

Q  
33  
A6X  
NH

ANALES

ISSN 0037-8437

DE LA

# SOCIEDAD CIENTIFICA

## ARGENTINA

Director: Dr. PEDRO CATTANEO

ENERO - JUNIO 1981 - Entregas I-VI - TOMO CCXI 211

JULIO - DICIEMBRE 1981 - Entregas I-VI - TOMO CCXII 212

### SUMARIO

#### SERIE I. - CIENCIAS Nº 45

	Pág.
ANTONIO MARTINEZ y ADRIAN MARTINEZ: Una nueva especie de <i>Dichotomius Hope</i> (Col. Scarab. Copríni: <i>Dichotomiina</i> ) . . . . .	3
JOSE F. ZELASCO: Proyecto de rutas curvas horizontales: Obtención del punto de inflexión y origen de dos clotoides que vinculen dos circunferencias dadas recorridas en sentido contrario.( <i>Contracurva</i> ) . . . . .	9
S.N. FUSERO, M.H. BERTONI, E.G. GROS y P. CATTANEO: Frutos de <i>Cynura Cardunculus</i> L. (Cardo de Castilla, compuesta) - Estudio del aceite crudo de extracción y de la harina residual. . . . .	17
N.S. NUDELMAN, R.D. MARTINEZ, P.M.E. MANCINI y L.R. de VOTTERO: Efectos de solvente en la sustitución nucleofílica aromática. Parte 2 reacción de 2,4-dinitroclorobenceno con piperidina en metanol y en ciclohexano. . . . .	27
CRISTINA A. CORDO DE BALONGA: Mancha de la hoja del trigo (Sep-toria tritici) en la República Argentina III - Método de inoculación en laboratorio. Control de factores ambientales. . . . .	41
S.N. FUSERO, M.H. BERTONI y P. CATTANEO: Frutos de <i>Carduus Thoermeri</i> Weinm. ( <i>Carduus Nuuns</i> auct. compuesta) - Estudio del aceite crudo de extracción y de la harina residual. . . . .	47
JEAN-CLAUDE DESSELLE, GUY VERNET y Humberto J.A. MORETTO: Estudio citoquímico de los elementos figurados de la sangre del nemertino, <i>Lineus lucteus montagu</i> (heteronemertea). . . . .	57

#### SERIE II. - CIENCIAS APLICADAS Nº 48

EMILIO L. DIAZ: Una posible vinculación solar de la presión atmosférica. . . . .	37
--	----

#### TEMAS DE ACTUALIDAD

JUANA DURIEUX DE MAZZA: Microbiología de las aguas minerales . . . . .	61
PEDRO CATTANEO: Aditivos alimentarios. . . . .	69

Avda. SANTA FE 1145  
1059 BUENOS AIRES  
ARGENTINA

1982

# SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA

## SOCIOS HONORARIOS

Dr. Norman Borlaug  
Dr. Luis Leloir  
Dr. Selman Waksman  
Dr. Florentino Ameghino †  
Dr. Valentín Balbin †  
Ing. Santiago E. Barabino †  
Dr. Carlos Berg †  
Ing. Vicente Castro †  
Ing. Enrique Chanourdie †  
Dr. Carlos Darwin †  
Dr. Germán Burmeister †

Dr. Alberto Einstein †  
Dr. Enrique Ferri †  
Dr. Angel Gallardo †  
Dr. Benjamin A. Gould †  
Dr. Cristóbal M. Hicken †  
Dr. Eduardo L. Holmberg †  
Dr. Bernardo A. Houssay †  
Ing. Luis A. Huerdo †  
Dr. Mario Isola †  
Dr. Juan J. J. Kyle †  
Ing. Eduardo Huerdo †

Dr. César Lombroso †  
Ing. Guillermo Marconi †  
Dr. J. Mendizábal Tamborel †  
Dr. Walter Nernst †  
Dr. R. A. Phillippi †  
Dr. Guillermo Rawson †  
Dr. Alfredo Sordelli †  
Dr. Carlos Spegazzini †  
Dr. Pedro Visca †  
Dr. Estanislao Zeballos †

## JUNTA DIRECTIVA

— Presidente  
— Vicepresidente 1º  
— Vicepresidente 2º  
— Secretario  
— Prosecretario  
— Tesorero  
— Bibliotecario  
— Director de Anales

Ing. Agr. Eduardo Pous Peña  
Dr. Máximo Valentínuzzi  
Dr. Roberto F. Recoder  
Agrim. Antonio M. Saralegui  
Ing. Agr. Ichiro Mizuno  
Dr. Luis A. Santalo  
Dra. Estrella A. M. de Mäthov  
Dr. Pedro Cattáneo

## Miembros Titulares

Ing. Lucio R. Ballester  
Dr. Alfredo Manzullo  
Dr. José María Quevedo  
Dr. Andrés O. M. Stoppani

Lic. José María Gallardo  
Ing. Agr. Edgardo N. Orrila  
Ing. Roque Scarfiello  
Dr. Julio V. Uriburu

## Miembros Suplentes

Dra. Sara Mabel Abecasis  
Ing. Quím. Carlos A. Leguizamón  
Dr. Jorge R. A. Vanossi

Cap. Navío Mario Raul Chingotto  
Ing. Elect. Jorge S. Panizza  
Ing. Valerio J. Yacubsohn

— Revisores de balances anuales: Ing. Ricardo R. Hertig y Cont. Públ. Jesús Vazquez Ger

## SECCIONES DEL INTERIOR

### Comisión Directiva

#### Sección LA PLATA:

Presidente: Ing. Roberto Diego Cotta; Vicepresidente: Ing. Camilo B. Rodriguez; Secretario: (Vacante)  
Prosecretario: Ing. Horacio C. Albina; Tesorero: (Vacante); Protesorero: Ing. Enrique Corrá; Vocales:  
Dr. Homero Bibiloni; Dr. Jorge Ronco; Dr. Rodolfo Disalvo; Dra. Ives L. Danna; Ing. Aaron Beilinson;  
Ing. José G. Romano Yalour

#### Sección SAN JUAN:

Presidente: Dr. Indalecio Carmona Ríos; Vicepresidente: Dr. Antonio Aguilar; Secretario: Agr. Orlando de Sanctis Aubone; Tesoro: Dr. Duilio Graffigna; Vocales Titulares: Prof. César H. Guerreo;  
Ing. José Benedicto Graffigna; Ing. Fernando Volponi; Dr. Emilio Maurin Navarro; Vocales Suplen-  
tes: Enólogo Alberto Baistrocchi; Dra. María Augusta Herrera Bustos; Ing. Faustino Puebla; Prof. Ma-  
riano Gambier; Revisores de Cuentas: Ing. Enrique Gatti; Ing. Juan C. Perucca; Ing. Jorge Avila.

Sección MENDOZA: (en reorganización)

Sección SANTA FE: (en reorganización)

ANALES  
DE LA  
SOCIEDAD CIENTIFICA

ISSN 0037-8437

ARGENTINA

Director: Dr. PEDRO CATTANEO



ENERO - JUNIO 1981 - Entregas I-VI - TOMO CCXI

JULIO - DICIEMBRE 1981 - Entregas I-VI - TOMO CCXII

**NO NEGOCIABLE**



Avda. SANTA FE 1145  
1059 BUENOS AIRES  
ARGENTINA

1982

**MIEMBROS PROTECTORES**  
**DE LA**  
**SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA**

AGUA Y ENERGIA ELECTRICA, Empresa del Estado

ARMADA ARGENTINA, Comando en Jefe

ASOCIACION ESCUELA MEDICA HOMEOPATICA ARGENTINA

ASOCIACION PSICOANALITICA DE BUENOS AIRES

COMISION DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS de la Prov. de Bs. As.

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS

FUNDACION BUNGE Y BORN

I. B. M. ARGENTINA S. A.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA (INTA)

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA INDUSTRIAL (INTI)

JOCKEY CLUB ARGENTINO

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

YACIMIENTOS PETROLIFEROS FISCALES

UNA NUEVA ESPECIE DE *DICHOTOMIUS HOPE*  
(Col. Scarab. Coprini: *Dichotomiina*)

por

ANTONIO MARTINEZ<sup>1</sup> y ADRIAN MARTINEZ<sup>2</sup>

RESUMEN

En este trabajo los autores describen una nueva especie de *Dichotomius* del Subgénero nominotípico: *Dichotomius (D.) prietoi* sp. nov., procedente de Bolivia y Perú.

Esta nueva especie por descripción, puede ser confundida con *Dichotomius (D.) podalirius (Felsche)*, que posiblemente sea sinónima de *Dichotomius (D.) telamon* (Harold).

De todas las del grupo "boreus" se diferencia principalmente por la forma de las armaduras cefálica y pronotal.

SUMMARY

In this work the authors describe a new species of *Dichotomius* of the nominotypic Subgenus: *Dichotomius (D.) prietoi* sp. nov., from Bolivia and Perú.

This species, by description could be confounded with *Dichotomius (D.) podalirius (Felsche)*, which probably could be sinonim of *Dichotomius (D.) telamon* (Harold); but is principally diferenced by the cephalic and pronotal armor.

Durante un viaje de estudio y recolección de material entomológico a Ecuador, durante los meses de abril a junio; capturamos en la zona amazónica de Lago Agrio, provincia de Napo, en trampas cebadas con excremento humano, una interesante serie de *Dichotomius*, entre los que pudimos determinar a *D. (D.) podalirius (Felsche)*. Quedó por consiguiente como especie "inquirenda" el material de Bolivia y Perú que habíamos considerado como perteneciente a esa especie la que, reestudiada y comparada con casi todas las especies pertenecientes al grupo, concluimos se trataba de un taxa inédito, próximo a *podalirius*, que a continuación describimos como

*Dichotomius (D.) prietoi* sp. nov.  
(Figs. 1-2)

DIAGNOSIS:

Especie del grupo *boreus* y muy emparentada con *podalirius (telamon?)*. Cabeza con quilla clipeo-frontal angosta, lateralmente subdentada; quilla del vértice de la frente formando una figura triangular, con el diente medial anterior en el ♂ saliente y fino y en la ♀ tuberculiforme, pudiendo o no estar unido a los látero-posteriores por fina quillita. Pronto con el ángulo anterior más marcado, lo mismo que la armadura anterior del borde superior y, el

<sup>1</sup> Investigador de la Carrera.

<sup>2</sup> Técnico ayudante. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; Instituto de Investigaciones Entomológicas Salta (INESALT). Rosario de Lerma.

borde lateral más escotado; en el ♂ la puntuación preescutelar escasa y poco conspicua. Fémur III con la puntuación de la mitad distal, excepto sobre el borde anterior, más rara y la que margina el borde posterior conspicua con sedas más largas. ♂ con falobase y parámetros proporcionalmente más grandes.

### DESCRIPCION

Especie mediana, oval, aproximadamente 1/5 a 1/6 más larga que ancha; robusta; dorsalmente bien convexa y glabra. Negra brillante, excepto las piezas bucales, antena, tibia anterior y todos los tarsos que son negro de pez, más o menos oscurecidos y la pilosidad que cubre las diferentes regiones del cuerpo, de color dorado o ferruginoso, ora poco mas claro, ora poco mas obscuro, con la maza antenal cubierta de tomento ceniciento.

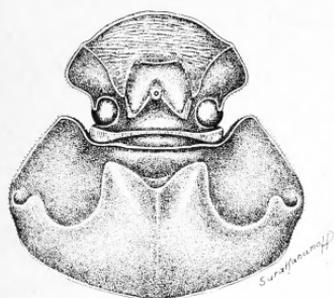
♂ "*majior*": *cabeza*. Ensanchada, el borde clipeal y anterior de las mejillas irregularmente semicircular; aquel finamente marginado y en su unión con las mejillas subdentado, medialmente ligeramente escotado y dentiforme; mejillas angulosas lateralmente; sutura clipeogenal apareciendo por detrás del dientecito del borde anterior, fina pero impresa, por detrás algo desigual y ensanchada, finalizando en la base del tuberculito dentiforme posterior; una primera armadura clipeo-frontal, consistente en una elevación mesal aquillada, transversal, recta o ligeramente arqueada, con arista más o menos marcada y a cada lado denticulada, de la que puede partir póstero-lateralmente una sutura que confluye con la clipeogeno-frontal y, el que generalmente está unido al tubérculo central por obsoleta quillita. El clipeo es transversal y marcadamente rugoso; el resto de la superficie cefálica es más o menos alutáceo, con la puntuación más marcada en la frente, por detrás de la quilla; el vértice de la frente liso.

Región ventral con el borde angostamente marginado, liso y rebordeado con seditas cortas y algo proyectadas lateralmente; el clipeo en su parte media en corta quillita angulosa y dentiforme, por detrás de la cual y unida al reborde oral, hay un dientecito espinoso fino y saliente. Superficie del clipeo irregular y aglomeradamente punteada, los puntos finos, perdiéndose hacia el borde oral, que es obsoletamente rugoso; mejillas alutáceas y con algunas seditas cortas y poco notables; piezas bucales, excepto el último artejo del palpo labial, palpos maxilares y gula que son glabros, cubiertos con sedas más o menos tupidas y largas; antena con sedas ralas.

*Tórax*. Pronoto totalmente marginado; ángulo anterior saliente y ligeramente obtuso; ángulo posterior poco indicado y muy redondeado; borde lateral arqueado, ligeramente escotado sobre el ángulo caudal; medialmente en la región anterior en declive abrupto y excavado transversalmente, hacia el borde lateral con un tubérculo poco conspicuo que se pierde antes del ángulo anterior; la excavación, por arriba y medialmente con proceso saliente y algo convergente, cuyo borde anterior es escotado en análogo ancho, marcado y formando a cada lado un lóbulo coniforme aplanado; lateralmente a este con una impresión oblicuo-oval marcada y por debajo de ésta con una otra poco definida; la región del disco con surco longitudinal fino, anteriormente perdido y obsoleto sobre la parte preescutelar; impresión lateral casi adosada a la orilla del declive, pequeña, pero marcada. Superficie en la mitad anterior y por debajo del proceso medial aglomeradamente punteada, los puntos marcados, a veces coalescentes y formando cortas araguaitas, esta escultura se atenúa hacia adelante y lateralmente, siendo en las impresiones obsoletamente alutáceas; la región posterior, a cada lado del surco longitudinal medial, punteada, los puntos finos, separados, tornándose más aglomerados y poco más marcados hacia el borde lateral y anteriormente; premarginalmente con una hilera de puntitos ocelados, pequeños y algo irregularmente dispuestos.

Mesonoto con el élitro finamente estriado-punteado, los puntos poco más anchos que la estría; interestrías microscópicamente punteadas, los puntos abundantes, pero no aglomerados; sutura elitral ancha; angostándose y tornándose algo convexa desde el tercio anterior; tubérculo humeral poco resaltante, algo alargado; callo distal inconspicuo; epipleura angostada caudalmente, con fina estría marginal lateral e hilera ventral de cortas y apretadas seditas.

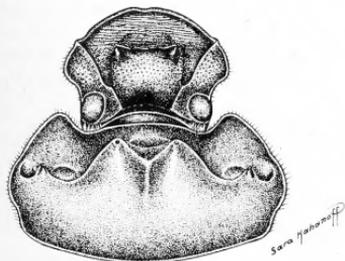
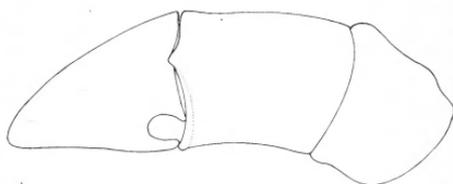
Mesosternón corto y, excepto una angosta franja medial longitudinal lisa, despolido y con algunas seditas cortas y decumbentes. Metasternón en la placa bien más largo que



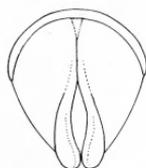
1



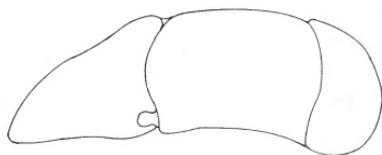
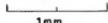
2



3



4



### EXPLICACION DE LAS FIGURAS

Fig. N° 1. *Dichotomius (D.) prietoi* sp. nov. Cabeza y pronoto, norma dorsal. 6 x

Fig. N° 2. *Dichotomius (D.) prietoi* sp. nov. Parámetros, norma dorsal; falbase y parámetro, norma lateral.

Fig. N° 3. *Dichotomius (D.) podalirius* (Felsche). Cabeza y pronoto, norma dorsal. 6 x

Fig. N° 4. *Dichotomius (D.) podalirius* (Felsche). Parameros, norma dorsal; falbase y parámetro, norma lateral.

ancho, con surco medial longitudinal obsoleto o inaparente; la superficie, excepto sobre el borde anterior que tiene corta faja despulida, ligeramente brillante y glabra, con puntuación microscópica dispersa, poco más aglomerada e impresa proximalmente; región lateral cubierta con puntuación pequeña, ocelada, aglomerada y pilifera, las sedas finas, largas y abundantes.

Pata anterior con la tibia poco ensanchada distalmente, el borde lateral con 4 dientes romos, siendo el distal el menos marcado; espolón simple, espiniforme, achatado, ligeramente arqueado distalmente y aguzado; tarso y uñas normales para el grupo. Pata media con el borde interno coxal ensanchado proximalmente, angostado en cuña fina por detrás, en la mitad anterior con puntuación pilifera impresas y sedas finas, largas y decumbentes; fémur en la faz ventral obsoleta y dispersamente micropunteado, distalmente con algunos puntos impresos y pilíferos, tibia en el borde látero-ventral con denticulación serrada marcada y con sedas de largo moderado marginando los bordes, el ápice distal con seditas cortas y chatas lateralmente; espolones achatados y romos, el lateral más largo, subensiforme; tarso subigual en largo a la tibia. el 5° del largo del 3°; uñas pequeñas, arqueadas y aguzadas. Pata posterior con la tibia fuerte, pero gradualmente ensanchada distalmente, el borde latero-ventral denticulado en sierra, la ornamentación similar a la de la tibia precedente; espolón alargado, más corto que la suma de los dos primeros artejos tarsales, el ápice claramente escotado; tarso poco más largo que la tibia, pero con ornamentación y uñas muy similar al precedente.

*Abdomen.* Esternitos medialmente acortados, los II a V lateralmente algo impresos y sobre el borde anterior con puntuación pequeña, pero neta; sobre los bordes laterales y en la región anterior con puntos impresos y pilíferos, el resto del esternito micropunteado y glabro; esternito VI glabro, corto, mucho más medialmente, donde es casi linear. Pigidio corto y ancho, totalmente marginado; superficie micropunteada y glabra. Genital con los parámetros cortos, comprimidos: vistos en norma dorsal cuneiformes con el ápice de cada uno ligeramente ensanchado y romo; en norma lateral en cuña triangular de ápice romo.

♂ "minor": armadura cefálica y pronotal reducida. La primera con la quilla transversal anterior obsoleta o inaparente y la posterior con el tubérculo coniforme central poco desarrollado y los látero-posteriores poco indicados; en el pronoto el lóbulo superior reducido a dos puntas dentiformes poco notables, la depresión anterior poco marcada, oblicua, lo mismo que la foseta oval superior y la orilla lateral, que no tienen tubérculo aparente; toda la superficie netamente punteada microscópicamente, siendo los puntitos más espaciados y rasos en la mitad posterior; el resto sin diferencias apreciables.

♀: similar al ♂, pero con la armadura cefálica menos marcada, generalmente sin quillas que unan los denticulos laterales al medial, en la armadura del vértice de la frente; pronoto con los lóbulos más angostos distalmente y la escotadura medial mas angulosa; esternito VI no acortado medialmente; el resto muy semejante al ♂.

La ♀ "minor" es similar al ♂ "minor".

Largo ♂ y ♀: 16-28; ancho del pronoto: 10-17; ancho máximo: 11-18 mm aproximadamente.

Ejemplares examinados 50 (30 ♂ y 20 ♀). De Bolivia Holotipo ♂, Alotipo ♀, 2 Paratipos ♂ y 3 Paratipos ♀: Departamento Cochabamba, Provincia de Chapare, Chimoré, 250 a 450 m a, I-72 (A. Martínez-coll.); 2 Paratipos ♂ y 2 Paratipos ♀ de la misma localidad (Zischka-leg.); 1 Paratipo ♂ del mismo departamento y provincia, San F. del Chipiriri, XI-53 (A. Martínez-coll.). Perú: 25 Paratipos ♂ y 12 Paratipos ♀: Departamento Huánuco, Tingo María (Universidad) VII-XII-74 (C. Bordón y A. Martínez-coll.); 1 Paratipo ♀ de Satipo, V-945 (Vucetich-cooll.). Holotipo ♂, Alotipo ♀, 20 Paratipos ♂ y 8 Paratipos ♀ en la colección de los autores; 10 Paratipos ♂ y 10 Paratipos ♀ en la colección Bordón en Maracay, Venezuela.

*Discusión.* Esta especie que pertenece al grupo "boreus" es próxima a *podalirius* (Felsche) = *telamon* (Harold)?, de la que se reconoce por la armadura cefálica que, en el límite del clípeo y frente está formada por una quillita angosta, poco elevada y a cada lado más o menos conspicuamente denticulada; por la armadura del vértice de la frente, consistente en un tubérculo coniforme medial, situado entre este y la frente, flanqueado por detrás y lateralmente por un otro tubérculo más pequeño y situado por delante del borde posterior, formando una figura triangular, cuyo borde caudal es del ancho o poco mas ancho que la

quilla cípeo-frontal. En el pronoto, lateralmente a la depresión externa sin dentículo marcado, solo con leve gibosidad poco notable, a veces subdentada; los lóbulos mediales del borde superior de la depresión anterior más anchos, salientes anteriormente y con el ápice más marcado; también en la mayoría de los ejemplares, aunque esto puede tener alguna variación, los élitros con las estrías finas, impresas y con la puntuación más notable y, las interestrías con micropuntuación más neta y aglomerada; por el contrario, el pigidio con los puntos más finos y pequeños. De *carinatus* (Luederwaldt) lo reconocemos por tener esta quilla cípeo-frontal muy ancha y aproximada al borde anterior y la del vértice de la frente recta o casi recta; el pronoto con los ángulos anteriores más agudos y claramente indicados; los élitros con estrías impresas y puntuación marcada, las interestrías clara, aunque moderadamente convexas, etc. Con *boreus* (Olivier) y *telamon* (Harold), esta última por descripción, la forma de las armaduras cefálica y pronotal, muy distintas, la reconocen de inmediato.

Esta nueva especie, como señalamos precedentemente, es muy próxima a *podalirius*, con la cual la hemos confundido; separándose muy fácilmente de ésta por la forma de la armadura cefálica y proyección y escultura del pronoto, aquella única en el grupo "*boreus*".

Es imposible, por descripción, determinar *D. telamon* (Harold), especie que posiblemente sea similar a *D. podalirius* (Felsche). Figs. 3 y 4). En caso de resultar exacta esta sinonimia puesto que es necesario previamente estudiar el ejemplar TIPO de Harold, que suponemos debe encontrarse en la ex-colección Harold — ex-colección Oberthur— ahora depositada en el Museo Nacional de Historia Natural de París, el nombre de Harold, *telamon*, tiene prioridad sobre el de Felsche, *podalirius*.

Hacemos notar de que en este grupo, "*boreus*", los caracteres específicos están dados principalmente por la forma de las armaduras cefálica y pronotal, siendo el resto del cuerpo, lo mismo que los genitales del macho, muy similares.

Dedicamos esta interesante especie a la memoria del primer Jefe de la Carrera de Investigador Científico del CONICET, señor Don Gerardo T. Prieto, como homenaje sincero a quien fuera, no sólo un probo funcionario, sino también un excelente compañero.

Agradecemos al Ing. Carlos Bordón de Maracay, Venezuela, el habernos facilitado material para su estudio y en donación, haciendo extensivo este al Director y Subdirector de INESALT, R.P. Gregorio J. Williner y Sr. Manfredo A. Fritz, por las facilidades acordadas pero este estudio y muy especialmente a la Sra. Sara Kahanoff por las ilustraciones que acompañan el trabajo.



**PROYECTO DE RUTAS  
CURVAS HORIZONTALES: OBTENCION DEL PUNTO DE INFLEXION  
Y ORIGEN DE DOS CLOTOIDES QUE VINCULEN DOS  
CIRCUNFERENCIAS DADAS RECORRIDAS EN SENTIDO  
CONTRARIO. (CONTRACURVA)**

Por José F. Zelasco

**RESUMEN**

Para que el trazado de una ruta o autopista se adapte mejor a las particularidades topográficas del terreno (riberas, crestas de colinas, zonas suburbanas, etc...) con una rasante de menor costo de movimiento de suelos, en lugar de proceder como habitualmente, por segmentos de rectas, se puede trazar directamente curvas circulares de las que se obtendrán sus centros y radios.

Si se aplica este procedimiento, el problema fundamental por resolver, consiste en vincular dos circunferencias recorridas en sentido contrario, por medio de dos curvas de transición (clotoides). Este problema tiene infinitas soluciones y puede ser resuelto por computadora utilizando un método iterativo.

Es posible, sin embargo, encontrar la mejor de estas soluciones, si se considera que las dos clotoides parten del mismo punto en sentido opuesto (punto de inflexión), y tienen el mismo parámetro, que será mayor que el menor de cualquier otro par de clotoides solución de un caso dado.

Se demuestra aquí como se obtiene este parámetro, con el que se definirá el trazado, que será, por lo tanto más armónico, y de mayor coeficiente de seguridad y confort para una velocidad directriz dada.

Se completa con un ejemplo de un proyecto real, y se agrega finalmente una somera exposición que concierne los otros casos, poco usuales, que consisten en vincular curvas circulares recorridas en el mismo sentido.

**RESUMÉ**

Pour mieux adapter le trace d'une route ou autoroute aux caractéristiques du terrain (crêtes des collines, rivières, zones suburbaines, pistes existantes etc. . .) et diminuer ainsi le coût de terrassement, au lieu de procéder comme d'habitude par segments de droites, il est possible de dessiner directement des circonférences dont il sera facile de déterminer leurs rayons de courbures et les coordonnées de leurs centres. Si l'on applique cette procédure, le problème fondamental a résoudre est celui de raccorder deux courbes circulaires de sens contraire (contre courbe) par deux courbes de transition. Ce problème a un nombre infini de solutions et peut être résolu par ordinateur à l'aide d'une méthode itérative.

Il est possible néanmoins de chercher la meilleure de ces solutions si l'on considère que les deux clothoides partent du même point (point d'inflexion) et ont le même paramètre qui sera donc plus grand que le plus petit de toute autre paire de courbes de transition, solution d'un cas donné.

Il est montré ici comment obtenir ce paramètre et définir ainsi le tracé qui sera par conséquent plus harmonieux avec un plus grand coefficient de confort et de sécurité pour une vitesse donnée.

Sont ajoutés finalement, un exemple d'un projet réel et les solutions pour d'autres cas moins usuels, c'est-à-dire, raccorder deux courbes circulaires parcourues le même sens.

### SUMARY

To design a road or highway better suited to the topography of the zone to be crossed (taking account of crests of hills, rivers, suburban areas, etc...) with a minimum of earth works, it is possible to draw circular curves and calculate the coordinates of their centres and their radii, instead of using a series of straight lines as is common practice.

When this procedure is employed the fundamental problem that arises is to connect two circular curves having opposite senses (reverse curves) by two transition curves (clothoids); a problem which has infinite number of solutions, some of which can be obtained by computer using an iterative method.

Nevertheless, it is possible to find the best of these solutions, that is when the two clothoids start at the same point (inflexion point) and have the same parameter, which is always bigger than the smaller one of any pair of transition curves for the solution of a given case.

How to obtain this parameter is derived in this paper, and consequently a design with higher comfort and security coefficients for a given speed, is obtained.

Appended is one example from an actual project and also some comments about the solutions for connecting two circular curves having the same sense. There are two cases of this, which only arise once in a while.

### FORMULAS PRELIMINARES

La llegada al mercado de las calculadoras electrónicas, ha permitido el uso de métodos de cálculo que antes eran inadecuados debido al tiempo que requería emplearlos. El uso de ciertas tablas se puede considerar obsoleto.

En los proyectos de rutas y autopistas y para el trazado de curvas horizontales una nueva solución que ha comenzado a emplearse consiste en utilizar directamente curvas circulares en lugar de rectas, que es como se hace tradicionalmente, obteniendo, entre otras ventajas un trazado más armónico.

De esta manera se asimilará una serie de puntos convenientes (cresta de una colina, curvas de nivel, camino existente, costaneras, zonas suburbanas, etc. . .) a curvas circulares de diferentes radios que definirán directamente el trazado óptimo de menor costo de movimiento de suelos.

Una vez elegidos tres puntos de cada curva, se podrán obtener sus centros y sus radios y quedará por resolver el problema de vincularlas por medio de clotoides. Cabe señalar que el caso realmente práctico es aquel en que dos circunferencias sucesivas se recorren en sentido contrario (contracurva).

Para comenzar el análisis, conviene primero recordar como debe procederse para vincular una recta con una curva circular (fig. 1), esto permitirá pasar posteriormente a la resolución del problema que nos ocupa, que, como se sabe, se resuelve actualmente por computadora usando un método iterativo, que debe ser aplicado varias veces hasta obtener parámetros razonables para las dos curvas de transición buscadas.



Se tiene entonces:

$$(A) S = \sqrt{24(QR - R^2)} \text{ donde es siempre } Q > R$$

S : longitud de la clotoide

R : radio de la circunferencia

Q : distancia del centro de la circunferencia a la recta

(como habitualmente en la práctica se toman solamente los primeros términos de los desarrollos en serie de senos y cosenos debe ser entonces  $S \ll R$ ).

$$S \ll R$$

Dado que:

$$Q = R \cos \tau + y_t$$

$\tau$  : ángulo formado por la tangente a la clotoide en el origen, y la tangente a la clotoide y a la circunferencia en el punto común a las dos curvas.

