

Tesis de Posgrado

Sobre la composición química del aceite de semillas de "Maytenus Disticha"

Darnet, Leda María

1945

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Darnet, Leda María. (1945). Sobre la composición química del aceite de semillas de "Maytenus Disticha". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0392_Darnet.pdf

Cita tipo Chicago:

Darnet, Leda María. "Sobre la composición química del aceite de semillas de "Maytenus Disticha". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1945. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0392_Darnet.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

LEDA MARIA DARNET

SOBRE LA COMPOSICION QUIMICA DEL ACEITE DE SEMILLAS DE

"MAYTENUIS DISTICHA"

POYBA.

TESIS

presentada a la

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

para optar al título

de

Doctora en química

Tesis 392

1945

Toda mi gratitud al Doctor Pedro Cattáneo, cuya inapreciable ayuda ha hecho posible la realización de esta tesis.

Quedo también muy reconocida al Doctor R. Pérez Moreau, quien me proporcionó la descripción del vegetal en cuestión; y a los Doctores Abel Sánchez Díaz y Venancio Deulofeu por haber permitido el desarrollo de la parte experimental en los laboratorios de la Oficina Química Municipal y de la Cátedra de Química Orgánica (Ingeniería Industrial y Doctorado en Ciencias Naturales) de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, respectivamente.

CONSIDERACIONES BOTÁNICAS SOBRE EL VEGETAL

"MAYTENUS AFF. DISTICHA" (HOOK. F) URBAN

Arbusto de 0,5 a 1 metro de altura; muy ramoso; ramas pubé-
rulas, dísticas, divaricadas, cubiertas de una corta pubescen-
cia fuliginosa.

Hojas numerosas, pequeñas, alternas, brevemente pecioladas,
coriáceas, glabras, de contorno oval u oblongas, obtusas o a
veces subagudas, de más o menos 6 a 15 mm. de largo y 3,5 a 7
mm. de ancho, de color ceniciento oliváceo en el haz y más cla-
ras en el envés; en éste bien marcado el nervio medio y total-
mente cubiertas de papilas(visibles ala lupa). Borde de la lá-
mina ligeramente recurvado y ápice algo calloso.

Flores axilares pequeñas, sostenidas por cortos pedicelos,
provistos en su base de 2 bracteolas color castaño, con borde
fiabriado. Cáliz con 4-5 segmentos más o menos triangulares,
o a veces algo redondeados. Pétalos en igual número, de con-
torno oval, colorados y por lo general unas 2 veces más lar-
gos que los sépalos. Estambres 4-5, alternipétalos, insertos
en los lóbulos del disco; filamentos subulados y anteras con
dehiscencia longitudinal.

Disco perigino grande, más o menos cupuliforme y 4-5 loba-
do. Ovario sésil, más o menos subredondo, terminado en un es-
tilo corto que lleva un estigma más o menos 4-lobulado.

Cápsula coriácea, de color amarillo ocre - en la madurez -
en cuyo ápice se observan restos del pistilo, turbinada, algo
achatada, de unos 4,5 a 6,5 mm. de largo y 5 a 6,6 mm. de an-
cho, bilocular, monosperma, algo asimétrica, frecuentemente
por aborto 1-locular. En la madurez se abre en 2 valvas.

Semillas elipsoides, con testa color castaño, rugosa y com-
pletamente envueltas por una capa carnosa(arilo), de color ro-
jo bermellón en vivo, y lúteas - excepto en la base - cuando
secas. Albumen carnoso; embrión derecho; cotiledones ovales, a
veces algo exarginados en el ápice, de más o menos unos 2,5 mm

de largo y 1,5 mm. de ancho.

Este arbusto es un elemento frecuente en ciertos pisos del bosque en la Provincia Antartánica, y algunos pobladores lo reconocen como una de las tantas "chauras".

EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DEL GRASO

Disponiéndose de semillas recolectadas en los meses de febrero de los años 1943 y 1944, se procedió a la separación mecánica del arilo y de la semilla en sí, como precaución inicial para evitar la contaminación del aceite con ceras que pudiesen provenir de la cobertura(arilo). Por extracción separada en aparato de Soxhlet, con éter de petróleo de punto de ebullición no mayor de 80°C, se pudo probar que ambas partes separadas eran ricas en productos extraíbles.

De ese modo, se hicieron determinaciones cuantitativas de los contenidos grasos, sobre pequeñas porciones de semillas cosechadas en 1943, y sobre el total disponible de la cosecha de 1944.

El siguiente cuadro resume esos valores, indicando además las cantidades de arilo y de semilla propiamente dicha, obtenidas en cada caso, y sometidas a extracción con éter de petróleo.

Cosecha	Semilla (g.)	Arilo	P. int.	% graso arilo	% graso p. int.	% graso sem.entera
1943	35,99	7,00	28,60	63,4	47,0	50,2
	35,61	7,26	28,35	61,6	49,9	52,3
1944	1473,0	244,0	1229,0	52,1	51,0	51,2

El estudio que sigue ha sido practicado sobre el aceite obtenido por extracción de la parte interna de las semillas cosechadas en 1944, habiéndose reservado el estudio del extracto correspondiente a los arilos para el futuro.

CUADRO I

CONSTANTES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Peso específico a 20°/20°C	0,9467
Índice de refracción Zeiss a 20°C	1,4722
Índice de Iodo (Hanus)	97,3
Índice de saponificación(AOAC)	244,2
Índice de Reichert-Weissl(AOAC)	53,7
Índice de Polenske(AOAC)	4,3
Índice de acetilo(AOAC)	18,1
Insaponificable %	1,05
Acidez en ácido oleico %	3,66
Ácidos grasos fijos totales %	73,67
Ácidos grasos fijos "sólidos" % (Twitchell)	15,88
Ácidos grasos fijos "líquidos" % (Twitchell)	84,12
Índice de Iodo de ácidos fijos totales	117,1
Índice de Iodo de ácidos fijos "sólidos"	32,1
Índice de Iodo de ácidos fijos "líquidos"	133,0
Peso molecular medio de ácidos fijos totales	271,1
Peso molecular medio de ácidos fijos "sólidos"	267,1
Peso molecular medio de ácidos fijos "líquidos"	271,8
Índice de saponificación de ácidos fijos totales	206,6
Índice de saponificación de ácidos fijos "sólidos"	209,6
Índice de saponificación de ácidos fijos "líquidos"	206,0
Índice de Iodo del insaponificable(Rosenmund-Kunheinn)	184,8
Glicerina % (Gunnar Blix)	9,77
Color	Rojo

Se destacan el elevado valor del peso específico, y del índice de Reichert-Weissl, como asimismo el bajo contenido en ácidos no arrastrables por vapor de agua, lo cual está de acuerdo con

el elevado valor del índice de saponificación.

