

## Tesis de Posgrado

# Investigación de clorofila natural y clorofila comercial en aceites comestibles

Türk, Ernesto F.H.

1935

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Türk, Ernesto F.H.. (1935). Investigación de clorofila natural y clorofila comercial en aceites comestibles. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0206\\_Turk.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0206_Turk.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Türk, Ernesto F.H.. "Investigación de clorofila natural y clorofila comercial en aceites comestibles". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1935. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0206\\_Turk.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0206_Turk.pdf)

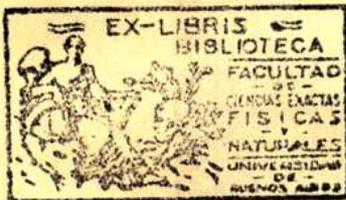
TESIS

Investigación de clorófila natural y clorófila comercial

en aceites comestibles.

por

Ernesto F. H. Türk



No. 206

Buenos Aires

1936

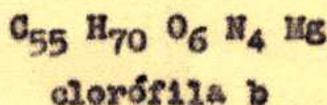
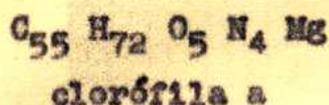
Investigación de clorófila natural y clorófila general  
en aceites comestibles.



1.- Reseña sobre las características de la clorófila.

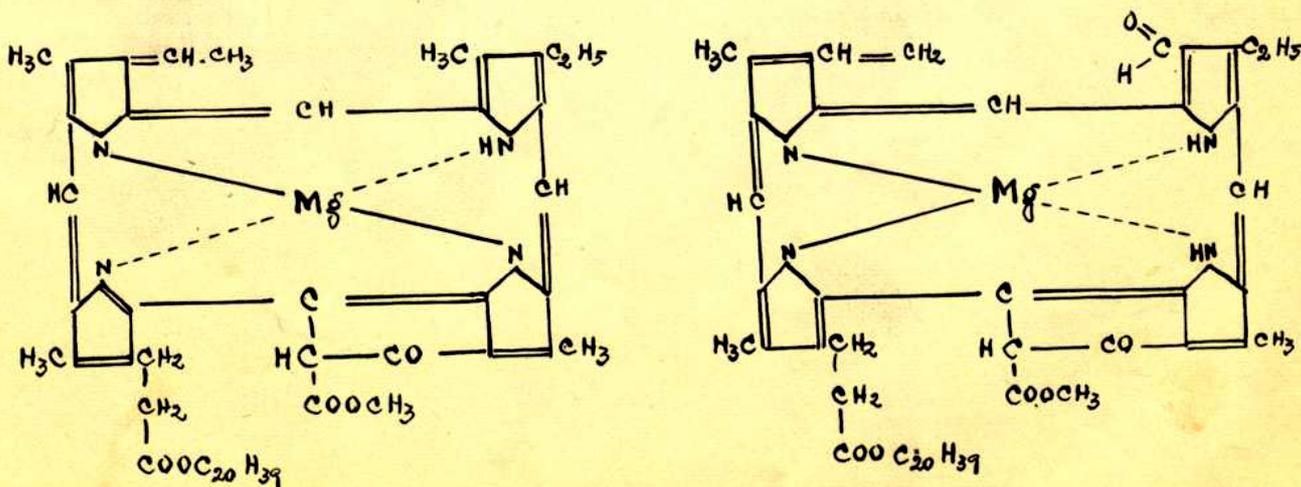
La compleja estructura de la molécula de clorófila dificultó su estudio a tal punto que aún no se logró demostrar en forma definitiva cual es la fórmula que le corresponde.

Willstätter y Stoll, y más tarde H. Fischer, realizaron durante años investigaciones con ese objeto. En 1910 Willstätter demostró que la clorófila está constituida por una mezcla de dos componentes químicamente muy semejantes, que llamó clorófilas a y b, separables por procedimientos basados en que los sólidos las adsorben en distinto grado. Tienen por fórmula



En cuanto a sus funciones químicas, posee la molécula dos funciones ácidas esterificadas, con alcohol metílico  $CH_3 OH$  una de ellas y con fitol  $C_{20} H_{39} OH$  la otra; además una función cetona permite a la molécula tomar estructura enélica en medio alcalino. Cuatro núcleos pirrólicos sustituidos y un átomo de magnesio coordinado con ellos, forman el esqueleto de esta compleja estructura.

Las fórmulas de estructura más probables de las clorófilas a y b según H. Fischer (1935) son las siguientes:



(a)

(b)

La clorófila aislada y pura es estable, pero obtenida de los vegetales mediante disolventes, que siempre disuelven también otros productos, se altera fácilmente. Así, su solución alcohólica se alomeriza al cabo de pocos días, cambiando su color verde brillante primitivo al pardo. Este fenómeno puede impedirse por agregado de una muy pequeña cantidad de ácidos orgánicos a la solución.

Existe en los vegetales una enzima, llamada clorofilasa, que separa el fitol de la molécula, el cual es reemplazado por el alcohol en que se encuentra en solución la clorófila (alcohol metílico o etílico). Contienen cantidades sumamente pequeñas de esta enzima la gramilla, el plátano y la ortiga, por lo cual se emplea de preferencia estos vegetales, y especialmente el último, para la preparación de soluciones de clorófila.

Cuando el grupo fitol de la clorófila es reemplazado por el alcohol disolvente, se obtienen ésteres metílicos o etílicos que se denominan clorofilidas. La clorófila cristalizada es la clorofilida etílica; se emplea como tipo en varios métodos colorimétricos de dosaje de clorófila.

Los álcalis saponifican los grupos metilo y fitol dando isoclorofilinas. La estructura admitida para la isoclorofilina proveniente de la clorófila 2 es la siguiente



Por acción de los ácidos la clorófila pierde el átomo de magnesio, denominándose feofitina la molécula resultante. Se observa fácilmente que se produce una modificación en la molécula si se añade a una solución alcohólica o etérea que presente el intenso color verde característico, un ácido; inmediatamente se produce un viraje al verde oliva pardusco, debido a la pérdida del magnesio y transformación en feofitina.

Todos los productos de transformación debidos a la acción de los disolventes, los álcalis o los ácidos que hemos nombrado,

Presentan fluorescencia roja observados a la luz ultravioleta, no diferenciándose en este sentido de la clorófila misma, lo cual hacemos notar aquí por basarse nuestras investigaciones en las distintas propiedades fluorescentes de las clorófilas naturales y comerciales.

## 2.- Métodos de investigación y dosage de clorófila.

Entre los métodos de investigación de la clorófila y sus derivados debemos mencionar en primer término la espectroscopía y espectrografía, mediante las cuales se logró caracterizar los distintos productos de degradación obtenidos de la clorófila, por sus diferentes espectros de absorción.

El estudio de la fluorescencia provocada por la luz ultravioleta y especialmente la espectrografía de la luz emitida, han sido de gran utilidad en la determinación de estructuras. La característica fluorescencia roja es un excelente medio para reconocer cualitativamente la presencia de clorófila, aún en cantidades muy pequeñas.

Los dosajes de clorófila se basan casi exclusivamente en la colorimetría por comparación con soluciones tipo de etilclorofila (clorófila cristalizada), o bien, en la determinación de Omg en las cenizas, pudiéndose calcular la cantidad de clorófila teniendo en cuenta que deja 4,5% de Omg.

El fraccionamiento en sus componentes *a* y *b* puede lograrse mediante el análisis cromatográfico o por acción selectiva de disolventes inmiscibles.

Los productos de la degradación de la clorófila pueden separarse por extracción con soluciones de ácido clorhídrico de distintas concentraciones, las cuales presentan propiedades selectivas. Willstätter denomina "número de ácido" la concentración % del HCl que extrae 2/3 de la cantidad del producto disuelto en éter, al agitar volúmenes iguales del ácido y solución.