$y_t$  : distancia de dicho punto a la recta tangente a la clotoide en el origen.

$$(B) \tau = \frac{S}{2R} \quad \text{y} \quad \cos \tau = 1 - \frac{S^2}{8R^2}$$

$$y_t = \frac{S^2}{8R}$$

$$Q = R \left( 1 - \frac{S^2}{8R^2} \right) + \frac{S^2}{8R}$$

$$(C) Q = R + \frac{S^2}{24R}$$

OBTENCION DEL PARAMETRO DE LAS DOS CLOTOIDES QUE VINCULAN DOS CURVAS CIRCULARES RECORRIDAS EN SENTIDO CONTRARIO. CONTRACURVA. (fig. 2)

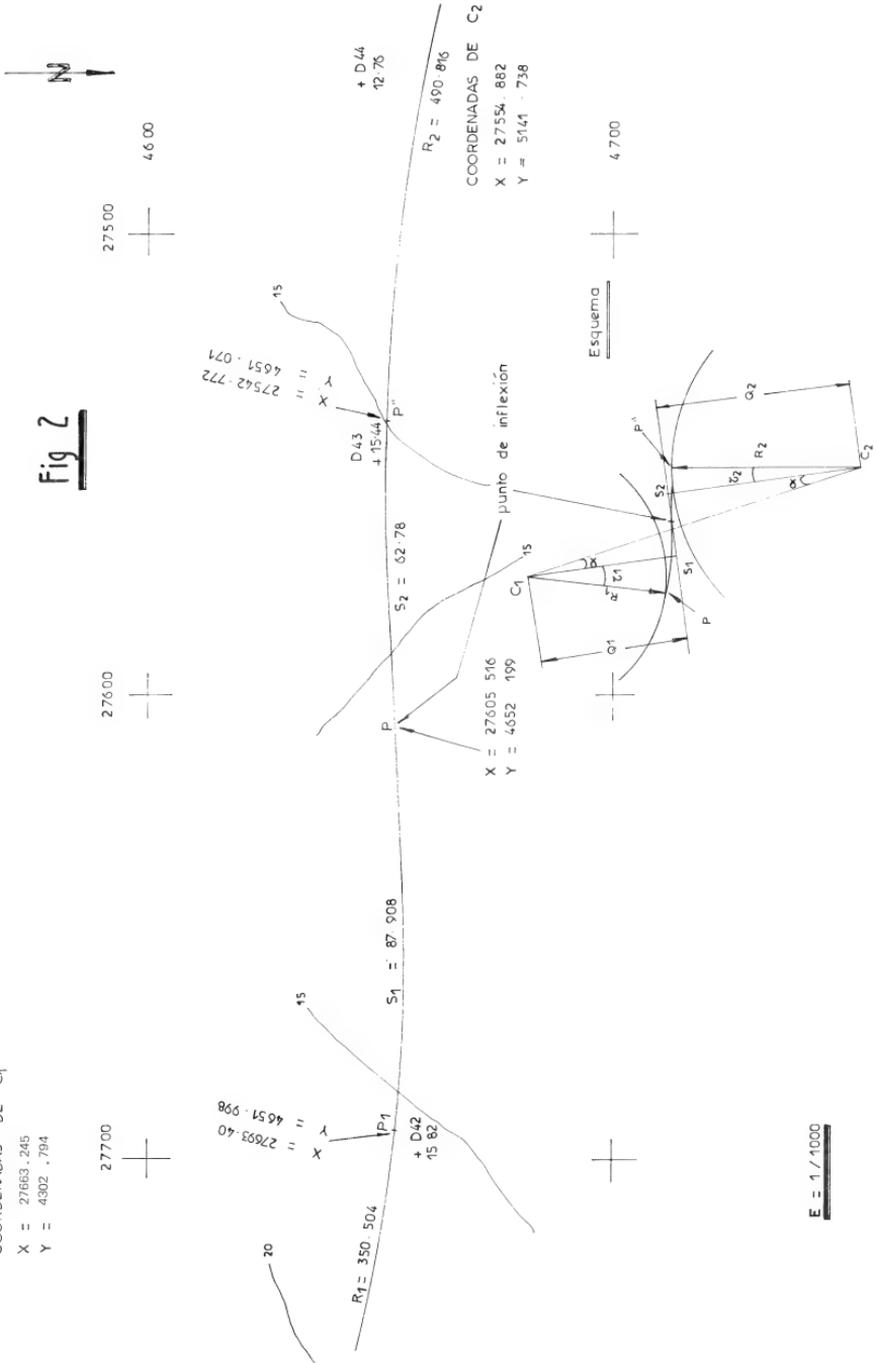
Las distancias de cada uno de los centros a la recta que pase por el punto de inflexión y sea tangente a las dos clotoides son:

$$Q_1 = R_1 + \frac{1}{24} \frac{S_1^2}{R_1} \quad Q_2 = R_2 + \frac{1}{24} \frac{S_2^2}{R_2}$$

Trazando las infinitas rectas posibles entre las dos curvas se obtienen otros tantos pares de clotoides que las vinculen. Si se considera que las dos clotoides tienen un punto común en el origen se sigue estando en presencia de infinitas soluciones, algunas de las cuales se pueden obtener por computadora, eligiéndose posteriormente la mejor. Sin embargo para plantear un sistema de ecuaciones del que se obtenga una solución singular se propondrá que las dos clotoides tengan el mismo parámetro. Dicho parámetro será mayor que el menor de todo par de clotoides solución de un caso dado. Esto implica que el coeficiente de confort y seguridad en esta solución será el mayor y constante a lo largo de toda la curva.

COORDENADAS DE C<sub>1</sub>  
 X = 27663.245  
 Y = 4302.784

**Fig 2**



E = 1/1000

A: parámetro de la clotoide,  $c = \sqrt{C_1 C_2}$

$$1) S_1 R_1 = S_2 R_2 = A^2$$

$$c \cos \alpha = Q_1 + Q_2$$

$$(2) c \cos \alpha = R_1 + \frac{S_1^2}{24 R_1} + R_2 + \frac{S_2^2}{24 R_2}$$

$$c \operatorname{sen} \alpha = S_1 - R_1 \tau_1 + S_2 - R_2 \tau_1$$

$$c \operatorname{sen} \alpha \approx S_1 - \frac{S_1}{2} + S_2 - \frac{S_2}{2} \quad (\text{por B})$$

$$(3) c \operatorname{sen} \alpha = \frac{S_1 + S_2}{2}$$

$$(c \operatorname{sen} \alpha)^2 + (c \cos \alpha)^2 = \left(\frac{S_1 + S_2}{2}\right)^2 + \left(R_1 + \frac{S_1^2}{24 R_1} + R_2 + \frac{S_2^2}{24 R_2}\right)^2$$

$$c^2 = \frac{1}{4} (S_1^2 + S_2^2 + 2 S_1 S_2) + R_1^2 + \left(\frac{S_1^2}{24 R_1}\right)^2 + R_2^2 + \left(\frac{S_2^2}{24 R_2}\right)^2$$

$$+ 2 (R_1 R_2 + \frac{R_1 S_1^2}{24 R_1} + \frac{R_2 S_2^2}{24 R_2} + \frac{R_1 S_2^2}{24 R_2} + \frac{R_2 S_1^2}{24 R_1} + \frac{S_1^2 S_2^2}{(24)^2 R_1 R_2})$$

reemplazando por 1

$$c^2 = \frac{1}{4} (S_1^2 + \frac{S_1^2 R_1^2}{R_2^2} + 2 \frac{S_1^2 R_1}{R_2} + R_1^2 + \frac{S_1^4}{(24 R_1)^2} +$$

$$+ R_2^2 + \frac{S_1^4 R_1^4}{(24)^2 R_2^6} + 2 R_1 R_2 + \frac{S_1^2}{12} + \frac{S_1^2 R_1^2}{12 R_2^2} + \frac{R_1^2 S_1^2}{12 R_2^2} +$$

$$\frac{R_2 S_1^2}{12 R_1} + \frac{S_1^4 R_1}{288 R_2^2})$$

ordenando

$$S_1^4 \left( \frac{1}{576 R_1^2} + \frac{R_1^4}{576 R_2^6} + \frac{R_1}{288 R_2^3} \right) + S_1^2 \left( \frac{1}{3} + \frac{R_1^2}{e R_2^2} + \frac{R_1}{2 R_2} +$$

$$\frac{R_1^3}{12 R_2^3} + \frac{R_2}{12 R_1} \right) + (R_1 + R_2)^2 - c^2 = 0$$

donde  $(R_1 + R_2)^2 - c^2 < 0$  y el coeficiente  $S_1^2$  se reduce a:

$$\frac{1}{3} + \frac{R_1^2}{3 R_2^2} + \frac{R_1}{2R_2} + \frac{R_1^3}{12 R_2^3} + \frac{R_2}{12 R_1} =$$

$$= \frac{R_2}{12 R_1} \left( \frac{4 R_1}{R_2} + \frac{4 R_1^3}{R_2^3} + \frac{6 R_1^2}{R_2^2} + \frac{R_1^4}{R_2^4} + 1 \right) = \frac{R_2}{12 R_1} \left[ \frac{R_1}{R_2} + 1 \right]^4 =$$

$$\frac{(R_1 + R_2)^4}{12 R_1 R_2^3}$$

Si se reemplaza  $s^2$  por  $x$  se obtiene una ecuación de segundo grado en  $x$ . La raíz cuadrada de la solución positiva es el valor  $s$  buscado y con el que se hallaran todos los valores necesarios para definir el trazado y poder así calcular el replanteo.

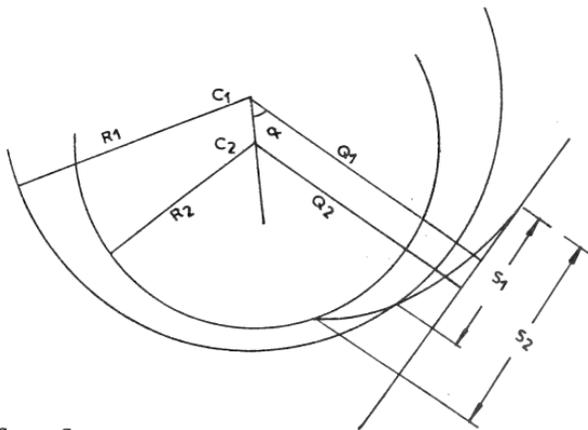
En los casos prácticos y dado que  $R_1, R_2$  y  $c$  son positivos hay una sola solución real positiva.

El ejemplo de la figura da una idea razonable de la relación entre la distancia entre los centros y los valores de  $s$  encontrados. Si excepcionalmente estos no son satisfactorios, sin modificar el dibujo del trazado, y variando de algunos decímetros los valores de los radios en los cálculos, se obtendrán nuevos valores convenientes para  $s$ .

**CURVAS CIRCULARES RECORRIDAS EN EL MISMO SENTIDO. (casos de poca utilidad práctica).**

A) curva de menor radio interior a la otra. (Fig. 3)

Fig 3



$$c \operatorname{sen} \alpha = \frac{S_2 - S_1}{2} \quad c \operatorname{cos} \alpha = Q_1 - Q_2 \quad y$$

$$S_1 R_1 = S_2 R_2$$

Reemplazando y en forma análoga al caso anterior se obtiene el valor de  $S_1$   $S_1$   $S_1 = S_2$   $R_2$  no es en este caso una premisa sino que surge del análisis de la figura.

B) curvas circulares secantes.

(cuando la distancia entre los centros es grande en relación a la suma de los radios, la condición  $S \ll R$  no se cumple, conviene entonces resolverlo en forma clásica o utilizando la fórmula preliminar).

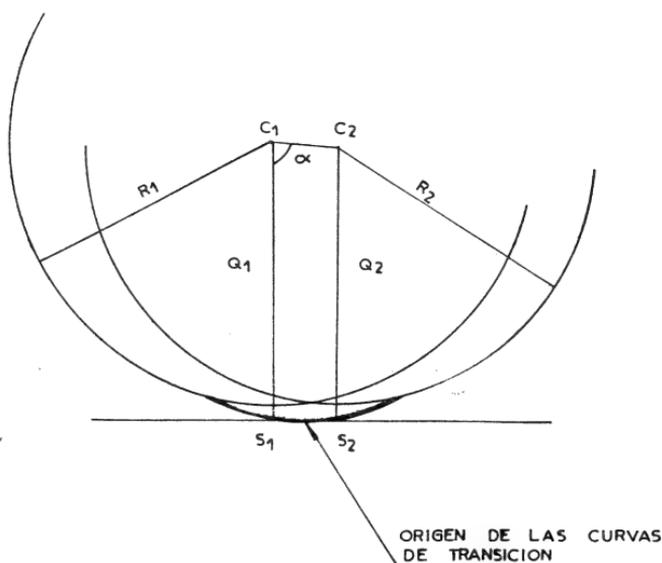
$$c \operatorname{sen} \alpha = \frac{S_2 + S_1}{2} \quad C \cos \alpha \alpha = Q_1 - Q_2 \text{ y}$$

$$S_1 R_1 = S_2 R_2$$

$S_1 R_1 = S_2 R_2$  condición necesaria, como en primer caso, para reducir a uno el número de soluciones.

Y en forma análoga se resuelve.

Fig. 4



## FRUTOS DE *CYNARA CARDUNCULUS* L. (CARDO DE CASTILLA, COMPUESTA) — ESTUDIO DEL ACEITE CRUDO DE EXTRACCION Y DE LA HARINA RESIDUAL\*\*

Por S.N. Fusero\*\*, M.H. Bertoni, E.G. Gros y P. Cattaneo

Departamento de Química Orgánica (Orientaciones Bromatología y Tecnología de Alimentos y Química Orgánica). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Pabellón 2, Ciudad Universitaria. (1428) Buenos Aires.

### RESUMEN

Frutos de *Cynara cardunculus* L. cosechados en dos localidades diferentes de la provincia de Buenos Aires, se agotaron por hexano y los aceites crudos obtenidos (índ. yodo 128,0-129,6) se estudiaron determinando sus composiciones ácidas (CGL) con los siguientes valores: 16:0 (14,7-13,1), 18:0 (1,7-2,5), 18:1 (16,9-17,9), 18:2 (66,7-66,5), trazas de 12:0 y 14:0, verificando ausencia de 18:3. Un análisis más detallado evidenció la presencia de otros componentes ácidos menores como 15:0, 17:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0, 15:1, 17:1 y 20:1. Se informan valores de contenidos en tocoferoles, esteroides y fósforo lipídico. Campesterol, stigmasterol, sitosterol, chondrillastenol (24-etil- $\Delta^7$ -colesteno-3 $\beta$ -ol) y 7,24(28)-stigmastadienol fueron los esteroides presentes, los dos últimos identificados por CGL-EM.

Se presentan valores de composición de las harinas residuales de extracción.

### SUMMARY

Fruits from *Cynara cardunculus* L. harvested in two different localities of Buenos Aires province were defatted (hexane) and the crude oils (I. N° 128, 0-129,6) examined. GLC of total fatty acid methyl esters showed the following acidic composition values: 16:0 (14,7-13,1), 18:0 (1,7-2,5), 18:1 (16,9-17,9), 18:2 (66,7-66,5), traces of 12:0 and 14:0 and absence of 18:3. Consequently is a typical 'non yellowing drying oil'. A more detailed analysis showed the presence of other minor fatty acid components like 15:0, 17:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0, 15:1, 17:1 and 20:1. Values for tocopherol, sterol and lipidic phosphorus contents are given. Campesterol, stigmasterol, sitosterol, chondrillastenol (24-ethyl- $\Delta^7$ /cholesten-3 $\beta$ -ol) and 7,24(28)-stigmastadienol were the sterols present being the two last ones identified by GLC-MS. Defatted meals composition values are presented.

\* Este trabajo fue posibilitado en parte mediante un subsidio de la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología (SECYT).

\*\* Parte del Trabajo de Tesis Doctoral presentado por S.N. Fusero<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto, 1982.

## INTRODUCCION

El "Cardo de Castilla" (*Cynara cardunculus* L.) es una especie de las Compuestas de origen europeo (tal vez de España) que como maleza tiene una gran difusión en América del Sur, especialmente en nuestro país. Fue citada por Columnella<sup>2</sup> (en la primera mitad del primer siglo de nuestra era), quien señaló su uso como coagulante de la leche. Parece lógico suponer que integró la flora americana precolombina, desde que no sería razonable admitir que los conquistadores españoles hayan introducido el grano de una planta salvaje, pese a su uso como coagulante de la leche<sup>3</sup>. Además de los esfuerzos y estudios tendientes a su exterminio, la literatura provee informaciones respecto de su uso. Lavallo<sup>3</sup>, Christen Virasoro<sup>4</sup> y más recientemente Barbosa et al<sup>5</sup> se ocuparon de recopilar la información bibliográfica referente al fermento propio de sus flores responsable del uso como coagulante de la leche. Por otra parte, sus frutos son fuente de aceite seminal apto para la alimentación y las harinas de extracción (hexano) residuales de la obtención de estos últimos merecen ser estudiadas en sus valores de composición, tema que no registra antecedentes en la literatura consultada.

## DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

Se examinaron las composiciones de los aceites crudos de extracción y de las harinas de extracción residuales de frutos maduros de Cardo de Castilla. Los capítulos secos cosechados en dos localidades de la provincia de Buenos Aires: Unión Ferroviaria (Barrio "El Trébol") y Encina se resolvieron manualmente en sus principales partes constitutivas registrando los valores de peso/capítulo, del fruto sano y vano separado, de la estructura voladora, del soporte de los achenios y del resto del capítulo constituida por la estructura espinosa externa y el pedúnculo. Esos valores se tabularon para 20 capítulos y de su análisis surgieron dos constituyentes dignos de señalarse con vistas a probable aprovechamiento: el fruto sano y la estructura voladora (vulgarmente conocida como "panadero"). El primero por su contenido en aceite y como productor de harina residual de extracción y el segundo por su fina estructura celulósica, seguramente propenso al ataque por diversos reactivos en la obtención de derivados de uso industrial (tema a desarrollar). Los porcentajes de fruto por capítulo oscilaron entre 20 y 44 con mayor concentración de valores entre 24 y 33; los de "panadero" fluctuaron entre 18 y 52 con preponderancia entre 20 y 30%. Operando sobre fruto sano de ambas partidas se observaron los siguientes valores de algunas características (para partidas de Encina y de "El Trébol", respectivamente): peso/HI (50-60 kg), peso medio fruto (31-39 mg), relación cáscara/semilla o pepa (48/52 y 47/53), humedad % (8.50-9.55), aceite crudo (hexano)% fruto seco (17.50-22.42) y aceite crudo (hexano)% semilla seca (33.80-42.60). El rendimiento en aceite crudo del fruto cosechado en Encina fué sensiblemente menor. Las cifras observadas para fruto cosechado en "El Trébol" fueron coincidentes con las anteriormente referidas por Fernández et al<sup>6</sup> para fruto de Argentina y de España (20.5 y 21.3% de aceite crudo sobre fruto tal cual), ligeramente inferior al señalado por Eckey<sup>7</sup> (25.2%, en base seca), y al consignado por Earle et al<sup>8, 9</sup> (42.2-43.0%, sobre semilla seca).

**Aceite crudo de extracción** — Características físico-químicas. Los aceites extraídos por hexano (ver Parte Experimental) presentaron los siguientes valores para algunas características físico-químicas y contenidos en componentes menores ("El Trébol" y "Encina", respectivamente): densidad relativa (25/4°, picnómetro) 0,9163-0,9193; índice de refracción (25°, AOAC) 1,4732-1,4732; índice de saponificación (AOAC) 193, 1-193,2; índice de yodo (Wijs) 128,0-129,6; índice de acidez (mg KOH/g, IUPAC) 2,1-33,8; insaponificable % (AOCS, éter etílico) 2,04-2,50; índice de yodo del insaponificable (Rosenmund) 128,2-93,7; ácidos grasos totales% (por saponificación) 89,24-95,07; tocoferoles totales<sup>10</sup> (como  $\alpha$ -tocoferol) 43,2-36,6 mg% g; esteroides totales<sup>11</sup> (digitonina, como sitosterol) 560-746 mg% g y fósforo lipídico<sup>12, 13</sup> (como P) 16,2-16,2 mg% g.

Los valores para índice de yodo fueron superiores al señalado por Earle et al<sup>8</sup> (125,0) e inferiores al citado por Eckstein<sup>14</sup> (133,3). Los contenidos en insaponificable fueron sensiblemente mayores que el indicado por Eckstein<sup>14</sup> (0,5%) y al encontrado por Fernández et al<sup>6</sup> (1,00%), diferencias debidas al método y solvente (éter de petróleo) usados por éstos.

El valor de 33,8 para el índice de acidez del aceite de frutos cosechados en Encina en el mes de febrero (cosecha tardía) se atribuye a contaminación fúngica de los capítulos con hidrólisis de los glicéridos catalizada por lipasas de hongos. Los valores consignados en este trabajo para fósforo lipídico, tocoferoles y esteroides totales no registran antecedentes en la bibliografía. Como comentario al respecto se señala que el contenido en fosfolípidos totales (mg P lipídico %g x 25<sup>15</sup>) de estos aceites sería aproximadamente de 400 mg%g, que los de tocoferoles no son elevados y sensiblemente inferiores a los de aceites de girasol (66-100 mg%g)<sup>16</sup>. Al igual que estos últimos el aceite crudo de Cardo de Castilla acusa reacción negativa de Bellier (aceites de semilla), confirmando lo observado anteriormente por Fernández et al<sup>6</sup>.

**Composiciones acídica** — Previa verificación de ausencia de dienos y trienos conjugados preexistentes y operando por CGL sobre ésteres metílicos de ácidos totales se lograron los siguientes valores de composición acídica (% de ácidos totales, para los aceites de frutos de "El Trébol" y "Encina", respectivamente: 16:0 (13,1-14,7); 18:0 (2,5-1,7); 18:1 (17,9-16,9) 18:2 (66,5-66,7) y rastros de 12:0 y 14:0.

Estas composiciones presentan a 16:0, 18:1 y 18:2 como componentes "mayores", siendo prácticamente similares. En el caso del aceite de fruto procedente de Encina (elevado valor de acidez libre (33,8 mg KOH/g) se sospechó contaminación fúngica del fruto y actividad de lipasas de ese origen. Se procedió a separar los ácidos grasos libres que se examinaron por CGL de sus esteres metílicos, observando los siguientes valores (% de ácidos grasos libres totales): 16:0 (18,6); 18:0 (1,5); 18:1 (16,5) y 18:2 (63,4), cifras sensiblemente mayores en 16:0 y menores en 18:2 respecto de las de los ácidos totales del aceite. Ello sería indicativo de acción de lipasas microbianas, especialmente fúngicas, como lo indican Kavanagh et al<sup>17</sup> en el sentido que liberarían preferentemente los grupos acilo de las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos. A resultados similares arribó Vaamonde<sup>18</sup> examinando las composiciones acídicas de ácidos totales de aceites de maní de dos variedades y las de los ácidos libres de los aceites procedentes de esas semillas previamente contaminadas con esporas de *Aspergillus parasiticus* (luego de humectación e incubación por siete días a 25°). Esos resultados concuerdan con lo indicado por Carpenter et al<sup>19</sup>, quienes señalaron que en aceites carentes (o prácticamente carentes) de 18:3, 18:2 ocupa preferentemente la posición 2 en la molécula de glicerina de los triglicéridos. De ahí la disminución de 18:2 y el aumento de 16:0 en los ácidos libres.

La Tabla 1 resume los pocos valores de la literatura sobre composiciones acídicas de aceites de frutos de Cardo de Castilla, varios de ellos analizados antes del advenimiento de la CGL. Las cifras de composición de esta Tabla difieren sensiblemente de las encontradas en este trabajo a excepción de las halladas para 18:2 en tres de los en ella tabulados (61-65%). Por tal motivo se decidió realizar un examen de composición más exhaustivo (destilación fraccionada en vacío de ésteres metílicos de ácidos totales y examen CGL de las fracciones y residuo de destilación (ver Parte Experimental), obteniendo las siguientes cifras (% de ácidos totales): 14:0 (0,13), 15:0 (0,01), 16:0 (13,13), 17:0 (vest.), 18:0 (1,80) 20:0 (0,23), 21:0 (0,16), 22:0 (0,19), 23:0 (0,04), 24:0 (0,22), 15:1 (vest.), 17:1 (vest.), 18:1 (16,84), 18:2 (67,13) y 20:1 (0,12), para el aceite de frutos de Encina. Estas cifras son suficientemente acordes para los componentes ácidos comunes con los observados por CGL de esteres metílicos de ácidos totales respectivos.

TABLA 1: Aceites "crudos" de frutos de *Cynara cardunculus* L. Valores de composición ácida, registrados en la literatura.

Procedencia	Argentina (14)*	? ** (8)	Argentina (6)	España (6)	Egipto (22)
14:0	↑	↑	0,7	1,2	0,2
16:0	↓	↑	10,0	8,7	17,3
18:0	9,7	18,9	1,7	1,8	0,8
20:0	↓	↓	0,9	0,9	—
14:1	—	—	0,1	1,0	—
16:1	—	—	0,7	2,7	—
18:1	24,2	18,9	21,5	27,2	35,1
18:2	64,6	60,7	62,1	53,6	46,6
20:1	—	—	2,3	2,9	—
Métodos	?	CGL	Destilación de ésteres metílicos ácidos "sólidos" y "líquidos"		CGL

\* — Además 18:3 (1,5).

\*\* — Además 18:3 (0,6) y 18:2 conj. (0,9)

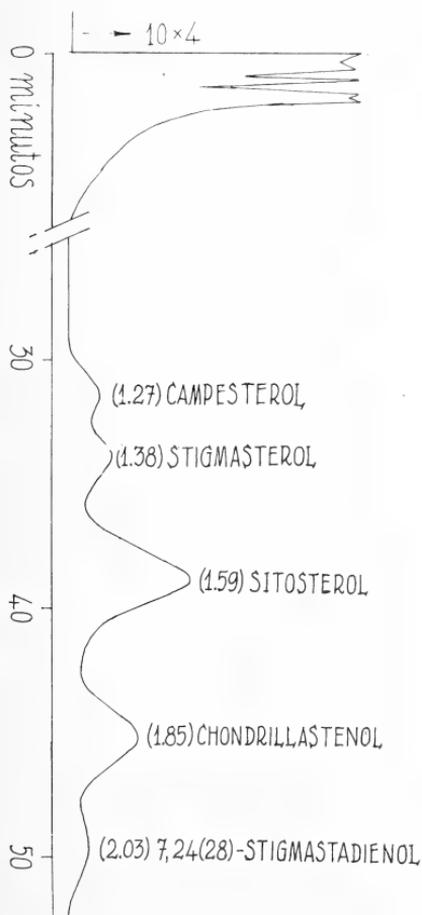
Se concluye que la semilla de *Cynara cardunculus* L. es fuente significativa para la obtención de aceites alimenticios carentes de 18:3, de elevados tenores en ácido linoleico (18:2) y bajos en saturados totales (principalmente 16:0), características propias de los aceites del tipo "non yellowing drying oils", como los de girasol, pepita de uva, semilla de amapolas, semilla de cártamo, etc., a la vez no propensos a desarrollar fenómenos de "flavor reversión".

**Composición de la fracción de esteroides** — Desde que la literatura tampoco señala antecedentes sobre este tema y partiendo de los insaponificables de ambos aceites, se aislaron las fracciones de esteroides totales según Fedeli et al<sup>19</sup>, que se examinaron por CGL. Por computación de áreas se encontraron las siguientes composiciones (esteroides % de esteroides totales), para los aceites de frutos de "El Trébol" y "Encina", respectivamente:

Campesterol (9,5-12,7), stigmasterol (13,8-13,7), sitosterol (49,4-68,2), chondrillastenol (21,1-5,4) y 7,24(28)-stigmastadienol (6,2-vest).

La Fig.1 reproduce el cromatograma de los esteroides del aceite de frutos cosechados en "El Trébol". En la misma figuran (entre paréntesis) los valores de tiempo de retención ( $T_R$ ) respecto de colesterol. Campesterol, Stigmasterol y Sitosterol se identificaron en base a esos valores. Los dos últimos (emergentes luego del Sitosterol) lo fueron por examen CGL-EM (cromatografía gas-líquido-espectrometría de masa) (ver Parte Experimental)<sup>20,21</sup>

El primero de ellos presenta un espectro con iones ( $m/e$ ; %) 414( $M^+$ ) indicativo de un compuesto en  $C_{29}$  con un doble enlace; 399 ( $M-15$ ), 396 ( $M-18$ ) que indica presencia de HO libre, 381 ( $M-18-15$ ), 273 ( $M$ -cadena lateral  $C_{10} H_{21}$ ) que indica presencia de un grupo etilo en la cadena lateral que es saturada, 255 ( $M-18$ -cadena lateral), 231 ( $M$ -cadena lateral-42), 229 ( $M$ -cadena lateral-27-18). La ausencia de iones a 329, 303 y 275 indica que el doble enlace está en  $\Delta^7$  y no en  $\Delta^5$ . Del análisis de lo expuesto surge la estructura 24-etil- $\Delta^7$ -colest-3 $\beta$ -ol o **Chondrillastenol**. El último pico emergente en el cromatograma de la Fig. 1 presenta un espectro de masa con iones ( $m/e$ ; %) 412 ( $M^+$ ) indicativo de un compuesto en  $C_{29}$  con dos dobles enlaces, 397 ( $M-15$ ), 394 ( $M-18$ ), 314 ( $M-C_{23-27-1H}$ ) que señala ruptura entre  $C_{22}$  y  $C_{23}$  alílica al doble enlace, característica de los  $\Delta^{24}$  (28) esteroides; 273 ( $M$ -cadena lateral- $C_{10}$ - $C_{19}$ ) indicativo de un doble enlace en la cadena lateral, 255 ( $M-18$ -cadena lateral), 231 ( $M$ -cadena lateral-42), 229 ( $M$ -cadena lateral-27-18), 213 ( $M$ -cadena lateral-18-42). La ausencia de iones a 329, 303 y 275 indica doble enlace en  $\Delta^7$ , por lo que se propone la estructura que corresponde al 24-etiliden-7-colest-3 $\beta$ -ol [7,24 (28)-stigmastadienol].



**Fig. 1:** Cromatografía gas-líquido de la fracción de esteroides del aceite crudo del fruto de *Cynara Cardunculus L.* ("El Trebol", Prov. de Buenos Aires).

**Harinas residuales de extracción – Composición general** – Los frutos agotados por hexano se desolvietizaron obteniendo así las harinas residuales de extracción, que se analizaron con los siguientes valores (% en base seca, para los frutos de “El Trébol” y “Encina”, respectivamente):

**Cenizas** (500-550°) 5,19-6,64; **Fibra cruda** (AOAC official Method 21038, 1965) 22,88-31, 51; **Nitrógeno total** (macro Kjeldahl, AOAC official Method 2,24, 1950) 3,98-4,56 equivalentes a 24,90 y 28,50% de **proteína “cruda”**; azúcares reductores (en glucosa, AOAC Official Method 22.043, 1965 y 29.038, 1965) 0,2 y < de 0,20%; **Azúcares invertibles** (en sacarosa, AOAC Official Method 29.026, 1965) 1,59- 1,83; **Hidratos de Carbono sacarificables** (en almidón, HCl d:1, 125) 11,53-11,09 %; **Lípidos remanentes** (ver Parte Experimental) 8,01% y no determinado.