Con respecto al color puede decirse que es rojo en el aceite inicialmente obtenido, pero que el mismo desaparece por exposición al aire. Por estacionamiento prolongado del aceite (unos 20 días) en atmósfera de N_2 , se observó la separación de cristales rojos muy bien formados (prismas), que aislados por decantación y centrifugación, y lavados con pequeñas porciones de éter de petróleo, dieron reacciones típicas de carotenoides.

Estos cristales fueron recristalizados en éter de petróleo, y remitidos para su estudio al Dr. Jorge R. Mendive (1), quien trabajando sobre los mismos, y sobre el producto graso aislado por extracción con éter de petróleo, de los arilos (ricos en principio rojo), pudo caracterizarlo como licopeno, por separación mediante análisis cromatográfico.

SOBRE LA INTERPRETACIÓN DEL ÍNDICE DE REICHERT-WEISS

El alto índice de Reichert-Weiss observado hizo suponer la existencia de ácido butírico, pero las experiencias destinadas a identificar este ácido fracasaron, como se pudo comprobar tratando de aislar los ácidos grasos volátiles solubles en agua.

Operando en macroescala, se hizo saponificación y arrastre de ácidos volátiles con vapor de agua, comprobándose que la solución acuosa que contenía estos no permitía separación de los mismos por repetidas extracciones con éter etílico, por lo cual solo cabía admitir que se trataba de ácido acético. Esto fué probado mediante aislamiento de acetanilida.

Las extracciones etéreas mencionadas proporcionaron por eliminación del solvente un residuo líquido que fué sometido a destilación fraccionada, habiéndose separado una fracción de destilación con punto de ebullición de 115-119°C, el cual es muy concordante con el del ácido acético(118-119°C). Quedó un residuo sin destilar, sobre el que se determinó el peso molecular medio (índice de saponificación), obteniéndose 129,2, y que luego de ser sometido a recristalización en agua, permitió aislar una sustancia cristalina(prismas monoclinicos) de punto de fusión igual a 122°C. Teniendo en cuenta este valor y el del peso molecular medio hallado, se supuso la presencia de ácido benzoico, lo cual fué comprobado por punto de fusión mezcla con ácido benzoico puro, no habiéndose observado depresión(122°C).

SOBRE LA PROBABLE EXISTENCIA DE ESTOS ÁCIDOS EN FORMA DE GLICÉRIDOS

El ácido acético parece haber sido citado ya anteriormente(2) como componente de algunas grasas, pero no ha sido demostrado que forme parte de glicéridos; por este motivo decidimos establecer tan sólo en este caso si podía suponersele combinado a la glicerina.

El procedimiento más directo consistió en determinar la cantidad de glicerina producida por saponificación del aceite, refiriendo los resultados a 100 g. del mismo. Para las grasas comunes (sin ácidos grasos volátiles), con índice de saponificación de 190, aproximadamente, este valor es de un 10,5%. En cambio, si hay ácidos grasos volátiles, y más aún acético, este valor debe ser superior. Así, en este aceite, la cantidad de glicerina sería de 13,57%, partiendo de la base de índice de saponificación 244,2, es decir, suponiendo que todos los ácidos están bajo forma de glicéridos. Por el contrario, si se admite que sólo los ácidos fijos (no volátiles) son los que forman los glicéridos, el rendimiento en glicerina sería de 8,90%, valor encontrado teniendo en cuenta que el aceite contiene 78,67% de estos ácidos, y que el índice de saponificación de los mismos es de 206,6.

Para la determinación de glicerina se empleó el micrométodo de Gunnar Blix(3), fundado en la destilación como ioduro de isopropilo, y aplicable directamente a grasas y fosfátidos. Se hicieron 6 determinaciones, cuyo valor promedio fué de 9,77% (ver más detalles en la parte experimental). Este valor difiere mucho menos del calculado teóricamente(8,90%) que del valor 13,57, en el que se suponía la existencia de glicéridos de los ácidos volátiles. Ello es una indicación casi concluyente en el sentido de que esos ácidos forman parte de compuestos distintos de los glicéridos, pero solubles en sus mismos solventes, por cuya razón forman parte del aceite extraído.

El valor 9,77% de glicerina es 0,87 más alto que el calculado teóricamente(8,90%), pero debe tenerse en cuenta que es probable la existencia de diglicéridos, y que ha sido calculado en base al % de ácidos no volátiles, con lo cual se ha cometido un ligero error por defecto, ya que una parte del ácido láurico siempre destila con vapor de agua, y por lo tanto no forma parte, cuantitativamente, de los ácidos fijos.

En lo que se refiere al ácido benzoico, cabe también suponer su naturaleza química ajena a la de los glicéridos. No se ha in-

tensificado en este caso la investigación de la naturaleza química de los ácidos acético y benzoico por falta de materia prima.

Sin embargo, como dato de adelanto, se intentó establecer si estos ácidos formaban en el aceite compuestos arrastrables por vapor de agua. Con ese fin, aproximadamente 100 g. de aceite se arrastraron con vapor, recogiéndose 1,5 litros de destilado, que fué extraído repetidamente con éter etílico, obteniéndose tan sólo 0,093 g. de extracto seco. Por otra parte, sobre el aceite sometido a este arrastre, se determinó el índice de saponificación, y el valor de 244,8 obtenido es muy concordante con el de 244,2 observado sobre el aceite tal cual, lo que indica que los ácidos acético y benzoico se encuentran bajo forma de compuestos no arrastrables por vapor de agua.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS GRASOS FIJOS

a) OBTENCIÓN DE LOS MISMOS:

Para su obtención, siguiendo las indicaciones de Hilditch(4), se saponificaron aproximadamente 150 g. de aceite en las condiciones que pueden verse en la parte experimental. Posteriormente, se eliminó por destilación el etanol empleado en la saponificación, operación sumamente lenta hacia el final de la misma. Por eso, se resolvió eliminar el resto del alcohol por arrastre con vapor, empleando un erlenmeyer de 2 litros, y en medio alcalino, operación que demandó unas 2 horas. Este tratamiento pudo haberse evitado, ya que por acidificación de los jabones y arrastre en medio ácido, la eliminación del alcohol habría sido fácil, sin los inconvenientes de la intensa producción de espuma que tiene lugar trabajando en medio alcalino; pero como la misma operación sirvió para aislar los ácidos volátiles, hubo de hacerse en esa forma, pues el ácido acético libre se esterifica fácilmente con el alcohol etílico, ocurriendo lo mismo con algunos de sus homólogos superiores inmediatos.

