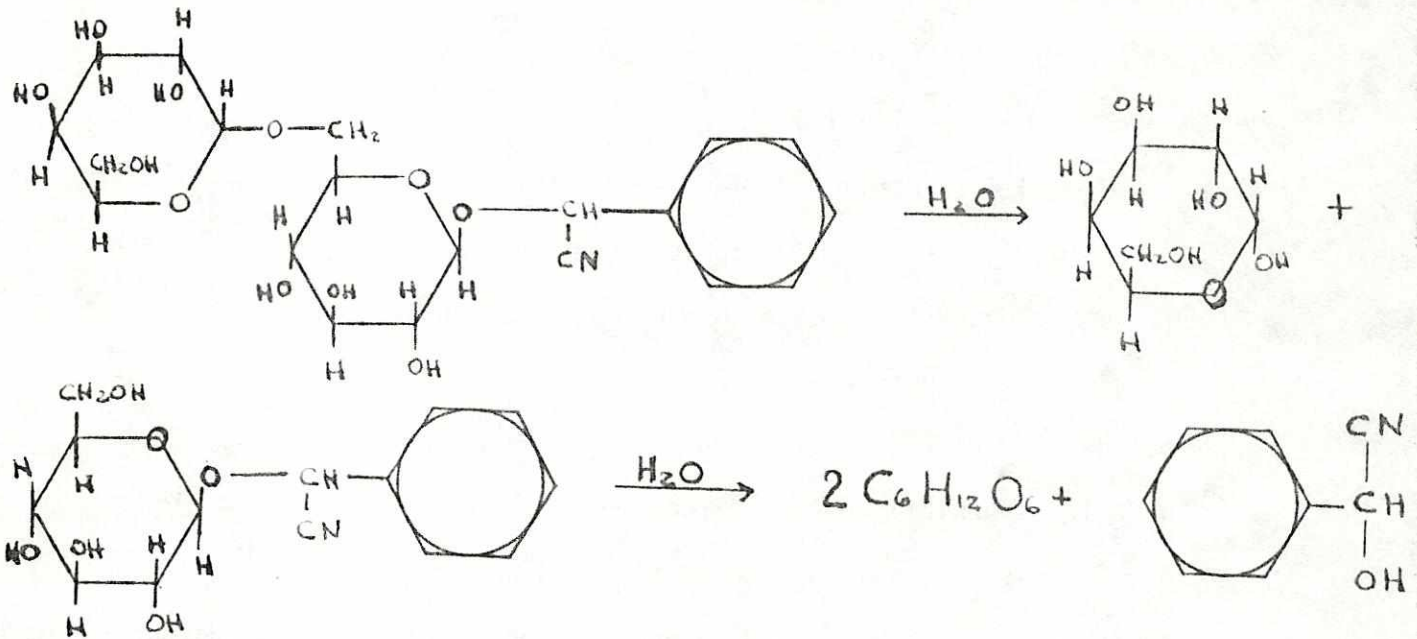
- Terrel, R. J. Food Sci. 44:865-868.
1979
- The Aldrich Library of infrared spectra. 2nd Ed. Pouchert, Ch.
1975 editor. Aldrich chemical company Inc.
- Vilhjalmsdottir, L. y Fisher, H. Nutrition. 101:1185-1192.
1971
- Vietmeyer, N. National Geographic. 159(5):702-708.
1981
- Weiss, R. Food oils and their use. Westport, England. Avi
1970 publishing company, Inc.
- Whittaker, J. Food related enzymes. Whittaker, J. editor.
1979 Washington, D.C., U.S.A. American Chemical Society.
- Williams, K. Oils, fats and fatty foods. 4th Ed. London,
1966 England. J. & A. Churchill, Ltd.
- Zúñiga, J. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol 31
1981 (Junio 1981) No.2 pp 350-370.



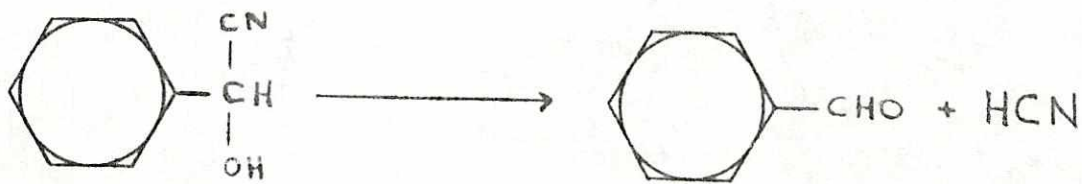
APENDICE A

Toxicidad de los glucósidos cianoqénéticos

Los glucósidos cianogenéticos son sustancias muy tóxicas. La base de su toxicidad radica en que al hidrolizarse generan ácido cianhídrico. Esta reacción se ilustra en las ecuaciones A1-A2 con el glucósido amigdalina:

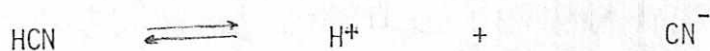


ecuaciones A1



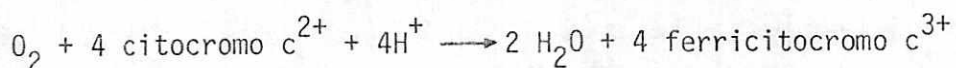
ecuación A2

Procesos parecidos ocurren con los otros glucósidos cianogénicos. Un listado de estos se presenta en el Apéndice B. La toxicidad de estos compuestos se debe pues al HCN que generan. La especie tóxica en sí, es el ion cianuro CN^- y se produce entre otras por la ionización del ácido débil HCN ecuación A3.



ecuación A3

La enorme toxicidad del ion CN^- es una consecuencia de su habilidad de detener la respiración celular en las mitocondrias. Esto ocurre cuando CN^- interfiere con la reacción de oxidación de citocromo c^{3+} . La reacción debería ser (Lehninger 1975) (Gortner y Gortner 1950).



ecuación A4

CN^- bloquea el proceso formando un complejo muy estable con el ferricitocromo c^{3+} (Lemberg 1973). De esta manera se obstruye la habilidad de transferir electrones de la variedad oxidada y se disminuye la disponibilidad del citocromo que participa en la ecuación A4, deteniéndose así la respiración celular. El complejo del CN^- se forma con el ion Fe^{3+} del grupo hemo del citocromo c^{3+} . En general no sólo este compuesto es obstruido, sino también cualquier otro grupo con un ion metálico que pueda formar complejos estables con CN^- (Rieders 1971). Sin embargo, la concentración de cianuro necesaria para bloquear el citocromo, 10^{-8}M , es muy pequeña y su efecto es tan rápido que los efectos sobre las otras enzimas no tienen ni siquiera la oportunidad de aparecer. (Rieders 1971).

Uno de los detalles que hacen tan peligroso al HCN como fuente de cianuro es que tiene una gran velocidad y eficiencia de absorción por los pulmones. El envenenamiento es tan rápido como el causado por CN^- inyectado intravenosamente (Rieders 1971) y es mucho más rápido que el causado por CN^- ingerido oralmente. Es por lo tanto razonable, que la dosis letal de HCN inhalado, 50 mg, sea por lo menos 4 veces menor que la de KCN o NaCN ingeridos oralmente 200-400 mg. (Arena 1974), HCN inhalado es mortal de inmediato en cantidades de 0.2-0.3 mg por litro, y causa la muerte después de una hora con 0.13 mg por litro (Labianca 1979).

El HCN que liberan los glucósidos cianogénéticos es pues una sustancia muy peligrosa hasta en cantidades muy pequeñas, por su alta toxicidad y además, como es muy volátil, punto de ebullición de $25,5^\circ\text{C}$, por su fácil absorción como gas.

La semilla de hule Hevea brasiliensis contiene glucósidos cianogénéticos que al hidrolizarse, en general enzimáticamente, producen HCN (ver ecuaciones A1-A2). Esta hidrólisis puede ocurrir también por catálisis de un medio ácido (Seigler 1975 a, Cooke 1978 a,b,c,) en el estómago por ejemplo. Es por esto que la semilla sin tratamiento previo es tan peligrosa. Al triturarse la semilla en presencia de agua, se libera parte del HCN. Este cianuro recibe el nombre de cianuro libre. Más problemático es el HCN, que forma parte de moléculas más grandes, es también liberado. Este cianuro recibe el nombre de cianuro enlazado o estructural. Como base de comparación se presenta el siguiente cuadro. Presenta los contenidos de HCN totales en algunas plantas y semillas comunes.

Cuadro A.1

Contenido de cianuro de algunas plantas^a

| Planta | mg/100g |
|---|---------|
| Lima bean (<u>Phaseolus lunatus</u>) | 210-312 |
| Sorghum, planta entera | 250 |
| Cassava | 113 |
| Linseed meal | 53 |
| Black-eyed pea (<u>Vigna sinensis</u>) | 2.1 |
| Pea (<u>Pisum sativum</u>) | 2.3 |
| Kidney bean (<u>Phaseolus vulgaris</u>) | 2.0 |
| Bengal gram (<u>Cicer arietinum</u>) | 0.8 |

a: Tomado de Food Safety 1975.

Se conocen 800 especies de 70 a 80 familias (Eyjolfsson 1971, Secor 1976) que contienen glucósidos cianogenéticos. Se conocen en hongos, gimnospermas, angiospermas mono y dicotiledóneas, helechos y en varios insectos. (Seigler 1975a).