El número de ácido es característico de cada producto.

Existe finalmente una reacción química específica para la clorófila natural inalterada, conocida como "reacción de la fase parda", y que consiste en que una solución etérea de clorófila agitada con OHK al 30% en alcohol metílico, da una coloración parda que al cabo de unos minutos vuelve a virar al verde.

### 3.- Los derivados metálicos de la feofitina de Willstätter.

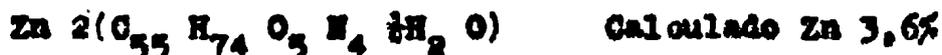
Ya hemos mencionado que la acción de los ácidos sobre la clorófila da lugar a la formación de feofitina, por pérdida del átomo de magnesio.

Los derivados de la clorófila que han perdido su átomo de magnesio se caracterizan por reaccionar fácilmente con los metales pesados, a tal punto, que cuando se los quiere estudiar espectroscópicamente es imprescindible utilizar material de cuarzo para evitar reacción con los metales.

Willstätter y Sjöberg (Z. physiol. Chem. 133, 171, 1924) prepararon los complejos de cobre y cinc de la feofitina. En dicho trabajo afirman los autores que la gran estabilidad que presenta el derivado cúprico a la acción de ácidos, álcalis y la luz, se aprovecha industrialmente en la clorófila comercial, que es una solución en materias grasas de la cobre-feofitina.

Para la preparación de sus derivados metálicos Willstätter y Sjöberg utilizan feofitina pura, que disuelven en cloroformo, agregando ácido acético glacial y eliminando el cloroformo por vacío. A la solución acética de feofitina así obtenida, añaden soluciones de acetato de cinc e acetato de cobre y precipitan el complejo metálico formado por dilución con agua. El producto obtenido lo purifican redisolviéndolo en ácido acético glacial y precipitando nuevamente con agua.

Obtienen así compuestos con un contenido de cinc que oscila entre 3,45 - 3,75% que corresponde a un átomo de cinc por dos moléculas de feofitina, cuya composición sería



Es una sustancia de color azul negruzco, de constitución cerosa, que en solución presenta un intenso color verde y fluorescencia roja.

El derivado de cobre contiene por cada átomo metálico una molécula de feofitina.



También es de aspecto ceroso, azul negruzco, y da soluciones de intenso color verde azulado que no presentan fluorescencia.

Es mucho más estable que el compuesto de cinc frente a la acción de los álcalis y ácidos.

#### 4.- Las clorófilas comerciales.

Si bien no se demostró en forma definitiva en trabajos experimentales que las clorófilas comerciales contienen cobre-feofitina, este hecho es generalmente admitido en la bibliografía. La presencia de cobre en todas ellas, la falta de fluorescencia de sus soluciones, y las demás propiedades que las caracterizan indican, evidentemente, que el compuesto al que deben su color es el complejo metálico.

Se obtienen las clorófilas comerciales extrayendo el pigmento verde de vegetales, comúnmente de ortiga desecada y finalmente pulverizada, en extractores industriales de material de cobre, por agotamiento con alcohol etílico de más de 75°. Generalmente se añade al material a extraer una solución de sulfato cúprico concentrada, en el mismo recipiente extractor, cuya capacidad es de unos 100 kg., y en la proporción de 100 g. de la sal por cada 10 kg. del vegetal.

La clorófila extraída por el alcohol pierde en estas condiciones el átomo de magnesio que contiene en su molécula, el cual es reemplazado por uno de cobre, dando así un compuesto mucho más

estable que el original. La solución alcohólica obtenida es sometida a una destilación con objeto de eliminar el disolvente, que se recupera, quedando una solución acuosa de hidratos de carbono y ceras, además de la clorófila cúprica bruta.

Se purifica la misma por una extracción con bencol; el residuo que deja por destilación lo constituyen las ceras y el colorante, denominándose "clorófila pura".

La "clorófila comercial soluble en grasas" es una disolución al 30-40% de la anterior en materias grasas.

La "clorófila soluble en alcohol" es una solución al 50% en aceite de ricino, el cual tiene la propiedad de disolverse en el alcohol.

El color de estas clorófilas es verde azulado, sumamente estable a la acción de la luz, y se utiliza para colorear aceites y jabones, dado que tampoco es alterada por los álcalis.

Se preparan también "clorófilas solubles en agua", las cuales son productos de saponificación de la clorófila tratada con  $\text{OHNa}$ , purificándose al estado de clorófila cálcica insoluble, la que se hace reaccionar con  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  dando así nuevamente clorófila sódica soluble en agua.

La cantidad de cobre presente en las clorófilas comerciales a que nos hemos referido en primer término, puede llegar hasta 1% ; la cantidad del colorante recomendada por sus fabricantes para producir en solución un color verde natural, es de 100 g. por cada 100 kg. de aceite, o sea que un kg. de aceite coloreado contendrá tan solo 0.01 g. de cobre. Esta pequeña cantidad del metal hace que su investigación en un aceite coloreado sea engorrosa pues exige trabajar sobre cantidades grandes de la muestra; por este motivo se desechó este método.

Como la clorófila comercial tiene la característica de no poseer la fluorescencia roja de la clorófila natural, hemos tratado de aprovechar esta propiedad para llegar a su diferenciación en los aceites verdes.

Bibliografía: Ullmann, Enciclopedia de Química Industrial.

### 5.- La presencia de clorófila en aceites comestibles.

#### Características a la luz de Wood de los mismos.

La existencia de aceites coloreados con clorófilas industriales en el comercio y la falta de un método analítico apropiado, fué el motivo que condujo a la realización del presente trabajo. Si bien en los aceites de oliva el color verde puede ser de origen natural, siempre que el mismo no hubiese sido sometido a refinación, se encontraron aceites comestibles de maní y algodón coloreados intensamente de verde, de los cuales algunos presentaban un tono azulado, distinto del verde amarillento de la clorófila natural y semejante al de la llamada "clorófila comercial o industrial, soluble en grasas" utilizada para colorear jabones, velas, resinas, ceras, cosméticos, etc.

En la bibliografía referente al coloreado artificial de aceites comestibles, se encuentra un trabajo de F.M.Scherts "Aplicaciones comerciales de la clorófila y derivados" (Ind. Eng. Chem. 19, 1152, 1927) quien preparó cobre-feofitina y cinc-feofitina de acuerdo al método original de Willstätter y Sjöberg. En las clorófilas comerciales es el primero de los compuestos el que se forma al reemplazarse el magnesio por el cobre, como lo afirman Willstätter y Sjöberg, y Scherts, en los trabajos antes mencionados, y Skogstrom en "Clorófila en sebo" (Canadian Chemistry and Metallurgy 18, 274, 1934.)

Scherts estudió la estabilidad de ambos derivados metálicos de la clorófila frente a la acción de la luz, encontrando que el compuesto de cobre es superior al de cinc. Aceites coloreados con el primero mantenían su color verde brillante después de dos años de exposición a la luz. No solo presenta el compuesto cúprico la ventaja de esa estabilidad que no posee la clorófila natural, la cual se altera dando por tal motivo verdes parduscos, sino que su intensidad tintórea es muy superior. Este hecho fué aprovechado para la revelación analítica de clorófila en tejidos vegetales aparentemente exentos de ella, por S. Hilpert y H.Hofmeister "Investigación y determinación cuantita-

tiva de clorófila en tejidos vegetales". (Ber. 66,1443,1933.) Estos autores calientan en tubo cerrado 0,1 - 0,3 g. del vegetal finamente dividido, con solución acuosa de  $\text{SO}_2$  al 5% y una gota de solución diluida de acetato de cobre, a  $100^\circ \text{C}$  durante 1-2 horas. El  $\text{SO}_2$  tiene por objeto decolorar colorantes amarillos presentes en los vegetales, se forma en estas condiciones, según dichos autores, la cobre-feofitina; se extrae la misma del material filtrado, con acetona al 100%, habiendo eliminado antes por extracción con acetona al 40% los restos del colorante amarillo presentes, realizando la determinación colorimétrica con fotómetro de Pulfrich.

