

**ANALISIS DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE
AGUACATE POR CROMATOGRAFIA DE GAS**

Tesis

que presenta para su examen profesional de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Ma. del Pilar Oltra Chávez

ante la

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

incorporada a la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

México, D. F.

1966



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Deseo expresar mi reconocimiento al Personal Técnico del Instituto Mexicano de Investigaciones Tecnológicas, A. C., y especialmente al Laboratorio Central Analítico por la asistencia y facilidades que me fueron brindadas para la realización del presente trabajo.

CONTENIDO

I. - INTRODUCCION.

II. - GENERALIDADES.

A) Definición de cromatografía.

B) Descripción de los principales elementos que intervienen en la cromatografía de gases.

III. - PARTE EXPERIMENTAL.

A) Diagrama del plan de investigación.

B) Selección de la planta.

C) Extracción por arrastre con vapor directo.

D) Recuperación por medio de disolventes y destilación de los mismos.

E) Determinación de las constantes físico - químicas del aceite esencial.

F) Identificación de los componentes del aceite en el cromatógrafo de gases.

IV.- RESULTADOS.

V.- CONCLUSIONES.

VI.- BIBLIOGRAFIA.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- TABLA No. 1.- Pruebas de extracción del aceite esencial de hojas de aguacate.
- TABLA No. 2.- Pruebas de extracción con diferentes di solventes en la columna de extracción líquido - líquido tipo Sheibel.
- TABLA No. 3.- Características del aceite esencial de hojas de aguacate.
- TABLA No. 4.- Análisis cromatográfico del aceite esen cial de hojas de aguacate.
- FIGURA No. 1.- Destilador - extractor por arrastre con vapor directo.

FIGURA No. 2.- Columna de extracción líquido - líquido.

FIGURA No. 3.- Concentración del aceite esencial por destilación del disolvente empleado en la extracción a contracorriente.

FIGURA No. 4.- Cromatograma de una muestra de aceite esencial extraída de hojas de aguacate.

I. - INTRODUCCION.

La planta aguacate (*Persea Americana*, Fam. Lauráceas), se cultiva en climas tropicales, subtropicales, y se produce en gran cantidad en nuestro país.

El olor característico de sus hojas, indica la presencia de aceites esenciales. El término "aceite esencial", se define como "substancia olorosa de naturaleza oleosa que se obtiene casi exclusivamente de fuentes vegetales; generalmente es líquida y volátil a la temperatura ordinaria." (1).

En la actualidad los aceites esenciales desempeñan un papel muy importante dentro de las industrias de perfumes, medicamentos, sabores en alimentos y bebidas, de aquí la importancia que presenta el estudio del aceite esencial de las hojas de aguacate.

El presente trabajo se basa, en la separación e identificación de los componentes que constituyen el aceite esencial de las hojas de aguacate, mediante la aplicación de la cromatografía de gases.

Dentro de las técnicas de análisis más avanzadas, que se usan en la separación de sustancias volátiles, se encuentra la de cromatografía de gases.

Los métodos de Naves, se recomiendan como métodos oficiales en el análisis de aceites esenciales, (9) - (10).

Otros autores, utilizan la cromatografía de gases en la separación de sustancias volátiles de esencias comerciales (11), y en el análisis cuantitativo y cualitativo de terpenos naturales y sintéticos de aceites esenciales (12).

Asimismo, en el campo de perfumería y sabores, - tiene un amplio uso la cromatografía de gases (15) (16) - (17).

II. - GENERALIDADES.

A) DEFINICION DE CROMATOGRAFIA. - La cromatografía de gases se define como un método físico de separación de componentes en una muestra, en la cual, los componentes gasificados o vaporizados se encuentran distribuídos en dos fases, la primera fase es fija y consiste en un lecho con una gran superficie de contacto, la otra fase es móvil y está constituída por un fluído que pasa a través de la fase estacionaria (5).

El tiempo de permanencia de un compuesto en una columna cromatográfica depende en primer lugar de la - distribución de la substancia entre las fases gaseosa y estacionaria. Un compuesto con menos tendencia a ser adsorbido por la fase estacionaria, se eluirá más rápida -mente en la columna.

B) DESCRIPCION DE LOS PRINCIPALES ELE -
MENTOS QUE INTERVIENEN EN LA CROMA
TOGRAFIA DE GASES.

I. - Fase móvil o gas portador. - La fase móvil se denomina comunmente gas portador debido a que su - función es la de transportar y eluir la muestra a su paso por la columna y éste debe ser retenido menos fuertemen te que cualquiera de los componentes de la substancia por analizar. Si para el análisis se usa el principio de la conductividad térmica, conviene usar un gas con una conducti vidad térmica considerablemente más alta que cualquiera

de las sustancias que se analizan. El helio y el hidrógeno son ejemplos de este tipo de gas. El helio es el gas portador de uso más extenso a causa de su conductividad alta, su inercia y su seguridad.

