

**ANALISIS FITOQUIMICO Y FARMACOLOGICO
DE SOLANUM MARGINATUM**

Resumen del trabajo de tesis presentado por ARGELIA HERRERA
A. y GABRIEL KECÁN M. para optar al título de Químico - Far-
macéutico.

Presidente de Tesis: Dr. EDUARDO CALDERÓN G.

INTRODUCCION

Como una contribución al estudio de las plantas de la Flora Colombiana, con especialidad de aquellas que llaman la atención por sus propiedades tóxicas o medicinales atribuidas por el pueblo, y habiendo sido informados por el doctor Hernando García Barriga que la planta conocida en Bogotá con el nombre erróneo de Toronja presenta una acción tensioactiva, razón por la cual algunas gentes la emplean como sustituto del jabón para lavar pisos y ropas y que además es considerada popularmente como una planta venenosa, decidimos hacer un estudio fitoquímico de la planta, con el fin de buscar alcaloides u otros principios activos responsables de las propiedades atribuidas.

En el presente trabajo se desarrolla la marcha fitoquímica sistemática y se encuentra que hay presentes heterósidos de acción hemolítica y alcaloides; además se descubre que las semillas son ricas en aceite.

Una vez realizado el análisis cualitativo del fruto, se divide el trabajo en tres secciones:

Se realiza un estudio detallado del aceite, determinando sus constantes fisicoquímicas y su composición química. Se hace luego un estudio comparativo, en base al rendimiento obtenido, con los encontrados en las semillas de las plantas usadas industrialmente en la producción de aceites.

Se lleva a cabo la separación de los alcaloides por diferentes técnicas y se establece un método con el cual se obtiene un rendi-

miento aceptable. Se identifican los alcaloides por las técnicas clásicas de análisis orgánico y luego por métodos instrumentales, especialmente cromatografía y espectrofotometría.

Se efectúan ensayos farmacológicos en ratones y estudios hemodinámicos en perros, determinando la toxicidad del jugo y de los alcaloides responsables.

Briggs y colaboradores estudiaron en Nueva Zelanda un alcaloide separado de la *Solanum marginatum*, al cual denominaron *Solamargina*; pero como podrá apreciarse en el presente trabajo, este alcaloide no se encontró en la *Solanum marginatum* estudiada por nosotros, hallando sí un alcaloide relacionado a la *Solamargina*, pero no el identificado por ellos.

ESTUDIO BOTANICO

A. Clasificación botánica (1, 2).

División: Fanerógamas.

Subdivisión: Angiospermas.

Clase: Dicotiledóneas.

Subclase: Simpétalas.

Serie: Tetracíclicas.

Orden: Personatae.

Familia: Solanáceas.

Género: *Solanum*.

Especie: *Marginatum* (Linneo).

1. Sinónimos.

Solanum sactum Jacq.

Solanum argyrocatha Dun. Cours.

Solanum niveum All.

2. Nombres vulgares.

Departamento de Antioquia: "Lulo".

Departamento de Cundinamarca: "Toronja".

NOTA: Se conoce también con el nombre vulgar de "lulo" a la planta *Solanum quitoense*, cuyo fruto, morfológicamente similar a la baya del *Solanum marginatum*, tiene uso doméstico en la preparación de bebidas refrescantes.

B. Descripción botánica.

La planta *Solanum marginatum* se presenta en forma de arbusto de 1.50 mts. de alto, ocasionalmente hasta 3.00 mts., con

el tallo principal erecto, ramas secundarias numerosas, leñosas y con aguijones fuertes; la corteza de los tallos tiernos, jóvenes, con indumento blanco debido a los tricomas que son de este color. Figura número 1.

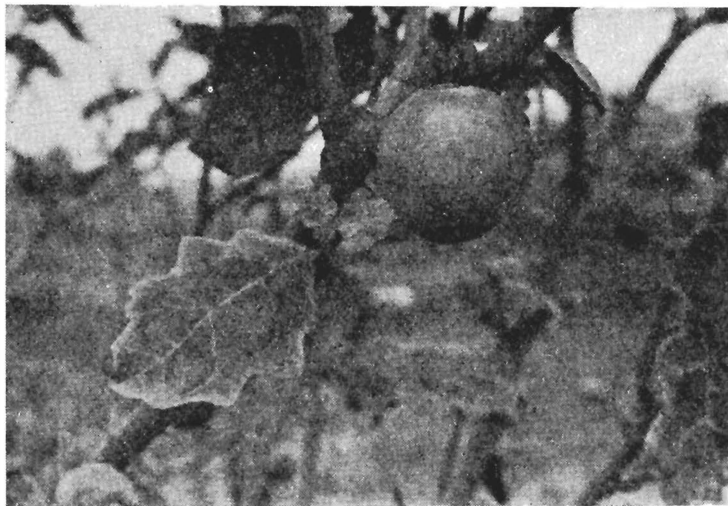


FIGURA 1

Hojas: Sinuado lobuladas, de 12-18 cmts. de largo, 8.5 - 12 cmts. de ancho; haz de color verde brillante, blanquecina en las márgenes y sobre los nervios principal y secundarios, debido a los tricomas blancos. Figuras números 2 y 3.

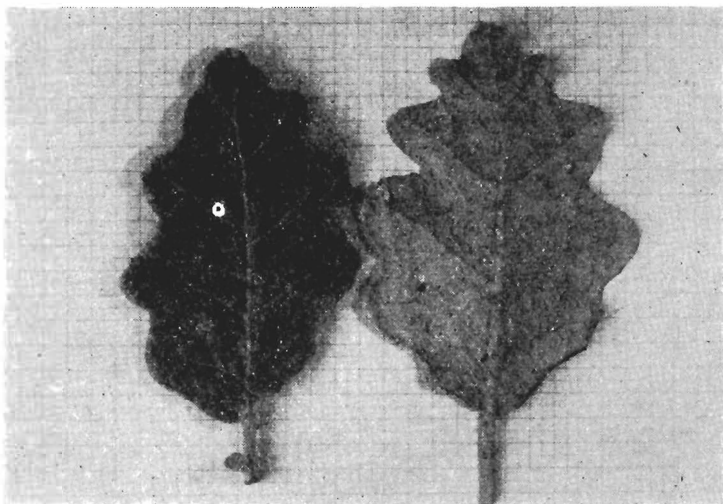


FIGURA 2



FIGURA 3

Inflorescencia con tres a seis flores, cáliz níveo tomentoso, sépalos ovado-elípticos de 1 cmt. de largo, 0.5 cmts. de ancho. Corola blanca de 3 cmts. de diámetro, anteras amarillas. Figura número 4.

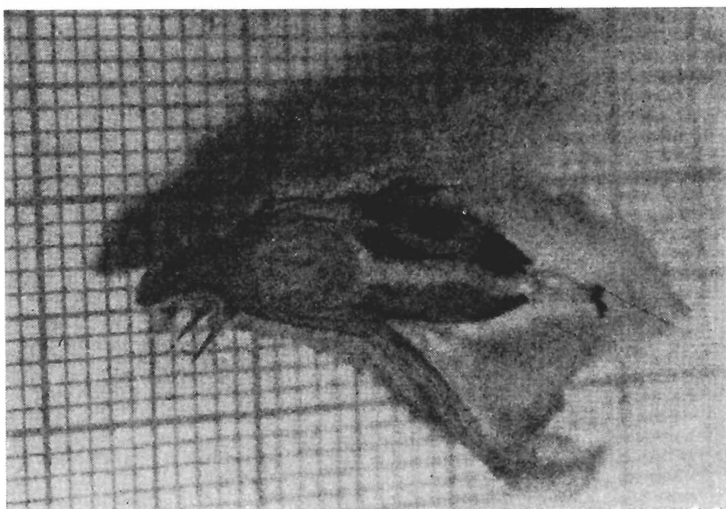


FIGURA 4

Fruto: Baya grande, 3.5 - 4.0 cmts. de diámetro, globosa, péndula, amarilla en la madurez, exocarpio apergaminado, liso o glabro, duro; mesocarpio jugoso de color amarillo verdoso, con numerosas semillas amarillas de textura dura. Figura número 5.

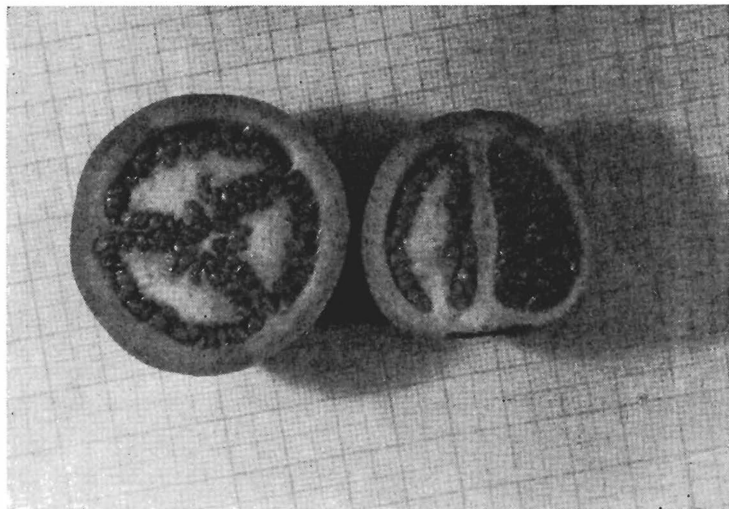


FIGURA 5

C. *Distribución geográfica.*

Especie de área de dispersión muy grande: se encuentra en el Asia y Africa tropicales.

En Colombia crece espontáneamente en lugares incultos, en climas fríos a una altura sobre el nivel del mar comprendida entre 2.600 a 3.500 mts.

ESTUDIO QUIMICO

GENERALIDADES

A. *Recolección del material.*

Iniciamos nuestro estudio con la recolección del material botánico, en potreros localizados entre los barrios San Fernando y Las Ferias, y sitios comprendidos en los alrededores del Campo Eucarístico de la ciudad de Bogotá.

Muestra del material botánico fue llevado al Herbario Nacional Colombiano y debidamente clasificado con el N° 115578 por el doctor Hernando García Barriga.

B. *Desecación del material.*

El material recolectado se subdividió en pequeños pedazos y se sometió a desecación en estufa a 40°C durante 48 horas.

Por ser de interés para el presente trabajo el fruto, debido a las características que presenta, seleccionamos las bayas desecadas, las pulverizamos y tamizamos por malla N° 80.

C. *Características del polvo del fruto.*

El polvo se presenta de color amarillo oscuro, olor característico, sabor amargo; su inhalación es irritante a la mucosa nasal que se manifiesta por piquiña seguida de estornudos.

D. *Examen microscópico del polvo.*

Para observar los elementos existentes en el polvo, se hicieron las preparaciones en hidrato de cloral al 10%. Los elementos que caracterizan el polvo del fruto del *Solanum marginatum* son: Restos de endospermo, mesocarpio y vasos en forma espiralada.

E. *Reacciones microquímicas (3).*

Como punto de partida para los posteriores análisis, realizamos sobre el polvo y el fruto, las reacciones microquímicas que se describen a continuación:

1. *Celulosa.*

Sobre un porta-objetos se coloca una muestra del polvo y se somete a la acción de los reactivos cloro - yoduro de zinc y carmín de Grenacher, observándose en ambos casos tinción del material.

2. *Principios volátiles.*

Un trozo del fruto se somete a calentamiento en un vidrio de reloj cubierto con un porta-objetos; al examinar al microscopio, no se observa ningún sublimado.

3. *Sustancias reductoras (monosacáridos).*

Se toma un pequeño trozo del fruto y se coloca sobre un porta-objetos junto con dos gotas de reactivo de Benedict; calentando por unos minutos, enfriando y examinando al microscopio, se observa la presencia de un precipitado rojo de óxido cuproso.

4. *Sustancias grasas.*

Una pequeña cantidad de polvo del fruto presenta fijación de color rojo, con el reactivo Sudan III.

ANALISIS PRELIMINAR

A. *Estudio del jugo.*

Continuamos el estudio químico en el jugo fresco, obtenido de las bayas maduras con cantidad suficiente de agua.

El jugo presenta las siguientes características: abundante cantidad de espuma color blanco; la fase líquida es de color amarillo claro, pero al contacto con el aire tanto la espuma como el extracto acuoso toman una coloración carmelita oscura. Es de sabor amargo y astringente, de carácter ácido al tornasol. Pesando 800 Gm. de frutos, extrayendo el jugo, lavando la pulpa residual con pequeñas porciones de agua, completando a un volumen final de 1.000 ml. y midiendo su pH al potenciómetro, se obtienen valores comprendidos entre 4.6 - 4.8.