Además se registraron contenidos en calcio (AOAC Official Method 13.014, 13.013, 1965) de 362-575 mg % g, como Ca; de **fósforo total**<sup>12,13</sup> 910-824 mg % g, como P; de **fósforo de ácido fítico**<sup>23</sup> 228-221 mg % g, como P; de **lisina disponible**<sup>24,25</sup> **4,20-4,08 (g/16 g N)**. Se obtuvo un valor de **0,52%** para ácido clorogénico<sup>26</sup> para harina de fruto cosechado en Encina. La **actividad ureásica** (AOCS, Tentative Method Ba 9-58, 1963) fue nula no habiéndose podido determinar actividad anticátrica (sustrato sintético BAPA) por interferencia de color (presencia de ácidos clorogénicos).

Los valores para **humedad** de estas harinas fueron 7,67 y 8,90% respectivamente. Operando sobre las soluciones usadas para las evaluaciones de hidratos de carbono, previamente purificadas en columnas de resinas de intercambio iónico: Amberlite IR 120 (catiónica, acidez fuerte) y Amberlite IRA 410 (aniónica, basicidad media) previamente activadas, debidamente concentradas (Rotavapor vacío parcial, T menor de 45°), sembradas en papel o placas de vidrio (Kieselguhr) y desarrolladas y reveladas por diversas técnicas<sup>27,29</sup>, se reconocieron glucosa, manosa y maltosa como los únicos azúcares reductores e invertibles (ausencia de sacarosa) y galactosa, glucosa, arabinosa y ribosa como azúcares integrantes de los hidratos de carbono sacarificables (ausencia de almidón).

Las relaciones Ca/P fueron 0,39 y 0,69 (excesivo tenor en fósforo total). Las cifras para fósforo de ácido fítico fueron muy similares y representaron el 25 y 27% de los de fósforo total respectivas.

**Lípidos remanentes en harinas de extracción** – El agotamiento de los frutos por hexano extrajo la mayor parte de los lípidos no polares, restando en las harinas lípidos principalmente polares extraíbles por mezclas ternarias tipo Folch (metanol, cloroformo, agua). Para el caso de la harina de frutos cosechadas en “El Trébol” se registró un valor de 8,01 g de tales lípidos (a los que llamamos “lípidos remanentes”). Este tratamiento proporcionó una nueva harina (agotada por hexano y por mezcla ternaria) que calentada a reflujo con solución etanólica de KOH al 6%<sup>30</sup>, permitió (ver Parte Experimental) el aislamiento, previa acidificación y extracción con éter de petróleo, de una mezcla de ácidos grasos e insaponificable que designamos como “lípidos retenidos”. El análisis mostró que el total de “lípidos remanentes” (8,01 g de harina seca de partida) estaba formado por 7,29 g de lípidos extraíbles por mezcla ternaria (los designamos como “lípidos polares” y 0,72 g de “lípidos retenidos”. Los “lípidos polares” se saponificaron y resolvieron en ácidos grasos e insaponificable y los primeros se analizaron (CGL de sus ésteres metílicos) obteniendo los siguientes valores de composición ácida: 14:0 (0,2); 15:0 (0,2); 16:0 (43,5); 18:0 (1,2); 18:1 (16,8); 18:2 (38,1); y vest. de 17:0 y 17:1 (índ. yodo ácidos tot., calc. 84,1).

En el insaponificable se investigó la presencia de esteroides y su composición, que % de esteroides totales, fue: **colesterol** (0,9), **campesterol** (13,3), **stigmaterol** (31,0) y **sitosterol** (54,8), no habiendo observado picos emergentes a continuación del de sitosterol (como se observó en el aceite crudo).

Los “lípidos polares” de esta harina contenían 34,7 mg de **fósforo lipídico** % g, equivalentes a 875 mg de fosfolípidos % g (factor de conversión 25<sup>15</sup>).

Desde ya que los “lípidos retenidos” no son preexistentes, dado que en su aislamiento

medió un proceso drástico de saponificación. Se los resolvió en insaponificable y ácidos grasos. El primero no reveló presencia de esteroides y los segundos se analizaron en su composición ácida (CGL de ésteres metílicos), observando los siguientes valores:

12:0 (1,6) 12:1+13:0? (0,3); 13:0 (0,1); r-14:0 (0,2); 14:0 (1,9); r-15:0? (0,1); 15:0 (0,9); r-16:0 + 15:1? (0,2); 16:0 (25,5); 16:1 (2,1); 17:0 (0,5); 17:1 (0,2); 18:0 (2,3); 18:1 (15,7); 18:2 (37,0); 18:3 (vest.); 20:0 + 20:1 (0,5); 21:0 (8,8) y 23:0 (21, % de ácidos totales) (Ind. de yodo de ácidos tot., calc. 83,9).

Se destaca el significativo número de componentes ácidos de los "lípidos retenidos" y las notables diferencias en las composiciones ácidas del aceite crudo, "lípidos polares" y "lípidos retenidos".

Farag et al<sup>22</sup> realizaron en Egipto un estudio de cruzamiento interespecífico entre *Cardo* de Castilla como progenitor masculino y alcachofa (*Cynara scolymus* L.) como progenitor femenino obteniendo 23 clones diferentes. Algunos de los híbridos tenían un rendimiento en semilla significativamente más alto conteniendo más lípidos, proteínas y carbohidratos que las especies progenitoras.

### PARTE EXPERIMENTAL

- Materia prima** — Capítulos maduros de *Cynara cardunculus* L. cosechados en los meses de enero-febrero (Encina, prov. de Bs.As., 1979) y de enero (Unión Ferroviaria, Barrio "El Trébol", prov. de Bs. As., 1980). En la Discusión se expusieron las determinaciones practicadas sobre capítulos y frutos.
- Aceites crudos** — Se obtuvieron por molienda y agotamiento con hexano técnico de los frutos. De los extractos se recuperó el solvente por destilación (Rotavapor, vacío parcial) y los aceites crudos se llevaron a peso constante en estufa de vacío (100°, 5 Torr.), calculando los valores de rendimiento y efectuando las determinaciones analíticas expuestas en la Discusión.
- Composiciones ácidas** — Con las técnicas ya mencionadas y operando sobre los lípidos resultantes de las determinaciones de índice de saponificación se aisló el insaponificable y recuperó los ácidos grasos totales que se transformaron en ésteres metílicos por reflujo con CH<sub>3</sub>OH anhidro conteniendo 1,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador<sup>31</sup>. Las composiciones ácidas se determinaron por CGL empleando columna de vidrio (3m x 4,5 mm de diámetro interno) con relleno de Chromosorb W lavado ácido (60-80) conteniendo 15% de adipato de etilenglicol polímero como fase fija, N como fase móvil, detector de ionización de llama, temperatura de horno y detector 194° y con inyecciones de 2 a 7 μl de soluciones de ésteres al 5% en éter etílico. Las identificaciones se lograron a través de valores de T<sub>R</sub> y por triangulación y evaluación de áreas las composiciones ácidas.
- Composición ácida exhaustiva** — 17,06 g de ésteres metílicos de ácidos totales libres de insaponificable (aceite de frutos de Encina) se fraccionaron por destilación en un equipo según Longenecker<sup>32</sup> (0,5-1,0 Torr.) obteniendo 7 fracciones y un residuo de destilación, registrando sus pesos y composiciones ácidas (CGL) con el siguiente detalle (ácidos % de ácidos totales en cada fracción y residuo):

Fracción 1 (0,28 g): 14:0 (3,3), 15:0 (0,2), 16:0 (83,6),  
17:0 (vest.), 15:1 (vest.), 17:1 (vest.),  
18:1 (2,6) y 18:2 (10,3).

Fracción 2 (1,13 g): 14:0 (0,4), 15:0 (0,1), 16:0 (57,6),  
17:0 (vest.), 18:0 (0,2), 15:1 (vest.),  
17:1 (vest.), 18:1 (8,3) y 18:2 (33,4)

Fracción 3 (1,09 g): 14:0 (0,3), 15:0 (vest.), 16:0 (40,2),

	<b>17:0</b> (vest.), <b>18:0</b> (0,4), <b>15:1</b> (vest.)
	<b>17:1</b> (vest.), <b>18:1</b> (12,1) y <b>18:2</b> (46,7).
<b>Fracción 4</b> (2,27 g):	<b>14:0</b> (0,2), <b>16:0</b> (22,0), <b>17:0</b> (vest.), <b>18:0</b> (1,0), <b>17:1</b> (vest.), <b>18:1</b> (15,7) y <b>18:2</b> (61,1)
<b>Fracción 5</b> (2,49 g):	<b>16:0</b> (11,0), <b>17:0</b> (vest.), <b>18:0</b> (1,6), <b>18:1</b> (19,0) y <b>18:2</b> (68,4).
<b>Fracción 6</b> (7,27 g):	<b>16:0</b> (1,7), <b>18:0</b> (1,7), <b>18:1</b> (16,8) y <b>18:2</b> (79,8).
<b>Fracción 7</b> (1,29 g):	<b>16:0</b> (0,8), <b>18:0</b> (4,8), <b>21:0</b> (2,0), <b>18:1</b> (24,8), <b>18:2</b> (66,9) y <b>21:1</b> (0,7)
<b>Residuo</b> (1,24 g):	<b>16:0</b> (0,8), <b>18:0</b> (4,3), <b>20:0</b> (3,1), <b>21:0</b> (0,1), <b>22:0</b> (2,6), <b>23:0</b> (0,5), <b>24:0</b> (3,1), <b>18:1</b> (21,4), <b>18:2</b> (63,1) y <b>20:1</b> (1,0)

Con estos valores se calculó la composición de los ácidos totales expuesta en la Discusión.

5. **Composición de la fracción de esteroides** — Los insaponificables de ambos aceites se fraccionaron en capa delgada de sílicagel G según Fedeli et al<sup>19</sup> y los esteroides se resolvieron por CGL en columna de vidrio (1,80 m x 3,0 mm de diámetro interno) con relleno de Chromosob G-HP (silanizado, 80-100), conteniendo 2% de OV-17 como fase fija, N como fase móvil, detector de ionización se llama, temperatura de horno 260°, de inyector y detector 315° y con inyecciones de 10 µl de solución de esteroides al 5% en éter isopropílico. La presión de entrada del nitrógeno se reguló para lograr máxima resolución del par crítico campesterol-stigmasterol. La identificación de los dos picos emergentes a continuación del de sitosterol (ver Fig. 1) se llevó a cabo por CGL-EM usando un cromatógrafo Varian 1440 acoplado a un espectrómetro de masa Varian MAT CH7-A comandado por computadora. Condiciones de cromatografía: columna de vidrio (2 m x 2 mm de diámetro interno) con relleno de OV-17 al 3% en Chromosorb W-AW DMCS (60-80), temperatura de inyector 260°, de horno con programación de 220 hasta 280° (2°/min), He como fase móvil (19 ml/min.) y separador de He Watson-Biemann de dos etapas a 300°. Condiciones de espectroscopía de masa: fuentes de iones (temperatura 200°, potencial 70 eV, emisión 1 mA), detector de corriente iónica (temperatura 200°, potencial 22 eV, emisión 600 µA) y velocidad de barrido 19 espectros/min. En la Discusión figuran en detalle los iones de los espectros, de cuya interpretación surgió el reconocimiento de esos dos esteroides cuyos valores de Tr/colesteroleson 1,85 y 2,03.

## 6. Harinas de extracción.

a) **Valores de composición general** — Han sido expuestos y comentados en la Discusión con la mención de los métodos analíticos usados. Un detalle mayor puede verse en el Trabajo de Tesis de Fusero.<sup>1</sup>

b) **Lípidos remanentes** (“polares” y “retenidos”)<sup>30-33-34-35</sup>. 100,4 g de harina agotada por hexano (de frutos cosechados en “El Trébol”) se suspendieron en 1 l. de mezcla ternaria Cl<sub>3</sub>CH:CH<sub>2</sub>OH:H<sub>2</sub>O (10:20:7,6 v/v), agitó periódicamente y centrifugó (20 min., 2.800 rpm) a las 24 horas. El insoluble se suspendió en 100 ml de mezcla ternaria, centrifugó y volvió a tratar con otro litro de dicha mezcla en la forma expuesta. Los líquidos reunidos se adicionaron de 450 ml de solución acuosa de KCl al 0,88%, separándose la capa clorofórmica inferior y recuperando el solvente por destilación (Rotavapor, vacío parcial). El residuo (producto sólido en frío, de tono pardo) se llevó a peso

constante (vacío, 100°: 6,73 g) y homogeneizó en mortero ("lípidos polares"). 2,3630 g del mismo se saponificaron con 30 ml de solución etanólica de KOH al 4% (reflujo, 2 horas), diluyó con 60 ml de agua y extrajo el material insaponificable con éter etílico obteniendo 0,0829 g (3,51% sobre lípidos de partida) del que se aislaron los esteroides totales<sup>19</sup> que se examinaron por CGL. Se recuperaron los ácidos grasos totales (0,2691g; 11,30% sobre lípidos de partida) determinando su composición acídica (CGL de ésteres metílicos). En la Discusión figuran los valores hallados.

10 g de la harina agotada por hexano y por mezcla ternaria (5,86% de humedad) se hirieron a reflujo por una hora con 100 ml de solución etanólica de KOH al 6% . Se enfrió, acidificó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1 v/v; placa de toque, heliantina) y centrifugó (20 min., 2.800 rpm). El insoluble se suspendió dos veces en 30 ml de etanol por vez, centrifugando y reuniendo los líquidos alcohólicos, que se extrajeron en ampolla con hexano técnico (3 extracciones con 100, 60 y 60 ml). Los extractos reunidos se lavaron con agua (tornasol), recuperó el solvente (Rotavapor) y llevó a peso constante (vacío, 100°) obteniendo 69,4 mg de "lípidos retenidos" (0,72% sobre harina de partida), que se disolvieron en 30 ml de mezcla etanol: agua (2:1 v/v) alcalinizando con solución de KOH al 6% en etanol (fenolftaleína) y extrayendo el insaponificable con éter etílico (27,1 mg, 39,0% sobre lípidos retenidos). Se recuperaron los ácidos grasos totales (61,0% sobre lípidos retenidos) y se examinaron por CGL en su composición acídica, con los resultados ya expuestos en la Discusión. El insaponificable no contenía esteroides.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Eduardo Braida y Sra. y al Ing. Agr. Roberto Guieshem la recolección de capítulos de *Cynara cardunculus* L. en la localidad de Encina (Prov. de Buenos Aires) y al Ing. José Vives su intervención a esos fines.

Asimismo a los Sres, C. Arabehety y J. Aznarez (Laboratorio de espectroscopía) y a la Dra. B. B. de Deferrari y Lic. M. Marcote (Laboratorio de Microanálisis) por la colaboración prestada.

## BIBLIOGRAFIA

1. S.N. Fusero, Tesis, Fac. Cienc. Exactas, Físico-Químicas y Nat., Univ. Nac. de Río Cuarto (Córdoba) "Estudios sobre malezas del suelo argentino - Frutos de *Cynara cardunculus* L. (Cardo de Castilla) y de *Carduus thoeirmei* Weinm, *Carduus nutans* Auct., Compuestas (Cardo pendiente, Cardo del caballo, Cardo de caballo)", 1982.
2. Lucius Junius Moderatus Columnella, *De re rustica*; citado en Enciclopedia Británica, vol. 6, p. 116, 1964.
3. F.P. Lavalle, *Anales Soc. Cient. Argentina*, 72, 225 (1911).
4. C. Christen y E. Virasoro, *Lait*, 15, 354 (1935).
5. M. Barbosa, E. Valles, L. Vassal y G. Mocquot, *Lait*, 56, 1 (1976).
6. J.C. Fernández, P. Cattáneo, G. Karman e I.J. Rodrigo, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 37, 139 (1949).
7. E.W. Eckey, "Vegetable Fats and Oils", Reinhold Publ. Corp., New York, p. 782, 1954.
8. F. R. Earle, C.A. Glass, G.C. Geisinger, I.A. Wolff y Q. Jones, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 37, 440 (1960)
9. F.R. Earle, I.A. Wolff y Q. Jones, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 37, 254 (1960).
10. M.H. Bertoni y P. Cattaneo, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 47, 52 (1959).
11. V.C. Mehlenbacher, "The Analysis of Fats and Oils", The Garrard Press Publ., Champaign, Illinois, p. 592, 1960.
12. G.R. Bartlett, *J. Biol. Chem.*, 234, 466 (1959).
13. M.S. Vigo, Tesis, Fac. Cienc. Exactas y Nat., Univ. de Buenos Aires, 1972.
14. G. Eckstein, *Ind. y Quím.*, 3, 81 (1940).
15. W.W. Marion, S.T. Maxon y R.M. Wangen, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47, 391 (1970).
16. G.K. de Sutton, M.H. Bertoni, J.C. Gómez Artero y P. Cattaneo, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 54, 101 (1966).
17. T.E. Kavanagh, G.A. Reineccius, P.G. Keeney y W. Weissberger, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47, 344 (1970).
18. G. Vaamonde, Tesis, Fac. Cienc. Exactas y Nat., Univ. de Buenos Aires, 1978.
19. E. Fedeli, A. Lanzani, P. Capella y G. Jacini, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43, 254 (1966).
20. B.A. Knights, *J. Gas Chrom.*, 5, 273 (1967).
21. H. Budzikiewicz, C. Dierassi y D.H. Williams, "Structural Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry". Holden-Day, vol. 2, San Francisco (1964).
22. Farag, A.H.A. Khoreba y A.A.M. Hamama, *Grasas y Aceites*, 31, 255 (1980).
23. A.O. Rucci, M.H. Bertoni, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 62, 365 (1974)
24. E. Conkerton y V. Frampton, *Archives of Biochem. and Biophys.*, 81, 130 Conkerton (1959)
25. S.C. Revuelto, Tesis, Fac. Cienc. Exactas y Nat., Univ. de Buenos Aires, 1976.
26. INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial) Técnica desarrollada en base a un artículo de J.V. Pomenta, *J. Food Sci.*, 36, 490 (1971).
27. R.L. Whister y M.L. Wolfrom, "Methods in Carbohydrates Chemistry", Academic Press, New York-London, vol. II, p. 27 (1962).
28. E. Sthal, "Thin Layer Chromatography", Ed. Springer Verlag, Berlin, p. 707 (1969).
29. L. Hough, J.K. Jones y W.W. Wadman, *J. Chem. Soc.*, 1702 (1950).
30. W. Szutowicz, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 254 (1965).
31. T.P. Hilditch y P.N. Williams. "The Chemical Constitution of Natural Fats", Champan & Hall, 4° Ed., London, p. 86, 1964.
32. H.E. Longenecker, *J. Soc. Chem. Ind.*, 56, 199T (1939).
32. J.M. Lyons y L.F. Lippert, *Lipids*, 1, 136 (1966).
34. E.N. Zerba, Tesis, Fac. Cienc. Exactas y Nat., Univ. de Buenos Aires, 1974.
35. G.O. Zaragoza, Tesis, Fac. Cienc. Exactas y Nat., Univ. de Buenos Aires, 1978.

## EFFECTOS DE SOLVENTE EN LA SUSTITUCION NUCLEOFILICA AROMATICA. Parte 2 REACCION DE 2,4-DINITROCLOROBENCENO CON PIPERIDINA EN METANOL Y EN CICLOHEXANO, CURIOSO COMPORTAMIENTO EN CICLOHEXANO

Por

N.S. Nudelman\*

R.D. Martínez, P.M.E. Mancini, L.R. de Vottero\*\*

### RESUMEN

Se han estudiado cinéticamente las reacciones de 2,4-dinitroclorobenceno con piperidina en metanol y en ciclohexano a 15, 25 y 40°C, a varias concentraciones de piperidina en el rango 0.001-0.5 M. La reacción en metanol es extremadamente lenta, este resultado sorprendente se interpreta como debido a una solvatación importante del estado inicial (especialmente como uniones hidrógeno entre la piperidina y el metanol) no compensada en el estado de transición a causa del efecto de solvatación interna. Avala esta interpretación la energía de activación observada y el efecto ejercido sobre la velocidad de reacción por cantidades crecientes de base. En ciclohexano se observa un comportamiento curioso: la aparición de una turbidez durante el curso de la reacción, debida a la formación del clorhidrato de piperidonio. Se dan detalles para obviar esta dificultad experimental. La velocidad de reacción observada en ciclohexano se compara satisfactoriamente con determinaciones previas en otros solventes.

### ABSTRACT

The rates of reaction of 2,4-dinitrochlorobenzene with piperidine have been measured in methanol and in cyclohexane at 15, 25 and 40°C, at several piperidine concentrations in the range 0.001-0.5 M. The reaction in methanol is unusually slow, this unexpected result is interpreted as due to an important solvation of the initial state (specially in the form of hydrogen-bonds between piperidine and methanol) not compensated in the transition state because of the "built-in solvation" effect. This interpretation is supported by the observed energy of activation and the effect of increasing base concentration on the rate of reaction. A curious behaviour is observed in cyclohexane which is the appearance of a turbidity during the course of the reaction due to the formation of piperidine hydrochloride. Details are given to obviate this difficulty in the experimental determinations. The rate of reaction in cyclohexane compares fairly well with previous runs in other solvents.

### INTRODUCCION

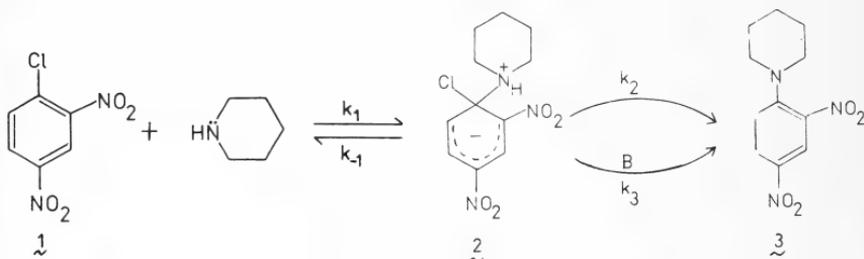
Las primeras comunicaciones de efectos de solvente sobre la sustitución nucleofílica aromática (SNA) con aminas, datan de 1955 en que se estudiaron las reacciones de o- y p-cloronitrobenzeno<sup>2</sup> y de 2,4-dinitroclorobenceno<sup>3</sup> con piperidina en distintos solventes. A pesar de los interesantes resultados bosquejados entonces, poco más se ha hecho sobre este tema hasta el presente, como puede advertirse en un review reciente.<sup>4</sup>

\*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pab. II, P. 3 - Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina.

\*\*Instituto de Investigaciones de Productos Naturales, de Análisis y de Síntesis Orgánica (IPNAYS). Sgo. del Estero 2829 - 3000 Santa Fe, Argentina

La comparación entre diversos datos de la literatura de reacciones realizadas en distintos laboratorios, indica que cuando existe un grupo nitro colocado en posición orto al centro de reacción, la velocidad de reacción es menos sensible a una variación en el solvente. Este resultado fue atribuido por Bunnett a un efecto de solvatación interna ("built-in solvation")<sup>2</sup> en el estado de transición que conduce al compuesto  $\sigma$  zwitteriónico (2) (Esquema 1). Sin embargo, el hecho de que la velocidad de reacción del 2,4-DNC $\alpha$ B con piperidina sea igual en MeOH-benceno (50:50) que en metanol puro no encontró explicación entonces<sup>3</sup> y aún no se ha dado una explicación válida para este comportamiento en ésta y otras reacciones similares.

Además del efecto del solvente sobre la velocidad de reacción total de segundo orden ( $k_A$ ), otro efecto a considerar es la influencia del medio sobre la velocidad del paso base-catalizado ( $k_3$ , esquema), tema en el cual prácticamente tampoco se ha avanzado mucho<sup>4</sup> desde una temprana publicación<sup>5</sup>.



En el presente trabajo se estudia la reacción de 2,4-dinitroclorobenceno (1) con piperidina en metanol y en ciclohexano. En ambos solventes se ha realizado la búsqueda de catálisis básica, siendo sorprendente la pequeña aceleración que tiene lugar en metanol y el curioso comportamiento de la mezcla de reacción observado en ciclohexano.

## PARTE EXPERIMENTAL

*Solventes y reactivos* — 2,4-dinitroclorobenceno: el producto comercial se purificó por recristalizaciones sucesivas en etanol,  $pf$  51-52° (agujas correspondientes a la forma  $\alpha$ ). N-(2,4-dinitrofenil)-piperidina (3); se preparó disolviendo (1) en la mínima cantidad de metanol y agregando piperidina en relación molar 1:5. Se recristalizó de metanol,  $pf$  92-93° (Lit.<sup>6</sup> 92-95.5°). Se realizaron los espectros UV y visible de 1 y 3, los  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (y los coeficientes de extinción) son respectivamente:  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 238 nm ( $\epsilon$ : 13.350) y  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 377 nm ( $\epsilon$ : 15.320) en metanol;  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 230 nm ( $\epsilon$ : 12.850) y  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 353 nm ( $\epsilon$ : 15.830) en ciclohexano. Metanol: se hizo anhidro por el método de Lund y Bjerrum<sup>7</sup> y se recogió en un recipiente especialmente diseñado para facilitar su uso sin contaminación atmosférica. Ciclohexano: el producto comercial se mantuvo varios días sobre sodio metálico y luego se destiló sobre sodio, recogándose la fracción que destiló a 81°, sobre tamices moleculares de 4Å.

*Mediciones Cinéticas* — Las determinaciones se realizaron por el método espectrofotométrico<sup>8</sup> utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer 124. En todos los casos se utilizaron condiciones de pseudo-primer orden. Las reacciones se siguieron midiendo directamente la absorbancia, a 400 nm aproximadamente, de la mezcla de reacción colocada en las cubetas termostatazadas del espectrofotómetro. La constante de velocidad de reacción de pseudo-primer orden,  $k_{\psi}$ , se calculó como la pendiente de  $\ln(A_{\infty} - A_t)$  vs.

tiempo por el método de cuadrados mínimos. La constante de velocidad de reacción de segundo orden,  $k_A$ , se calculó dividiendo  $k_d$  por la concentración de amina usada en cada caso. En todas las determinaciones se utilizó el valor de  $A_\infty$  determinado experimentalmente para cada experiencia a la temperatura respectiva. Este valor coincidió, dentro de los errores experimentales, con el valor teórico calculado por aplicación de la ley de Beer a diversas soluciones de 2,4-dinitrofenilpiperidina en el solvente de reacción. La energía de activación se determinó por cuadrados mínimos como la pendiente de  $\ln k_A$  vs.  $1/T$  multiplicada por  $R$ . La entropía de activación mediante la fórmula: (1)

$$\Delta S^\ddagger = 4.576 (\lg k_A - 10.753) - (\lg T - \Delta H^\ddagger / 4.576 \cdot T) \quad (1)$$

dada por la teoría absoluta de velocidades de reacción.<sup>9</sup> Todas las cinéticas fueron realizadas al menos por duplicado y el error en  $k_A$  es  $\leq 2-3\%$  para las reacciones en metanol, las reacciones en ciclohexano presentan una dificultad experimental que será discutida más adelante. razón por la cual el error en  $k_A$  es  $\leq 5\%$ . El error en  $\Delta H^\ddagger$  es 0.1 kcal/mol y el de  $\Delta S^\ddagger$  es 2 calmol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

*Reacciones en Metanol* — Se investigó en primer término la posible existencia de catálisis básica en la reacción de 2,4-dinitroclorobenceno (1) con piperidina en metanol. Los resultados de los valores de la constante específica de segundo orden,  $k_A$ , promedio de dos o más determinaciones cinéticas independientes se agrupan en la Tabla 1. Las reacciones se estudiaron a 15, 25 y 40°, a las tres temperaturas puede advertirse un ligero aumento en la velocidad de reacción al aumentar la concentración del nucleófilo.

Si bien la velocidad de reacción aumenta con sucesivos agregados de base, teniendo en cuenta el criterio de Bunnett y Garst<sup>10</sup> esto no puede considerarse una catálisis básica ya que la relación  $k_3/k_2$  es solo de 1.5. Con el criterio alternativo propuesto recientemente<sup>11</sup> tampoco encuadra dentro de los términos de catálisis básica, ya que se necesitan concentraciones relativamente elevadas de amina, para que la velocidad de reacción aumente un 50%.

Otra posibilidad existente en metanol es la solvólisis de la amina debida al equilibrio (2)



Esta disociación básica disminuye la concentración de piperidina disponible para reaccionar con (1), y, en consecuencia, disminuye la velocidad de reacción. Este efecto ya fue observado en la reacción de 2,4-dinitrofluorobenceno con piperidina<sup>12</sup> y en la reacción de 2,4-dinitroclorobenceno con ciclohexilamina<sup>13</sup>, ambas en metanol.

Si se tiene en cuenta la constante de disociación básica de la piperidina en metanol ( $k_B: 7.3 \times 10^{-6}$ )<sup>14</sup> puede calcularse que para la concentración más baja de amina usada, aproximadamente un 8% de la piperidina está ionizada en forma de metilato de piperidonio. Además, a bajas concentraciones de piperidina, existe contaminación por el dióxido de carbono atmosférico dado que se trata de un reactivo fuertemente básico. Sin embargo, a concentraciones de piperidina superiores, estos efectos deben ir disminuyendo, y para soluciones  $> 0.064$  M en piperidina, la proporción de amina ionizada es inferior al 1%. En consecuencia, la solvólisis de la amina podría explicar la tendencia observada para concentraciones de base  $\leq 0.04$  M, pero el efecto se mantiene aún hasta valores cercanos a 0.5 M. Un caso distinto es el de la ciclohexilamina para la cual el  $pK_B$  es de 5.89<sup>15</sup> y el efecto de la disociación solvolítica se mantiene aún para concentraciones de base cercanas a 1 M.<sup>13</sup>

Una posible explicación alternativa para esta aceleración sería un efecto de solvatación, ya que no puede considerarse un efecto de catálisis básica. A bajas concentraciones de amina, ésta estaría rodeada de moléculas de solvente en zonas cibotácticas unidas por fuertes uniones hidrógeno con el metanol. Al aumentar la concentración aumentaría la proporción de moléculas de piperidina más libres o autoasociadas consigo mismas, mediante uniones hidrógeno que, por su naturaleza, serían de menor energía que las formadas con el metanol. Existen numerosas evidencias de formación de uniones hidrógeno entre la piperidina y el metanol, y entre moléculas de piperidina para formar oligómeros<sup>16</sup>. Esta interpretación estaría de acuerdo con los resultados encontrados en reacciones llevadas a cabo en otros solventes<sup>1</sup> y cuya correlación se comentará más adelante.

*Reacciones en Ciclohexano* – Al estudiar la cinética de la reacción entre (1) y piperidina en ciclohexano como medio de reacción, resulta de interés destacar la formación de una turbidez a medida que avanza la reacción. En todas las reacciones estudiadas desde muchos años atrás con este nucleófilo en solventes apróticos (comentadas recientemente<sup>4</sup>) nunca se había observado un hecho similar, ni aún trabajando en ciclohexano<sup>17</sup>.

