

Tesis de Posgrado

Contribución al estudio de los glucósidos cianogenéticos y el Holocalyx Balansae Mich.

Pelisch, Juan

1920

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Pelisch, Juan. (1920). Contribución al estudio de los glucósidos cianogenéticos y el Holocalyx Balansae Mich.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0121_Pelisch.pdf

Cita tipo Chicago:

Pelisch, Juan. "Contribución al estudio de los glucósidos cianogenéticos y el Holocalyx Balansae Mich.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1920. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0121_Pelisch.pdf

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO

DE LOS

GLUCÓSIDOS CIANOGENÉTICOS

Y EL HOLOCALYX BALANSAE MICH.

TESIS

PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN QUÍMICA

POR EL EX-ALUMNO

JUAN PELISCH



00 121

BUENOS AIRES

337376—TALLERES "CASA JACOBO PEUSER"

1920

Ej. 21

PADRINO DE TESIS

Prof. Dr. Juan A. Domínguez

SEÑORES ACADÉMICOS:

SEÑORES CONSEJEROS:

SEÑORES PROFESORES:

Con el presente estudio entrego a vuestra elevada consideración el trabajo de tesis que me inicia en las investigaciones científicas y dentro de éstas en la disciplina química a que me he dedicado, cerrando de esta manera el ciclo de estudios que he cursado bajo vuestra dirección.

El tema que me he propuesto desarrollar presenta amplios y variadísimos aspectos y fuerza sería dedicarle pacientes observaciones durante largos años, en distintos períodos y zonas para los vegetales, dando un margen amplio para las consideraciones, en forma tal que únicamente así es posible valorar un cuadro de conjunto con importantes conclusiones para la técnica agrícola y las comprobaciones fisiológicas.

En la imposibilidad material de abordarlo bajo todas sus fases donde indudablemente, manos más avezadas que las mías lo habrían conseguido, cúmpleme declarar que he tratado en lo posible de desligarme de toda sugestión, describiendo y reflexionando detenidamente lo que he observado, de manera que espero que al juzgarlo lo hagáis con criterio benevolente hacia el principiante.

Aprovecho esta ocasión para expresar a todos mis maestros mi íntimo agradecimiento por los sanos preceptos y las sabias lecciones que han impulsado poderosamente mis conocimientos y han cooperado con eficacia al término de mi jornada.

Quiero manifestar aquí mi profundo reconocimiento al distinguido profesor Juan A. Domínguez a indicación del cual

realicé el presente estudio, efectuado en gran parte bajo su dirección en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Médicas, honrándome a su vez con su alto padrinazgo.

Al doctor Ildefonso C. Vattuone (1) séame permitido hacerle el más efusivo agradecimiento por la eficaz cooperación en la parte Botánica, del mismo modo que a los doctores Enrique Herrero Ducloux, Angel Sabbattini y Bernardo Houssay por las innumerables facilidades que me han prestado y por los acertados consejos que en todo momento orientaron la realización de este estudio.

Es mi deber recordar al señor José F. Molfino (2) por las muchas atenciones dispensadas durante la realización de mi trabajo.

(1) Jefe de trabajos de Botánica Farmacéutica de la F. de C. M. de B. A.

(2) Jefe de la sección Botánica del Instituto de Botánica y Farmacología.

INTRODUCCIÓN

La determinación de numerosas especies vegetales que contienen ácido cianhídrico, sobre todo en los últimos tiempos han hecho adquirir al estudio de los glucósidos cianogenéticos un interés cada vez mayor para entrar a formar parte de uno de los temas profieus en investigaciones especiales, ya sea en su faz interpretativa, corroborando diversas importantes teorías fisiológicas o en su faz esencialmente práctica revelando la nocividad de especies vegetales aplicadas en la alimentación de animales y cuya utilización eventual es cada vez más corriente.

La función cianogenética a semejanza de la clorofilica con la cual nada tiene que ver, ha recibido muchas interpretaciones y ha dado origen a innumerables trabajos científicos, sobre todo en los últimos tiempos. No obstante esos estudios, el reducido número, 197 especies, que aparecen en el cuadro publicado por Greshoff (1) en 1906, no dan material suficiente para explicar esa función, debido en gran parte al desconocimiento de las combinaciones en que se encuentran en los vegetales. Si consideramos paralelamente el número de plantas cianíferas que tienen el grupo sulfociánico (CNSH) el número de especies anteriormente expresado aumenta grandemente, pues entran plantas que contienen algunas esencias como en muchas Crucíferas, Caparidáceas, Tropeoláceas, Rucedáceas, etc., como lo hace notar Guignard (2) quien cuenta de esta manera hasta 1627 especies que tienen el grupo citado, constituyendo especies químicas diversas.