A pesar de que muchos de los casos de envenenamiento por glucósidos cianogenéticos son accidentales (Seigler 1975a, Labianca 1979), existen poblaciones que están expuestas diariamente a compuestos cianogenéticos en su alimentación. El harina de yuca en Nigeria puede contener hasta 35mg de HCN en la dieta diaria, ya procesada, por persona (750g). Esta cantidad representa casi la cuarta parte de la dosis letal de HCN consumido en una sola ingestión. Estos contenidos relativamente grandes de cianuro se metabolizan y deshechan con bastante rapidez. Existe, sin embargo, creciente preocupación sobre las condiciones neurológicas que puedan derivarse de este envenenamiento crónico (Seigler 1975a). El mecanismo que se encarga de detoxificar el cianuro en el cuerpo es el siguiente: La enzima azufre transferasa, que se encuentra en las mitocondrias, cataliza la conversión del CN^- al ion relativamente no tóxico, tiocianato (SCN^-), que es desechado en la orina (Labianca 1979). La azufre transferasa está distribuida en todo el cuerpo en buena cantidad. Existe en el perro, menos azufre transferasa que en el hombre, pero suficiente de ella como para digerir y excretar 4000g de cianuro en 15 minutos (Labianca 1979). Este dato parece indicar que no debería haber envenenamiento de cianuro. El factor limitante, sin embargo, es la disponibilidad del suficiente azufre para formar el tiocianato (Labianca 1979). El suministro de este azufre a partir de moléculas de tiosulfato, aminoáci-

dos azufrados u otros compuestos de azufre es insuficiente; de allí la toxicidad tan grande del cianuro.

APENDICE B

Extracción, aislamiento y caracterización de compuestos cianogénicos

Existen básicamente dos tipos de compuestos responsables por la actividad cianogénica en plantas: Glucósidos cianogénicos

Lípidos cianogénicos

Los dos tipos de compuestos son derivados de los alfa-hidroxi-nitrosos o cianohidrinatos, y producen HCN y un componente carbonilo, cuando se remueve el ácido graso o el sacárido.

La extracción, purificación y caracterización de los cianolípidos, son tratados en otros trabajos (Micolajczak 1970, Seigler 1974).

Los glucósidos cianogénicos, son los compuestos que producen cianuro y además tienen como componente un azúcar. Como se explicó en el Apéndice A, estos compuestos están distribuidos ampliamente en la naturaleza. Pero a pesar de que se han detectado en tantos lugares, no se ha identificado sus estructuras más que en unos pocos casos.

Hasta 1975 Seigler (1975a) informa de 29 distintos compuestos, entre glucósidos y lípidos, pertenecientes a 50 especies de plantas. Estos compuestos se presentan en el cuadro B.1.

La principal razón para que se hayan publicado hasta aquel entonces tan pocos compuestos es que la extracción y purificación de estos es compleja; principalmente por su inestabilidad y porque co-ocurren con muchos compuestos muy parecidos. Esto es especialmente para el caso de los glucósidos cianogénicos, donde otros sacáridos contaminan

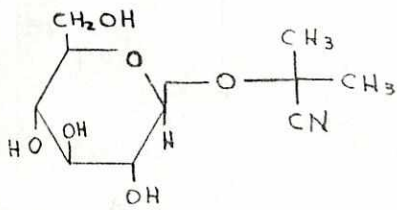
a: Tomado de Seigler (1975 a)

los extractos, siendo muy difícil su purificación.

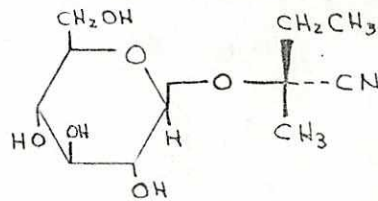
Consecuencia de esto es que solo algunos de estos compuestos existen comercialmente.

Cuadro B1: Compuestos cianogénéticos de plantas

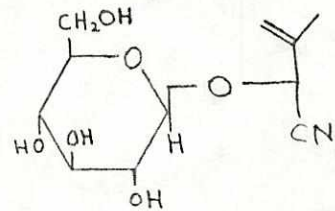
A. Derivados de valina, isoleucina y leucina