B. *Ensayos preliminares (4).*

1. *Reacción a los indicadores.*

Con papel indicador universal da un pH entre 4.5 y 5.0. Su acidez nos indica la presencia de ácidos orgánicos libres o de sustancias fenólicas.

2. *Reacción con cloruro férrico.*

A unos mililitros del extracto acuoso se adicionan unas gotas de solución acuosa al 1% de cloruro férrico recientemente preparado, dando por resultado una coloración verde esmeralda; esto nos sugiere la presencia de sustancias tánicas o fenólicas.

3. *Acción del acetato de plomo.*

A unos 20 ml. del extracto acuoso se adiciona, gota a gota, solución de acetato de plomo; aparece un precipitado de color gris claro. El precipitado se filtra y al filtrado se le adiciona, gota a gota, solución de subacetato de plomo produciéndose una nueva precipitación. Esta reacción nos indica que pueden estar presentes: ácidos orgánicos, tanoides, proteínas y mucinas que precipitan con el acetato, así como gomas, mucílagos y heterósidos que precipitan con el subacetato.

4. *Acción del reactivo de Fehling.*

A 5 ml. de solución del reactivo de Fehling, se adiciona un ml. de jugo, se calienta suavemente en baño María y se observa reducción del reactivo. A unos mililitros del filtrado procedente de la precipitación con acetato de plomo, se les adiciona solución de oxa-

lato de sodio al 10%, gota a gota, hasta cuando no hay más formación de precipitado; se filtra y se comprueba que la reacción es neutra; se adiciona parte del filtrado a solución recientemente preparada del reactivo de Fehling observándose reducción del reactivo. Esto nos indica que en el jugo hay presentes azúcares reductores.

5. *Acción del reactivo de Tollens.*

Como en el caso anterior, hay reducción del reactivo con el jugo puro, y con el filtrado obtenido de la precipitación con acetato de plomo.

6. *Presencia de gomas, mucílagos y pectinas.*

A 5 ml. del jugo se adicionan unos 15 ml. de alcohol de 95 con 2% de ácido clorhídrico; no hay precipitación, indicando la ausencia de estas sustancias en el jugo natural.

7. *Alcaloides.*

Se determina la presencia de alcaloides haciendo uso de los siguientes reactivos: Dragendorff (DR), Bertrand (BER), Bouchardat (BOU), Marme (MAR), Valser (VAL), Hager (HAG), Mayer (MAY), Herrera (HER), Solución yodo-yodurada (SYY), Mandelin (MAN), Fröde (FRO), Marquis (MRQ) y Erdman (ERD). Las respuestas a estos reactivos aparecen en el cuadro I.

C. *Extracción con agua acidulada.*

Unos 20 Gms. de frutos se extraen con 200 ml. de agua caliente que contiene 2% de ácido clorhídrico obteniéndose una solución de color amarillo. Esta solución se filtra y se somete a la acción de los reactivos para alcaloides usados en el caso anterior. Además, se hacen pruebas con los siguientes reactivos: Solución de hidróxido de potasio al 10% (KOH), Solución al 5% de ácido fosfomolibdico en etanol de 95 (A. FM.), ácido nítrico concentrado, ácido sulfúrico concentrado y reactivo para taninos.

Los resultados se tabulan en el cuadro I.

Como las respuestas a todos los reactivos para alcaloides usados fueron positivas, se puede asegurar la presencia de una sustancia alcaloidal.

CUADRO I

REACTIVO	JUGO	EXTRACTO CON AGUA ACIDULADA
DR	Precipitado floculento anaranjado	Precipitado rojo naranja
BOU	Precipitado color carmelito	Precipitado carmelito
BER	Precipitado blanco (gris)	Precipitado blanco
MAR	Precipitado gris amarillento	Precipitado blanco
VAL	Precipitado floculento blanco	Precipitado blanco
HAG	Precipitado verde gelatinoso	Precipitado verde
MAY	Precipitado blanco gelatinoso	Precipitado blanco
HER	Negativo	Precipitado blanco
SY Y	Precipitado carmelito	Precipitado carmelito
MAN	Coloración rojo - violeta	Coloración amarillo - rosado - rojo - violeta
FRO	Precipitado rojo - violeta	Coloración rojiza
MRQ	Coloración amarilla que pasa a rojo vino con halo azul que pasa a verde	Coloración rojo - violeta
ERD	Coloración roja	Coloración amarilla - roja
KOH		Precipitado gelatinoso de color amarillo
A. FM.		Precipitado azul oscuro
HNO ₃ Conc.		Coloración amarilla
H ₂ SO ₄ Conc.		Color amarillo - rosado - rojo
R. Taninos	Precipitado blanco	Ligero precipitado

MARCHA FITOQUIMICA SISTEMATICA

Debido a las características tan importantes que ofrece el fruto, nos dedicaremos exclusivamente al análisis del mismo, dejando para otro estudio posterior el análisis de la hoja, tallo y raíces.

Iniciamos la marcha sistemática siguiendo la técnica de M. E. Wall y colaboradores, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (5), la cual comienza con la preparación de un extracto alcohólico del material fresco: se pesan 100 Gms. de los frutos, se dividen en pequeños trozos, se extraen los principios solubles en alcohol colocando el material en un balón de 1.000 ml., adicionando 500 ml. de alcohol de 95 y sometiendo a calentamiento bajo reflujo durante 6 horas en baño María; (el alcohol contiene 1% de carbonato de calcio). Se obtiene una solución de color amarillo oscuro; se filtra y en el filtrado se hacen los siguientes ensayos:

1. *Saponinas.*

Se toma 1 ml. del extracto alcohólico y se coloca en un tubo de ensayo; se adicionan 15 ml. de agua destilada, se tapa, se agita vigorosamente y se deja en reposo. Se produce una espuma que persiste por más de 12 horas. Esta prueba nos puede indicar la presencia de una saponina.

Para comprobar su presencia, efectuamos la prueba de la hemólisis, usando sangre humana estandarizada: se colocan en un tubo de ensayo 10 ml. de sangre estandarizada y 1 ml. del extracto alcohólico. La hemólisis se presenta de manera inmediata.

Estas pruebas nos indican que el fruto contiene un principio activo hemolítico, que posiblemente ha de ser un heterósido saponónico.

2. *Alcaloides.*

Del extracto alcohólico tomamos una alícuota de 50 ml., se evapora a sequedad sobre un baño María, quedando un residuo amarillo verdoso que se disuelve en agua ligeramente acidulada y ensayamos con reactivos para alcaloides indicados en el Cuadro I; las respuestas fueron todas positivas.

El extracto acuoso se alcaliniza con amoníaco y se extrae con cloroformo. Se repiten las pruebas para alcaloides, las cuales fueron en este caso, negativas.

De los resultados concluimos que hay presentes alcaloides insolubles en cloroformo.

3. *Taninos.*

Con otra porción del residuo evaporado, se hace una mezcla con 25 ml. de agua, se filtra y sobre el filtrado ensayamos taninos por la acción del cloruro férrico al 5%. Se produce una ligera coloración verdosa la cual se puede considerar positiva.

Sobre el mismo filtrado probamos la reacción con solución de gelatina sal, obteniendo como resultado una ligera precipitación blanca de aspecto floculento. Considerando estas dos reacciones positivas, se concluye que hay presentes taninos.

4. *Esteroles insaturados.*

15 ml. del extracto alcohólico se evaporan a sequedad; se disuelve el residuo en cloroformo y se le hace la prueba de Liebermann-Buchard para esteroles insaturados. La reacción es positiva.

MARCHA FITOQUIMICA SEGUN FLORIANI

Finalizado el análisis según la técnica de M. E. Wall y colaboradores, el cual es únicamente orientador, procedemos a efectuar una marcha más detallada según el método rápido de Floriani (6), especial para plantas medicinales. Este método consta de dos partes: Extracción con éter-cloroformo y destilación con arrastre de vapor.

Por este método se estudiaron separadamente el fruto total y las semillas.

A. *Fruto total.*

1. *Primera parte: Extracción con éter - cloroformo.*

50 Gms. de las bayas, sometidas a desecación a 40° C, pulverizadas y tamizadas por malla Nº 30, se someten a extracción continua en soxhlet durante 6 horas, usando como solvente una mezcla a partes iguales de éter y cloroformo. Se obtiene una solución (A-1) y un residuo (R-1). De la solución (A-1) evaporamos el solvente; el residuo de esta evaporación se trata con agua destilada, calentando sobre baño María, se deja enfriar y se filtra; el filtrado es de apariencia lechosa y lo denominamos solución (A-2). Queda un residuo (R - A - 1). En esta solución investigamos alcaloides, ácidos orgánicos y fenoles:

a) Alcaloides: Se toma una alícuota de la solución, se coloca en una ampolla de decantación, se alcaliniza con hidróxido de sodio al 10% y se extrae con cloroformo; del cloroformo se extrae con agua

acidulada (HC l), y, en esta solución acuosa, ensayamos reactivos para alcaloides.

Inicialmente no hubo reacción, pero a las 24 horas se observaron cristales con algunos de los reactivos.

Los resultados se tabulan en el Cuadro II.

CUADRO II

REACTIVO	RESPUESTA A LAS 24 HORAS
Dragendorff	Cristales en forma de gránulos
Marme	Cristales en forma de agujas
Bertrand	Cristales en forma de agujas
Bouchardat	Cristales en forma de gránulos
Valser	Negativo
Mandelin	Negativo
Fröde	Negativo

Se puede concluir que hay alcaloides presentes, solubles en éter-cloroformo, aunque su cantidad es pequeña.

b) Ácidos orgánicos: Reacción neutra al tornasol. No se produce efervescencia con el bicarbonato de sodio. Concluimos que no hay ácidos orgánicos.

c) Fenoles: Reacción positiva con el cloruro férrico al 1%.

El residuo (R - A - 1) se seca y se redissuelve en éter-cloroformo; se evapora el solvente y se trata con etanol de 80 hirviendo; se filtra en caliente obteniéndose la solución (A - 3) y el residuo (R - A - 3).

La solución (A - 3) se deja enfriar y vuelve a filtrarse; en el filtrado, solución (A - 4), investigamos resinas, obteniendo un resultado negativo para éstas. En el residuo (R - A - 4) de esta filtración, se investigan ceras pero éstas también dan resultado negativo.

En el residuo (R - A - 3) se investigan grasas, dando resultado positivo para el reactivo Sudan III. Este mismo residuo se saponifica con solución alcohólica de hidróxido de potasio, se evapora el etanol, se trata con cloroformo y se filtra. En el filtrado, solución (A - 5), se investiga fitosterol: 0.5 ml. del extracto clorofórmico, adicionados de 2 ml. de anhídrido acético, se calientan hasta disolución completa, se deja enfriar y se adiciona una gota de ácido sulfúrico; una coloración verde esmeralda indica la presencia de fitosterol.

El residuo (R - A - 5) se somete a ensayo para ácidos grasos: se acidula con ácido clorhídrico al 10%; se produce efervescencia quedando luego una capa grasa sobrenadante que indica la presencia de ácidos grasos. El residuo (R - 1) se seca a la temperatura ambiente, se coloca en un soxhlet y se agota durante 6 horas con propanona. Se filtra dando la solución (A - 6) y el residuo (R - 2).

Se evapora el solvente de la solución (A - 6); el residuo se trata con éter etílico puro y neutro, se agita y se filtra a los 30 minutos; se obtiene la solución (A - 7) y el residuo (R - 3). En este residuo investigamos principios amargos, dando un resultado negativo.

La solución (A - 7) se somete a una corriente de amoníaco seco y se filtra: se obtiene la solución (A - 8) y el residuo (R - 4).

En la solución (A - 8) se investigan alcaloides, cuyo resultado es positivo, considerando como positivos leves cambios en los reactivos.

En el residuo (R - 4), que es de color carmelita oscuro, investigamos pigmentos flavónicos y resinas. El resultado es negativo.

2. Segunda parte: Destilación con arrastre de vapor.

50 Gms. de material fresco, desecado, pulverizado y tamizado por tamiz N° 30 se someten a una destilación con arrastre de vapor de agua. En el destilado se investigan alcaloides volátiles, ácidos volátiles y aceites esenciales. El resultado es negativo en todos los casos.