Recientemente J.A. Skogstrom en su trabajo titulado "Clorófila en sebo" (Can. Chem. and Metall. 18, 274, 1934) utiliza también para la investigación cualitativa de clorófila en ese material, el mayor poder tintóreo del derivado cúprico; procede así; el sebo en que se investiga clorófila se funde, calentándolo con acetato de cobre en solución o bien con una lámina de cobre, durante una hora a la temperatura de  $110-115^\circ \text{C}$ .

Cuando existe pigmento verde en el sebo, se produce una intensa coloración. Anteriormente la investigación de clorófila se hacía por saponificación y observando el color del jabón formado. Este método presenta sobre el método de saponificación la ventaja de ser más rápido, pues no exige una saponificación y separación ulterior del jabón. El interés de esta determinación reside en que es indispensable que el sebo destinado a la elaboración de jabones blancos no contenga clorófila, que suele provenir de un contacto del sebo con el contenido del aparato digestivo, al sacarlo del animal, por conferirle al jabón una coloración verde pánfusa que luego no puede eliminarse.

La investigación de la clorófila natural por medios físicos puede realizarse por métodos espectroscópicos, revelándola sus características bandas de absorción de  $6400\text{Å}$  y  $6600\text{Å}$ .

Aunque con menor sensibilidad que el método anterior, es

mucho más sencilla su investigación mediante la luz de Wood; las ultravioleta de longitudes de onda menores de 3650 Å.

Danckwort y Pfau (Apoth. Ztg. 45, 207, 1930) utilizan el siguiente procedimiento para revelar su presencia en tinturas alcohólicas de uso farmacéutico; extraen la clorófila por agitación con éter húmedo, efectuando luego un análisis capilar y observación al ultravioleta.

Zickgraf (Apoth. Ztg. 45, 561, 1930) también recurre a la luz ultravioleta filtrada para diferenciar en productos medicinales la clorófila medicinal de las clorófilas comerciales más baratas usadas en jabonería, aprovechando que la primera posee fluorescencia roja, en tanto que la última carece de ella.

Muy abundante es la bibliografía del comportamiento de los aceites, principalmente de oliva, a la luz ultravioleta. Como una conclusión sacada de todos los trabajos puede afirmarse que todo aceite de oliva refinado presenta una fuerte fluorescencia azul o celeste, en tanto que los aceites vírgenes y de primera presión carecen de ella y dan en cambio fluorescencias amarillo-verdosa o amarillo-anaranjada. (Danckwort: *Lumineszenzanalyse*, 1928; Radley y Grant: *Fluorescence Analysis in ultra-violet light*, 1933.)

P. Croner (Z. angew. Chem. 32, 1032, 1926) encontró que calentando aceites vegetales diversos a temperaturas superiores a 150° C., se producía en ellos una fluorescencia azul al exponerlos a la luz de Wood.

A. G. Nassini y P. De Cori (Ann. Chim. Applic. 12, 46, 1929) observaron que aceites vírgenes de oliva daban fluorescencias amarillas o anaranjadas y que por agregado de 10% de aceite de semilla de sésamo o maní, la fluorescencia resultaba azul. Como en aceites vírgenes era a veces rojiza, pensaron que aceites refinados podrían ser coloreados con clorófila natural para provocar así las características de aceites vírgenes.

Los pigmentos vegetales dan las siguientes fluorescencias: clorófila, roja; caroteno, verde tendiente a amarillo; la xantó-

fila no posee fluorescencia.

Comprobaron que aceites refinados e decolorados con carbón animal, observados al espectroscopio, no daban la banda de absorción roja característica de la clorófila, y su fluorescencia al ultravioleta era azul. Una pequeña cantidad de clorófila y carotinoídes agregada al aceite en solución de sulfuro de carbono, que era luego evaporado, hacía reaparecer las características del aceite vírgen. Ensayaron también clorófilas comerciales encontrando que no eran fluorescentes, y que por lo tanto no podían utilizarse para hacer pasar por vírgen un aceite refinado.

A. Le Roy Giants '(Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 2, 256, 1930) estudió espectroscópicamente aceites de oliva encontrando que la banda roja era causada por la clorófila y que era independiente de la fluorescencia azul del aceite. Por añadido de rocou e carotene, puede provocarse en el aceite la fluorescencia de los vírgenes, siendo confundidos con ellos.

F. Provvedi (Olii minerali, olii grassi, colori, vernici 14, 121, 1934) comprobó observando una serie de aceites de oliva prensados en su presencia, que en todos ellos, sin excepción, faltaba la fluorescencia azul y con solo decolorarlos con carbón animal aparecía. Cita un trabajo de R. Teue (L'Igiene Moderna 2, 166, 1934) que afirma que la fluorescencia azul proviene de las vitaminas del aceite, y que en los de presión la clorófila enmascara la fluorescencia mencionada con la propia. Confirma Provvedi con sus ensayos esta hipótesis.

Los últimos trabajos aparecidos sobre esta cuestión son los de J. Guillet y colaboradores, quienes llegan a conclusiones que, considero, confirman definitivamente todas las observaciones anteriores.

Estudiaron la fluorescencia de aceites de oliva (Ann. Fraudes et Falsif. 28, 75, 1935) y determinaron sus espectros de absorción, comprobando que la fluorescencia emitida por una capa

delgada de aceite virgen posee bandas de absorción con las siguientes características:

fuerte banda azul-violeta	3800 Å - 4600 Å
débil banda amarillo-verde	5100 Å - 5900 Å
intensa banda roja	6400 Å - 6600 Å

En capa más espesa se debilitan las bandas azul y amarillo-verdosa, permaneciendo intensa la roja.

Decolorado con adsorbentes el aceite, desaparece la banda roja, se debilita la amarillo-verdosa, y se intensifica notablemente la azul-violeta.

Deducen de las experiencias expuestas que en los aceites de oliva vírgenes existen agrupaciones capaces de emitir fluorescencia azul, pero también hay pigmentos que preexisten en el aceite virgen o que pueden haber sido agregados a aceites refinados y recolorados, presentando al espectroscopio bandas anaranjadas y rojas que se superponen a las del aceite! Además establecen que los pigmentos (clorófila, xantófila, caroteno, etc.) absorben netamente la fluorescencia azul del aceite mismo. Al modificarse los pigmentos con la edad del aceite, varía su fluorescencia, lo que explica las diferencias que se observan en cuanto al color mencionado por los diversos experimentadores y que figuran en la bibliografía.

La luz de Wood tiene utilidad en la clasificación de aceites de oliva como vírgenes o de presión y refinados, únicamente en el caso de observarse una fluorescencia azul neta. (refinados)

Como se habrá observado, las fluorescencias citadas son amarillo-verdosas a amarillo-pardo, y raras veces anaranjadas o rojizas, no permitiendo reconocer la roja de la clorófila, si no es mediante el espectroscopio.

Los aceites verdes (aceites de oliva y aceites comestibles) estudiados por nosotros, daban en algunos casos una fluorescencia

rosado-violácea en su superficie y amarillo-verdosa en el líquido, en tanto que otras veces superficie y líquido eran azules. La observación directa a la luz ultravioleta no permitía llegar a la diferenciación de clorófila natural y clorófila comercial, agregada para provocar en el aceite el aspecto exterior del aceite virgen o mejorar el color en aceites mal refinados, debido a que la fluorescencia azul propia del aceite cubría la posible fluorescencia roja de la clorófila natural. Ensayos efectuados con aceites de oliva refinados (con fluorescencia azul) a los que se añadía solución etérea de clorófila extraída recientemente de ortiga pulverizada, dejando evaporar el disolvente, nos demostraron la imposibilidad de poder descubrir mediante este procedimiento la clorófila natural, pues solo la presencia de grandes cantidades se revelaba por una fluorescencia anaranjada o rojiza.

