

NOCIONES FUNDAMENTALES
DE
INVESTIGACIONES FITOQUÍMICAS

POR EL
Dr. L. ROSENTHALER
(TRADUCCIÓN DE E. H. D.)

PALABRAS DEL TRADUCTOR

Con toda exactitud podría el profesor Rosenthaler, repetir con el eminente rector de la Universidad de Salamanca: «da el oro de tu alma y él correrá aunque se le borre el cuño», si por cuño entendemos aquí el idioma en que la obra por mí traducida se escribiera y por oro de ley se valorase, justamente, todo el tesoro de ciencia y de experiencia acumulado en sus páginas.

Y no dudo en afirmar que correrá entre nuestros estudiosos el libro del doctor Rosenthaler, porque conozco por mi mismo las dificultades que entraña el estudio de la composición de los vegetales y todo el interés que la tarea posee en un país como el nuestro, ya se considere la cuestión con criterio desinteresado o se persiga un fin utilitario.

Cuando de los estudios de Bompland, Grisebach, Lorentz, Hieronymus, Spegazzini y Kurtz entre los primeros, surgió una flora variada y rica en el territorio de la República, su conocimiento despertó la curiosidad de los investigadores y la iniciativa de los espíritus prácticos, aquéllos buscando una verdad nueva, éstos una nueva riqueza y todos colaborando en la nacional grandeza. A poco que se busque en nuestra bibliografía científica, esta afirmación queda plenamente confirmada: los Anales de la Sociedad Científica Argentina, el Boletín de la Academia de Ciencias de Córdoba y el Boletín de la Unión

Industrial Argentina — por no citar sino los más antiguos que todavía viven — nos mostrarían en sus páginas ejemplos muy numerosos de memorias y monografías, notas y proyectos, consagrados al estudio de las plantas indígenas, donde se señaló un tanino utilizable, se indicó una cera nueva, se sospechó un alcaloide con virtudes curativas, se determinó un aceite esencial de valor indudable, se aisló una materia colorante base de una industria, cuando no era una sustancia amarga, un ácido orgánico, una resina, un almidón o una celulosa constituyente de una fibra textil, el objeto de la investigación de laboratorio o de la tentativa del técnico.

Y sólo los iniciados pueden valorar todo lo que significa en tiempo y en esfuerzo, la cifra desnuda y seca, el carácter anotado, la conclusión alcanzada. Quien no haya realizado una vez la tarea de escudriñar en una hoja, en una corteza o en una semilla, lo que hay más allá del aspecto exterior, todo lo que ha acumulado en sus órganos ese maravilloso laboratorio sintético del vegetal más vulgar y despreciado, no puede comprender el mérito de la labor que debemos a Parodi, Kyle, Arata, Canzoneri, Puiggari y Quiroga en la generación de químicos que nos precediera, mérito que crece, cuando se piensa en la escasez de material de investigación de sus laboratorios y en la pobreza de los métodos de trabajo que posetan.

En nuestra época, los estudios de fitoquímica son numerosísimos y sus autores no sólo son químicos sino médicos y agrónomos, veterinarios y egresados de escuelas industriales, hombres todos atraídos por la riqueza inagotable de la flora indígena, que sigue brindando a los estudiosos problemas variadísimos y a los negociantes, filones inexplotados de indiscutible riqueza.

Es verdad que disponemos en nuestras universidades e institutos técnicos, de laboratorios dotados de material abundante y apropiado a este género de trabajos; pero nuestras conquistas en cuanto a guías seguras y perfectas para la investigación, no han sido paralelas a nuestras adquisiciones en instrumentos y aparatos. Cada caso

particular es un problema que exige solución propia, característica ésta de los trabajos fitoquímicos que el análisis mineral no posee, y la lectura de las publicaciones hechas en la época actual lo demostraría sin esfuerzo.

Disponemos de tratados clásicos hoy, como el Analyse des végétaux de Dragendorff y Schlagdenhauffen en la Encyclopédie de Frémy, de capítulos valiosos en los Commercial organic Analysis de Alfred H. Allen, y en el Handbuch der Pharmakognosie de A. Tschirch; de guías sistemáticas como la tesis del doctor Pedro N. Arata, Análisis inmediato de los vegetales; de colecciones de memorias publicadas por el profesor Emile Perrot con el título de Travaux du Laboratoire de Pharmacologie de l'Ecole Supérieure de Pharmacie de Paris; de monografías valiosas en el Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden que dirige el profesor Emile Abderhalden, sin contar la selección de métodos analíticos que encierra el volumen tercero de la obra monumental de J. König, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmittel y el acopio de datos reunidos en la Pflanzen-chemie de H. Euler.

Sin embargo, erraría quien creyese suficiente ese conjunto de obras para resolver las cuestiones que el análisis vegetal plantea en un momento dado. La simple inspección del material bibliográfico que el profesor Albert Goris ha utilizado para su notable estudio Localisation et rôle des alcaloïdes et des glucosides chez les végétaux comprobaría mi aserto: más de 320 publicaciones han sido consultadas por el autor en su trabajo.

Adquiere entonces un valor excepcional la obra del doctor Rosenthaler, en su aparente pequeñez, y por esto me decidí a traducirla para mis alumnos, sin propósito alguno de lucro que, existiendo, desnaturalizaría mi labor y hasta la transformaría en usurpación de bien ajeno. Me propongo completarla con la traducción, ya muy adelantada, del tratado del doctor D. H. Wester, Anleitung zur Darstellung phytochemischer Übungspräparate, dedicado a farmacéuticos, químicos, tecnólogos, etc., por

el autor, con una suma considerable de datos prácticos que unidos a los del libro de Rosenthaler, contribuirán a despertar e intensificar en nuestros jóvenes estudiantes el amor por las tareas de laboratorio, haciéndoles adquirir esa cualidad excepcional entre las cualidades del espíritu, indispensable al investigador según Humphry Davy, que la leyenda oriental coloca como piedra angular de la sabiduría y que Goethe indica al decir:

*Nicht Kunst und Wissenschaft allein
Geduld will bei dem Werke sein.*

La Plata, Mayo de 1922.

DR. E. HERRERO DUCLOUX

INTRODUCCION

La composición química de una planta queda completamente determinada si se conoce la naturaleza y las proporciones de las especies químicas reunidas que la constituyen. La ejecución de una investigación sistemática de esta naturaleza es tarea cuya realización, aún con el progreso alcanzado en las ciencias naturales y en la química, representa dificultades extraordinarias, porque un considerable número de sustancias como las enzimas, los albuminoides, los pigmentos y los constituyentes de tejidos, no pueden fraccionarse en especies químicas definidas con seguridad.

Un trabajo semejante, sin lagunas, es en las más de las investigaciones de química vegetal un ideal, para cuya conquista no hay plan y que además no es necesario, teniendo en cuenta que los principios de estas investigaciones dependen de los propósitos perseguidos. El farmacéutico y el farmacólogo persiguen muchas veces fines muy distintos, así como el fisiólogo vegetal o el químico agrícola. La mayor parte de las investigaciones que se realizan, en química vegetal, en los laboratorios farmacéuticos, químicos y farmacológicos, tienen como fin la preparación de cuerpos valiosos e interesantes del punto de vista técnico, médico o científico, obtenerlos en estado de pureza y determinar su composición en mayor o menor cantidad.

La investigación de los componentes orgánicos de una planta es mucho más difícil que la investigación de sus elementos inorgánicos. Mientras que con la determinación de los últimos sólo se alcanza una relativa cantidad de elementos y compuestos, los orgánicos son innumerables, a pesar de contener sólo un número limitado de cuerpos simples. Las propiedades de los cuerpos, cuya obtención se persigue, son en su mayoría desconocidas y la distinción entre especies químicas definidas y mezclas de las mismas en los cuerpos que se aíslan no siempre es tarea fácil.

Además, el químico vegetal se halla a menudo ante la duda de si los cuerpos que obtiene en el curso de su trabajo existían así en la planta o son productos de descomposición de estos. En efecto, durante su investigación, la acción del calor, del oxígeno del aire, de las enzimas, las reacciones producidas entre los cuerpos disueltos y a menudo la reacción ácida o alcalina de los líquidos, pueden actuar sobre los compuestos primitivos del vegetal provocando variaciones que, aún con extrema habilidad y pericia, no pueden ya comprobarse.

Además, la composición de una planta o aún de una parte de planta no es la misma en todas las circunstancias. La variación de estación del año, las diferencias de terreno y condiciones de cultivo, influyen no sólo en la composición cualitativa sino también en la cuantitativa. Así en época de la floración, las hojas de *Digitalis purpurea* contienen más glucósido activo que en los principios del año y la riqueza en glucósido de la misma droga, oscila entre ciertos límites para hojas cosechadas en la misma época pero procedentes de distintos lugares. También es un hecho conocido que el contenido en alcaloides de las quinas de Java ha aumentado notablemente por el cultivo.

Finalmente, las determinaciones cuantitativas proporcionan solamente resultados aproximados. Por ejemplo, los métodos puramente científicos de valoración de ta-

ninos, albuminoides y componentes de membranas, dejan mucho que desear.

Si se considera la diversidad de las sustancias que se encuentran en los vegetales, se comprenderá fácilmente que no exista y que no pueda existir una marcha sistemática como en el análisis inorgánico, mientras no se hayan realizado investigaciones completas sobre un gran número de plantas de todas las familias del reino vegetal. Así, pues, no es posible establecer un método de investigación que permita con seguridad obtener, sin modificación alguna, los cuerpos todos que los vegetales contienen, como en otros términos podría decirse, una red de mallas tan apretadas que retuviese todas estas sustancias. Si a pesar de esto se propone una marcha sistemática (por ejemplo la establecida por Dragendorff) es menester que el principiante la considere como una guía, como un medio de orientación, sin el cual se encontraría perdido en el análisis vegetal, sin que deba considerarse esclavo de sus prescripciones. Una gran dosis de sagacidad y de facultad de observación necesita el químico vegetal si quiere dominar su tarea y resolver en cada caso las cuestiones que se le planteen.

Por otra parte, existen circunstancias por las cuales el trabajo del químico se facilita: así, en la multitud de sustancias contenidas en los vegetales pueden formarse grupos, cuyos individuos poseen propiedades comunes. En presencia de cuerpos desconocidos de un grupo dado, alcaloides, albuminoides, taninos, azúcares, el empleo del método de investigación probado ya para los miembros conocidos del grupo dará sus resultados o en presencia de las propiedades comunes de los componentes de un grupo, se podrá proyectar un nuevo procedimiento. Un gran número de sustancias vegetales, cuyos caracteres son conocidos, se hallan muy difundidas en las plantas; por eso es fácil (y a menudo hasta superfluo) establecer su existencia en el material que se estudia. En este caso se halla la clorofila, el azúcar reductor, la celulosa, el almidón, etc.

A menudo es más fácil comprobar la ausencia de un cuerpo dado que determinar su presencia: así, si un extracto concentrado de vegetal no da precipitado alguno con los reactivos generales de alcaloides, la presencia de un cuerpo de este grupo puede excluirse; en cambio, la producción de un precipitado de esta clase no sería prueba suficiente de la existencia de tal especie de sustancia, pues podría deberse la reacción a un cuerpo albuminoide.

A veces, las aplicaciones de una planta sirven como punto de partida en la investigación: los alimentos verdaderos contienen hidratos de carbono y albuminoides digestibles; en los alimentos de ahorro se encuentran sustancias de carácter básico; y, en fin, en mezclas para lavar de carácter vegetal, puede esperarse hallar glucósidos semejantes a la saponina.

La situación de la planta estudiada en el sistema de clasificación natural, proporciona a veces datos no despreciables respecto de las sustancias cuya presencia deba esperarse. Basta a este respecto recordar la relación existente entre muchas solanáceas o papaveráceas en cuanto a su contenido de alcaloides se refiere. Sin embargo, no es posible asegurar para una planta un lugar en la clasificación como consecuencia de su composición química. Si no se puede reconocer que en las plantas comúnmente llamadas (superiores) aparecen componentes distintos de las que se presentan en las inferiores y que, por ejemplo, alcaloides complicados como la morfina y la quinina faltan en éstas, también hay que confesar que sobre la base de los resultados de análisis de vegetales que poseemos, no es posible establecer un paralelismo entre la constitución anatómica y morfológica de las plantas por una parte y su composición química por otra, pretendiendo construir un sistema de clasificación capaz de sustituir a la clasificación actual.

Algunos hechos aislados, como la obtención de especies de acónito sin aconitina, la presencia de cafeína en

especies vegetales pertenecientes a familias nada vecinas y la falta de alcaloides venenosos en muchos miembros de la familia de las loganiáceas y aún del género *Strichnos*, hablan a este respecto, demostrando que la formación de un sistema de clasificación con base química no podría hacerse tomando algunos cuerpos como guías, aunque se considerase sus propiedades medicinales, fisiológicas o técnicas. Posiblemente existen diferencias muy pequeñas, aunque de gran valor, en la composición de las albúminas del protoplasma, que guardan estrecha relación con las diferencias de estructura anatómica y morfológica de las plantas.

Si fuese posible un mayor conocimiento de la composición y de la estructura de los vegetales, se podría también deducir la composición química de una nueva especie o de un nuevo género, sabiendo su situación en el sistema natural.

Abstracción hecha de estos problemáticos empleos, tiene la química vegetal analítica fines tan numerosos que cumplir, servicios tan valiosos que prestar a la ciencia y a la técnica, que debe desearse una dedicación especial por parte de las universidades hacia esta rama del saber.

PARTE GENERAL

GENERALIDADES SOBRE ALGUNOS TRABAJOS NECESARIOS PARA LA OBTENCIÓN DE SUBSTANCIAS VEGETALES

La obtención comienza con la extracción o con la destilación, si de sustancias volátiles se tratase; sólo en casos excepcionales encuentra la sublimación su empleo, como en la extracción del ácido benzóico del benjuí.

El uso de aparatos de percolación para extracciones en frío y de aparatos de extracción en caliente, facilitan mucho el trabajo. Si en esa operación no se pudiese evitar la calefacción, ésta se haría en baño maría.

La duración de la extracción depende de las propiedades de los cuerpos a obtener y de la naturaleza de la investigación que se realiza. En general, conviene llevarla hasta completo agotamiento de la sustancia tratada, lo que se notará fácilmente si el líquido obtenido es coloreado, porque se tornará incoloro y en caso de que desde el principio no estuviese teñido, la evaporación de pequeñas porciones de tiempo en tiempo, en un vidrio de reloj, dará la indicación precisa; si se tratase de sustancias grasas, se deja caer algunas gotas del líquido en un papel de filtro y la observación de la marcha obtenida guiará seguramente al operador;

si son taninos lo que extraemos, esperaremos a que la reacción del cloruro férrico (mejor la del acetato o del sulfato de hierro y amonio) (pág. 19) no se produzca más; con las saponinas se utiliza la reacción de la espuma (pág. 20) y con los alcaloides los reactivos generales o la desaparición del sabor amargo, esto último con cuidado naturalmente. Esta última reacción organoléptica no sólo se refiere a alcaloides sino a otras numerosas sustancias. La materia extraída debe prensarse a fin de privarla del disolvente que retiene.

La filtración que debe realizarse con el líquido obtenido, sino se dispusiese de una centrífuga, resulta a menudo una operación difícil. Lo mejor es dejar reposar bien el líquido, decantar la parte clara y filtrar el resto, pudiendo emplearse como clarificantes el talco o la tierra de infusorios, los que arrastran al fondo las partículas en suspensión; en líquidos gelatinosos es muy útil a menudo una adición de alcohol.

Un buen procedimiento de filtración es el de Pukall, cuando todos los demás fallan. La evaporación se hará, siempre que sea posible, en el vacío, a fin de impedir la oxidación a alta temperatura y la posible descomposición de muchas sustancias.

Si se pretende evaporar un líquido alcohólico para redissolver el residuo en agua, se tendrá cuidado de eliminar completamente el alcohol, pues de lo contrario muchos cuerpos como la clorofila insolubles en agua y solubles en alcohol serán arrastrados, provocando en el líquido enturbiamientos muy difíciles de eliminar por filtración. Una precaución semejante hay que observar en el caso contrario. Y si a pesar de todo se produjese la turbidez, se ensayará la adición de éter, que algunas veces da buen resultado.

Si se quisiese decolorar el extracto con carbón, es menester hervir después este decolorante con distintos disolventes, para reconocer la presencia de alcaloides y otras sustancias que junto con los pigmentos hubiesen sido retenidos.

En los casos favorables se obtiene por estos medios un producto cristalino que sin ulteriores tratamientos, salvo la decoloración con carbón y una recrystalización, está constituido por substancias puras. En la mayor parte de las veces, la cristalización no marcha tan fácilmente y se necesita esperar hasta un mes sobre ácido sulfúrico para que se realice. Si se trata de una substancia conocida o de la reunión de algunos cuerpos solamente (pág. 109) se puede iniciar la cristalización por siembra.

Los cuerpos solubles en agua y que en alcohol no se disuelven, se pueden hacer cristalizar, si la solución acuosa se adiciona de alcohol, hasta producir un enturbamiento que se elimina con agua, llevando entonces el líquido a un desecador con cal viva; el agua es absorbida por la cal y el líquido se hace así más y más alcohólico.

Un cuerpo cristalino puede, en general, considerarse puro, si después de recrystalizado no varía su punto de fusión.

Más difícil es establecer la pureza de un cuerpo que no funde sin descomposición o es amorfo o líquido. Los líquidos que por ebullición no se descomponen se distinguen por destilación fraccionada, separando cuidadosamente las fracciones que destilan entre intervalos de temperatura pequeños. Esta operación, aún con repetidas redestilaciones, no lleva algunas veces al resultado deseado, ni en el caso de líquidos de punto de ebullición constante. En esos casos se trata de producir compuestos definidos de esos cuerpos, los cuales se dejan separar muchas veces mejor que los cuerpos originarios. Un procedimiento de este género se emplea particularmente, para separar los componentes terpénicos de los aceites etéreos (pág. 72) y para la separación de cuerpos no volátiles. Los alcaloides se llevan con este fin al estado de sales, los glucósidos a compuestos acetilados, los ácidos a éteres, etc.

Un valioso método de separación se funda en la precipitación fraccionada y la disolución consiguiente. Para

la ejecución de este procedimiento, se establece primero con una pequeña cantidad de la substancia en que proporciones se disuelve en el líquido; entonces se trata cinco veces con el quinto del volumen o diez veces con el décimo del volumen que se ha determinado como necesario para la disolución y se prueba con cada fracción las propiedades de la substancia obtenida por evaporación, en particular el punto de fusión y la composición elemental. De modo parecido se procede en la precipitación fraccionada: se determina exactamente la cantidad de precipitante que sería necesario para precipitar de la solución la totalidad de la substancia disuelta y se precipita entonces cinco veces con $\frac{1}{5}$ de esta cantidad (o diez veces con $\frac{1}{10}$ de la misma), separando cada vez por filtración el precipitado obtenido. Si se tratase de dos substancias que se comportan de un modo distinto respecto del líquido o del precipitante, en las fracciones obtenidas por la primera y la última precipitación, se observarían caracteres diferentes y se podría llevar la separación más adelante.

Si se cree tener un cuerpo sólido en estado de pureza, se comprueba primero si contiene parte mineral. Calentando en una laminilla de platino hasta el rojo, la parte mineral quedará como residuo. Se buscará entonces el medio de librarlo de esas impurezas, salvo el caso de que se trate de un compuesto órgano-metálico. Para conseguirlo libre de cenizas, se puede aplicarle la disolución o la precipitación fraccionadas; si fuese una substancia no dializable, la diálisis daría buen resultado, sobre todo si para acelerarla se añade un poco de ácido, con tal que éste no la dañe.

Se procede de modo especial si la substancia contuviera ázoe, fósforo o azufre. Para comprobar la existencia de ázoe se calienta 0,05-0,1 en un tubo de ensayo seco con sodio metálico y se trata el producto con agua, sabiendo que el ázoe de la substancia se ha transformado en cianuro sódico; luego se trata con sulfato ferroso y cloruro férrico, se hierve y se acidula con ácido clorhídrico, formándose el azul de Prusia.

Calentando con sodio se determina también el azufre: se forma sulfuro sódico, que con nitroprusiato sódico dará una coloración violeta púrpura y que producirá sobre lámina de plata la mancha negra característica. Se determina también el azufre, atacando con ácido nítrico fumante o mezclando con un álcali y nitrato potásico, que por el calor lo oxidarán hasta formar ácido sulfúrico, el cual se caracteriza con cloruro bórico.

Por reacciones de oxidación semejantes se determinará el fósforo, transformándolo en ácido fosfórico que se caracterizará por sus precipitados de fosfato amónico magnésico o de fosfomolibdato amónico.

Estas reacciones previas son seguidas del análisis elemental por combustión y si es posible se determina el peso molecular. Después se establecen los caracteres de solubilidad y el modo de comportarse con los distintos reactivos.

INVESTIGACIONES PRELIMINARES

Antes de comenzar la investigación sistemática, se puede determinar la presencia o ausencia de un gran número de sustancias muy difundidas en los vegetales, con algunas reacciones preliminares sencillas.

Para esto se tratan 5-10 gramos de sustancia con agua en baño maría y el extracto acuoso se somete después de enfriarse a las operaciones siguientes:

1. Determinación de la reacción. Una reacción ácida demostraría la existencia de ácidos libres, de sales ácidas o de cuerpos fenólicos;

2. Adición de cloruro férrico. Si no se produjese coloración azul o verde en solución neutra, se podría establecer la ausencia de taninos. Estos se precipitarán después con soluciones de alcaloides o gelatina y dan con bicromato potásico un precipitado pardo u oscuro.