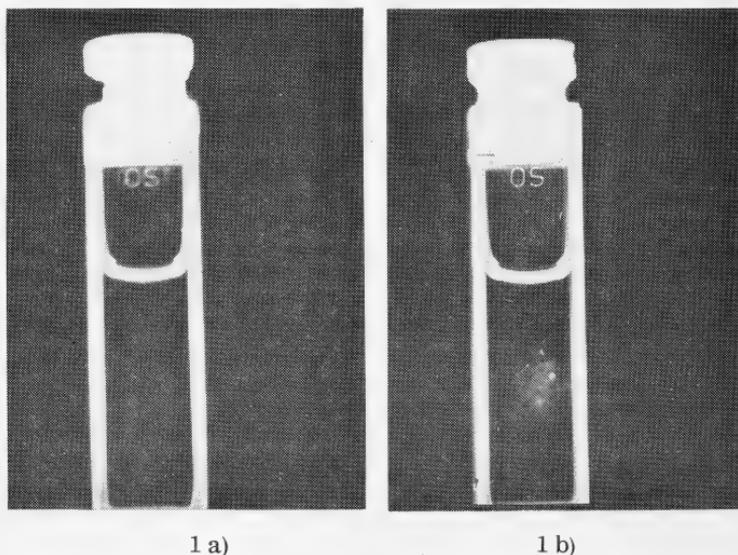


Fig. 1 – Mezclas de reacción de 2,4-dinitroclorobenceno con piperidina en ciclohexano, a) a 50% de reacción; b) a 100% de reacción.

El porcentaje de la reacción al que aparece la turbidez depende de la temperatura de trabajo. Se observa su aparición en forma difusa como lo muestra la figura 1a y luego se va concentrando hasta tomar la apariencia de la figura 1b. Dado que no se encontraron informes de nada similar observado en la literatura se trató de aislar e identificar el producto responsable de esta turbidez.

Se trabajó sobre la base de que siendo el ciclohexano un solvente de muy baja constante dieléctrica ( $D = 2 \cdot 0^{18}$ ), podría ser muy baja la solubilidad del clorhidrato de piperidonio que se va formando a medida que avanza la reacción. El ácido clorhídrico,

desplazado en la reacción rápidamente se salifica (3) en el medio que contiene exceso de piperidina.



Para aislar el sólido en cantidad suficiente y proceder a su identificación se realizó una reacción utilizando 0,5 g de (1) y 5 ml de piperidina en 100 ml de ciclohexano. El sólido se separó por filtración, obteniéndose cristales de p.f. 241-242°. Independientemente, se preparó clorhidrato de piperidina en la forma descrita para el clorhidrato de ciclohexilamina<sup>13</sup>, obteniéndose agujas blancas, cuyo pf (241-242°) coincide con el del sólido aislado de la mezcla de reacción y no deprime al ser mezclado con el mismo. (Lit. p.f. 242-242, 5°C)<sup>19</sup>.

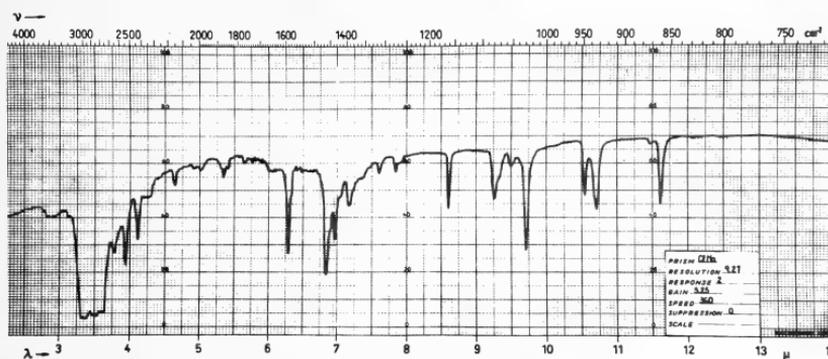


Fig. 2 Espectro infrarrojo del sólido aislado de la mezcla de reacción de 2,4-dinitroclorobenceno con piperidina en ciclohexano.

Como una confirmación adicional al sólido aislado de la mezcla de reacción se le realizó su espectro i.r., el cual se muestra en la figura 2. En el mismo puede advertirse las dos bandas típicas de la sal de amina a 1590 y 1450  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración de estiramiento N-C. La banda a 1590  $\text{cm}^{-1}$  es fundamental ya que esta señal se encuentra ausente en el espectro i.r. de la piperidina.

Si bien las determinaciones efectuadas no dejan lugar a dudas de que la turbidez observada se debe al clorhidrato de piperidonio, es llamativo que aquella no aparezca cuando se estudia la misma reacción en benceno<sup>20</sup>, un solvente de constante dieléctrica ( $D = 2.3^{18}$ ) similar a la del ciclohexano. Esto demuestra una vez más que la constante dieléctrica del solvente no es el único factor importante en determinar los efectos solvantes del mismo.<sup>1</sup>

En la figura 3 se muestra la forma aleatoria en que la aparición de la turbidez afecta el registro de la absorbancia en función del tiempo. Pudo comprobarse que la variación de los valores de absorbancia no inflúan en los valores de  $k_A$ , no así para el valor de la absorbancia a tiempo infinito,  $A_\infty$ , en cuyo caso la interferencia de la masa sólida es considerable; por lo tanto, para evitar este inconveniente, finalizada cada reacción las

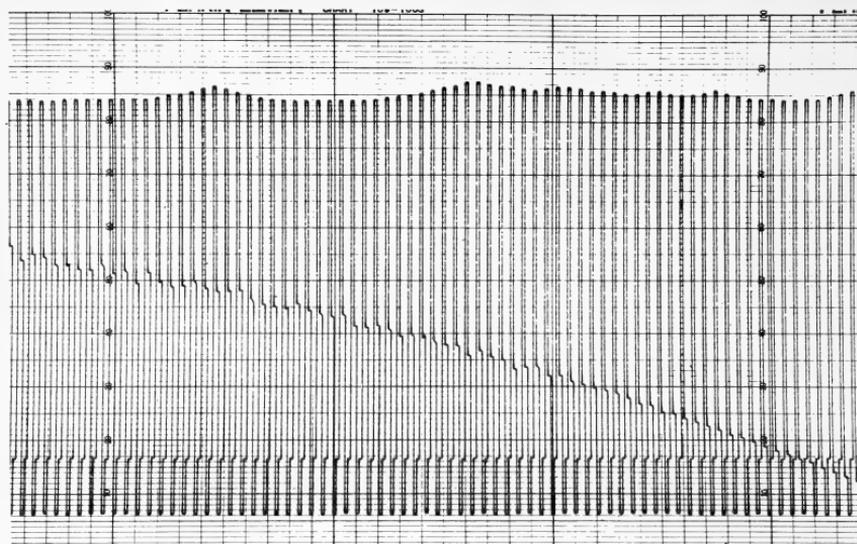


Fig. 3 - Registro de la absorbancia en función del tiempo de la mezcla de reacción de 2,4-dinitroclorobenceno con piperidina en ciclohexano a 40°C.  $[2,4\text{-dinitroclorobenceno}] = 10^{-4}$  M y  $[\text{Piperidina}] = 0.0480$  M

TABLA I  
Reacción de 2,4-Dinitroclorobenceno con piperidina en metanol  
a 15, 25 y 40°C<sup>a</sup>

[Piperidina] M	40°		25°		15°	
	$10^5 k_{\psi}$ seg <sup>-1</sup>	$10^3 k_A$ l mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>	$10^5 k_{\psi}$ seg <sup>-1</sup>	$10^3 k_A$ l mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>	$10^5 k_{\psi}$ seg <sup>-1</sup>	$10^3 k_A$ l mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>
0.0012	2.60	21.6	1.30	10,9	0.669	5.58
0.0024	5.04	21.0	2.77	11.5	1.53	6.39
0.0052	13.0	25.3	6.60	12.7	3.72	7.15
0.0090	21.1	23.4	11.5	12.8	6.58	7.31
0.0160	41.1	25.8	21.3	13.3	11.4	7.12
0.0400	97.9	24.5	49.0	12.2	29.9	7.49
0.064	166.	25.9	81.6	12.7	46.6	7.28
0.0920	255.	27.7	118.	12.8	67.9	7.38
0.1200	441.	36.8	192.	16.0	116.	9.66
0.2400	811.	33.8	407.	16.7	238.	9.92
0.3200	1127.	35.2	577.	18.0	323.	10.1
0.4800	1665.	34.7	914.	19.0	513.	10.7
$10^2 \bar{k}_A$		28.0		14.1		8.01

<sup>a</sup> $[2,4\text{-Dinitroclorobenceno}] = 10^{-4}$  M

cubetas selladas se enfriaron a 10° C favoreciendo el depósito del sólido en el fondo de la cubeta, de manera que no interfiera en la lectura de la absorbancia a tiempo infinito (lectura realizada a la temperatura de reacción).

En la Tabla 2 se consignan los resultados de experiencias a 25° realizadas hasta por cuatriplicado con el objeto de mostrar el grado de reproducibilidad de los mismos.

· TABLA 2 ·  
Reacción de 2,4-Dinitroclorobenceno con piperidina en ciclohexano a 25°C<sup>a</sup>

[Piperidina] M	10 <sup>2</sup> k <sub>A</sub> 1 mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup> k <sub>A</sub> 1 mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup> k <sub>A</sub> 1 mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup> k <sub>A</sub> 1 mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>
0.0012	3.55	3.60		
0.0024	3.54	3.54		
0.0048	3.61	3.50		
0.0070	3.57	3.71	3.62	3.64
0.0100	3.56	3.66	3.60	
0.0200	3.67	3.73	3.79	3.75
0.0400	3.89	3.79	3.84	
0.0600	4.34	4.27	4.28	4.20
0.0800	4.80	4.69	4.71	

<sup>a</sup>[2,4-Dinitroclorobenceno] = 10<sup>-4</sup> M

En la Tabla 3 se agrupan los valores promedio de experiencias realizadas a 15 y 40° y los promedios de las k<sub>A</sub> correspondientes a la Tabla 2. Los valores de los parámetros de activación en metanol y en benceno se dan en la Tabla 4 junto con los de otros solventes de la literatura.

Puede advertirse en las Tablas 2 y 3 un ligero aumento de la velocidad de reacción con el aumento de la concentración de base. Si se representan los datos de k<sub>A</sub> a 25° en función de las ocho concentraciones de amina utilizadas, se obtiene una recta de coeficiente de correlación 0.98, que permite obtener la relación k<sub>3</sub>/k<sub>2</sub> que resulta ser de 4.1.

Nuevamente, dado el pequeño valor del cociente no puede tratarse de catálisis básica. En este caso no podría aplicarse un equilibrio solvóltico del tipo (2), y la pequeña aceleración observada puede atribuirse al aumento gradual en la polaridad del solvente, provocado por sucesivos agregados de piperidina (D = 5.8<sup>18</sup> (22°C)) a un solvente de muy baja polaridad.

*Reacciones en Otros Solventes* — Un hecho singular llama la atención en estas reacciones: la baja reactividad de (1) con piperidina en metanol, cuando se la compara con la observada en otros medios de reacción (Tabla 4). Según el criterio ya comentado de sol-

TABLA 3

Reacción de 2,4-Dinitroclorobenceno con piperidina en ciclohexano a 15, 25 y 40°C<sup>a</sup>

[Piperidina] M	15°		25°		40°	
	$10^4 k_{\psi}$ seg <sup>-1</sup>	$10^2 k_A$ l mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>	$10^4 k_{\psi}$ seg <sup>-1</sup>	$10^2 k_A$ l mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>	$10^4 k_{\psi}$ seg <sup>-1</sup>	$10^2 k_A$ l mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>
0.0012			0.429	3.58		
0.0024			0.851	3.54	1.53	6.36
0.0048			1.71	3.56	3.17	6.60
0.0070			2.55	3.64		
0.0100			3.61	3.61		
0.0200	5.67	2.84	7.48	3.74	13.7	6.86
0.0300					20.9	6.97
0.0400	12.4	3.09	15.4	3.84	28.8	7.20
0.0560					41.6	7.43
0.0600	21.2	3.53	25.6	4.27		
0.0800	30.4	3.80	37.9	4.73		
$10^2 \bar{k}_A$		3,32		3.84		6.90

<sup>a</sup>[2,4-Dinitroclorobenceno] = 10<sup>-4</sup> M

TABLA 4

Reacción de 2,4-Dinitroclorobenceno con piperidina en diversos solventes a 25°. Constantes específicas de segundo orden,  $k_A$ , y parámetros de activación.

Solventes	$10^2 k_A$ l mol <sup>-1</sup> seg <sup>-1</sup>	$\Delta H^\#$ kcal mol <sup>-1</sup>	$-\Delta S^\#$ cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	Ref
Metanol	1.41	8,35	41.0	
Ciclohexano	3.84	5.80	47.6	
Benceno	7.83	5.50	43.8	20
Cloroformo	8.65	5.83	45.8	1
Clorobenceno	20.2	6.02	43.5	1
THF	29.5	5.91	43.1	1
Acetona	49.1	5.46	43.6	1
DMSO	193	5.70	40.1	1

vatación interna en compuestos o-nitro sustituidos, se esperaría una muy baja sensibilidad de la reacción a efectos de solvente. Esto fue lo observado por Bunnett y Morath<sup>3</sup> para la misma reacción en una serie de solventes mezclas. Sin embargo, en la Tabla 4 se observa un cambio de  $10^2$  entre los límites de reactividad entre metanol y DMSO, y llamativamente,

la velocidad de reacción en metanol (excelente solvatante) es aún menor que en el menos polar de los medios de reacción analizados (ciclohexano)\*. Este hecho no tiene explicación dentro del esquema clásico de efectos de solvente: en reacciones en que se pasa de un estado inicial neutro a un compuesto intermedio dipolar se esperaría un aumento en la velocidad de reacción al aumentar la constante dieléctrica del solvente<sup>22</sup>; si bien esto se observa en líneas generales en los solventes estudiados, el caso del metanol es una excepción. Su curiosamente baja reactividad puede interpretarse en términos de una alta solvatación del estado inicial, en el que se encontrarían fuertes uniones hidrógeno entre la piperidina y las moléculas de metanol. Estas uniones deberían romperse para formar el compuesto intermedio con una considerable pérdida de energía de solvatación. Esta energía no estaría compensada en el compuesto (2) que ya posee su propia solvatación interna. La alta solvatación de la piperidina bajaría la energía del estado inicial para la reacción en metanol, mientras que la del compuesto intermedio sería relativamente insensible al cambio de solvente. Esto da como resultado una mayor energía de activación para la reacción en metanol, que sería la responsable de la baja reactividad observada en este medio. Efectivamente, los parámetros de activación mostrados en la Tabla 4, ponen en evidencia la gran diferencia en la entalpía de activación para la reacción en metanol, comparada con la prácticamente similar en el resto de los solventes analizados. Esta diferencia de aproximadamente 2.60 kcal/mol sería una medida de la energía de solvatación de la piperidina en metanol y su valor es totalmente acorde con lo esperado para uniones hidrógeno<sup>23</sup>.

Comparando las reactividades del *o*- y *p*-cloronitrobenzenceno con piperidina en benceno y en etanol<sup>5</sup>, también se observa un decrecimiento en la reactividad del *o*-cloronitrobenzenceno en el solvente prótico, mientras que el *p*-cloronitrobenzenceno aumenta su *v. de r.* al pasar de benceno a etanol. La caída en la reactividad del *o*-cloronitrobenzenceno se debe, nuevamente, a un aumento en la energía de activación, lo que está de acuerdo con una desolvatación de la piperidina previa a la etapa de formación del compuesto intermedio.

Finalmente cabe comentar que si bien en el trabajo de Bunnett y Morath se habla de una insensibilidad al cambio de solvente, todos los medios de reacción estudiados por ellos (mezclas dioxano-agua y metanol-benceno) contienen solventes próticos, razón por la cual, en todos ellos existe la ya mencionada solvatación del nucleófilo y por ello no se observa un cambio marcado de reactividad.

## REFERENCIAS

- 1 Efecto del solvente en reacciones de SNA. Parte I. Aplicabilidad de la correlación de Reichardt en la reacción de 2,4-dinitroclorobenceno con piperidina. Acta Sudamericana de Química (Chile), en prensa.
- 2 J.F. Bunnett y R.J. Morath, J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 5051.
- 3 J.F. Bunnett y R.J. Morath, J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 5165
- 4 N.S. Nudelman, Anales Acad. Nnal. de Cs. Exactas y Naturales, (Buenos Aires), 1980, 32, 109.
- 5 N.S. Nudelman, T. Suárez y J.A. Brioux, Chem. & Ind., 1964, 1754.
- 6 N.S. Nudelman y J.A. Brioux, Anales Asoc. Quím. Arg., 1970, 58, 217.
- 7 A.I. Vogel, "Practical Organic Chemistry", Longman, London 1956, 3rd. ed., p. 168.

\* Los datos experimentales de velocidad de reacción en metanol, encontrados en el presente trabajo concuerdan satisfactoriamente con el valor  $0.016 \text{ l mol}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  determinado previamente para la misma reacción a  $30.06^{\circ}\text{C}$  lo que descarta toda posibilidad de error en estos datos.

- 8 J.F. Bunnett, T. Kato y N.S. Nudelman, in "Fundamental Organic Chemistry", Laboratory Manual, K.T. Finley & Wilson, eds., Prentice-Hall, New Jersey, p. 112.
- 9 K. Wiberg, "Physical Organic Chemistry", Wiley, N.Y. 1976, p. 220.
- 10 J. F. Bunnett y R.H. Garst, J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 3879.
- 11 C.F. Bernasconi, C.L. Gehrigher y R.H. Rossi, J. Am. Chem. Soc., 1977, 99, 4090.
- 12 J.F. Bunnett, T. Kato y N.S. Nudelman, J. Org. Chem., 1969, 34, 785.
- 13 N.S. Nudelman y D. Garrido, J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, 1976, 1256.
- 14 J.R. Schaefgen, M.S. Newman y F.H. Verkoek, J. Am. Chem. Soc., 1944, 66, 1847.
- 15 N.S. Nudelman, Anales Asoc. Quím. Arg., 1978, 66, 89.
- 16 a) J.E. Sinsheimer and A.M. Keuhnelian, Anal. Chem., 1974, 46, 89; b) S.D. Prahan, H.B. Mathews, Proc. Indian Ac. S. A, 1978, 87, 23; c) J.A. Pople, H.J. Bernstein and W.G. Schneider, "High Resolution NMR", Mc-Graw Hill, New York, 1969; d) M. Kern, D. Servais, L. Abello and G. Pannetier, Bull. Soc. Chim. France, 1968, 2763; e) G. Pannetier and L. Abello, Bull. Soc. Chim. France, 1966, 1645; f) J.L. Mateos, R. Cetina and O. Chao, Chem. Comm., 1965, 519.
- 17 N.S. Nudelman y D. Palleros, J. Org. Chem., 1982, en prensa.
- 18 C.R.C. Handbook of Chemistry and Physics, 59<sup>th</sup>, CRC Press Inc., (1978-1979).
- 19 Dictionary of Organic Compounds, Vol. III, Oxford University Press, New York, 1943, p. 499.
- 20 N.S. Nudelman, T.H. Suárez y J.A. Brioux, resultados no publicados.
- 21 J.F. Bunnett, E.W. Garbisch y K.M. Pruitt, J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 385.
- 22 C.K. Ingold, "Structure & Mechanism in Organic Chemistry", Cornell Univ. Press, N.Y. 1953, p. 345
- 23 G.C. Pimentel y A.L. McClellan, "The Hydrogen Bond", W.H. Freeman & Co., N.Y., 1960, p. 354.

## UNA POSIBLE VINCULACION SOLAR DE LA PRESION ATMOSFERICA

Por EMILIO L. DIAZ

### RESUMEN

Un estudio estadístico parece mostrar unas ocho regiones terrestres cuya presión atmosférica media anual varía ya sea en fase entre sí (seis) o en oposición a las anteriores (dos), si se la computa como una función del nivel de la actividad solar (manchas) en los ciclos undecenales (A) y (B).

### ABSTRACT

An statistical study seems to show some eight terrestrial regions whose atmospheric mean annual pressure variates either in phase (six) or in opposition to the formers (two), if computed as a function of sunspots level of activity in eleven years cycles (A) and (B).

La actividad undecenal del Sol es aquí considerada teniendo en cuenta la distribución de la polaridad magnética en los grupos de manchas en los ciclos sucesivos. Se designan (A) aquellos ciclos similares al comenzado (año 0) en 1913 y (B) los análogos al iniciado en 1923.

Los tramos de la actividad se han definido así:

- creciente: años 0 a 4°, notación ( $A_0^4$ ) (o  $B_0^4$ );
- alta: años 2° a 7°, notación ( $A_2^7$ ) (o  $B_2^7$ );
- decreciente: años 5° a 10°, notación ( $A_5^{10}$ ) (o  $B_5^{10}$ );
- baja (tránsito al ciclo siguiente): años 8°, 9° y 10° del ciclo en terminación más los años 0 y 1° del ciclo en inicio, notación ( $A_8^{10} B_0^1$ ) (o  $B_8^{10} A_0^1$ ).

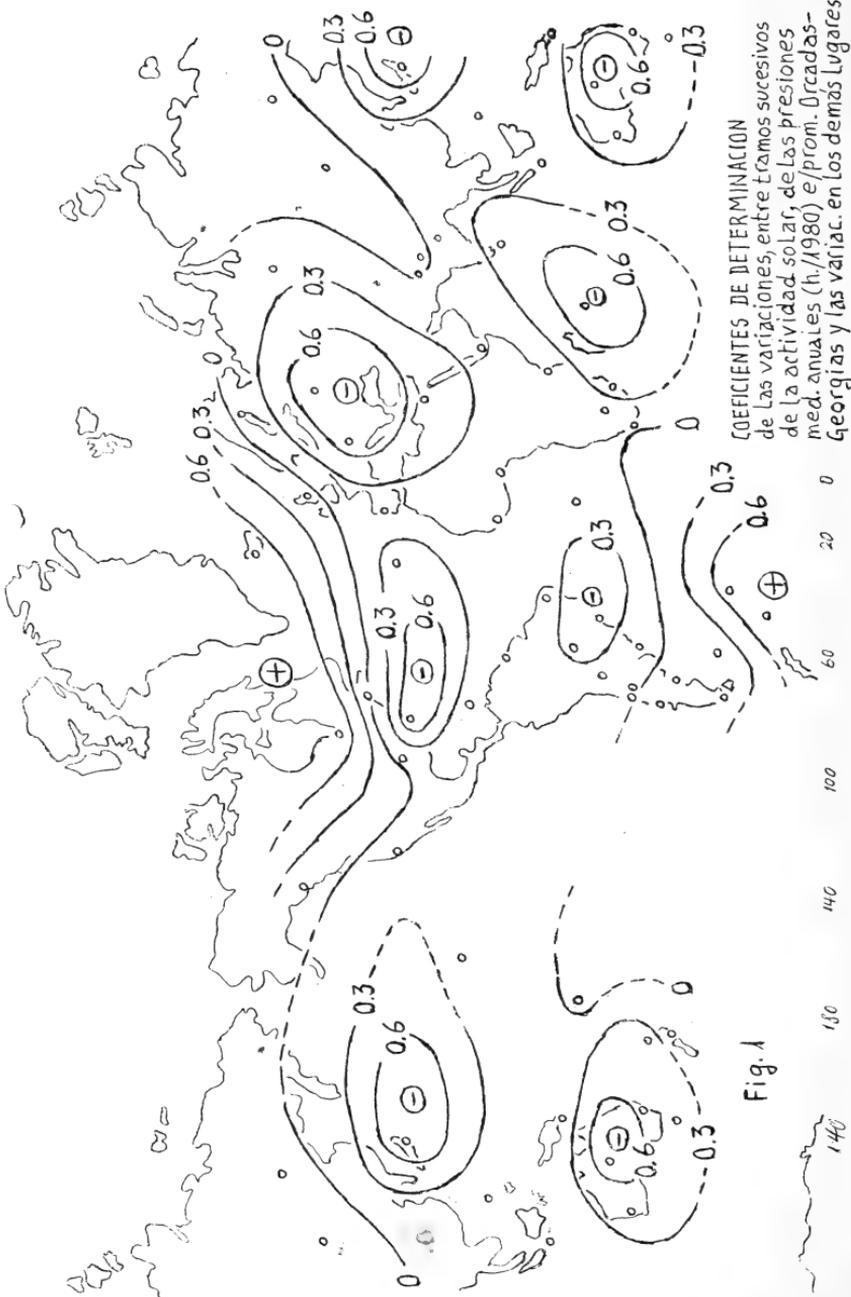
La longitud de los registros de las estaciones utilizadas (57 en este análisis) permite que los valores de la presión anual media para cada tramo de actividad solar, correspondientes a cada estación, sea el promedio de entre 15 y 30 años de observaciones, según los casos.

Los resultados que se enuncian a continuación tienen carácter provisorio.

Si se calculan las presiones medias anuales vinculadas a los ciclos (A) y (B) en las diversas ubicaciones y se hace su diferencia, el trazado de las isóneas en una carta muestra áreas (A - B) negativas en el Pacífico Norte, Australia, Eurasia y Atlántico Norte, Atlántico Sur (Brasil Oriental) y Océano Indico. En las regiones subpolares del Atlántico Norte y Sur, y al sur de Australia, surgen áreas de exceso de (A - B). La faja ecuatorial parece constituir una banda de separación entre los campos de (A - B) negativos de ambos hemisferios.

Con el objeto de evitar que el estudio de correlación fuera afectado por la circunstancia de que las presiones medias (A) (o B) suelen ser ya sea mayores, o menores, que las (B) (o A) en las distintas estaciones, se prefirió trabajar con las variaciones de las presiones medias entre los tramos sucesivos de la actividad solar. Ello equivale a utilizar las diferencias primeras de la función que expresa dichas presiones en relación con los tramos de la actividad.

El cálculo efectuado, tomando como referencia el promedio de las variaciones entre tramos anotadas en Orcadas y Georgias del Sur (seleccionadas por su posición respecto de



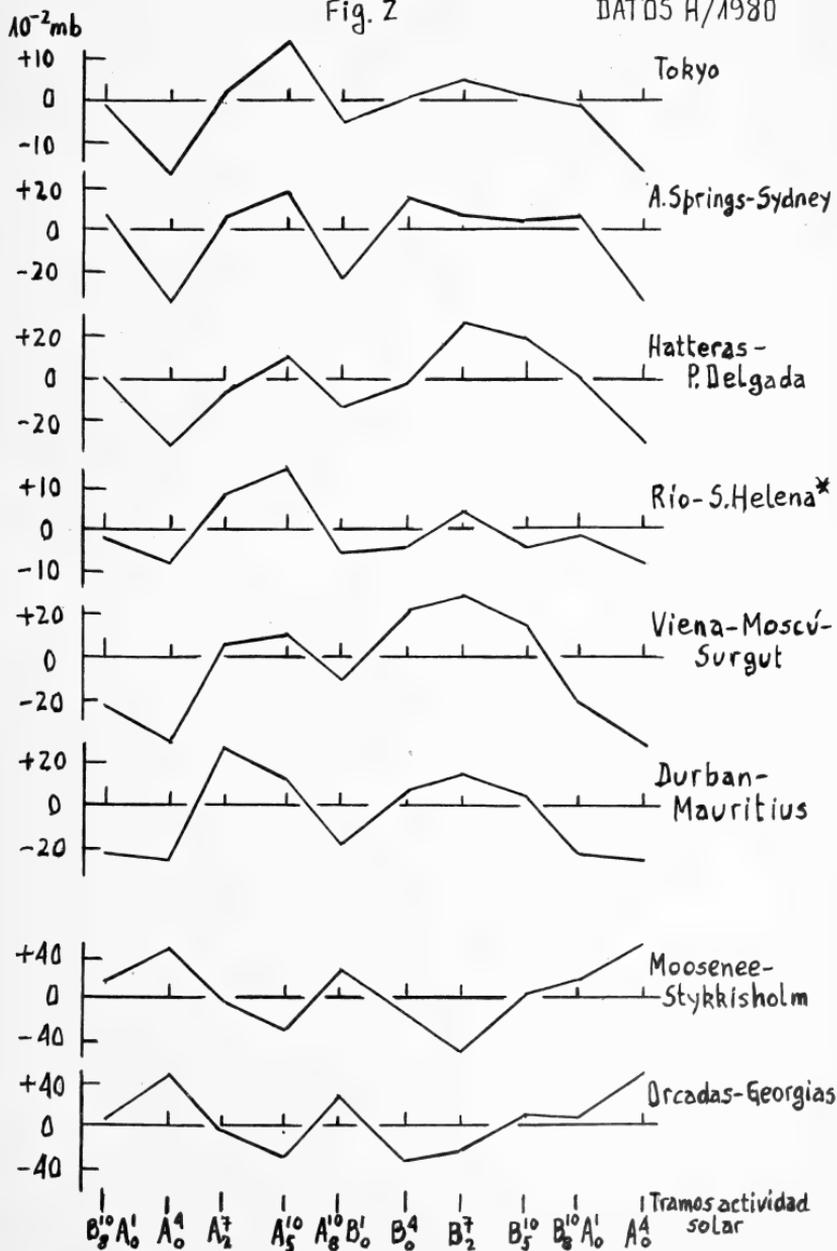
COEFICIENTES DE DETERMINACION de las variaciones, entre tramos sucesivos de la actividad solar, de las presiones med. anuales (h/1980) e/prom. Orzadas-Georgias y las variac. en los demás lugares

Fig. 1

VARIACIONES DE LA PRESION ATMOSFERICA ANUAL MEDIA  
ENTRE TRAMOS SUCEIVOS DE LA ACTIVIDAD SOLAR ( $10^{-2}$  MB)

Fig. 2

DATOS H/1980



\* 1892-1960

la convergencia antártica y el área (A-B) positiva arriba mencionada), correlacionadas con las variaciones en las demás estaciones terrestres, arrojó los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) con los cuales se ha trazado la Figura 1. Las áreas de resonancia en fase con la base de referencia se indican con (+) y las en oposición con (-).

Un cálculo semejante realizado tomando como referencia el promedio de las variaciones en Viena, Moscú y Surгут, proporciona una figura similar, con coeficientes de determinación del mismo orden, aunque invirtiendo el signo de la fase ya que el de la referencia es distinto aquí que en la otra.

En la Figura 2 se han graficado las variaciones de la presión atmosférica anual media entre los tramos sucesivos de la actividad solar (datos hasta 1980) en las ocho regiones que allí se citan. Puede verse que la magnitud de dichas variaciones es pequeña, del orden de décimos de milibar. Los datos de las varias regiones se han calculado tomando el promedio de dos o más estaciones de las mismas, cuando ello fue posible.