II. - Columna. - La columna es la parte de mayor importancia de la cromatografía de gases, ya que efectúa la separación de los componentes de una muestra a su paso a través de ella, dicha columna puede ser de cobre, acero inoxidable o de vidrio.

La fase estacionaria puede ser un sólido con propiedades de adsorción o un líquido que generalmente se distribuye en un soporte sólido. La fase líquida sirve para efectuar la separación de los componentes en la sustancia por analizar, y es relativamente no volátil a la temperatura de operación de la columna. La separación se basa en las diferencias de volatilidad de los componentes en la solución.

III. - Soporte sólido. - En cromatografía gas - líquido, el soporte sólido no tiene propiedades de adsorción y por lo tanto su superficie específica necesita ser lo suficientemente grande para que permita un reparto eficiente de la muestra entre el gas portador y la fase líquida.

La naturaleza del soporte debe ser bien seleccionada, de tal manera que permita a la fase líquida la mayor área de contacto con la fase gaseosa por unidad de volumen. Los poros pequeños no son aconsejables, ya que se convierten en un bloque en lugar de servir de canal para el paso del gas, en cambio los poros grandes aumentan la superficie de contacto. La experiencia demuestra que sólo los soportes cuya densidad es menor de 0.4 tienen eficiencia satisfactoria (3).

IV. - Fase líquida. - La fase líquida es la encargada de separar en la columna los componentes volátiles a su paso a través de ella y se ha de disponer de una cantidad considerable de líquido para eliminar cualquier efecto de adsorción residual debido al soporte sólido.

Los requisitos de la fase líquida son los que a continuación se expresan:

1). - El líquido ha de ser estable a la temperatura de operación. Esto significa que no ha de sufrir alteraciones químicas durante el experimento.

La volatilidad del líquido no solo origina la disminución del propio ingrediente activo, sino que también produce una adición al cromatograma que no se debe a la posición de la muestra que se está analizando. Esto se observa por el cambio de resolución característico del tipo de empaque de la columna.

2). - Los componentes de la muestra por analizar deben tener una relativa solubilidad en el líquido de la columna, ya que los componentes insolubles saldrán de la columna sin separarse, después de un tiempo mínimo.

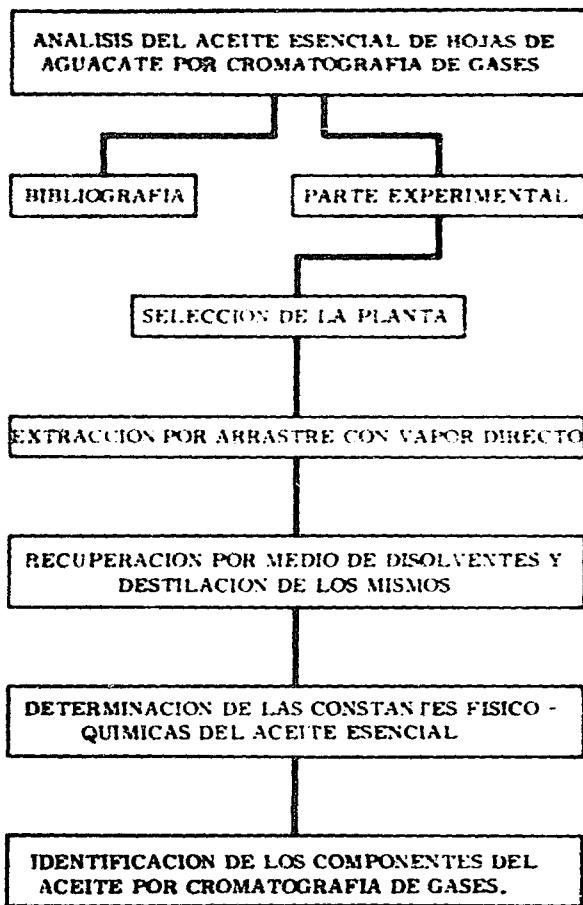
3). - La relativa solubilidad de los componentes en la fase líquida ha de ser tal que ayude a la separación deseada. Por lo tanto el volumen de retención será mayor de acuerdo con la solubilidad de los componentes en dicha fase, ya que quedarán retenidos más tiempo que los menos solubles.

Un método normal para preparar el empaque de la columna es el siguiente:

La fase líquida se disuelve en un disolvente de bajo punto de ebullición (acetona, cloroformo, isopentano), para asegurar una distribución uniforme de la fase líquida en el soporte sólido, y se añade a éste, agitando constantemente la mezcla. El disolvente de bajo punto de ebullición se elimina en baño de vapor o con lámpara de rayos infrarrojos hasta que el soporte sólido recubierto con la fase líquida queda libre de disolvente (4).

III. - PARTE EXPERIMENTAL.

A.- DIAGRAMA DEL PLAN DE INVESTIGACION.



B) SELECCION DE LA PLANTA.

Se hizo la selección de un lote de 15 Kg. de hojas de aguacate frescas, procedentes de Tepeojuma, Pue. Estas hojas fueron cortadas en tamaños pequeños despojándolas de sus tallos, y manteniéndolas en refrigeración, mientras se preparaba la totalidad del material para evitar su descomposición.