3. Adición de acetato plúmbico. Si se produce un precipitado se sigue precipitando con cuidado y se investiga si el filtrado precipita con algo de subacetato, pues un exceso de este cuerpo disuelve en algunos casos el precipitado obtenido. Por el acetato de plomo muchos ácidos precipitan, así como también los taninos, sustancias pécicas y albuminoides, mientras que otros cuerpos como las gomas y algunos glucósidos, deben ser precipitados antes con acetato de plomo ácido.

4. Calentamiento con licor de Fehling. Si se obtiene el precipitado característico de óxido de cobre, quedará demostrada la existencia de sustancias reductoras como por ejemplo los glucósidos. Si no hubiere reducción se calentará después de agregar ácido clorhídrico, se neutralizará con hidrato sódico y se calentará de nuevo, interpretando entonces la aparición de un precipitado de óxido, como señal de presencia de cuerpos capaces de dar sustancias de desdoblamiento reductoras, como los disacáridos y los glucósidos.

Si se hirviese un líquido ácido (1) con licor de Fehling viejo, puede obtenerse un precipitado de cobre oxidado que no corresponda a sustancia reductora alguna en el ensayo, por lo cual conviene tener esta solución siempre reciente o utilizar un líquido formado por:

Sulfato de cobre	3,5
Glicerina	15,0
Citrato de sodio	25,0
Hidrato sódico al 15 %.	20,0
Agua a	100,0 cm ³

5. Sacudimiento de la sustancia. Si se formase una parte espumosa, podría atribuirse, entre otros cuerpos, a sustancias pécticas, taninos, albuminoides y saponinas, debiendo notarse que estas últimas dan una espuma con estructura de panal de abejas y de mayor persistencia que ninguna. En el caso de la *Musa paradisiaca*, la espuma que se produce, muy semejante a la de una saponina, se debe al oleato potásico que contiene.

6. Se vierte sobre una pequeña cantidad del material de ensayo en un tubo o en un matracito un poco de agua; se cierra con un corcho y se cuelga de éste una tira de papel empapada en solución de cobre y guayaco, haciendo lo mismo en otros dos tubos o matracitos, en los cuales se ha añadido algo de ácido sul-

fúrico diluido (en el segundo) y un poco de emulsina (en el tercero). Si después de un día de espera no hay coloración azul del papel, ni después de calentar al vapor los ensayos 1 y 3 y haber llevado el 2 a la ebullición, puede establecerse la ausencia de cuerpos engendradores de ácido cianhídrico por desdoblamiento. Si el núm. 1 se tiñe de azul al agregar agua fría a la substancia de ensayo y calentar suavemente, pero no se tiñe si ésta se sumerge en agua hirviendo previamente, se infiere que hay un cuerpo cianogenético y con él una enzima activa.

Este papel de cobre y guayaco se prepara humedeciendo papel puro en una solución incolora por dilución de sulfato cúprico y tintura de guayaco y su empleo exige cuidar de que no haya al mismo tiempo substancias como el ácido clorhídrico y el amoníaco, cuyos vapores pueden reaccionar como el ácido cianhídrico.

Todas estas reacciones sólo sirven como medio de orientación y en particular para la investigación de glucósidos, substancias amargas y alcaloides, menester es recurrir al procedimiento de Stas-Otto.

PROCEDIMIENTO DE STAS-OTTO

El método de investigación de Stas-Otto se funda por una parte en la solubilidad de la mayor parte de los glucósidos y cuerpos amargos en alcohol y en agua y la posibilidad de extraerlos por agitación con éter de esta última solución; y además, porque los tartratos de alcaloides también son solubles en alcohol y en agua, pero no son arrastrables por el éter si la solución es ácida, en tanto que lo son si se han puesto en libertad por alcalinización previa. Debe observarse, sin embargo, que algunos alcaloides de débiles propiedades básicas como la colchicina y la veratrina, también en presencia de ácido en sus soluciones, pasan al éter; además, hay alcaloides como la morfina y la cefaelina que dan con los álcalis fijos, compuestos solubles en éter.

Las sales de estos alcaloides deben descomponerse con amoníaco. De acuerdo con estas circunstancias el método de Stas-Otto se conducirá del modo siguiente:

La sustancia a investigar (25-50 gramos) se calentará por media hora en un balón con refrigerante de reflujo, agregándole alcohol conteniendo ácido tártrico en proporción suficiente para darle una reacción ligeramente ácida, que debe persistir después de la ebullición y en caso contrario se repetirá ésta. El filtrado que se obtenga se calentará en bañomaría para eliminar el alcohol y el residuo se tomará con agua, poco al

principio y más después, calentando nuevamente si fuese necesario y el líquido acuoso se filtrará en frío. Si el líquido no resultase claro, se evapora a consistencia de extracto y si fuese posible a sequedad y, disolviendo en alcohol, se procede de nuevo como antes, hasta conseguir un líquido acuoso claro. Este se agita con éter en una ampolla muchas veces, sin sacudimientos para evitar la formación de emulsiones, con movimiento de oscilación cruzada y si apesar de todo se produjese emulsión, se agregará un poco de alcohol o se calentará un poco o se filtrará a través de filtro mojado. El primer líquido obtenido en la agitación (A_1) se conserva aislado si estuviese muy teñido y los siguientes (A_2) se reúnen porque están menos coloreados.

En seguida se alcaliniza fuertemente con hidrato sódico la solución acuosa y se agita de nuevo con éter muchas veces, reuniendo los líquidos separados (B).

Finalmente se elimina del líquido el resto de éter, se agrega cloruro amónico para formar amoníaco y se agita con alcohol amílico (C).

De los líquidos A_2 , B y C se obtienen por destilación volúmenes reducidos a 5 cm³ más o menos, observando las precauciones del caso, haciendo una investigación también sobre A_1 si en A_2 no se hallase nada. Si así evaporados los líquidos citados no apareciese nada, se colocarían en vidrio de reloj o en cristalizadores: A_2 y B se dejan evaporar completamente al aire libre y C en baño de vapor. Si se obtuviesen así residuos, lo que casi siempre ocurre, se investigará en A glucósidos, alcaloides y cuerpos amargos, así como en B y en C se buscarán alcaloides.

Con este fin, se prueba primero la acción de la solución acuosa del residuo de A sobre el licor de Fehling, llevándolo a la ebullición. Si se produjese una reducción, es dudoso todavía atribuírla a un glucósido, pues en tales circunstancias esa acción la ejerce uno de la solanácea *Fabiana imbricata* y también un cuerpo amargo como la picrotoxina, parte activa de los granos de

Anamirta coccullos W. y C. Además, la reducción puede atribuirse a azúcar reductor que en pequeñas proporciones haya pasado al éter.

Para tener la certeza de que se trata de un glucósido, se ensaya de disolver el residuo seco en un líquido que no disuelve el azúcar, como éter anhidro o éter de petróleo y se repite la investigación sobre la solución acuosa del residuo que este extracto etéreo proporciona. Se hacen entonces sobre este residuo las reacciones más características de los hidratos de carbono. Se agrega a la sustancia disuelta en un poco de agua o alcohol algunas gotas de una solución al 20 % alcohólica de α -naftol y se superpone a ácido sulfúrico concentrado. En presencia de un glucósido se formará un anillo azul o violeta, que sólo para escaso número de glucósidos persiste. Pueden producirse otras coloraciones, cuando se sustituye en esta reacción el α -naftol por fenol, thymol o alcanfor. En experiencias ulteriores se calienta el residuo con ácido clorhídrico (los glucósidos forman productos insolubles de desdoblamiento) y se investiga la presencia de azúcar, calentando con clorhidrato de fenilhidrazina y acetato sódico, por formación de una osazona. Si no se produjese esta osazona habría que excluir la existencia de un glucósido verdadero. Como muchos glucósidos no se desdoblan a la presión ordinaria por calefacción, se operará en caso negativo con frascos de presión o tubos sellados.

Si el licor de Fehling no fuese reducido por el residuo, se calienta con ácido clorhídrico y se procede como en la reacción preliminar 4. Y si entonces hubiese reducción, podría interpretarse como debida a un glucósido o a un disacárido. Se aplicará aquí el procedimiento ya descrito, utilizando el éter anhidro o el de petróleo.

Bourquelot ⁽²⁾ ha propuesto un procedimiento para determinar glucósidos y azúcar ordinario en presencia de azúcar reductor: se disuelve una parte del residuo en 10 cm³ de solución saturada de thymol y otra semejante

en una solución como la anterior adicionada de invertina. Después de 3 días se prueban ambos líquidos (que pueden clarificarse con acetato de plomo a 25 %) en el polarímetro y se determina la cantidad de substancia reductora por ebullición con licor de Fehling. La prueba con invertina presenta, cuando hay azúcar, una variación en el poder rotatorio específico y un aumento en el poder reductor: la cantidad de azúcar ordinario se calcula con estos dos datos. Se hierve esta prueba con invertina después de 3 días para matar la enzima, se agrega, después de enfriar, emulsina y se prueba después de algunos días como antes: una ulterior variación en el poder rotatorio específico y un aumento en el poder reductor demostraría la existencia de un glucósido.

Si con este procedimiento se quisiese únicamente determinar la presencia simultánea de azúcar reductor, azúcar ordinario y un glucósido, no es necesario pasar por todos los detalles del método Stas-Otto. Se puede tratar la substancia a analizar con alcohol hirviendo para extraerla y agregando carbonato cálcico se evapora esta solución: el residuo se toma con la solución de thymol y se procede como queda dicho.

Si el residuo A contuviese un cuerpo amargo, una prueba organoléptica hecha con precaución, daría la certidumbre de su presencia.

Sólo queda todavía por probar la presencia de alcaloides en el residuo A que excepcionalmente puede ocurrir. Si se dispusiese de mucha substancia (0,05-0,1) se haría la prueba de Lassaigne, pudiendo asegurarse la ausencia de alcaloide si no hubiese formación de azul de Prusia, pero sin que una reacción positiva baste para constatar su presencia, hasta haber experimentado sobre el resto del residuo la acción de los reactivos propios de los alcaloides, entre los cuales citaremos soluciones de tanino, ácido pícrico, cloruro de platino, cloruro de oro, ioduro mercurico potásico, iodo iodurado, ácido fosfotúngstico, etc., (ver pág. 42). Las reacciones se hacen sobre una solución acética débil del residuo

empleando gotas de ella y del reactivo y observando los enturbiamientos, precipitados o coloraciones que pueden producirse.

Sin embargo, estas reacciones por sí sólo no proporcionan una conclusión definitiva para atribuir a los alcaloides la turbidez de la primitiva substancia. En el laboratorio se observan casos frecuentes en los cuales la substancia disuelta en ácido acético muy diluído, ha dado precipitados con los reactivos de alcaloides sin que pueda atribuírse a un proceso químico, como en el caso de la presencia de estas substancias. Por otra parte hay glucósidos que dan precipitado con solución de tanino y tratando la pasta de guaraná con el método Stas-Otto se obtiene un residuo A que con yoduro potásico da precipitado.

Los residuos B y C se tratan del mismo modo para determinar la presencia de alcaloides.

Debe hacerse notar que las plantas contienen cuerpos básicos que no son alcaloides en el estricto sentido de la palabra y que precipitan con los reactivos de los alcaloides: entre otros se hallan muy difundidas la betaína y la colina. La betaína se caracteriza muy bien por una sal doble de oro que produce, da color azul con ferricianuro potásico y cloruro férrico y su reacción es neutra. La colina es alcalina y su solución alcohólica precipita con una solución alcohólica de bicloruro de mercurio. Ambos cuerpos desprenden con hidrato potásico trimetilamina y dan (como otros cuerpos semejantes) la reacción de Florence ⁽³⁾. Algunas gotas de su solución evaporadas en un portaobjetos dan, con una solución fuerte de yodo en yoduro potásico, cristales que observados al microscopio crecen y desaparecen.

El método de Stas-Otto no está exento de inconvenientes. Primero porque el éter es un medio de solución malo para muchos glucósidos y alcaloides, por lo cual es ventajoso adicionarlo de cloroformo. Este último por agitación produce más fácilmente que el éter emulsiones, aconsejándose por eso el método de

perforación (que también es útil para el éter). Se asegura el perforador con un tapón de corcho en el cuello de un baloncito conteniendo 40-50 cm³ de cloroformo, se coloca un poco de éste en el perforador y luego la solución acuosa. Se liga el perforador a un refrigerante de reflujo y se calienta el baloncito en baño de vapor de modo que caigan 30-40 gotas por minuto en el perforador, pudiendo calcularse en 2 horas la duración del proceso.

Una dificultad mayor del método Stas-Otto, proviene de que hay cuerpos que tanto por ebullición con ácidos como por la acción de los álcalis en frío, sufren desdoblamientos. La mayor crítica que al método puede hacerse se funda en que numerosos glucósidos y cuerpos amargos, parte en agua y parte en alcohol, no son solubles y no pasan por agitación a un líquido determinado.

MÉTODO DEL PLOMO

(ROCHLEDER)

Si se obtuviese un resultado positivo con la solución ensayada, es decir, si los acetatos de plomo diesen precipitado, se ensaya con una parte el método del plomo, particularmente estudiado por Rochleder.

La substancia, extraída previamente con éter ordinario o éter de petróleo si fuese necesario, se hierve con agua, se filtra y a temperatura de ebullición, se precipita con una solución de acetato plúmbico en ligero exceso.

El precipitado A así obtenido se lava primero con solución diluída de acetato plúmbico y luego con agua hasta reacción neutra, conviniendo hacer estos lavados por decantación. El líquido residual de la precipitación así como las aguas de lavado concentradas, se precipitan con acetato básico, obteniendo el precipitado B.

Se ensaya primero si el precipitado A es soluble parcialmente en alcohol frío o hirviente y si así fuere, la solución obtenida A₂ se libra de Pb con H₂S (o con H₂SO₄, H₃PO₄ o SO₄Na₂) se concentra el filtrado y se deja evaporar en el vacío sobre H₂SO₄.

La parte insoluble de A en alcohol se trata con C₂H₅O₂ diluído. Si el precipitado A fuese incompletamente soluble, se podría establecer por adición de acetato básico si algo ha ido a la solución. Si se produjese

precipitado se sigue añadiendo reactivo hasta precipitación, se lava el precipitado $A\beta$, se suspende en agua y se trata con H_2S . El filtrado se evapora y se deja en el vacío sobre H_2SO_4 .

Del mismo modo se trata la parte insoluble después del tratamiento con alcohol y con $C_2H_4O_2$, del precipitado A.

En el precipitado B se opera en general del mismo modo que con el precipitado A, excepto en lo que se refiere al tratamiento con $C_2H_4O_2$, pues todos los precipitados obtenidos con acetato básico son completamente solubles en aquel ácido.

El líquido B, que además de plomo y $C_2H_4O_2$, puede contener glucósidos, cuerpos amargos, alcaloides, azúcares y sales con sustancias análogas, se libra del Pb, del SPb y del H_2S , este último con corriente de CO_2 , y se divide luego en tres porciones: la primera se neutraliza casi con CO_3Na_2 y se sigue su estudio con el método de Stas-Otto; la segunda porción se concentra y se deja en vacío sobre H_2SO_4 a evaporar, separando los cristales que se formasen del agua madre que se evaporará más y se llevará a sequedad, tomando el residuo con alcohol y precipitando con éter o tratando de hacerlo; de este modo se tendrían también tres porciones:

- 1 Substancias insolubles en alcohol,
- 2 Substancias insolubles en alcohol-éter,
- 3 Substancias solubles.

Para constatar si con este procedimiento se ha producido algún desdoblamiento por el $C_2H_4O_2$ libre, se neutraliza la tercera porción antes de la evaporación con Na_2CO_3 y se trata en lo demás como en la segunda, teniendo en cuenta que el $C_2H_3O_2Na$, es soluble en agua y en alcohol.

Es necesario en el curso de la investigación estudiar el SPb obtenido, pues éste en estado naciente posee la peculiaridad de arrastrar (adsorber?) muchas sustancias y en particular colores o cuerpos enturbiadores,

debiendo hacer notar que en esa propiedad reposa en parte el método del plomo. Se trata el SPb con H_2O , alcohol y NH_3 hirvientes y se observa por evaporación si estos líquidos han disuelto algo. Se oxida el SPb con (*) H_2O , y el SO_4Pb resultante se hierve con agua y con alcohol. Es innecesario aconsejar que se proceda a ensayar el sulfuro de plomo en partes antes de atacar la totalidad del precipitado.

Por este camino se obtiene gran número de cuerpos cristalizados y residuos amorfos cuya naturaleza se ha establecido y que depende de la forma de obtenerlos.

En el precipitado A pueden separarse, por ejemplo, ácidos vegetales, taninos, mucílagos y glucósidos. Se prueba entonces cada una de estas sustancias con licor de Fehling, así como las del líquido y del precipitado B; de estos últimos se pueden separar azúcares y cuerpos afines y también sustancias básicas.

Para evitar la acción que el H_2S y el $C_2H_4O_2$ pueden ejercer en algunos casos sobre las sustancias que se quiere aislar, se emplea como precipitante hidróxido de plomo recientemente precipitado o carbonato de plomo, tratando líquido y precipitado como el líquido y precipitado B.

En el método descripto, el empleo de los compuestos de plomo aparece como sistemático en análisis vegetal, hasta como clarificadores o decoloradores, pudiendo en muchos casos ser sustituidos por MgO o $Al(OH)_3$ recientemente precipitado.

En muchos casos el método del plomo puede ser de gran utilidad en el tratamiento de líquidos alcohólicos.

En forma semejante a las sales de plomo actúan las sales, hidróxido y carbonato de cobre, permitiendo marchas sistemáticas de análisis. Se puede, por ejemplo, primero con carbonato precipitar taninos y mucílagos y después con el hidrato otros cuerpos. Puede decirse sin embargo que un método completo no se ha hecho aún.

MARCHA ANALÍTICA SISTEMÁTICA

El principio de la marcha reposa en el tratamiento sucesivo del material de investigación groseramente pulverizado, con una serie de diferentes disolventes.

Los residuos de la evaporación de los líquidos obtenidos por extracción, se tratan por el mismo principio o por el método del plomo.

A menudo es más simple agitar los extractos con líquidos apropiados, evaporar entonces éstos y trabajar sobre los extractos.

En general bastan 50-100 gramos del material para una investigación original.

Para tener una idea de los medios de extracción en caliente, se atacan cantidades iguales de substancia con iguales porciones de líquido, en caliente en extractores y en frío con percolador, haciendo actuar los disolventes en general hasta que la muestra no ceda más al líquido.

Sólo en el caso de que la acción de un disolvente sea insignificante, se puede despreciarlo y pasar a emplear otro. La substancia no debe conservar restos de un disolvente cuando se comience a actuar con otro.

EXTRACCIÓN

1. *Eter de petróleo* (35°-40°): grasas y aceites grasos, ceras, *lecitina*, aceites esenciales, parte de clorofila, filos-

terina, algunos alcaloides en estado libre, glucósidos y cuerpos resinosos.

Los alcaloides se extraen del éter con $H_2O + HCl$; se alcaliniza esta solución acuosa y se extrae de ella con éter de nuevo, obteniéndose por evaporación el alcaloide libre. Si hubiese un glucósido soluble en H_2O , habría que buscarlo en el mismo residuo y lo mismo ocurriría con cuerpos solubles a la vez en H_2O y en éter de petróleo.

El líquido etéreo que se agitó con agua acidulada, se lava con H_2O para arrastrar el resto que hubiera de ácido, se destila el éter y se toma el residuo con C_2H_5OH 90° hirviendo, líquido que extraerá todo menos las grasas y los aceites grasos. Debe tenerse en cuenta que según la naturaleza de las sustancias grasas pueden disolverse mayores o menores proporciones en alcohol caliente; conviene en tal caso evaporar el alcohol e investigar empleando alcohol diluido, éter, benzol, etc., los componentes disueltos.

La cera y la fitosterina, así como algo de la grasa disuelta precipitarán del alcohol por enfriamiento y podrán ser identificadas. Corresponde ahora ensayar la separación con éter de los glucósidos y de las resinas. Si ésto no se lograra, se evapora la solución de nuevo y se trata el residuo con éter, metanol, benzol y demás disolventes, para separar esos cuerpos, lo que se consigue en la generalidad de los casos. Si no resultase así, se arrastra con vapor acuoso el aceite etéreo, se separa la resina (tratando con lejía potásica) del glucósido quizá parcialmente desdoblado por el vapor acuoso. Se comprende que la investigación del glucósido es tarea que corresponde al procedimiento de Stas-Otto.

En lugar de esta separación, se puede también ensayar, tratando el residuo con alcohol y precipitar fraccionadamente con agua. En la mayoría de los casos no se hallan muchos cuerpos en la solución de éter de petróleo y no existe la complicación que a propósito hemos supuesto aquí.

2. *Eter sulfúrico anhidro*: suponiendo agotada la substancia con éter de petróleo, el éter sulfúrico extraerá otros glucósidos y alcaloides, otros cuerpos resinosos y materias colorantes, ácidos como el gálico y cuerpos indiferentes.

Se evapora el éter y se prueba el residuo, para determinar presencia de glucósidos y alcaloides. Para ésto se trata con agua, agua acidulada (en caso de alcaloides presentes), alcohol, sulfuro de carbono y otros disolventes; si hubiese cuerpos resinosos, se trata de separarlos con lejía potásica de la solución etérea o de precipitarlos con agua de la solución alcohólica.

3. *Cloroformo*: arrastra substancias semejantes a las extraídas con éter y en caso de cuerpos del grupo del caucho es disolvente de gran valor.

4. *Alcohol absoluto*. Se opera sobre la substancia suspendida en alcohol y a temperatura de ebullición, filtrando en filtro baño maría. Por enfriamiento del alcohol se obtendrá la separación de sales, saponina o glucósidos o azúcares.

El filtrado se libra del exceso del alcohol por destilación, se filtra de nuevo si hubiese precipitación y se precipita con éter. El precipitado contiene además de los cuerpos citados, taninos y alcaloides. Se disuelve en agua y se ensaya respecto de estos cuerpos, examinando lo que no se hubiese disuelto por si hubiese flobafenos, productos de desdoblamiento de taninos, que se disuelven en álcalis y son precipitados por los ácidos.