Es dable notar la ya mencionada marcha en fase en las áreas situadas a ambos lados del Ecuador y la evolución en oposición, respecto de las anteriores, de las variaciones en las zonas subpolares. Señalemos, con relación a estas últimas, que el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) entre Moosenee-Stykkisholm en el norte y Orcadas-Georgias en el sur, es de 0,83.

En el estado actual del trabajo no es posible emitir hipótesis respecto de la naturaleza y/o forma de la vinculación, si bien pareciera tratarse de un efecto a través de la atmósfera superior.

#### BIBLIOGRAFIA

1. World Weather Records, vols 79, 90, 105, Smithsonian Institution, y 1941-1950 y 1951-1960, U.S. Weather Bureau, U.S.A.
2. Monthly Climatic Data for the World, 1961-1980, National Oceanic and Atmospheric Administration, U.S.A.
3. Díaz, Emilio L., Sobre las lluvias en la Pampa Húmeda y otras referencias, revista Meteorológica, vol. VIII/IX, págs. 147/156, 1978, Centro Argentino de Meteorólogos. Buenos Aires, Argentina.

MANCHA DE LA HOJA DEL TRIGO (*Septoria tritici*) EN LA REPUBLICA ARGENTINAIII — Método de inoculación en laboratorio. Control de factores ambientales<sup>1</sup>

por

CRISTINA A. CORDO DE BALONGA<sup>2</sup>

## RESUMEN

Se presenta un método de inoculación artificial para determinar el comportamiento de un alto número de líneas o variedades de trigo bajo condiciones controladas. Este es efectivo para usar tanto en invernáculo como en laboratorio.

Se ha obtenido una buena infección, pulverizando una suspensión de esporas en agua destilada. La concentración de la solución se debe ajustar a  $6-10 \times 10^6$  esp./ml.

La incubación en cámara húmeda de polietileno debe ser de 96 hs. Se ha determinado, a través de sucesivos ensayos, las mejores condiciones ambientales, que favorecen la colonización y avance del patógeno y el desarrollo del hospedante; ellas son: 17°C, 65-85% de humedad relativa y una intensidad lumínica mayor de 3000 lux durante 16 hs., tomando los resultados finales a los 30 días de la inoculación.

## SUMMARY

A practical method of inoculation is proposed to determinate the behaviour of a high number of wheat lines or varieties under controlled conditions. It's effective when it's used in greenhouse or in laboratory.

It was obtained a good infection applying a spray of spore suspension in destilled water.

The concentration of this solution is about  $6-10 \times 10^6$  spores/ml.

The incubation in wet chamber of polyethilen last 96 hs. It was determinated, through sucesives assays, the best environmental condition under which the pathogen and varieties host lives: 17°C; 65-85% relative humidity; the light intensity more over 3000 lux for 16 hs.

The last results will be taken after 30 days of inoculation.

## INTRODUCCION

El panorama actual y futuro del cultivo del trigo con relación a *Septoria tritici* tiende a mejorar en el país. Los informes anuales del Centro Internacional de Investigaciones Agropecuarias (7, 8, 9, 10, 11) expone que nuevas líneas de crianza y variedades comerciales de inscripción provisoria y definitiva presentan cada año mayor susceptibilidad al parásito, sin observar mejoras en el comportamiento. Este fenómeno es atribuido a la incorporación de germoplasma mejicano en los planes de mejoramiento, que por otra parte incrementó el potencial de rendimiento y la resistencia al vuelco.

El método más aconsejado para el control de la enfermedad consiste en ubicar e introducir genes de resistencia a *S. tritici* en variedades seleccionadas. Es conveniente probar dicha resistencia en un estadio vegetativo temprano (plántula). Persiguiendo este objetivo, se presenta un método de inoculación artificial en el laboratorio y bajo condiciones controladas, que posibilita determinar simultáneamente, el comportamiento de un alto número de líneas y cultivares en estadio de 3° hoja. Este método se emplearía en las primeras generaciones segregantes del material a seleccionar, descartando tempranamente, las líneas susceptibles al parásito. Complementando este método, se han estudiado los factores ambientales (temperatura, humedad, intensidad de luz, fotoperíodo) y su ajuste, para obtener resultados más efectivos.

- (1) Investigación realizada en el Instituto de Botánica "Spegazzini", Facultad de Ciencias Naturales y Museo, y Cátedra de Cerealicultura, Facultad de Agronomía (UNLP), y auspiciada por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Buenos Aires.
- (2) Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

## MATERIAL Y METODOS

Las pruebas de inoculación se condujeron sobre dos variedades comerciales de trigo de comportamiento conocido: Marcos Juarez INTA (Susceptible) y Buck Napostá (Resistente), seleccionadas por su respuesta constante en sucesivas inoculaciones. El estadio de crecimiento elegido fue el de 3° hoja en desarrollo.

Se probó la patogenicidad del aislamiento de *S. tritici* 38388C.D. La técnica de cultivo se dio a conocer con anterioridad<sup>3</sup>. El patógeno produjo una esporulación abundante sobre estrias de medio CZDV'8 y AHA.

Las plantas, hasta la ejecución de los tratamientos estaban sujetas a condiciones de intemperie. Desde el momento de la inoculación continuaron creciendo en cámara de cria, con condiciones ambientales controlados.

Se produjo un plan de inoculación tendiente al conocimiento de las condiciones ambientales y de otros aspectos técnicos que hacen el método.

Las experiencias se diseñaron en bloques al azar con 3 repeticiones. Se inocularon 30 plantas de cada variedad (10 por block) dejando 5 como testigo.

Mediante u atomizados se aplicó una suspensión de esporas de concentración ajustada ( $6 - 10 \times 10^6$  esp./ml) continuando hasta la cobertura total y comienzos del escurrimiento. Los órganos a tratar se frotaron con la yema de los dedos humedecidas, para eliminar la cera cuticular.

La permanencia en cámara húmeda de polietileno fue de 96 hs. Semanalmente y por espacio de un mes se las revisó para determinar la reacción. Se midió el porcentaje de cobertura picnidial alcanzada en la tercera hoja, a pesar que la cuarta pudo ser afectada.

## RESULTADOS

### Estudio y ajuste de los factores ambientales

Analizando la *intensidad de luz* y la *calidad de la incubación*, se ensayó el efecto de dos intensidades lumínicas y de dos tipos de cámara húmeda, manteniendo constantes la calidad de la luz (tubos grolux), la temperatura y el fotoperíodo (22-24° C y días largos): Intensidad lumínica I ( $I_1$ ) = 1300 - 2200 lux; Intensidad lumínica II ( $I_2$ ) = 4800 lux. Los tipos de cámara húmeda fueron: CI = construida en polietileno; CII = construida en celofán.

Las plántulas incubadas en cámara húmeda de celofán debieron ser rehumectadas con agua destilada a las 24 y 72 horas, para asegurar una humedad elevada.

En cuanto a la intensidad de luz, medida en unidades de iluminancia, se recomienda ajustar la cámara a valores mayores de 3000 lux, (Ver cuadro 1). Bajo 4800 lux se observó un funcionamiento normal del hospedante y una rápida colonización de los tejidos por parte del patógeno.

Con menor iluminancia (1200-2200 lux) las dos variedades probadas no mostraron diferencias en el comportamiento, pero sí sufrieron una intensa clorosis, reducción de la estatura y tamaño de los órganos, a consecuencia en un retraso en el desarrollo. En ocasiones el patógeno no llegó a establecerse en el hospedante, y de hacerlo, no se formaron fructificaciones por muerte prematura de la 3° hoja. El cultivar Buck Napostá resultó notablemente afectado por esa causa. Cuando crecieron bajo 4800 lux el patógeno se estableció y desarrolló en óptimas condiciones. Se incrementó

CUADRO 1

EFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ EN LA INFECCION POR SEPTORIA TRITICI MEDIDO POR EL PORCENTAJE PROMEDIO DE COBERTURA PICNIDIAL							
INTENS. LUZ = 1330-2200 lux				INTENS. LUZ = 4800 lux			
Buck Napostá		Marcos J. INTA		Buck Napostá		Marcos J. INTA	
C I	C II	C I	C II	C I	C II	C I	C II
+0,17	0,17	2,98	1,74	0	0	0	0,38
0,95	1,19	6,37	3,68	7,16	8,30	28	20,53
+Porcentaje promedio de cobertura picnidial							
C I = Cámara húmeda de polietileno							
C II = Cámara húmeda de celofán							

notablemente el tamaño y densidad de picnidios y las diferencias de comportamiento resultaron altamente significativas, lo que se demuestra en el siguiente cuadro.

CUADRO 2 — Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio.

F.V.	G. L.	S. C.
V d I <sub>1</sub>	1	2485,77 <sup>n.s.</sup>
V d I <sub>2</sub>	1	2069,4 <sup>++</sup>

La apreciación del comportamiento de las dos variedades se hace posible cuando el período de incubación y post incubación de la enfermedad se realiza a una intensidad relativamente elevada, que favorezca el desarrollo normal de la planta y el establecimiento del patógeno.

Las dos intensidades lumínicas probadas (2200 y 4800 lux) no afectaron el comportamiento del cultivar resistente Buck Napostá (V<sub>1</sub>), pero sí el del susceptible Marcos Juárez INTA (V<sub>2</sub>).

CUADRO 3 — Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio.

F.V.	G. L.	S. C.
I d V <sub>1</sub>	1	4049,73 <sup>n.s.</sup>
I d V <sub>2</sub>	1	24849,58 <sup>++</sup>

Por su naturaleza, la variedad resistente V<sub>1</sub>, experimenta bajos porcentajes de infección a pesar de crecer bajo intensidades lumínicas más elevadas. En cambio, sobre la variedad susceptible V<sub>2</sub> es donde se observa con más fidelidad la influencia de una intensidad apropiada; los porcentajes de cobertura obtenidos a 4800 lux son mayores que los manifestados a la menor intensidad. Este carácter es fundamental para la diferenciación del material susceptible.

Con respecto a los tipos de cámara húmeda, el efecto proporcionado por la de celofán y la de polietileno, es distinto (ver cuadros 4 y 5).

CUADRO 4 – Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio

F.V.	G.L.	S.C.
V d C poliet.	1	15891,0 <sup>++</sup>
V d C celof.	1	4576,86 <sup>n.s.</sup>

CUADRO 5

COMPORTAMIENTO DE LOS CULTIVARES BAJO DIFERENTES INTENSIDADES LUMINICAS Y DISTINTOS TIPOS DE CAMARA HUMEDA									
Cultiv. Buck Napostá					Cultiv. Marcos Juárez INTA				
INTENSIDAD LUZ									
1300-2000 lux		4800 lux		1300-200 lux		4800 lux			
C I	C II	C I	C II	C I	C II	C I	C II	C I	C II
<sup>+</sup> 0,17	0,17	0	0	2,98	1,74	0	0,38		
0,95	1,19	7,16	8,30	6,37	3,68	28	20,53		
<sup>+</sup> Porcentaje promedio de cobertura picnidial C I = Cámara húmeda de polietileno C II = Cámara húmeda de celofán									

El análisis del cuadro anterior establece que la incubación bajo cámara de celofán no produjo diferencias significativas de comportamiento; en cambio, la de polietileno realza mayores diferencias. Asegura una humedad relativa elevada sin rehumectación durante las horas de incubación.

El efecto de la *temperatura* y el *fotoperíodo* se estudiaron conjuntamente. Las dos variedades se sometieron a tres regímenes térmicos (17, 21, y 27°C) y a dos fotoperíodos (D.L., 16 hs. de luz y D.C. 8 hs. de luz).

CUADRO 6 – Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio.

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.
Entre macet.	23	32103,87	1395,82
(V) Varied.	1	12123,02	12123,02 <sup>++</sup>
(T) Temperat.	2	7438,89	3719,45 <sup>++</sup>
(F) Fotoper.	1	234,62	234,62 <sup>n.s.</sup>
V X T	2	6512,21	3256,11 <sup>++</sup>
V X F	1	761,30	761,30 <sup>+</sup>
Error	40	5033,83	125,84
Error de muestreo		11948,06	88,50

Las temperaturas estudiadas provocan un efecto diferente (3719,45<sup>++</sup>). El promedio de infección bajo 17 y 21° C es similar (a 17° C = 30,5% de infección promedio; a 21° C = 25% de infección promedio) pero difiere notablemente a 27° C (8,20% de infección promedio). También se ha observado que a 17° C las plantas desarrollan normalmente, con vigor, porte erguido y una altura equiparada al desarrollo en campo. A 21° C el porte es semierguido y la altura menor. A 27° C el porte es erecto para Marcos Juárez INTA y prostrado para Buck Napostá, con secado prematuro de las plantas de este último. El fotoperíodo no provoca un efecto significativo, pero sí se manifiesta un comportamiento altamente significativo de las variedades, de acuerdo a la temperatura a que se someten (V X T).

CUADRO 7 – Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.
T d V <sub>1</sub>	2	13434,01	6717,00 <sup>++</sup>
T d V <sub>2</sub>	2	518,52	259,26 <sup>n.s.</sup>
Error	40		125,84

La variedad más afectada por el efecto de la temperatura es la (S) Marcos Juárez INTA; el cultivar resistente responde de forma similar a todas las temperaturas. Esto señala la importancia del ajuste de las temperaturas para una manifestación correcta de la reacción. Las observaciones demuestran que bajo 17 y 21° C Marcos Juárez INTA reaccionó de forma susceptible frente a la invasión del patógeno; contrariamente, a 27° C, el comportamiento manifestado fue similar que al del cultivar resistente.

El efecto del fotoperíodo ha sido estudiado en el siguiente cuadro.

CUADRO 7 – Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio.

F.V.	G.L.	S.C.
Fot. d V <sub>1</sub>	1	927,04 <sup>++</sup>
Fot. d V <sub>2</sub>	1	68,88 <sup>n.s.</sup>
Error	36	103,52

El efecto del fotoperíodo es altamente significativo para Marcos Juárez INTA (V<sub>1</sub>). Los porcentajes promedio de ataque bajo fotoperíodo largo F L = 26,6% y para fotoperíodo corto F C = 18,9%. Buck Napostá (V<sub>2</sub>) no experimentó diferencias de comportamiento (F L = 5,6% y F C = 6,5%).

El fotoperíodo más adecuado para exaltar el comportamiento real de los cultivares es el de días largos, como queda demostrado por el valor de la suma de cuadrados de la interacción variedad por fotoperíodo largo (V X FL), en el siguiente análisis de variancia.

CUADRO 8 – Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio.

F.V.	G.L.	S.C.
V d FL	1	9438,69 <sup>++</sup>
V d FC	1	3455,70 <sup>++</sup>
Error	36	103,52

La elección del fotoperíodo largo se ratifica con las observaciones fenológicas y morfológicas conocidas. En general, bajo Fotoperíodo largo y cualquier temperatura, se observa un estado de crecimiento más avanzado (7° hoja apareciendo) y mayor vigor que para el fotoperíodo corto, garantizando la colonización y avance del patógeno.

En cuanto al *estadio de crecimiento más apropiado* para aplicación del tratamiento se compararon en los cuadros 9 y 10, los resultados obtenidos sobre 2° y 3° hojas.

CUADRO 9

COMPORTAMIENTO DE DOS CULTIVARES INOCULADOS EN DOS ESTADOS SUCESIVOS DE CRECIMIENTO <sup>+</sup> Porcentaje promedio de cob.picn.											
Cultiv. Buck Napostá						Cultiv. Marcos Juárez INTA					
2° hoja			3° hoja			2° hoja			3° hoja		
B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
+1,59	2,03	3,31	2,37	3,42	2,03	10,28	6,93	11,65	7,83	16,44	11,80
X total = 2,31%			X total = 2,61%			X total = 9,62%			X total = 12,06%		

CUADRO 10 – Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.
V d h <sub>2</sub>	1	1500,12	1500,12 <sup>++</sup>
V d h <sub>3</sub>	1	1917,00	1917,00 <sup>++</sup>

Las variedades ensayadas respondieron con diferencias de comportamiento altamente significativas, tanto para inoculaciones en 2° como en 3° hoja.

La reacción de las hojas (2° y 3°), para una misma variedad, no presenta significancia, por tanto, resultaría indistinto inocular 2° o 3° hoja. Esto se dedujo del siguiente análisis.

CUADRO 11 – Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.
h d V <sub>1</sub>	1	6,03	6,03 <sup>n.s.</sup>
h d V <sub>2</sub>	1	53,36	53,36 <sup>n.s.</sup>

A pesar de los resultados se recomienda la *tercera hora* por las siguientes razones:

- 1) La segunda hoja tiene tendencia a secarse prematuramente, antes de la observación final, por tanto podría verse interrumpido el avance del patógeno en pleno período de infección.
- 2) El ancho y longitud de la lámina de la tercera hoja es mayor que el de la segunda, siendo la recepción del inóculo más segura en la 3°.

3) La infección se practica en un estado temprano de crecimiento para el que no se necesitan mantener las plantas durante mucho tiempo, evitando ataques de otras enfermedades.

En otro ensayo se probó un *producto adhesivo* que incorporado a la suspensión conidial evitaría la limpieza por frotación, de los órganos a tratar. Se preparó una solución de oleato de sodio (0,05 g) y gelatina (0,25 g) por cada 100 ml. de inóculo. En este caso no resultó efectiva. Si bien no afectó la germinación de las esporas, pudo obstruir el ostíolo de los estomas, dificultando la penetración del tubo germinativo del conidio.

Las variedades inoculadas reaccionaron correctamente cuando se las inoculó *sin adhesivo* (s/a), contrariamente a los resultados del tratamiento *con adhesivo* (c/a), como se compara en los CUADROS 12 y 13.

CUADRO 12

EFECTO DE LA INOCULACION EN 3° HOJA CON Y SIN USO DE ADHESIVO					
(+) Porcentaje promedio de cobertura picnidial sobre 3° hoja					
Buck Napostá			Marcos Juárez INTA		
c/adhesivo	s/adhesivo	T	c/adhesivo	s/adhesivo	T
+1,32	4,22	0	5,26	12,17	0

CUADRO 13 – Cuadro de contraste entre medias.

	$\bar{X}_{c/a} = 9,55$	$\bar{X}_{s/a} = 15,93$	$\bar{X}_T = 0$
$\bar{X}_{c/a} = 9,55$	—	6,38 <sup>++</sup>	9,55 <sup>++</sup>
$\bar{X}_{s/a} = 15,93$	—	—	15,93 <sup>++</sup>
$\bar{X}_T = 0$	—	—	—

El desarrollo del patógeno es altamente significativo sobre individuos tratados sin adhesivo, observando el mismo efecto del testigo con respecto a los otros dos subtratamientos.

## DISCUSION

El método de inoculación practicado con *Septoria tritici*, permitiría la selección masiva por resistencia al patógeno en generaciones segregantes y en estadíos tempranos de crecimiento (3° hoja). Consiste en aplicar, con un atomizador, una suspensión de conidios de concentración regulada, que puede oscilar entre 6 a 10 millones de conidios por ml. Se recomienda pulverizar 1 a 2 ml por planta. Para obtener dicha concentración se debe inundar cada estria esporulada con 3 ml. de agua destilada.

Las hojas, antes del tratamiento deben frotarse con la yema de los dedos humedecidos, para eliminar la cera cuticular y facilitar la adherencia de la gota de inóculo. Sería de utilidad suprimir esta etapa incorporando unas gotas de adhesivo a la suspensión. Se han obtenido resultados exitosos, en inoculaciones con *Pyricularia oryzae*, incorporando Tritón X 100 (1 gota/200 ml.), a la suspensión conidial.

Se recomienda una incubación en cámara húmeda de polietileno, durante 96 hs. La cobertura de polietileno asegura una humedad relativa elevada, sin rehumectación durante dicho período.

Finalizado este tiempo, las plantas deben retornar a las condiciones ambientales controladas de la cámara de cría. Las observaciones se deben hacer entre la 3° y la 4° semana de la inoculación, cuando los picnidios expresan su total madurez.

Las condiciones de temperatura, luz (cálida, fotoperíodo) y humedad de la cámara de cría deben ajustarse de la siguiente forma:

- 1) La temperatura aconsejada es la de 17°C, por permitir un desarrollo normal del hospedante y una segura colonización y avance del patógeno. A esa temperatura y a 21°C la aparición de los picnidios se realizó entre los 12 y 16 días, coincidiendo con las observaciones de Weber, 1922.
- 2) Referido a la luz incidente, el fotoperíodo deberá ajustarse a 16 hs. de luz. En cuanto a la intensidad lumínica, deberá superar los 3000 lux y no alcanzar los 9000 lux. La máxima intensidad probada en este ensayo (4800 lux) resultó apropiada. Como expuso Benedict, 1971 la intensidad de luz de las primeras horas después de la inoculación es responsable de la aceleración de los cambios estructurales de la espora. La formación del tubo germinativo y de las hifas ocurrió más rápido bajo intensidades menores de 5000 lux. La penetración de la hifa al tejido del hospedante se aceleró a los 8000 lux, mientras que el desarrollo hifal y de picnidios, dentro de la cavidad subestomática se incrementó bajo intensidades fluctuantes entre 2000 y 4800 lux.
- 3) La humedad relativa de la cámara de cría puede ajustarse a una oscilación diaria entre 65-85%

### AGRADECIMIENTOS

Un reconocimiento muy especial a los profesores que dirigieron el presente trabajo, Ingenieros Agrónomos Juan C. Lindquist y Héctor O. Arriaga. Al Ing. Agr. Rafael Boggio, por participar en la conducción del Análisis Estadístico de los ensayos.

Al señor Lorenzo F. Cuomo, mi agradecimiento por su colaboración en el mecanografiado del texto de este trabajo y de la entrega anterior (Informes 29 CIC).

A las autoridades directivas del Instituto de Botánica "Spegazzini" donde se condujo parte de este trabajo, y de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Bs. As., que auspició esta investigación, mi profundo agradecimiento por la colaboración recibida.

### BIBLIOGRAFIA

1. ANTONELLI, E.F. et al. 1970. Fuentes de germoplasma de resistencia a enfermedades y plagas. *Rev. Inv. Agron. Ser 2, 7 (3)*, 133-151 pgs.; 2 diag. 2 tabl. *English Summ. INTA, Castelar.*
2. BENEDICT, W.C. 1971. Differential effect of light intensity on the infection of wheat by *S. tritici*. *Phytopath. Plant. Pathol. I (1)*: 55-66 pgs.
3. CORDO, C.A. 1979. Mancha de la hoja del trigo (*S. tritici*) en la República Argentina. *Boletín de CIC N° 29.*
4. MILES, A.A. 1955. The meaning of pathogenicity; 1-16 pgs. *In I. Whowie and A.J.O. Hea, Mechanism of microbial pathogenicity. Simposium 5 Soc. Gen. Microb.* Cambridge University Press, 333 pgs.
5. RENFRO, B.L. & YOUNG, H.C. 1956. Tehcniques for studying varietal responce to Septoria leaf blotch of wheat (Abs.) *Phytopath.* 46: 23-24 pgs.
6. RILLO, A.O. & CALDWELL, R.M. 1966. Inheritance of resistance to *S. tritici* in *T. aestivum sub. sp. vulgare Bulgaria 88*. *Phytopath.* 56: 897 pgs.
7. RODRIGUEZ AMIEVA, P.J. et al. 1968. Ensayos Territoriales de enfermedades en trigo, cebada, avena, centeno y lino, de la región cerealera argentina en 1968 INTA. *Inst. Fitot. Boletín Inf. N° 28*: 19 pgs. Castelar.
8. 1970 *Inst. Fitot. Boletín Inf. N° 30*: 23 pgs. Castelar.
9. 1971 *Inst. Fitot. Boletín Inf. N° 31*: 27 pgs. Castelar.
10. 1972 *Inst. Fitot. Boletín Inf. N° 32*: 22 pgs. Castelar.
11. 1974 *Inst. Fitot. Boletín Inf. N° 34*: 24 pgs. Castelar.
12. SHEARER, B.L. & ZADOKS, J.C. 1972. The latent period of *S. nodorum* in wheat. I - The effect of temperature and humidity treatment under controlled condition. *Neth. Journ. of Plant Path.* 78 (6): 231-245 pgs.
13. WEBER, G.F. 1922 Septora diseases of wheat. *Phytopath.* 12: 537-585 pgs.

**“FRUTOS DE *CARDUUS THOERMERI* WEINM. (*CARDUUS NUTANS* AUCT. COMPUESTA) – ESTUDIO DEL ACEITE CRUDO DE EXTRACCION Y DE LA HARINA RESIDUAL”.\***

Por S.N. Fusero\*\*, M.H. Bertoni y P. Cattaneo

Departamento de Química Orgánica (Orientación Bromatología y Tecnología de Alimentos). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Pabellón 2, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires.

### RESUMEN

Frutos de *Carduus thoermeri* Weinm; *Carduus nutans*, var. *macrocephalus*, cosechados en Río Cuarto (Prov. de Córdoba, Argentina) se agotaron con hexano en Soxhlet, obteniendo el aceite crudo (32,05% b.s.; índ. yodo 137,6; índ. saponif. 175,9; insaponificable% (12,44). Los valores de composición ácida (% de ácidos totales, CGL) fueron 12:0 (0,6), 14:0 (1,7), 14:1 (0,1), 16:0 (6,2), 16:1 (0,5), 18:0 (2,4), 18:1 (20,6), 18:2 (67,1), 18:3 (0,3) y 20:0 (0,5). Un análisis CGL de los ésteres metílicos de los ácidos totales hidrogenados confirmó estos valores evidenciando presencia de otros componentes menores como 13:0, 15:0, r-16:0, 17:0, 22:0 y 24:0.

Se indican valores de contenido para esteroides y fósforo lipídico. Los esteroides particulares (% de esteroides totales) fueron: colesterol (12,2), campesterol (18,0), stigmasterol (7,4) y sitosterol (62,4). El aceite contenía 4800 mg de escualeno % g (una cifra muy elevada para aceites seminales). Se identificó escualeno como su dodecabromo-derivado (Br % calc. 69,7; det. 69,5 y 70,0%). Se presentan valores de composición de la harina residual de extracción.

### SUMMARY

Fruits from *Carduus thoermeri* Weinm; *Carduus nutans*, var. *Macrocephalus*, harvested in Río Cuarto (prov. de Córdoba, Argentina) were defatted (hexane) and the crude oil (32,05% dry basis; I.N° 137,6; S. N° 175,9; unsaponifiable matter 12,44% ) examined. GLC of total fatty acid methyl esters showed the following acidic composition values: 12:0 (0,6); 14:0 (1,7); 14:1 (0,1); 16:0 (6,2); 16:1 (0,5); 18:0 (2,4); 18:1 (20,6); 18:2 (67,1); 18:3 (0,3) and 20:0 (0,5). An analysis of hydrogenated methyl esters confirmed these values and showed other minor components like 13:0; 15:0; r-16:0; 17:0; 22:0 and 24:0.

Values for sterol and lipidic phosphorus contents are given. Cholesterol (12,2), campesterol (18,0), stigmasterol (7,4) and sitosterol (62,4 % of total sterols) values were found. The oil contained 4800 mg of squalene %g (a very high figure in seminal oils). Squalene was identified as it dodecabromine derivative (Br %calc. 69,7; det. 69,5 and 70,0 %). Defatted meal composition values are presented.

\* Este trabajo fue posibilitado en parte mediante un subsidio de la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología (SECYT).

\*\* Parte del Trabajo de Tesis Doctoral presentado por S.N. Fusero<sup>1</sup>. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, 1982.

## INTRODUCCION

**Carduus thoermeri** Weinm (*C. nutans* auct.)<sup>2</sup> es una hierba anual de 1-2 m de altura, con ramas casi desnudas superiormente. Europea y adventicia común en campos con ganado. La var. **macrocephalus** (Desf.) Fiori et Beguinot<sup>3</sup> es frecuente en el norte y centro de la República Argentina como maleza invasora de los cultivos. Suele encontrarse fácilmente en muestras de semillas de cosecha primavera-estival (lino, alfalfa, festuca, etc.)<sup>4</sup> Se la conoce con los nombres vulgares de "Cardo del caballo", "Cardo Flor de caballo" o "Cardo pendiente" y fuera de los trabajos vinculados con formas de exterminio<sup>5</sup>, la literatura consultada no registra antecedentes referentes a estudios químicos de composición de sus frutos. Dada la gran difusión de esta maleza en el país se llevó a cabo un estudio de esa naturaleza, que se expone a continuación.

## DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

Se operó sobre una partida de 80 g de frutos maduros y limpios cosechados en los alrededores de la ciudad de Río Cuarto (Córdoba), en enero de 1979. Previamente a la extracción del aceite, se observaron los siguientes valores de algunas características de esos frutos:

**Peso/Hl** 55,1 Kg; **peso medio del fruto** 2,0 mg; **N° de frutos/g** 480 y **humedad %** 6,10. Por agotamiento del fruto integral, previamente molido (hexano) se obtuvo el **aceite crudo** (32,05 %b.s.), que se sometió a un estudio de características físico-químicas y de composición química.

### Estudio del aceite crudo

a) **Características físico-químicas** — El aceite se presentó como un líquido amarillo claro y límpido a 25°, con los siguientes valores de características físico-químicas y contenidos en componentes menores:

**Densidad relativa** (25/4°, picnómetro) 0,9220; **índice de refracción** (25°, AOAC) 1,4772; **índice de saponificación** (AOAC) 175,9; **índice de yodo** (Wijs) 137,6; **índice de acidez** (mg KOH/g, IUPAC) 43,8; **insaponificable %**(AOCS, éter etílico) 12,44; **índice de yodo del insaponificable** (Rosenmund) 198,7; **ácidos grasos totales %**(por saponificación) 82,21; **fósforo lipídico**<sup>6, 7</sup> (como P) 17,2; **N° de escualeno** (Fitelson, g%) 4,80 y **esteroles totales**<sup>8</sup> (digitonina, como sitosterol, mg%) 957.