En conocimiento de que el nitrobenzeno era empleado para eliminar fluorescencias al efectuar determinaciones de efecto Raman, se nos ocurrió ensayar el efecto producido al añadir a un aceite con intensa fluorescencia azul este compuesto orgánico, comprobando que una pequeña cantidad era suficiente para suprimir totalmente la fluorescencia. El agregado de nitrobenzeno a una solución etérea de clorófila, que presenta fuerte fluorescencia rojo-sangre, en cambio, altera muy poco la misma, oscureciendo algo el tono rojo.

Comprobamos entonces que por añadido de nitrobenzeno a un aceite coloreado por nosotros con clorófila en la forma en que se indicó anteriormente, el color de la fluorescencia original presente en la superficie, violáceo-rosado, pasaba netamente a rojo, por pérdida de la fluorescencia azul que la acompañaba.

Realizado el mismo ensayo con aceite coloreado esta vez con clorófila comercial, la fluorescencia original azul fuerte, se eliminaba presentando una débil fluorescencia azul-verdoso oscura. La diferencia entre ambos ensayos era neta, lo cual nos dio la seguridad de que un método elaborado sobre estas bases debía permitirnos la resolución del fin propuesto.

El reconocimiento de la clorófila por reacciones químicas se vió dificultado por la carencia de reacciones características. La reacción de la fase parda, citada como tal, que consiste en agitar la solución etérea en la cual se investiga la presencia de clorófila con una solución de  $\text{OHK}$  en alcohol metílico, se produce con extracto etéreo de ortiga, y en cambio, no la da la solución etérea de clorófila comercial. En efecto, la primera da por agitación una coloración parda que al cabo de unos minutos se ha transformado nuevamente en verde brillante; la clorófila comercial al ser agitada con la solución alcalina no sufre alteración, faltando el viraje.

Los ensayos que se efectuaron con aceites coloreados, con extracto etéreo de clorófila natural daban netamente la reacción, y los coloreados con comercial reproducían la reacción negativa. En cambio al ensayar con aceites de oliva verdes, no se obtenía ya la reacción de la fase parda, indicando posiblemente alteraciones sufridas con el tiempo en el pigmento; lo mismo sucedió al ensayar un aceite de pepita de uva verde, de dos años. En la parte experimental pondremos en evidencia que esta reacción no puede servirnos para la diferenciación buscada.

También ensayamos aislar la clorófila natural de aceites verdes, para lo cual recurrimos primero a la adsorción sobre caolín activado, el cual decolora bien el aceite.

La clorófila adsorbida sobre este material no presenta a la luz de Wood su fluorescencia roja. Se trató entonces de eliminar el aceite que recubría al adsorbente, comprobándose que todos los disolventes del mismo llevaban nuevamente a solución la clorófila adsorbida, siendo imposible por este camino la purificación.

Se ensayó extraer la clorófila del aceite por agitación con soluciones de ácido clorhídrico de distintas concentraciones, basándonos en el fraccionamiento ácido según Willstätter y Mieg de soluciones etéreas de clorófila (Klein: Handbuch der Pflanzenanalyse, 1932; véase también pág. 3) y en la separación de protoclorófila del aceite de sapalle, según Noack y Kies-

ling (Ztschr. f. physiol. Chem. 121, 97, 1930).

No se llegó a resultados satisfactorios, ya que la capa ácida resultó incolora en todos los casos.

También se estudió el comportamiento de la clorófila frente a la saponificación, buscándose posibles diferencias con la clorófila comercial, pero no sucede así. Es imposible separar por saponificación la clorófila del jabón formado; puestos luego los ácidos grasos en libertad, mantienen disuelta la clorófila. La diferenciación a la luz ultravioleta de estas soluciones tampoco se logró.

## 6.- P A R T E E X P E R I M E N T A L

### I. Características de la clorófila natural y clorófila comercial.

En todos los ensayos que se realizaron utilizando aceites coloreados con clorófila natural, éstos se prepararon incorporando el colorante en solución etérea y eliminando el disolvente por evaporación al aire. La clorófila se extrajo de hojas de ortiga finamente pulverizadas, malaxando con éter en un mortero y filtrando la solución así obtenida.

La clorófila comercial también se incorporó al aceite en forma de solución etérea. Presenta ésta un color verde más azulado que el de la clorófila natural.

Observadas las soluciones etéreas a la luz de Wood, la de clorófila natural presenta una intensa fluorescencia rojo-sangre, aún en soluciones muy débilmente coloreadas; la clorófila comercial en cambio, solo posee una muy débil fluorescencia azul oscura.

Realizando con las soluciones etéreas la "reacción de la fase parda", agitando un volumen de las mismas con otro igual de una solución de OHK (30%) en alcohol metílico, la clorófila vira al pardo, volviendo a dar al cabo de unos minutos una coloración verde intensa en la capa inferior de OHK metílico. La clorófila comercial no se modifica al efectuar esta reacción en lo que a su color se refiere, pero también pasa a colorear la capa metílica, dejando en el éter una débil coloración azul verdosa.

Aceite de oliva coloreado con las soluciones anteriores, con una intensidad de coloración semejante a la de los que se encuentran en el comercio, presentan las características que se indican en el Cuadro I, donde la columna titulada -Color- se refiere al del aceite visto a la luz del día; las fluorescencias

son las observadas en la lámpara Hanau de luz ultravioleta, significando - S - la fluorescencia observada en la superficie del líquido contenido en un cristizador, - M - la del menisco observando el líquido lateralmente, y - L - la fluorescencia (f) o color (c) del líquido en su parte inferior,

CUADRO I.

Aceite	Color	Fluorescencia		
		S	M	L
A.- aceite refinado de oliva, sin colorear	amarillo	azul	azul	celeste lechosa
B.- aceite refinado de oliva, con clorófila natural agregada	verde amarillento	violeta lechosa	violeta lechosa	verde amarillento
C.- aceite refinado de oliva, con clorófila comercial agregada	verde azulado	azul violácea	celeste lechosa	verde

Efectuada la reacción de la fase parda con los aceites B y C diluidos previamente con igual volumen de éter, la muestra B da reacción positiva, en tanto que el color de C no se altera. Como se observa, en este caso es posible diferenciar mediante esta reacción la clorófila natural agregada, de la clorófila comercial. Sin embargo, con aceites del comercio verdes, en los cuales se comprobó por el método que indicamos más adelante la presencia de clorófila natural, la reacción falla por cuanto no se produce el característico viraje al pardo, sino que directamente se colorea la capa metálica en verde.

El mismo resultado se obtuvo también con un aceite de pepita de uva verde, en el cual se sabía con toda certeza que existía clorófila natural. La falla de la reacción se debe a que ésta solamente se obtiene con la clorófila inalterada, y probablemente por el envejecimiento han de producirse alteraciones en

el pigmento, que impiden la reacción.

## II. Preparación de complejos de clorófila con cobre y cinc.

Con el objeto de emplear en nuestras experiencias colorantes de composición conocida, se prepararon complejos de cobre y cinc, utilizando un método semejante al de Willstätter y Sjögberg (Z. physiol. Chem. 138, 171, 1924).

Estos autores disuelven feofitina en cloroformo y añaden ácido acético concentrado a esta solución, evaporando el disolvente al mismo tiempo por vacío. Luego forman el complejo agregando una solución acuosa del acetato metálico correspondiente y la precipitan directamente por dilución en unos casos, o bien, calientan la solución acética de feofitina con el acetato, diluyendo y precipitando luego.