Los cuerpos encontrados en la solución acuosa se separan por el método del plomo.

La solución etéreo-alcohólica se concentra, se ensaya el residuo respecto de presencia de taninos, alcaloides, glucósidos, etc., y puede también emplearse el método del plomo o la separación por los disolventes; las resinas se precipitarán con agua en todo caso.

5. *Agua fría*. En este disolvente se encontrarán además de los cuerpos antes mencionados, si no se hubiesen empleado los disolventes enumerados, algunas subs-

tancias amargas y glucósidos no solubles antes, así como azúcares insolubles en alcohol, sales, gomas, *pectina* y albúmina.

Para determinar albúmina se emplearán los medios siguientes:

1, por el calor se obtiene un precipitado insoluble en $C_2H_4O_2$ y NO_3H ;

2, con los reactivos de alcaloides puede ocurrir que las albumosas den precipitados solubles en exceso de reactivo;

3, por la reacción del biuret, agregando lejía de potasa y algunas gotas de SO_4Cu obteniéndose color azul o violeta para albúmina y rojo para albumosas;

4, por ebullición con una sal plúmbica y potasa cáustica hay formación de SPb ;

5, con HNO_3 concentrado se tiñen las albúminas en amarillo y con el NH_3 pasan al naranjado;

6, por calentamiento con reactivo de Millon se obtiene un color rojo.

Haya o no albuminoides, se agrega igual volumen de alcohol: así precipitan compuestos pécticos, mucílagos, albúmina y una parte de sales. Se disuelven de nuevo en agua y se separan las sales por diálisis y la albúmina por precipitación con calor y algo de $C_2H_4O_2$ o por adición de sal. En caso de no ser esto posible, utilizase el método del plomo, pues que los albuminoides precipitan con acetato de plomo y los compuestos pécticos con acetato básico. A menudo es imposible separar los compuestos (mucílagos) pécticos de los albuminoides por completo. Del líquido acuoso alcohólico se destila el alcohol y se sigue el método del plomo.

6. *Agua hirviendo*, que transforma en engrudo el almidón y disuelve los mucílagos rebeldes, xylana, inulina, cuerpos pécticos, glicógeno, etc. La inulina puede obtenerse por evaporación cristalizada; los demás cuerpos se obtienen como amorfos con alcohol.

7. *Acido clorhídrico diluido frío*, que se emplea por digestión de varios días, agitando de tiempo en tiempo.

Este líquido disuelve los alcaloides que en parte habían arrastrado los demás disolventes y además sales como el tartrato y oxalato cálcicos y otros albuminoides que el agua no disolvió y cuya presencia se determina como antes, pudiendo precipitarlos con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. El líquido se hierve y se trata con CO_3Na_2 para reprecipitar los ácidos orgánicos, siguiendo luego el procedimiento especial pág. 279. Debe advertirse que si hubiese en la substancia mucho almidón o algún hidrato de carbono poco soluble en agua, se tendría en el líquido concentrado dextrina o azúcar reductor.

8. *Hidrato sódico 5 %*, en caliente extrae albuminoides, hemicelulosas, pentosanas y otros componentes de membranas. Junto con estos cuerpos pueden hallarse flobafenos.

9. *Ácidos diluidos calientes*, atacan oxixelulosas, quedando la celulosa y la lignina. El residuo se ensaya para señalar esta última con:

- | | |
|---|--------------|
| 1. sulfato de anilina + H_2SO_4 | amarillo |
| 2. fenol + HCl | verde o azul |
| 3. timol + HCl | verde o azul |
| 4. floroglucina + HCl | rojo cereza |

10. Separación de lignina y celulosa, que puede obtenerse de varios modos: la lignina se disuelve en una mezcla de clorato potásico y ácido nítrico (!) así como también en una solución de sulfito (obtenida por saturación con SO_2 de una solución de 50 gramos CO_3Ca suspendido en 1500 cm^3 H_2O).

La celulosa se disuelve sola en hidrato de cobre amoniacal, de donde se precipita con HCl , se lava expulsando el Cu y se seca y pesa, incinerando y pesando de nuevo.

ALCALOIDES

Si en las reacciones preliminares se ha comprobado que el alcaloide es volátil, se puede proceder a la destilación de la droga desmenuzada, en presencia de un álcali; o también se puede utilizar para la destilación uno de los extractos (alcalinizado), como se establece más abajo en los métodos generales de preparación, según los cuales también pueden obtenerse los alcaloides volátiles sin destilación, teniendo en cuenta que los más no son volátiles a 100°, sin corriente de vapor.

La obtención de alcaloides comprende tres partes:

1. Extracción.
2. Obtención de alcaloide bruto.
3. Purificación y separación en caso de existir varios simultáneamente. Las operaciones 2 y 3 en realidad no están separadas en mucho.

Para la extracción consideramos tres métodos:

- a) Extracción con líquidos neutros. En algunos casos se dejan extraer los alcaloides o sus sales, simplemente con agua o alcohol.
- b) Extracción con líquidos ácidos. Los ácidos en proporción de 1-2 % se disolverán en agua o en alcohol. Se usan comúnmente ácidos minerales y principalmente clorhídrico y sulfúrico, rara vez ácidos orgánicos que se recomiendan cuando se teme una acción desdoblante en los ácidos minerales.

c) **Extracción con líquidos alcalinos.** Se mezcla previamente la droga pulverizada con álcali, eligiendo, para evitar desdoblamientos, álcalis débiles como hidrato cálcico o bórico. Se humedece la masa, se seca y se extrae con disolventes apropiados, como los carburos de hidrógeno (éter de petróleo, bencina, ligroina, aceite de parafina), (benzol, toluol, xylol) y además alcohol, cloroformo, tetracloruro de carbono, éter, acetona, etc., no debiendo olvidar que muchos alcaloides dan compuestos con el cloroformo.

También se emplean soluciones alcalinas como disolventes. Como álcali sirve en primera línea el amoníaco. Buenos resultados se alcanzan con alcohol y cloroformo amoniacaes, que se obtienen saturando con amoníaco gaseoso seco estos líquidos y utilizando el cloruro amónico comercial para engendrar el gas.

Con ayuda de estos últimos métodos es posible, en casos favorables, únicamente por evaporación de los disolventes, llegar a conseguir un alcaloide bruto no muy impuro. Del mismo modo puede ocurrir, en algunos casos, que por agitación de los líquidos acuosos obtenidos en los métodos a) y b), con un disolvente apropiado capaz de arrastrar el alcaloide disuelto en aquéllos, se llegue a separar éste por simple evaporación de aquél. No conviene evaporar a sequedad, sino abandonar el líquido concentrado en un secador de vacío, para favorecer la formación de cristales.

A menudo, empleando los métodos a) y b) se consigue el alcaloide por precipitación con un álcali, sirviendo a tal fin los carbonatos alcalinos, fuera de los hidratos alcalinos y alcalino-terrosos y el amoníaco. Ya se ha hecho observar (pág. 216), que por el empleo sucesivo de estos precipitantes se puede lograr una separación de varios alcaloides mezclados, así como también que algunos son solubles en los álcalis cáusticos. Los

alcaloides precipitados se recogen en filtros y en la forma ordinaria se libran del agua madre.

A menudo se somete la solución de alcaloides a una purificación previa, antes de precipitarlos.

- a) Se toma de nuevo con agua y alcohol como en el método de Stas-Otto.
- β) Se decolora con carbón y mejor aún si es carbón animal recientemente calcinado. Este procedimiento no es aconsejable por la facilidad con que el negro animal retiene los alcaloides. En este caso se extrae el carbón con agua acidulada y esta solución se trata con los reactivos de alcaloides para comprobar su ausencia o presencia.
- γ) Se trata el líquido acuoso o alcohólico con acetato de plomo y, eliminado el exceso de plomo con hidrógeno sulfurado, se procede como queda dicho en la pág. 221.

Rochleder ha hecho ya notar que por precipitación de soluciones acuosas con el acetato, los alcaloides que son difícilmente solubles en agua pueden pasar al precipitado.

- δ) Por agitación. De los líquidos neutros o ácidos se dejan extraer por agitación muchas impurezas, usando medios apropiados, sin ocasionar una pérdida apreciable de alcaloides. Después de alcalinizar se agita otra vez el líquido, el alcaloide pasa al disolvente 2 y una gran parte de las impurezas quedan en el líquido acuoso. Del disolvente 2 se puede extraer el alcaloide con agua acidulada, la cual, alcalinizada, cederá el alcaloide al disolvente 2, repitiéndose la operación hasta alcanzar una purificación conveniente. Este proceso de purificación, tratándose de alcaloides incoloros, se controla por la decoloración paulatina que los líquidos experimentan. Las agitaciones se harán cada vez hasta que todo el alcaloide pase al líquido de extracción, lo que se comprobará haciendo reacciones con gotas y reactivos apropia-

dos, directamente si el líquido es acuoso, sobre soluciones acuosas aciduladas de residuos si los líquidos fuesen de otra naturaleza.

- e) Se consigue una purificación rápida y completa, si se precipita el alcaloide con un reactivo apropiado y luego se regenera por descomposición del precipitado, extrayéndolo entonces con disolventes bien elegidos, por agitación. Esto tiene la ventaja de no arrastrar cuerpos no alcalóidicos como los albuminoides que podrían haber precipitado junto con los alcaloides. También conviene tomar los residuos con líquidos no acuosos para obviar ese inconveniente.

Entre los precipitantes deben citarse:

- a) Tanino. El precipitado se desmenuza bien en agua o en alcohol y se trata en caliente con hidrato de plomo o carbonato de plomo recientemente precipitado, pudiendo usarse el óxido de magnesio o el óxido de zinc. El alcaloide puesto en libertad, se extrae por agitación actuando sobre el líquido filtrado.
- b) Krauts. (Ioduro de bismuto y potasio). Se precipita en solución acidulada con ácido sulfúrico. El reactivo se prepara ⁽⁵⁾ disolviendo 80 gramos $\text{NO}_3(\text{BiO})$ en 200 $\text{HNO}_3, d = 1,18$ y se agrega a esta solución una solución concentrada de 272g. KI , llevando el volumen a 1 litro cuando el NO_3K haya cristalizado. El precipitado que se obtenga, todavía húmedo, se trata con igual cantidad de carbonato argéntico, mezclando bien, hasta que el color rojo de la mezcla desaparezca y el filtrado no dé reacción de iodo; la poca plata que pase al filtrado se elimina con H_2S . O también se descompone el precipitado obtenido con agua hirviente y carbonato bárico, se precipita en el filtrado el bario con ácido sulfúrico, el ácido iodhídrico con carbonato argéntico y la plata con hidrógeno sulfurado.

- c) Ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico. La descomposición del precipitado se realiza por medio de Ca(OH)_2 o CO_2Ca o $(\text{HO})_2\text{Ba}$ o CO_2Ba .
- d) Ioduro mercurico potásico. Los precipitados se dejan descomponer con hidratos o carbonatos alcalinos a alcalino-terrosos.
- e) Cloruros de platino y de oro. De los precipitados bien divididos en agua pueden eliminarse los metales nobles con H_2S o con carbonatos alcalinos.

En los casos en que con estos medios no se obtenga aún alcaloide suficientemente puro, (por estar algo teñido o mostrarse refractario a la cristalización) debe purificarse más. Con tal fin se tratará de nuevo con carbón o se repetirá alguno de los procedimientos anteriores de agitación o precipitación y descomposición del precipitado. También puede ensayarse la acción de distintos disolventes, así como la precipitación de la solución en alcohol absoluto con éter de petróleo o agua, etc.

Un camino que conduce a menudo a la purificación, consiste en preparar una sal (o una sal doble), que no es raro ver cristalizar mejor que la base libre, y luego descomponer esa sal para obtener el alcaloide.

Para preparar esa sal se neutraliza la base, en presencia de agua o alcohol con ácido y se cristaliza en un disolvente apropiado. De la solución acuosa puede precipitarse la sal con alcohol y de la alcohólica con éter. El doble cambio se puede lograr, transformando una sal en otra; así el cloruro se obtendrá tratando el sulfato de alcaloide con cloruro bórico.

Las sales dobles de oro o de platino cristalizan a menudo bien.

Entre los trabajos más difíciles e interesantes de la química vegetal, debe citarse la constatación de la presencia de más de un alcaloide en los componentes de una planta, que se han caracterizado como *alcaloide*, y la tarea de separarlos. La separación puede conseguirse en el curso de la preparación del alcaloide, por ejem-

plo, cuando en el procedimiento de agitación, debe agitarse un alcaloide en solución neutra o alcalinizada con álcalis fijos, en tanto que quizá el segundo componente se ha ido con el primer líquido de agitación en líquido amoniacal.

También puede contribuir a la separación, la distinta manera de comportarse los alcaloides con los disolventes, cuando se hace en la preparación uso de disolventes sucesivos como éter de petróleo, luego éter y, en fin, cloroformo, o cuando se estudia la acción de los distintos disolventes sobre el alcaloide obtenido.

En la purificación puede hallarse también circunstancias favorables a la separación. Pueden también los componentes de la mezcla alcalóidica distinguirse por precipitación con agentes diferentes físicos y químicos. Posiblemente se hallará un componente que, al precipitar su solución alcohólica con éter, sea soluble en la mezcla alcohol-éter o se separa por precipitación con cloruro platínico ya en solución acuosa, mientras que su acompañante haya precipitado por simple adición de alcohol.

Para establecer si un residuo está formado por un solo alcaloide, el examen con la lente o el microscopio es útil: quizá se encuentren diferentes formas cristalinas o una masa amorfa y otra cristalina. Si los cristales fuesen de cierto tamaño, su separación sería posible con una pinza y una lente. Si el tamaño de los cristales no lo permitiese se buscará el fraccionamiento por disolución o precipitación (pág. 208). Para esta última operación es muy eficaz la preparación de sales de oro y de platino.

La diferente basicidad del alcaloide por saturación fraccionada con ácidos, proporciona un medio de separación muy apropiado. Se establece por una experiencia cuanto ácido necesita la masa alcalóidica para ser neutralizada, disuélvese entonces con un líquido no miscible con el agua y se agita diez veces con la décima parte de la cantidad del ácido necesario para la neutra-

lización: en cada fracción se pondrá en libertad el alcaloide y se determinarán sus caracteres.

La valorización del alcaloide se hace por gravimetría o por volumetría. El método que se adopte en el primer caso dependerá de los caracteres y del método de preparación empleado.

Para la evaluación volumétrica, como se establece en la farmacopea alemana, debe conocerse el peso molecular del alcaloide. Se disuelve el alcaloide que se habrá puesto en libertad con un álcali apropiado, en un disolvente no miscible con agua y se agita con un exceso de $\text{HCl } \frac{N}{10}$ o $\frac{N}{100}$ empleando la eosina como indicador y titulando en retorno con $\text{K(OH) } \frac{N}{10}$ o $\frac{N}{100}$. La iodoeosina se disolverá en éter, agitando durante la operación en un vaso bien cerrado y agregando álcali hasta que el líquido acuoso sea rosa-rojo.

Para otros métodos de evaluación debe consultarse *Ber. d. D. chem. Ges.* XXXII, 2871 (1899).

GLUCÓSIDOS

No poseemos métodos generales de obtención de glucósidos, excepto para los del grupo de las saponinas. No hay más remedio que determinar exactamente el modo de comportarse de los cuerpos glucosídicos, obtenidos con el método del plomo o con el de Stas-Otto, con los disolventes y según las propiedades de los demás componentes de la droga, elaborar un método particular:

Deben tenerse en cuenta las observaciones siguientes.

Las enzimas desdoblantes de glucósidos que frecuentemente se hallan junto a éstos en los vegetales, pueden inutilizarse o destruirse, extrayendo con alcohol o cuando esto no es posible, aplicando el procedimiento (*) siguiente: Se calienta el vegetal pulverizado en baño de vapor hasta que la masa entera alcance la temperatura de 70-80°, se agrega agua a 80-90° y se mantiene todo algún tiempo entre 70 y 80°.

La preparación de glucósidos se hace casi siempre partiendo de extractos acuosos o alcohólicos de los vegetales; en el primer caso, el método del plomo es el más indicado para su purificación; también con CO_3Cu e $(\text{HO})_2\text{Cu}$ se pueden eliminar los taninos y otras impurezas. Que el método por agitación se aplica a esta obtención se deduce de lo expuesto en el método de Stas-Otto. Si se hubiese extraído con alcohol se probará de precipitar con agua o con éter.

Tratándose de algunos glucósidos que precipitan con reactivos de alcaloides, corresponde aplicar los métodos empleados para preparar alcaloides (pág. 234), no debiendo olvidarse que un exceso de reactivo precipitante podrá actuar disolviendo el precipitado o atacándolo.

Los glucósidos con propiedades de taninos se tratarán por los métodos indicados para estas sustancias (pág. 231).

Si el glucósido hallado fuese cristalino se utilizará esta propiedad para purificarlo.

Frecuentemente, contienen las plantas varios glucósidos cuya separación representa dificultades extremas, como lo demuestra la historia del glucósido del digital. Como ejemplo de separación de varios glucósidos, merece citarse el método que Tschirch y Henberger emplearon para estudiar la raíz del ruibarbo (?). La droga fué extraída primero con alcohol a 70 % y luego a 95 % en un percolador; el líquido fué evaporado en el vacío y luego en un desecador calentado por vapor sobre cal cáustica hasta sequedad. Este extracto seco se sometió en un Soxhlet a la acción sucesiva del éter, acetona anhidra y una mezcla de benzol con alcohol a 96 %; el residuo se tomó con agua y la parte insoluble con alcohol diluído.

El o los glucósidos disueltos en acetona se separaron de acuerdo con su comportamiento respecto del agua, aislando de la parte soluble de glucósidos el ácido glucosídico por medio del alcohol.

En el grupo de los glucósidos, las saponinas ocupan un lugar importante y por las propiedades que les son comunes permiten establecer un método general para su extracción. Si se ha constatado por la reacción preliminar (*) la formación de la espuma característica de las saponinas, se trata una cantidad (20-25 gramos) de sustancia por alcohol hirviente, se filtra en caliente y el líquido enfriado se adiciona con éter, sin filtrar el precipitado coposo que, quizá al enfriarse, el líquido ha producido. El precipitado que podrá tener como impu-

rezas taninos, sales y azúcares, se adherirá fuertemente a las paredes del vaso sino se ha empleado alcohol y éter absolutos. En tal caso, basta decantar el líquido etéreo y lavar el vaso con algo de éter. Si el precipitado fuese coposo se llevará a un filtro y se lavará allí con éter; se disuelve luego en agua caliente y si existe saponina, el líquido poseerá las propiedades siguientes: por agitación produce la espuma característica (pág. 212), emulsiona la esencia de trementina, mata el mercurio y disuelve los glóbulos rojos. Por ebullición con ácido clorhídrico se forma un cuerpo insoluble (sapogenina) y un azúcar reductor, no produciéndose la espuma después del desdoblamiento.

Por evaporación del líquido queda un residuo que posee un sabor picante y que, pulverizado, provoca el estornudo, produciendo con ácido sulfúrico una coloración rojo-violeta. Después se prueba la acción del agua de barita sobre soluciones concentradas y también los acetatos de plomo, utilizando alguno de estos precipitados para practicar los métodos de separación y purificación que vamos a exponer.

Para la extracción de saponinas, empléase el agua o el alcohol de 80-90 %, donde esos cuerpos se disuelven en caliente y pueden precipitar en frío, como generalmente ocurre. Se facilita la obtención de saponinas puras, si extrayendo con alcohol y precipitando con éter se produce primero una saponina bruta, la cual se purifica luego. Y si la droga cediese algo al éter, como grasas, etc., agótase primero con éste y luego con el alcohol.

PROCEDIMIENTOS DE PURIFICACIÓN

1. *Método del plomo.* Se procede como está indicado en la página 221. Con acetato de plomo precipitan las saponinas ácidas y con subacetato las «neutras», ha-

4

biendo algunas de éstas como las del *Verbascum* que no precipitan con subacetato. Como las saponinas se unen especialmente al sulfuro de plomo, conviene decomponer en gran parte el precipitado con ácido sulfúrico y el resto de plomo se precipita en el filtrado con H_2S ; puede también lavarse con agua o con alcohol el precipitado de plomo para eliminar la saponina adherida o adsorbida. El líquido libre de plomo se evapora a consistencia de extracto consistente y se trata con alcohol, y si estuviese muy teñido, con una mezcla de 1 parte de alcohol absoluto y 4 partes de cloroformo a la ebullición; de esta solución se precipita la saponina con éter y se secará sobre ácido sulfúrico.

2. El *método de la magnesia* se empleará, si el ensayo preliminar con las sales de plomo indicase la presencia de una sola saponina y también para purificar una saponina obtenida por cualquier otro método. Este procedimiento consiste en formar compuestos magnésicos de la saponina y de los cuerpos que la acompañan como taninos, colorantes, etc., y aprovechar la propiedad que posee el compuesto de magnesia y saponina de decomponerse por el alcohol hirviendo, quedando en solución de la cual se extrae después. Se hierve la droga con agua (o se utiliza la solución acuosa de la saponina bruta), se concentra y se filtra el extracto, llevándolo en baño maría a sequedad, después de haberle agregado magnesia calcinada. La masa se pulveriza lo más que sea posible y en suspensión en alcohol, se hierve con refrigerante de reflujo. Del líquido alcohólico se extraerá por precipitación fraccionada con éter la parte de saponina que haya quedado en solución, aún después de haber enfriado; se procede por precipitación fraccionada para conseguir un preparado privado de cenizas, debiendo hacer notar que el primer precipitado es mucho más rico en sustancias minerales que los siguientes.