El bajo valor hallado para índice de saponificación se vincula al elevado contenido en insaponificable y consecuentemente al bajo valor de ácidos totales por saponificación y no a la presencia de ácidos grasos de alto peso molecular, como fue demostrado al estudiar la composición acídica. El contenido en esteroles totales fue muy alto, duplicando prácticamente los valores más corrientes en aceites seminales. El valor de índice de yodo del insaponificable, sin ser tan elevado como sucede en muchos aceites de oliva, hizo sospechar la presencia de escualeno, lo cual se confirmó por aplicación de la técnica de Fitelson<sup>9</sup> en la determinación del **N° de escualeno** que resultó ser extraordinariamente elevado (4,8% de aceite, debido sin duda al alto tenor del aceite en insaponificable). Hasta el presente este estudio muestra al escualeno en concentración tal vez no superada en fuentes grasas vegetales o animales terrestres. El valor para **tocóferoles totales** de acuerdo a la técnica de Bertoni y Cattaneo<sup>10</sup>, no pudo determinarse ante la imposibilidad de purificar el material insaponificable antes del desarrollo de color con  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridilo-FeCl<sub>3</sub>. El aceite crudo contenía 430 mg%g de **fosfolípidos** (mg P lipídico % x 25)<sup>11</sup>

b) **Composición ácida** — Previa verificación de la ausencia de dienos y trienos conjugados preexistentes y operando por CGL de ésteres metílicos de ácidos totales libres de insaponificable, se estableció la siguiente composición ácida (% de ácidos totales):

**12:0** (0,6); **14:0** (1,7); **14:1** (0,1); **16:0** (6,2); **16:1** (0,5); **18:0** (2,4); **18:1** (20,6); **18:2** (67,1) **18:3** (0,3) y **20:0** (0,5).

Esta composición se vió confirmada al determinar por CGL la composición ácida de los ésteres metílicos previamente hidrogenados de los ácidos totales, con los siguientes valores: **12:0** (0,5); **14:0** (1,6); **16:0** (5,9); **18:0** (91,0) y **20:0** (1,0), cifras muy acordes con las resultantes de sumar las concentraciones de ésteres de igual N° de átomos de carbono del análisis de composición ácida de los ácidos totales ya mencionada, que fueron:

$C_{12}$  (0,6);  $\Sigma C_{14}$  (1,8);  $\Sigma C_{16}$  (6,7);  $\Sigma C_{18}$  (90,4) y  $C_{20}$  (0,5).

Considerando que el N° de acidez fue elevado (43 mgKOH/g), se aislaron los ácidos grasos libres (ver Parte Experimental) que se transformaron en ésteres metílicos y examinaron en su composición ácida con los siguientes valores:

**12:0** (1,1); **14:0** (3,6); **14:1** (0,2); **16:0** (5,2); **16:1** (1,3); **18:0** (1,4); **18:1** (17,7); **18:2** (69,5) y **18:3** (0,6).

Estas cifras comparadas con las de composición ácida de ácidos grasos totales indican que los ácidos libres no difieren sensiblemente de estos últimos en su composición, de lo que se deduce que si procediesen de hidrólisis catalizada por lipasas, éstas carecían prácticamente de especificidad respecto de la ubicación de los radicales acilos en las moléculas de glicéridos (probablemente lipasas propias de la semilla).

En razón de la poca disponibilidad de aceite no fue posible un examen de composición ácida exhaustiva (destilación fraccionada en vacío de ésteres metílicos de ácidos totales y examen CGL de cada fracción y residuo de destilación). En cambio, operando sobre los ésteres metílicos hidrogenados de los ácidos totales con una inyección masiva se obtuvo un cromatograma que evidenció pequeños picos de componentes identificados como **13:0**, **15:0**, **r-16:0**, **17:0**, **22:0** y **24:0**.

La literatura no registra antecedente alguno sobre el aceite seminal de *Carduus nutans* L. Este estudio señala que este vegetal produce frutos oleaginosos (32,0% de aceite sobre fruto integral en b.s., muy probablemente alrededor del 50 - 60 % sobre semilla seca), de carácter semi-secante del tipo "non yellowing drying oils" (aceites que no pardean por secado), en razón de su riqueza en **18:2** (67 %) y prácticamente carente de **18:3** (0,3 %).

Se destaca que, dentro de los aceites vegetales ajenos a los de palmas, sus tenores en **12:0** y **14:0** son de cierta significación (0,6 y 1,7 %, respectivamente).

c) **Examen de la fracción de esteroides** — Desde que la literatura tampoco señala antecedentes sobre este tema y partiendo del insaponificable se aisló la fracción de esteroides totales según Fedeli et al<sup>12</sup>, que se examinó por CGL. Por computación de áreas se encontró la siguiente composición, expresada en esteroides % de esteroides totales (valores de  $T_F/T_T$  colesterol entre paréntesis): **Colesterol** (1,00) 12,2; **campesterol** (1,30) 18,0; **stigmasterol** (1,40) 7,4 y **sitosterol** (1,60) 62,4.

Es de destacar la concentración significativa encontrada para colesterol.

#### Harina residual de extracción.

a) **Composición general** — Los frutos agotados por hexano se desolvetizaron obteniendo la harina de extracción residual, que se analizó con los siguientes valores (% en b.s.):

**Cenizas** (500-550°) 6,40; **fibra cruda**, (AOAC, Official Method 21.038 1965) 34,03; **nitrógeno total** (macro Kjeldahl, AOAC Official Method 2.24, 1950) 4,49 (equivalente a 28,06% de "proteína cruda"); **azúcares reductores** (en glucosa, AOAC, Official Method 22.043,

1965 y 29.038, 1965) 0,56; **azúcares invertibles** (en sacarosa, Official Method 29.026, 1965) 1,31; **hidratos de carbono sacarificables** (en almidón, HC1 1,125) 14,31 y **lípidos remanentes** (ver Parte Experimental) 4,22.

El valor de **humedad** para esta harina fue 8,05 %; además se registraron contenidos en **calcio** (AOAC, Official Method 13.014, 13.013, 1965) de 853 mg% g, como Ca; de **fósforo total** <sup>6,7</sup> 897 mg% g, como P; de **fósforo de ácido fítico** 161 mg% g como P y de **lisina disponible** <sup>14,15</sup> 1,98 g/16gN.

Operando sobre las soluciones usadas para las evaluaciones de hidratos de carbono, previamente purificadas en columnas de intercambio iónico: Amberlite IR-120 (catiónica, acidez fuerte) y Amberlite IRA-410 (aniónica, basicidad media) previamente activadas, debidamente concentradas (Rotavapor, vacío parcial, T < 45°), sembradas en papel o placas de vidrio (Kieselguhr) y desarrolladas y reveladas por diversas técnicas <sup>16-18</sup>, se reconoció **glucosa** como único azúcar reductor antes y después de inversión, no habiéndose detectado la presencia de sacarosa u otros di o trisacáridos. Los hidratos de carbono sacarificables rindieron por sacarificación arabinosa, xilosa y galactosa (ausencia de almidón).

La relación Ca/P fue 0,95 y el tenor de P de ácido fítico constituye el 18,0 % del P total de la harina. La **actividad ureásica** (AOCS, Tentative Method Ba 9-58, 1963) fue nula y se observó una actividad antitriptérica (sustrato sintético, BAPA)<sup>19</sup> de 1,25 UTI/mg. Si bien el tenor proteico sobre harina libre de fibra es del orden del 42%, el nivel de lisina disponible es sumamente bajo (1,98 g/16gN).

b)- **Lípidos remanentes**— El agotamiento de los frutos por hexano extrajo la mayor parte de los lípidos no polares, restando en la harina lípidos principalmente polares extraíbles por mezclas ternarias tipo Folch (metanol: cloroformo: agua). Se observó un valor de 4,22% para lípidos polares (a los que designamos como "lípidos remanentes"). Este tratamiento proporcionó una nueva harina (agotada por hexano y por mezcla ternaria) que calentada a reflujo con solución etanólica de KOH al 6%<sup>20</sup>, permitió (ver Parte Experimental) el aislamiento, previa acidificación y extracción con éter de petróleo, de una mezcla de ácidos grasos e insaponificable que designamos como "lípidos retenidos".

El análisis mostró que el total de "lípidos remanentes" (4,22 % de harina seca de partida) estaba formado por 3,26 % de lípidos extraíbles por mezcla ternaria (designados como "lípidos polares") y 0,96% de "lípidos retenidos". Los "lípidos polares" se saponificaron y resolvieron en ácidos grasos e insaponificable y los primeros se analizaron (CGL de ésteres metílicos) obteniendo los siguientes valores de composición ácida: **r-12:0 (0,1); 12:0 (2,0); 14:0 (5,4); 15:0 (0,3); 16:0 (44,3); 16:1 (4,2); 18:0 (8,1); 18:1 (11,6); 18:2 (23,1) y 18:3 (0,8)**, con vestigios para **17:0 y 17:1** (índ. de yodo de los ácidos tot., calc.: 58,6).

En el insaponificable se investigó la presencia de esteroides con resultado negativo.

Los "lípidos retenidos" no son preexistentes dado que en su obtención se operó un proceso drástico de saponificación. Se los resolvió en insaponificable y ácidos grasos. El primero no reveló presencia de esteroides y los segundos (CGL de ésteres metílicos) observaron la siguiente composición ácida:

**11:0(0,6); 12:0 (2,2); 12:1? + r-13:0 (0,1); 13:0 (0,2); r-14:0 (0,1); 14:0 (5,6); 14:1? + r-15:0 (0,1); 15:0 (0,6); r-16:0 (0,2); 16:0 (25,8); 16:1 (2,2); 17:0 + 17:1 (0,6); 18:0 (5,6); 18:1 (19,6); 18:2 (27,7); 18:3 (1,4); 20:0 (2,2); 20:1 (0,6); 20:2 (2,7); 21:0 (0,8); 22:0 (1,1)** (índ. de yodo ácidos tot., calc. 79,1).

Se destaca el significativo N° de componentes ácidos de los "lípidos retenidos" y las notables diferencias en las composiciones ácidas del aceite crudo, "lípidos polares" y "lípidos retenidos". En este aspecto fueron notorias las elevadas concentraciones para **16:0** observadas en los "lípidos polares", así como las también elevadas en **18:2** en los aceites crudos.

Este estudio ha clarificado los principales aspectos de la composición química de los lípidos y composición general de la harina residual de extracción de frutos de **Carduus**

*nutans* L. Teniendo en cuenta el elevado tenor en insaponificable del aceite crudo de extracción (12,44%) y que como componentes del mismo se ha determinado aproximadamente un 50% entre escualeno (4,8% sobre aceite) y esteroides (0,96% sobre aceite), resultaría de interés proseguir el estudio de composición del 50% restante del material insaponificable.

### PARTE EXPERIMENTAL

- Materia prima** — Frutos maduros (aprox. 80 g) de *Carduus nutans* L. var. *Macrocephalus* (Desf.) Fiori et Beg., cosechados en los alrededores de la ciudad de Río Cuarto (prov. de Córdoba), en enero de 1979. En la Discusión figuran las determinaciones practicadas sobre estos frutos.
- Aceite crudo** — Se obtuvo por molienda y agotamiento de los frutos integrales con hexano técnico. De los extractos se recuperó el solvente (Rotavapor, vacío parcial) y el aceite crudo se llevó a peso constante en estufa de vacío (100°, 5 Torr.), calculando el valor de rendimiento y efectuando las determinaciones analíticas expuestas en la Discusión.
- Composición acídica** — Operando sobre el líquido resultante de la determinación del índice de saponificación, se aisló el **insaponificable** y recuperó los **ácidos totales** que se transformaron en **ésteres metílicos** por reflujo con MeOH anh. conteniendo 1,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador<sup>21</sup>. La composición acídica se determinó por CGL en columna de vidrio (3 m x 4,5 mm de diámetro int.) con relleno de Chromosorb W lavado ácido (60-80) conteniendo 15% de adipato de etilenglicol polímero como fase fija usando N como fase móvil y con detector de ionización de llama (T de horno y detector 194°). Se operó con inyecciones de 2 — 7  $\mu$  l de soluciones de ésteres al 5% en éter etílico. Las identificaciones se lograron según valores de T<sub>R</sub> y la composición final por triangulación y evaluación porcentual de áreas.
- Ensayos sobre ésteres metílicos hidrogenados** — Según Tiong y Waterman<sup>22</sup>, 50 mg de ésteres metílicos de ácidos totales se hidrogenaron (Pd/C 10%, ciclohexano) y los ésteres metílicos hidrogenados obtenidos se examinaron por CGL a través de una inyección masiva pudiendo identificar pequeños picos correspondientes a **13:0; 15:0, r-16:0; 17:0; 22:0 y 24:0**.

La composición acídica de los ésteres hidrogenados confirmó los valores hallados para la de los ácidos grasos totales.

- Composición de la fracción esteroides** — El insaponificable se fraccionó en capa delgada de silicagel G según Fedeli et al<sup>12</sup> y los esteroides totales aislados se resolvieron por CGL en columna de vidrio (1,80 m x 3,0 mm de diámetro int.) con relleno de Chromosorb G-HP (silanizado, 80-100) conteniendo 2% de OV-17 como fase fija y usando N como fase móvil. Detector de ionización de llama, temperatura de horno 260°, de inyector y detector 315° e inyectando 10  $\mu$  l de solución de esteroides al 5% en éter isopropílico. La presión de entrada del N se reguló para obtener máxima resolución del par crítico campesterol-stigmasterol. La identificación de los picos se logró a través de los valores de T<sub>R</sub>/colesterol y la composición (esteroides % de esteroides totales) por computación de áreas. En la Discusión se informó los resultados logrados.
- Harina residual de extracción**
  - Composición general** — En la Discusión se expusieron y comentaron con mención de los métodos analíticos usados, los valores obtenidos. Un detalle mayor puede verse en el Trabajo de Tesis de Fusero<sup>1</sup>
  - “Lípidos remanentes”** (“polares” y “retenidos”) <sup>20, 23-25</sup> 23 g de harina agotada por hexano se suspendieron en 230 ml de mezcla ternaria (C<sub>13</sub>CH:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O, 10:20:7,6 v/v), agitó periódicamente y centrifugó (2.800 rpm, 20 min.) a las 24 horas.

El insoluble se suspendió en 30 ml de dicha mezcla, centrifugó y volvió a suspender en otros 230 ml, prosiguiendo en la forma ya expuesta. Los líquidos reunidos se adicionaron de unos 100 ml de solución acuosa de KCl al 0,88%, separando la capa clorofórmica inferior y recuperando el solvente por destilación (Rotavapor, vacío parcial). El residuo se llevó a peso constante (100°, 5 Torr.) obteniendo 681,6 mg de "lípidos polares" (3,26% sobre harina de partida b.s.), que se resolvió en insaponificable (177,0 mg; 25,97% sobre lípidos de partida) y 106,2 mg (15,58% sobre lípidos de partida) de ácidos grasos totales.

Según las técnicas ya descriptas para el fraccionamiento del insaponificable en placa delgada, no se observó presencia de esteroides. Los ácidos grasos totales se examinaron por CGL de sus ésteres metílicos, con los resultados y comentarios que figuran en la Discusión.

10 g de la nueva harina (agotada por hexano y por mezcla ternaria; 6,01% de humedad) se hirvieron a reflujo por 1 hora con 100 ml de solución etanólica de KOH al 6%. Se enfrió, acidificó con  $H_2SO_4$  (1:1 v/v, placa de toque, heliantina) y centrifugó (20 min., 2.800 rpm). El insoluble se suspendió dos veces en 30 ml de etanol por vez, centrifugando y reuniendo los líquidos alcohólicos, que se extrajeron en ampolla con hexano técnico (3 extracciones con 100, 60 y 60 ml). Los extractos reunidos se lavaron con agua (tornasol), recuperó el solvente (Rotavapor, vacío parcial) y llevó a peso constante (vacío, 100°) obteniendo 95,6 mg (0,96% sobre harina de partida b.s.) de "lípidos retenidos", que se disolvieron en 30 ml de mezcla etanol: agua (2:1 v/v) alcalinizando con solución de KOH al 6% en etanol (fenolftaleína) y extrayendo el insaponificable con éter etílico (82,9 mg; 13,3% sobre "lípidos retenidos"). Se recuperaron los ácidos grasos totales (86,7% sobre "lípidos retenidos") que se examinaron por CGL como ésteres metílicos, con los resultados ya expuesto en la Discusión. El nuevo insaponificable tampoco contenía esteroides.

#### 7. Sobre la presencia de escualeno. Aislamiento del derivado dodecabromado.

Como se ha expuesto en la Discusión, en el aceite se registró un valor elevado para índice de yodo del insaponificable ( $\sim 200$ ) junto a un alto contenido en este último (12,44%). El N° de escualeno, determinado por la técnica de Fitelson, respondió a una cifra sumamente alta (4.800 mg %g). Por tanto se trató de investigar la presencia de escualeno, para lo cual 5 g de aceite se saponificaron por reflujo durante 2 horas con 50 ml de solución de KOH al 4% en etanol, diluyó con igual volumen de agua, enfrió y llevó a cabo una extracción con 150 ml de éter de petróleo<sup>26</sup> (en la extracción de insaponificable los compuestos más insaturados se extraen selectivamente por éter de petróleo en la primera o segunda extracción). Se eliminó el solvente (Rotavapor) y el residuo se disolvió en 20 ml de éter etílico anh., enfrió a  $-18^\circ$  con hielo y sal y agregó exceso de bromo, observando de inmediato la formación de un precipitado coposo blanco que se separó por centrifugación y lavó por suspensión y centrifugación con pequeñas porciones de éter etílico anh. a  $-15^\circ$ , hasta obtención de producto netamente blanco, que se secó en estufa a 100°. El producto oscureció sin fusión a 140-155°, proceso que se intensificó alrededor de los 180-200°, sin haber observado fusión definitiva con descomposición como se indica en la literatura<sup>27</sup>. Por aplicación de las técnicas de Schöniger<sup>28</sup> y White<sup>29</sup> se determinó el contenido en bromo: para  $C_{30}H_{50}Br_{12}$  (1368,9); Br % (calc.) 69,7; Br % (det.) 69,5 y 70,0.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Ing. Agr. Milan J. Dimitri por la clasificación botánica del vegetal motivo de este estudio, y a la Dra. Blanca B. de Deferrari y Lic. Marta Marcote (Lab. de Microanálisis) por la colaboración prestada.

## BIBLIOGRAFIA

1. S. N. Fusero, Tesis, Fac. Cienc. Exactas, Físico-Químicas y Nat. Univ. Nac. de Río Cuarto (Córdoba). "Estudios sobre malezas del suelo argentino-Frutos de *Cynara cardunculus* L. (Cardo de Castilla) y de *Carduus thoermeri* Weinm., *Carduus nutans* Auct., Compuestas (Cardo pendiente, Cardo del caballo, Cardo flor de caballo)", 1982.
2. A.L. Cabrera y E.M. Zardini, "Manual de la Flora de los alrededores de Buenos Aires", Ed. ACME, p. 686, 1978.
3. A.L. Cabrera, "Flora de la Provincia de Buenos Aires", Colección Científica, Tomo IV, parte IV, Ed. INTA, p. 325, 1967.
4. O.R. Soldano, "Semillas de Malezas", Boletín de divulgación N° 20, INTA, Est. Exptal. Agr. de Pergamino, 1962.
5. A. Marzocca, "Manual de Malezas", Ed. Hemisferio Sur, 3° Ed. p. 87, 93 y 444, 1979.
6. G. R. Bartlett, *J. Biol. Chem.*, 234, 466 (1959).
7. M.S. Vigo, Tesis, Fac. Cienc. Exactas y Nat., Univ. de Buenos Aires, 1972.
8. V. C. Mehlenbacher, "The Analysis of Fats and Oils", The Garrard Press Publ., Champaign, Illinois, p. 592, 1960.
9. J. Fitelson, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 26, 499 (1943).
10. M.H. Bertoni y P. Cattaneo, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 47, 52 (1959).
11. W.W. Marion, S.T. Maxon y R.M. Wengen. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47, 391 (1970).
12. E. Fedeli, A. Lanzani, P. Capella y G. Jacini, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43, 254 (1966).
13. A.O. Rucci y M.H. Bertoni, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 62, 365 (1974).
14. E. Conkerton y V. Frampton, *Archives of Biochem. and Biophys.*, 81, 130 (1959).
15. S.C. Revuelto, Tesis, Fac. Cienc. Exactas y Nat., Univ. de Buenos Aires, 1976.
16. R.L. Whister y M.L. Wolfrom "Methods in Carbohydrates Chemistry", Acad. Press, New York-London, Vol. II, p. 27, 1962.
17. E. Sthal, "Thin Layer Chromatography", Ed. Springer-Verlag, Berlin, p. 807, 1969.
18. L. Hough, J.K. Jones y W.W. Wadman, *J. Chem. Soc.*, 1702 (1950).
19. J.O. Bouzas y M.H. Bertoni, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 68, 81 (1980).
20. W. Szutowicz, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 254 (1965).
21. T.P. Hilditch y P.N. Williams, "The Chemical Constitution of Natural Fats", Chapman & Hall, 4° Ed., London, p. 688, 1964.
22. S.S. Tieng y H.I. Waterman, *Chimie et Industrie*, 81, 204 (1959).
23. J.M. Lyons y L.F. Lippert, *Lipids*, 1, 136 (1966).
24. E.N. Zerba, Tesis, Fac. Cienc. Exactas y Nat., Univ. de Buenos Aires, 1974.
25. G.O. Zaragoza, Tesis, Fac. Cienc. Exactas y Nat., Univ. de Buenos Aires, 1978.
26. P. Cattaneo, G. Karman y R. Rosovsky, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 33, 85 (1945).
27. P. Cattaneo y G. Karman, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 33, 110 (1945).
28. W. Schöniger, *Mikrochimica Acta*, 123 (1955)
29. D.C. White, *Mikrochimica Acta*, 449 (1961).



ESTUDIO CITOQUIMICO DE LOS ELEMENTOS FIGURADOS  
DE LA SANGRE DEL NEMERTINO  
*LINEUS LACTEUS* MONTAGU (HETERONEMERTEA).

por

JEAN-CLAUDE DESSELLE\*, GUY VERNET\* y HUMBERTO J.A. MORETTO\*\*

RESUMEN

En los elementos figurados de la sangre de la laguna sanguínea anterior de *Lineus lacteus* se investigaron: lípidos, glicógeno, peroxidadas, y fosfatasas ácidas y alcalinas.

ABSTRACT

Lipids, glycogen, peroxidases, acid and alkaline phosphatases were studied in the blood cells of the *Lineus lacteus* anterior blood lacuna. These products are largely confined to granulocytes and macrophages.

Los trabajos sobre los elementos figurados de la sangre de los nemertinos, publicados hasta hace unos cuarenta años, son antiguos (3) (6) (9) o no precisos (16) (17) (18). Con el objeto de la actualización de esos estudios, recientemente Vernet (23) y Vernet y Gontcharoff (20) (21) (22) (24) ensayaron diversas técnicas para el estudio de los hemocitos de los nemertinos, limitándose a especies del género *Lineus*, que es uno de los más comúnmente encontrado en el litoral de todos los mares (13) (14) (15). Los resultados experimentales que obtuvieron les han permitido describir en detalle los glóbulos rojos y su maduración, así como los cinco tipos de glóbulos blancos presentes en el líquido circulatorio de *Lineus lacteus*.

En el presente trabajo, expondremos nuestros resultados de un estudio citoquímico de los corpúsculos sanguíneos de *Lineus lacteus*, respecto a la presencia en ellos de lípidos, glicógeno, peroxidadas, y fosfatasas ácidas y alcalinas.

\* Doctores J.C. Desselles y G. Vernet  
Université de REIMS, Faculté des Sciences Laboratoire de Biologie Cellulaire. Moulin de la Housse,  
B.P. 347 51062 REIMS Cedex Francia.

\*\* Profesor Doctor Humberto J.A. Moretto. Cátedra de Invertebrados I. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

### MATERIAL Y METODOS

Los especímenes utilizados de *Lineus lacteus* nos habían sido remitidos por la Estación Biológica de Banyuls-sur-Mer (Francia). Los animales empleados en los ensayos lo fueron poco tiempo después de su llegada a nuestro laboratorio, a fin de que sus estados fisiológicos fueran los mejores posibles. De entre ellos seleccionamos los aparentemente sanos y con dimensiones corporales similares (10-12 cm de longitud). Sobre lotes de una veintena de individuos, realizamos las investigaciones citoquímicas siguientes:

- 1) Detección de lípidos por la "coloración" con el Negro Sudan B, según Scheehan y Storey (19).
- 2) Detección de glicógeno por la reacción del ácido peryódico-Schiff (APS), según MacManus (11).
- 3) Detección de peroxidasas por el método de Jacobs (7).
- 4) Detección de fosfatasas ácidas por el método de Kaplow y Burstone (8).
- 5) Detección de fosfatasas alcalinas por el método de Ackerman (1).

### RESULTADOS

El examen al microscopio fotónico de cortes histológicos coloreados con May-Grunwald-Giemsa, permite localizar en la laguna sanguínea anterior, por delante de los ganglios cerebroides, diversos tipos de elementos figurados en el líquido circulante, observándose eritrocitos, linfocitos, granulocitos y macrófagos (21).

La totalidad de nuestras observaciones respecto al estudio citoquímico de estos elementos figurados sanguíneos, están resumidas en el Cuadro N° 1. En éste se indica que:

- los lípidos se presentan en los granulocitos y los macrófagos, bajo la forma de un precipitado negruzco. No se los detecta ni en los eritrocitos ni en los linfocitos;
- gránulos de color rojo brillante dicen de la presencia de glicógeno en los granulocitos y los macrófagos quienes se muestran muy reactivos, mientras que ni los eritrocitos ni los linfocitos reaccionan al APS;
- en el citoplasma de los eritrocitos, de los granulocitos y de los macrófagos es observable una actividad peroxidásica intensa manifestada por un precipitado amarillo-pardo. Los linfocitos no poseen esta característica;
- se encuentran fosfatasas ácidas en el citoplasma de los granulocitos y los macrófagos. El método de Kaplow y Burstone permite localizarlas bajo la forma de gránulos azulados. Estos no aparecen ni en los eritrocitos ni en los linfocitos;
- un precipitado azulado pálido señala la existencia de fosfatasas alcalinas en el citoplasma de los granulocitos y de los macrófagos. Este precipitado no se observó en los eritrocitos y los linfocitos.

### DISCUSION

La actividad peroxidásica ligada a los eritrocitos de *Lineus lacteus* está de acuerdo con observaciones realizadas por otro autor en *Lineus fuscoviridis* (16). Si bien el rol fisiológico de esta actividad peroxidásica no ha sido todavía dilucidado de una manera clara, se puede pensar que al nivel del glóbulo rojo ella esté relacionada con la presencia de hemoglobina, puesto que desde hace tiempo se sabe que la hemoglobina actúa como una peroxidasa (10). En este caso la actividad peroxidásica estaría en relación con la respiración.

La distribución de fosfatasa ácida y alcalina en los granulocitos y de fosfatasa ácida en los macrófagos de *Lineus lacteus* es de la misma naturaleza que la constatada en ciertos vertebrados incluido el Hombre (2) (4) (5). Esta coincidencia de características habla en favor de una convergencia de funciones, en particular para los macrófagos (12).

La presencia de lípidos y glicógeno en el citoplasma de varios tipos de células sanguíneas de *Lineus lacteus* es, a nuestro conocimiento, informado por primera vez en los nemertinos.

CUADRO N° 1  
RESULTADOS DEL ESTUDIO CITOQUIMICO DE LOS  
ELEMENTOS FIGURADOS DE LA SANGRE DE *LINEUS LACTEUS*.

Hemocitos Detección de	Eritrocito	Linfocito	Granulocito	Macrófago
Lípidos	-	-	+	+
Glicógeno	-	-	++	++
Peroxidasas	++	-	++	++
Fosfatasa ácidos	-	-	+	+
Fosfatasa alcalinas	-	-	+	+

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 Ackerman, G.A., 1962. *Substituted naphthol AS phosphate derivatives for the localization of leucocyte alkaline phosphatase activity*. Lab. invest., 11, : 563.
- 2 Bessis, M.C., 1972. *Cellules du sang*, p. 434, Masson, edit. Paris.
- 3 Burger, O., 1895. *Fauna und Flora des Golfes von Neapel*, 22, : 743.
- 4 Carr, I., 1973. *The macrophage*. Acad. Press edit. Londres, New-Hork.
- 5 Caxton-Martins, A.E., 1978. *Cytochemistry of blood cells in two west African amphibians*. - J. Anat., 125: 231-235.
- 6 Hubrecht, A.A.W., 1874. *Gefäßsystem und Blut*. Niederl. Arch. Zool., 2, : 119-129.
- 7 Jacobs, A., 1958. *Staining for leucocyte peroxidase*. Lancet, 1, : 697.
- 8 Kaplow, L.S. y M.S. Burstone, 1964. *Cytochemical demonstration of acid phosphatase in haematopoietic cells in Health and in various haematological disorders using azo-dye techniques*. J. Histochem. Cytochem., 12, : 805.
- 9 Lankaster, E.R., 1872. *A contribution to the knowledge of haemoglobin*. Proc. Roy. Soc. London, 140, : 70.

- 10 Lison, L., 1960. *Histochimie et Cytochimie animales*. Gauthier-Villars, edit. Paris, Vol. II, : 549.
- 11 MacManus, J.F.A., 1946. *Oxidation of mucin with periodic-acid producing the capacity of stain with Schiff's reagent*. Nature, 158, : 202.
- 12 Manning, M.J. y R.J. Turner, 1976. *Comparative immunology*. Blakie edit. Glasgow et Londres, : 10.
- 13 Moretto, H.J.A., 1971. *Un heteronemertino de la costa atlántica bonaerense*. Neotropica, 17, (52), : 5-11.
- 14 Moretto, H.J.A., 1974. *Sobre el Lineus bonaerensis Moretto, 1971*. Neotropica, 20, (62), : 97-103.
- 15 Moretto, H.J.A., G. Vernet y M. Gontcharoff, 1976. *Aspects anatomo-histologiques de quelques Lineidae*. Bull.Soc. Zool.France 101, (2), : 221-230.
- 16 Ohuye, T., 1942. *On the blood corpuscles and the hemopoiesis of a nemertean Lineus fuscoviridis, and of a sipunculus Dendrostoma minor*. Sci. Repets. Tohoku Imper. Univ., (4), (Biol.), 17, :187-196.
- 17 Prenant, M., 1922. *Recherches sur le parenchyme des Plathelminthes. Essai d'histologie comparée*. Arch. Morph. Gen. Exp., 5, : 90.
- 18 Riepen, O, 1933. *Anatomie und Histologie von Malacobdella grossa (Müll.)*. Z.f. wiss. Zool., 143, : 324-496.
- 19 Sheehan, H.L. y G.W. Storey, 1947. *An improved method of staining leucocyt granules with Sudan black B*. J. Path. Bact., 59, : 336-337.
- 30 Vernet, G. y M. Gontcharoff, 1975. *Etude autoradiographique de l'incorporation de l'acide deltamino-lévolulinique<sup>3H</sup> et du <sup>55</sup>Fe dans les éléments figurés du sang de Lineus lacteus Montagu (Hétéronémerte)*. C.R. Acad. Sci. Paris Série D, 280, : 1413-1415.
- 21 Vernet, G. y M. Gontcharoff, 1976. *Cytological study of the blood corpuscles of Lineus lacteus (Rhynchocoela, Lineidae)*. Cytobios, 17, : 137-140.
- 22 Vernet, G. y M. Gontcharoff, 1977. *Sur l'existence de macrophages chez Lineus lacteus Montagu (Hétéronémerte)*. C.R. Acad. Sci. Paris Série D, 285, : 187-188.
- 23 Vernet, G., 1979. *Fine structure of the nemertean worm Lineus lacteus red blood corpuscles*. Cytobios, 24:43-46.
- 24 Vernet, G. y M. Gontcharoff, 1980. *Etude de la maturation de la lignée des globules rouges du sang du Némertien Lineus lacteus Montagu (Hétéronémerte)*. C.R.A. Acad. Sci. Paris, Série D, 290: 473-476.