El residuo se trata con 500 ml. de agua destilada, se hierve durante media hora y se filtra en caliente; (fue necesario filtrar a través de una tela, ante la imposibilidad de filtrar por papel, algodón o lana de vidrio, aun al vacío). Este filtrado se evapora hasta extracto seco; se trata luego con etanol de 98, se hierve y se filtra en caliente. Se obtiene: solución (B - 1) y residuo (R - B - 1). En este residuo investigamos la presencia de sales minerales por calcinación, obteniendo resultado positivo; a la llama se comprueba la presencia de sales de sodio y potasio. También se investigan en este residuo, la presencia de gomas y mucílagos por la reacción con el ácido nítrico (7), dando un resultado negativo.

La solución (B - 1) se enfría en una mezcla de hielo y sal común, y se filtra a las 24 horas. Se investigan saponinas en una alícuota del filtrado, siendo negativo el resultado. El resto de la solución (B - 1), se mezcla con tres veces su volumen de éter etílico y se filtra; se obtiene la solución (B - 2) y el residuo (R-B-2).

En la solución (B - 2), se investigan alcaloides y tanoides. Para alcaloides únicamente dieron resultado positivo los reactivos de Dragendorff y Bouchardat. Los tanoides se investigan con solucio-

A. *Técnica de extracción.*

Antes de entrar al proceso real de extracción del aceite, se requieren varias operaciones mecánicas que preparan la semilla para tal fin:

1. *Separación y lavado de las semillas.*

Se tomaron bayas maduras de tamaño uniforme, se lavaron y partieron transversalmente; por medio de un chorro de agua se separaron las semillas del pericarpio, se recogieron sobre una malla fina (N^o 20) y se lavaron sobre ésta hasta que quedaron completamente libres de restos de pericarpio y el agua del lavado no produjo más espuma.

2. *Secado de las semillas.*

Las semillas se extendieron sobre una bandeja en un espesor adecuado que permitiese la penetración del calor y se colocaron en la estufa con corriente de aire a 40° C durante dos días.

3. *Molienda.*

Una vez secas, se molieron por molino tipo Corona, obteniéndose una harina de consistencia pastosa.

4. *Extracción.*

La harina obtenida anteriormente se pesó y se sometió a extracción continua durante 6 horas (para asegurar extracción completa) en un soxhlet, usando como solventes mezcla de éter-cloroformo o disolvente 10-20.

Se procedió luego a la separación del aceite, en primer término por destilación, para recuperar la mayor parte del solvente; se evaporaron luego las últimas trazas de solvente y se filtró. Este aceite, así obtenido, se sometió a enfriamiento, formándose un precipitado que se separó por centrifugación y filtración posterior.

El aceite obtenido de esta manera fue usado para la determinación de su composición química y sus constantes físicas y químicas.

B. *Análisis (8) (12).*

1. *Características organolépticas.*

Estado físico: líquido.

Color: amarillo.

Olor: característico.

Sabor: característico.

En realidad es difícil dar un concepto exacto sobre el color, sabor y olor del aceite, ya que se pudo comprobar que estas propiedades varían de acuerdo al solvente empleado en la extracción, así: usando mezcla de éter-cloroformo, el color del aceite es amarillo oscuro, con olor y sabor semejantes a los de la manteca de cacao. Con disolvente 10 - 20, el color es más claro y su olor y sabor no pueden determinarse exactamente.

2. *Constantes físicas.*

Peso específico: 0.918 (15° C).

Índice de refracción: 1.4750 (20° C).

Acción de la luz U.V.: Fluorescencia amarillo-cremosa.

3. *Acción de disolventes.*

Eter: soluble.

Etanol: insoluble.

Metanol: insoluble.

Benceno: soluble.

Cloroformo: soluble.

Eter de petróleo: soluble.

Acetona: soluble.

Acido acético: soluble.

Tetracloruro de carbono: soluble.

4. *Constantes químicas (11).*

Índice de acidez: 5.0.

Índice de saponificación: 181.

Índice de ésteres: 176.

Índice de yodo: 144.

Índice de yodo absoluto: 148.

Índice de cianógeno (9, 10): 58.2.

Materia insaponificable: 2.35%.

Título: 14 - 16° C.

5. *Determinación de los ácidos grasos sólidos y líquidos.*

Según Tortelli y Rugieri (8), el método para la determinación de los ácidos grasos líquidos y sólidos de una grasa, se lleva a cabo aprovechando la diferencia de solubilidades de las sales de plomo en el éter: las sales plúmbicas de los ácidos sólidos son insolubles en éter, mientras que las de los ácidos líquidos se disuelven fácilmente.

Partiendo de 20 Gms. de la grasa en examen y siguiendo la técnica, se obtuvieron los siguientes resultados:

Ácidos líquidos: 74.5%.

Ácidos sólidos: 8.2%.

Los principales ácidos grasos presentes en el aceite de semillas de solanáceas (13), pueden ser: ácido oléico, ácido linoléico, ácido palmítico y ácido esteárico.

C. *Determinación de la composición química del aceite por cromatografía de gases (14).*

Para esta determinación, seguimos la técnica de transesterificación (15), la cual consiste en la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, por un proceso de catálisis de KOH en metanol, evitando totalmente cualquier traza de humedad mientras ocurre la reacción. La técnica seguida por nosotros fue la indicada de transesterificación por catálisis con KOH, pero en lugar de usar solución de KOH 0.2 N en metanol, adicionamos la potasa sólida a la mezcla de metanol y aceite anhidros. La técnica seguida se indica a continuación: Se pesan con exactitud unos 5 Gms. del aceite a investigar, se le adicionan 25 ml. de metanol anhidro y unas 5 perlas de KOH bien secas; la mezcla se somete a calentamiento a reflujo sobre baño María durante 4 horas, hasta que sea homogénea y luego se mantiene por un tiempo posterior de 20 minutos. La mezcla se deja enfriar y se le adiciona un volumen igual de agua fría dando una solución opalescente. Los ésteres metílicos se extraen con tres porciones de éter sulfúrico; los extractos se combinan y lavan con pequeñas porciones de agua destilada hasta que no den coloración a la fenolftaleína; el extracto etéreo así obtenido, se seca sobre sulfato de sodio anhidro y posteriormente se filtra; el residuo del éter se remueve por medio de una corriente de aire seco y luego se dejan los ésteres durante dos horas en estufa a 50 grados C para remover cualquier resto de éter que pueda aún permanecer.

Los ésteres así obtenidos fueron llevados a separación en el cromatógrafo de gases PERKIN ELMER 820, el cual se operó en las siguientes condiciones:

Detector de conductividad térmica con corriente de 200 miliamperios.

Corriente de helio a 41 libras.

Flujo de 28 milímetros por minuto.

Columna BDS (Butanediol succinato al 15% en Chromosor W).

Longitud: 12 pies (3.66 m.).
Diámetro: $\frac{1}{8}$ pulgada (0.32 cm.).
Tubo de acero inoxidable.

Temperatura del inyector: 250 grados C.
Temperatura de la columna: 210 grados C.
Temperatura del detector: 215 grados C.
Atenuación: 1.

Volumen de la muestra inyectada para una buena separación: 0.2 microlitros. Bajo estas condiciones, el orden de salida de los ésteres fue el siguiente:

Palmitato de metilo.
Estearato de metilo.
Oleato de metilo.
Linoleato de metilo.

Los resultados obtenidos se observan en el correspondiente cromatograma.

Comparados los tiempos de salida con patrones en idénticas condiciones, Palmitato y Oleato, se determinaron estos dos ésteres; los otros se determinaron por comparación en cromatogramas tipo, suministrados por Perkin Elmer, obtenidos en condiciones similares (16).

Composición cuantitativa.

Por los cromatogramas obtenidos se puede determinar la composición en porcentaje de cada uno de los ésteres de los ácidos grasos que componen el aceite; esta determinación cuantitativa se hace por el método de normalización interna (17), para lo cual es necesario integrar las áreas de cada uno de los picos obtenidos; esta integración se hizo por triangulación, midiendo la altura a la línea base y el ancho a media altura.

Area: Altura x ancho a media altura.

La cantidad por ciento de cada componente, se obtiene de la siguiente relación:

$$\% \text{ Compuesto A} = \frac{\text{Area del compuesto A}}{\text{Suma total de áreas de todos los compuestos}}$$

De los cromatogramas hechos con diferentes esterificaciones del aceite, extraídos en diversas ocasiones, con muestras distintas

de material, se obtuvieron los siguientes porcentajes de los compuestos:

Palmitato:	8.05%.
Estearato:	4.83%.
Oleato:	12.62%.
Linoleato:	74.49%.

Sin tener en cuenta las trazas de otros ácidos grasos, los cuales escasamente se pueden detectar en la cromatografía y cuyo porcentaje no alcanza al 1%. (Figura Nº 6).

D. *Ensayo de toxicidad del aceite.*

Con el fin de determinar si el aceite encontrado, podría usarse como alimento, hicimos un ensayo tentativo de toxicidad de la siguiente manera: Se tomaron 10 ratones blancos de 28 Gms. de peso promedio, se les administró alimento (Finca) impregnado con buena cantidad de aceite y se mantuvieron en observación bajo esta dieta durante 5 días. En los 10 ratones no se observó efecto tóxico alguno, ni pérdida de peso.

E. *Rendimientos obtenidos en el proceso de extracción.*

En el Cuadro IV presentamos valores de los rendimientos encontrados por nosotros, tanto en el porcentaje de semillas del fruto, así como el porcentaje de aceite obtenido en las semillas secas.

F. *Estudio comparativo del rendimiento (18, 19, 20).*

Las plantas industrialmente usadas para la extracción de aceite, presentan los rendimientos promedio que aparecen en el Cuadro V. Es fácil apreciar que las semillas del *Solanum marginatum*, ofrecen un rendimiento comparable al de las semillas de girasol y soya y superior al del algodón, tung, oliva y palma africana.

CROMATOGRAFIA DE GASES

ACEITE DE SEMILLAS DE "SOLANUM MARGINATUM"

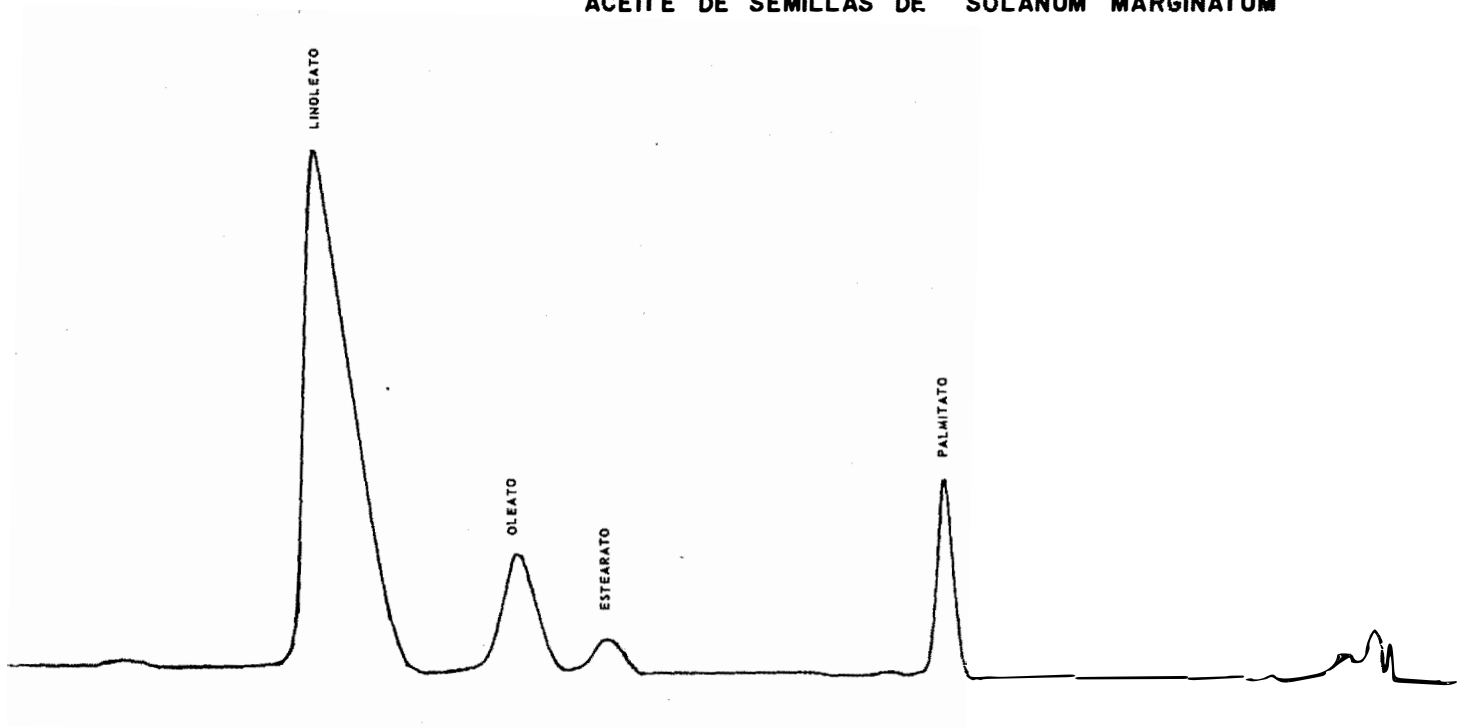


FIGURA No. 6

CUADRO IV

PESO FRUTOS MADUROS (Gm.)	PESO SEMILLAS SECAS (Gm.)	%	PESO SEMILLAS MOLIDAS (Gm.)	PESO ACEITE EXTRAIDO (Gm.)	%
210	66	31.43	50	11.5	23
720	180	25.0	50	12.0	24
600	91	16.0	50	10.0	20
150	27.8	18.5	150	33.5	22
230	50.2	21.8	50	8.5	17
186	40.9	22.0	91	17.8	19.5
425	73.1	17.2	50	12.5	25
800	164.0	20.5	50	9.8	19.6
810	147.4	18.2	50	10.2	20.4
360	70.2	19.5	50	11.4	22.8

Rendimiento promedio de semillas en el fruto: 21.01%

Rendimiento promedio de aceite en las semillas: 21.3%.