Eliminado el alcohol, se acidificó la solución jabonosa con SO_4H_2 , empleando un 10% de éste en exceso, y se arrastró con vapor de agua durante 5 horas. El destilado fué reservado para las determinaciones sobre ácidos volátiles, y el producto no volátil, para el aislamiento de los ácidos fijos y del insaponificable.

Con ese fin, el líquido no arrastrable fué extraído repetidamente con éter etílico, aislándose así los ácidos grasos fijos y el insaponificable. Para eliminar el insaponificable, el conjunto se disolvió en alcohol y neutralizó a la fenolftaleína con solución de KOH. Los ácidos fijos se transformaron así en jabones permitiendo la separación posterior del insaponificable con éter etílico. Los ácidos fijos se aislaron de la solución jabonosa por acidificación con SO_4H_2 y extracción con éter. Luego se evaporó el disolvente, y se secaron dichos ácidos en estufa de vacío.

b) SEPARACIÓN DE ÁCIDOS "SÓLIDOS" Y "LÍQUIDOS":

Con este fin se trabajó sobre aproximadamente 115 g. de ácidos fijos, aplicando el macroproceso de Twitchell(5), modificado por Hilditch(6), que emplea el etanol de 96° como solvente de las sales de Pb de los ácidos "líquidos". Los resultados pue-

den verse en la parte experimental.

Los ácidos "sólidos" y "líquidos" fueron esterificados con alcohol metílico, obteniéndose así sus ésteres metílicos. Estos fueron sometidos a destilación fraccionada, en vacío de 1 - 3 mm. de Hg, empleando una columna que reúne las características dadas por Longenecker(7) y Whitmore y Lux(8), con material de relleno formado por hélices de vidrio de una vuelta(single turn glass helices), de aproximadamente 4 mm. de diámetro, y con calentamiento exterior para alcanzar en lo posible condiciones adiabáticas de destilación. Esta misma columna ya fué empleada anteriormente por Comastri(9), Grianta(10) y Schiariti(11), en el estudio de otros aceites vegetales.

Las destilaciones practicadas sobre los ésteres metílicos "sólidos" y "líquidos" proporcionaron una serie de fracciones que fueron pesadas y sobre las que se determinaron los índices de iodo y de saponificación. Con el valor de estos últimos se calcularon los pesos moleculares medios de cada fracción, estableciéndose para cada una de ellas sistemas de ecuaciones que permitieron su resolución en ésteres metílicos. Se calcularon entonces las composiciones % en ésteres metílicos y finalmente las composiciones en ácidos grasos % de ácidos grasos "sólidos" y "líquidos".

En los siguientes cuadros se da el detalle de ambas destilaciones y las composiciones % de ácidos "sólidos" y "líquidos".

Fracc nº.	Peso (g.)	Baño (°C)	Medio (°C)	Cabeza (°C)	II	IS	PVK	Oleico	C ₁₄	C ₁₆
1	1,13	210-216	175-177	110-138	2,0	217,5	257,4	0,03	0,50	0,60
2	1,92	216-217	177-195	138-141	0,0	209,8	266,9	-	0,19	1,73
3	2,07	217-225	195-215	141-143	1,1	208,1	269,1	0,02	0,60	1,99
4	4,68	225-270	215-260	143-160	47,9	196,2	285,3	2,61	-	1,86
R	2,21	-	-	-	51,9	178,6	313,4	1,34	-	-
Total: 12,01								4,00	0,75	6,18
Esteres y ésteres "sólidos"								33,31	6,25	51,45
Ácidos y ácidos "sólidos"								33,40	6,20	51,34

CUADRO 3

ESTERES "SÓLIDOS" - COMPOSICIÓN

2	2,14	222-226	200-204	140-152	89,3	200,1	279,8	0,27	0,60	0,32	0,95
3	5,06	226-234	204-206	152-157	135,3	191,9	291,8	-	0,52	1,15	3,39
4	7,59	234-235	206-208	157-158	135,8	191,1	293,0	-	0,46	2,30	4,83
5	7,47	235-240	208-213	158-159	135,8	190,6	293,8	}	0,70	7,19	12,31
6	12,73	240-255	213-255	159-	135,8	190,9	293,8				
R	4,78	-	-	-	99,4	189,7	295,2	-	-	4,03	0,75
Total: 40,83								1,04	2,28	15,06	22,45
Esteres y ésteres "líquidos"								2,54	5,59	36,88	54,98
Acidos y ácidos "líquidos"								2,51	5,56	36,81	55,01

CUADRO 3

ÉSTERES METÍLICOS "LÍQUIDOS" - COMPOSICIÓN

El cuadro que sigue resume los anteriores e indica además la composición % de ácidos fijos totales y % de aceite.

	Acidos % de áo. "sól."	Acidos % de áo. "líq."	Acidos % de áo. fij. tot.	Acidos % de aceite
Virfático	5,20	2,51	3,10	2,44
Palmítico	51,34	5,56	12,82	10,09
Estearico	1,75	---	0,30	0,24
Araquídico	2,51	---	0,40	0,31
Behénico	4,80	---	0,76	0,60
Oleico	33,40	36,91	36,35	28,60
Linoleico	---	55,01	46,27	36,40

DETALLE DEL CÁLCULO DE COMPOSICIÓN DE LAS FRACCIONES DE DESTILACIÓN
DE LOS ÉSTERES METÍLICOS "SÓLIDOS"

En todas las fracciones se consideró que los ésteres metílicos de ácidos no saturados estaban constituidos por oleato de metilo. Este criterio es exacto con respecto a las fracciones 1 y 3, dado que los índices de iodo de las mismas son sumamente bajos (2,0 y 1,1, respectivamente). En cuanto a la fracción 2, tiene $II = 0$. En lo que respecta a las fracciones 4 y 5 (residuo), se ha cometido un ligero error, dado que los índices de iodo de las mismas son relativamente elevados (47,9 y 51,9, respectivamente), siendo muy probable la presencia de linoleato de metilo en las mismas.