## MICROBIOLOGIA DE LAS AGUAS MINERALES

por la Dra. JUANA DURIEUX DE MAZZA\*

Teniendo en cuenta la divulgación que ha tenido en los últimos tiempos en nuestro ambiente, la comercialización de agua mineral contaminada, nos ha parecido interesante reunir en un escrito, los trabajos presentados al "Congresso Internazionale sulla Batteriologia delle Acque Minerali Naturali" efectuado en Roma en 1975.

Todos ellos son altamente representativos, por ser dirigidos por científicos de renombre mundial como D.A.A. Mossel de la Cátedra de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Utrecht (Holanda), H. Leclerc del Instituto Pasteur de Lille (Francia); R. Merino del "Centro Nacional de Salmonelosis" de la Escuela Nacional de Sanidad de Madrid (España) y otros.

Los temas tratados se orientan hacia el estudio 1) de la microflora del agua mineral sin gas y su significado; 2) de la importancia de las prácticas higiénicas durante la recolección y el embotellamiento de las aguas minerales; 3) de los estándares sugeridos y de los métodos microbiológicos adecuados y 4) de los criterios de evaluación de las características higiénicas y microbiológicas de las aguas minerales.

### CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL AGUA MINERAL, NATURAL, SIN GAS.

Esta agua, como todas las aguas provenientes de fuentes naturales nunca es completamente estéril pero sí muy pobre en gérmenes. El recuento aerobio es del orden de magnitud de 1 a 20 bacterias/ml pero después del embotellamiento se produce un aumento significativo de microorganismos y su número puede llegar a valores de 10.000 a 100.000 bacterias/ml.

Los grupos de microorganismos de la flora bacteriana del agua mineral pueden ser de origen y caracteres muy diversos.

Coexisten dos grupos de bacterias correspondientes a

- 1) Contaminación o microflora alóctona
  - y 2) Contaminación o microflora autóctona o propia del sustrato.
- 1) **Microflora alóctona**

Esta microflora es la que penetra en el agua mineral durante el embotellamiento.

\*

Exposición (22/4/81) en el Seminario sobre Temas Especiales de Bromatología y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Bromatología), Universidad de Buenos Aires.

Las fuentes de polución durante esta etapa son las siguientes: 1) envases, 2) las tapas ó cápsulas, 3) el aire y 4) las plantas de embotellamiento.

**Envases.** Actualmente se prefieren los recipientes de plástico; desde el punto de vista sanitario es un adelanto ya que las botellas de vidrio y sus tapas representan la principal fuente de polución.

Como regla, las botellas de plástico en su fase de extrusión alcanzan temperaturas de 230°C durante algunos minutos. De este modo las formas vegetativas, los conidios y la mayor parte de las esporas bacterianas se destruyen.

El peligro de los envases de vidrio es que no estén perfectamente enjuagados.

**Cápsulas.** En la mayoría de los casos, también se confeccionan de plástico y se fabrican poco antes de su uso. A lo sumo estarán contaminadas con algunas esporas bacterianas.

**Aire.** La principal contaminación de las botellas y sus cápsulas se produce por el aire. La mayoría de los microorganismos está constituida por esporas de los bacilos, conidios y las bacterias Gram positivas más resistentes como ser los micrococcos.

**Plantas de embotellamiento.** Los diferentes sectores del equipo de embotellamiento deben estar perfectamente lubricados. En la delgada capa de aceite pueden sobrevivir las bacterias y en ciertas condiciones pueden multiplicarse.

Aún más, pueden penetrar en el agua mineral durante el embotellamiento; existe aún un mayor riesgo de contaminación si el equipo debe ser reparado o si los terminales deben cambiarse y se manipulean con poca higiene.

#### A) Flora contaminante transitoria.

En la actualidad es aún imposible efectuar un embotellamiento aséptico al 100%

Por un lado el producto a embotellar no está libre de bacterias y por otro lado el factor determinante no está constituido sólo por el orden absoluto de magnitud de la contaminación microbiana sino también por el tipo de microorganismos que constituyen la flora contaminante del sustrato embotellado.

El agua mineral no carbonatada, es un sustrato muy desfavorable al crecimiento de microorganismos exigentes.

En este sustrato un notable porcentaje de la microflora contaminante, muere rápidamente; un porcentaje adicional se vuelve lentamente inactivo o retiene por largo tiempo la habilidad de reproducirse y aún puede llegar a no reproducirse.

O sea que debe considerarse esa flora como contaminante transitoria.

Esto no se aplica a varias especies de bacilos, a ciertas enterobacterias, ni tampoco a *Pseudomonas fluorescens* y *aeruginosa*.

**Resumiendo:** debemos establecer que la flora contaminante que penetra en el agua mineral no carbonatada durante el embotellamiento es prevalentemente transitoria, o sea que no se produce multiplicación como regla, pero sólo una leve y gradual inactivación de los contaminantes.

Deben intervenir algunos efectos de antagonismo o competición provenientes de la flora autóctona.

#### B) Flora contaminante permanente.

Desde el punto de vista sanitario son mucho más difíciles de resolver los problemas que se relacionan con esta flora.

Está formada por un grupo específico de bacterias Gram negativas que pueden desarrollar rápida y profusamente en sustratos muy pobres en nutrientes.

Se la llama oligotróficos y más habitualmente "oligocarbotolerantes". La especie más importante que aparece en las aguas minerales es la *Ps. aeruginosa*. Otras especies de *Pseudomonas* como *cepacia (multivorans)* también caen en este grupo.

Desde un punto de vista nutricional se dice a menudo que éstas como las bacterias de la flora saprofita son autotróficas.

Conviene ser prudente con este punto, pues en la autotrofia estricta la fuente de carbono es obligatoriamente el  $\text{CO}_2$  ó las sales del ácido carbónico. Es más lógico pensar que estas bacterias son heterotróficas o a lo sumo autotróficas facultativas. En la heterotrofia, la fuente de carbono es obligatoriamente un compuesto orgánico. De ahí nuestra preferencia por el término "oligocarbotolerante".

El origen de esas *Pseudomonas* es humano o animal y son cepas mesófilas.

Pueden desarrollar a  $37^\circ\text{C}$  o también a temperaturas más altas como a  $42^\circ\text{C}$ . No son psicrotróficas.

Estas cepas están adquiriendo importancia como agentes de infecciones hospitalarias secundarias, por ser resistentes a los antibióticos.

La *Ps. aeruginosa* es también supuesto agente de infecciones alimentarias.

En los últimos años un gran número de análisis ha demostrado que por sus reducidos requerimientos nutritivos y su marcada facilidad de reproducción y supervivencia en cualquier tipo de agua pobre en nutrientes como por su alta resistencia a los desinfectantes, es factible su diseminación en todos los sectores clínicos.

Estos contaminantes permanentes "oligocarbotolerantes" son mucho más peligrosos, desde el punto de vista sanitario, que los contaminantes transitorios, porque también pueden seguir creciendo en el agua mineral.

Es pues necesario adoptar todas las medidas adecuadas para prevenir una contaminación particularmente en la planta de embotellamiento proveniente de operarios que trabajan sin guantes.

En el caso de un cierre transitorio, las bacterias pueden entrar en las cañerías y multiplicarse en los terminales de los tanques y en otros lugares donde el agua se inmoviliza por un tiempo.

Es en esos lugares, donde circula el agua mineral, que puede sobrevenir una contaminación constante antes del embotellado.

De cualquier forma, los innumerables controles microbiológicos nunca demostraron un número muy alto de *Ps. aeruginosa* o *cepacia* en aguas minerales embotelladas.

## 2) Microflora autóctona.

El agua mineral que proviene de la fuente y es embotellada inmediatamente, ya se dijo que tiene pocas bacterias.

El recuento aerobio es del orden de 1 a 2 bacteria/ml si se usa por ej. recuento en placa en profundidad con medio nutritivos común e incubación a  $20-22^\circ\text{C}$  o por membrana filtrante con poros de  $0,5\ \mu$  de diámetro.

Usando medios de cultivo pobres en nutrientes con siembra en superficie y mayores períodos de incubación, el número de colonias es mayor; es del rango de 10 a 20/ml y corresponde al número real de bacterias.

Si se usan membranas filtrantes con poros de  $0,1\ \mu$  de diámetro el número de colonias aumenta también notablemente. O sea que un gran número de células son más pequeñas que  $0,5\ \mu$  de largo.

El tamaño sumamente pequeño de las células es una característica de la flora autóctona. Las bacterias que la componen son alrededor de  $1/3$  o  $1/4$  de las células bacterianas normales y aún en el caso de un crecimiento abundante en el agua embotellada, no se produce turbidez en el agua.

Las poblaciones mixtas naturales, muestran la misma regularidad de crecimiento que los cultivos puros en medios estáticos, con una fase "lag" o de reposo, una logarítmica, otra estacionaria y otra decreciente.

La única diferencia estriba en que en el agua muy pobre de nutrientes, se produce un rápido descenso en el número de células capaces de reproducción después de llegar a la fase estacionaria. A menudo se produce luego un nuevo aumento en el número de células obteniéndose una segunda fase exponencial.

Esto puede suceder más de una vez, sobre todo durante un largo período de almacenamiento.

Se presume que los productos de autólisis y la disgregación de las células muertas, son utilizadas como nutrientes por las nuevas poblaciones.

### ESPECIES BACTERIANAS DE LA MICROFLORA AUTOCTONA, SUS PROPIEDADES, SU SIGNIFICADO.

La flora banal del agua mineral está casi exclusivamente compuesta por bastones Gram negativos no esporulados. De acuerdo a la clasificación de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, estas bacterias pertenecen ya sea a la familia *Pseudomonadaceae* con sus dos géneros *Pseudomonas* y *Xantomonas* o a la ex-familia de los *Achromobacteriaceae*, con sus géneros *Flavobacterium* y *Achromobacter*.

La distinción en especies de éstos generos es muy delicada y puede variar de uno a otro autor.

Es el caso por ej. del género *Pseudomonas*, donde aparte de la *Ps. aeruginosa*, bien individualizada como patógena, la distinción en especies de las demás se basa entre otras cosas, en la presencia de una enzima proteolítica capaz de hidrolizar la gelatina. Pero este carácter es inestable. Las células hijas aisladas de una colonia gelatinosa positiva poseen o no este carácter o inversamente.

Está actualmente bien establecido que las bacterias banales presentes en las aguas minerales embotelladas o no, están desprovistas de poder patógeno porque no producen metabolitos tóxicos y porque son incapaces de desarrollar en el tubo digestivo del consumidor.

Durante el período de embotellamiento en envases de plástico, ciertas sustancias que provienen del polímero, pueden ser usadas por las presentes en el agua mineral como nutrientes adicionales.

Todas las bacterias de la flora autóctona son incuestionablemente psicrófilas. Muy raras veces se extiende la temperatura máxima de crecimiento a los 25-30° C. La temperatura óptima de crecimiento es de 20°C.

Un agua mineral posee siempre su propia flora compuesta de esos microorganismos habitualmente calificados de banales.

En cualquier napa las condiciones físico-químicas del medio son habitualmente constantes y por lo tanto también deben serlo las poblaciones bacterianas.

En la determinación cuantitativa de la flora autóctona total es de importancia la elección correcta del medio de cultivo.

En el agua embotellada, el nivel de la población bacteriana banal no tiene significado higiénico, ya que puede variar en proporciones considerables en función de las condiciones de almacenamiento, de la naturaleza del envase y de la duración del tiempo de almacenamiento.

La presencia de esta flora banal en el agua mineral que no ha sido tratada, prueba que no se ha aplicado ningún tratamiento, lo que constituye uno de los mayores intereses de las aguas naturales.

Como consecuencia podemos acotar que el incremento bacteriano después del embotellamiento del agua pobre en nutrientes, es enteramente un proceso biológico normal.

### IMPORTANCIA DE LAS PRACTICAS HIGIENICAS DURANTE LA RECOLECCION Y EMBOTELLAMIENTO DE AGUAS MINERALES

En algunos países como Francia, la denominación de "agua mineral" está reservada al agua dotada de propiedades terapéuticas.

En otros países como Alemania, el agua mineral es un agua fuertemente mineralizada que debe contener como mínimo 1 g de extracto seco/litro.

En la Argentina, de acuerdo con el grado de mineralización determinado por el residuo seco a 180°C las aguas minerales se clasifican en:

- a) Oligometálicas: cuando contengan entre 50 y 100 mg/litro.
- b) De mineralización muy débil: cuando contengan entre 101 y 250 mg/litro.
- c) De mineralización débil: cuando contengan entre 251 y 500 mg/litro.
- d) De mineralización media: entre 501 y 1500 mg/litro.
- e) De mineralización fuerte: cuando contengan entre 1501 y 2000 mg/litro.

O sea que el residuo seco a 180°C no será menor de 50 mg/litro ni mayor de 2000 mg/litro.

El agua no debe contener materia orgánica discernible; debe ser pura desde el punto de vista microbiológico, o sea prácticamente estéril y debería quedar en este estado durante todas las fases del proceso de embotellamiento.

Para mantener esta alta calidad, los lugares de origen de la fuente deben estar desprovistos de contaminación, las instalaciones de la extracción de agua y del embotellamiento deben ser capaces de prevenir cualquier contaminación externa.

El personal deberá tener vestimenta protectora y controlarse periódicamente de enfermedades infecciosas que podrían transmitirse por el agua.

El control del agua se hará por análisis regulares y frecuentes de muestras de agua y de aire, tomadas en diferentes puntos del proceso.

Un problema nuevo que se presenta es el riesgo de contaminación con ciertos materiales en contacto con el agua que podrían contener sustancias capaces de favorecer el desarrollo de bacterias saprófitas. Estas bacterias contaminarían el agua produciendo un sabor, un olor y una coloración particulares, volviendo turbia el agua, lo cual es presencia evidente de bacterias.

El reglamento de práctica que se quiere dejar asentado para obtener mejores resultados, parece algo ideal, sin embargo debería tratar de cumplirse con vigilancia constante por aquellas personas que tienen este control a su cargo.

### METODOS MICROBIOLÓGICOS Y STANDARDS SUGERIDOS

No hay duda que se pueden elegir los métodos adecuados a nuestras necesidades entre los innumerables que figuran en los manuales de métodos analíticos de aguas europeas o internacionales. Lo que es importante es que en todos los Laboratorios de un país se trabaje con el mismo método analítico para que los resultados sean siempre comparables, con el fin de uniformar los métodos de trabajo y los criterios de interpretación.

España que es un país muy rico en fuentes de agua mineral, tiene la legislación siguiente desde 1975.

Parásitos y m.o. patógenos: ausencia total

Recuento total de hongos:

ausencia

Recuento total de coliformes:

en

Escherichia coli:

100 ml.

Recuento de Streptococcus:

Recuento de Clostridios sulfito-reductores:

*Pseudomonas aeruginosa*: ausencia total

El Código Alimentario Argentino, no tiene legislación microbiológica para las aguas minerales, pero sí para las aguas mineralizadas, que es bastante parecida a la que acabamos de describir.

En lo que concierne a los aspectos microbiológicos, en relación a la flora "oligocarbotolerante" específica de cada fuente de agua mineral representada por especies de los géneros *Xantomonas* y *Pseudomonas*, se llegó a la conclusión que debemos respetar la eco-biología de las aguas profundas, con su contenido microbiano autóctono, no patógeno y que juega muy posiblemente un papel importante en la reconstrucción de la flora microbiana intestinal en una época en que los antibióticos, los antisépticos y los insecticidas están de moda.

Por otro lado, el hecho de eliminar la flora autóctona significa que se admite un proceso de esterilización que puede ser nocivo.

La presencia de *Ps. aeruginosa* supone una deficiencia técnica en el lavado de las botellas, una instalación inadecuada de embotellamiento o la presencia de manipuladores de agua portadores de *Ps. aeruginosa*.

Enfermedades entéricas de distintos origen (salmonelosis, shigelosis y yersiniosis) pueden ser transmitidas por el agua aún poco contaminada con la bacteria causante.

Esto parecería contradecir los números elevados de células bacterianas del orden de  $10^6$  que parecen necesarios para producir, ya sea salmonelosis ó shigelosis cuando estas bacterias se encuentran en alimentos.

Esta aparente contradicción fué rápidamente aclarada con explicaciones sencillas.

Cuando se ingiere agua entre comidas, ésta pasa el área pilórica sin demora. Los patógenos entéricos que pudieran existir, están difícilmente expuestos al efecto bactericida del jugo gástrico, o sea que llegan al duodeno casi en la misma cantidad que al ingerirse, y por consiguiente pueden producir enfermedad.

Por otro lado los patógenos entéricos, cuando son absorbidos con los alimentos, tienen una retención intragástrica considerable, produciéndose una gran reducción del número de microorganismos, o sea que la dosis infectiva de patógenos entéricos debe ser muy baja.

Veamos la situación. Aguas inicialmente pobres en nutrientes, pueden producir un riesgo.

Si en estos productos, bacterias oligocarfilicas, llegan a desarrollar en gran número, se va a producir un crecimiento secundario de bacterias estrictamente heterotróficas, como ser las bacterias enteropatógenas, que aprovechan la materia orgánica de las primeras para crecer.

## OBSERVACIONES SOBRE EL ENVASE

Se ha comparado el aumento de la carga bacteriana del agua mineral en distintos envases: P.V.C; polietileno y envases de vidrio.

Se consideraron distintas temperaturas de crecimiento durante 18 semanas en los distintos envases.

Se reveló que la carga microbiana de todas las muestras de agua confeccionadas en P.V.C. a cualquier temperatura presentan valores significativamente más elevados que los que se encuentran en las botellas de vidrio, pero con el tiempo, esos valores tienden a confluir.

Recordaremos con este propósito que distintos autores atribuyen esa diferencia, a la naturaleza del envase; según otros la diferencia de recuento se debe a la distinta rugosidad de la superficie interna del envase.

Tal rugosidad produce nichos que por varios motivos, favorecen el crecimiento de los clones bacterianos.

En el curso de estas experiencias, y con la ayuda de gráficos, se revelaron "picos" de crecimiento de la carga microbiana.

Tales "picos" pueden estar relacionados con la carga del sustrato (agua mineral) seguido de la lisis de la flora microbiana ó de la modificación de las condiciones de antagonismo microbiano que se pueden encontrar eventualmente en el agua después del embotellamiento.

### CRITERIOS DE EVALUACION DE LAS CARACTERISTICAS HIGIENICAS Y MICROBIOLOGICAS DE LAS AGUAS MINERALES

La evaluación de la calidad microbiológica de las aguas minerales depende estrechamente de su definición: aguas dotadas de propiedades terapéuticas, aguas fuertemente mineralizadas, etc.

En su origen, el agua mineral está excepcionalmente contaminada con gérmenes peligrosos, aún cuando contiene ciertos microorganismos saprófitos en número habitualmente constante.

Es la técnica del embotellado, la que es habitualmente responsable de las contaminaciones encontradas; embalaje, atmósfera de los ambientes, personal, etc.

En estas condiciones los criterios de evaluación, deben ampliarse con respecto a los que interesan al agua de la red de distribución.

Se pueden distinguir los que corresponden a riesgos reales perfectamente conocidos y los que tienen que ver con peligros más hipotéticos.

Los primeros involucran contaminaciones fecales (*Salmonellas*, *Streptococcus faecalis*, Clostridios-sulfito-reductores, bacteriófagos fecales) contaminaciones cutáneo-mucosas (*Staphylococcus aureus*, *Ps. aeruginosa*). Se deben vigilar con extrema severidad.

Los segundos conciernen a los gérmenes saprófitos oligotróficos.

Su incidencia en Salud Pública, no puede discutirse en el estado actual sobre bases serias. Lo mismo puede decirse sobre la presencia de amebas, que aparecen frecuentemente en las aguas de esta naturaleza.

### CONTAMINACION AMEBIANA

Se ha hablado mucho en los últimos años de casos de meningo encefalitis amebianas primitivas (MEAP) generalmente provenientes del agua de pileta. Se conocen un centenar de casos fatales.

Estas infecciones son producidas por muy pocas especies del mundo de las amebas. La más frecuente es la *Naegleria fowleri*.

Su presencia en las aguas de pileta, suscitó interés en los científicos y los incitó a buscarlas en las aguas de consumo.

Efectivamente, existen amebas en las aguas de la red de distribución y en las aguas minerales embotelladas. Siempre se trata de amebas no patógenas. De cualquier manera ha nacido un nuevo problema.

Puede aceptarse la presencia de estas amebas aún no patógenas en las aguas de consumo?

Algunos han adelantado la hipótesis según la cual el agente causal de la MEAP no sería la ameba en sí, pero un elemento infeccioso verosímilmente viral, llevado por la ameba.

Esto abre nuevos horizontes acerca del papel de estos agentes vectores en la epidemiología de las enfermedades infecciosas transmitidas por el agua, sobre todo si se traspasan esas posibilidades al caso de la hepatitis infecciosa.

Como conclusión diremos que la calidad bacteriológica de una agua mineral descansa sobre dos criterios: uno corresponde a riesgos reales, perfectamente conocidos y el otro deriva de peligros hipotéticos.

## ADITIVOS ALIMENTARIOS

por

Pedro Cattaneo

Conferencia pronunciada en la Fundación Pedro Escudero (al Servicio de la Nutrición humana) en el Hospital de Clínicas, Buenos Aires, 7 de setiembre de 1981 y en la Universidad Nacional de Misiones, el 16 de octubre de 1981.

A mediados del siglo pasado Pasteur destruyó la teoría de la generación espontánea, hecho coincidente con el desarrollo creciente de la síntesis en el campo de la Química Orgánica. Como consecuencia de esto último muchas sustancias orgánicas y otras minerales se usaron para combatir la proliferación, contaminación y putrefacción de alimentos por microorganismos. Esas sustancias se denominaron conservadores o preservadores químicos y se emplearon inicialmente al margen de toda evaluación toxicológica. Cuando este tipo de control se inició, diversas sustancias fueron prohibidas en su uso (formaldehído, ácido salicílico, ácido monobromacético, ácido bórico, compuestos mercuriales, etc.). Finalmente entró a regir la prudente posición de exigir para ser admitidas como preservadores químicos que tales sustancias no debían provocar riesgos para la salud, en las condiciones de uso.

Durante los últimos 60 años nuestra sociedad pasó de una señalada condición rural a otra de convivencia urbana. Los consumidores de alimentos están muy alejados de las zonas de producción de materias primas, alimentos frescos y muchas veces de los preservados. A medida que la población mundial crece aumenta la tendencia a la convivencia en grandes ciudades y con ello, cada vez más, disminuye el número de personas que producen sus propios alimentos. El suministro de éstos a esas poblaciones importa aumentar los rendimientos del agro, eliminar riesgos de deterioro de los productos del mismo, preservarlos, estacionarlos y finalmente industrializarlos del modo más conveniente, es decir con máximo rendimiento en sus fines (significativamente alimentarios) y aprovechamiento de subproductos, tanto de la producción agrícola como de los de su industrialización. Esto último con una doble finalidad: dar mayor valor a la materia prima y evitar desperdicios que, indebidamente ubicados, crean problemas de insalubridad ambiental y de población.

\* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Dpto. de Química Orgánica (Orientación Bromatología y Tecnología de Alimentos). Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pab. 2. (1428) Buenos Aires.

En consecuencia y de continuo crecen el procesamiento, estacionamiento y transporte de materias primas, alimentos y subproductos para satisfacer la ración diaria del hombre del presente..

Las bases del conocimiento, que emergen de mediados del siglo pasado, sentaron la fundamentación científica de los sistemas tradicionales de preservación de alimentos, creándose nuevas e importantes disciplinas básicas y aplicadas, tales la Ciencia, la Tecnología y la Ingeniería de los Alimentos. Todo esto para dar el mejor destino posible a los frutos de la Ciencia y Tecnología Agropecuaria, de las que aquellas dependen en gran medida. Resumiendo, una gran industria, la Alimentaria, experimentó un cambio de proporciones a consecuencia del impacto científico y de la evolución de nuestra organización social. El tema de los "*Aditivos Alimentarios*" reviste un interés muy amplio revelado especialmente durante los últimos 60 años como resultado del desarrollo tecnológico. Tratemos de comprenderlos y finalmente definirlos fijando sus alcances.

En el concepto moderno, el término *preservación* aplicado a los alimentos y sus materias primas, comprende numerosos aspectos y no solamente la prevención o retardo de contaminaciones microbianas. La preservación importa asegurar la "*calidad*", un término no muy bien comprendido por muchos y que tiene relación directa con la llamada "*aceptabilidad*" por parte del consumidor. Tal vez con un ejemplo podamos explicar la mejor manera de clarificar lo expuesto. Sea la "*margarina*". Napoleón III alarmado por la disminución y alto costo de la manteca en Francia ofreció en 1860 un premio a quien produjera un sustituto adecuado, que fue ganado por Mége-Mouriér en julio de 1869 (patente francesa N° 86.480). Dos notables avances en la tecnología de las grasas alimenticias, la producción del primer sustituto de la manteca y la conversión de las grasas líquidas en sólidas o semisólidas por hidrogenación catalítica se iniciaron en escala industrial poco antes de guerras europeas: la de Mége-Mouriér precedió levemente a la guerra Franco-Prusiana (1870), mientras la hidrogenación de grasas a la de 1914-1918 por un lapso algo mayor, desde que el proceso Norman de hidrogenación se patentó en Alemania en 1902 y en Inglaterra en 1903 y se operó en escala de 100 ton/semana en Inglaterra en 1909.

En el proceso original de producción de margarina la grasa vacuna se obtenía por fusión a 45° con agua ligeramente acidificada y tratada con jugos estomacales de cerdo (se creía que ello modificaba los ácidos grasos semeando a los de la manteca). La grasa, luego de lavada, se enfriaba a 25° y la masa semisólida se prensaba y resolvía en dos partes: *oleoestearina* y una fracción de menor temperatura de fusión (*oleomargarina*) de consistencia similar a la manteca. Esta última se batía con leche descremada en presencia de trazas de un macerado de ubre de vaca y la emulsión, semeando a la crema, se procesaba como las mantecas. El producto en Francia se expendía con las designaciones de "Buterina" "Manteca artificial", "Oleomargarina" o "Margarina", este último término, obligatorio en Inglaterra desde 1887 y en los EE.UU. de N.A. hasta 1952 año en el que se autorizó también el de margarina. Con el tiempo los agregados de ácidos y de macerados de ubre se abandonaron, precisando el objetivo esencial: producir una grasa comestible extensible como la manteca de consistencia similar. Ello se resolvió emulsificando una grasa de textura apropiada con leche descremada.

Modernamente la "*Margarina*" se define como "un sistema heterogéneo constituido por una *fase acuosa* finamente dispersa en una *fase grasa* continua de características plásticas. Su aceptabilidad depende de su calidad y esta última comprende la consideración de todas las materias primas usadas, del proceso, del equipo de elaboración y de su acondicionamiento hasta el consumo. En su gran mayoría y al presente se elaboran en base a aceites vegetales, grasas animales enteras o fraccionadas o sus mezclas modificadas

principalmente por hidrogenación adecuada. Esto importa en la fabricación el uso de un primer aditivo, el o los *catalizadores* de la hidrogenación (Ni, Cu, Cr, etc.) que deberán estar ausentes en el producto terminado. En algunos casos la composición glicerídica de la fase grasa deberá modificarse hacia otra más conveniente respecto de la temperatura de fusión o de su plasticidad o textura. En ese caso se adicionan otros aditivos, los catalizadores de la *interesterificación*, el más común de los cuales es el metóxido de sodio que en su acción engendra jabones sódicos. El metóxido debe destruirse una vez cumplida su misión y los jabones eliminarse totalmente o no superar cierta concentración límite en el producto terminado. Este tipo de aditivos se designa como "*aditivos incidentales*". Como los pesticidas, plaguicidas, etc., de la moderna agricultura deben eliminarse de las materias primas tratadas y sólo se toleran en el orden de las trazas en los productos terminados.

La fase grasa así obtenida se añade de aditivos de otra clase, los llamados "*aditivos intencionales*" que cumplen en el producto terminado importantes funciones. Es sabido que la ingestión diaria de grasas autoxidadas (grasas rancias) conduce, en función del tiempo a fenómenos varios de toxicidad y no solamente, como se creyó por mucho tiempo, al rechazo del producto por su sabor o "flavor" anormales. Si predominan en las elaboraciones las grasas animales que, como es sabido carecen prácticamente de defensas naturales frente a la autoxidación, los riesgos de estas últimas serán mayores. Para prevenir ese proceso se usan aditivos llamados *antioxidantes primarios* como el BHT, el BHA, la TBHQ, diversos ésteres del ácido gálico o sus mezclas adecuadas entre los productos de síntesis, o concentrados de tocoferoles (de origen natural) y según los casos los aditivos llamados *antioxidantes secundarios* o *sinergistas*, generalmente ácidos o ésteres de ácidos orgánicos hidroxilados, monoestearato de ascorbilo, etc., que principalmente actúan en la captación de *iones pro-oxidantes* metálicos como ser trazas de ión Cu, prolongando así la acción protectora de los antioxidantes primarios.

Además, la fase grasa deberá agregarse de un aditivo *emulsificante* que asegure la formación de una emulsión fina y estable de la fase acuosa. Los más corrientes son los monoglicéridos de ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico o sus mezclas) y también de *pigmentos liposolubles* (carotenoides naturales o de síntesis, vitamina A natural o de síntesis o sus mezclas, etc.) para lograr en el producto terminado una tonalidad adecuada, uniforme y estable en función del tiempo o época del año. Otros aditivos intencionales integran modernamente la fase grasa de una margarina, por ejemplo las llamadas *grasas acetiladas* o "*acetin fats*" que químicamente son monoglicéridos diacetilados. En determinadas concentraciones aumentan y mejoran el carácter plástico de la fase grasa y la hacen de poca variación por disminución de la temperatura (por ej. en estacionamiento en una heladera). Finalmente si una margarina ha de emplearse en frituras, la fase grasa deberá adicionarse de fosfolípidos (*lecitina para uso alimentario*) para impedir por fusión en una sartén la destrucción de la emulsión acuosa, con formación de gruesas gotas de esa fase debajo de la fase grasa fundida y que por sobrecalentamiento se vaporizarán en forma brusca provocando salpicaduras de la fase grasa caliente sobrenadante. Un tal aditivo se designa *antisalpicante* y permite que una margarina se comporte como la mantequilla en una fritura.