Nosotros hemos utilizado una solución etérea de clorófila, obtenida por extracción en Soxhlet de 80 g. de hojas de ortiga secas, finamente pulverizadas, que vertimos en 100 cm<sup>3</sup> de ácido acético. El color verde intenso de la solución etérea vira al pardo oliva por perder la molécula de clorófila en medio ácido su átomo de magnesio, pasando a feofitina. Se evaporó el éter a baño-maría, añadiéndose entonces 20 cm<sup>3</sup> de la solución del acetato al 4% y calentando a continuación durante 15 minutos a baño-maría. Al añadir las sales de cobre y cinc se observa inmediatamente que se producen intensas coloraciones verdes, por formación del complejo metálico cobre-feofitina e cinc-feofitina respectivamente.

Se precipitó el compuesto metálico formado por dilución con 15 cm<sup>3</sup> de agua, filtrando después de 24 horas de reposo.

Se purificaron los compuestos metálicos redisolviéndolos en éter, pasándolos nuevamente a 50 cm<sup>3</sup> de ácido acético glacial, evaporando el éter y añadiendo 5 cm<sup>3</sup> de la solución del acetato metálico, calentando 15 minutos a baño-maría y precipitando por dilución con 20 cm<sup>3</sup> de agua, filtrando después de 24 horas de reposo.

Los precipitados una vez secos, adquieren consistencia pastosa; tienen color verde oscuro negruzco, con reflejos azulados.

En solución etérea el de cobre tiene un hermoso color verde azulado, coincidiendo todas sus características con las de las clorófilas comerciales. El compuesto de cinc presenta en éter color verde. Observadas las soluciones a la luz ultravioleta, la cobre-feofitina emite una muy débil fluorescencia azul, en cambio la cinc-feofitina una fuerte fluorescencia roja.

Dosamos en las cenizas de estos compuestos el metal; el cobre, por colorimetría del color azul formado con  $\text{NH}_3$  y el cinc por el método gravimétrico de Spacu-Dick, precipitándolo al estado de sulfocianuro de cinc y piridina, que se seca y pesa.

Obtuvimos los siguientes resultados:

<u>cobre-feofitina</u>		<u>cinc-feofitina</u>	
cenizas %	1,13	cenizas %	1,19
cobre %	0,66	cinc %	0,29
Ca % en las cenizas	67,8	Ca % en las cenizas	30,3

Estos compuestos son los que hemos utilizado en todas nuestras experiencias, considerando que contienen cobre y cinc feofitina, aunque no coincidan sus análisis con los de los productos puros obtenidos por Willstätter y Sjöberg partiendo de feofitina.

Hemos preparado también complejos de cobre y clorófila, y de cinc y clorófila, utilizando procedimientos completamente análogos a los que se emplean industrialmente en la fabricación de clorófilas comerciales. Procedimos así:

50 g. de hojas de ortiga pulverizadas se colocaron en el Soxhlet añadiendo una solución concentrada de 0,5 g. de  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , extrayendo luego con alcohol etílico de 80° hasta agotar el producto. Se obtiene así una solución intensamente coloreada verde, que observada a la luz de Wood presenta una débil fluorescencia rojo-vinosa, muy distinta de la que presentan las soluciones puras de clorófila en alcohol. Se añadieron a la misma 50 cm<sup>3</sup> de agua y se destiló el alcohol al vacío. Entonces se extrajo con bencol el precipitado pastoso que se formó, separando en esta

forma la "clorófila comercial" de otros productos extraídos por el alcohol.

La solución en bencel, de un hermoso color verde azulado, presenta una débil fluorescencia azul, observada en la lámpara. Su comportamiento respecto a la reacción de la fase parda es idéntico al de la clorófila comercial.

Evaporado el bencel, se obtuvieron 1,33 g. de un producto de consistencia cárea.

Del mismo modo se procedió añadiendo 0,5 g.  $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  obteniéndose 1,48 g.

Las características de color y comportamiento a la luz ultravioleta de los compuestos metálicos obtenidos por el segundo procedimiento, coinciden totalmente con los anteriores.

Se analizaron clorófilas del comercio, encontrando que todas ellas son cápricas y su contenido en metal muy bajo, como puede apreciarse en el siguiente cuadro:

	cenizas %	cobre %
clorófila comercial Merck	0,64	0,11
clorófila comercial Schering	0,22	0,16
clorófila comercial -	0,63	0,20

### III. La acción del nitrobenzeno sobre la fluorescencia de soluciones de clorófila, cobre-feofitina y zinc-feofitina.

Como ya indicáramos en la parte general, habíamos observado que el añadido de unas gotas de nitrobenzeno a aceites refinados sin colorear, tenía por consecuencia suprimir totalmente la fuerte fluorescencia azul que los caracteriza.

En todos los ensayos que describiremos a continuación se procedió de la siguiente manera: la solución cuya fluorescencia era estudiada, se colocaba en cristalizadores de vidrio no fluorescente, en la cámara de la lámpara de luz ultravioleta Hanau con filtro, que permite únicamente el pasaje de radiaciones de longitudes de onda menores de  $3650 \text{ \AA}$ . (luz de Wood)

Observada así la fluorescencia directa, el nitrobenzeno era añadido por gotas, agitando con una varilla para disolverlo.

Los resultados obtenidos con aceites coloreados fueron los siguientes: al eliminar el nitrobenzeno la fluorescencia azul-celeste propia del aceite, se ponen en evidencia las fluorescencias rojas de la clorófila natural y del complejo zinc-feofitina (clorófila cínica), desapareciendo toda fluorescencia e quedando tan solo una muy débil azul-oscuro en presencia de cobre-feofitina (clorófila cúprica).

Estudiamos primeramente el comportamiento de soluciones en éter de los diversos colorantes que empleamos luego en los aceites.

Comprobamos así que, si bien el nitrobenzeno también debilita las fluorescencias rojas, en cambio elimina rápidamente las azules. El nitrobenzeno desempeña el papel de un filtro para las radiaciones excitadoras, como se pudo comprobar interponiéndolo en capa delgada entre la lámpara y un cristalizador con un aceite de oliva refinado, cuya fluorescencia azul-celeste intensa es eliminada. Esta técnica que hubiera podido adoptarse en todos los casos, no la encontramos sin embargo conveniente,

pués el añadir el nitrobenzeno por gotas tiene la ventaja de poder graduar la absorción, variando la cantidad del mismo. Transcribimos a continuación en el Cuadro II las variaciones observadas en soluciones etéreas de los colorantes

CUADRO II.

Sol. etérea N. B. (20 cm <sup>3</sup> ) (gotas)	Fluorescencia			
	I	II	III	
Clorófila natural	0	roja intensa	roja-anaranjada	anaranjada
	1	roja debilitada	id.	id.
	3	id.	id.	id.
	5	id.	id.	e. verde
	10	rojo obscura	roja	id.
	15	id.	id.	id.
	20	id.	id.	id.
	25	las fluorescencias ya no sufren modificación		
Clorófila comercial Schering	0	azul-verdosa	azul-verdosa	azul-verdosa
	1	id. debilitada	id.	id.
	3	id. muy débil	id.	e. verde azul.
	5	id.	id.	id.
	10	prácticamente sin fluorescencia		
Cobre-feofitina	0	azul-verdosa	azul-verdosa	azul-verdosa
	1	id. mas obscura	id.	id.
	3	id. muy débil	azul-obscura	e. verde azul.
	5	id.	id.	id.
	10	prácticamente sin fluorescencia		
Cine-feofitina	0	rojo ladrillo	rojo ladrillo	rojo ladrillo
	1	id.	id.	id.
	3	roja	id.	e. verde
	5	id. más obscura	roja	id.
	10	rojo obscura	id.	id.
	15	id.	id.	id.
	20	id.	id.	id.
	25	las fluorescencias ya no sufren modificación		

Las cifras de la columna N. B. indican las gotas de nitrobenzeno añadidas a 20 cm<sup>3</sup> de la solución en examen.