Para eliminar por completo esos compuestos minerales que no están unidos químicamente a la saponina,

se puede dializar la solución acidulada previamente con ácido clorhídrico, hasta que el líquido exterior no reaccione con nitrato argéntico. En este procedimiento se pierde algo de saponina que se dializa también.

3. El *método de la barita* proporciona un medio de separar dos saponinas en un vegetal, cuando una de ellas es precipitable por Ba(OH)_2 . La solución acuosa concentrada obtenida por ebullición de la droga con alcohol y precipitación ulterior con éter, se precipita con $(\text{HO})_2\text{Ba}$ en solución saturada. La saponina precipitada en combinación básica se lavará con agua de barita, se suspenderá en agua y se descompondrá con una corriente de CO_2 en CO_3Ba y saponina. La solución acuosa de saponina se evapora, se toma ésta con alcohol y se extrae de éste por evaporación o por precipitación fraccionada con éter.

4. *Método del hidróxido de plomo*. La saponina arrastrada en solución alcohólica se hierve con hidróxido de plomo, varias horas, con refrigerante de reflujo; se filtra, se elimina en el filtrado el plomo residual con CO_2 y el último resto con H_2S , tratando el líquido con éter como en el método anterior.

5. El *método del sulfuro de plomo* se puede practicar hasta con las saponinas que forman una combinación con el plomo, de la cual no puede extraerse la saponina por ebullición con agua o con alcohol. Se trata el extracto acuoso de la droga primero como en el método del plomo; el precipitado conteniendo la saponina y el filtrado, se tratan por H_2S para eliminar el plomo; si en el filtrado no hubiese suficiente plomo para arrastrar toda la saponina con el sulfuro de plomo, se agregará acetato hasta que esto se consiga. Se lava cuidadosamente el sulfuro de plomo, al fin con agua hirviente, se filtra, se exprime hasta sequedad casi y se hierve con alcohol hasta que éste no se coloree más; entonces se divide bien el precipitado en agua y se agrega tanta H_2O_2 cuanta se necesite para blanquear por completo el SPb por transformación en SO_4Pb . Por adición

de alcohol y filtrando, (con el procedimiento de Pukall si necesario fuese) se obtiene una solución clara de saponina que se trata después por el procedimiento ordinario.

6. El *método del cobre* se practica tratando la solución acuosa con CO_3Cu que precipita el tanino y otras impurezas (pág. 275) y se hierve ya sea con $\text{Na}(\text{OH})$ el filtrado alcalinizado con $(\text{OH})_2\text{Cu}$ o se echa sobre el líquido caliente, conservando su alcalinidad, una solución de SO_4Cu . La saponina, por este método, precipita completamente; se descompone el compuesto de cobre obtenido, después de lavar, sea con H_2S o por adición de HCl o H_2SO_4 en cantidad insuficiente para destruir todo el compuesto de saponina y dializando después.

7. Por el *sulfato amónico* se puede, según Kobert (*Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen*, 1904) precipitar todas las saponinas de una solución, ácidas o neutras, saturándola con dicha sal e hirviendo luego algunos minutos. Sin embargo, algunas saponinas consideradas como neutras precipitan así, por ejemplo, la ciclamina y la chamalirina.

8. Una saponina preparada con estos métodos puede sufrir una purificación ulterior, si se la lleva a una combinación acetilada y de ella luego se extrae (*). Para formar la combinación acetilada, se calienta una parte de la saponina desecada con cuatro partes de anhídrido acético (mejor agregando una parte de acetato sódico anhidro) unas 3-4 horas con refrigerante de reflujo en baño de glicerina entre 110° y 120° c.

Después de enfriar se toma con agua y el compuesto acetílico queda insoluble: se extrae con éter, se agita la solución etérea para eliminar el $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ con CO_3Na_2 en solución al 1 %, en una ampolla de llave, se lava con agua después de eliminar CO_3Na_2 hasta reacción alcalina y se evapora el éter. El residuo se baña con alcohol, se decolora con negro animal y se evapora tal como está o mezclado con agua, que descompondrá el compuesto acetilado. Stütz deja que el compuesto acetilado

se desdoble en presencia de Ba(OH)_2 a temperatura de ebullición y la barita en exceso la precipita con CO_2 . Más pronto se realiza el desdoblamiento en solución alcohólica de K(OH) a temperatura de ebullición. Si la saponina, como casi siempre ocurre, no es sino difícilmente soluble en alcohol, precipita de este disolvente. Haciendo pasar una corriente de CO_2 en el líquido filtrado de la saponina, se consigue precipitar el K(OH) como CO_3K_2 insoluble en alcohol y así se puede conseguir la parte de saponina que no precipitó por evaporación o por precipitación con éter. Llevándola entonces a solución acuosa y dializando se logra obtener la saponina pura. Según Kobert, la saponina que se prepara por regeneración de la combinación acetilada según Stütz, como por el método de la barita, carece de acción fisiológica.

La evaluación de la saponina en un compuesto bárico ⁽¹⁰⁾ es problema sencillo. La droga se hierve tres veces con agua, los extractos se concentran a pequeño volumen, se tratan con alcohol y se filtran. El precipitado se hierve con alcohol, se filtra en caliente y se une al primer filtrado; se destila el alcohol, se toma el residuo con agua, se evapora a un pequeño volumen, se agrega Ba(OH)_2 saturado y se lleva el precipitado bárico a un filtro tarado seco, donde se lava con agua de barita hasta que pase incoloro el líquido, se seca en estufa y después en baño de aire a 110° hasta constancia de peso: el peso total, descontando el filtro, nos da la combinación saponina-bario y si ésta la calcinamos, llevando la barita a la forma de carbonato, tendremos por el cálculo el BaO que estaba unido a la saponina y por diferencia ésta.

También el método de la magnesia ⁽¹¹⁾ se presta a una determinación cuantitativa. Se procede como queda expuesto (pág. 242), la masa de magnesia extraída con alcohol, se hierve con agua y se repite el procedimiento de la magnesia; se reúnen los extractos alcohólicos así obtenidos con los otros, se evapora en cápsula tarada

a sequedad y se pesa el residuo desecado a 110° hasta constancia de peso; si se incinera y se restan las cenizas se tiene un dato más preciso. Ambos procedimientos no pueden considerarse como rigurosos.

Un tercer método se funda en el peso de la sapogenina producida por desdoblamiento de la saponina, purificándola y aprovechando su insolubilidad. Sólo proporciona resultados exactos, cuando el desdoblamiento es cuantitativo y podrá emplearse con otros glucósidos cuyos productos de descomposición sean insolubles. La evaluación de glucósidos con ayuda de los productos de su desdoblamiento puede emplearse, cuando no es posible por otros caminos y cuando se conoce exactamente el proceso de su descomposición. Los glucósidos cianogénéticos pueden valorarse por el (CN)H engendrado por su descomposición, como los que contienen radicales rodánicos por la liberación del sulfocianógeno; también se utilizaría en estos casos los azúcares engendrados por su hidrólisis.

En general, se tratará de evaluar los glucósidos que formen compuestos insolubles, con el auxilio de éstos y para aquellos glucósidos que no permitan aplicar los métodos indicados, se ensayará de perfeccionar su método de preparación, de modo que se preste a dicho fin.

La descomposición de los glucósidos se hace por medio del agua, de ácidos, de álcalis y de enzimas. Si se desea hacer el desdoblamiento con agua solamente, casi siempre es necesaria una temperatura superior a 100°; se procede entonces con frascos de presión o tubos sellados. Para los difíciles de desdoblar se agrega HCl o H₂SO₄. Muchos glucósidos se desdoblan por ebullición y hasta en baño de vapor en presencia de ácidos al 1-10 %, dando mejores resultados el HCl que el SO₄H₂. Algunas veces se logran hermosos productos de desdoblamiento, haciendo llegar una corriente de HCl gaseoso y seco a la solución alcohólica caliente del glucósido; pero en este caso debe temerse que los productos buscados fijen grupos etilos.

Para conseguir los productos de desdoblamiento formados en solución acuosa, se agita ésta con éter primero; si fuesen insolubles en agua y en éter, se filtra para obtenerlos; la formación de productos volátiles se constatará por el olor y se obtendrán por destilación. Para aislar los que en esta forma aparecen como no aislables, en particular los azúcares, se eliminan los ácidos, el H_2SO_4 por BaCO_3 y el HCl por $\text{Ag}(\text{OH})$. Para el reconocimiento y aislamiento de azúcares véase pag. 301; pero debe aquí notarse que de estos azúcares de desdoblamiento, cantidades apreciables de azúcares como glucosa y galactosa o glucosa y ramnosa, se forman en unos casos y en otros faltan las glucosas y aparecen otras especies, como ramnosa y chinovosa y aún cuerpos diferentes como la floroglucina.

Si existe en el vegetal con el glucósido una enzima capaz de provocar el desdoblamiento, se tratará de realizarlo por este medio, como ocurre con la myrosina en la mostaza negra. Útiles, aunque no de aplicación general, son la levadura y la emulsina: ambas no se comportan siempre del mismo modo; es sabido que la amigdalina con la emulsina, da azúcar, benzaldehído y ácido cianhídrico, mientras que el extracto de levadura produce el desdoblamiento en un glucósido nitrilmandélico y glucosa. Por las investigaciones ulteriores de E. Fischer, se sabe que la emulsina desdobla el metilglucósido β , dejando intacto el compuesto α , mientras que la invertina se comporta de manera inversa.

Para la preparación de las sustancias amargas, grupo no bien definido de cuerpos con el carácter organoléptico citado, que no son ni alcaloides ni glucósidos, sirve también todo lo expuesto.

GRASAS Y ACEITES GRASOS

La preparación de las grasas y de los aceites grasos se hace, sea por extracción con éter de petróleo o éter o también por expresión del material en frío. Si se comprueba en la grasa obtenida fósforo, indicaría que contiene lecitina. En la expresión puede calentarse la prensa, con lo cual se obtiene gran rendimiento.

Para el estudio de las grasas recomendamos la obra de Benedikt-Ulzer titulada *Analyse der Fette und Wacharten* (4ª edición Berlín, 1903), donde el analizador hallará todos los métodos con sus detalles y podrá determinar todas las propiedades físicas de este grupo de sustancias.

Las propiedades físicas principales son los puntos de fusión y solidificación, la densidad, solubilidad, consistencia y viscosidad.

Se hacen también algunas reacciones preliminares:

1. Reacción de la grasa fundida en baño-maría.
2. Reacción de los vapores desprendidos (ácidos libres volátiles).
3. Presencia de oleína (y glicéridos de ácidos homólogos) que, en ausencia de gran cantidad de glicéridos del ácido linoléico, se demostrará por la reacción de la elaidina. Esta se practica comúnmente, colocando aceite en un tubo de ensayo, con igual volumen de ácido nítrico y algunos fragmentos de cobre en alam-

bres; en caso positivo el aceite se solidifica en masa compacta, pues los glicéridos líquidos del ácido oléico pasan a glicéridos del ácido elaídico.

También la determinación de las constantes químicas, que de ordinario se realiza en análisis de materias grasas, permitirá deducir valiosos datos sobre la composición cualitativa de las grasas extraídas. El índice de ácido muestra la presencia de ácidos grasos libres; el índice de iodo da los ácidos no saturados y sus éteres; y el índice de acetilo determinado sobre los ácidos libres permite conocer la existencia de ácidos alcoholes (si la presencia de alcoholes se excluyese).

Las grasas consisten principalmente en glicéridos de los ácidos grasos, cuyos radicales pueden ser simples (glicéridos simples) o llegar hasta tres (glicéridos mixtos). La preparación y separación de los glicéridos constitutivos de una grasa se funda en la cristalización fraccionada por enfriamiento, lo que se hace comúnmente, operando con una solución de grasa o de aceite. Así consiguen D. Holde y M. Stange ⁽¹²⁾ una separación de los glicéridos mezclados, por enfriamiento fuerte de solución etérea a -40° y hasta -45° en un baño de alcohol y CO_2 sólido. La ulterior purificación y la separación de los glicéridos líquidos, se hace por redisolución y precipitación a -40° , así como por precipitación en pequeñas cantidades de éter a -20° y luego por varias recrystalizaciones en alcohol-éter a la temperatura ambiente.

Para una completa separación de los glicéridos líquidos, Kreis y Hafner ⁽¹³⁾ proceden, tratando los glicéridos con la solución de Hübl como para determinar índice de iodo y el producto cloroiodado se cristaliza en benzol y alcohol y entonces se eliminan con éter.

La composición de los glicéridos se determina con el análisis elemental y por su separación y evaluación de los ácidos grasos que producen: este estudio se hace con los métodos propios al análisis de las sustancias grasas, que uno se propone determinar:

1. Los ácidos libres o combinados;
2. Los alcoholes de las grasas;
3. Los cuerpos no comprendidos en estos grupos.

Las grasas se saponifican por calentamiento con un exceso de Na(OH) alcohólica, con refrigerante de reflujo, considerando completa la operación si el producto se disuelve perfectamente en agua, excepción hecha del caso en que la grasa contenga cuerpos insaponificables del tipo de la fitosterina y alcoholes grasos superiores insolubles en agua.

Por dilución con agua precipitan estas sustancias insaponificables y pueden ser extraídas por agitación con éter. Otro método de extracción de la fitosterina reposa en la extracción con éter de petróleo de la materia saponificada y seca en presencia de CO_3HNa (Allen Thomson). ⁽¹³⁾

La ulterior investigación de los compuestos insaponificables ⁽¹⁴⁾ se realiza calentándolos con igual cantidad de anhídrido acético, 1-2 horas con refrigerante de reflujo: en ausencia de hidrocarburos la esterificación y la disolución son completas; por enfriamiento se separarán los ésteres; esta separación es completa si se tratan con agua. Los ésteres de los alcoholes grasos superiores y de la fitosterina se separan por su comportamiento con el alcohol: los ésteres de alcoholes grasos que se hallan como componentes insaponificables de algunas ceras, se disuelven fácilmente en alcohol hirviendo y quedan disueltos por enfriamiento, mientras que el acetato de fitosterina es difícilmente soluble en alcohol y de las soluciones calientes que se obtienen precipita por enfriamiento; los ésteres de los alcoholes grasos se pueden precipitar de las soluciones alcohólicas por adición de agua o saponificando por ebullición con álcalis cáusticos; por dilución de la solución saponificada con agua precipitan de nuevo los alcoholes grasos.

Otras diferencias muestran los alcoholes alifáticos respecto de la fitosterina por calentamiento con cal so-

dada: ésta queda sin variación, en tanto que los alcoholes grasos producen ácidos con el mismo contenido en carbono.

Las fitosterinas se caracterizan por su punto de fusión y su éster acetilado o benzoilado. Además producen reacciones coloreadas que tienen su parecido con las colesterinas de las grasas animales.

Entre las reacciones cromáticas pueden citarse las siguientes, pero observando que las coloraciones pueden variar con el origen de la fitosterina:

1. Si se disuelve en cloroformo y se agrega H_2SO_4 , éste y el CCl_3H presentan tintes característicos, el último generalmente rojo sangre (Reacción de Hesse).

2. Si se trata con una mezcla de 5 partes de H_2SO_4 y 1 parte de agua (reacción de Moleschott), se obtendrán coloraciones rojas hasta violetas y si se añade entonces algo de solución de iodo, se producen otras coloraciones.

3. Si se disuelve en anhídrido acético caliente y se agregan unas gotas de H_2SO_4 al líquido frío, se produce una coloración azul (reacción de Liebermann).

4. Si se agrega una mezcla de 9 partes de ácido tricloracético y 1 parte de agua o si se calienta hasta ebullición con ácido tricloracético líquido, se obtiene una coloración roja hasta violeta (reacción de Hirschsohn).

5. Si se evapora en presencia de ácido clorhídrico y cloruro férrico, el residuo muestra color rojo o azúl después de lavar con agua (reacción de Machs).

Después de eliminar los cuerpos insaponificables, se expulsa el éter y el alcohol por evaporación y se agrega cloruro sódico: el ppdo. consiste en jabón, es decir, en sales sódicas de los ácidos grasos; el líquido contiene glicerina y eventualmente sales sódicas de ácidos grasos inferiores.

Para determinar si hay ácidos grasos del líquido, se acidula con H_2SO_4 y se emprende con el líquido una destilación fraccionada: los ácidos grasos de peso mole-

cular superior pasan después de los inferiores (¹⁶). Para identificarlos se saturan las fracciones con CO_2Ag_2 y se prueba la sal argéntica del punto de vista de su composición elemental y su riqueza en plata

El líquido residual de la destilación se neutraliza (o se usa una parte de líquido que no se haya empleado para destilar) y se evapora a consistencia siruposa, pudiendo tomar el residuo con una mezcla de 3 partes de alcohol a 95 % y 1 parte de éter para extraer la glicerina que se obtendrá por evaporación de su solución alcohol-etérea, con precaución, identificándola por sus propiedades físicas y químicas. Es fácilmente soluble en agua y en alcohol y posee un sabor dulce ardiente; por calentamiento con bisulfato potásico desprende acroleína; calentada con fenol y ácido sulfúrico concentrado sobre 120° , se obtiene una masa rojo parda que tratada por amoníaco en frío produce una coloración rojo violada.

El jabón se disuelve en agua y se descompone con ácido sulfúrico: los ácidos superiores a partir del caprílico, son insolubles en agua y precipitan, en tanto que los inferiores hasta el caprónico quedan disueltos por dilución conveniente y pueden separarse unos de otros por destilación fraccionada; de la masa de los ácidos precipitados, el caprónico y el caprílico se dejan destilar sin alteración a la presión ordinaria. La separación de los demás ácidos grasos, se funda en parte en el modo de comportarse de sus sales con los disolventes y en parte, en el principio de la precipitación fraccionada, cristalización y destilación en vacío, teniendo en cuenta lo siguiente: que las sales plúmbicas de los ácidos grasos líquidos insolubles son solubles en éter y las de los sólidos no. Se precipita la solución alcohólica de los ácidos grasos sólidos (que se obtienen por descomposición con HCl o H_2SO_4 de las sales plúmbicas), por precipitación fraccionada, con acetato de bario o magnesio (¹⁷) o siguiendo la modificación de este método que figura en *Ber. d. d. chem. Ges.* 36 (1903),

y así se obtienen los de mayor contenido en carbono al principio. Este procedimiento se debe a Heintz: se precipita cada vez con $\frac{1}{30}$ o $\frac{1}{40}$ de la cantidad total necesaria de precipitante (acetato de magnesio) en solución alcohólica; el $C_2H_4O_2$ libertado en la precipitación se neutraliza con NH_3 ; la sal magnésica precipitada se descompone con HCl diluido y los ácidos libertados se cristalizan o se someten a una nueva precipitación fraccionada; continuando así el proceso hasta obtener ácidos de diferente punto de fusión.

Los ácidos no saturados que dan ácidos de la elaidina pueden parcialmente, reduciendo con cobre el HNO_3 , transformarse en ácidos eláidicos, cuyas sales plúmbicas son insolubles en éter, lo que permite separarlos de otros ácidos no saturados. (¹⁸).

La separación del ácido oléico de los ácidos de la serie linoléica se realiza con las sales báricas, como veremos más abajo.

Para la determinación del ácido linoléico, se emplea (¹⁹) la propiedad de su tetra bromuro (funde a 113-114°) de cristalizar por enfriamiento de su solución en éter de petróleo.

Otro camino para determinar la mayor parte de los ácidos no saturados, unos en presencia de otros, se funda en su oxidación con $KMnO_4$ en solución alcalina (²⁰) y su separación de los oxácidos, aprovechando su diferente comportamiento con los disolventes.

Una marcha de separación aplicable a los más comunes ácidos grasos es la de Ferié (²¹): 1 gramo de grasa se saponifica con $KOH \frac{n}{2}$ en solución alcohólica; el jabón se disuelve en 100 cm^3 de alcohol a 50 %, se neutraliza con $C_2H_4O_2$ y se trata con una solución de acetato de litio al 10 %; el ppdo. obtenido se lava con 50 cm^3 de alcohol a 50 % y puede decirse que está formado por estearato y palmitato de litio y la mayor parte del miristato de litio; las sales se secan y se disuelven en 100 cm^3 de alcohol caliente absoluto: los

ácidos palmítico y esteárico precipitan totalmente por enfriamiento como sales de litio y el miristato lítico queda en solución; las primeras se separan por filtración, se secan a 100° y se pesan, tratando del mismo modo el miristato después de obtenerlo por evaporación de la solución alcohólica. De los dos residuos se libertan los ácidos por HCl diluido y se identifica el ácido mirístico por su punto de fusión y su peso molecular. Del peso molecular de la mezcla de los otros dos se calculan las proporciones de ambos.

La solución filtrada del primer precipitado contiene todavía pequeñas cantidades de miristato de litio y las sales del ácido láurico y de los ácidos no saturados. Se llevan a sales plúmbicas, según Farnsteiner, con acetato plúmbico y se separan con benzol, en el cual, las sales de ácidos líquidos se disuelven y las de los sólidos no. Las sales que quedan insolubles de los ácidos sólidos se secan y se pesan, descomponiéndolas luego con HCl y de su peso molecular se deduce la proporción de ácido láurico y mirístico que contienen. La solución benzólica de los ácidos no saturados se evapora en corriente de hidrógeno y las sales de plomo se destruyen con HCl; se disuelven los ácidos en alcohol, se neutralizan con HOK y se combinan con solución alcohólica de acetato bárico al 10 %; de esta mezcla el éter acuoso extrae los ácidos de la serie linoléica, cuyo peso así como el del oleato de bario insoluble en éter, se determinarán para deducir su contenido en ácidos.

La identificación de los ácidos no saturados liberados de las sales báricas por HCl, se hace por el índice de iodo.

La marcha de Ferié ha sido muy criticada.

La determinación del contenido en grasa de una sustancia (²³) se hace por extracción de la misma con un disolvente apropiado como éter o éter de petróleo, que arrastrarán algo de lecitina. La práctica de la operación es sencilla, utilizando aparatos como el de Soxhlet más o menos modificado.