(1) Greshoff. — « Sur la distribution de l'acide cyanhydrique dans le règne végétal ». Bull. des Scien. Pharm. N° 11. — Nov. 1906.

(2) Guignard — Journal Botanique, t. IV, VII y VIII.

Debemos agregar las determinaciones que he catalogado en el cuadro respectivo que revelan la existencia del grupo cianhídrico en más de 50 especies nuevas, desde 1906 hasta la fecha, y se notará que dicha agrupación molecular no es solamente el argumento para sustentar una teoría más o menos fundada sino para corroborar un hecho de orden general por el que se atribuye al grupo citado como el generador de los compuestos azoados de los vegetales en las primeras etapas de su metabolismo.

Sin embargo es menester ponerse a cubierto del afán de explicar las cosas generalizando o marcando una finalidad determinada, puesto que con argumentos simplistas se pretende demostrar un hecho que se resiente por su poca eficacia. Este caso se presenta al decir que los glucósidos cianogenéticos tienen por objeto proteger los órganos tiernos y jugosos de las plantas jóvenes contra las asechanzas de sus enemigos, hasta tanto que crecidos y endurecidos puedan mecánicamente evitar o tolerar sin grandes perjuicios los ataques; razonamiento que no puede ser admitido, como tampoco se puede atribuir a sustancias cianogenéticas la mayoría de los casos de envenenamiento por pastos en los ganados, y aunque pudieran ser gran parte ocasionados por ellos, no los considero al solo fin de desempeñar el papel de tóxicos defensivos efímeros: pero sí que actúen en parte como material de reserva, papel que algunos autores le han asignado (3).

En nuestro país el estudio especial de temas de esta naturaleza ha sido comenzado en los últimos años por el trabajo debido a Alejandro Botto (4) y por otro que se particulariza sobre la Toxicidad de la Mandioca, debido a los señores Aree y Mendy (5); investigaciones de esta índole han sido abundantemente efectuadas en Norte América sobre todo en estudios aplicados a plantas forrajeras (Johnson Grass).

(3) Spegazzini C. — Notas y apuntes sobre las plantas venenosas para los ganados. An. Soc. Cient. Arg. 1914 -- LXXVII p. 259.

(4) Botto A. — Glucósidos generadores de ácido cianhídrico. Tesis 1910 — La Plata.

(5) Aree E. y Mendy J. B. — Toxicidad de la mandioca. A. Soc. Rur. Arg. Agosto 1917. LI (6) pág. 437.

La investigación cualitativa de un gran número de plantas realizada por el profesor Domínguez (6) han puesto de manifiesto una cantidad apreciable de vegetales con principios cianogénéticos entre los que se encuentra el *Holocalyx Balansae* Mich.; era pues, interesante para nosotros sin perder de vista la faz práctica del tema propuesto, fijar nuestra atención en la parte interpretativa, ocupándonos de la incorporación del ácido cianhídrico en la planta, concurriendo en la medida de nuestras fuerzas, a la dilucidación de un problema bastante obscuro aún al decir de Czapek (7), como es el esclarecimiento del papel fisiológico de dicha sustancia, dado que para conseguir ese objeto era indispensable aislar la combinación en que el ácido cianhídrico se encuentra.

Es útil citar lo que dicho Profesor dice al respecto: «La cuestión del ácido cianhídrico reclama un estudio profundo de conjunto, pues incuestionablemente se realizan fenómenos que tienen su grande importancia para la fisiología y la formación de sustancias del tipo cianhidrina o nitrilo que desempeñan un papel considerable en la química celular».

La presencia de urea en los vegetales estudiada por R. Fosso (8) tiene quizás el mismo origen puesto que demasiado conocida es su síntesis a partir del isocianato de amonio, producto de la actividad celular y transformable en urea por un fermento especial; el autor de dichos trabajos no hace alusión alguna en ese sentido, no obstante haber realizado un estudio completo sobre la presencia de la urea en los vegetales y de extenderlo luego a su origen en la naturaleza. (9).