C) EXTRACCION POR ARRASTRE CON VAPOR DIRECTO.

La literatura indica que la técnica de destilación con vapor directo es la más apropiada en este tipo de extracciones (1), ya que da lugar a un mayor rendimiento - gracias al buen contacto que existe entre el vapor y el material en estudio.

Fue necesario acondicionar un filtro Yeiser (Fig. No. 1), para poder llevar a cabo este método. A dicho aparato se le hicieron las adaptaciones siguientes:

1).- Entrada y salida de vapor al interior del filtro y a la chaqueta de calentamiento.

2).- Un manómetro, para registrar la presión dentro del aparato.

3).- Un condensador de vapor (serpentín de acero inoxidable de 15 m de longitud por 0.63 cm de diámetro interno) sumergido en un tanque con circulación continua de agua y vertedero.

4).- Para soportar el material se instalaron 5 charolas de malla de aluminio No. 14 (abertura de 1.41 mm)

con medidas de 33.0 cm. x 66.0 cm; 40.6 x 66.0 cm., - 43.1 x 66.0 cm; 40.6 x 66.0 cm. y 30.4 x 66.0 cm. respectivamente.

5).- Un recipiente recolector, conectado a la salida del serpentín por un tubo de Tygon de 1 m y con capacidad de 19 l.

6).- Separador de condensados en la línea de vapor.

Se hicieron diferentes pruebas de extracción en este aparato, en las que se tuvieron como variantes el peso de la muestra, la presión del vapor y la temperatura. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla No. 1.

D) RECUPERACION POR MEDIO DE DISOLVENTES Y DESTILACION DE LOS MISMOS.

Una vez obtenido el condensado de las hojas por medio de arrastre con vapor directo, se procedió a extraer el aceite esencial con un disolvente, en una columna de extracción líquido - líquido tipo Sheibel (2).

Dicha columna (ver Fig. No. 2), consiste en un tubo de vidrio de 106.6 cm de longitud con 13 porciones de empaque de 5.08 cm cada una, provisto de un eje con sistema de agitación continua. El eje está seccionado por intervalos libres e intervalos de empaque. El empaque, constituido por alambre muy fino de acero inoxidable entretejido, sirve para lograr un mejor rompimiento de la emulsión que se forma en los intervalos libres debido a la agitación.

Mediante una serie de pruebas, llevadas a cabo, para estudiar la eficiencia de extracción por un mejor contacto entre las dos fases (disolvente - muestra), se determina

ron las condiciones de alimentación más adecuadas, encontrándose la parte central de la columna como la más adecuada para alimentar, tanto la muestra como el disolvente. El disolvente con el aceite extraído, se colectó por la parte superior de la columna y la muestra libre de aceite por la parte inferior.

Para seleccionar el disolvente más apropiado para la extracción; a una parte de la muestra se le sometió a varias pruebas con diferentes disolventes tales como hexano, tetracloruro de carbono, benceno y éter de petróleo; resultando el éter de petróleo el más adecuado, ya que extrajo la mayor cantidad de aceite esencial (6.6 ml de aceite por litro de disolvente). Las pruebas realizadas con los diferentes disolventes se presentan en la Tabla No. 2.

Una vez extraído todo el aceite del condensado, el disolvente se sometió a una destilación, la cual se mantuvo entre 37°C y 45°C regulándose la temperatura por medio de una chaqueta de calentamiento y un termómetro (Fig. No. 3).

El residuo de la destilación, antes de que destilara totalmente el disolvente, fue sometido a deshidratación con cloruro de calcio anhidro. El producto de la deshidratación se filtró y el resto de disolvente se evaporó en una estufa de vacío, obteniéndose 30 ml de aceite esencial de hojas de aguacate.

E) DETERMINACION DE LAS CONSTANTES FISICO - QUIMICAS DEL ACEITE ESENCIAL.

En este trabajo se determinaron las tres constantes físicas principales del aceite esencial: densidad, índice

ce de refracción y rotación óptica. La densidad se determinó por el método gravimétrico de Fisher Davidson usando etilbenceno como testigo (7). El índice de refracción se determinó en el refractómetro de Abbé (8). La rotación óptica fue determinada en el polarímetro Leitz - - - Watzlar. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla No. 3.

F) IDENTIFICACION DE LOS COMPONENTES DEL ACEITE EN EL CROMATOGRFO DE GASES.

La determinación de los componentes del aceite esencial de hojas de aguacate se llevó a cabo usando la técnica de cromatografía gas - líquido por elución, en un cromatógrafo de gases F & M modelo 720 con unidad de conductividad térmica.

En la estabilización del aparato se toman en cuenta varios factores para establecer las condiciones adecuadas de operación.

Tales factores son: temperatura de la puerta de inyección, temperatura del detector, flujo de gas portador, columna usada, uso de temperatura programada o isotérmica en la columna.