Para establecer cuantitativamente los componentes de una grasa, sirven las reacciones cuantitativas y las operaciones cualitativas ya explicadas, aunque conviene advertir que su exactitud no es aún completa.

Del índice de ácido (²³) y del de saponificación (²⁴) se puede deducir el peso molecular medio de los ácidos grasos, así como el contenido en ácidos libres y combinados (²⁵). Si se ha determinado por el índice de Hehner (²⁶) el porcentaje de ácidos insolubles de la grasa, del dato de los ácidos totales y de éste tendremos los ácidos grasos solubles. Si los insolubles corresponden a los tipos palmítico y esteárico, siempre se puede por el peso molecular medio, calcular (²⁷) las proporciones de ambos. En igual caso sirve el índice de iodo (²⁸) para los ácidos no saturados y combinando este dato y el peso molecular medio se resuelve el caso de mezclas de ácidos saturados y no saturados (²⁹).

La separación de los ácidos no saturados de los saturados se realiza como en análisis cualitativo por las sales de plomo (pág. 253). Sirve aquí el método de Rose (³⁰) que consiste en dejar digerir los ácidos con plomo pulido y éter, con lo cual se consiguen sales normales, de cuyo contenido en plomo se deduce el peso molecular medio de los ácidos líquidos. Si todavía se conoce el índice de iodo de los ácidos reunidos, es posible, en presencia de tres diferentes ácidos no saturados, establecer el porcentaje de cada uno.

La riqueza en glicerilo de una grasa o el equivalente en glicerina se calcula aproximadamente con el dato del índice de éter (³¹). La determinación directa de la glicerina se consigue por métodos de oxidación o por el procedimiento del acetilo (³²): en los primeros se usa el bicromato potásico (³³) o se valoran los productos de la oxidación como CO_2 (³⁴) o $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$ (³⁵).

La determinación de los insaponificables se liga a su obtención (aconsejándose el método de Allen Thomson).

CERAS

Las investigaciones que sobre una cera se realizan, utilizan los métodos indicados para las grasas. Si se hallase algo de fitosterinas se procedería como queda explicado en el capítulo anterior.

Los componentes particulares de las ceras son solubles en el alcohol hirviendo y cristalizan por enfriamiento.

Los alcoholes que se aislen podrán ser separados por cristalización fraccionada. A veces la separación se hace utilizando los éteres acetilados o benzoilados de estos alcoholes.

La identificación de los mismos se hace por el análisis elemental, por el punto de fusión del alcohol y de su éter, por el índice de aceto y por su reacción con la cal sodada (pág. 251). Como una molécula de alcohol graso por calentamiento con cal sodada, sin ácidos grasos, produce dos moléculas de hidrógeno, la medida de este gas proporciona un medio de determinar cuantitativamente los alcoholes grasos (⁵⁶).

LECITINAS

Corresponde considerar las lecitinas a continuación de las grasas y las ceras, porque en las plantas y más comúnmente en las semillas se encuentran diseminadas.

En el agua sola se hinchan, obteniéndose en los extractos del éter de petróleo, éter y alcohol, en este último aún después de haber agotado el material con uno de los otros, por hallarse en los vegetales cuerpos que contienen lecitina y que por ebullición con alcohol la abandonan libre al desdoblarse.

Para la preparación de la lecitina ⁽³⁷⁾ se extrae primero con éter, después con alcohol a 60° de temperatura, se evapora entre 40-50° y se trata el residuo de este extracto alcohólico con éter frío. La solución etérea se agita con agua, destruyendo la emulsión que pudiese formarse con un poco de ClNa ; se evapora el éter, se toma el residuo con alcohol absoluto y se deja enfriar para separar la lecitina que se seca sobre SO_4H_2 .

La solución etéreo-alcohólica de lecitina da con Cl_4Pt alcohólico un precipitado blanco amarillento que es soluble en éter.

Por saponificación con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ se desdobra en colina, ácido glicero-fosfórico y ácidos grasos.

La evaluación de la lecitina se hace ⁽³⁸⁾ por el cálculo sobre el dato de P_2O_5 formado por oxidación.

ACEITES ESENCIALES

La obtención de los aceites etéreos se logra casi siempre, por destilación de la substancia desmenuzada con agua o vapor de agua.

El aceite se separa del agua destilada por medio de los vasos florentinos. Una parte de la esencia disuelta en el agua se separará, agregando sal común en el mismo vaso florentino o por agitación con éter.

A menudo esta operación no se hace en el laboratorio sino que se pide a una fábrica su realización, pues por los elementos de que disponen los establecimientos industriales, es más seguro un producto mejor y un mayor rendimiento.

Se determina primero las principales propiedades físicas del aceite bruto: densidad, propiedades ópticas y solubilidad. Del primer dato ya se pueden hacer algunas hipótesis sobre la composición del aceite (³⁹): una densidad inferior a 0,9 indica presencia dominante de terpenos o compuestos alifáticos y una superior a 0,9 hablaría de existencia de compuestos de oxígeno, nitrógeno o azufre, así como de derivados del benzol. Por la presencia de grandes cantidades de cuerpos como los citados y en especial de nitrilos, sulfuros y rodanatos puede llegar la densidad a más de 1,0.

Como investigación preliminar conviene tomar los datos siguientes:

1. Reacción: si fuese ácida indicaría ácidos libres o compuestos fenólicos.

2. Azoe: la presencia se determina por el método clásico en tubo largo.

3. Azufre : se determina por HNO_3 en tubo sellado.

4. Aldehidos: su presencia se revela con nitrato argéntico amoniacal.

5. Aldehidos y ketonas: se reconocen además por los compuestos cristalinos que producen con fenilhidrazina, semicarbazida e hidroxilamina.

6. Enfriamiento: por enfriamiento con mezclas refrigerantes, muchos aceites dan productos cristalinos.

7. Análisis elemental: por él se sabrá si hay o no compuestos oxidados.

8. Como para las grasas, hay varias determinaciones cuantitativas que ilustran sobre la composición cualitativa del producto.

a) Índice de éter. Se calienta el aceite con KOH alcohólica $\frac{n}{2}$, durante 1 hora en baño de vapor y se titula por retorno con H_2SO_4 $\frac{n}{5}$, dando el álcali necesario para éteres, no existiendo lactonas, ácidos libres o aldehidos o habiendo sido eliminados.

b) Índice de ácido. Si hubiese ácidos libres se titularían con KOH alcohólica fría.

Índice de saponificación. Como para el índice de éter, teniendo además que la diferencia entre el índice de saponificación y el de ácido nos da el de éter.

c) La constatación de un metoxilo por el procedimiento de Zeisel indica la presencia de compuestos etéreos. Se calienta el aceite con HI y se lleva el yoduro alcohólico que se forme, tras alguna purificación a una solución alcohólica de NO_3Ag donde formará IAg.

d) En presencia de aldehidos y cetonas conviene determinar el carbonilo. Para esto se calienta el aceite con fenilhidrazina, la hidrazona resultante se filtra y el

exceso de fenilhidrazina se elimina por ebullición con solución alcalina de cobre, por oxidación: el N desprendido se recoge y se mide.

e) Índice de acetilo. Se hierve el aceite con anhídrido acético y acetato sódico seco, se precipita con agua, se elimina el exceso de ácido con soda y con agua el exceso de soda y se determina el índice de saponificación del aceite, desecado con SO_4Na_2 anhidro. Si el índice de saponificación es mayor que el del aceite no tratado de este modo, el aceite contendrá alcoholes, eventualmente oxiácidos.

Si el resultado de las reacciones 1, 4, 5 y 6 fuese positivo, se procede así. Por enfriamiento se separan las partes que así precipiten; los ácidos se extraen por agitación con soluciones débiles de carbonatos alcalinos; los fenoles con álcalis cáusticos; los aldehidos y cetonas con una solución de sulfito ácido de sodio. De los compuestos así formados, los ácidos permiten obtener los cuerpos deseados; los compuestos de aldehidos y cetonas con SO_3HNa se desdoblan con álcalis.

También de las semicarbazonas, que se producen cuando se trata el clorhidrato de semicarbazida en solución concentrada acuosa, con acetato potásico en solución alcohólica y una cetona, puede obtenerse ésta por acción de los ácidos.

Después de separar estos componentes, se buscan los demás componentes de los aceites etéreos por destilación fraccionada, a presión ordinaria o reducida, tratando de separarlos. También el fraccionamiento en corriente de vapor puede ser muy útil.

El punto de ebullición de las fracciones es valioso a menudo para determinar la composición. Así los terpenos de fórmula $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ hierven entre $170-190^\circ$ y los sesquiterpenos a 100° más o menos.

La comparación de la composición elemental de las fracciones con la del aceite bruto, proporciona datos valiosos, pudiendo reconocerse las proporciones de oxígeno correspondiente a cada componente.

Las fracciones se estudian por separado como se indica para el aceite total.

Los alcoholes se caracterizan llevándolos a la forma de éteres, particularmente con ácidos benzoico, phtálico y succínico. Los alcoholes primarios se unen al Cl_2Ca anhidro y los alcoholatos se rompen luego por el agua. También para separar alcoholes sirven los compuestos del feniluretano, los cuales por la acción del fenilisocianato, dan también alcoholes.

Si se obtuviese algo de éster se saponificará y sus productos de saponificación se estudiarían.

Si junto a la parte principal de hidrocarburos hubiese cuerpos oxigenados, éstos se descompondrían por K o Na o por P_2O_5 .

Los más importantes de los carburos que se encuentran en estos aceites son los terpenos, cuya separación y caracterización reposan en los métodos hallados y estudiados por Wallach, que consisten en preparar productos cristalinos de las fracciones que contienen terpenos. Los principales derivados de los terpenos son:

1. Productos halogenados ⁽⁴⁰⁾ de adición, que se obtienen tratando los hidrocarburos por los ácidos halogenados en solución acética, precipitándolos por enfriamiento de la mezcla en agua helada; y si éstos se tratan en solución acética con acetato sódico anhidro, vuelven a formarse los hidrocarburos ⁽⁴¹⁾.

2. Bromados, que se forman si se hace absorber bromo por los terpenos en solución enfriada de éter-alcohol o ácido acético; cristalizan en éter acético ⁽⁴²⁾.

3. Nitrosados, que se producen agitando los terpenos con una solución de nitrito sódico y ácido acético.

4. Nitroso clorados ⁽⁴³⁾ que se obtienen si una solución enfriada de terpeno y nitrato de amilo se agita con ácido clorhídrico y se agrega algo de alcohol o ácido acético.

5. De los nitrosoclorados derivan las nitrolaminas ⁽⁴⁴⁾ si se calientan en solución alcohólica con una base orgánica, en baño maría.

En algunos casos se puede caracterizar los terpenos con reacciones cromáticas. Por ejemplo, se obtiene una coloración intensa azul si a una solución de sylvestreno en anhídrido acético se agregan algunas gotas de H_2SO_4 .

Para la determinación de aceites etéreos en drogas, ha propuesto C. Mann ⁽⁴⁵⁾ el siguiente procedimiento:

20 gramos de la droga desmenuzada se mezcla con la mitad de su peso de piedra pómez y se destila con el aparato descrito en *Arch. der Pharm.* 1902, p. 152. El destilado se sala, se agregan 50 cm³ de rigoleno, se regenera el volumen después de agitar, se extraen 25 cm³ o sea 10 gramos de substancia, se evapora en vasito de pesada, se multiplica por 10 el aceite etéreo obtenido y así se tiene la riqueza de la droga.

La preparación de cuerpos volátiles, como se hallan en la familia de las ranunculáceas, está ligada a lo que queda expuesto. Conviene destilarlos en corriente de vapor ⁽⁴⁶⁾ y tratar de aislarlos en el destilado por agitación.

RESINAS

Un método o una marcha con cuyo auxilio se puedan estudiar todas las resinas y separar sus componentes no existe. Tschirch en su obra *Die Harze und die Harzbehälter* (Leipzig, 1900), presenta varios métodos de investigación que sirven para determinar los componentes y cuerpos agregados de las resinas naturales. Estos cuerpos agregados deben eliminarse primero: los aceites etéreos por destilación con vapor de agua o tratando la resina o su solución alcohólica con éter de petróleo, si se teme alguna descomposición de aquélla durante la destilación. Si en ese disolvente pasase alguno de los componentes de la resina, se debe repetir la destilación con el residuo, con vapor de agua. Los cuerpos amargos se extraen de la resina con agua. La separación de los ácidos libres se logra por agitación de la solución etérea de la resina con soluciones débiles de carbonatos alcalinos, así como para los aldehídos se empleará la agitación de la solución etérea con una solución acuosa de SO_3HNa . Los componentes de la resina pura que se obtenga por este tratamiento, se pueden separar algunas veces por disolventes neutros, además de aprovechar su acción con potasa cáustica, en cuyas soluciones se disuelven los éteres (resina), quedando insolubles los resenos.

La purificación de los resenos se consigue por pre-

precipitación de sus soluciones alcohólicas con HCl muy diluído.

La saponificación de los éteres de la resina se hace por ebullición con álcalis cáusticos, bajo una corriente de vapor y exige mucho tiempo: así para la resina amoníaco la saponificación dura 6 meses. Si los ácidos de los éteres de la resina fuesen atacados por los álcalis cáusticos se usarán carbonatos. Las legías de saponificación se descompondrán por HCl, los ppdos. se lavarán con agua caliente y el residuo se saponificará de nuevo, hasta que la saponificación termine, lo que se reconocerá porque por la acción del HCl precipitará la resina (alcohol de resina) pulverulenta: estos alcoholes de resina pueden ser mezclas de resinol y de resinotanol.

Los resinotanoles dan con $(C_2H_3O)_2$, Pb, Cl, Fe y Cr_2O_7, K_2 reacciones semejantes a las de los taninos. La separación de los resinoles y de los resinotanoles se funda en su comportamiento con los álcalis cáusticos o la cal viva (véase la investigación sobre la resina de benjuí). Su purificación se puede hacer además por precipitación de su solución alcohólica con agua clorhídrica.

En el líquido acuoso separado de los alcoholes de resina se encuentran los ácidos ligados con ellos en forma de éteres, los cuales se separan por agitación con éter y otros disolventes.

Como tipos de los métodos de investigación propuestos por Tschirch vamos a exponer los siguientes:

1. Investigación sobre una resina de conífera que junto con el reseno contiene varios ácidos de resina (Resina de *Dammara orientalis*). (47)

La resina se extraerá primero con agua caliente para librarla de los cuerpos amargos y entonces se disolverá en éter y hasta completo agotamiento se agitará con $CO_2(NH_4)_2$ al 1 % protegida de la luz.

Los líquidos de agitación, libres de éter por calentamiento, se mezclarán una vez bien fríos con ácido clorhídrico muy diluído, agitando, con lo cual los ácidos de resina precipitan; se lavan, se enjugan entre papeles de

filtro y sin emplear calor y en ausencia de luz se secan; para purificarlos se redisuelven en éter; se agitan otra vez con el $\text{CO}_2(\text{NH}_4)_2$ y se sigue el procedimiento hasta el fin. La resina de *Dammar orientalis* da así dos ácidos que en una mezcla de alcoholes etílico y metílico dan el ácido mancopalénico cristalizado y el mancopalénico amorfo. La solución alcohólica conteniendo el último se precipita con acetato de plomo alcohólico para purificarlo, la sal plúmbica se lava con alcohol, se enjuga entre papel de filtro y se echa poco a poco en alcohol acidulado con ácido sulfúrico; el filtrado del SO_4H_2 se vierte agitando en HCl muy diluído, precipitándose los ácidos de resina. Se redisuelven en éter, se agitan con $\text{CO}_2(\text{NH}_4)_2$ al 1 %, se reprecipitan con HCl diluído, se lavan y se secan.

La solución etérea de la resina, después de tratarla con el $\text{CO}_2(\text{NH}_4)_2$, se agita con CO_2Na_2 al 1 %, de ésta se separan los ácidos por HCl, se redisuelven en éter y para purificarlos se reprecipitan como ya se ha explicado. También esta precipitación da con la *Dammara orientalis* dos ácidos los mancopalólicos α y β que por preparación de su sal plúmbica, se separan, sabiendo que una de estas sales es soluble en alcohol y la otra no.

El tercer elemento de agitación de Tschirch, K (OH) al 1 %, no extrae de la solución tanto como las soluciones fuertes.

La solución etérea que queda después de las agitaciones, se lava con agua y se elimina el éter con cuidado en baño de vapor: así queda la resina y el aceite etéreo: el último se arrastra con corriente de vapor. El residuo es en la *Dammara* indiferente como el reseno respecto de los álcalis cáusticos, aún en caliente, y vertiendo su solución alcohólica en agua acidulada precipita.

2. Investigación sobre una resina de benjuí⁽⁴⁸⁾ que, en su mayor parte, está formada por éteres de resina y que contiene pocos ácidos libres, al lado de algunos otros componentes (aldehidos, etc.).

La resina se disuelve en éter y se agita varias veces con Na (OH) al 4 % hasta que el éter no tenga reacción ácida; por lavado con agua, el álcali se elimina del éter; éste se agita después con una solución acuosa saturada de SO_2HNa , se trata la solución acuosa con H_2SO_4 diluido (150 cm^3 de una mezcla de 3 p. de H_2SO_4 y 5 p. de H_2O bastan para 100 cm^3 de solución de sulfito); el SO_2 se eliminará en lo posible a baño maría.

El líquido acuoso después de frío, se agita con éter y éste se evapora: *Benzaldehído*.

El éter libre de benzaldehído abandona por evaporación un residuo oleoso del cual por enfriamiento se separa la *Styracina*.

En el resto de aceite se constata la presencia de éter del ácido propilfenilcinámico por saponificación.

La presencia de *vanillina* se determina en la solución alcalina separada del éter. Del líquido caliente se separará la resina con HCl y será filtrada también en caliente. El líquido separado de los cristales que aparecen de ácidos benzoico y cinámico, se agita con éter y con el sulfito se trata como queda dicho.

Para señalar presencia de ácidos libres, la solución etérea del benjuí se agita enérgicamente con soda al 1 % y se descompone el álcali con HCl. La resina libre de ácidos, éteres, hidrocarburos y aldehídos, se saponifica con potasa y vapor de agua, el líquido de saponificación se adiciona con potasa concentrada y después de agregar fragmentos de potasa, se evapora a fuego directo. Se separan—especialmente con algunas gotas de éter—hermosas agujas de un compuesto que debe considerarse como un alcohol-resina del benzoresinol. De la legía parda se precipita, primero con HCl, el benzoresinotanol bruto; y el benzoresinol contenido aún en aquella se separa con KOH alcohólica concentrada: precipita benzoresinotanol potásico, que con HCl da benzoresinotanol que igualmente es un alcohol de resina.

También con cal se consigue una separación de los

dos alcoholes de resina, porque el benzo-resinotanol cálcico es insoluble en alcohol.

Para establecer cuales son los ácidos que se hallaban combinados con los alcoholes de resina, se preparará una resina pura, para lo cual la resina se redissolverá en éter, se precipitará con éter de petróleo y se agitará con una solución etérea de soda al 1 %. Algunos gramos de la resina pura se saponificarán con potasa y el líquido se acidulará ligeramente con HCl. Además de los alcoholes de resina, se separan los ácidos (cristalinos) y pueden por lavado con agua caliente separarse de los alcoholes.

3. Investigación sobre una resina de umbelíferas (Amoníaco) ⁽⁴⁹⁾ que al lado de ácidos libres contiene resina y reseno.

La resina se extrae con éter y el residuo de la extracción etérea se trata con agua: la goma pasa a la solución:

La resina resultante de la evaporación de la solución etérea, cede al agua un ácido (salicílico) que por extracción acuosa de la droga también se obtiene. Con solución de sulfito no se consigue nada de aldehído de la solución etérea. Con potasa al 5 %, por agitación, da al fin el éter de resina, mientras queda en el éter un reseno, del cual se libran los aceites etéreos que quedan de la solución etérea, después de evaporar, por destilación en vapor de agua. La resina disuelta en la solución potásica se precipita con HCl y se saponifica como de costumbre con potasa en solución; por descomposición de la solución de saponificación, resultan por una parte los ácidos butírico, baldriánico y salicílico y por otra el resinotanol, el cual por precipitación de su solución alcohólica con HCl, se purifica de componentes minerales.

4. Investigación sobre una resina conteniendo dos diferentes resenos y resinotanoles (Burseráceas-Opopanax). ⁽⁵⁰⁾

La resina bruta se agotará sucesivamente con éter de petróleo, éter y alcohol.

En éter de petróleo se disuelven los componentes de la resina, junto con los aceites etéreos que se separan como de costumbre por destilación en vapor de agua, de la resina; ésta se disuelve en éter, y la solución se precipita con éter de petróleo: el ppdo. es el β -panaxreseno, quedando disuelto el α -panaxreseno.

La purificación del reseno consiste en precipitar su solución alcohólica por agua acidulada con HCl. El β -panaxreseno se encuentra también en el extracto etéreo que, junto con algo de aceites etéreos, contiene otros componentes de la resina; ésta se puede extraer con amoníaco y de la solución amoniaca se precipitará por adición de agua muy lig. clorhídrica: es un resinotanol que puede obtenerse también de la resina bruta si la droga extraída con éter de petróleo y éter, se trata con alcohol y esta solución se adiciona con ácido clorhídrico muy diluido.

5. Investigación sobre la resina de la Palmera sangre de dragón ⁽⁵¹⁾ que contiene ácidos libres y aldehidos.

Tiene este trabajo la particularidad de que el aislamiento de los componentes se logra con soluciones indiferentes.

La resina se disuelve en éter: como residuo queda una masa parda que se disuelve en alcohol. La solución etérea se precipita con alcohol: ppdo. de *Dracoalbano*; el filtrado se evapora y el residuo se toma con éter de petróleo: el *dracoreseno* pasa en solución, en tanto que la *dracoresina* queda como insoluble.