CUADRO V

ACEITE	RENDIMIENTO %
Copra	64
Nuez de palma	47
Ricino	45
Maní descascarado	45
Ajonjolí	45
Colza	35
Linaza	34
Maní con cáscara	32
Girasol	25
Soya	17
Tung	16
Algodón	15
Oliva	15
Palma Africana	14

G. *Comentario.*

1. Del estudio comparativo del rendimiento del aceite, creemos que valdría la pena tenerlo en cuenta para un posible uso industrial, sabiendo que en Colombia existe un déficit de 44% de producción (18, 20).
2. De acuerdo a los análisis efectuados sobre el aceite, éste podría clasificarse dentro del grupo de los aceites semise-cantes.
3. Teniendo en cuenta los resultados de la prueba de toxicidad, sería posible darle uso como aceite comestible.

ESTUDIO DE LOS ALCALOIDES

En la marcha fitoquímica sistemática se determinó la presencia de alcaloides, los cuales tratamos de clasificar e identificar utilizando métodos químicos e instrumentales.

Teniendo en cuenta las referencias bibliográficas, se sabe que las solanáceas contienen alcaloides del grupo del tropano (21, 22), atropina, hiosciamina, escopolamina, etc. y gluco-alcaloides de estructura esteroideal (23, 24, 25), solanina, tomatina, solasonina, solauricina, solangustina, solanocapsina y solamargina.

Inicialmente, para determinar a cuál de estos dos grupos pertenecen los alcaloides presentes en esta planta, se siguió la técnica de extracción con solución de ácido tartárico al 10% y posterior separación con éter (26). El resultado negativo obtenido con los reactivos de alcaloides sobre el extracto etéreo (27), nos indica

la ausencia de alcaloides del grupo del tropano. Por el anterior resultado, es fácil suponer que se encuentran gluco alcaloides de estructura esteroidal, lo cual se comprueba haciendo una extracción general de alcaloides con alcohol amílico y sometiendo el extracto a la acción de reactivos específicos (28), cuyos resultados fueron positivos, como se aprecia en los cuadros VII y VIII.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ALCALOIDES TOTALES

Para determinar que el contenido de alcaloides justifica un trabajo posterior de separación e identificación, ensayamos una extracción global de alcaloides, utilizando diferentes solventes; aprovechando que el mejor rendimiento se obtuvo con alcohol amílico, se procedió a una determinación cuantitativa neta de la siguiente manera:

Se pesaron 200 Gm. de frutos maduros frescos, se partieron en pequeños trozos y se sometieron a extracción con 500 ml. de alcohol amílico adicionado de 20 ml. de solución concentrada de amoníaco. Se calentó a reflujo sobre baño María durante 6 horas, se separó la fase alcohólica por filtración, y el residuo se sometió de nuevo a extracción con igual cantidad de alcohol amílico. Se reunieron los extractos alcohólicos y a continuación se evaporó el solvente sobre baño María hasta sequedad. Como producto final se obtuvo una sustancia de color carmelita, que presenta al microscopio aglomeraciones de cristales, unos en forma de agujas y otros en forma de hojas planas; estas sustancias en solución con ácido clorhídrico al 1%, dan positivas las pruebas con los reactivos para alcaloides.

La cantidad obtenida de alcaloides totales fue de 9.95 Gm., que equivale a un rendimiento global del 5%.

Como se puede apreciar que la cantidad de alcaloides presentes es relativamente abundante, procedemos a su separación, purificación e identificación.

A. *Identificación de los alcaloides en el fruto, su obtención y purificación.*

1. *Identificación.*

Partiendo de la base de que los alcaloides presentes en las bayas de *Solanum marginatum* son de estructura esteroidal, llevamos a cabo las siguientes pruebas preliminares de identificación:

a) Se tomaron unos 0.5 Gm. de polvo del fruto y se trataron con ácido sulfúrico moderadamente concentrado; en unos segundos, se produjo una coloración rojo vino (28).

b) Se tomaron 0.5 Gm. de polvo del fruto y se les adicionó ácido nítrico medianamente concentrado; en pocos segundos se observó una coloración rojo ladrillo (28).

c) 5 Gm. del polvo del fruto se extrajeron con alcohol caliente hasta agotamiento; el extracto alcohólico se concentró a sequedad y el residuo se extrajo con agua acidulada con clorhídrico. La solución acuosa dio una fuerte coloración carmelita oscura; se filtró sobre papel, del filtrado se tomaron 2 ml. y se les agregaron dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. Inicialmente se observó una coloración amarilla que pasó a rosado y finalmente a rojo violeta (29).

2. Separación y purificación.

Para la separación y purificación de los alcaloides ensayamos, entre otras, la técnica de Stas-Otto (30), siendo bastante tediosa y de bajo rendimiento. Probamos luego el método de extracción según Meyer (30). Acondicionando este método, para el tipo de fruto que tenemos, se operó de la siguiente manera: Se pesaron 720 Gm. de frutos maduros y se preparó un extracto acuoso; el jugo se separó de la pulpa por expresión en una tela, lavando el residuo con porciones de 500 ml. de agua por cuatro veces consecutivas; los extractos acuosos se reunieron y se dejaron en reposo durante 24 horas en refrigerador, decantando el líquido sobrenadante del precipitado que se formó durante el reposo; el residuo se lavó con nuevas porciones de agua destilada, se filtró y se reunió con la fracción acuosa separada por decantación. Los extractos acuosos así reunidos se alcalinizaron con solución concentrada de amoníaco, se evaporó el agua por calentamiento a 90 grados C, quedando una masa negra de aspecto resinosa; de esta masa resinosa se hizo extracción con alcohol caliente durante tres veces, se filtró el extracto alcohólico y se evaporó el solvente hasta consistencia de miel espesa; este extracto se dejó en maceración durante una noche con 200 ml. de solución al 2% de ácido sulfúrico; el líquido se filtró y se precipitó con amoníaco, dando un precipitado de aspecto gelatinoso color gris oscuro, el cual se lavó varias veces con agua destilada y se sometió a recristalización con etanol-agua.

Los alcaloides así obtenidos, se purificaron aún más por disolución en ácido acético al 2%, precipitación con amoníaco y cristalización en alcohol amílico durante 4 veces; recristalizado final-

mente en etanol, se obtuvo un sólido que presenta al microscopio agujas y hojas planas. El rendimiento obtenido en este caso fue de 0.05%. Los cristales obtenidos por este método se usaron posteriormente para las pruebas de identificación.

Por cromatografías, en papel y capa delgada, se determinó que los alcaloides obtenidos por este método, eran dos sustancias con valores de Rf diferentes. Estos valores de Rf, corresponden a los de la Solanina y Tomatina dados por la bibliografía.

3. *Procedimiento definitivo para la obtención de alcaloides.*

Aprovechando las propiedades fisicoquímicas de los alcaloides glucosídicos y las experiencias obtenidas por las extracciones anteriores, desarrollamos la siguiente técnica, con la cual se obtuvo únicamente el alcaloide de mayor Rf, el cual designamos como Tomatina:

Se seleccionaron frutos maduros que no presentasen deterioro producido por insectos o microorganismos, se pesaron 500 Gm., los cuales se partieron en trozos pequeños y se sometieron a extracción con 1 litro de etanol de 95 que contenía 10 ml. de solución concentrada de amoníaco y 8 Gm. de carbonato de calcio; esto con el fin de liberar los alcaloides de los tejidos vegetales; se calentó a reflujo sobre un baño María por término de 8 horas, se separó el extracto alcohólico por filtración en un lienzo y el residuo se sometió de nuevo a otras dos extracciones con 500 ml. de etanol cada vez calentando durante 4 horas; los extractos alcohólicos se reunieron y una porción del residuo se sometió a otra extracción; este último extracto se ensayó con los reactivos para alcaloides (Mandelin, Fröde, Dragendorff), siendo sus resultados negativos, por lo cual concluimos que el alcaloide fue extraído totalmente.

Los extractos alcohólicos reunidos se concentraron sobre baño María hasta sequedad, quedando un residuo de color carmelito oscuro el cual se disolvió en 250 ml. de solución al 2% de ácido acético, se dejó en digestión durante 12 horas a temperatura ambiente, luego se filtró y se precipitó por adición gota a gota de solución concentrada de amoníaco, hasta cuando no se observó más precipitación; el precipitado se filtró y se lavó, luego los alcaloides así obtenidos se purificaron de la siguiente manera:

El precipitado se disolvió en 250 ml. de solución al 1% de ácido clorhídrico, se adicionaron 300 ml. de alcohol amílico agitando vigorosamente, luego se dejó en reposo durante 12 horas a temperatura ambiente; la fracción alcohólica se separó en forma de un gel color carmelito oscuro; se evaporó el solvente sobre baño María

hasta sequedad, quedando una masa de aspecto resinoso, color carmelita, donde se pudo observar la presencia de cristales en forma de agujas finas. El extracto obtenido anteriormente se disolvió en agua por trituración en un mortero, dando una solución de aspecto de tintura la cual se filtró y se precipitó alcalinizando con amoníaco; el precipitado obtenido se disolvió en solución al 0.5% de ácido sulfúrico y se filtró en presencia de carbón activado; el filtrado se volvió a precipitar con amoníaco, se lavó hasta fin de alcalinidad, se secó y se sometió a lavado con los siguientes solventes: benceno, cloroformo y éter etílico. El alcaloide se disolvió en alcohol amílico y luego se sometió a varias recristalizaciones en etanol-agua.

El producto final es un polvo amarillento de p f. 265 grados C, que por cromatografía en capa delgada da una sola mancha con Rf. 0.24.

La cantidad de alcaloide obtenido por esta técnica fue de 0.930 Gm. que equivale a un rendimiento de 0.19%.

B. *Identificación de los alcaloides por sus reacciones químicas.*

Los alcaloides glucosídicos de las solanáceas, se identifican por sus propiedades fisicoquímicas, las cuales se tabulan en el cuadro VI (29, 33).

La mezcla de los dos alcaloides separados por el método de Meyer, se determinó químicamente de la siguiente manera:

1. *Ensayos preliminares.*

a) Análisis elemental (34). Se comprobó la presencia de nitrógeno por el método de Lassaigne.

b) El punto de fusión de la mezcla obtenida, fue de 273 grados C con descomposición.

c) Rotación específica: -78 (conc. 0.95% en etanol).

d) Solubilidad: Agua: insoluble.

Eter: insoluble.

Cloroformo: insoluble.

Benceno: insoluble.

Etanol: soluble en caliente.

La disolución de los alcaloides en agua acidulada, y bufferizando a pH 6.5, produce una solución amarilla que con agitación da abundante cantidad de espuma estable por más de 6 horas.

e) Acción de los reactivos de Tollens y Fehling: El producto original no redujo el Fehling, pero sí el Tollens.