En la última columna la - e - indica color de la capa líquida inferior al menisco, sin fluorescencia.

En todos los cuadros se han indicado los tonos de los colores de fluorescencia que prevalecen, nombrándolos primero, por ejemplo azul-verdoso (tono más azulado), verde-azulado (tono más verde).

Como se observa es perfectamente posible eliminar fluorescencias azules, en tanto que las rojas persisten.

Realizamos análogas experiencias utilizando aceite de oliva refinado, para determinar la cantidad de nitrobenzeno necesaria para 20 cm<sup>3</sup>.

Los resultados están representados en el Cuadro III.

CUADRO III.

Aceite (20 cm <sup>3</sup> )	N. B. (gotas)	Fluorescencia		
		B	M	L
refinado	0	azul-violácea	celeste lechosa	celeste le-
amarillo	3	azul débil	id.	chosa
	4	id.	id.	id.
	5	id.	id.	id.
	7	violácea	azul celeste	e. verde
	9	id. débil	id. débil	id.
	12	id. muy débil	blanco verdoso	id.
	15	id.	id.	id.
	20	id.	celeste muy déb.	id.
	25	prácticamente sin	fluorescencia	
con	0	violeta lechosa	violeta	verde
clorófila	3	violeta púrpura	id. lechosa déb.	id.
natural	4	violeta rojiza	violeta rosada	id.
agregada	5	id.	id.	id.
	7	rosado-violácea	rosada	e. verde
	10	rojiza	anaranjada	id.
	12	roja	id.	id.
	15	id.	id.	id.
	20	rojo obscura	id.	id.
con	0	azul-violácea	celeste lechosa	celeste
clorófila	3	azul-violácea	id. verdosa	id.
comercial	5	id. debilitada	id.	e. verde
agregada	7	azul	celeste verdosa	id.
	10	id.	id.	id.
	15	azul muy débil	id.	id.
	20	id. obscura muy débil	verde-azulado	id.
con	0	celeste	celeste verdosa	celeste verd.
cobre-	3	azul	celeste lechosa	e. verde
feofitina	5	id.	id.	id.
agregada	7	id. más obscura	celeste verdosa	id.
	10	id.	id.	id.
	12	azul obs. débil	id.	id.
	15	id. muy débil	id.	id.
	20	id.	id.	id.
	25	prácticamente sin	fluorescencia	
con	0	violeta lechosa	verde lechosa	verde lechosa
cinc-	3	id. déb. rojiza	lechoso violácea	e. verde
feofitina	5	id.	id.	id.
agregada	7	id. más obscura	id.	id.
	10	violeta rojiza obs.	id.	id.
	12	rojo violácea	violeta rojiza	id.
	15	id.	id.	id.
	20	id.	id.	id.

Se observa en el cuadro que por añadido de 20 gotas de nitro-benceno a 20 cm<sup>3</sup> del aceite en examen, se logra eliminar prácticamente en forma completa la fluorescencia azul propia, poniendo en evidencia la roja de la clorófila, en caso de existir en el aceite, como así también del complejo de cinc-feofitina.

IV. Estudios para diferenciar clorófila natural de clorófila sintética.

Dado que ambos colorantes poseen fluorescencia roja, aunque de distinto tono, por ser el de la cinc-feofitina algo más violáceo, ensayamos transformar la clorófila natural presente en el aceite en su derivado cúprico, buscando realizar esta transformación mediante un tratamiento suficientemente suave para no alterar la cinc-feofitina, de modo que en presencia de una fluorescencia roja en el aceite en examen, si ésta se perdía después del tratamiento con cobre, el aceite contendría clorófila; si en cambio la fluorescencia roja subsistía, se trataría de cinc-feofitina.

Estudiamos las condiciones para formar el derivado cúprico utilizando aceite de oliva coloreado con el extracto de ortiga, Por calentamiento de 5 cm<sup>3</sup> de dicho aceite con unos miligramos de acetato de cobre sólido hasta una temperatura próxima a la de ebullición del aceite, mantenida durante 5 minutos, se intensifica notablemente el color verde indicando que hay reacción. En la misma forma se trató el aceite amarillo sin colorear para confirmar que el cobre reacciona con la clorófila y no con los ácidos grasos. El aceite amarillo pasa a tomar una coloración parda. Las características que presentan a la luz de Wood, observando el aceite contenido en tubos de ensayo, son las siguientes:

aceite (4 cm <sup>3</sup> )	color formado por tratamiento con Cu	N. B. (gotas)	Fluorescencia
sin clorófila	parde	0 4	celeste azul verdosa
con clorófila	verde azulado brillante	0 4	azul violácea <u>violeta rojiza</u> obscura

Es evidente que en esta forma la reacción no llega a ser completa, pues subsiste en parte la fluorescencia roja, por lo que ensayamos calentando 5 cm<sup>3</sup> del aceite verde con 5 cm<sup>3</sup> de ácido acético glacial y unos miligramos de acetato de cobre a reflujo durante 10 minutos.

El aceite que contiene clorófila toma en estas condiciones una intensa coloración verde; el aceite no coloreado pasa a un color amarillo sucio, demostrando definitivamente que el cobre no actúa como han supuesto algunos autores para formar sales de ácidos grasos debido a los cuales se intensificaría el color del aceite. (D. Ponti - Boll. chim. farm. 72, 953, 1933)

Se procedió a decantar los aceites y lavarlos con agua hasta eliminar su acidez, observando entonces a la lámpara:

aceite (4 cm <sup>3</sup> )	N.B. (gotas)	Fluorescencia
con clorófila no tratado con cobre	0 4	rosada violácea lechosa roja
con clorófila tratada con cobre	0 4	celestes verdosa azul verdosa obscura

En esta forma se consigue pues la transformación total de la clorófila en su derivado cúprico.

Efectuando en iguales condiciones la reacción entre un aceite coloreado con clorófila y unos miligramos de acetato de cinc, se forma el derivado de dicho metal con las siguientes características:

color formado	aceite con clorófila N.B.	cíncica fluorescencia
verde brillante amarillento	0 4	violeta lechosa pardo ligeramente rojizo

Estudiamos entonces las condiciones necesarias para la transformación del derivado de cinc en el de cobre.

Para ello formamos en un aceite el derivado de cinc, calentando

10 cm<sup>3</sup> de aceite con clorófila, a reflujo con 10 cm<sup>3</sup> de ácido acético y acetato de cinc. Se forma de inmediato un compuesto de color verde intenso. Decantado y lavado el aceite, lo dividimos en dos porciones: la primera (A) no se sometió a otro tratamiento y constituye aceite coloreado con cinc-feofitina; la segunda (B) fué calentada a ebullición con ácido acético glacial y acetato de cobre, decantada luego y lavada. La coloración no se alteró notablemente.

aceite (4cm <sup>3</sup> )	N.B. (gotas)	Fluorescencia	
		H	L
A	0	violácea	verde oliva
	4	roja	verde oliva
B	0	azul	verde oscura
	4	azul débil	verde oscura

Se observa netamente que en estas condiciones el derivado de cinc se ha transformado en el de cobre y por consiguiente no cumplen nuestros propósitos.

Se trató entonces de encontrar un tratamiento suficientemente suave que transformase en derivado cúprico la clorófila natural pero que al mismo tiempo no nos alterase la clorófila cíncea, con lo cual dispondríamos de un ensayo analítico para diferenciar esta última de la clorófila natural.