Son indudablemente de más valor las síntesis bioquímicas de los glucósidos cianogénéticos utilizando la emulsina, trabajo emprendido por Bourquelot en 1914-1915 que señala un nuevo derrotero a estas investigaciones.

(6) Domínguez J. A., Molfino José F. y Galelli Emilia L. de.—I. Investigaciones fitoquímicas en plantas indígenas o naturalizadas. (Trabajos del Instituto de Botánica y Farmacología 1918 N° 39).

(7) Czapek — *Biochemie der Pflanzen* — II 1903, pág. 259.

(8) Fosso R. — Formation de l'urée par les végétaux supérieures. C. R. Acad. — 1912. CLV, pág. 851 y 1913. CLVI, p. 567.

(9) Fosso R. — Origine et distribution de l'urée dans la nature. — Bull. Soc. Ch. Fr. 1918 — XXIII, pág. 88.

El material necesario para el estudio que nos ocupa fué conseguido de los ejemplares aclimatados en el Jardín Botánico de esta Capital, debiéndose tener en cuenta especialmente la circunstancia anotada, puesto que siendo su adaptación completa ha debido obedecer forzosamente a los factores y leyes, clima y suelo, que lo rigen.

No debe extrañar, pues, la ausencia de fructificaciones por cuanto en el vegetal prevalecen todos los elementos restantes inalterados, coincidentes en todo con lo descripción original.

Por otra parte, al tomarlo para el estudio he tenido en cuenta la circunstancia de la variabilidad observada en la cianogénesis según las regiones, señalándose al efecto plantas cianogenéticas en otros países, que en el nuestro han perdido esa característica y viceversa.

Con el estudio del *Holocalyx Balansae* queda incorporada esta especie indígena al grupo de plantas cianogenéticas y para el cual realizamos previamente su análisis inmediato, siguiendo después con el aislamiento del cuerpo de naturaleza glucosídica que contiene y agregando en un tercer capítulo la experimentación relacionada con el estudio de la cianogénesis, en un todo de acuerdo con el siguiente desarrollo:

CAPÍTULO I.

Descripción botánica.

Datos relativos a la especie en estudio.

Caracteres anatómicos de la especie.

CAPÍTULO II.

Estudio fitoquímico.

Ensayos preliminares.

Análisis inmediato cualitativo y cuantitativo.

Estudio microquímico.

Aislamiento y estudio del principio cianogenético.

Composición de las cenizas.

CAPÍTULO III.

Los principios cianogenéticos en los vegetales.

Papel fisiológico, bioquímico y físico-químico del glucósido.

Cuadro de plantas cianogenéticas descubiertas desde 1906.

Acción tóxica.

Conclusiones.

CAPÍTULO I.

Descripción Botánica.

Datos relativos a la especie en estudio. — El *Holocalyx Balansae* es un vegetal perteneciente a la familia de las Leguminosas, subfamilia de las Caesalpinoideae, tribu *Schwartzia* (1), fué descrita por Micheli (2), en la colección efectuada por Balansa en el Paraguay durante el año 1880.

En homenaje al coleccionista, dedicó Micheli la especie en estudio siendo él también fundador del género *Holocalyx*, género que consta en la actualidad tan solo de dos especies: la que nos ocupa, *Holocalyx Balansae* Mich. y *H. Glaziovii* Taub. ambas sudamericanas, originarias de la formación subtropical.

La planta es bastante conocida en las regiones chaqueño misioneras por los nombres vulgares de Alecrin (Portugués: Romero), en Misiones y Corrientes; en Chaco y Formosa por el de Ibirá-Pepé, Uirá-Pepé o Uirá-Papá (Uirá: madera; pepé: ruido de madera al romperse, madera que se rompe). Además de esas regiones se le encuentra en el Chaco Paraguayo y dispersa en el Norte de Santa Fe. Los ejemplares existentes en el Jardín Botánico concuerdan con la descripción que hace Micheli, quien le asigna cuatro a cinco metros de altura definiendo en cambio la de Lillo y Venturi (3) al decir que es un árbol

(1) Engler y Prantl. — Die natürliche pflanzen familien. — P. Taubert p. 184 III. Leipzig 1894.

(2) Micheli Mare. — Contribution à la Flore du Paraguay. — Mémoires de la Soc. Ch. et d'Hist. Nat. de Geneve (1883), Tomo 28. n° 7. pag. 46.