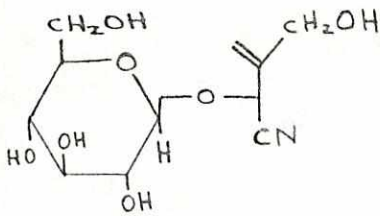
tinamarina



(R)-lotausalina

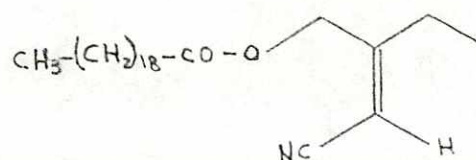
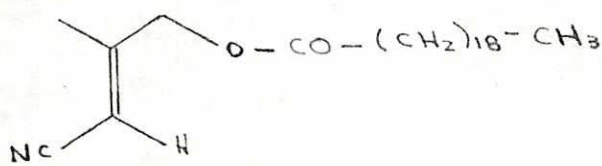
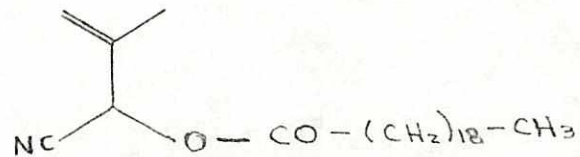
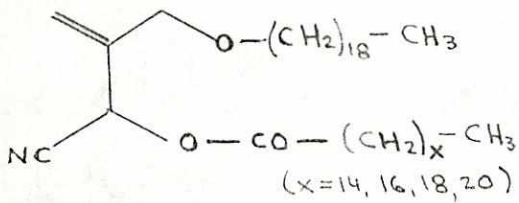


acacipetalina



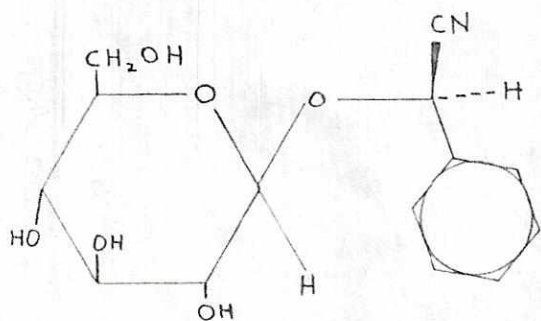
cardiospermina

Cianolípidos probablemente derivados de leucina

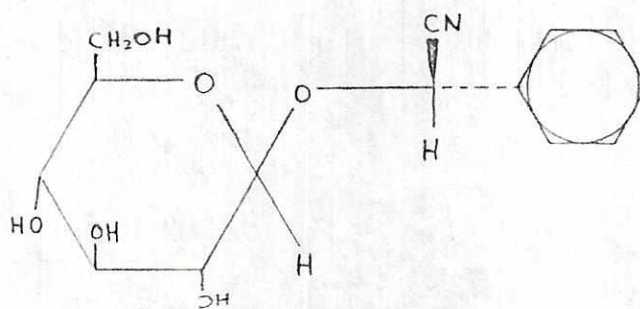


a: Tomado de Seigler (1975 a)

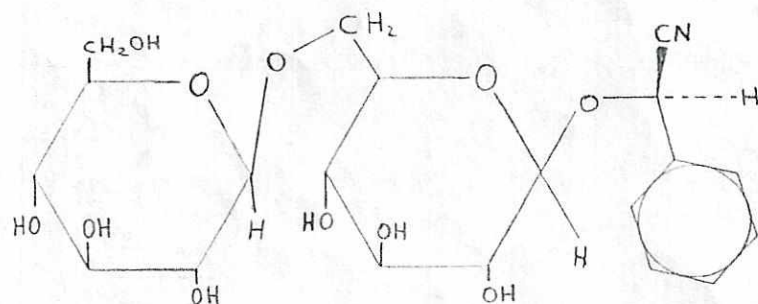
B. Compuestos derivados de fenilalanina.