Una resolución exacta de la composición de estas 2 últimas habría involucrado oxidación con MnO_4K en acetona, para aislar los ésteres metílicos de los ácidos saturados, y determinar sobre éstos el peso molecular medio (PMM). Pero este procedimiento no se pudo realizar dada la pequeña cantidad de material disponible, que casi totalmente fué empleado en las determinaciones de peso molecular medio e índice de iodo (por duplicado).

Para la resolución de todas las fracciones se calculó oleato de metilo, empleando en todas ellas la expresión:

$$85,7 \cdot x = w \cdot I_w$$

en la que $\left\{ \begin{array}{l} 85,7 = II \text{ del oleato de metilo.} \\ x = \text{oleato de metilo.} \\ w = \text{peso de la fracción.} \\ I_w = II \text{ de la fracción.} \end{array} \right.$

Por diferencia entre el peso total de cada fracción y el oleato de metilo así calculado en cada caso, se tiene la cantidad de ésteres de metilo de los ácidos saturados, cuyo PMM se determina empleando la expresión:

$$\frac{x}{296,8} + \frac{y}{PM_y} = \frac{w}{PM_w}$$

en la que $\left\{ \begin{array}{l} y = w - x = \text{peso de los ésteres metílicos saturados.} \\ PM_w = \text{PMM de la fracción.} \\ PM_y = \text{PMM de los ésteres metílicos saturados.} \end{array} \right.$

El siguiente cuadro resume los valores de x (oleato de metilo) y PM_y encontrados en cada caso.

Nº.fracc.	Oleato de metilo(g.)	Esteres saturados (g.)	PM _y
1	0,03	1,10	256,4
2	-	1,92	266,9
3	0,02	2,05	268,8
4	2,61	2,07	272,6
5(B)	1,34	0,87	344,1

Para terminar el cálculo de estas fracciones, se resolvieron los ésteres metílicos de los ácidos saturados totales de cada fracción en sus componentes, para lo cual se tuvo en cuenta el valor de PM_y hallado y los pesos moleculares (PM_p y PM_v) de 2 términos consecutivos de la serie saturada, entre los cuales resultó comprendido PM_y en cada caso. Se resuelven sistemas del tipo:

$$p + v = y$$

$$\frac{p}{PM_p} + \frac{v}{PM_v} = \frac{y}{PM_y}$$

Los resultados obtenidos pueden verse en el cuadro 2.

DETALLE DEL CÁLCULO DE COMPOSICIÓN DE LAS FRACCIONES DE DESTILACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS "LÍQUIDOS"

Fracción 3.- Por su índice de iodo y peso molecular medio(135,3 y 291,8, respectivamente), el grueso de la fracción debe estar formado por oleato y linoleato de metilo; como el peso molecular medio es ligeramente inferior al del linoleato de metilo, es necesario admitir la presencia de palmitato de metilo. Por lo tanto se resuelve el siguiente sistema:

$$x + y + z = 5,06$$

$$\frac{x}{270,3} + \frac{y}{296,3} + \frac{z}{294,3} = \frac{5,06}{291,8}$$

$$85,7y + 172,6z = 5,06 \times 135,3$$

donde

$$\begin{cases} x = \text{palmitato de metilo} & = 0,52 \\ y = \text{oleato de metilo} & = 1,15 \\ z = \text{linoleato de metilo} & = \underline{3,39} \\ & \underline{5,06} \end{cases}$$

Fracción 4.- Se resuelve del mismo modo que la fracción anterior, aplicando el sistema:

$$x + y + z = 7,59$$

$$\frac{x}{270,3} + \frac{y}{296,3} + \frac{z}{294,3} = \frac{7,59}{293,0}$$

$$85,7y + 172,6z = 7,59 \times 135,8$$

donde

$$\begin{cases} x = \text{palmitato de metilo} & = 0,46 \\ y = \text{oleato de metilo} & = 2,30 \\ z = \text{linoleato de metilo} & = \underline{4,83} \\ & \underline{7,59} \end{cases}$$

Fraciones 5 y 6.- Ambas fracciones tienen los mismos valores de índice de iodo y peso molecular medio(135,8 y 293,8, respectivamente), por cuyo motivo se resuelven en forma conjunta, aplicando el sistema:

-17-

$$x + y + z = 20,20$$

$$\frac{x}{270,3} + \frac{y}{296,3} + \frac{z}{294,3} = \frac{20,20}{293,8}$$

$$85,7y + 172,6z = 20,20 \times 135,8$$

habiendo resultado

$$\begin{cases} x = \text{palmitato de metilo} = 0,70 \\ y = \text{oleato de metilo} = 7,19 \\ z = \text{linoleato de metilo} = \underline{12,31} \\ \hline 20,20 \end{cases}$$

Fracción 7 (residuo)..- Por su PVM e índices de Iodo (295,2 y 99,4, respectivamente), se trata evidentemente de una mezcla de oleato y linoleato de metilo, que se resuelve así:

$$x + y = 4,78$$

$$85,7x + 172,6y = 4,78 \times 99,4$$

donde

$$\begin{cases} x = \text{oleato de metilo} = 4,03 \\ y = \text{linoleato de metilo} = \underline{0,75} \\ \hline 4,78 \end{cases}$$

Fracciones 1 y 2..- Por sus índices de Iodo (41,3 y 89,3) es evidente la presencia de oleato y linoleato de metilo, ya que como ha sido demostrado por Hilditch (12), en presencia de una mezcla original que contenga estos ésteres, se obtendrá por destilación una serie de fracciones, en todas las cuales figurarán esos ésteres no saturados, cuyas tensiones de vapor son muy próximas. Por consiguiente, las fracciones 1 y 2 contendrán ésteres metílicos ~~líquidos~~ de, por lo menos, 3 ácidos diferentes. La resolución exacta de las mismas habría involucrado, como en el caso de las fracciones 4 y 5 de los ésteres metílicos sólidos, oxidación con VnO_4K , que no pudo efectuarse por sólo disponerse de 1,06 y 2,14 g. de fracciones totales. El mismo Hilditch ha establecido que en estos casos puede considerarse que los ésteres metílicos de los ácidos oleico y linoleico destilan en la misma relación que en las fracciones 3, 4 y 5, a las que corresponde un índice de Iodo de 150,7 y un PVM de 295,4. Teniendo en cuenta estos valo-

res se aplicó, en cada caso, la siguiente fórmula para calcular la cantidad de mezcla oleato-linoleato presente;

$$150,7 \cdot x = w \cdot I_w$$

en la que

$$\left\{ \begin{array}{l} x = \text{mezcla oleato-linoleato.} \\ w = \text{peso de la fracción.} \\ I_w = \text{II de la fracción.} \\ 150,7 = \text{II de la mezcla Oleato-linoleato.} \end{array} \right.$$