Para el análisis de la muestra, se introducen por la puerta de inyección de 1 - 10 microlitros por medio de microjeringas y el problema pasa a través de la columna, sus componentes son detectados por un puente de Wheatstone, éste a su vez transmite dicha señal a un registrador que normalmente grafica las variaciones en forma de picos. El área formada debajo de estos picos se calcula mediante un integrador de disco que forma parte del aparato.

El empaque de la columna consistió de Carbowax 20 M al 20% en peso, en Chromosorb W malla 60 - 80, preparada y empacada por el método convencional (6) fue acondicionada durante dos horas a 200°C.

Se hicieron varias pruebas para estabilizar las condiciones de operación y una vez estables se procedió a la identificación de los componentes.

Se tomó como referencia el linalol, para los componentes con puntos de volatilización entre 100°C y 160°C. Además se utilizó como referencia carvona, para los componentes con puntos de volatilización mayores a 160°C.

Se identificaron los diferentes componentes del aceite esencial, y en el cromatograma que se obtuvo bajo las condiciones mencionadas, se determinaron los tiempos de retención relativos de cada componente, en relación con las sustancias de referencia. Estos tiempos de retención se obtienen marcando en la gráfica la distancia entre el punto de inyección de la muestra y el pico que presenta la sustancia que se toma como referencia, y dividiendo el valor encontrado entre las distancias del punto de inyección de la muestra y los picos de los demás componentes (7).

La muestra de aceite fue inyectada bajo las siguientes condiciones:

Columna: Cobre, 2 m de long., 0.63 cm de diámetro.

Empaque: 20% de Carbowax 20 M en Chromosorb W.

Temperatura de la columna: Isotérmica 160°C y 195°C.

Flujo de gas portador: 30 ml por minuto.

Tamaño de la muestra: 1 microlitro.

IV.- RESULTADOS.

Los resultados de las características del aceite esencial de hojas de aguacate se encuentran en la Tabla No. 3.

En el análisis cromatográfico se obtuvieron 17 - componentes, 15 de los cuales se pudieron identificar y 2 no pudieron ser identificados. Los resultados se presentan en la Tabla No. 4.

La investigación de las fracciones colectadas en el cromatógrafo, no se llevó a cabo por espectrofotometría en infra - rojos, debido a impedimentos de instrumentación.

V.- CONCLUSIONES.

1.- Los resultados obtenidos del análisis cromatográfico del aceite esencial, indican que el principal - componente de dicho aceite es el estragol, el cual se encuentra en un porcentaje de 80.8 superior en relación con los porcentajes de los otros componentes y debido a ello, el aceite presenta un olor característico muy parecido al de dicho componente.

2.- También se puede observar que contiene cantidades apreciables de beta - ionona y formiato de etilo y cantidades menores de alfa y gama metil iononas, en porcentajes relativos de 5.741, 4.008, 1.169 y 1.231 respectivamente.

3.- Se encontró la técnica de cromatografía gas-líquido, como la más adecuada en la separación de los - componentes de muestras volátiles; por su eficiencia y rapidez.

4.- Entre los disolventes ensayados para la extracción del aceite esencial se escogió el éter de petróleo, ya que extrajo una mayor cantidad de aceite en relación - con los otros disolventes.

TABLA No. 1

PRUEBAS DE EXTRACCION DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE AGUACATE.

Prueba	Peso de la muestra en Kg	Presión de vapor en el interior del filtro Kg/cm ²	Temperatura aproximada en °C	Volumen del condensado en litros	Observaciones
1	3	0.983	116	20	Cocimiento total de las hojas.
2	2	0.491	106	20	Tenue, olor característico.
3	2.5	0.491	108	20	Tenue, olor característico.
4	3	0.351	102	20	Ligero aumento en la concentración.
5	2.5	0.351	102	20	Ligero aumento en la concentración.
6	3	0.210	99	20	Olor característico concentrado.
7	3.5	0.210	99	20	Olor característico concentrado.

TABLA No. 2

PRUEBAS DE EXTRACCION CON DIFERENTES DISOLVENTES EN LA COLUMNA DE EXTRACCION LIQUIDO - LIQUIDO TIPO SHEIBEL.

Disolvente (s)	Relación de volu- men disolvente/ muestra en litros	Relación de flujo disolvente/mues- tra en cc/min	Velocidad de agi- tación en r.p.m.	Tiempo de ex- tracción en hs.	Cantidad de aceite extraído por litro de disolvente en ml
Tetracloruro de carbono.	1:5	3:32	1000	1:45	1.06
Hexano.	1:5	3:32	1000	2:20	0.455
Benceno.	1:5	3:32	1190	3:20	1.57
Eter de petróleo.	1:5	3:32	1000	2:30	6.6
Hexano y éter de petróleo.	1:5	3:32	1600	3:15	0.190
Hexano y tetracloruro de carbono.	7:35	3:32	650	2:40	0.256
Tetracloruro de carbono y éter de petróleo.	1:5	3:32	720	2:50	1.05
Hexano, éter de petróleo y tetracloruro de carbono.	1:4:6:7	3:32	720	3:00	0.407