A tal efecto realizamos primeramente ensayos con una solución etérea de cinc-feofitina, cuya preparación hemos descrito anteriormente, (pág. 17) y paralelamente con solución etérea de clorófila, adicionando ácido acético y 5 gotas de una solución de acetato de cobre al 4%, abandonando la mezcla en frío durante media hora:

fluorescencias

1 cm <sup>3</sup> sol. etérea + 1 cm <sup>3</sup> ac. acético sin agregado de cobre	1 cm <sup>3</sup> sol. etérea + 1 cm <sup>3</sup> ac. + 5 gotas sol. cúprica
--	---

clorófila natural

rojo sangre intensa

verde azulada

clorófila cíncea

rojo ladrillo intensa

rojo ladrillo

Basándonos en estos resultados satisfactorios, ensayamos este método con aceites: 1 cm<sup>3</sup> del aceite de oliva coloreado se agitó con 5 cm<sup>3</sup> de ácido acético glacial y 3 gotas de solución de acetato de cobre al 4%, dejando decantar y observando luego a la lámpara de luz ultravioleta, directamente y después de añadir 4 gotas de nitrobenzene

aceite coloreado con	fluorescencia		N. B.
	capa superior	capa inferior	
clorófila natural sin añadir cobre tratado por cobre	violeta lechosa violeta lechosa	rojiza débil verde	roja obs. verde
clorófila cincica sin añadir cobre tratado por cobre	celeste celeste	gris gris	violácea violácea

Vemos que es en el ácido donde se producen modificaciones (capa inferior), variando notablemente las características de fluorescencia de la clorófila natural, pero permaneciendo inalteradas las de su derivado de cinc.

Con el objeto de evitar la formación de dos capas líquidas se encontró mucho más conveniente modificar el método reduciendo a solo unas gotas la cantidad de ácido acético, y someter la mezcla a un breve calentamiento:

a tres cm<sup>3</sup> del aceite verde en examen añadimos tres gotas de una solución al 0,1% de acetato de cobre en ácido acético glacial (Reactivo cúprico), agitando y calentando 10 minutos a 100<sup>o</sup> en baño-maría; paralelamente se efectuó un ensayo con ácido acético puro, obteniéndose las siguientes fluorescencias observadas en presencia de nitrobenzene añadido en la proporción de una gota por cm<sup>3</sup> de aceite

aceite coloreado con	tratado con	fluorescencia obtenida (N.B.)
clorófila natural	ácido acético	rojo obscura
	reactivo cúprico	azul verdosa obscura
clorófila cincica	ácido acético	rojo obscura
	reactivo cúprico	rojo obscura (algo más deb.)

Confirmamos que en estas condiciones en ningún caso podría llegar a producirse una variación en la fluorescencia del compuesto de zinc, pues se calentó durante media hora a 100°C con el reactivo cúprico el aceite adicionado de zinc-feofitina y comparó como en todos los casos anteriores con un ensayo testigo efectuado con ácido acético puro

---

aceite coloreado con clorófila cínica tratado con

---

reactivo cúprico (N.B.) fl. violeta rojiza oscura

ácido acético (N.B.) fl. violeta rojiza oscura

Repetidos en serie los ensayos que anteceden con aceites coloreados y comprobados los resultados, proponemos el siguiente método definitivo para el examen de los pigmentos verdes de los aceites de oliva y comestibles

#### METODO DEFINITIVO.

Se colocan en un cristizador de vidrio no fluorescente 20 cm<sup>3</sup> del aceite verde en examen, se añaden 20 gotas de nitrobenzono y se mezcla con una varilla, observando en la cámara de la lámpara de luz ultravioleta las fluorescencias emitidas por la superficie y el menisco del líquido.

Una fluorescencia azul-verdosa débil indica la presencia de clorófila comercial cúprica.

Si la fluorescencia es roja o anaranjada, se procederá al siguiente ensayo para diferenciar clorófila natural de clorófila cínica: se colocan en dos tubos de ensayo A y B, 3 cm<sup>3</sup> del aceite; al tubo A se añaden 3 gotas del reactivo cúprico (solución de acetato de cobre al 0,1% en ácido acético glacial) y al B 3 gotas de ácido acético glacial, calentándose 10 minutos a 100°C en baño-maría, se agregan dos gotas de nitrobenzono en cada uno, se mezcla y se observa a la lámpara; fluorescencia verde-azulada en A y roja en B indica clorófila natural; fluorescencias rojas e violáceas iguales en A y B indican clorófila cínica.

Aplicando este procedimiento han sido estudiados todos los aceites que figuran más adelante,

Damos a continuación los resultados del examen de dos aceites vírgenes de oliva, sometidos únicamente después de prensados a un lavado con agua.

La muestra N<sup>o</sup>1 proviene de aceitunas maduras frescas, prensadas inmediatamente después de cortadas y molidas; la muestra N<sup>o</sup>2 de aceitunas maduras secadas al aire, molidas y prensadas.

CUADRO IV.

Aceite de oliva vírgen.

Procedencia: Aimagasta.- Catanarca.

Aceite	Color	N. B.	Fluorescencia	
			S	M
muestra N <sup>o</sup> 1	amarillo	0	violeta rojiza	amarillo claro lechosa
		10	id. obscuro	anaranjado rojiza
		20	id. obscuro	anaranjado rojiza
muestra N <sup>o</sup> 2	amarillo	0	violeta rosada	amarillo verdosa lechosa
	verdoso	10	rojo obscura	anaranjado rojiza
		20	rojo obscura	anaranjado rojiza

Ensayo con el reactivo cúprico.

Aceite	Color formado	Fluorescencia directa	Fl. con nitrobenzene
muestra N <sup>o</sup> 1			
tubo A	verde	azul-verdosa lechosa	verde azulada obs.
tubo B	amarillo	violeta rojiza lech.	violeta rojiza obs.
muestra N <sup>o</sup> 2			
tubo A	verde intenso	azul-verdosa lechosa	verde azulada obs.
tubo B	amarillo-verd., rojo-violáceo	lechosa	rojo chocolate

Se observa que el método propuesto es muy sensible, revelando la presencia de pequeñas cantidades de clorófila, tal como sucede en la muestra N<sup>o</sup> 1 de color amarillo.

CUADRO Y.

Examen de aceites de oliva amarillos  
obtenidos en el comercio.

Aceite	Color	Fluorescencia		
		directa	con nitrobenzene	N
		S	S	N
muestra N <sup>o</sup> 1	amarillo fuerte	azul	violácea	celeste
muestra N <sup>o</sup> 2	amarillo lig. verdoso	celeste	violácea	celeste
muestra N <sup>o</sup> 3	amarillo	celeste	violácea	celeste
muestra N <sup>o</sup> 4	amarillo	azul	violácea	celeste
muestra N <sup>o</sup> 5	amarillo	azul	violácea	verdosa
muestra N <sup>o</sup> 6	amarillo lig. verdoso	azul	violácea <u>rojiza</u>	violácea <u>deb. rosada</u>
muestra N <sup>o</sup> 7	amarillo	azul	violácea <u>rojiza</u>	celeste <u>deb. anaranjada</u>

Ensayo con el reactivo nítrico.

Aceite	Color formado	Fluorescencia directa	Fl. con N. B.
muestras N <sup>o</sup> 1-5	no contienen clorófila natural		
tubo A	amarillo	celeste lechosa	azul obscura
tubo B	amarillo	celeste lechosa	azul obscura
muestra N <sup>o</sup> 6	contiene clorófila natural		
tubo A	verde claro brillante	azul-verdosa lechosa	azul-verdosa obscura
tubo B	amarillo	violácea rosada lechosa	<u>violata rojiza</u> obscura
muestra N <sup>o</sup> 7	contiene vestigios de clorófila natural		
tubo A	amarillo verdoso	celeste azulado	azul-verdosa obscura
tubo B	amarillo	celeste muy deb. violáceo	pardo violáceo <u>rojizo</u>

Las muestras N<sup>o</sup> 6 y 7 de aceites de oliva amarillos contienen pequeñas cantidades de clorófila.