Por diferencia entre el peso total de la fracción y el valor de x hallado, se tiene la cantidad de ésteres metílicos saturados y , cuyo PM se deduce de expresiones del tipo:

$$\frac{y}{PM_y} + \frac{x}{PM_x} = \frac{w}{PM_w}$$

Finalmente se calculan las cantidades de oleato y linoleato de metilo, resolviendo sistemas del tipo:

$$\begin{aligned} p + v &= x \\ 85,7p + 172,6v &= 150,7x \end{aligned}$$

y la composición de los ésteres metílicos saturados, resolviendo sistemas del tipo:

$$\begin{aligned} m + n &= y \\ \frac{m}{PM_m} + \frac{n}{PM_n} &= \frac{y}{PM_y} \end{aligned}$$

en el cual: PM_m y PM_n son los pesos moleculares de los ésteres metílicos de 2 términos consecutivos de la serie saturada, que comprenden a PM_y .

El siguiente cuadro resume los valores de x y de PM_y encontrados en cada caso:

Nº. fracc.	Oleato-linoleato en g. (x)	PM _y
1	0,29	242,2
2	0,27	260,8

Las composiciones finales de estas fracciones pueden verse en el cuadro 3.

SOBRE LOS VALORES DE RECONSTRUCCIÓN

Para juzgar sobre la corrección de las determinaciones de composición de los ácidos "sólidos" y "líquidos" encontrados por destilación de sus ésteres metílicos, se calcularon los índices de saponificación e índices de Iodo de los mismos en función de las composiciones halladas.

El siguiente cuadro comprende esos valores y los encontrados por determinación directa de los ácidos "sólidos" y "líquidos", así como los de los ésteres metílicos "sólidos" y "líquidos".

	Indices de Iodo		Indices de Saponificación	
	Determ.	Calc.	Determinados	Calculados
Ac. "sólidos"	32,7	30,1	209,6	210,5
Ac. "líquidos"	130,1	133,0	206,0	201,6
Est. "sólidos"	30,7	28,6	200,2	199,2
Est. "líquidos"	123,0	126,5	193,4	192,0

Los valores de reconstrucción de estos índices con respecto al aceite no han sido calculados, dado que la composición cuantitativa de la parte del aceite que comprende los ácidos volátiles no ha sido establecida.

SOBRE EL ÍNDICE DE IODO DEL INSAPONIFICABLE

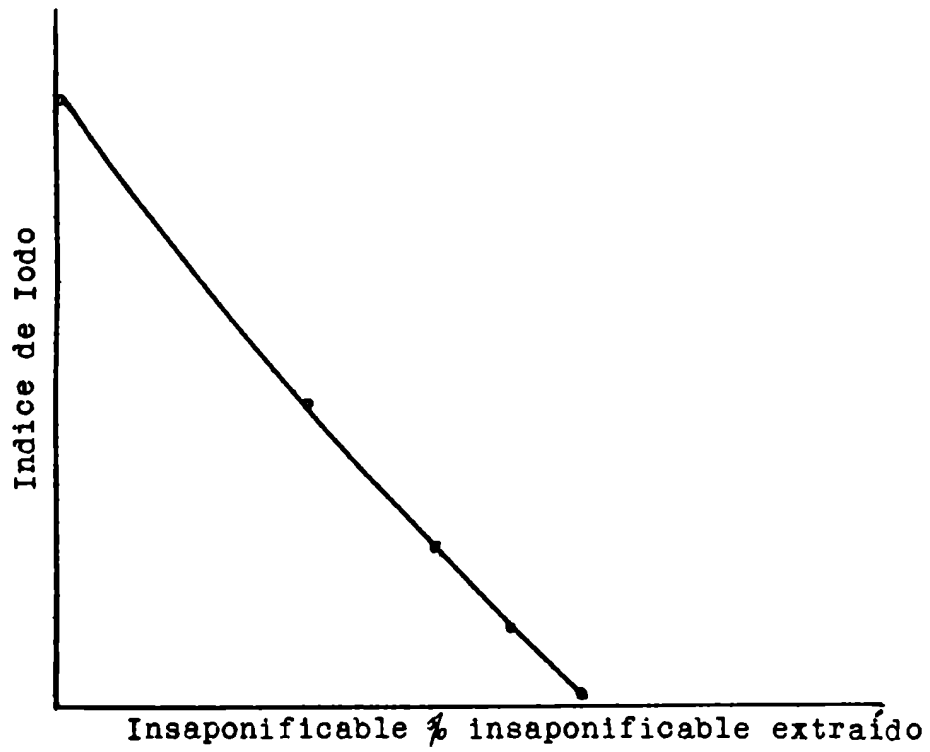
Con anterioridad, R. Rosovsky (13), estudiando el índice de iodo de los insaponificables de aceites vegetales, pudo demostrar que estos valores son función del grado de extracción del insaponificable, es decir que dependen de la cantidad del mismo que ha sido extraída y sobre la que se ha practicado la determinación del índice de iodo. Así, llegó a demostrar que los índices de iodo de insaponificable de aceite de oliva dependen fundamentalmente de la cantidad extraída. Aplicando la misma técnica de Rosovsky se determinó en el aceite de "Vaytenus Pisticha" la variación del índice de iodo del insaponificable en función de la cantidad del mismo extraída, habiéndose comprobado que ofrece un comportamiento semejante al de los aceites de oliva.

En el siguiente cuadro se resumen los resultados obtenidos por aplicación de dicha técnica.

Cantidad saponif. (g.)	Extr. N°.	Insap. extr. (g.)	Insap. extr. en %/extr. aceite	Insap. extr. hasta %/extr. aceite	II insap. %/extr.	I insap. total hasta %/extr.	II del total extraíd hasta %/extr.
25,3406	1	0,1707	0,67	0,67	225,0	65,4	225,0
	2	0,0427	0,17	0,84	120,6	81,8	204,1
	3	0,0219	0,09	0,92	103,2	90,2	194,7
	4	0,0136	0,05	0,98	91,9	95,4	189,1
	5a8	0,0119	0,04	1,02	96,0	100,0	184,8

Los valores de la columna 7 han sido representados gráficamente en función de los de la columna 8, pudiéndose observar fácilmente la notable influencia que sobre el índice de iodo del insaponificable tiene el grado de extracción del mismo.

REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA VARIACIÓN DEL ÍNDICE DE IODO EN
FUNCIÓN DE LA CANTIDAD % DE INSAPONIFICABLE EXTRAÍDO HASTA
CADA EXTRACCIÓN



PARTE EXPERIMENTAL

I - DETERMINACION DE CONSTANTES FÍSICAS Y QUÍMICAS.-

Fueron hechas siguiendo los métodos citados en el cuadro 1, que resume los valores encontrados.

II - SAPONIFICACION.-

Seguendo las indicaciones de Hilditch(4), 151,95 g. de aceite se saponificaron con 90 g. de KOH disueltos en 750 ml. de etanol libre de aldehidos, a baño maría durante 6 horas. Terminada la saponificación se recuperó el alcohol calentando sobre tela hasta que la destilación se hizo lenta y difícil. Como se sospechaba la presencia de ácidos volátiles (índice de Reichert Meissl) se hizo necesario eliminar totalmente el alcohol, antes de proceder a la separación de aquellos por destilación con vapor de agua, dado que se esterifican muy fácilmente. Por ese motivo, el producto obtenido de la recuperación del alcohol fué calentado a 100°C en estufa de vacío, hasta conseguir una buena eliminación del etanol remanente. Como todavía la eliminación no había sido total, se procedió a desalojarlo en medio alcalino por arrastre con vapor de agua, durante 2 horas, operación que se hizo lenta, debido a la gran formación de espuma.

III - SEPARACION DE LOS ACIDOS VOLATILES.-

El producto sometido a arrastre fué acidificado con 87 g. de SO_4H_2 ($D=1,84$), bajo forma de solución acuosa al 40%, con lo cual se neutralizaron los 90 g. iniciales de KOH, quedando además un exceso de ácido del 10%. Este ácido fué añadido desde una ampolla adaptada al aparato de arrastre, el cual además tenía una trampa de 2 bolas conectada al refrigerante. El arrastre con vapor se prolongó durante 6 horas, habiéndose recogido 2800 ml. de destilado.

IV - AISLAMIENTO DE LOS ÁCIDOS "FIJOS" MÁS INSAPONIFICABLE.-

La operación anterior proporcionó un producto ^{no} arrastrable por vapor, que contenía los ácidos "fijos" en esas condiciones, más el insaponificable y glicerina. La totalidad de estos productos fué transferida a una ampolla de decantación de 1 litro, donde se hicieron 4 extracciones con éter etílico, empleando 300 ml. por vez. Los extractos se juntaron en otra ampolla y se lavaron repetidamente con agua, agitando, para separar la acidez mineral, se separamos con SO_4Na_2 anhidro, recuperando luego el éter por destilación a baño maría. Los ácidos más insaponificable fueron secados en estufa de vacío hasta constancia de peso, obteniéndose 120,75 g.

V - SEPARACIÓN DEL INSAPONIFICABLE.-

La totalidad del producto obtenido anteriormente se disolvió en 500 ml. de etanol y llevó a reacción alcalina a la fenolftaleína por añadido de 30 g. de KOH disueltos en 100 ml. de agua. Se añadieron 400 ml. más de agua y se extrajo 10 veces con 300 ml. de éter por vez. Los extractos aislados fueron lavados varias veces con solución de alcohol al 10%, y los líquidos de lavado se añadieron a la solución de jabones. Los líquidos etéreos fueron secados con SO_4Na_2 , recuperando luego el solvente por destilación. Se secó el insaponificable en estufa de vacío hasta constancia de peso, obteniéndose 2,209 g., que representan el 1,45% sobre aceite.

VI - OBTENCIÓN DE LOS ÁCIDOS "FIJOS".-

La solución jabonosa anterior, librada del insaponificable, fué acidificada con 30 ml. de SO_4H_2 ($D = 1,84$) más 30 ml. de agua, y se extrajeron los sólidos liberados con éter etílico, mediante 3 extracciones, hecha cada una con 300 ml. Los extractos fueron lavados con agua y secados con SO_4Na_2 . Se recuperó el éter por destilación a baño maría, secando finalmente en estufa de vacío hasta constancia de peso. Se obtuvieron 119,55 g., que representan el 78,67% de aceite.

VII - SEPARACIÓN DE ÁCIDOS "SÓLIDOS" Y "LÍQUIDOS".-

Siguiendo el macro-procedimiento de Twitchell(5) modificado por Wilditch(6), 114,15 g. de ácidos "fijos" se disolvieron en 575 ml. de alcohol. A esta solución hirviente se añadió otra, también hirviente, de 80 g. de acetato de Pb en 575 ml. de alcohol, conteniendo 7,7 ml. de ácido acético glacial. La mezcla se

dejó por 12 horas a una temperatura de aproximadamente 15°C, al cabo de las cuales se observó un insoluble formado por sales de Pb de ácidos "sólidos". La parte líquida fué decantada y el insoluble recristalizado en 1 litro de alcohol, conteniendo 5 ml. de ácido acético glacial. Después de 12 horas, los jabones "insolubles" fueron aislados por filtración, lavándoselos con una pequeña porción de alcohol. El líquido obtenido en esta recristalización y los líquidos de lavado fueron añadidos al líquido decantado en la separación inicial, el que contenía los jabones de Pb de los ácidos "líquidos".

Los jabones "insolubles" fueron pasados a un vaso de precipitación y descompuestos con HCl (1:1) sobre baño maría. Los ácidos se separaron en una capa sobrenadante, y el calentamiento se prolongó hasta que la misma fuese límpida. Por enfriamiento, esta capa solidificó y fué fácilmente separada del líquido inferior, pasándola a una ampolla de decantación, en la que se disolvió en éter. El líquido y el precipitado ($PbCl_2$) fueron pasados a otra ampolla y extraídos repetidamente con éter etílico. Estos extractos se unieron al obtenido por disolución de la capa de ácidos, y el total se lavó repetidamente con agua, se secó con $CaCl_2$ y se recuperó el solvente. Los ácidos se secaron en estufa de vacío hasta constancia de peso, obteniéndose 16,12 g. de ácidos "sólidos".

Los líquidos alcohólicos que contenían los jabones "solubles" fueron sometidos a recuperación del alcohol a baño maría, con burbujeo constante de N_2 . La solución concentrada obtenida se pasó a una ampolla de decantación y se descompuso por agregado de HCl (1:1) hasta reacción ácida al rojo Congo. Los ácidos liberados fueron extraídos con éter etílico, habiéndose hecho 4 extracciones, empleando 250 ml. por vez. Como en el caso de los ácidos "sólidos", se procedió a su aislamiento, obteniéndose 96 g.