TANINOS

La obtención de taninos en perfecto estado de pureza es sumamente difícil por razones diversas: son cuerpos amorfos y no dan compuestos cristalinos; se desdoblán por la acción de muchos cuerpos, en especial, por los álcalis; además en muchas plantas hay dos o más taninos y falta todavía un método para separarlos.

Los disolventes más empleados para extraer los taninos de los materiales naturales son: la mezcla alcohol-éter, alcohol fuerte o débil, agua, éter acético y alcohol metílico.

Empleando la mezcla alcohol-éter conviene tomar 4 partes de éter y 1 de alcohol: el extracto se agita con $\frac{1}{3}$ de su volumen de agua, la cual se apodera de la mayor parte del tanino.

Esta solución acuosa se purifica por agitaciones repetidas con éter y se evapora a sequedad o se purifica el líquido más todavía. La evaporación se hará en el vacío y se llevará a consistencia de extracto solamente, el cual en láminas delgadas sobre una plancha, se secará en el vacío sobre ácido sulfúrico.

Si se hubiere evaporado a sequedad, se redisuelve el residuo en alcohol, en el menor volumen posible y se precipita fraccionadamente con éter; por repetición de esa operación se consigue un tanino puro.

Una purificación ulterior del tanino así preparado

se logra por los métodos más abajo expuestos. Debe notarse que los taninos disueltos en alcohol metílico pueden también precipitarse con éter y que los mismos métodos empleados con las soluciones acuosas obtenidas de las extracciones con alcohol-éter, se practican con los extractos acuosos de los materiales brutos.

Métodos de ulterior purificación son:

1. Precipitación con NaCl y agitación ulterior con éter acético.

2. Precipitación con compuestos de metales pesados y regeneración de los taninos por descomposición de esos cuerpos.

El primer método ha sido aconsejado por Löwe (⁵²) quien procede, disolviendo en una solución de ClNa no saturada, filtrando para separar las impurezas no disueltas y precipitando el tanino con un exceso de NaCl. Se repite la operación disolviendo el tanino al final en una mezcla de 2 volúmenes de agua y 1 volumen de solución saturada de ClNa que se agita con éter acético.

No es necesario obtener, por evaporación de la solución acuosa, el tanino en un principio, sino más bien proceder a la precipitación fraccionada con ClNa, de inmediato, en dicha solución acuosa.

Es de valor la modificación al procedimiento que vamos a exponer: se saca de la solución acuosa una pequeña parte del tanino y algunas impurezas por precipitación, saturando el líquido incompletamente con ClNa, se filtra y se agita el extracto varias veces con éter; el líquido etéreo está constituido por ácido gálico y productos similares de desdoblamiento de los taninos que habrá que estudiar y que acompañan frecuentemente a los taninos; a la solución acuosa se agrega ClNa hasta saturación y se agita entonces con éter acético: la evaporación de estas soluciones etéreas se hará con las precauciones indicadas antes para las soluciones acuosas.

Los compuestos metálicos más usados para la precipitación de taninos son sales neutras o básicas de plomo (acetatos) y acetato de cobre. El uso de los acetatos no

está exento de inconvenientes: el ácido acético que queda libre puede (aún en pequeña proporción) disolver una parte del tanato metálico. Además puede alterar el tanino no precipitado y complicar las investigaciones ulteriores.

Por ésto se ha propuesto la sustitución del acetato de plomo por hidróxido de plomo o carbonato del mismo metal, aunque el primero por sus propiedades básicas ataque al tanino. El autor ha conseguido los mejores resultados con carbonato de cobre, siendo en muchas ocasiones muy conveniente el hidrato de cobre. La preferencia corresponde al carbonato porque el hidrato de cobre produce compuestos insolubles con algunas sustancias no taninos y como carbonato se buscará el comercial, seco, y mejor aún el amorfo, preparado por precipitación de una sal cúprica con carbonato alcalino.

Se procede por precipitación fraccionada, en tres veces, por ejemplo, comparando las propiedades de los taninos que en cada fracción se obtienen.

Los precipitados que se han obtenido con sales de cobre o plomo, se dividen bien, se suspenden en agua y se atacan, sea con H_2S o con HCl o H_2SO_4 , sin saturar por completo, agitando luego con éter acético.

La separación de taninos rara vez se logra por precipitación fraccionada, más bien por su diferente comportamiento con los disolventes; así, un tanino en solución alcohólica precipitará con éter, mientras el que lo acompaña quedará en solución etéreoalcohólica.

La determinación de dos taninos simultáneamente existentes en una sustancia, se logra aún sin separarlos: por ejemplo, si uno se desdobla por un agente dado y el otro no. De este modo Zölffel⁽⁵³⁾ estableció en la *Caesalpinia brevifolia* y en los *Myrobalanos* la existencia de dos taninos, de los cuales, uno se desdoblaba por la acción de H_2SO_4 diluido a la ebullición. El ácido gálico engendrado por desdoblamiento se extraerá del líquido filtrado por agitación con éter, el H_2SO_4 con $Ba(OH)_2$ y el tanino residual se aislará por el procedimiento del acetato plúmbico.

Los métodos de evaluación de taninos se aplican especialmente al ácido galotánico y no son aplicables a todos los taninos en general. El procedimiento gravimétrico de Schröder ⁽⁵⁴⁾ es utilizable en todos los casos.

25 gramos de la substancia se someten a temperatura de ebullición con 500 cm³ de agua 30' y el residuo se agota en percolador, hasta obtener en total un volumen de un litro.

100 cm³ de esta solución se evaporan en baño maría sobre cápsula de platino y el residuo se seca a 100° hasta constancia de peso, dando:

G substancias disueltas

En seguida se incinera este residuo y se tiene:

A Cenizas de substancias disueltas;

G — A = O substancias orgánicas disueltas.

Luego se hace digerir en 200 cm³ de solución, por 1 hora, 10 gramos de piel en polvo, con agitación cuidadosa y frecuente, se comprime la masa en un filtro y se mantiene el filtrado 24 horas con 4 gramos de piel en polvo, probando sobre el líquido si todo el tanino ha sido precipitado; se toman 100 cm³ del líquido, se evaporan como antes y se secan, dando

G' substancias no taninos y minerales;

se incinera y tendremos:

A' cenizas

G' — A' = N substancias no taninos.

Si se hace la corrección de la parte soluble del peso de la piel en polvo empleada, tendremos:

O — N = T taninos verdaderos.

Otros métodos aplicables serían los de Löwenthal-von Schroeder ⁽⁵⁵⁾, de Hammer ⁽⁵⁶⁾ y de Ruoss ⁽⁵⁷⁾, éstos últimos con datos relacionados al ácido galotánico.

Sobre la separación de taninos y ácidos vegetales véase la pág. 283.

FLOBAFENOS

En estrecha relación con los taninos se hallan los flobafenos, productos de descomposición de aquéllos.

Son insolubles en agua y pueden ser solubles cuando están acompañados por otros cuerpos y especialmente por los taninos.

Si se evapora una solución acuosa en el vacío y se agota el residuo con alcohol absoluto, quedan los flobafenos como insolubles.

Por disolución en álcalis y precipitación con ácidos se purifican.

Se debe investigar si poseen naturaleza glucosídica.

ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los cuerpos que se van encontrando en el curso de la investigación de un vegetal, proporcionan la base para la obtención de los ácidos orgánicos: se sabrá si se encuentran combinados o libres, y en el primer caso si se hallan como sales alcalinas o alcalino-terrosas y si su estado permite una fácil separación, determinándose si forman o no una parte importante de la materia en estudio.

La mayor parte pasan en disolución cuando se hierve la droga con agua o alcohol acidulados con HCl. Para ulteriores investigaciones (en particular para ácidos ya conocidos) se neutralizan con CO_3Na_2 después de haberse eliminado el alcohol de sus soluciones; si al agregar el CO_3Na_2 a la solución acuosa se tuviese precipitado (por ejemplo CO_3Ca), se hierve 15' (para grandes cantidades 30') con exceso de solución de soda y se neutraliza con HCl; de este líquido se precipitan muchos ácidos orgánicos con acetato plúmbico y por desdoblamiento de las sales plúmbicas mediante H_2SO_4 , se obtienen en libertad.

Para la separación de los ácidos más frecuentes existen distintos métodos, los más, fundados en su acción sobre sales de plomo, calcio o bario.

Habiendo obtenido una solución acuosa de las sales alcalinas neutras por el procedimiento antecitado, se

comienza por precipitar, según E. Fleischer, ⁽⁵⁸⁾ el tártrico, cítrico, málico y oxálico con acetato plúmbico, habiendo eliminado las sustancias pécticas por adición de un volumen igual de alcohol. El precipitado que además de los ácidos orgánicos encierra como sales de plomo al sulfúrico, clorhídrico y fosfórico que pudiese tener el vegetal, se lava con alcohol a 50 % y se satura con NH_3 ; el filtrado contiene de los ácidos nombrados el tártrico, cítrico y málico; se agrega $(\text{SNH}_4)_2$ y se acidula con ácido acético, obteniéndose en el líquido de filtración del SPb los ácidos citados en libertad; se evapora si fuese necesario, se añade acetato potásico en solución acuosa y se lleva por adición de alcohol a 95 % (doble volumen del de la solución acuosa) el ácido tártrico a la forma de tartrato ácido que precipita, acelerando la separación por enfriamiento. Después de 1 hora se decanta el líquido y se lava el precipitado residual con una mezcla de

Alcohol	2
Agua	1

En el líquido separado se agrega Cl_2Ca , NH_3 y un poco de alcohol, precipitándose las sales cálcicas del málico y del cítrico, que por lavado con agua de cal caliente permiten la separación del malato soluble y del citrato insoluble.

La parte del precipitado primitivo de sales plúmbicas insolubles en amoníaco, se satura con H_2S ; a los ácidos puestos así en libertad se les adiciona de acetato sódico en cantidad suficiente o se neutraliza con CO_2HNa y se acidula con ácido acético; entonces se precipita el ácido oxálico como $\text{C}_2\text{O}_4\text{Ca}$ con solución saturada de SO_4Ca .

De todos los precipitados obtenidos, se libentan los ácidos y se estudian no solo por las reacciones de identidad propias, sino por el análisis elemental y el peso

molecular, de modo que puedan descubrirse ácidos nuevos en presencia de ácidos ya conocidos.

Para aislar los ácidos de sus sales, se usa el H_2S para las plúmbicas y el H_2SO_4 , para las demás.

Como reacciones de identificación que dan buen resultado con los ácidos aislados o con sus sales alcalinas neutras citaremos:

1. *Acido cítrico:*

- a) Con $(\text{HO})_2\text{Ca}$ da por calentamiento un precipitado que se redisuelve por enfriamiento.
- b) Se disuelve un poco de ácido en poca agua, se agrega algunas gotas de $\text{KMnO}_4 \cdot \frac{n}{10}$ y se calienta a 30° , añadiendo algunas gotas de oxalato amónico y $10 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$ (10 %) si hubiese precipitado o coloración parda; al líquido así decolorado se añade algunas gotas de H_2O , Br y se producirá un enturbiamiento de pentabromacetona (reacción de Stahre) ⁽⁵⁹⁾.
- c) En una solución del ácido se vierte $\frac{1}{20}$ del volumen de sulfato de mercurio ($5\text{gHgO} + 20\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ a 100) y se calienta a ebullición; se añaden algunas gotas de $\text{KMnO}_4 \cdot \frac{n}{10}$ y se producirá un precipitado blanco, aunque también lo producen los ácidos cetónicos (reacción de Denigés) ⁽⁶⁰⁾.

2. *Acido tártrico.*

- a) El precipitado formado por el AgNO_3 en la sal neutra ennegrece por el calor.
- b) Si se agrega ácido tártrico a una mezcla de resorcina y ácido sulfúrico previamente calentada a $125-130^\circ$, se produce una coloración rojiza (reacción de Mohler) ⁽⁶¹⁾.
- c) Calentando la solución de un tartrato neutralizado, si se deja caer gota a gota Cl_3Fe se produce un precipitado amarillento ⁽⁶²⁾.

3. *Acido málico.*

- a) Si a una solución de este ácido se agrega $\frac{1}{10}$ del volumen de acetato de mercurio (5 %) y 1 cm³ de ácido acético, se filtra, se calienta a ebullición y luego se deja caer gota a gota KMnO_4 (2 %) se forma un precipitado blanco constituido por un compuesto mercúrico del ácido oxalacético (reacción de Denigés) (⁶³).
- b) El PdCl_2 se reducirá (⁶⁴) si se calienta con malato neutro o lig. alcalino.
- c) Por calentamiento del ácido málico entre 150-200° se transforma en maléico y fumárico. Los cristales de éste se caracterizan por su insolubilidad en agua.

4. *Acido oxálico.*

- a) Este y sus sales neutras dan con FeSO_4 un precipitado de $\text{C}_2\text{O}_4\text{Fe}$.
- b) El Cl_3Fe da con exceso de ácido un color verde (⁶⁵).
- c) Calentado con H_2SO_4 se descompone sin carbonización en CO_2 , CO y H_2O .
- d) Los oxalatos dan con Cl_2Ca un precipitado insoluble en $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$.

De los ácidos no considerados en esta serie debe citarse el succínico: se caracteriza por el precipitado pardo rojizo que a la temperatura ordinaria dan con Cl_3Fe en solución neutra, precipita con $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}) \text{Pb}$ pero no con Cl_2Ca en soluciones diluídas; además tiene la propiedad de sublimarse sin descomposición.

Se hallará otra marcha de separación de estos ácidos en el trabajo de E. Schmidt, *Pharm. Chemie*, 3^a edición 1896; (así como debe consultarse el tratado de Beythien, Klimmer y Hartwich, *Nahrung-und Genussmittel Untersuchung*, I, Leipzig, 1914).

[Las reacciones aquí indicadas se completarán consultando la obra de Roche, *Réactions et Réactifs*, París, 1902 y el libro de Merck, *Reagenzien Verzeichnis*, Berlín, 1913].

Siguiendo el método de Fleischer hay que eliminar los taninos que precipitan con el $(C_2H_3O)_2 Pb$: esto se consigue agitando con éter acético o tratando con piel en polvo o con gelatina y también precipitando con alcaloides o antipirina. El tratamiento con éter acético tiene la ventaja de eliminar también el ácido gálico.

La determinación cuantitativa de los ácidos se hará utilizando el método de Fleischer: el bitartrato se valorará por volumetría; el citrato cálcico se disuelve en $C_2H_4O_2$ y precipitando con acetato plúmbico, se lavará con alcohol a 50 %, se dividirá en agua y se precipitará con H_2S , pudiendo titularse el ácido libertado.

Para valorar el ácido oxálico utiliza Fleischer el precipitado plúmbico insoluble en amoníaco, tratándolo con álcali cáustico, agregando $S(NH_4)_2$ y acidulando con ácido acético o ácido clorhídrico, se hierve y se filtra: el líquido se trata con ácido sulfúrico y se titula con permanganato.

Para el ácido málico A. Hilger ⁽⁶⁴⁾ utiliza la reacción del Cl_2Pd : se acepta que 1 gramo de ácido málico reduce del Cl_2Pd , 0,294 gramos de Pd.

[Para la valoración de estos ácidos, el tratado citado de Beythien, Hartwich y Klimmer es precioso].

SUBSTANCIAS ALBUMINÓIDEAS

El aislamiento de las sustancias albuminóideas puede conseguirse en muchos casos por una separación mecánica, del mismo modo que los cuerpos que las acompañan. Así, se puede separar el almidón de la harina de trigo por lavaje de las sustancias albuminóideas (gluten).

Los cristaloides de algunas semillas se obtienen, si se extraen éstas con éter una vez desmenuzadas y la suspensión etérea se deja reposar, de modo que los cristaloides se depositen; se decanta el éter, se lava con el mismo disolvente varias veces y el resto se evapora.

De modo semejante puede emplearse aceite o una mezcla de aceite y éter de petróleo, pudiéndose después separar el aceite con éter sulfúrico o de petróleo.

La investigación de los albuminoides vegetales, tanto en el caso antes citado como en el de una parte de la planta no aislada, reposa en el empleo de los disolventes y precipitantes ya aconsejados para los albuminoides animales, después de tratar los órganos animales sin reactivos enérgicos, los cuales alterarían de tal modo los principios obtenidos, que no podrían relacionarse a los cuerpos originarios.

Para la extracción sirven: agua, solución de cloruro sódico de concentración variable (5-10 %), soda cáustica (1 %), amoníaco (0.1-1 %) y alcohol etílico (40-80 %).

Los métodos de precipitación más usuales son: los albuminoides pueden ser separados de sus soluciones acuosas y salinas por coacción, saturadas con alcohol, sobre saturadas con sulfato amóniaco o con otras sales aisladas o mezcladas, a veces por ácidos débiles como el acético. Los albuminoides del tipo de las globulinas, pueden además, de su solución salina, precipitarse por dilución con agua o por diálisis. De una solución alcohólica diluída, se puede precipitar la albúmina por adición de alcohol fuerte y éter.

Los albuminoides precipitados se lavan bien con alcohol y éter, los solubles en el alcohol con éter, y se secan en el vacío sobre ácido sulfúrico.

El modo de comportarse los albuminoides respecto de los disolventes y precipitantes, así como sus propiedades químicas, son la base de la clasificación que hasta hoy se adopta. Poseen la particularidad de variar sus propiedades físicas sin que haya una variación en su composición. Semejantes variaciones pueden producirse si el albuminoide se somete a la acción prolongada del agua o del alcohol y aún más si actúan sobre él (aun que sean diluídos) ácidos o álcalis. Estas variantes consisten principalmente en que su solubilidad en agua o soluciones salinas desaparece. Además, los albuminoides se descomponen fácilmente. Una descomposición semejante puede impedirse, operando a bajas temperaturas o conservando las soluciones con cuerpos como el timol o el cloroformo.

Si las plantas estuviesen libres de sales solubles, por la extracción acuosa la albúmina y las albumosas (de los núcleoproteidos) estarían en solución. Pero las plantas contienen siempre sales solubles en agua y por eso se pueden hacer extracciones por medio del agua pura o de soluciones salinas muy diluídas. En semejantes líquidos es sin embargo soluble algo de globulina. Además, debe tenerse en cuenta que muchas veces los extractos vegetales actúan como ácidos, lo que en los límites antes discutidos de los albuminoides puede ser

perjudicial. Una neutralización del extracto es por eso necesaria. Para esta neutralización pueden servir álcalis diluidos, carbonatos alcalinos y aún mejor carbonato magnésico (⁶⁶). Con estas precauciones más importantes pueden hacerse las investigaciones en la forma siguiente:

Se extraen las partes del vegetal que se estudian, previa neutralización con cantidad suficiente de carbonato magnésico, con solución de cloruro sódico a 5-10 %. Una parte del material así extraído, se trata con solución de cloruro sódico calentada a 60° C. y se observa si por enfriamiento algo del cuerpo albuminoide precipita. La solución salina así preparada abandona por saturación con sal los albuminoides del grupo de la miosina como precipitado, conservando la vitelina en solución. Sin embargo, las investigaciones de Palladin han probado que la miosina es únicamente un compuesto calcáreo de la vitelina. Otra separación de las globulinas solubles en líquidos salinos se puede realizar por diálisis y otro por coagulación fraccionada con calentamiento. Así se coagula la miosina en solución de sal a 10 % o 55-60° C., la vitelina hacia 75° C.

En general debe preferirse la diálisis como medio de fraccionamiento (*). Se separa la globulina, (que se aísla antes que ninguna por diálisis de una solución salina diluida), del líquido y se vuelve a dializar y así hasta que no tenga nada de globulina o no haya más sal en la solución.

Las fracciones de globulina obtenidas, se disuelven por separado en solución salina al 10 % y se calientan con cuidado; en seguida se calienta la solución albuminosa en una vasija con agua, la cual por su parte en la misma agua que ha servido para el calentamiento se halla. La albúmina que se precipite a determinada temperatura se filtra, se calienta más y se filtra de nuevo y así se sigue hasta la ebullición del agua. Además se

(*) El líquido externo sirve para investigar albumosas que en pequeñas proporciones se hallan difundidas.

puede proceder por fraccionamiento, usando sulfato magnésico, sulfato amónico o mezclas de estas y otras sales para obtener la separación de distintos albuminoides. Cada uno de los precipitados obtenidos se purifica por diálisis y luego por tratamientos con alcohol.

Si en el líquido libre de globulinas se encuentran aún albuminoides, se pueden comprobar por sus reacciones generales (pág. 228). Si el líquido da la coloración rojiza por la reacción del biuret, se interpretará como presencia de albumosas, las cuales junto a las albúminas pueden hallarse. Finalmente, se puede por calentamiento (ebullición) en reacción neutra con una mezcla de sulfatos magnésico y sódico y en reacción ácida con cloruro sódico y sulfato magnésico, hacer la separación de los albuminoides. Las albumosas que se hallasen todavía en solución, podrían separarse en líquido ácido, mediante el sulfato de cinc o de amonio.

Por medio de la extracción con solución salina, se puede seguir la investigación utilizando el alcohol, puesto que entre las albúminas vegetales hay muchas solubles en ese vehículo. Se emplea primero alcohol 35-40° y después de 75-80°. El extracto preparado con alcohol diluido se puede concentrar por evaporación o provocar la precipitación del cuerpo disuelto, agregando alcohol concentrado. Y también la solución de alcohol concentrado puede evaporarse o precipitar con éter. Si se hallasen albuminoides solubles en alcohol, se trataría de extraer el material estudiado primero con alcohol, pues por el tratamiento con solución de cloruro sódico podrían aquellos perder su solubilidad en alcohol.

Como disolvente puede emplearse después el hidrato sódico al 1 %. Se disuelven así muchos albuminoides insolubles o insolubilizados, especialmente globulina que se deja precipitar por neutralización con ácidos débiles o por una corriente de anhídrido carbónico.