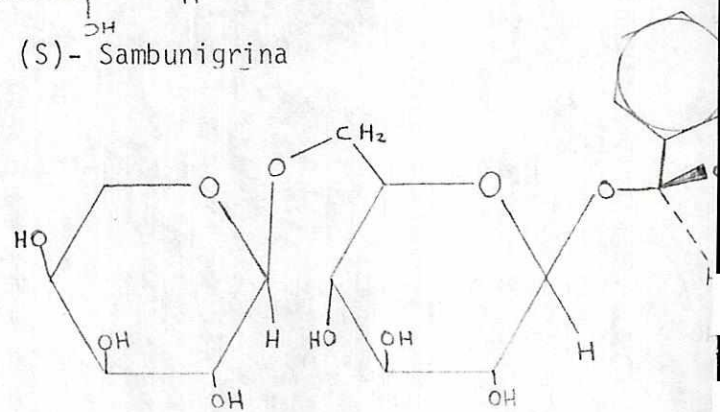
(R)- Prunasina



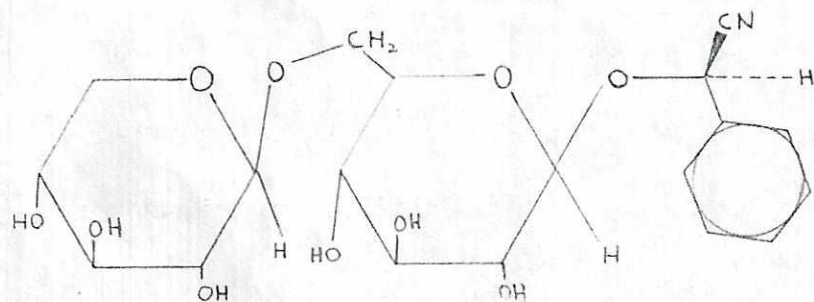
(S)- Sambunigrina



(R)- Amigdalina

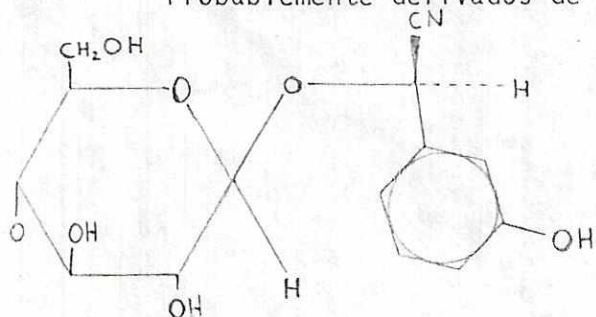


(R)- Vicianina

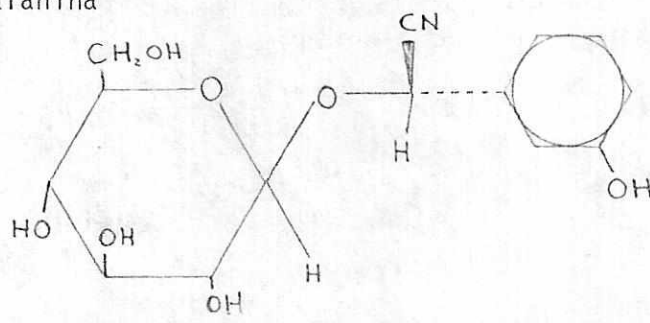


(R)- Lucumina

Probablemente derivados de fenilalanina

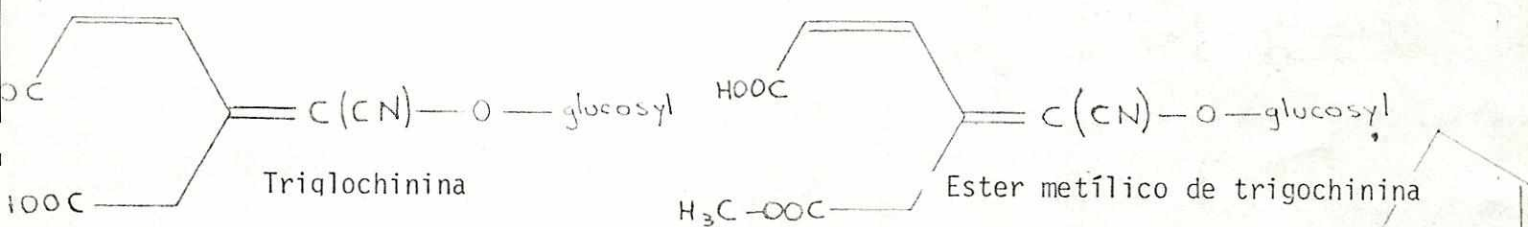
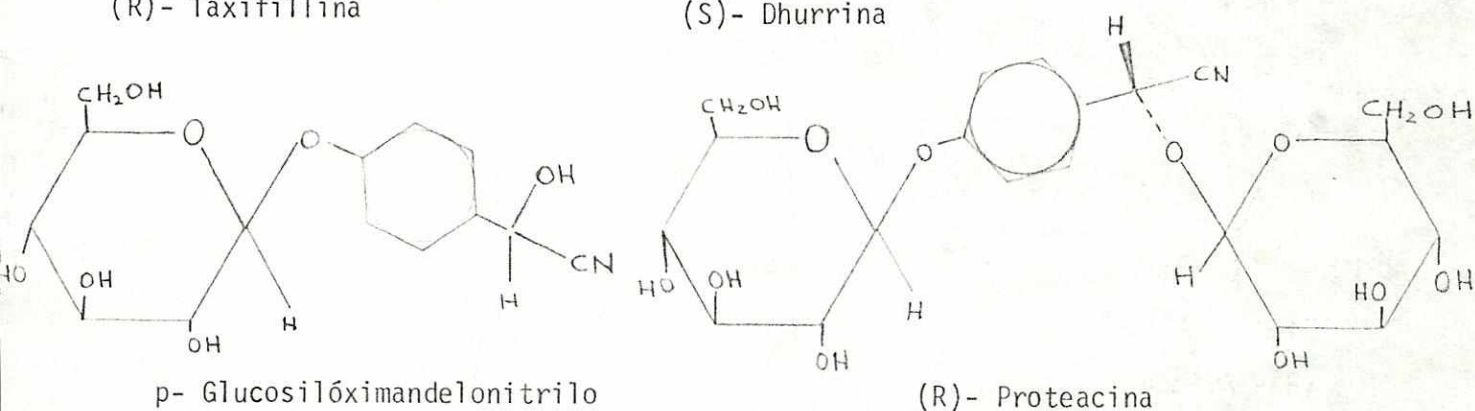
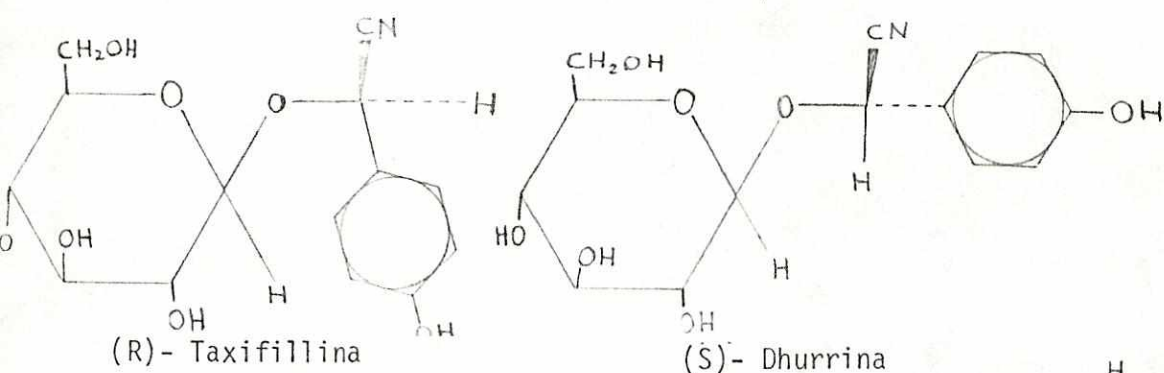