El siguiente cuadro resume los % de ácidos "sólidos" y de ácidos "líquidos" obtenidos, y las constantes de los mismos.

Ácidos	% aceite	% ácidos totales	II	III	PMW
"Sólidos"	12,48	15,88	32,7	209,6	267,2
"Líquidos"	66,18	84,12	130,1	206,0	271,8

VIII - ESTERIFICACIÓN CON ALCOHOL METÍLICO.- OBTENCIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS "SÓLIDOS" Y "LÍQUIDOS".-

Por separado se procedió a esterificar los ácidos "sólidos" y "líquidos", para lo cual se trabajó a reflujo sobre baño maría durante 3 horas, empleando una cantidad de CH_3OH 4 veces mayor que la de ácidos tratados, y 2% de SO_4H_2 concentrado ($D=1,84$) con respecto al alcohol usado. Después de recuperar por destilación el alcohol excedente, se pasó a una ampolla, diluyó con agua y se extrajeron con éter etílico los ésteres metílicos. Los extractos fueron agitados cuidadosamente con pequeñas porciones de solución acuosa de CO_2K_2 al 0,05%, para eliminar los ácidos no esterificados. Luego se lavó repetidamente con agua, y se secó con SO_4Na_2 , aislando los ésteres en la forma ya conocida.

El siguiente cuadro resume los rendimientos de esterificación y las constantes de los ésteres obtenidos.

Esteres	Acidos esterif. (g.)	Esteres obt. (g)	Rend. %	II	IS	PVM
"Sólidos"	13,66	14,13	98,8	30,7	200,2	279,7
"Líquidos"	50,00	40,80	94,0	123,0	193,4	289,0

IX - DESTILACIÓN.-

El fraccionamiento de los ésteres metílicos "sólidos" y "líquidos" fué realizado, como se ha dicho anteriormente, a 1 - 3 mm. de Hg, empleando la columna de Longenecker, con relleno de heliocoides cilíndricos de una vuelta, y observando las condiciones de destilación dadas por el autor. Los resultados obtenidos figuran resumidos en los cuadros correspondientes(3 y 2).

X - SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LOS ÁCIDOS VOLÁTILES.-

Según III (ver pág. 11), el arrastre con vapor de agua proporcionó los componentes ácidos volátiles contenidos en un destilado de aproximadamente 2800 ml. Fraccionadamente, este destilado fué extraído con porciones de 300 ml. de éter etílico por vez, haciendo un total de 10 extracciones. Los extractos etéreos se secaron con SO_4Na_2 ; y empleando una pequeña columna se recuperó el éter etílico, obteniéndose un residuo líquido que fué transferido cuantitativamente con pequeñas porciones de éter a un baloncito

de Willstätter, de 125 ml. Por destilación se separó el éter, que al igual que el recuperado anteriormente resultó ácido, indicando la destilación parcial de los ácidos extraídos.

El residuo obtenido fué sometido a destilación en el mismo baloncito, calentando sobre tela, y se obtuvieron 3 fracciones:

- a) P.EB.: 60-100°C
- b) P.EB.: 105-115°C
- c) P.EB.: 115-119°C

quedando un residuo de aspecto cristalino y olor desagradable (2,05 g.). La porción a tenía fuerte olor a acetato de etilo, mientras que las b y c, fuerte olor a ácido acético. Las cantidades de estas fracciones eran relativamente pequeñas, lo cual daba idea de que la mayor parte había quedado sin extraer en la capa acuosa. Por neutralización de ésta se consumieron 126,6 ml. de NaOH N, lo cual representa aproximadamente 7.6 g. de ácido acético.

XI - RECONOCIMIENTO DEL ÁCIDO ACÉTICO.-

Aproximadamente 1,5 g. de la fracción c de la destilación anterior fueron calentados a reflujo durante varias horas con 1,1 g. de anilina recién destilada. Por enfriamiento se obtuvo una masa cristalina, que recristalizada de agua, fundió netamente a 113 - 114°C. Un punto de fusión mezcla con acetanilida pura, no mostró depresión (P.F.: 114°C), con lo cual quedó confirmada la presencia de ácido acético.

XII - RECONOCIMIENTO DEL ÁCIDO BENZOICO.-

El residuo de la destilación que proporcionó las fracciones que contenían el ácido acético, fué secado en desecador de vacío con SO_4H_2 , y posteriormente recristalizado repetidamente de agua, separándose un producto cristalino, que fundió a 121-122°C. Como sobre una pequeña porción del producto no recristalizado se había hecho una determinación de peso molecular medio (índice de saponificación) y encontrado el valor de 129, se vió que la única sustancia que satisfacía este valor y el P.F. encontrado era el ácido benzoico. Se confirmó la suposición por P.F. mezcla entre el producto recristalizado y ácido benzoico puro, no observándose depresión en el P.F. de éste.

XIII - SOBRE LA PROBABLE EXISTENCIA DE ESTOS ÁCIDOS COMO GLICÉRICOS.-

Si los ácidos volátiles formasen parte de glicéridos, no esta-

rían en forma arrastrable por vapor de agua. Para verificarlo, 100 g. de aceite fueron sometidos a destilación por arrastre con vapor de agua, obteniéndose 1,5 litros de destilado. Este fué extraído repetidamente con éter etílico, y de los extractos reunidos, secados con SO_4Na_2 , se obtuvieron por evaporación del solvente y secado en estufa de vacío a 100°C , 0,0932 g. Esta cantidad es muy pequeña respecto de la que se esperaba obtener, teniendo en cuenta el alto valor del índice de Reichert-Weissl, y en consecuencia los ácidos volátiles no forman parte de compuestos arrastrables por vapor. Como una confirmación, sobre el aceite sometido a arrastre, se determinó el índice de saponificación, obteniéndose el valor de 244,8, prácticamente análogo al observado sobre el aceite tal cual (244,2).