TABLA No. 3

CARACTERISTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE AGUACATE

Fecha de colección	Abril de 1965
Peso de la planta fresca	15 Kg
Rendimiento de aceite esencial	30 ml de aceite de color cafe claro y de color semejante al anís
$D_{23.3^{\circ}\text{C}}$ (Densidad)	0.954 (7)
$N_D^{23.3^{\circ}\text{C}}$ (Índice de refracción)	1.5000 (8)
$(\alpha)_D^{20^{\circ}\text{C}}$ (Rotación óptica)	0.02 prácticamente <u>0</u>

TABLA No. 4

ANALISIS CROMATOGRAFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE AGUACATE

Picos	Composición del área en % relativo	Tiempo de retención relativo	Identificación
1	0.835	0.016	Hexano.
2	0.104	0.027	Heptano.
3	0.229	-	No identificado.
4	4.008	0.048	Formiato de etilo.
5	1.043	0.069	Nonano.
6	0.521	0.082	Propionato de etilo.
7	0.647	0.099	Diacetilo.
8	0.187	0.141	Alfa - pineno.
9	0.689	0.203	Beta - pineno.
10	0.146	-	No identificado.
11	0.396	0.280	Limoneno.
12	80.843	1.65	Estragol.
13	1.879	1.302	Trans - anetol.
14	1.075	1.646	Alcohol fenil etílico.
15	1.169	1.844	Alfa - metil - ionona.
16	5.741	1.919	Beta - ionona.
17	1.231	2.058	Gama - metil - ionona.

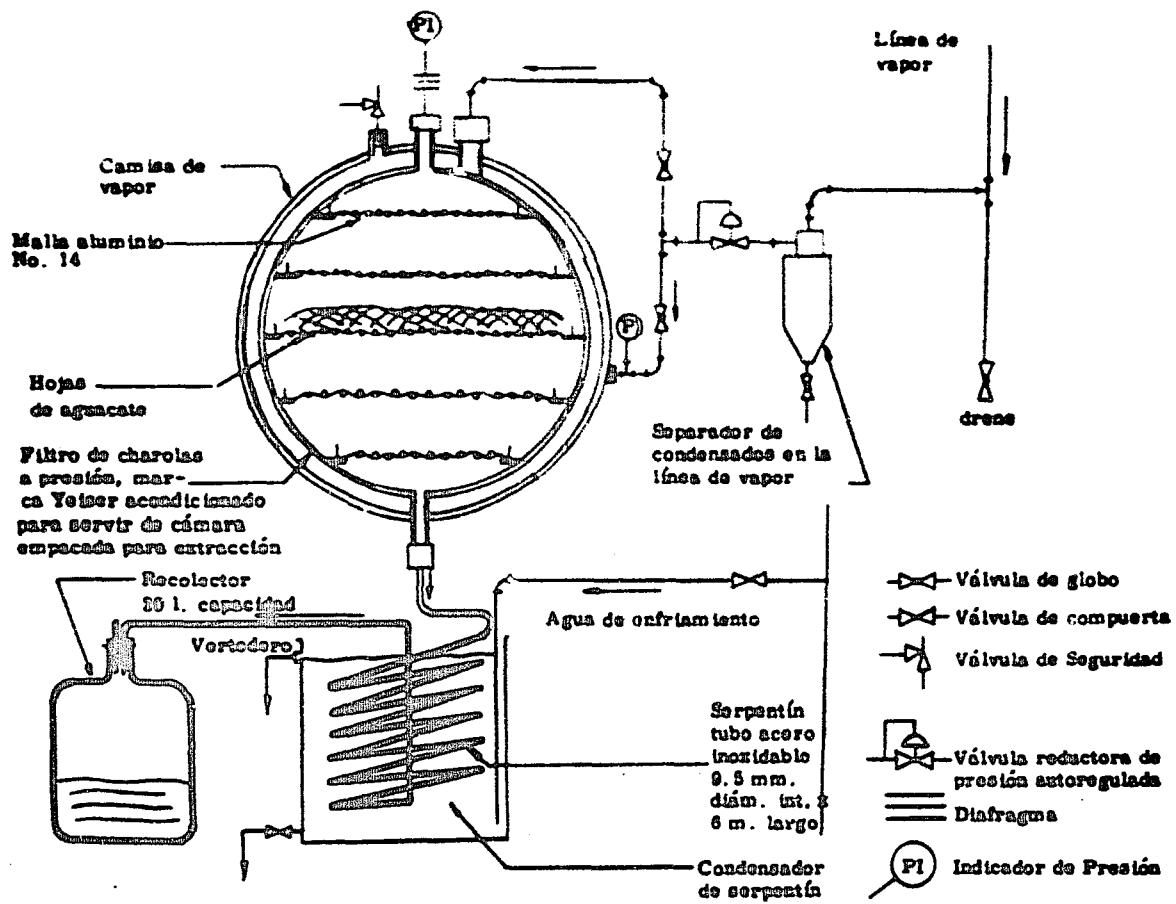


FIG. 1.- DESTILADOR-EXTRACTOR POR ARRASTRE DE VAPOR DIRECTO.