(R) - Holocalina

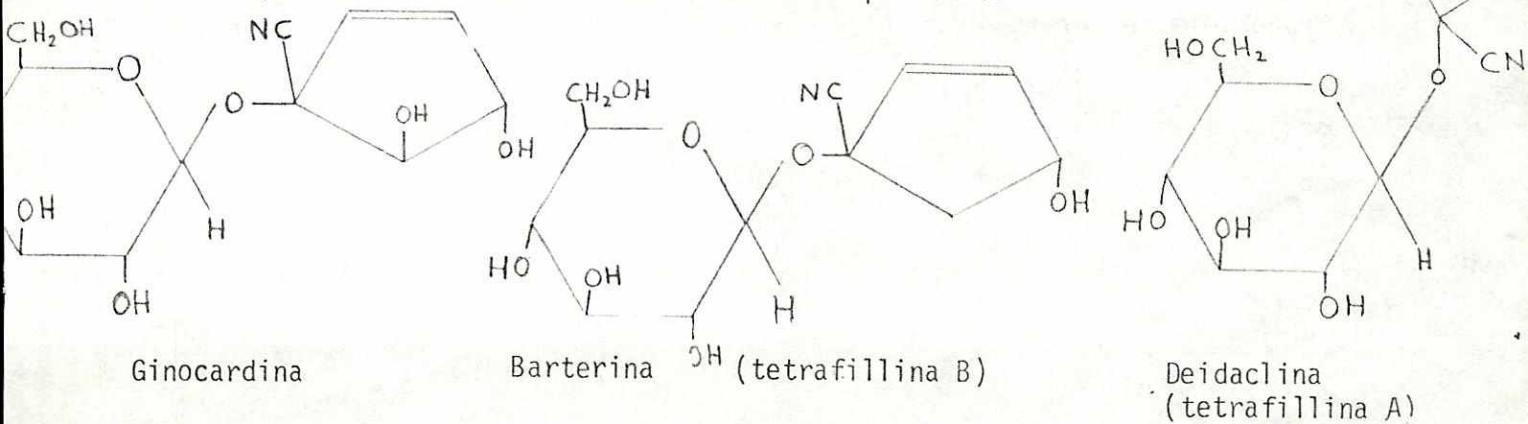


(S)- Zierina

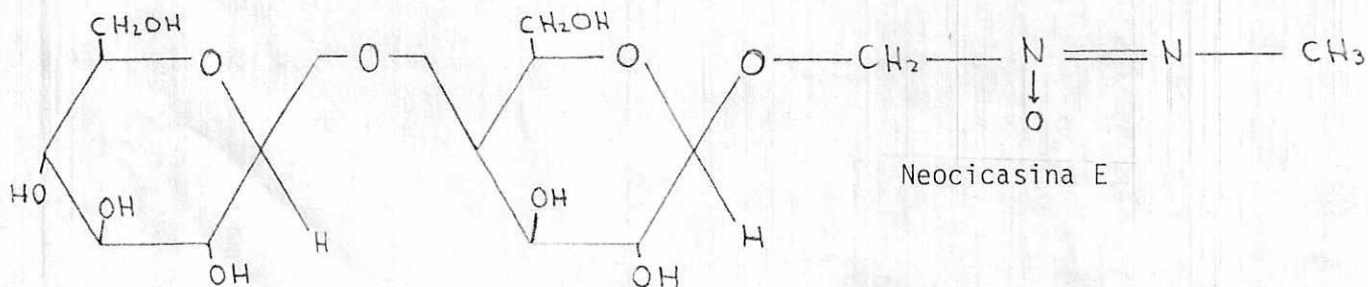
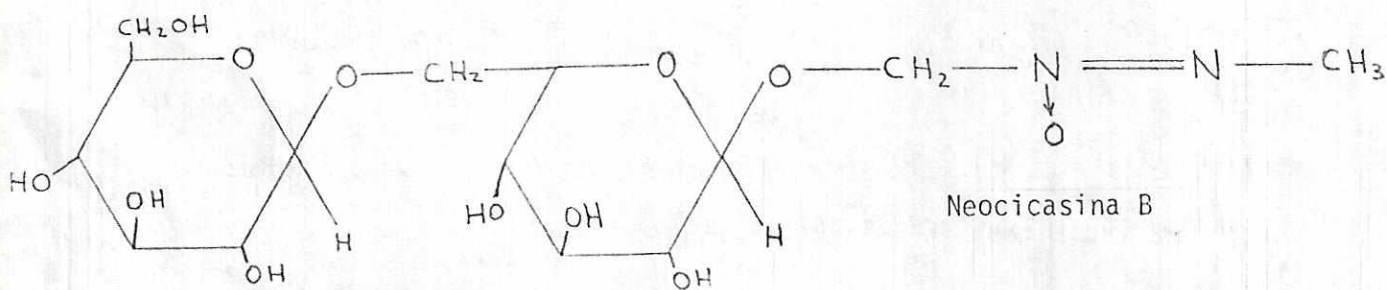