Al hidrolizar el alcaloide con ácido clorhídrico se obtuvo el aglicón, un sólido blanco amorfo, que no redujo los reactivos de Fehling ni Tollens.

CUADRO VI

ALCALOIDE	FORMULA MOLECULAR	P. F. °C.	HIDROLISIS	ROTACION ESPECIFICA	P. F. DERIV.	Rf. C. D.	Rf. PAPEL
Solanina	$C_{45}H_{72}O_{14}N$	280	Solanidina	— 42.16 (HCl)	Clh: 212	0.20	0.56
		285	Gluc. - Rham.	— 56.5 (Pir.)	Act: 204		
		235	Galac.	— 60.0 (Pir.)			
Solanidina	$C_{27}H_{48}ON$	210 219		— 28.5 (Et.)	Clh: 345	0.56	0.95
Solasonina	$C_{45}H_{73}O_{16}N$	284	Solasodina	— 68.7 (Et.)	Clh: 265	0.30	0.46
			Rham. - Gal.	— 53.0	Per: 199		
			Gluc.		Act: 135		
Solasodina	$C_{27}H_{43}O_2N$	198		— 97.1 (Met.)	Clh: 234 Per: 144 Act: 195	0.66	0.96
Tomatina	$C_{66}H_{83}O_{21}N$	263	Tomatidina	— 30.0		0.24	0.49
		267	Xil. - Gluc. Galac.				
Tomatidina	$C_{27}H_{45}O_2N$	209 211		— 8.8 (Met.)	Clh: 275 280	0.73	0.91
Solauricina	$C_{45}H_{73}O_{16}N$	272	Solauricidina Rham. - Galac. Gluc.		Per: 185		
Solamargina	$C_{45}H_{73}O_{15}N$	301	Solasodina Rham. - Gluc.	—105 (Et.)	Per: 188		0.79

2. *Reacción de Liebermann - Burchard (35).*

Por ser el aglicón de estos alcaloides de núcleo esteroidal, se sometieron a esta reacción, tanto los alcaloides como el aglicón producto de la hidrólisis, obteniéndose en ambos casos resultado positivo.

Esta reacción, que para estos alcaloides no está incluida en la bibliografía, consideramos que vale la pena tenerla en cuenta como prueba indicativa para alcaloides esteroidales y más específicamente para alcaloides del grupo de la Solanina.

3. *Reacciones específicas.*

Rooke y colaboradores (29) dan una serie de reacciones de identificación que consideran específicas para estos alcaloides. Al someter los cristales obtenidos a la acción de estos reactivos, obtuvimos los resultados que aparecen en el cuadro VII.

Además, estos alcaloides dan reacciones con el ácido nítrico, clorhídrico, sulfúrico, reactivo de Mandelin, etc. (28). Efectuados los ensayos, se obtuvieron los resultados que aparecen en el cuadro VIII.

CUADRO VII

REACTIVO	GLUCOALCALOIDE	AGLICON
H ₂ SO ₄ conc. caliente Erdmann	Amarillo - rojo vino Amarillo	Amarillo - carmelito Amarillo
Vainillina en AcOH glac. + H ₂ SO ₄ frío	Anillo carmelito rodeado de halo rojo vino	Idem glucoalcaloide
Vainillina en AcOH glac. + H ₂ SO ₄ caliente	Amarillo - amarillo oscuro - rojo caoba - rojo sangre - carmelito	Amarillo - rojo naranja - rojo vino - carmelito oscuro
Acido pícrico	No precipita	No precipita
Acido fosfomolibdico en etanol	Precipitado azul oscuro	Precipitado azul oscuro

CUADRO VIII

REACTIVO	RESPUESTA
HNO ₃ conc.	Incoloro - rojo púrpura - desaparece la coloración
HCl conc.	Coloración amarilla a los 5 min.
H ₂ SO ₄ conc.	Amarillo - naranja - rojo vino - violeta profundo
Metanol - H ₂ SO ₄ partes iguales	Amarillo rojizo - verde esmeralda - rosado
Etanol - H ₂ SO ₄ partes iguales	Amarillo rojizo - verde esmeralda - rosado
R. Mandelin	Amarillo - rojo - naranja - púrpura - carmelito violeta

4. *Hidrólisis.*

Se llevó a cabo la hidrólisis ácida del alcaloide así: 160 mg. se calentaron a reflujo durante 2 horas en solución de ácido clorhídrico al 2% sobre baño María; se dejó enfriar dando una suspensión floculenta de color blanco; se filtró y se recrystalizó. En el filtrado se investigó la presencia de azúcares, por cromatografía en papel (37). Los cristales obtenidos en forma de base libre, dieron un p.f. de 213 grados C.

Con estas pruebas químicas, que se consideran específicas para estos alcaloides, agrupamos la sustancia aislada dentro de los alcaloides de la solanina. Comparando los resultados obtenidos con los dados en el Cuadro VI, podemos decir que el componente principal es tomatina.

C. *Cromatografía de los alcaloides obtenidos.*

Los alcaloides obtenidos en forma de polvo amorfo, tal como se describió en A, y con el fin de comprobar su identidad, fueron sometidos a los siguientes ensayos cromatográficos, tanto el producto obtenido por el método de Meyer como el del indicado por nosotros.

1. *Cromatografía ascendente sobre papel.*

Del polvo amarillo amorfo, se preparó una solución al 1% en etanol de 95.

Como medio absorbente se empleó papel Watmann N° 1; como solvente, una mezcla formada por: n-butanol, ácido acético glacial y agua (4:1:5); de esta mezcla se usó únicamente la fase orgánica luego de saturación con agua; como revelador se empleó tricloruro de antimonio (31).

En todos los ensayos realizados, hemos obtenido los valores de Rf, 0.54 y 0.49, comprobando en los diferentes casos los mismos valores.

Vale la pena hacer notar que de la extracción por el método de Meyer se obtuvieron dos manchas con los Rf anotados, mientras que en la extracción indicada por nosotros, únicamente se obtuvo una mancha con el Rf correspondiente a la tomatina, es decir, por esta extracción la tomatina obtenida se puede considerar libre de mezclas de alcaloides o sustancias similares.

2. *Cromatografía sobre placa de Sílica gel G.*

Las soluciones alcohólicas usadas para estas cromatografías, fueron preparadas nuevamente con la misma concentración. Esto lo

hicimos con el fin de estar seguros de la pureza de la solución, evitando cualquier contaminación o alteración que pudieran ocasionarse.

Como solvente se empleó una mezcla constituida por: n-butanol, ácido fórmico y agua (4:1:5); luego de saturación se separó la fase orgánica que se usó como solvente; como revelador se empleó solución al 5% de ácido fosfomolibdico en etanol de 95. Los Rf correspondientes a los alcaloides obtenidos, así como los de sus productos de hidrólisis, corresponden a los dados en la bibliografía (36).

De esta manera se confirma la identidad de los alcaloides encontrados, complementando los resultados con los obtenidos en las cromatografías sobre papel.

3. *Cromatografía de los azúcares.*

Una comprobación a los anteriores resultados, con los cuales prácticamente se identificaron los alcaloides, se llevó a cabo sobre el producto soluble de la hidrólisis ácida, el cual consta de monosacáridos provenientes del desdoblamiento de la molécula del glucoalcoide.

Por cromatografía sobre papel Schleicher & Schuell 1507, usando como solventes (37) : a) Mezcla de n-butanol, ácido acético y agua (4:1:5); b) Butanol, piridina y agua (6:4:3) y como revelador en ambos casos oxalato ácido de anilina³⁸, se encontraron valores de Rf que comparados con monosacáridos patrones, identifican a la glucosa, xilosa y galactosa, azúcares que componen la molécula del alcaloide tomatina.

D. *Separación de la tomatina y solanina por cromatografía en capa delgada.*

De los alcaloides obtenidos por el método de Meyer, que como ya se ha indicado son tomatina y solanina, procedimos a su separación, haciendo uso de las técnicas de cromatografía (39), para separación de compuestos puros.

Las cromatografías se efectuaron de la siguiente manera: Se alistaron placas de vidrio de 20 x 10 perfectamente lavadas y neutralizadas, se extendió la sílica obteniendo una película con espesor de 250 micrones; las placas luego se activaron a 120 grados C durante una hora.

Sobre las placas así preparadas se aplicó la solución de los alcaloides en etanol, por colocación sucesiva de gotas dejando una línea de manchas a lo largo de las placas; la cantidad de solución

aplicada por cada 10 placas, fue de 3 ml.; luego de dejar secar las manchas, se hicieron correr por cuatro veces sucesivas, a fin de asegurar una buena separación. La distancia recorrida por el solvente en cada ocasión fue de 15 cm.

Una vez efectuada la separación, se reveló con ácido fosfomolibdico en los extremos izquierdo y derecho de las placas, se raspó la sílica y se procedió a la extracción de ella, usando dioxano como solvente; luego se evaporó el dioxano y se obtuvieron los alcaloides en forma absolutamente pura, lo cual se comprobó por medio de otra cromatografía en capa delgada.

Los alcaloides así separados, se usaron luego para las determinaciones espectrofotométricas.

E. Análisis espectrofotométrico de los alcaloides obtenidos.

Para complementar el análisis de los alcaloides por técnicas instrumentales, tomamos los espectros al infrarrojo de los alcaloides puros utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 137 B.

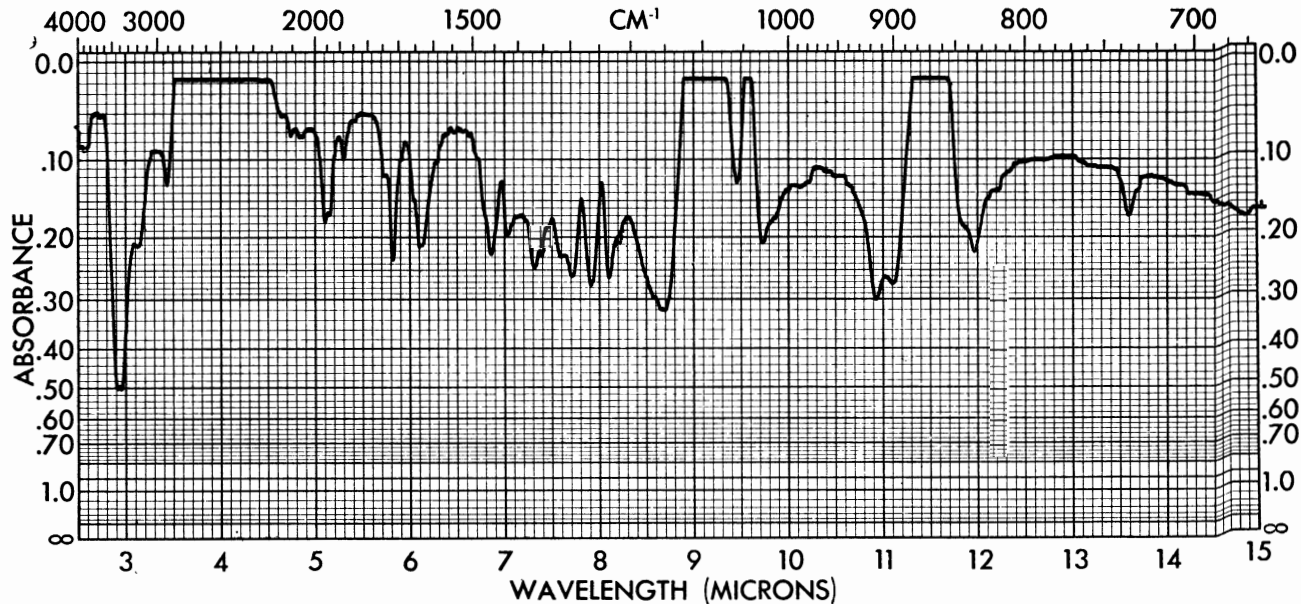
1. Espectros en fase líquida.

De los alcaloides separados cromatográficamente, tal como se indicó anteriormente, se preparó una solución en dioxano la cual se colocó entre las placas de cloruro de sodio de una celda sellada modelo 127 - XX90, y dioxano puro en una celda de espesor variable modelo 127 - 1168; de esta manera, se obtuvieron los espectros para la tomatina y para la solanina (Figuras Nos. 7 y 8).

Como puede observarse, las absorbancias presentadas por ambos compuestos son prácticamente las mismas; en vista de lo anterior y basados en que compuestos de estructura semejante pueden potenciar las absorbancias presentadas (40) y además para obtener el espectro de la mezcla de estos dos alcaloides, preparamos una solución de los alcaloides obtenidos por el método de Meyer, usando dioxano como solvente; colocamos la solución en la celda sellada, y con celda de compensación como en el caso anterior, se obtuvo el espectro correspondiente. (Figura N° 9).