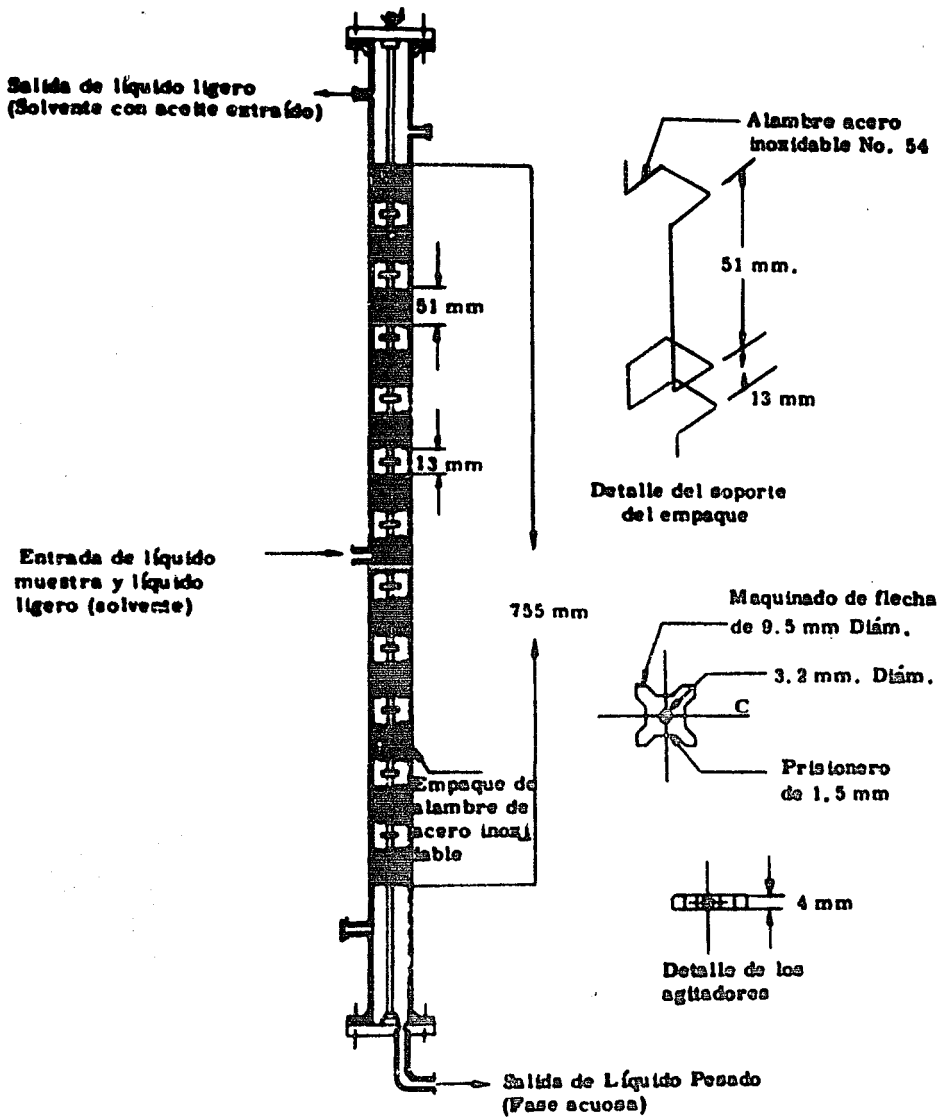


FIG. No. 2. - COLUMNA DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.