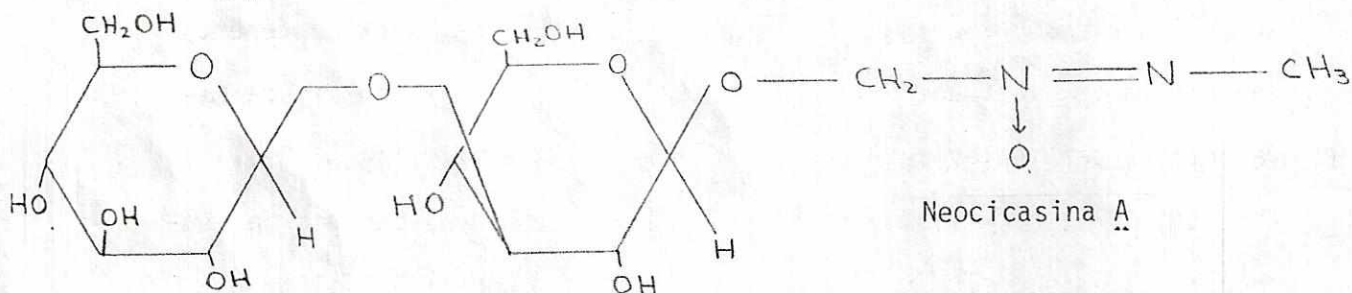
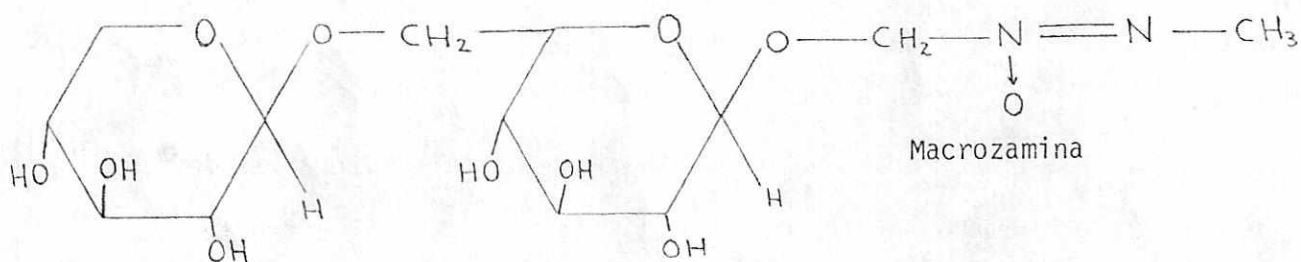
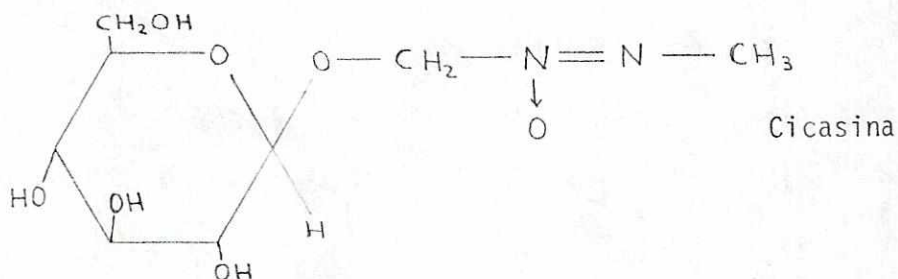
C. Compuestos derivados de tirosina