Consideremos ahora la *fase acuosa* (fase dispersa) de la margarina. Por su composición (contiene en solución compuestos minerales, azúcares, proteínas, etc.) está propensa al desarrollo de hongos y de otros microorganismos. Aún con buena práctica higiénica la experiencia aconseja prevenir esos desarrollos empleando *aditivos fungistáticos*, *fungicidas*, *bacteriostáticos* y *bactericidas*, como el ácido sórbico o benzoico, sus sales o sus mezclas.

Finalmente el sabor y aroma de una margarina (tan vinculados a su aceptabilidad) pueden lograrse *biológicamente* como en las mantecas (maduración con "starters" y producción de diacetilo, acetilmetil-carbinol, butilendiglicol, ácido láctico, etc.) o, más modernamente en forma *artificial* por aromatización con productos sintéticos (diacetilo, diversas lactonas, etc.) llamados *aditivos saporíferos*.

En el presente ninguna margarina de mesa elaborada sin el concurso de la mayoría de los aditivos mencionados tendría "aceptabilidad". Por ello tales aditivos *merecen justificación tecnológica* para su empleo.

El ejemplo que acabamos de exponer prueba que al presente los aditivos alimentarios deben considerarse como recursos significativos de la Tecnología de Alimentos (con las restricciones que luego analizaremos), para satisfacer la demanda en cantidad y en calidad de alimentos en cualquier época del año para el consumo de los grandes centros de población. Esas restricciones derivan de la rápida evolución operada en la Legislación Alimentaria Internacional respecto de los aditivos alimentarios, así como del impacto potencial de su probable toxicidad, tanto en la opinión pública como en la comunidad científica. Este aspecto de la Toxicología de Alimentos estuvo restringido a un pequeño número de especialistas en Tecnología y en Legislación pero, desde aproximadamente 1950 experimentó una rápida expansión de tipo interdisciplinario con el concurso de toxicólogos, farmacólogos, nutricionistas, médicos, químicos, bioquímicos, economistas, etc.etc.

En 1954 El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Nutrición, convocó una Conferencia Especial para constituir un Comité de Expertos que debería enunciar los "Principios generales que regulan el empleo de aditivos" y formular los "Métodos de ensayo toxicológicos". En 1957 se publicó el *Informe Técnico 129* (el primero del Comité Mixto mencionado) titulado "*Principios Generales que regulan el empleo de Aditivos Alimentarios*" en el que se analizan las *Circunstancias técnicamente justificadas para el empleo de aditivos que hayan merecido aprobación oficial*, tales:

- mantener o mejorar el valor nutritivo.
- aumentar la capacidad de conservación o la estabilidad evitando el desperdicio.
- incrementar la aceptabilidad de alimentos sanos y genuinos, faltos de atractivo.
- permitir la elaboración económica y en gran escala de alimentos de composición y calidad constantes en función del tiempo.

Como *circunstancias* en las que no deben emplearse:

- para enmascarar el uso de técnicas y procesos de elaboración y manipulación defectuosos.
- para engañar al consumidor.
- para provocar una reducción considerable del valor nutritivo.
- para perseguir finalidades que pueden lograrse con prácticas lícitas de fabricación, económicamente factibles.

Respecto de los *Factores a tener en cuenta en el Control de los Aditivos Alimentarios*, se consideraron:

- *las ventajas a proporcionar* — todo nuevo aditivo que se proponga para un nuevo fin debe ser de eficacia igual o mayor, o más económico o con menor riesgo sanitario que los ya autorizados para ese fin.

- *limitación de uso en ciertos alimentos* — deben restringirse en los alimentos que forman parte masiva de la ración. Los destinados a niños deben considerarse en forma particular, desde que los mecanismos de desintoxicación eficaces en los adultos, pueden no serlo en los niños. Enfáticamente se recomendó que los alimentos para niños no deben contener aditivos y caso necesario, tenerse sumo cuidado en su elección y dosis de uso.
- *necesidad de identificación* — toda Legislación Alimentaria debe contener normas de identidad y de pureza para los aditivos autorizados, indicando con claridad los máximos admisibles en impurezas inorgánicas (metales pesados), orgánicas (reactantes e intermediarios de síntesis residuales), desde que esas impurezas son de difícil control una vez que los aditivos se han incorporado a los alimentos. Los aditivos formados por más de una especie química (mezclas) deben considerarse en la composición cuali-cuantitativa de sus componentes.
- *los máximos permisibles en los alimentos* — deben ser las mínimas cantidades necesarias (expresadas en mg/Kg de producto terminado) para lograr la finalidad lícita deseada. Esas cantidades se establecen atendiendo a:
  - a) el nivel de consumo estimado del alimento o los alimentos para los cuales se propone el aditivo.
  - b) los niveles mínimos que en estudios sobre animales producen desviaciones importantes respecto del comportamiento fisiológico normal.
  - c) la necesidad de un margen de garantía suficiente para reducir al mínimo todo peligro para la salud en todos los grupos de consumidores.
- *el efecto combinado de los aditivos* — se refiere al caso de aditivos dotados de propiedades químicas y/o toxicológicas estrechamente relacionadas, con riesgos de ocurrencia de una suma de efectos perjudiciales.
- *la autorización legal* — debe emanar de Organismo Oficial competente, a través de las llamadas *listas positivas* o *listas de aditivos autorizados*, debiendo excluirse definitivamente las *listas de aditivos prohibidos*. Las listas positivas serán revisadas permanentemente a los fines de su ampliación o reducción, según lo aconsejen las comprobaciones científicas de aptitud.
- *la conveniencia y naturaleza de la declaración* — el consumidor debe ser informado de la presencia de aditivos en los productos que consume a través de la declaración en los rótulos. Si se cumplen las demás exigencias legales, bastaría la declaración de la clase o tipo del aditivo o aditivos presentes.
- *el control regulador* — la Legislación debe cumplirse y acompañarse de controles adecuados y periódicos oficiales y en fábrica. Se deben disponer métodos de análisis rigurosos, tanto para los aditivos en sí como para los alimentos que los contienen. Cuando ello no sea factible, la Autoridad Sanitaria deberá reducir las autorizaciones a un número pequeño de aditivos que ofrezcan un margen de seguridad amplio. Toda decisión para evaluar un aditivo debe fundarse en el dictamen meditado de científicos capacitados. Todo aditivo autorizado debe someterse a evaluaciones nuevas, cuando los adelantos de la metodología toxicológica así lo aconseje.

El Comité Mixto FAO/OMS decidió en 1957 analizar criterios a seguir en la determinación de la toxicidad de los *aditivos intencionales*, limitándose a los que *no revisten valor nutritivo* y que se incorporan a los alimentos en cantidad pequeña, para mejorar el aspecto, sabor, consistencia o conservación. Esa tarea se reflejó en el *Informe Técnico N° 144* titulado: "*Métodos de Ensayo Toxicológicos de los Aditivos Alimentarios*" en el que, en primer término se destaca la necesidad de la descripción de orden físico y químico del aditivo, tendiendo a la elaboración de las *Normas de Identificación y Pureza* particulares. Con posterioridad aparecieron gran número de esas normas que cubren los integrantes más importantes de los distintos grupos de aditivos que son de gran utilidad

en la protección del consumidor, en la Legislación Alimentaria, para los productores de aditivos y para los que realizan las evaluaciones toxicológicas, desde que las impurezas o constituyentes que se encuentran en concentraciones mínimas podrían tener una significación mucho mayor que la que se deduce de sus cantidades. Esas Normas consideran los siguientes puntos: Título o Nombre corriente, Sinónimos (con exclusión de nombres comerciales o registrados), Nombre químico, Fórmula bruta o empírica, Fórmula estructural, Peso molecular, Definición (mención de la concentración en principio activo), Descripción, Ensayos de Identificación (solubilidad, temperatura de fusión o ebullición y ensayos de reconocimiento) y finalmente Ensayos de Pureza (con indicación de impurezas particulares, minerales y orgánicas, así como los métodos de determinación). Además de las publicaciones de esas Normas FAO/OMS cabe recomendar a los mismos fines la obra "Food Chemicals Codex" (2da. edición y suplementos de actualización, editado por la National Academy of Sciences de Washington D.C.).

Este Informe cubre principalmente los estudios en animales a través de las *Pruebas de Toxicidad Aguda*, *Toxicidad de Corta duración* y de *Toxicidad Prolongada o Crónica*, así como *Investigaciones Bioquímicas y Especiales*. Previamente se destacan exigencias a cumplir en la selección y mantenimiento de animales de experimentación, conocimiento de la duración normal de vida, susceptibilidad a enfermedades naturales (especialmente tumores en estudios prolongados), raza (en ratas y ratones) y edad e historia en animales de otras especies, cubriendo también lo relativo a dietas (adecuadas para mantener el desarrollo y la reproducción), así como la estimación estadística de las diferencias entre lotes experimentales y testigos.

Los *Ensayos de Toxicidad Aguda* implican el estudio de los efectos producidos por el producto en ensayo cuando se administra una dosis única. Se aconseja el empleo de por lo menos tres especies, una de las cuales no pertenezca al grupo de los roedores y en una, por lo menos, ambos sexos. Las dosis superiores a 5 g/ Kg. de peso corporal que no ocasionen muerte (vía oral y parenteral) no exigen la determinación exacta de la dosis letal. Cuando la dosis letal es inferior a 5 g/Kg, se aconseja la determinación de la  $DL_{50}$  en una especie y en forma aproximada la dosis letal para las otras. Duración: 2 a 4 semanas. La utilidad de estos ensayos reside en que todo aditivo supuesto satisfactorio debe ser de baja toxicidad aguda. Los resultados que se logran son útiles respecto a los efectos sobre los sistemas biológicos e indican la necesidad o no de estudios ulteriores. Proporcionan información sobre la especificidad de las especies, lo que es de importancia respecto del comportamiento en el hombre.

Los *Ensayos de Toxicidad de Corta Duración* (designados también como *Ensayos de Toxicidad Subaguda*) se refieren al estudio de los efectos producidos por el aditivo cuando se administra en dosis repetidas a lo largo de un período de hasta el 10% de la vida probable del animal (unos 90 días para la rata y alrededor de un año para el perro). Se aconseja usar una especie roedora (luego del destete, para observar el período de máximo desarrollo) y otra distinta (perro, cerdo o mono). Los lotes de animales, con 10 ó 20 animales de cada sexo y para cada nivel de dosificación. La forma de administración es la dieta, en niveles máximos de hasta el 10% de la misma. Estos ensayos permiten apreciar el aspecto general, comportamiento, crecimiento y mortalidad, la estimación de la ingestión de alimento, los análisis de sangre y orina y de funcionalidad de órganos. Se realizan exámenes macro y microscópicos de los órganos, particularmente hígado y riñón y sus pesos respecto de los de animales testigo.

Los *Ensayos de Toxicidad Prolongada* consideran los efectos en ensayos durante períodos que generalmente abarcan la mayor parte de la vida probable de las especies de vida corta y a veces, toda la vida y a más de una generación de esas especies (dos años para la rata), aunque se recomienda no exceder los 18 meses a fin de evitar la confusión de los síntomas de toxicidad con los cambios patológicos complicados que se presentan en los animales de edad avanzada. Se aconsejan lotes de 25 ratas (luego del destete) de cada sexo y para cada nivel de dosificación (máximo 10% de la dieta). En estos ensayos y además de las observaciones señaladas para el caso de Ensayos de Corta Duración, se ob-

servarán los efectos sobre la reproducción, la lactancia y la descendencia. Los órganos que merecen la mayor observación son los de eliminación (riñones, hígado y tracto gastro-intestinal). Los efectos citotóxicos, sobre los órganos en los que ocurre proliferación celular activa (órganos hematopoyéticos y sistema reproductivo). Con posterioridad, en 1961, se publicó el *Informe Técnico N° 220*, titulado "Evaluación de los Peligros de Carcinogénesis que entrañan los Aditivos Alimentarios" y en 1963 el N° 260 sobre *Aspectos de Salud Pública y Empleo de Antibióticos en Alimentos*" que complementan a los citados anteriormente en temas específicos.

En 1967 apareció el *Informe N° 348* sobre *Métodos de Evaluación Toxicológica de Aditivos Alimentarios Intencionales*, complementario del N° 144 que hemos comentado. En el mismo se amplían consideraciones respecto de la elección de especies animales a emplear, estudios sobre el hombre (voluntarios), estudios metabólicos relacionados entre toxicidad y edad y entre toxicidad y estado nutricional, duración de la experimentación en animales, estudios sobre actividades enzimáticas (sangre y tejidos), efectos mutagénicos, efectos teratogénicos (intoxicación del embrión o feto), disminución del ritmo de aumento ponderal, inhibición de colinesterasas, hepatomegalia, producción de sarcomas (por inyección subcutánea), márgenes de seguridad, concentración sin efecto e ingestiones diarias admisibles para el hombre.

Corresponde referirnos a la fómra en que los resultados logrados en los ensayos de evaluación toxicológica se trasladan al hombre, estableciendo los valores conocidos con la sigla IDA (*Ingestión Diaria Admisible*) que se expresan, para cada aditivo, en mg/Kg de peso corporal/día.

Los ensayos previos de toxicidad señalan las cifras máximas de ingestión que no ejercen efectos discernibles sobre los animales. Tales valores se designan como *concentraciones sin efecto* o, más correctamente *dosis sin efecto*.

A esta finalidad y mientras no se dispongan pruebas que demuestren lo contrario, se admite como *tóxico cualquier efecto observado*. Tales cifras no se aplican al hombre sino previendo los *márgenes de seguridad* que cubren la posible intervención de varios factores como ser diferencias de susceptibilidad entre especies, diferencias numéricas entre los animales sometidos a ensayo y la población humana expuesta a riesgo, mayor variedad de procesos patológicos que complican la cuestión en la especie humana, dificultad de estimar las cantidades ingeridas por el hombre y posible acción sinérgica de los aditivos alimentarios. Para un gran número de aditivos se aplica un margen de seguridad de 100, que es la centésima parte de la correspondiente dosis sin efecto. Ese nuevo valor es la ingestión diaria admisible (IDA) expresada en mg/Kg de peso corporal/día. Sin embargo y según los casos, los valores de los márgenes de seguridad oscilan entre 50 y 500. Los más elevados se aplican en países que no disponen de expertos en Tecnología de Alimentos o de Legislación adecuada. También para el caso de aditivos carentes de información toxicológica suficiente o para aquellos presentes en alimentos de ingestión diaria muy variable como ser, por razones climáticas: helados, refrescos, etc.

En algunos casos se aceptan los valores de *Ingestión Diaria Temporalmente Admisible*, para aditivos útiles y que están en uso, sin que se disponga sobre ellos la información toxicológica completa con arreglo a las normas vigentes. Esos valores se fijan por un determinado lapso (3 á 5 años) a la espera de las evaluaciones complementarias necesarias.

La Ingestión Diaria Admisible se califica como *Incondicionada* para aquellos aditivos cuya información incluye valores aceptables para los ensayos biológicos, metabólicos y toxicológicos a corto y largo plazo. Por el contrario es *Condicionada* cuando esa información no cubre la requerida para la Incondicionada o, para propósitos específicos en dietas especiales. En este caso es conveniente disponer supervisión y asesoramiento técnico.

Es también útil señalar que el objetivo de las evaluaciones toxicológicas es, principalmente, garantizar un mínimo de seguridad para los consumidores de alimentos que contienen aditivos intencionales. Se debe reforzar la convicción de que nunca se podrá dar una *prueba absoluta de inocuidad* y esto último rige tanto para productos naturales

como de síntesis. Estos, antes de ser aprobados, además de su eficiencia tecnológica deben satisfacer las de la *moderna metodología toxicológica vigente*. Existe un notable retraso respecto de los de origen natural. Hemos mencionado que los aditivos "mezcla de diversas especies químicas" se deben juzgar en función de su composición, esto es, considerando cada componente en particular. Pues bien, la mayor complejidad se encuentra en muchos aditivos aromatizantes naturales tales los aceites esenciales y sus materias primas, las especias. Estas últimas agregadas a productos alimenticios que no se someten a efecto térmico, suelen ser factores de *contaminaciones microbianas* no deseables. Los aceites esenciales considerados como aditivos flavorizantes presentan gran complejidad. En efecto, una misma especie vegetal produce aceites esenciales de composición química (y por tanto de propiedades aromatizantes) que difieren en función varietal, de la época de cosecha y de las condiciones agroclimáticas. Téngase presente que el avance que se opera en los métodos instrumentales de análisis es tal, que al presente es corriente demostrar el gran número de componentes revelables (a través de las más diversas técnicas de cromatografía: gaseosa, sobre papel, en capa delgada, líquido-líquido de alta presión o por técnicas espectrofotométricas en UV, IR o visible y en las combinaciones más actuales de destilación fraccionada, cromatografías y principalmente espectrometría de masa). Es corriente observar que esos análisis publicados en los últimos años muestran composiciones que en muchos casos sobrepasan el centenar de componentes. Por algo se ha dicho que los cultivos de plantas esenciales tendrían como finalidad importante la producción de aceites esenciales que serían materia prima para separar (en estado de pureza) sus componentes determinantes de sus efectos flavorizantes. Estos se emplearían para formular mezclas con composiciones fijas y lógicamente con efectos prácticos constantes (sólo los componentes activos o necesarios se deberían emplear en el procesamiento de los alimentos). Por otra parte, cada componente sería evaluado toxicológicamente, así como la mezcla final para poder, en este caso, apreciar efectos de probables acciones recíprocas.

Al presente y en algunos tipos de aditivos naturales se debe considerar la condición microbiológica como criterio de pureza. Es, por ejemplo, el caso de algunos colorantes y agentes espesantes o gomas, así como de enzimas que se usan en el procesamiento de alimentos. Estas últimas, si proceden del uso de microorganismos fúngicos, deberían estar libres de micotoxinas (aflatoxinas, etc.) y de otros metabolitos.

Las diferencias de reacción entre diversas especies animales frente a la ingesta de sustancias tóxicas son de significación tal, que crean incertidumbre cuando las evaluaciones sobre animales se deben extrapolar al hombre, pese a usarse diversas especies a esos fines. De ahí que se haya expresado que la mejor especie para la apreciación es el hombre. Pero el uso de este a ese fin presenta situaciones de ética y legales a tener en cuenta. Algunos principios gobiernan los ensayos con *humanos voluntarios* como:

- El aditivo debe haber sido exhaustivamente experimentado en varias especies animales.
- Debe existir una necesidad clara de interés público para el estudio de efectos sobre el ser humano.
- El efecto o efectos deben ser reversibles.
- Los niveles de dosis usados deben basarse sobre una información completa de las evaluaciones en animales.
- La investigación debe concluir inmediatamente después de la demostración inequívoca de los efectos.

La información disponible al presente respecto de los mas importantes integrantes de los grandes grupos de aditivos alimentarios es significativa. Comprenden Normas de Identidad y Pureza y Evaluaciones Toxicológicas para: antimicrobianos, antioxidantes y sinergistas, emulsificantes, modificadores de textura, blanqueadores de harinas, colores alimentarios, flavorizantes o saporíferos, exaltadores de aromas, estabilizadores, antiaglutinantes, antiespumantes, estimulantes, antisalpicantes, blanqueadores ópticas, edulco-

rantes no nutritivos, neutralizantes, acidulantes, agentes de maduración, mejoradores de color (carnes), secuestrantes, clarificantes, etc., etc..

Es conveniente exponer el estado actual de la Legislación Alimentaria de nuestro país en esta materia. Se trata de la vertida en el Código Alimentario Argentino (Ley Nº 18.284. Decreto Nº 2.126/1971) y sucesivas actualizaciones hasta el presente. En el Art. 3 (Cap. I-Disposiciones Generales) se define los Aditivos así:

*Aditivo Alimentario* – “Cualquier sustancia o mezcla de sustancias que directa o indirectamente, modifiquen las características físicas, químicas o biológicas de un alimento a los efectos de su mejoramiento, preservación o estabilización, siempre que:

- sean inocuas por sí mismas o a través de su acción como aditivos en las condiciones de uso.
- su empleo se justifique por razones tecnológicas, sanitarias, nutricionales o psicosensoriales necesarias.
- respondan a las exigencias de Identificación, Designación y Pureza que establezca este Código.

En los Art. 1.392, 1.393 y 1.394 de Capítulo XVIII, se resumen “*La Filosofía del Uso de Aditivos Alimentarios*” esto es, con que finalidades se los puede usar y cuando no, así como *Normas Generales* referentes a la fijación de *Concentraciones en Alimentos y Niveles de Consumo*. En el Art. 1.395 se dice textualmente: “Los Aditivos Alimentarios se expendrán siempre en envases originales cerrados, debidamente rotulados. Los de uso permitido que se encuentren en todo Establecimiento Productor de Alimentos, deberán mantenerse en sus envases originales debidamente cerrados, a fin de evitar toda manipulación o riesgo de contaminación o mezcla con sustancias o productos de cualquier naturaleza”. A su vez, el Art. 1.396 expresa: “En la rotulación de todo producto alimenticio adicionado de aditivos de uso permitido deberá hacerse constar su presencia, salvo excepción expresa mediante expresiones que identifiquen la clase o tipo de aditivos agregados, por ejemplo: “Antioxidante permitido”, “Emulsionante permitido”, “Conservador permitido”, “Colorante permitido”, etc., sin que ello impida, si así se lo desea, la mención de cada aditivo en particular. Las expresiones citadas referentes a la clase o tipo de aditivos agregados implica la responsabilidad de haber utilizado únicamente los permitidos por el Código, en los casos autorizados y dentro de los límites y grados de pureza establecidos”. Finalmente el Art. 1.398 fija los contenidos máximos (con carácter general) en arsénico, plomo y en metales pesados y valores máximos recomendados para hierro y cobre, en todos los aditivos que integran la lista positiva del Código, prosiguiendo con la descripción particular de los mismos (alrededor de 180) fijando Designación, Fórmula, Definición, Descripción, Exigencias en Impurezas permitidas y sus concentraciones máximas y Fuentes bibliográficas referentes a los Métodos de Análisis para cada uno de ellos.

A mi entender el hombre creó la necesidad de introducir los aditivos en la Tecnología de Alimentos, fundamentalmente urgido por la conveniencia de evitar el desperdicio de nutrientes y para mejorar características sávido-aromáticas y funcionales de los alimentos. Para ello debió modificar las de muchos productos tradicionales es decir, de muchos productos naturales. Como ha ocurrido con el uso de los primeros plaguicidas, no previó a tiempo consecuencias no deseables y sólo valoró en los albores el beneficio, como ser la mayor producción. El uso de aditivos hasta la intervención de Organismos como FAO y OMS tuvo inconvenientes que se han ido superando en forma señalada. La obra cumplida por los Comité de Expertos cambió fundamentalmente la situación al precisar conceptos, normalizar los aditivos, crear métodos de dosificación, efectuar evaluaciones toxicológicas y fijar valores de IDA, así como instruir en materia de Legislación. La obra que realizó y realiza deberá continuar indefinidamente, mientras el hombre tenga apetencias, característica que le es propia. Los métodos siempre perfectibles de evaluaciones deben extenderse cada vez más a la propia naturaleza, pues ella alberga en su producción muchas sustancias que deben estudiarse con el mismo rigor que se aplica a las de síntesis, en as-

pectos físicos, químicos y biológicos, siempre a tono con el avance y mejoramiento de las metodologías científicas involucradas. Así, el concepto de *Inocuidad Absoluta* (inalcanzable) tenderá a lo que debe ser, la *Inocuidad Práctica* (en condiciones de concentración y de uso establecidas). La experiencia ha mostrado que el uso adecuado de aditivos alimentarios reporta beneficios a la solución de agudos problemas de alimentación, siempre que presten su colaboración los Organismos competentes Oficiales o Privados, la Legislación, la *educación pública* y la *ética industrial*.

Es prudente señalar que los temas relacionados con la polución ambiental, inocuidad y calidad de los alimentos, pesticidas o aditivos alimentarios, son de índole emocional para muchos miembros de nuestra sociedad. Las declaraciones o comentarios vinculados a estos temas atraen de inmediato la atención. Por ello, es particularmente importante que toda información proporcionada al público por científicos sea exacta, balanceada y objetiva, evitando crear sensaciones de alarma cuando no existen razones para la inquietud.

#### REFERENCIAS

Además de las mencionadas en el texto, se han tenido en cuenta las siguientes:

- Comisión del Codex Alimentarius. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, CAC FAL 1-1973, "*Lista de Aditivos Evaluados en cuanto a su Inocuidad en el Uso Alimentario*", Primera Serie, FAO, Roma, 1973.
- Comisión del Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, CAC FAL 1-1973 (supl.1), "*Primer Suplemento a la Lista de Aditivos Evaluados en cuanto a su Inocuidad en el Uso Alimentario*", Primera Serie, FAO, Roma, 1973.
- Codex Alimentarius Commission, FAO/OMS, "*Status of Food Additive Provisions in Codex Commodity Standards*", Rome 1975.
- National Academy of Sciences, "*The Use of Chemicals in Food Production, Storage, and Distribution*", Committee on Food Protection. Food and Nutrition Board, Division of Biology and Agriculture, National Research Council, Washington, D.C., 1973.
- Manufacturing Chemists' Association, Inc., "*Food Additives*", what they are/how they are used, M.A.C., Washington, D.C., 1971.
- E.M. Mrak, "*Food Science: Past, Present and Future*", The 1976 W.O. Atwater Memorial Lecture, Agricultural Research Service, U.S. Department Agriculture, N.Y., 1976.
- E.J. Bigwood y A. Gérard, "*Objetivos y Principios Fundamentales de un Derecho Comparado de la Alimentación*", vol. I (Introducción general y ámbito de aplicación), 1970; vol. II (Elementos de Motivación y elementos de cualificación), 1972; vol. III (Elementos Estructurales e Institucionales), 1973; vol. IV (Elementos de Control y de Sanción), 1973; Revista Alimentaria Madrid.
- Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety and Nutrition, "*The Risk/Benefit Concept as Applied to Food*", march, 1978.

SESION DE LA JUNTA DIRECTIVA

19 de noviembre 1981

(Resolución aprobada con relación a la Revista ANALES)

"Punto 7.7. Informe del Dr. CATTANEO sobre nueva conformación de ANALES.

"El Director de ANALES informa que ha concluido las consultas para efectuar algunas variantes en la conformación de nuestra revista científica, habiendo recibido asentimiento general para llevarlas a cabo. En consecuencia, de acuerdo a su propuesta de fecha 24 de julio ppdo., a partir del primer Tomo de 1981 se registrarán las siguientes modificaciones:

"- La tradicional Comisión de Redacción será reemplazada por un "Comité Asesor", integrado por los ex-Directores de ANALES: Capitán de Navío (RE) Emilio L. DIAZ, Ingeniero José S. GANDOLFO y Dr. Andrés O.M. STOPPANI.

"- Se incluirá una nueva sección denominada "Puestas al Día" (Actualizaciones Bibliográficas) o de "Temas de Actualidad", en ambos casos a cargo de profesionales de reconocida capacidad. No se incluirá más de un artículo de esa índole por entrega, cuya extensión no deberá exceder de seis (6) carillas.

"Puesto a consideración se aprueba por unanimidad y en consecuencia a partir de 1981 se introducirán en ANALES las referidas innovaciones."

(La transcripción que antecede corresponde a la parte pertinente del ACTA de la Sesión de la Junta Directiva de la Sociedad Científica Argentina, N<sup>o</sup> 4075 del 19-11-81, folios 123/128 del Libro N<sup>o</sup> 6.)

Esta edición de 2.500 ejemplares se terminó de imprimir el 20 de enero de 1983, en el taller de R. Kossack, en calle J. Martí 463, Buenos Aires, República Argentina.-

Comisión de Redacción de los  
**ANALES DE LA SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA**

Cap. de Navío (R) Emilio Díaz

Ing. José S. Gandolfo

Dr. Andrés O. M. Stoppani

**NORMAS PARA LOS AUTORES**

1. ANALES publica unicamente trabajos originales e inéditos ; solamente por excepción podrá incluir trabajos cuya noticia se haya dado por otra publicación.
2. La publicación en ANALES es gratuita. Las separatas que soliciten los autores (o las entidades a que estén vinculados) son con cargo a los mismos. El requerimiento deberá hacerse por escrito y antes de iniciar la impresión.
3. Los autores son personalmente responsables de la tesis y del contenido de sus trabajos y deberán realizar las correcciones de las pruebas de imprenta de dichos trabajos.
4. La Sociedad Cientifica Argentina se reserva el derecho de rechazar cualquier trabajo que sea sometido para publicación en ANALES, si así lo considerara conveniente.
5. Los trabajos deberán ser presentados escritos a máquina, a doble espacio, en papel tamaño oficio o carta, utilizando una sola de las caras del papel y redactados en castellano. Las fórmulas podrán ir manuscritas y deberán ser suficientemente claras para la labor de la imprenta. Los gráficos se dibujarán en tinta china, o por otro medio, de manera tal de permitir la fácil y buena preparación de los clisés ; esto último es aplicable a todo tipo de ilustración. La cantidad será la mínima compatible con las necesidades de la buena comprensión del trabajo. Se procurará que los trabajos no ocupen más de seis páginas de Anales en total, incluidas ilustraciones y tablas. La publicación de las primeras seis páginas es gratuita ; los clisés y las páginas que excedan de seis serán con cargo a los autores, de acuerdo a la disposición de fecha 4 de septiembre de 1975.
6. Los trabajos, luego de su título, llevarán un resumen en castellano y otro en idioma extranjero, éste último de no más de 150 palabras. Dichos resúmenes deberán señalar el problema planteado, la indicación de los procedimientos y procesos y las conclusiones a que se arribe, y hacer referencia sobre la precisión de los resultados, todo ello de manera sintética.
7. Los escritos originales, destinados a la Dirección de ANALES, serán remitidos a la Administración de la Sociedad, Avenida Santa Fe 1145 (1059), Capital Federal, a efectos de registrar fecha de entrega y posterior envío al Director.
8. La publicación de los trabajos, una vez aceptados, estará sujeta a las posibilidades de la Sociedad y a las exigencias de diagramación de ANALES. La Sociedad se reserva el derecho de determinar la entrega de ANALES en la cual aparecerán los trabajos.

SMITHSONIAN INSTITUTION LIBRARIES



3 9088 01357 4025

CORREO  
ARGENTINO  
Central B

FRANQUEO PAGADO

Concesión N° 1186

TARIFA REDUCIDA

Concesión N° 6247