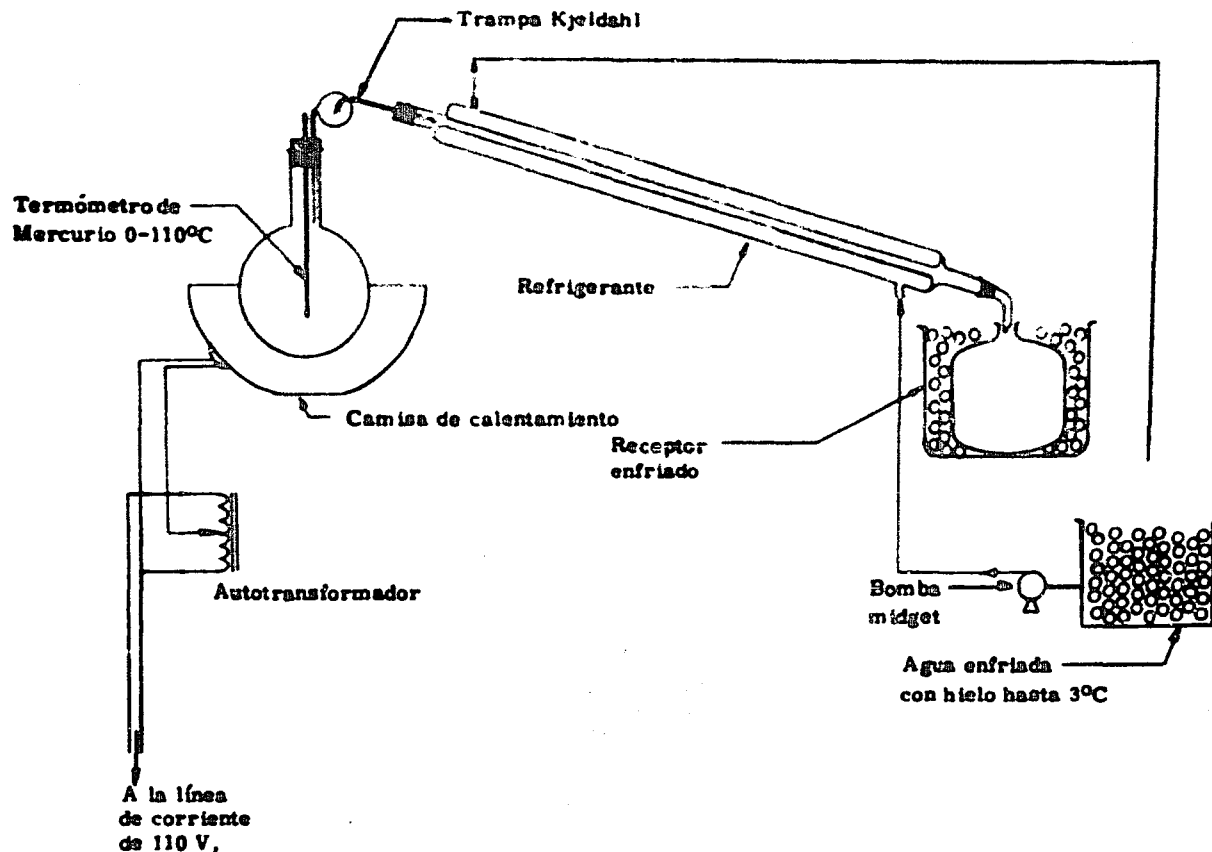


FIG. No. 3. CONCENTRACION DEL ACEITE ESENCIAL POR DESTILACION DEL SOLVENTE EMPLEADO EN LA EXTRACCION A CONTRACORRIENTE.