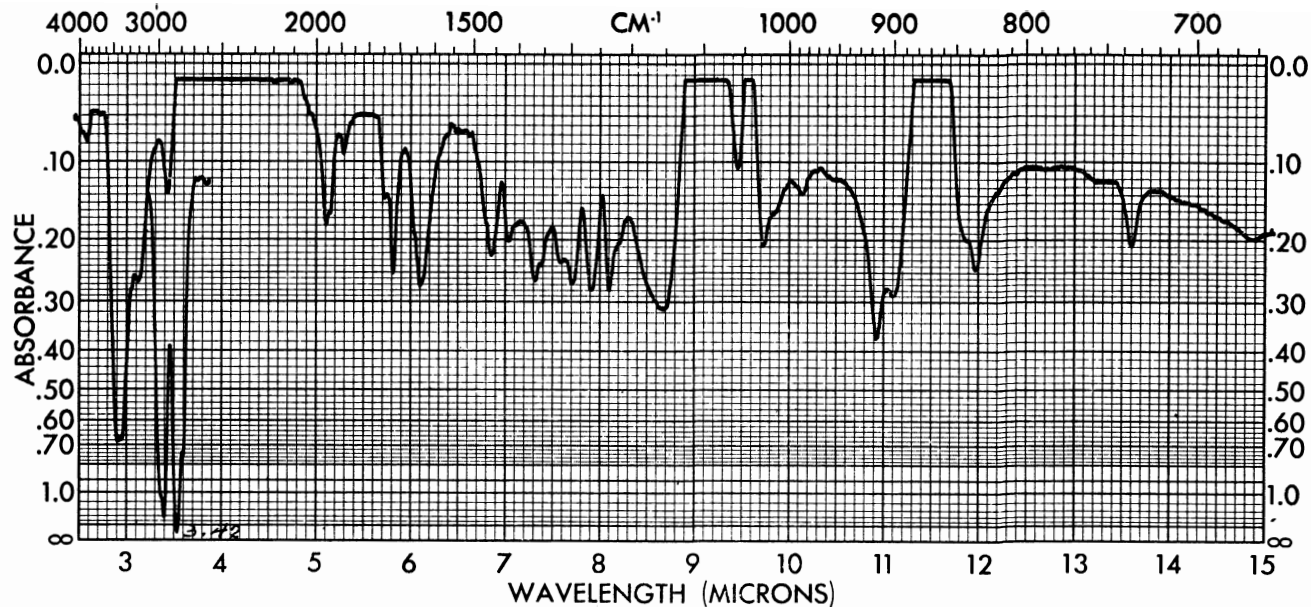
2. Espectros en fase sólida.

Para la mezcla de alcaloides, obtuvimos su espectro en fase sólida, usando el método de la pastilla de bromuro de potasio, según Lyon (41). La pastilla preparada por compresión a 20.000 lbs. de presión durante 20 minutos, se colocó en una celda desmontable modelo 186 - 0091; dejando actuar libremente el haz luminoso de compensación, se obtuvo el espectro (Figura N° 10). También se



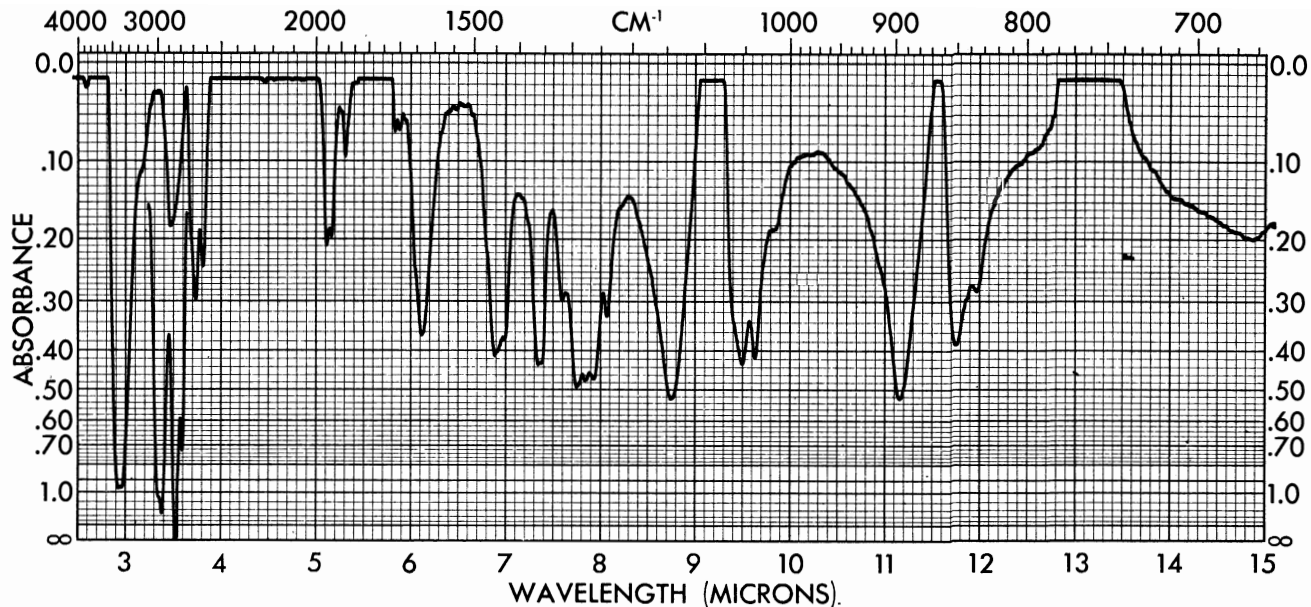
SPECTRUM NO. <u>01</u>	ORIGIN : FRUTO DE	LEGEND _____	REMARKS _____
SAMPLE <u>TOMATINA</u>	<u>SOLANUM MARGINATUM</u>	1. _____	MUESTRA SEPARADA POR
SOLV. <u>DIOXANO</u>	PURITY _____	2. _____	CROMATOGRAFIA EN CA ⁻
VEL : <u>LENTA</u>	PHASE <u>LIQUIDA</u>	DATE <u>25 III 69</u>	PA DELGADA
_____	THICKNESS _____	OPERATOR _____	_____

SPECTRUM NO. _____
SAMPLE _____



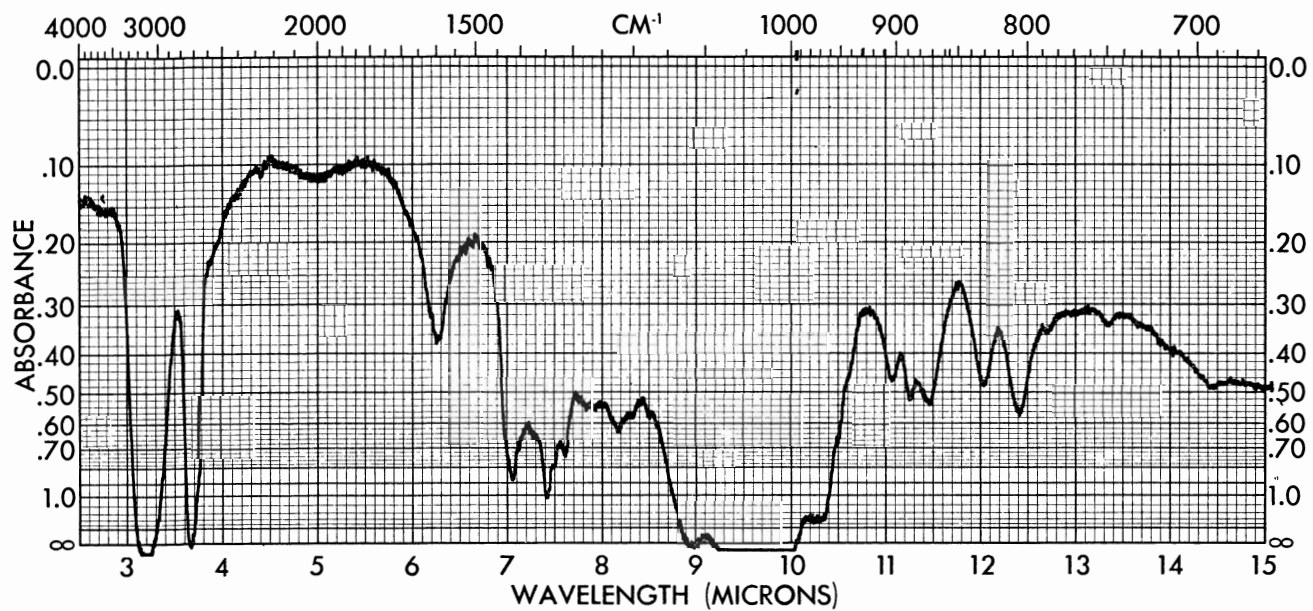
SPECTRUM NO. 02	ORIGIN FRUTO DE	LEGEND	REMARKS	SAMPLE SPECTRUM NO. _____
SAMPLE SOLANINA	SOLANUM MARGINATUM	1. _____	MUESTRA SEPARADA POR	
SOLV : DIOXANO	PURITY	2. _____	CROMATOGRAFIA EN CAPA	
VEL : LENTA	PHASE LIQUIDA	DATE 25 III 69	DELGADA	
	THICKNESS	OPERATOR		

FIGURA No. 8



SPECTRUM NO. <u>03</u>	ORIGIN <u>FRUTO DE</u>	LEGEND _____	REMARKS _____
SAMPLE <u>MEZCLA</u>	<u>SOLANUM MARGINATUM</u>	1. _____	<u>MEZCLA OBTENIDA POR</u>
SOLV : <u>DIOXANO</u>	PURITY _____	2. _____	<u>EXTRACCION (METODO</u>
VEL : <u>LENTA</u>	PHASE <u>LIQUIDA</u>	DATE <u>25 III 69</u>	<u>DE MEYER)</u>
	THICKNESS _____	OPERATOR _____	

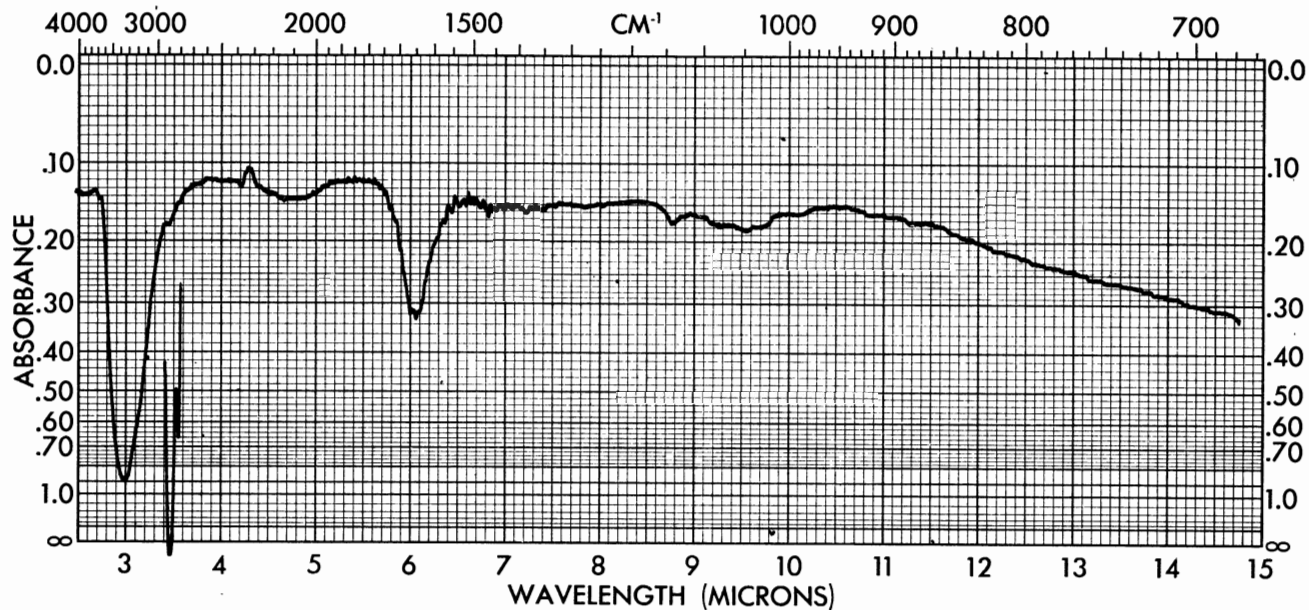
SAMPLE SPECTRUM NO. _____



SPECTRUM NO. <u>04</u>	ORIGIN <u>FRUTO DE</u>	LEGEND _____	REMARKS _____
SAMPLE <u>MEZCLA</u>	<u>SOLANUM MARGINATUM</u>	1. _____	<u>MUESTRA OBTENIDA POR</u>
	PURITY _____	2. _____	<u>EXTRACCION, SEGUN ME-</u>
<u>VEL : LENTA</u>	PHASE <u>SOLIDA (KBr)</u>	DATE <u>26 II 69</u>	<u>YER, Y RECRISTALIZADA</u>
	THICKNESS _____	OPERATOR _____	<u>EN ETANOL</u>

SPECTRUM NO. _____
SAMPLE _____

FIGURA No. 10



SPECTRUM NO. <u>05</u>	ORIGIN <u>FRUTO DE</u>	LEGEND _____	REMARKS _____
SAMPLE <u>MEZCLA</u>	<u>SOLANUM MARGINATUM</u>	1. _____	<u>MUESTRA OBTENIDA SEGUN</u>
	PURITY _____	2. _____	<u>MEYER Y RECRISTALIZADA</u>
VEL : <u>"SLOW"</u>	PHASE <u>SOLIDA (NaCl)</u>	DATE <u>12 IV 69</u>	<u>EN ETANOL - AGUA</u>
	THICKNESS _____	OPERATOR _____	

SPECTRUM NO. _____
SAMPLE _____

FIGURA No. 11

obtuvo un espectro de la mezcla, colocando el polvo finamente dividido sobre placas de cloruro de sodio en la celda desmontable. (Figura N^o 11).