Para establecer la probable existencia de glicéridos de ácidos volátiles, se procedió a la determinación de glicerina (ver pág. 4). Con ese fin se empleó el micrométodo de Gunner Blix (3) fundado en la formación de ioduro de isopropilo por acción del HI sobre el aceite. El ioduro de isopropilo destila y se transforma en bromuro de isopropilo y IBr, por reacción con una solución de bromo en ácido acético que contiene acetato de Na. Se destruye luego el exceso de bromo con HCOOH , y se valora el I_2 liberado por tratamiento con solución acuosa de IK en medio sulfúrico. El micrométodo empleado fué aplicado a cantidades de grasa que oscilan entre 10 y 30 mg. Estas cantidades fueron medidas a partir de una solución previamente preparada que contenía 1,0466 g. de grasa en 100 ml. de solución bencénica. El aparato usado no es exactamente el citado por los autores del método, pero es el microaparato para metoxilos descrito en la obra de Niederl y Niederl (14). La solución bencénica medida se colocó en el baloncito de reacción, y en corriente de N_2 se eliminó totalmente el solvente por calentamiento en baño de aceite, a temperatura no superior a 100°C . En el lavador se introdujo aproximadamente 1 ml. de solución de tiosulfato al 10% para retener el I_2 y el HI desprendidos durante el proceso. En el tubo receptor se colocaron 5 ml. de solución al 10% de acetato de Na anhidro en ácido acético glacial, libre de aldehidos, y 8-9 gotas de bromo. Evaporado el benceno, se añadieron al baloncito de reacción algunos granos de P rojo y 2 ml. de HI ($D=1,7$) y conectando las diversas partes del aparato se calentó el baloncito en baño de aceite a $130-140^\circ\text{C}$, en corriente de N_2 , graduando su velocidad de modo de obtener suave burbujeo en el tubo lavador. La destilación se prolongó alrededor de 4 horas, al término de las cuales se suspendió. El líquido del tubo colector fué transferido cuantitativamente a un erlenmeyer de 200 ml. con lavados de agua destilada, y se agregó 1 g. de acetato de Na. El exceso de bromo fué destruido por agregado de HCOOH puro, después de lo cual se añadieron 2 ml. de IK al 10%, y 5 ml. de SO_4H_2 2N. Después de 10 minutos, el I_2 liberado fué valorado con microbureta, con solución de tiosulfato N/30 cuyo título se estableció con una solución de IO_3K N/10. Como indicador se emplearon 5 gotas de solución de almidón soluble, al 2%, añadidas hacia el final de la valoración.

El siguiente cuadro resume los resultados obtenidos en las 6

determinaciones efectuadas.

Determ. Nº.	Grasa en determinac. (mg)	Glicerina encontr. (mg)	Glicerina %
1	10,466	1,059	10,12
2	10,466	1,044	9,97
3	20,932	2,041	9,75
4	20,932	1,989	9,50
5	31,398	2,987	9,51
6	31,398	3,064	9,76
Valor medio:			9,77

Estos valores pueden considerarse muy concordantes si se tiene en cuenta que el autor del método da diferencias máximas de 0,5 entre 2 determinaciones, y en nuestro caso la máxima diferencia es de 0,62. Por otra parte, los valores son muy concordantes para cantidades de grasa empleadas de 10 y 30 mg., en el mismo tiempo de destilación. Aunque el micro-método no fué controlado a partir de un glicérido puro por no disponerse de él, se atribuye valor a los resultados obtenidos, en vista de la concordancia de las diferentes determinaciones efectuadas.

XIV - SOBRE EL INDICE DE IODO DEL INSAPONIFICABLE.-

Los resultados obtenidos que figuran en la página 20, fueron hallados aplicando estrictamente la técnica de extracción y determinación del índice de iodo empleada por Rosovsky(13).

CONCLUSIONES

1) Las semillas de "Maytenus disticha" contienen alrededor de 50% de productos grasos solubles en éter de petróleo. Por separación mecánica del arilo y la semilla en sí, y extracción independiente de ambas partes con éter de petróleo, fueron obtenidos 2 diferentes productos. El correspondiente a los arilos es sólido, fuertemente coloreado en rojo, y representa alrededor del 63% de los mismos; el procedente del grano en sí es al principio ligeramente rojo, líquido, y representa alrededor del 48% del mismo.

2) Estudiando la composición química de este último aceite, se estableció la presencia de abundantes ácidos volátiles por vapor de agua, entre los que se caracterizaron acético (como acetanilida) y benzoico (como tal).

3) Por aislamiento de los ácidos no volátiles, separación de los mismos en "sólidos" y "líquidos", transformación de éstos en ésteres metílicos "sólidos" y "líquidos", y posterior fraccionamiento por destilación, se estableció su composición química, que resultó ser la siguiente:

Oleico	36,35%
Linoleico	46,27%
Mirístico	3,10%
Palmítico	12,82%
Esteárico	0,30%
Araquídico	0,40%
Behénico	<u>0,76%</u>
	<u>100,00</u>

En consecuencia, deben ser considerados componentes mayores hijos del aceite los ácidos oleico, linoleico y palmítico.

4) Tratando de establecer el probable estado de combinación de los ácidos volátiles, se comprobó que ni el acético ni el benzoico for-

man parte de glicéridos, como fué probado por determinación cuantitativa de glicerina. También se comprobó que esos ácidos no existen al estado de compuestos arrastrables por vapor de agua.

5) El método de Gunnar Blix para la determinación de glicerina en grasas y fosfátidos, empleado por nosotros, produjo resultados muy concordantes para determinaciones sobre 10 a 30 mg. de aceite.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Jorge H. Mendive. - Comunicación privada.
- (2) Jamieson. - "Vegetable Fats and Oils" - 2a. ed. - (1943) - p. 337.
- (3) Gunnar Blix. - Mikrochim. Acta - 1 , 75 , (1937).
- (4) Hilditch. - "The Chemical Constitution of Natural Fats" - London - (1941) - p. 367 y sig.
- (5) Twitchell. - J. Ind. Eng. Chem. - 13 , 806 , (1921).
- (6) Hilditch. - Obra citada. - p. 371.
- (7) Longenecker. - J. Soc. Chem. Ind. - 56 , 199 T. - (1937).
- (8) Whitmore y Lux. - J. Amer. Chem. Soc. - 54 , 3453, (1932).
- (9) Comastri. - "Composición química del aceite de uva argentina" . - Tesis - F.C.E.F.N. - (1942).
- (10) Orianta. - "Aceite de oliva argentino". - Tesis - F.C.E.F.N. - (1945).
- (11) Schiariti. - "Aceite de oliva argentino". - Tesis - F.C.E.F.N. - (1945).
- (12) Hilditch. - Obra citada. - p. 398.
- (13) Rosovsky. - "Sobre el índice de iodo de los insaponificables de aceites vegetales, con especial referencia a los de oliva". - Tesis - F.C.E.F.N. - (1944).
- (14) Niederl y Niederl. - "Organic Quantitative Microanalysis" - New York - 2a. ed. - (1942) - p.240