Y en fin, puede todavía hacerse una extracción con hidrato potásico a 0.1-0.2 % y precipitarse la solución con ácidos.

Algunos albuminoides vegetales pueden obtenerse en estado cristalino. Muchas globulinas cristalizan, cuando se dializa sus soluciones en cloruro sódico. Otros cristalizan enfriando sus soluciones preparadas en caliente. Schmiedeberg ⁽⁶⁷⁾ abandona la albúmina separada en estado húmedo con un exceso de magnesia calcinada y tratada con agua entre 30-35°. El líquido filtrado proporciona cristales si se evapora entre 30-35°. Mejor se obtienen los cristales si, de acuerdo con lo aconsejado por Drechsel, ⁽⁶⁸⁾ se lleva el compuesto magnésico contenido en el líquido a un dializador sumergido en alcohol absoluto, a través del cual el agua pasa poco a poco.

La determinación cuantitativa de los albuminoides se realiza como se ha procedido para su examen cualitativo. En bromatología se emplea mucho el método de Kjeldahl para determinar albuminoides, multiplicando por un factor (de ordinario 6,25) el contenido en ázoe, pero sin llegar a resultados exactos casi siempre; y no se obtienen tampoco datos exactos por el método de Stutzer, separando por hidróxido de cobre los cuerpos albuminoides de otros nitrogenados.

PRODUCTOS DE DESDOBLAMIENTO DE LOS ALBUMINOIDES

Como productos de desdoblamiento de los albuminoides, debemos considerar algunos cuerpos azoados contenidos en los vegetales y sobre todo en las semillas en germinación. Merecen ser nombrados ante todo la leucina, tirosina, arginina, ácido glutámico y ácido aspártico, (*) correspondientes a la glutamina y asparagina.

Para preparar esas sustancias (⁶⁹) se extrae con agua caliente la parte de la planta estudiada dividida previamente, se purifica el extracto con acetato plúmbico (evitando un exceso) y se precipita el filtrado con una solución de nitrato mercúrico, obteniendo asparagina, glutamina, arginina y tirosina, que pueden estar acompañadas de alantoina y vernina. El precipitado se satura con hidrógeno sulfurado y el filtrado se evapora entre 50-60° previa neutralización con amoníaco. La solución se satura con algunas gotas de solución de carbonato amónico. La solución evaporada da en el vacío cristales de arginina como nitrato. Tomando con agua fría en pequeña cantidad, se separa la tirosina,

(*) Sobre el aislamiento de estos cuerpos no precipitables por ácido fosfotungstácico pero reductores del licor de Fehling, ver *Journ. f. prakt. Chem.* CVII, 222 y *Ann. d. Chem. u. Pharm.* CLIX, 150 (1873).

difícilmente soluble en ese vehículo, pudiendo precipitarse la arginina con ácido fosfowolfrámico. Glutamina y asparagina se separan, aprovechando la circunstancia de que en agua fría escasa la segunda es menos soluble que la primera, se lleva la solución a evaporar lentamente y se obtienen finas agujas de glutamina y granos cristalinos de asparagina que se separan lavando con el agua madre.

La leucina no precipita por el nitrato mercúrico en solución diluida y se puede por evaporación del filtrado obtener, tratando éste previamente con ácido sulfhídrico. Por disolución en alcohol, se separa la leucina de la tirosina, si la última no hubiese precipitado enteramente por la sal de mercurio.

La leucina y la tirosina se dejan separar en una mezcla, empleando ácido acético y alcohol a 95°, con los cuales se calientan las sustancias hasta ebullición naciente; la leucina se disuelve (*Zeitschr. f. physiol. Chem.* XXXVII, 18).

La tirosina produce con ácido nítrico, por evaporación, un residuo amarillo, que con hidrato sódico vira al rojo amarillento intenso (reacción de Scherer); con el reactivo de Millon da una coloración rojiza o un precipitado rojo (reacción de Hofmann). Calentando tirosina con ácido sulfúrico concentrado a 50°, se obtiene por neutralización con carbonato bórico un filtrado que con cloruro férrico da un color violeta (reacción de Piria). Con algunas gotas de ácido sulfúrico y de aldehído fórmico, calentando, engendra una coloración rojo parda y por adición de ácido acético verde (reacción de Denigés).

La leucina conocida por sus cristales esféricos, da por evaporación con ácido nítrico un residuo, cuya solución en hidrato sódico calentado sobre la lámina de platino, abandona gotitas oleosas, las cuales sin mojar la lámina metálica, ruedan sobre sí mismas (reacción de Scherer).

La asparagina y la glutamina disuelven hidróxido de

cobre en caliente; por enfriamiento muestran compuestos de cobre difícilmente solubles.

Al lado de estas substancias figuran todavía la lisina, histidina y fenilalanina. La lisina y la histidina se hallan al lado de la arginina en el precipitado producido por el ácido fosfowolfrámico. Se satura con hidrato bórico y expulsando el exceso de éste con anhídrido carbónico, se agrega bicloruro de mercurio en solución concentrada (*Zeitschr. f. physiol. Chem.* XXV, 176 [1898]) hasta reacción ácida. Se descompone el precipitado con ácido sulfhídrico y se obtiene la histidina como cloruro. El filtrado de la precipitación con bicloruro se trata con ácido sulfhídrico y el líquido libre de mercurio, evaporado y libre de ácido sulfhídrico se satura con sulfato de plata, hasta que una parte dé con hidrato sódico una coloración amarilla. Entonces se precipita el filtrado del cloruro argéntico con barita cáustica y se obtiene en el precipitado la arginina por hidrógeno sulfurado. El filtrado del precipitado de arginina se acidula con ácido sulfúrico y se libra de plata por ácido sulfhídrico. El líquido filtrado del sulfato bórico y sulfuro argéntico se precipita con barita y el filtrado se cristaliza bajo la forma de picrato difícilmente soluble de lisina.

La fenilalanina se halla como los otros amidoácidos en el filtrado del ácido fosfowolfrámico y se puede de él obtener, si se precipita el exceso del ácido fosfowolfrámico con barita y se elimina ésta con ácido sulfúrico, al mismo tiempo se precipita con hidrato de cobre (*Ber. der deuts. chem. Ges.* XVI, 1711 [1883]) y el compuesto cúprico se satura con ácido sulfhídrico y el líquido obtenido, expulsando este gas, se precipita fraccionadamente con acetato de cobre.

En agua fría y en alcohol muy difícilmente soluble, deja la fenilalanina por calentamiento una substancia oleaginosa, y por enfriamiento un residuo cristalino, fusible.

ENZYMAS

A pesar de todos los esfuerzos hechos en esta materia, no existe aún método alguno para preparar enzimas en estado de perfecta pureza.

La extracción se hace con agua, alcohol a 20 % o glicerina, las más de las veces a temperatura ordinaria o más baja, porque el calor actúa sobre las enzimas y a cerca de 70° su poder desaparece completamente.

De cualquiera de las soluciones citadas las enzimas se precipitan con alcohol fuerte; sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunas son solubles en alcohol diluido y que otras pierden su poder por prolongado contacto con alcohol. Se redisuelven en agua, en glicerina o alcohol a 20 % para purificarlas, se reprecipitan con alcohol fuerte, repitiendo este tratamiento hasta que el producto por su aspecto, su escasa coloración o su actividad como fermento, muestre un grado de pureza conveniente.

La diálisis es utilizable para una purificación ulterior, pues las enzimas son muy poco dializables; en este caso, el líquido de la diálisis se precipitaría con el alcohol fuerte y el precipitado se secaría en el vacío sobre H_2SO_4 .

Otros métodos de preparación se fundan en la propiedad de las enzimas de ser absorbidas por determinados precipitados, resistiendo en tal forma a los lavados: cuerpos capaces de absorberlas son la coles-

rina, los ácidos grasos, la nitrocelulosa y en particular el fosfato cálcico. Para emplear este último se extrae la enzima con agua acidulada con ácido fósforico y se precipita con agua de cal: el precipitado se lava, se descompone con ácido clorhídrico diluido para libertar la enzima y por diálisis y precipitación ulterior con alcohol se purifica.

Explicaremos el método de Wroblewski ⁽⁷⁰⁾ para preparar diastasa, fundado en que ésta se disuelve en alcohol al 50 % y es insoluble en el de 65 %.

3 kilogramos de malta se maceran 24 horas con 6 kilogramos de alcohol al 68 %, el residuo bien prensado se macera 24 horas en 6 kilogramos de alcohol a 45 %, el líquido se filtra, el residuo se prensa y se repite la maceración. Se unen los dos líquidos de las dos últimas maceraciones y se les agrega tanto alcohol a 96° como sea necesario para tener un líquido de 70 %; se deja depositar el precipitado y se lava con alcohol a 70 %; se redisuelve de nuevo con 6 litros de alcohol a 45 %, se precipita la enzima como antes y se redisuelve en la menor cantidad de agua que posible sea; se satura con sulfato magnésico para precipitar la enzima, se lava con solución saturada de esta sal, se redisuelve en la menor cantidad posible de agua y se dializa, hasta que todo el sulfato se elimine; se precipita la enzima con alcohol y éter y se seca en el vacío.

La separación de la enzima de los hidratos de carbono que podrían acompañarla, se consigue ⁽⁷¹⁾ si se hiciese con el sulfato magnésico una precipitación fraccionada.

Que las enzimas sean cuerpos albuminóideos o al menos que estén ligados con ellos muy íntimamente, parece un hecho comprobado. En un caso dado, se puede tratar la solución de enzima y albuminoides con precipitantes apropiados y comprobar en el líquido y en el precipitado las propiedades de fermento.

En la preparación de enzimas se aconseja proteger las soluciones por medio de conservadores, pero que no actúan sobre el fermento, como el tymol, por ejemplo.

TOXALBÚMINAS

Las toxalbúminas vegetales se obtienen en parte como albuminoides y en parte como enzimas.

El ricino (⁷²) por ejemplo proporciona estos cuerpos, cuando se tratan las semillas prensadas con ClNa al 10 % en un percolador, se satura el líquido con sulfato magnésico y sódico a la temperatura ordinaria y se deja todo reposar en frío. Además de los cristales de los sulfatos, se produce un precipitado blanco de toxalbúminas, arrastradas mecánicamente por aquéllos; se filtra en frío, se lava y se lleva al dializador.

HIDRATOS DE CARBONO Y CUERPOS SIMILARES

Los cuerpos de este gran grupo permiten por sus caracteres de solubilidad una clasificación, considerando los más comunes en el reino vegetal.

I. Muy solubles en agua fría, solubles en alcohol caliente:

Dextrosa (glucosa).

Levulosa (fructosa).

Sacarosa.

Maltosa.

Mannita.

Inosita.

(Galactosa, mannososa, arabinosa, xylosa).

II. Muy solubles en agua, insolubles en alcohol:

Gomas y substancias semejantes.

III. Poco solubles en agua fría, más en caliente e insolubles en alcohol:

Mucílagos y cuerpos pécticos.

Basorina.

Glucógeno.

Inulina.

Almidón.

Xylana.

Amyloide.

IV. Insolubles en agua, solubles en álcalis diluídos:

Modificaciones de gomas difícilmente solubles.

Mannana, Pentosanas.

Hemicelulosas.

V. Insolubles en agua y alcohol, algo solubles en álcalis, solubles por desdoblamiento en ácidos diluídos: Oxixelulosas.

VI. Insolubles en todos estos disolventes:

Celulosa.

Lignina (de ésta una parte puede ser disuelta por soluciones de soda).

I. De los verdaderos azúcares, dextrosa, levulosa, sacarosa y maltosa, se distinguen la inosita y la mannita en que éstas son más difícilmente solubles en agua que aquéllas. Además, la inosita precipita con subacetato de plomo y la mannita se puede cristalizar aislándola de las otras, en agua caliente o en alcohol.

Estos hidratos de carbono se extraen de los vegetales, ya tratados con éter o éter de petróleo, por medio del agua fría o del alcohol a 50 % caliente, cuidando de la reacción neutra del líquido para impedir un desdoblamiento. La solución concentrada y libre de alcohol se precipita con acetato de plomo, se libra del plomo residual por H_2S y se evapora a sequedad previa neutralización del ácido acético libertado, extrayendo el residuo con alcohol metílico o etílico hirviendo, los cuales abandonan en frío por cristalización el azúcar, obteniéndose el resto por evaporación o por precipitación con éter. Conviene notar que la levulosa es bastante soluble en alcohol y en alcohol etéreo y más que los azúcares considerados, de modo que se halla en mayores cantidades en las aguas madres.

Los azúcares así obtenidos, por repetición del procedimiento indicado y decoloración con negro, pueden purificarse. Los productos amorfos o siruposos se harán cristalizar en el vacío sobre H_2SO_4 ; el proceso de cristalización es muy lento para los azúcares, siendo más rápido para la sacarosa, dextrosa y maltosa que para la levulosa.

Una orientación sobre los azúcares que se encuen-

tran en un jarabe, la proporciona el procedimiento de Widtsoe y Tollens ⁽⁷³⁾: se lleva a un portaobjetos un poco del jarabe separado y se siembran cristales del azúcar buscado (observando con microscopio), para ver si desaparecen o aumentan, lo que indicaría que existe en el jarabe esta especie, y entonces se completa la determinación con las reacciones correspondientes.

Si hubiese azúcares reductores al lado de otros no reductores, fácil es determinarlos (pág. 212). La presencia de maltosa junto a otras se pone de manifiesto con el reactivo de Barfoed, acetato de cobre y una solución neutra de carbonato básico de cobre en sal de Seignette: dextrosa y levulosa a la ebullición, quedando intacta la maltosa que se determina con otros reactivos que no alteran la sacarosa.

Si se obtiene por calentamiento con resorcina y ácido sulfúrico una coloración roja, habrá levulosa o un cuerpo combinado con ella, del mismo modo que si por acción de HNO_3 se formase ácido sacárico, habría dextrosa o un compuesto de ella. Esta oxidación se hace en baño maría ⁽⁷⁴⁾ donde se evapora el azúcar con HNO_3 , $d = 1.15$; la solución acuosa del residuo se neutraliza en caliente con carbonato alcalino y agregando ácido acético se separa el sacarato potásico ácido formado, purificando éste por cristalización. Para ulteriores identificaciones del ácido se prepara la sal argéntica, neutralizando con amoníaco el sacarato ácido y precipitando con NO_3Ag .

No conviene recurrir a reacciones de identificación en mezclas: es mejor tratar de separar los azúcares llevándolos a compuestos definidos, de los cuales luego se regenerarán.

Una separación de la sacarosa de otros azúcares se obtiene por medio del $\text{Sr}(\text{OH})_2$ ⁽⁷⁵⁾. La solución alcohólica de la mezcla se hierve 30' con una solución acuosa saturada del $\text{Sr}(\text{OH})_2$ y el ppdo. se lava con alcohol y se enjuga entre papel de filtro; se hierve entonces con solución de estronciana 30' y el líquido caliente se filtra en filtro baño maría; el ppdo. es prensa-

do entre papel de filtro y para quitarle el agua madre se suspende en agua y se satura con CO_2 ; el líquido se evapora, se toma con alcohol y se hace cristalizar.

Habiendo dextrosa y levulosa con la sacarosa, ⁽⁷⁶⁾ ésta se aísla por ebullición con $(\text{HO})_2\text{Ca}$, se filtra el líquido frío, se satura con CO_2 , se filtra, se evapora, se redisuelve y se lleva a cristalización.

La dextrosa y la levulosa se separan por su acción con la cal cáustica ⁽⁷⁷⁾, dando la levulosa un compuesto muy poco soluble en agua: a la solución de la mezcla (10 %) se agrega $\text{Ca}(\text{OH})_2$ de modo que haya 6 partes de ésta por 10 de azúcar, se agita la mezcla y se espera a que el compuesto de levulosa se separe sin dejar de agitar.

Las reacciones clásicas con el clorhidrato de fenilhidrazina son de gran utilidad ⁽⁷⁸⁾.

Para separar dextrosa y levulosa sirve muy bien la β -naftilhidrazina ⁽⁷⁹⁾: 4 g. de la mezcla de azúcares en 4 g. de H_2O se vierten en 50 cm^3 de alcohol a 96 % conteniendo 4 g. de β -naftilhidrazina; después de algunos días, durante los cuales se agitará de tiempo en tiempo, se separa la dextrosa β -naftilhidrazona que se filtra y se lleva a cristalizar, fundiendo a 117° ; el líquido se evapora en el vacío sobre H_2SO_4 y el residuo se trata con cloroformo, donde cristaliza la levulosa β -naftilhidrazona la cual funde a 161° .

Para determinar glucosa al lado de levulosa se utiliza la acción de la difenilhidrazina formándose la hidrazona de la dextrosa ⁽⁸⁰⁾ que funde a 162° , así como la dextrosabenzhidrazida que funde a $171-172^\circ$ ⁽⁸¹⁾ que se forma cuando se calientan los dos componentes en presencia de alcohol 6 h. con refrigerante de reflujo; esta dextrosabenzhydracida se descompone en dextrosa y benzhydracida por el agua, transformándose esta última en un compuesto insoluble por medio de la benzaldehida. La levulosa se caracteriza por medio de la osazona que produce con hidrazinas secundarias asimétricas ⁽⁸²⁾ y que las aldosas no dan.

De las hidrazonas la benzilfenilhidrazona ⁽⁸³⁾ proporciona compuestos cristalinos, empleando una solución en alcohol absoluto de la benzilfenilhidrazina sobre una solución concentrada del azúcar; de las hidrazonas se obtienen los azúcares primitivos por medio del formol o de la benzaldehida. Usando formol, se disuelve 1 g. de hidrazona en 2-3 cm³ de solución caliente de formol a 30-40 % y se calienta en baño maría; la mezcla se enturbia y se separa la hidrazona del formol como un aceite pesado que se elimina por el éter; el resto del formol se elimina por evaporación y si hubiese algo de metaformaldehido se separa por disolución del jarabe en alcohol absoluto.

En el mismo caso se halla esta hidrazona para ser desdoblada por medio de la benzaldehida. ⁽⁸⁴⁾

Si se han aislado los azúcares en estado de suficiente pureza, se determinan sus principales propiedades y se comparan con las de azúcares conocidos. De especial valor son: forma cristalina, acción del acetato cúprico y de la solución cúprica alcalina, capacidad de fermentación, acción sobre la luz polarizada, acción del HCl, HNO₃, e hidrazina, en particular la fenilhidrazina, y puntos de fusión de los derivados, sirviendo la última como reactivo de evaluación, pues la cantidad de osazonas formadas depende directamente de la cantidad de azúcares. ⁽⁸⁵⁾

Como reacciones específicas merecen citarse:

Sacarosa:

- a) Solución azúcar + algunas gotas solución ácido arsénico $\rightarrow$ en baño maría color rojo $\rightarrow$ púrpura (Maumené) ⁽⁸⁶⁾;
- b) Como los cuerpos conteniendo levulosa, da rojo calentando con ácido clorhídrico y resorcina y amarillo rojizo calentando con ácido clorhídrico y floroglucina;
- c) Del mismo grupo levulósico depende la coloración rosa que se produce si 0.1 de sacarosa se disuelve en 10 cm³ HCl concentrado y se agita con 20 cm³ de aceite de sésamo;

- d) Por inversión da dextrosa y levulosa;
- e) Es dextrógira.

Dextrosa:

- a) Dextrosa + $\text{HNO}_3 \Rightarrow$ ácido sacárico;
- b) Dextrógira;
- c) El compuesto cálcico es soluble en agua;
- d) Da color rojo con resorcina o floroglucina y HCl ;
- e) Reduce solución alcalina de cobre, bismuto y mercurio.

Levulosa:

- a) Levulosa + $\text{HNO}_3 \Rightarrow$ no da ácido sacárico;
- b) Es levógira;
- c) La combinación cálcica es muy poco soluble;
- d) Con resorcina y floroglucina + HCl como sacarosa;
- e) Igual poder reductor que dextrosa;
- f) Da como sacarosa las reacciones a) y c).

Maltosa:

Se comporta como la dextrosa. Además da productos de descomposición con invertina o reactivo de Barfoed.

Mannita:

- a) Mannita + $\text{HNO}_3 \Rightarrow$ ácido sacárico;
- b) Es dextrógira;
- c) No da reducción alguna;
- d) Agitada con benzaldehida y HCl o H_2SO_4 da benzacetal⁽⁸⁷⁾ insoluble en H_2O , alcohol frío, ácidos y álcalis.

Inosita:

- a) Ópticamente inactiva; no reduce solución alcalina de cobre ni da con álcalis o ácidos productos como las otras;
 - b) Solución concentrada + 5 gotas nitrato mercúrico + calor $\Rightarrow$ rosa rojo obscuro $\Rightarrow$ en frío ppdo. incoloro (Gallois).⁽⁸⁸⁾
 - c) Inosita + HCl + $\theta \Rightarrow$ Res. + NH_3 o acetato sódico + $\text{Cl}_2\text{Ba} \Rightarrow$ rosa rojizo (Scherer-Séidel).⁽⁸⁸⁾
- Los métodos cuantitativos se verán son detalles en

los tratados de König, de Beythien, Hartwich y Klimmer o en el de E. O. von Lippmann «Die Chemie der Zuckerarten» o en el de Landolt «Das optische Drehungsvermögen organischer Substanzen».

II. Gomas y sustancias similares. Son casi siempre sales cálcicas o magnésicas del ácido arábínico. Cuando se precipita el ácido arábínico de sus soluciones acuosas con ácido clorhídrico o con alcohol, se transforma por desecación en una modificación insoluble que sea libre o en forma salina se presenta también en el mundo vegetal, acompañando a la forma soluble. Por álcalis débiles como la cal o la barita, estas modificaciones insolubles se solubilizan.