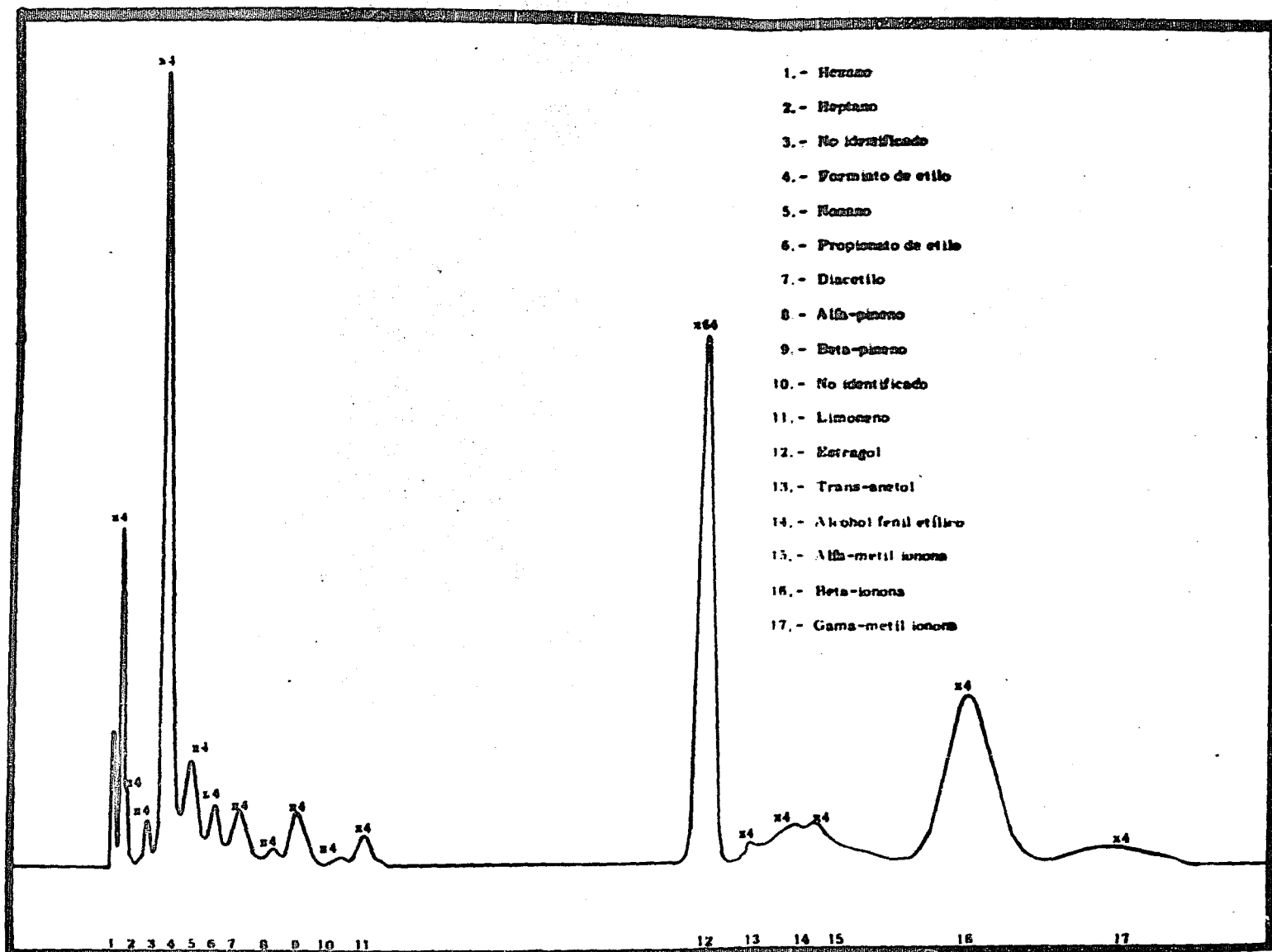


FIG. 4. - CRONATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE ACEITE ESENCIAL EXTRAIDA DE HOJAS DE AGUACATE.

Instrumento: F & M modelo 720
 Tamaño de muestra: 5 microlitros
 Tamaño de Columna: 200 cm x 0.635 cm.
 Empaquet: 20% de Carbowax en Chromosorb W.
 Temperatura: Programada 100°C - 220°C, 4°C/min.
 Gas arrastador: Helio 30 ml/min.
 Sensibilidad: 100 miliamperos.
 Atenuación: x4 y x64

VI. - BIBLIOGRAFIA.

- 1.- E. Guenther.
The Essential Oils, Vol. I.
D. Van Nostrand Company, Inc. New York 1948.
p. 111 - 123.
- 2.- Sheibel G.
Fractional liquid extraction. Part I.
Chemical Eng. Progress, 44, 682 (1953).
- 3.- Keulemans A. I. M.
Gas Chromatography. 2nd. Ed.
Reinhold Publishing Corporation. New York 1962.
- 4.- Galen W.
Instrumental Methods of Chemical Analysis. 2nd. Ed.
McGraw - Hill Book Company, Inc. New York, 1960.
p. 18 - 318.
- 5.- Keulemans A. I. M.
Gas Chromatography. 2nd. Ed.
Reinhold Publishing Corporation. New York 1962
p. 2.
- 6.- Zybyk W. J. and Conner A. Z.
Analysis of Terpene Hydrocarbons and Related
Compounds by Gas Chromatography.
Analytical Chemistry. Vol. 32, 912 (1960).

- 7.- Manjarrez A.
Instituto de Química U.N.A.M.
Información personal.
- 8.- Shriner, Fuson, Curtin.
The Systematic Identification of Organic Compounds
4th. Ed. 38.
Ralph L. Shriner and Reynold C. Fuson, 1935, 1940,
1948.
John Wiley and Sons, Inc. London, 1956.
- 9.- Naves I. René and Odermatt A.
The analysis of essential oils by partition gas - -
chromatography in general and that of the essential
oils of citronella and lemon grass in particular.
C.A. 53:3608g.
- 10.- Naves I. René.
Nature of the fixed phase or of the carrier in gas -
liquid partition chromatography of essential oils and
aromatics.
J. Soc. Cosmetic Chemists 9 - 101 - 3 C.A. 52:
10507g.
- 11.- Attaway J. A. and Walford R. W. and Edwards G. F.
Isolation and identification of some volatile carbonyl
components from orange essence.
J. of Agr. Food Chem. 10:102 (1962).
- 12.- Miller J. M. and Kirchner J. G.
Chromatostrips for identifying constituents of - -
essential oils.
Analytical Chemistry. Vol. 25 No. 7:1107 - 1108
(July, 1953).

- 13.- Zybyk W. J. and Conner A. Z.
Analysis of terpene hydrocarbons and related
compounds by gas chromatography.
Analytical Chemistry. Vol. 33:912 - 17 (1960).
- 14.- Jain T. C., Varma K. R. and Bhattacharyya S. C.
Terpenoids XXVIII. Gas - liquid chromatography of
monoterpenes and its application to essential oils.
Perfumery Essent. Oil Record 53, 678 - 84 (1962)
C. A. 58:4371b.
- 15.- Bevitt R. N. and Cheshire J. O.
The use of gas - liquid chromatography in the
analysis of perfumes and flavors.
J. Soc. Cosmetic Chemists 14, 173 - 202 (1963).
C. A. 59:3715a.
- 16.- Howard G. E.
The analysis of geranium oil by gas chromatography.
Analyst. Vol. 88:633 - 644 (1963).
- 17.- McCarthy A. I. and Palmer J. K. and Shaw C. P.
and Anderson E. E.
Correlation of Gas chromatographic data with flavor
profiles of fresh banana fruit.
J. of Food Science 28, No. 4:379 - 384 (1963).