D. Compuestos con estructura de anillo ciclopenténico



E. Glucósidos pseudocianogénéticos



Los compuestos se obtienen en forma hidratada y no cristalina. De esta manera se han determinado sus puntos de fusión y su rotación óptica, a pesar de que se sabe que en estas condiciones las mediciones no son muy reproducibles. Los resultados se presentan en el cuadro B2. Se adjuntan allí los puntos de fusión de los acetatos de cada compuesto, porque estos son fácilmente obtenibles y tienen puntos más reproducibles.

Los compuestos se obtienen generalmente por trituración de la muestra seguido de una extracción con etanol, metanol y agua o mezcla de estos.

Si las muestras son frescas a veces es preferible triturarlas después de congelarlas en hielo seco o nitrógeno líquido. El extracto se calienta entonces para desactivar las enzimas que pueda contener. (generalmente en etanol 80%). El material se filtra y centrifuga para remover partículas residuales. El método de extracción de Reay (Russell 1971, Reay 1970 y 1969) suprime los problemas que podría ocasionar la descomposición enzimática y térmica. Consiste básicamente en realizar la extracción a -80°C seguida de filtración a temperatura ambiente.

El solvente se destila al vacío y la muestra se redisuelve en agua. Cualquier precipitado que se obtenga a este nivel debe separarse por filtración y analizarse en busca de HCN.

Si el material vegetal no se había extraído previamente con un solvente apolar para remover lípidos, la solución acuosa debe ser extraída con eter de petróleo liviano o cloroformo.

Para seguir la purificación se procede con las más variadas técnicas para eliminar sustancias carboxílicas indeseables. En general se han hecho combinaciones de cromatografía y neutralización.

A este nivel los glucósidos cianogenéticos son relativamente estables. Sin embargo, deben ser guardados en refrigeración y en atmósfera inerte como medida de precaución. Este extracto frecuentemente está contaminado con azúcares y otros compuestos glicosídicos y requieren varios métodos de purificación. Algunos compuestos han sido purificados por extracción líquido continua con acetato de etilo (Kofod 1969). Otros se han purificado por cromatografía en papel. En el trabajo de Seigler (1975 a) se presentan los sistemas de solventes y R_f . La purificación final se ha llevado a cabo con Silica-gel, Kiesel-gel o Florisil.

La identificación se ha hecho con espectros de resonancia magnética nuclear e infrarrojo. Los detalles del análisis de los espectros se discuten detalladamente en el trabajo de Seigler (1975 a).

Cuadro B2: Propiedades físicas de algunos glucósidos cianogénicos y sus correspondientes acetatos.

| Compuesto | Punto fusión (°C) | Acetato | Punto fusión (°C) |
|-----------------------------|-------------------|--------------|-------------------|
| Acacipetalina | 176-177 | Tetraacetato | 104 |
| Amigdalina | 214 | Heptaacetato | 171-172 |
| Barterina | 157-158 | | |
| Cicasina | 145-146 | | |
| Deidaclina | 127-128 | | |
| Dhurrina | 165 | Pentaacetato | 132-132.5 |
| p-Glucosilóximandelonitrilo | 160-164 | | |
| Ginocardina | 165-166 | Hexaacetato | 119-120 |
| Holocalina | 154-155 | Pentaacetato | 129-130 |
| Linamarina | 143-144 | Tetraacetato | 140-141 |
| Lotaustralina | 123.5-124.5 | Tetraacetato | 116-116.5 |
| Lucumina | 183-184 | Hexaacetato | 137-138 |
| Macrozamina | 199-200 | Hexaacetato | 150-151 |
| Neocicasina A | 162-163 | Heptaacetato | 142-143 |
| Proteacina | 148-151 | Octaacetato | 181-183 |
| Prunasina | 148-151 | Tetraacetato | 139-140 |
| Sambunigrina | 151-152 | Tetraacetato | 125-126 |
| Taxifillina | 168-169 | Pentaacetato | 144-144.8 |

Cuadro B2 continuación

| Compuesto | Punto fusión (°C) | Acetato | Punto fusión (°C) |
|-----------------|-------------------|--------------|-------------------|
| Tetrafillina | 116-118 | Tetraacetato | 108-109 |
| Tetraphyllina B | 169-170 | Pentaacetato | 114-115 |
| Triglochinina | - | | |
| Vicianina | 175-176 | Hexaacetato | 170-171 |
| Zierina | 153-156 | Pentaacetato | 117.5-118.5 |