3. Análisis de los espectros.

Después de consultar "The Sadler Standard Spectra" de 1968, no se encontraron allí los espectros de solanina y tomatina, para una comparación con espectros patrones.

En vista de lo anterior, nos limitaremos a indicar, tal como aparece en el Cuadro IX, los valores en las zonas de mayor absorban-
 cia; para ello seguimos las indicaciones dadas en "The Sadler Standard Spectra" (42), según las cuales, para tratar de identificar una sustancia desconocida, se busca el valor de la longitud de onda de mayor absorción, y luego los picos más pronunciados entre dos valores consecutivos en milimicras.

Del espectro obtenido en fase sólida, se obtuvieron las absorban-
 cias más representativas, exceptuando los valores entre 9 y 10 milimicras, en las cuales hay una amplia zona de absorción, quizás debido a la unión de dos o más picos. De todas maneras, aquí determinamos los valores en los cuales se presenta una absorban-
 cia de más del 60%, comparando simultáneamente los espectros de las figuras Nos. 9 y 10.

Los valores obtenidos fueron:

CUADRO IX

0	—	—	23	38	75	50	—	43	37	—	—	—
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

Longitud de onda de mayor absorban-
 cia: 3.0

Los valores así tabulados, se compararon con varios espectros que presentaban absorban-
 cias similares, coincidiendo todos ellos con los de aminas terciarias; esto nos corrobora que los productos separados del fruto de Solanum marginatum son alcaloides, ya que todos estos son aminas terciarias.

ESTUDIO FARMACOLOGICO

Teniendo como referencia el concepto popular, que las bayas de Solanum marginatum son venenosas, realizamos en el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, la prueba de toxicidad, con la determinación de la DL₅₀ del jugo obtenido del fruto, y luego por

una serie de estudios hemodinámicos en perros determinamos el efecto sobre la tensión arterial y la respiración.

PRUEBA DE TOXICIDAD

Para la determinación de la toxicidad, preparamos un extracto acuoso del fruto, con una concentración de 800 mg. por ml. a partir del cual se hicieron diferentes diluciones.

La inyección intraperitoneal, en ratones blancos, de 870 mg./kg. en solución de pH 4.7, produce un efecto doloroso inmediato, que se manifiesta por chillidos, intento de fuga precipitada y comportamiento desesperado. Esta reacción tiene una duración de 30 segundos, después de los cuales se observa una profunda depresión que se prolonga durante todo el tiempo de observación.

La administración intraperitoneal de 1.250 mg./kg. en solución de pH 4.7, produce excitabilidad inmediata de duración relativamente corta, seguida de depresión profunda; al cabo de 10 minutos, se presenta un marcado efecto respiratorio manifestado por respiración lenta profunda y forzada. Igualmente, es notoria la pérdida de la motilidad y de la capacidad de defensa. Con dosis que van entre 3.500 y 4.000 mg./kg., administradas por vía intraperitoneal, se presentan las mismas manifestaciones ya descritas, en medio de un período convulsivo no muy fuerte, hasta que se produce la muerte por paro respiratorio.

Es notoria la intensidad y la brevedad de la reacción dolorosa, la cual atribuimos exclusivamente a la sustancia y no al pH de la solución. Para comprobar esto, se preparó solución salina a pH 7.4 con la cual se inyectaron los animales patrones en cada caso, sin observarse en éstos, alguna reacción especial o manifestación de incomodidad.

Es de anotar que, con las primeras dosis, se produjo muerte tardía, ya que ésta no se hizo manifiesta durante el tiempo de observación.

Se pudo además observar, que la sustancia es absorbida por vía oral, ya que un grupo de animales fue sometido a tomar jugo del fruto, observándose reacción de malestar e intolerancia, así como cierta dificultad de coordinación del equilibrio y finalmente la muerte.

DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA

Esta prueba se llevó a cabo en ratones blancos, con peso promedio de 29 Gm. Se tomaron 14 grupos de 10 animales cada uno y se les inyectó intraperitonealmente, la dosis correspondiente.

Se siguió el procedimiento llamado de "Acumulación" de datos observados durante un período de 2 horas, acumulando los animales vivos y los animales muertos.

La gráfica "en espejo" se estableció con base en los siguientes datos:

Dosis Mg/k.	Muertos	Vivos	Muertos acumulados	Vivos acumulados		% Mortalidad
1.250	0	10	0	18	18	0
2.500	2	8	2	8	10	20
5.000	10	0	12	0	12	100

La perpendicular trazada del punto de corte de las 2 curvas a la abscisa, cae en el valor (dosis letal media) correspondiente a 3.270 mg./k.

Este valor fue comprobado aplicando la fórmula matemática del método de RED y MUENCH, mediante la cual:

$$\text{Log } DL_{50} = \text{Log } di + \text{Log } int \frac{50 - Mi}{Ms - Mi}$$

Donde:

di: dosis inferior al 50% = 2.500 mg./k.

int: intervalo = 2.

Mi: mortalidad inferior al 50% = 20.

Ms: mortalidad superior al 50% = 100.

Así,

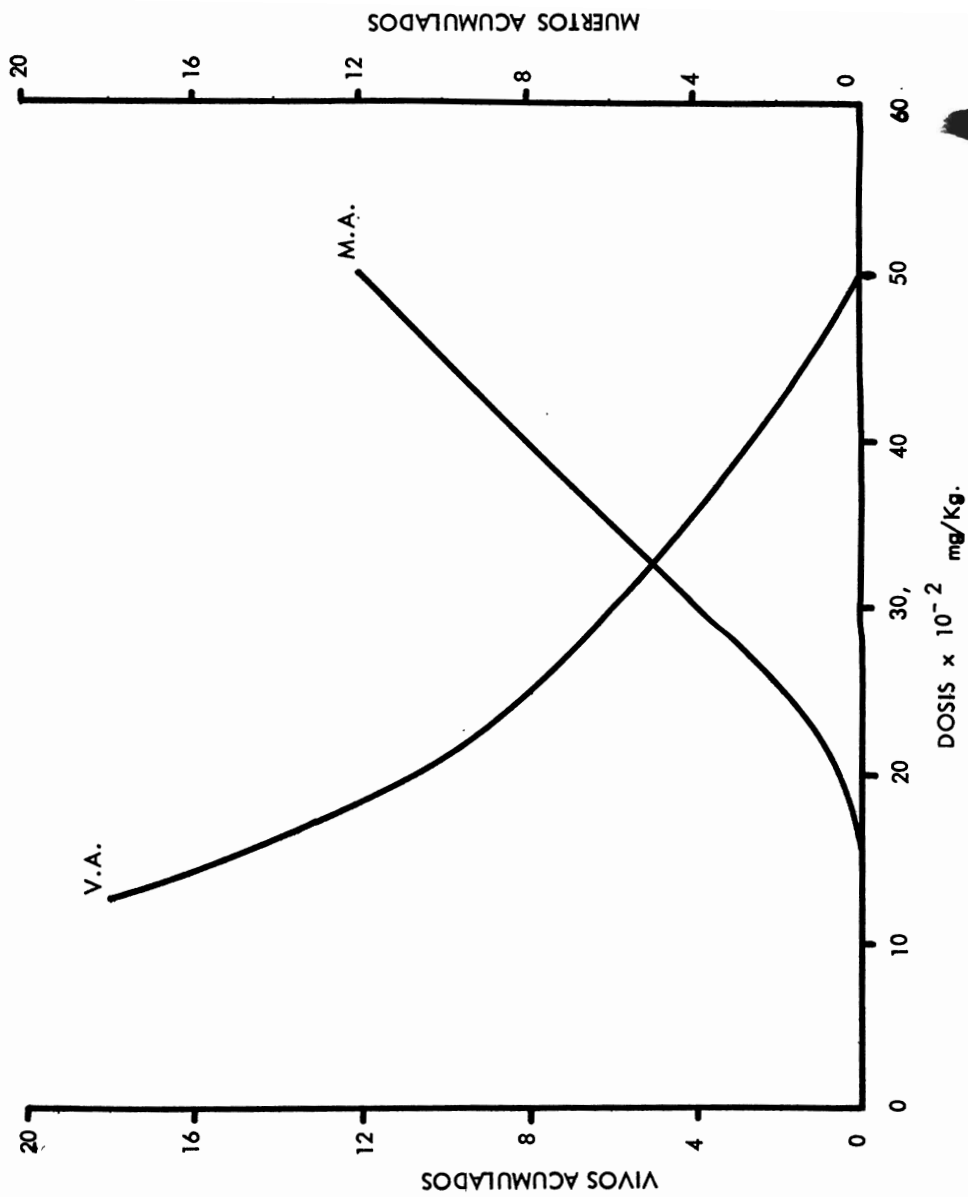
$$\text{Log } DL_{50} = \text{Log } 2.500 + \text{Log } 2 \frac{50 - 20}{100 - 20}$$

Efectuando la operación, se obtiene un valor de 3.250 mg./k. para la DL_{50} , valor que es sensiblemente igual al resultado obtenido en la gráfica "en espejo". (Figura N° 12).

HEMODINAMIA EN PERRO

Para el estudio del efecto del jugo del fruto del *Solanum marginatum*, y de la tomatina aislada, sobre la tensión arterial y la respiración, se emplearon perros de un peso promedio de 10 kilos anestesiados por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (40 mg./kg.).

La tensión arterial se registró mediante manómetro de mercurio en cánula arterial (carótida). La respiración se registró me-



diente tambor de Marey en cánula traqueal. La administración de las soluciones se practicó intravenosamente en la vena safena externa.

El jugo se preparó en solución salina en concentración correspondiente a 800 mg. de fruto total por ml. de solución. La tomatina se disolvió en solución salina a pH 6.5; la concentración de las soluciones de tomatina usadas, correspondían a dosis de: 20 mcg./kg., 100 mcg./kg., 1.000 mcg./kg. y 10.000 mcg./kg., estando cada dosis en 0.1 ml. de solución.

RESULTADOS

Jugo del fruto: La administración intravenosa de 0.1 ml./kg., produce disminución de la tensión arterial e inmediata estimulación respiratoria; la recuperación al nivel inicial de T. A. se efectúa en forma lenta; lo mismo sucede en este caso con la respiración.

El jugo, en dosis de 0.5 ml./kg., produce los mismos efectos, pero más acentuados, presentándose disminución de la T. A. a 5 mm. y la recuperación más lenta; en la respiración, luego de la inmediata estimulación, sigue un paro respiratorio del cual se recupera lentamente. Con dosis de 1 ml./kg., se aumenta la respuesta con disminución de la T. A. a 0.0 mm., seguido de paro respiratorio del cual no hay recuperación.