Para precipitar de las soluciones acuosas las gomas, se emplea el acetato de plomo que arrastra las impurezas y el subacetato que precipita las gomas; este precipitado se descompone con H_2S , produciéndose un sulfuro difícil a veces de separar de las gomas. Por eso se evita, siempre que es posible, el método del plomo, tratando de usar el alcohol como precipitante, pues aún en alcohol diluído las gomas son difícilmente solubles.

Para preparar en estado de pureza la parte orgánica de las gomas, se disuelve de nuevo las gomas en poca agua, se agrega HCl , se precipita de nuevo con alcohol, repitiendo estas operaciones hasta que el precipitado quede libre de sustancias minerales. Para tal fin, la diálisis es un poderoso auxiliar.

Las gomas se distinguen muy poco entre sí por sus propiedades, comportándose del mismo modo con los precipitantes siendo amorfas y no dando compuestos cristalinos; por lo cual es muy difícil determinar sus componentes y se recurre para ello a procedimientos de hidrólisis con ácido clorhídrico o sulfúrico y de oxidación con ácido nítrico. El mismo camino habrá que seguir al querer estudiar los mucílagos, los cuerpos pécticos y los constituyentes de membranas.

Si una de estas gomas da por oxidación ácido sacárico, puede decirse que la dextrosa entra en su cons-

titución, del mismo modo que si el ácido fuese el místico, difícilmente soluble en agua, se diría que un resto de galactosa se hallaba presente en la molécula del complejo.

Para determinar y caracterizar el ácido místico (⁸⁹). Tollens propone el medio siguiente: 5 gramos de azúcar se tratan en un vaso con 60 cm³ de HNO₃ (d=1.15), teniendo aquél 5.7 cm. de diámetro para que el líquido llegue a 2.5 cm. de altura y se calienta en baño maría hasta que el líquido se evapore de modo que solo llegue a 8.9 mm. de altura; la masa evaporada se agita al día siguiente con 10 cm³ de agua, se filtra después de 24 horas a través del filtro seco a 100°, se lava con 25 cm³ de agua, se seca y se pesa. El punto de fusión del ácido místico es 211-212° y como la galactosa da por oxidación el 75 % de ácido místico, fácil es calcular aproximadamente la proporción de aquélla por el rendimiento de ácido obtenido.

Los cuerpos de que nos ocupamos pasan por la acción de los ácidos en caliente al estado de azúcares. Estas se distinguen por ulterior acción de los ácidos: así de las hexosas y verdaderos azúcares se llega al ácido levulínico, de las pentosas al furfuro, así como también de las oxixelulosas de muchas membranas (⁹¹) y de las metilpentosas se obtiene metilfurfuro.

Además de la dextrosa y levulosa pueden encontrarse otros azúcares entre los productos de hidrólisis de gomas, mucílagos, etc., como la mannos, la galactosa, la arabinosa y la xylosa.

La mannos no tiene reacciones características: su identificación depende de la obtención de su hidrazona (⁹⁰) que funde entre 195-200° y que se obtiene ya en frío poniendo la mannos en presencia de la fenilhidrazina. Es dextrógira.

También la galactosa carece de reacciones especiales; es levógira y su transformación por los oxidantes en ácido místico deberá tenerse en cuenta.

Un compuesto característico de la xylosa merece citar-

se: el bromoxylonato de cadmio insoluble en alcohol ⁽⁹²⁾. Se obtiene tratando 5 gramos del jarabe investigado con 15 gramos de agua, 6 gramos de carbonato de cadmio y 3 gramos de bromo, calentando después por 20 horas y filtrando en caliente; del filtrado concentrado se separan, por adición de alcohol, cristales en forma de navecillas.

Las reacciones cromáticas que se fundan en la formación de furfurool, son las mismas para la arabinosa y la xylosa; entre ellas está la reacción del ácido clorhídrico con la orcina: el líquido en frío es azul violado, por el calor es rojizo y luego violeta azulado, formándose al fin copos azul verdosos. Con floroglucina o anafitol y ácido clorhídrico se producen colores rojizos.

Las propiedades ópticas de las fenilosazonas ⁽⁹³⁾ de la arabinosa y la xylosa son diferentes: mientras que una solución alcohólica al 4 % de la xylosa fenilosazona desvía 10.3 la luz polarizada a la izquierda en tubo de 100 mm., el compuesto de la arabinosa no da este resultado.

Con para bromo fenilhidrazina ⁽⁹⁴⁾ da solo la arabinosa un compuesto insoluble (hidrazona), si a una solución de la pentosa a 1 % se agrega una mezcla de

Hidrazina.	1
Acido acético 50 %	3.5
Agua	12

hasta que haya para 1 parte de arabinosa 2 partes de la hidrazina. En los *Ber. der D. chem. G.* XXXV (1902), II parte 1843 hay una marcha para separar galactosa, arabinosa y dextrosa.

Una separación de la xylosa y la arabinosa se obtiene con la β naftilhidrazina ⁽⁹⁵⁾; procediendo como antes (pág.) se hace cristalizar la arabinosa— β naftilhidrazona que funde entre 176-177° en tanto que el componente análogo de la xylosa funde a 124° y puede obtenerse del agua madre

Para reconocer el ácido levulínico ⁽⁹⁶⁾ se calienta la substancia a investigar, en baño maría 20 horas con ácido clorhídrico a 20 %, en vaso con refrigerante de reflujo; se filtra luego y se agita el filtrado cuatro veces con un volumen igual de éter: de esta solución etérea evaporada se consigue un residuo que calentado en estufa de vapor $\frac{1}{2}$ -1 hora, se trata en pequeña cantidad con iodo y soda para formar iodoformo. Si esto se produjese (en caso contrario no habría ácido levulínico) se disuelve el residuo del éter en agua, se digiere con óxido de zinc y se lleva, después de decolorar con negro, este levulato de zinc hasta formar cristales por evaporación; se redisuelven estos y se precipita la solución con nitrato argéntico para formar los cristales característicos del levulato argéntico.

La formación de furfurool y metilfurfurool se comprueba ⁽⁹⁷⁾ en los destilados que se producen, calentando la substancia con ácido clorhídrico de densidad 1.06. El destilado que aparece amarillo con acetato de anilina si solo hay metilfurfurool es rojo con furfurool. Con floroglucina y ácido clorhídrico, da el furfurool un precipitado verde negruzco y el metilfurfurool un precipitado rojo. Uno y otro pueden distinguirse también con el procedimiento de Widtsoe y Tollens modificado por Maquenne ⁽⁹⁷⁾: se mezclan tres volúmenes de alcohol a 95 % con un volumen de ácido sulfúrico y a 5 cm³ de tal mezcla se agrega unas gotas de destilado: se produce un color verde obscuro que da un espectro de absorción formado por una banda entre el verde y el azul.

Con fenilhidrazina dan los furfuroles precipitados casi insolubles. Con acetato de xylidina dan coloraciones semejantes a las engendradas por el acetato de anilina.

Métodos cuantitativos para el furfurool y por tanto para las pentosas y pentosanas existe el de Tollens y sus colaboradores ⁽⁹⁸⁾ así como el de Stone ⁽⁹⁹⁾, siendo de aconsejar la consulta de König en su tratado clásico, volumen III, 2ª parte.

III. A las gomas se vinculan algunos cuerpos de na-

turalaleza mucilaginosas, más o menos solubles en agua, de los cuales algunos solo se hinchan en este líquido como la basorina y los cuerpos pécticos.

La obtención de éstos por el acetato de plomo se funda en que precipitan con esta sal, prefiriéndose la solución en agua caliente y la precipitación con alcohol. Algunos mucílagos pueden ser privados de sales en sus soluciones como se hizo con las gomas.

Para obtener los amiloides que en semillas de leguminosas y de *Tropaeolum majus* se encuentran, se extraen estos materiales con éter, alcohol caliente, amoníaco diluído y soda al 1 % fría; se lava entonces el residuo con agua y se disuelve el amyloide en este líquido, en caliente, de donde por el alcohol se precipita luego. El amiloide se tiñe de azul con el iodo.

El glucógeno que en muchos hongos existe, da soluciones opalescentes que con ácido acético o soluciones de potasa se clarifican y precipitan con alcohol; se tiñen con iodo en rojo hasta pardo y da por hidrólisis, dextrosa.

La inulina se extrae de muchas compositáceas, en sus órganos subterráneos, tratándolos previa adición de carbonato cálcico, con agua caliente. El extracto se deja en reposo para que se clarifique, se filtra y se evapora hasta que la inulina comience a separarse; conviene previamente precipitar con subacetato los mucílagos, eliminar el plomo residual con H_2S , expulsar éste con CO_2 y después de neutralizar CO_3Ca evaporar para separar la inulina. Redisolviendo en agua caliente y reprecipitando por enfriamiento, se consigue con bastante pureza si se lava con alcohol y éter. Para mayor purificación, se aprovecha la propiedad de la inulina de precipitar con agua de barita. Por hidrólisis da levulosa. Su evaluación se hace de acuerdo con el método indicado en *Zeitschrift für Nahrungs-und Genussmittel*, 1902, pág. 81.

De la presencia de almidón el microscopio da indicación segura y rápida. Su insolubilidad en agua fría, la formación de engrudo en caliente, su solubilización por ácidos y álcalis deben tenerse en cuenta. Para ob-

tenerlo de las plantas ricas, se utilizan métodos mecánicos, lavando con agua fría los órganos que lo contienen, reposando estas suspensiones, lavando de nuevo varias veces y desecando el sedimento a baja temperatura. Su evaluación se efectúa por métodos ya clásicos. ⁽¹⁰⁰⁾, ⁽¹⁰¹⁾, ⁽¹⁰²⁾.

Aunque no tan difundida como el almidón se encuentra también la xylana, goma de madera, que en agua fría da líquidos opalinos y es soluble en caliente. Para obtenerla se agota el material con amoníaco a 1-2 %, se lleva a forma soluble con solución de soda y se precipita con alcohol; para purificarla se lava con alcohol acidulado y alcohol etéreo. Con subacetato precipita y por hidrólisis produce xylosa.

IV. A este grupo pertenecen las modificaciones insolubles de las gomas, que se solubilizan con álcalis y que en tal estado se comportan como las gomas solubles.

En el mismo grupo se colocan algunos constituyentes de membranas como mannana, pentosana y hemicelulosas. Estas no pueden distinguirse de los demás porque sean insolubles en álcalis, pues los cuerpos de los grupos próximos son también algo solubles, complicándose aquí la interpretación de los resultados por las materias incrustantes que contienen.

La mannana se halla en muchas semillas y engendra por hidrólisis, junto con otros azúcares, mannosa, que se caracteriza por su hidrazona; los cuerpos que en la bibliografía se designan con el nombre de mannana no parecen ser idénticos.

Las hemicelulosas son solubles en soluciones de soda a 5 % y como los demás miembros del grupo, precipitan por adición de ácido clorhídrico y alcohol, de estos líquidos. Se hidrolizan con ácidos diluidos dando azúcares como glucosa, galactosa y xylosa.

A las hemicelulosas se ligan las pentosanas en sus caracteres generales. Por hidrólisis engendran pentosas y gran cantidad de furfurol y metilfurfurol que sirven para su caracterización y evaluación (pág. 308).

V. Este grupo está formado por las oxixelulosas ¹⁰³ producidas por oxidación de las celulosas y que en los vegetales también se encuentran. Reaccionan con sales de fenilhidrazina a temperatura ordinaria, formando coloraciones amarillas que se intensifican a 70°, se tornan rojas por fucsina decolorada con SO₂, reducen soluciones alcalinas de cobre y dan furfurool con HCl. Se disuelven en H₂SO₄ d=1,5 saturado de HCl gaseoso y que se obtiene mezclando

H ₂ SO ₄	52 cm ³
HCl	23 „
H ₂ O	25 „

VI. Las sustancias que quedan después de tratar las membranas con soda al 5 %, son la celulosa y una parte de la lignina (fuera de algunas pentosanas).

La separación de la lignina y la celulosa se hace según Hoffmeister ¹⁰⁴ con óxido de cobre amoniacal, el reactivo de Schweizer, que disuelve la celulosa: por evaporación del líquido a sequedad, eliminación del cobre por HCl y HNO₃ muy diluidos, y lavado del residuo con amoníaco, alcohol y soda, se consigue la celulosa, aunque todavía con pentosanas.

El procedimiento de König ¹⁰⁵ proporciona celulosa libre de pentosanas: 3 gramos de sustancia + 200 cm³ de glicerina (d=1,23) con 2 % de ácido sulfúrico, se hierven con refrigerante de reflujo a 133-135° o en autoclave se mantienen 1 hora a 137°. La masa enfriada se trata con agua, se hierve de nuevo, se filtra en caliente y se lava con agua caliente, alcohol caliente y una mezcla de alcohol y éter hasta que el filtrado pase incoloro. El residuo da con agua oxigenada y amoníaco celulosa sin lignina que es oxidada y eliminada.

Celulosa pura da por el H₂SO₄ en caliente glucosa; se disuelve en óxido de cobre amoniacal y precipita con ácidos.

Los métodos cuantitativos son clásicos.

COMPONENTES INORGANICOS

Casi siempre se recurre a la incineración para determinarlos. Sin embargo por tal medio no se puede conocer su estado inicial en la planta y algunos se pierden como el amoníaco y los nitratos por completo, otros parcialmente como los cloruros al calentarse con sílice, los fosfatos en presencia de carbón al rojo.

Los álcalis y metales alcalino-terrosos que formaban sales orgánicas aparecen como carbonatos; el ácido sulfúrico y el fosfórico determinados antes de incinerar permiten establecer el azufre y el fósforo orgánicos.

También en las cenizas se hallan a veces sulfuros y cianuros que no se hallaban en los vegetales incinerados.

Si se quiere tener una noción más exacta del estado de estos elementos en la planta, debe investigarse los extractos preparados con agua y ácido clorhídrico diluido de acuerdo con los métodos de química analítica y luego el residuo desecado se incinera y se analiza.

Los métodos de incineración son clásicos, salvo el caso de emplear el dispositivo de Schuttlesworth y Tucker ¹⁰⁶.

En lugar de incinerar se puede destruir la materia orgánica con H_2SO_4 y NO_2H ¹⁰⁷. La evaluación de los elementos constitutivos de las cenizas no ofrece dificultad especial ¹⁰⁸ y solo citaremos dos reacciones que generalmente no se indican.

1. Para el magnesio, se emplea una solución de potasa teñida de amarillo con iodo que dará un precipitado pardo o pardo rojizo (Schlagdenhauffen).

2. Para el cobre se extrae la planta incinerada con ácido clorhídrico y clorato potásico, se elimina el cloro y el ácido por evaporación y se agrega algunas gotas de una solución neutra de tintura de guayaco con ácido cianhídrico (mejor solución alcohólica de ácido guayacónico) o solución de alofna: en el primer caso no se obtiene una coloración azul si hay cobre y en el segundo no hay coloración roja no habiendo cobre.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Archiv der Pharmazie 1903, p. 589.
- (2) Journal de Pharmacie et de Chimie 1901, p. 481.
- (3) Zeitschrift für analytische Chemie XXIX (1900), p. 1.
- (4) Arch. d. Pharm. 1902, p. 59.
- (5) " " " 1897, p. 152.
- (6) van Rijn, Die Glykoside. Berlin, 1900, p. 7.
- (7) Arch. der Pharm. 1902, p. 596.
- (8) " " " 1902, p. 61.
- (9) Annalen der Chemie 1883, p. 231.
- (10) G. Dragendorff. Die quantitative und qualitative Analyse von Pflanzen und Pflanzenteilen. Gottingen, 1882, p. 65.
- (11) Arbeiten aus dem pharmakologischen Institut der Universität Dorpat VI, p. 43.
- (12) Ber. der D. chem. G., XXXIV (1901) II, p. 2402.
- (13) " " " XXXVI (1903), p. 1126.
- (14) Benedikt-Ulzer, Analyse der Fette und Wachstern. Berlin 1903, p. 269.
- (15) Arch. d. Pharm. 1898, 367.
- (16) Ber. d. D. G. XI (1878) I, p. 46.
- (17) Journ. f. praktische Chem. LXVI, p. 1.
- (18) Zeitsch. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel 1899, p. 1.
- (19) Idem.
- (20) Benedikt Ulzer, 165.
- (21) Ferié, Zur Kenntnis der Fette. Dissertation. Bonn 1903.
- (22) Benedikt Ulzer, p. 81.
- (23) " " p. 170.
- (24) " " p. 172.
- (25) " " p. 211.
- (26) " " p. 186.
- (27) " " p. 288.

- (28) „ „ p. 231.
- (29) „ „ p. 230.
- (30) „ „ p. 221.
- (31) „ „ p. 240.
- (32) „ „ p. 475.
- (33) „ „ p. 244.
- (34) „ „ p. 245-246.
- (35) „ „ p. 241.
- (36) „ „ p. 248.
- (37) Ber. d. D. chem. G. XXIV (1891) I, p. 71.
- (38) Hoppe Seyler, Handbuch der physiologisch-und pathologisch-chem. Analyse 6ª edición, p. 86.
- (39) Gildemeister y Hoffmann, Die ätherischen Öle. Berlin 1899.
- (40) Ann. der Chemie 239 (1887), p. 3.
- (41) „ „ „ „ „ p. 4.
- (42) „ „ „ „ „ p. 3.
- (43) „ „ „ 245 (1888), p. 245.
- (44) „ „ „ „ „ p. 253.
- (45) Archiv. der Pharmazie 1902, p. 149.
- (46) „ „ „ 1892, p. 187.
- (47) „ „ „ 1902, p. 202.
- (48) „ „ „ 1893, p. 43.
- (49) „ „ „ 1895, p. 540.
- (50) „ „ „ 1895, p. 209.
- (51) „ „ „ 1896, p. 401.
- (52) Zeitschr. f. anal. Ch. 11, p. 365.
- (53) Arch. d. Pharm. 1891, p. 123.
- (54) E. Schmidt, Lehrbuch der pharm. Chemie 1896 II, p. 1210.
- (55) Z. f. anal. Ch. 25, p. 121.
- (56) Real Enzyklopädie der ges. Pharm. 1888, vol. IV, p. 582.
- (57) Z. f. anal. Chem. 42, p. 734.
- (58) Archiv. der Pharm. (1874) 205, p. 97.
- (59) Z. f. anal. Chem. 41, p. 77.
- (60) „ „ „ 41, p. 94.
- (61) „ „ „ 30, p. 620.
- (62) Arch. d. Pharm. 1903, p. 479.
- (63) Jahresbericht der Pharmazie 1900, p. 237.
- (64) Z. f. Untersuch. d. N. u. G. 1901, p. 49.
- (65) Arch. d. Pharm. 1903, p. 479.
- (66) K. Weiss, Über die Eiweisstoffe der Leguminosensamen, Munich 1899
- (67) Z. f. phys. Chemie 1, p. 206.
- (68) Journ. f. prakt. Ch. 19 (1879), p. 332.
- (69) Landwirtschaftliche Versuchsstationen 48 (1897), p. 33.
- (70) Z. f. phys. Chemie 24 (1898), p. 178.
- (71) Ber. d. D. chem. G. 31 (1898) I, p. 1130.
- (72) Arbeiter etc: de Dorpat III, p. 79.

- (73) Ber. d. D. chem. G. 33 (1900) I, p. 135.
- (74) Ann. der Chemie 249 (1888), p. 219.
- (75) Landwirtschaftliche etc. 24 (1887), p. 408.
- (76) Chr. Th. Barfoed, Lehrbuch, der organischen qualitativen Analyse
Copenhagen 1881, p. 211.
- (77) E. O. von Lippmann, Die Chemie der Zuckerarten 1895, p. 431.
- (78) Ber. d. D. chem. G. 17 (1884) I, p. 579.
- (79) " " " 35 (1902) IV, p. 445.
- (80) Ann. der Chemie 258 (1890), p. 244-258 (1890, p. 244.
- (81) Ber. d. D. chem. G. 28 (1895) I, p. 160.
- (82) " " 35 (1902) I, p. 959 III, p. 2626.
- (83) " " 32 (1899) III, p. 3236.
- (84) Ann. der Chemie 288 (1895), p. 245.
- (85) C. R. 112, p. 799.
- (86) E. O. von Lippmann (77), p. 780.
- (87) C. R. 107, p. 910.
- (88) R. Tollens, Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate 1888, p. 256.
- (89) Ann. der Chemie 232 (1886), p. 186.
- (90) Ber. d. D. chem. G. 20 (1887) I, p. 832 y 21 (1888), p. 1806.
- (91) " " " 27 (1894) I, p. 1062.
- (92) " " " 35 (1902) II, p. 1460.
- (93) " " " 23 (1890) I, p. 385.
- (94) " " " 27 (1894) II, 2491.
- (95) " " " 35 (1902) I, p. 445.
- (96) Ann. der Chemie, 243 (1888), p. 314.
- (97) Ber. d. D. chem. G. 33 (1900) I, p. 143.
- (98) " " " 24 (1891) III, p. 3581.
- (99) " " " 24 (1891) III, p. 3019.
- (100) Z. f. and. Chemie 24, p. 617; 29, p. 473.
- (101) Forschungsberichte über Lebensmittel etc. 1895, p. 73.
- (102) Z. f. Unters. d. Nahrungs. etc 1904 (2), p. 65.
- (103) Ber. d. D. chem. G. 26 (1893) III, p. 2520; 27 (1894) I, p. 1563.
- (104) Landwirt. etc. 1898, p. 347.
- (105) Z. f. Unters. d. Nahrungs. etc. 1903 (17), p. 769.
- (106) B. der D. chem. G. 1889 (32) III, p. 2583.
- (107) Z. f. anal. Chemie 43, p. 14.
- (108) U. a. Fresenius, Anleitung zur quantitativen chemischen Analyse
6. ed. vol. II, p. 632.

Esta traducción se terminó el 26 de Mayo de 1920.

E. H. D.