**CUADRO VI.**

**Examen de aceites verdes de oliva y otros.**

Aceite	Color	directa S	Fluorescencia con nitrobenzene	
			S	M
Nº 1 oliva	verde amarillento	rosada violácea	roja	roja
Nº 2 oliva	verde fuerte	rosada violácea	roja	roja
Nº 3 oliva	verde amarillento	celeste	roja obscura	roja
Nº 4 oliva	verde pardusco	rojiza	roja	roja
Nº 5 oliva	verde oliva	rosada violácea	roja obscura	roja
Nº 6 oliva	verde	rosada	roja obscura	roja
Nº 7 oliva	verde	celeste	violácea	verde amarillenta
Nº 8 comestible	verde claro	azul	violácea	azul
Nº 9 oliva	verde fuerte	celeste	azul	azul verdosa
Nº 10 comestible	verde muy claro	celeste	azul obs.debil	verde azulada
Nº 11 comestible	verde azulado	azul violácea	azul obs.debil	verde azulada
Nº 12 comestible	verde azulado	azul violácea	azul obs.debil	verde azulada

Ensayo con el reactivo cúprico

Color formado		Fluorescencia		
		directa	con nitrobenzeno clorófila	
tubo A	verde puro	verde azulada	azul verdosa	<u>natural</u>
tubo B	verde oliva	anaranjado rojiza	rojo sangre obscura	
tubo A	verde puro	celeste verd.	azul verdosa	<u>natural</u>
tubo B	verde	oliva violácea	rojo chocolate obscura	
tubo A	verde puro	verde celeste	azul verdosa	<u>natural</u>
tubo B	verde amarillento	oliva violácea	rojo violácea obscura	
tubo A	verde puro	verde azulada	azul verdosa obscura	<u>natural</u>
tubo B	verde oliva	anaranjado rojiza	rojo sangre	
tubo A	verde puro	verde azulada	azul verdosa obscura	<u>natural</u>
tubo B	verde oliva	anaranjada rojiza	rojo sangre	
tubo A	verde puro	verde azulada	azul verdosa obscura	<u>natural</u>
tubo B	verde	oliva violácea	rojo chocolate obscura	
tubo A	verde brillante	celeste lechosa	azul obscura	<u>cúprica</u>
tubo B	verde brillante	celeste lechosa	azul obscura	
	---	---	---	<u>cúprica</u>
	---	---	---	
	---	---	---	<u>cúprica</u>
	---	---	---	
	---	---	---	<u>cúprica</u>
	---	---	---	
	---	---	---	<u>cúprica</u>
	---	---	---	
	---	---	---	<u>cúprica</u>
	---	---	---	

Analizada una serie de aceites verdes, encontramos que contienen clorófila natural e clorófila comercial cúprica agregada, no utilizándose en cambio clorófila cíncea, la cual no se consigue en el comercio.

La fuerte intensidad de coloración de los aceites verdes de oliva indica que se trata de aceites obtenidos por extracción con disolventes de tortas de aceitunas prensadas, pues es muy superior dicha intensidad a la de los aceites de presión, que son amarillos e ligeramente verdosos.

En muchos de los aceites estudiados se pudo comprobar la presencia de restos del disolvente, efectuando la reacción de Lauro para revelar vestigios de S procedentes de  $S_2O$  (Jamieson: Vegetable fats and oils, pág.99), calentando 5  $cm^3$  del aceite a  $150^{\circ}C$  durante 10 minutos con 0,02 g. de benzoato de plata, produciéndose un ennegrecimiento.

#### RESUMEN.

- 1.- Se estudió un método que permite efectuar la diferenciación de clorófila natural, clorófila cúprica y clorófila cíncea en solución de aceite.
- 2.- Se propone un método basado en la eliminación de una fluorescencia mediante la incorporación de una sustancia orgánica, fenómeno conocido pero no utilizado analíticamente hasta el presente.
- 3.- Se comprobó que la reacción de la fase parda, característica de la clorófila natural inalterada, no puede ser utilizada para su investigación en aceites.
- 4.- Se estudiaron las características a la luz de Wood de aceites amarillos y verdes del comercio.
- 5.- La presencia de grandes cantidades de clorófila natural en aceites de oliva puede indicar su obtención mediante extracción con disolventes de tortas de aceitunas prensadas.

BIBLIOGRAFIA.

A. Bibliografía citada en el presente trabajo.

- 1.-Klein: Handbuch der Pflanzenanalyse, 1932
- 2.-Danckwort: Lumineszenzanalyse im filtrierten ultravioletten Licht, 1928
- 3.-Radley y Grant: Fluorescence Analysis in ultra-violet light, 1933
- 4.-Jamieson: Vegetable fats and oils, 1932
- 5.-Yoe: Photometrical Chemical Analysis, I Colorimetry.
- 6.-Ullmann: Enciclopedia de Química Industrial.
- 7.-Willstätter y Sjöberg: Z. physiol. Chem. 138, 171, 1924.
- 8.-Spacu-Dick: Z. anal. Chem. 71, 185, 1927; 78, 241, 1929.
- 9.-Schertz: Ind. Eng. Chem. 19, 1152, 1927.
- 10.-Skogstrom: Canadian Chem. and Metallurgy 18, 274, 1934.
- 11.-Hilpert y Hofmeister: Berichte 66, 1443, 1933.
- 12.-Danckwort y Pfau: Apoth. Ztg. 45, 207, 1930.
- 13.-Zickgraf: Apoth. Ztg. 45, 361, 1930.
- 14.-Croner: Z. angew. Chem. 39, 1032, 1926.
- 15.-Nassini y De Cori: Ann. Chim. Applic. 19, 46, 1929.
- 16.-Le Roy Glantz: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 2, 256, 1930.
- 17.-Provvedi: Olii min., olii grossi, colori, vernici 14, 121, 1934.
- 18.-Teue: L'Igiene moderna 2, 166, 1934.
- 19.-Guillot: Ann. Fraudes et Fals. 28, 75, 1935.
- 20.-Noack y Kiesling: Z. physiol. chem. 193, 97, 1930.
- 21.-Ponti: Boll. chim. farm. 72, 935, 1933.

B. Bibliografía sobre temas afines consultada.

- 22.-Francesconi y Pinoncelli: Ann. Chim. Applic. 24, 242, 1934.
- 23.-Cortese: Industria Chimica 2, 1048, 1934.
- 24.-Haitminger y Reich: Angew. Chem. 41, 815, 1928.
- 25.-Lunde y Stiebel: " " 46, 243, 1933 (con bibliografía completa de fluorescencia de aceites de oliva aparecida hasta el año 1930.)
- 26.-Lunde, Kringstad y Weedon: Angew. Chem. 46, 796, 1933.
- 27.-Noack y Kiesling: " " 44, 93, 1931.
- 28.-Sratia y Mangini: Giorn. chim. ind. e applic. 10, 205, 1928.
- 29.-Bernardini y Gautier: " " " " 15, 329, 1933
- 30.-Fachini: " " " " 8, 178, 1926
- 31.-Saccardi: " " " " 8, 11, 1926
- 32.-Baud y Courtois: Chim et Ind. 19, 602, 1928.
- 33.-Dhéré: Comptes Rendus 158, 64, 1914.
- 34.-Guillot: Ann. Fraudes et Fals. 28, 69, 1935.
- 35.-Nobile: Boll. chim. farm. 72, 649, 1933.
- 36.-Bolton: Analyst 55, 746, 1930.
- 37.-Marcille: " 53, 103, 1928.



*Ernesto Dick*

Buenos Aires, 30 de noviembre de 1936.