Tomatina: En la gráfica pueden observarse las respuestas al estímulo eléctrico con corriente de inducción y una fuente de 11½ voltios, y las de la epinefrina y acetilcolina, de acuerdo con la respectiva actividad de estas drogas.

Al aplicarse dosis de 20 mcg./kg., 500 mcg./kg. y 1.000 mcg./kg. de tomatina se observan ligeras alteraciones tensionales con rápida recuperación del animal y sin alteración respiratoria.

Cuando se administró la dosis de 5 mg./kg., la baja de la presión sanguínea fue similar a la obtenida con 5 mcg./kg. de acetilcolina y con la estimulación eléctrica sobre el vago simpático, pero se puede observar muy claramente la hiperpnea ocasionada por la tomatina, mucho más marcada que la ocasionada por la acetilcolina.

Por otra parte, hay una demora en la recuperación tensional, cuando se administra tomatina, con franco desfallecimiento de las propiedades cardiocirculatorias.

Al atropinizarse el animal con 0.5 mg./kg. de sulfato de Atropina I. V., la respuesta es usual para estos casos y vemos, muy claramente, que la acción anticolinérgica del alcaloide, inhibe la res-

puesta normal de la acetilcolina en tanto que no ocasiona ninguna alteración en la de la tomatina.

Se muestra así, de manera muy significativa que la posible acción de la tomatina no puede clasificarse dentro del terreno de las sustancias para-simpático-miméticas, ya que cuando se bloquea la función colinérgica, persiste la respuesta hipotensora y respiratoria con características absolutamente iguales a antes del bloqueo con atropina.

Es posible que los fenómenos ocasionados por la actividad de la tomatina, se deban a un bloqueo ganglionar (acción ganglioplegiante), lo cual le daría a este glucoalcaloide una singular importancia dentro de las precarias investigaciones que en la actualidad se han hecho sobre este llamativo tema.

De los resultados obtenidos en las hemodinamias, en las cuales únicamente se ensayó el jugo natural, y la similar respuesta presentada con dosis de 5 mg./kg. de tomatina, se puede concluir que ésta es la sustancia responsable de las acciones hipotensora y respiratoria.

La mayor intensidad de la respuesta presentada por el jugo, puede ser debida a una cantidad mayor de tomatina por ml., o a un sinergismo causado por otros alcaloides secundarios, taninos y saponinas que también se hallan presentes.

CONCLUSIONES

1. Creemos haber informado por primera vez, la presencia de aceite en las semillas de *Solanum marginatum*.
2. El aceite encontrado, por su estructura y sus propiedades, se clasifica dentro de los aceites semisecantes.
3. El rendimiento en aceite que se obtuvo de las semillas es comparable al de las semillas de soya. Industrialmente se puede usar como aceite semisecante en la fabricación de pinturas, aprovechando la pulpa residual de las semillas, como materia prima para la fabricación de papel, de la misma manera que se usa la pulpa residual de las semillas de soya y otras plantas oleaginosas.
4. Por no ser tóxico, el aceite puede usarse como aceite comestible.
5. Se identificaron los alcaloides presentes en el mesocarpio del fruto como glucoalcaloides de núcleo esteroideal del grupo de la solanina, y el principal alcaloide se identificó como tomatina, por sus reacciones y productos de hidrólisis.

6. Se consideró la reacción de Liebermann-Burchard como una reacción indicativa para alcaloides de núcleo esteroideal y especialmente del grupo de la solanina.
7. La tomatina es la responsable de la espuma producida por el jugo, pues el alcaloide aislado y solubilizado a pH 6.5, produce espuma estable por más de 6 horas.
8. La sustancia separada se clasificó como alcaloide por sus espectros al infrarrojo, ya que no pudiéndose comparar con alcaloides patrones, se comparó con espectros que presentaban similares absorbancias, coincidiendo todos en ser aminas terciarias.
9. Por los ensayos farmacológicos, se determinó una dosis letal media de 3.250 mg./kg. para el jugo.
10. La toxicidad del fruto se debe al alcaloide identificado como tomatina, pues por hemodinamias en perros, se observaron los mismos efectos producidos por el jugo del fruto.
11. La muerte producida por intoxicación con *Solanum marginatum*, es debida a una potente acción hipotensora, acompañada de estimulación respiratoria y finalmente paro pulmonar.

R E S U M E N

- 1º Se realizó el análisis fitoquímico de la planta *Solanum marginatum*.
- 2º Se estudió el aceite obtenido de las semillas y se le determinó su composición cualitativa y cuantitativa por el método clásico de Rugeri y Tortelli y por cromatografía de gases.
- 3º Se hizo un breve estudio comparativo del rendimiento en aceite obtenido, con los rendimientos de los aceites usados actualmente en escala industrial.
- 4º Se hizo el ensayo toxicológico para el aceite, en ratones, administrado por vía oral.
- 5º Se aislaron los alcaloides del fruto, por varias de las técnicas encontradas en los textos especializados, y se dio un método de extracción.
- 6º Los alcaloides separados se analizaron por los métodos químicos clásicos, por técnicas de microanálisis instrumental, especialmente por cromatografía y análisis espectrofotométrico.
- 7º Se hicieron ensayos de toxicidad del jugo y de los alcaloides aislados y se determinó la dosis letal media del jugo.
- 8º Por hemodinamia en perros, se determinó la acción hipotensora producida por el jugo, lo mismo que por el alcaloide, y sus efectos en el sistema respiratorio.

S U M M A R Y

A systematic phytochemical analysis on *Solanum Marginatum* is herein presented. Glycosides with hemolytic action, alkaloids and fixed oil were found.

The further analytic work was divided in 3 parts: 1. The phytochemical constants as well as the chemical composition of the oil were determined; 2. The alkaloids were separated by different techniques and the method which yielded the greatest amount of alkaloids was taken as the standard method; 3. Their identification was carried out by classical organic and instrumental analytical methods.

The pharmacological tests were performed on mice and the hemodynamic studies on dogs. The toxicity of the oil and the alkaloids was determined.

R É S U M É

Il est fait dans le travail une marche phytochimique systématique de *Solanum Marginatum* et il se trouve qu'il y a des hétérosides avec une action hémolytique, des alcaloïdes et que les semences sont riches en huile.

Une fois faite l'analyse qualitatif du fruit, le travail est divisé en trois parts: il est réalisé une étude détaillée de l'huile avec les déterminations de ses constantes chimiques-physiques et de sa composition chimique; il est faite une séparation des alcaloïdes au moyen de différentes techniques en établissant la méthode avec laquelle le rendement obtenu est acceptable; aussi, il est réalisée l'identification de ces principes au moyen des techniques classiques d'analyse organique et par des méthodes instrumentales.

Les essais pharmacologiques ont été réalisés sur des souris et les hémodynamiques sur des chiens en déterminant la toxicité de l'huile et des alcaloïdes.

B I B L I O G R A F I A

1. STRASBURGER, E. *Tratado de Botánica*, 5ª Edición Esp., 463 - 567, Barcelona, Editorial Marín S. A., 1963.
2. SWINGLE, D. A *Textbook of Systematic Botany*, 3ª Edición, 74 - 139, New York, McGraw - Hill, 1946.
3. TYLER, V., SCHWARTING, E. *Experimental Pharmacognosy*, 3ª ed., 19 - 47, Minneapolis Burgess Publishing Co., 1966.
4. CALDERÓN, E. *Guía para Análisis de Plantas y notas prácticas sobre Fitoquímica*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1963.

5. WALL, M. E. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, Ed., **43**, **1** (1954).
6. FLORIANI, L. *Análisis Químicos de los Vegetales*, **59-61**, Buenos Aires, Librería Ed. Vázquez, 1938.
7. Departamento de Farmacia. *Prácticas de Fitoquímica e Identificación de los Principios Químicos*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1966.
8. VILLAVECCHIA, V. *Tratado de Química Analítica Aplicada*, 2ª Edición, Vol. II, 487 - 513, Barcelona, Editorial Gustavo Gili S. A., 1954.
9. JAMIESON, G. *Vegetable Fats and Oils*, 2ª Edición, **395-398**, New York. Reinhold Publishing Corp., 1943.
10. CALVET, E. *Química General Aplicada a la Industria*, 3ª Ed., Vol. IV, 1039 - 1046, Barcelona, Salvat Edit., 1951.
11. CALDERÓN, E. *Conferencias de Farmacia Química*, 61 - 70, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1967.
12. CALDERÓN, E., GAVIRIA, E. *Prácticas de Análisis Químicos Aplicados*, Facultad de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1958.
13. HILDITCH, T. P. *The Chemical Constitution of Natural Fats*, 122, 137 - 139, New York, John Willey Sons Inc., 1944.
14. LITTLEWOOD, A. B. *Gas Chromatography*, 415 - 427, New York, London, Academic Press, 1967.
15. JAMIESON, R., E. *J. of Chromatography*, 17, 230 - 34 (1965).
16. ETTRE, L. S., AVERILL, W., KABOT, F. J. *Aplicación Gas Chromatography*, A. P. 001, Perkin Elmer.
17. KEULEMANS, A. *Gas Chromatography*, 33 - 35, New York Reinhold Publishing Corp., 1957.
18. Centro de Investigaciones Económicas (CIE), *Manejo a granel de aceites comestibles en Colombia*, Facultad de Ciencias Económicas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1964.
19. Instituto Latinoamericano de Mercadeo Agrícola (ILMA), *Productos durables, Mercadeo de Oleaginosas*, 1964.
20. HERRON, A., ADAMS, D. W. *Producción y Consumo de Aceites Vegetales en Colombia*, Centro Interamericano de Reforma Agraria (CIRA), mimeógrafo número 1, Versión preliminar, Bogotá, 1965.
21. CALVET, E., op. cit. Volumen VI, 591, 1953.
22. HAMERSLAG, F. *The Technology and Chemistry of Alkaloids*, 264 - 286, New York, London, DVan Nostrand Company, 1950.
23. BAMFORD, F. *Poison, their Isolation and Identification*, 3ª Edición, 239, London, J. and A. Churchill Ltd., 1951.
24. MANSKE, R., HOLMES, H. L. *The Alkaloids, Chemistry and Physiology*, Vol. III, 247 - 312, New York, Academic Press Publishers, 1953. Vol. VII, 343 - 353, 1960.
25. FIESER, F., FIESER, M. *Natural Products related to Phenanthrene*, 3ª edición, 597 - 600, New York, Reinhold Publishing Corp., 1949.
26. CALVET, E. Idem 21, 596.
27. CALVET, E. Idem 21, 644 - 647.

28. Allen's Commercial Organic Analysis, *Vegetable Alkaloids*, 5ª Edición, Vol, VII, 191, Philadelphia, The Blackiston Co., 1948.
29. PAECH, K., TRACEY, M. V. *Modern Methods of Plant Analysis*, 476 - 480, Berlin, Springer - Verlag, 1965.
30. BAMFORD, F. op. cit., 240.
31. Seltene Naturstoffe, Fluka A. G. Ch - 9470, 150, Buchs Schweiz, Karlsruhe, Ed. C. F. Muller, 1966.
32. BRIGGS, E. G., LINDSAY, H. *Chemical Abstracts*, 47, 1165 a (1953). *J. Soc. Chem.*, 3587 - 91 (1952).
33. The Merck Index of Chemical Drugs, 7ª Edición, Merck & Co., Rahway, N. J. U. S. A., 1.054, 966 (1960).
34. CHERONIS, D., ENTRIKIN, J. *Semimicro Qualitative Organic Analysis*, 2ª Ed., New York Interscience Publishers Inc., 1961.
35. Allen's Commercial Organic Analysis, Vol. II, 768, New York, Balckiston Co., 1924.
36. Seltene Naturstoffe, op. cit., 133.
37. HEFTMANN, E. *Chromatography*, 504, New York, Reinhold Publishing Corp., 1961.
38. VILLAR PALASI, V. *Cromatografía sobre el papel*, 135 - 155, Instituto Español de Fisiología y Bioquímica, Madrid, 1952.
39. RANDERATH, K. *Thin - Layer Chromatography*, 71 - 73, New York, Academic Press, 1963.
40. DOBRINER, K., LIEBERMANN, S. *J. of Biol. Chem.*, 172, 307 (1948).
41. Spectrophotometer model 137 B infracord, *Instructions*, 990 - 9541, Perkin Elmer Instrument Division, Norwalk Connecticut, U. S. A., 1965.
42. *The Sadler Standard Spectra*, Sadler Research Lab., 3316 Spring Garden Street, Philadelphia, P. A., 1968.