(3) Contribución al conocimiento de los árboles de la Argentina. — S. Venturi y M. Lillo. 1910.

de grandes proporciones cuya circunferencia alcanza a 1.40 mts. y llega a una altura hasta de 15 mts.

Su madera dura y pesada constituye un material muy fino para enclapados y tornos, siendo en algunas regiones aprovechada para elaborar carbón y cabos de herramientas.

Gen. Holocalyx.—El género *Holocalyx* responde a la descripción siguiente: Árbol de hojas compuestas paripinadas con folíolos coriáceos y estípulas pequeñas.

Las flores se agrupan en pequeños racimos axilares siendo tanto las brácteas como las bracteolas de las inflorescencias pequeñas y persistentes.

El tubo del cáliz, es turbinado en el disco, corto y de limbo íntegro antes de la floración, la cual una vez producida lo deforma lateralmente, sin hendiduras ni lóbulos; es la característica del género (*Holos*: entero).

Los pétalos son muy caducos, angostos y casi lineares. Los órganos fecundativos lo constituyen 10 a 12 estambres todos libres, rectos, perigíneos, sus filamentos son filiformes teniendo anteras basifijas todas iguales, con hendidura longitudinal: el ovario estipitado es erguido y atenuado hacia el estilo con el estigma terminal pequeño; es pluriovulado y de óvulos descendentes.

Holocalyx Balansae Mich.—En cuanto a la especie (*Lam. 1*) se la describe como con ramitas erguidas y pubescentes cuando jóvenes, siendo sus hojas pinadas con folíolos 20-40 yugados, sesiles, oblongos, coriáceos, desiguales en su base, obtusos en el vértice, mucronados, siendo confusamente dentados; a menudo son muy largos, casi paralelinervios, de 20 a 25 milímetros de largo y de 5 a 7 milímetros de ancho; la nervadura principal de las hojas, es de 14 a 16 cms. de largo, rígidas, acanaladas en su parte superior y en la base de los folíolos brevemente aculeada; las estípulas son muy pequeñas y agudas. La inflorescencia se presenta en racimos numerosos, axilares, mucho más chicos que las hojas siendo también pubescentes.

Las flores son numerosas y pedunculadas tanto con brácteas como con bracteolas pequeñas y persistentes, el cáliz es torcido lateralmente desde el disco hacia el tubo, de cerca de un milímetro de largo con un perímetro de 2 milímetros.

Los pétalos son espatulados y lineales, unguiculados, de cerca de tres milímetros de largo y muy caducos; los estambres son de 5 mm. de longitud.

El ovario pubescente tiene un estilo corto y agudo y presenta los mismos caracteres descritos al hablar del género.

El fruto es en forma de legumbre ovoidea, túrgida, carnosa y gruesa; es indehisciente y contiene 1 a 3 semillas también ovoideas, globulosas y exalbuminadas.

Sus cotiledones son gruesos con radícula corta.

Caracteres anatómicos e histológicos de la especie

Tallo. — La anatomía observada en órganos jóvenes de este vegetal, no presenta ninguna particularidad que permita en un somero estudio como el que hemos efectuado, la distinción fácil de este vegetal entre los de la mayoría de la familia a que pertenece.

Observado el tallo de *Holocalyx Balansae* en corte transversal, se ve de contorno ligeramente exagonal con los vértices muy curvos. En la faz primaria de su desarrollo se nota la siguiente estructura:

1) La epidermis constituyendo la capa más externa del tallo, está formada por una sola hilera de células, dispuestas en una fila que presenta ondulaciones muy frecuentes, unas veces suaves y apenas curvas; en otras ocasiones forma entrantes bruscas. Las células son pequeñas e irregulares y poseen hacia la parte externa el espesamiento cuticular muy grueso y homogéneo. En la epidermis se observan además pelos más o menos ralos.

2) A continuación de la epidermis se observa el parénquima cortical formado en los tallos jóvenes por 7 o 9 hileras de células, entre las cuales llama la atención la segunda o tercera fila que está constituida por células mucho mayores que las demás. Todas las células están llenas de corpúsculos clorofílicos y se observan en ellas muy escasos cristales.

3) Hacia el interior del parénquima cortical una formación muy abundante de fibras pericíclicas, constituyendo una capa gruesa de fibras poligonales muy unidas las unas con las otras, formando en su conjunto una circunferencia en la cual se ven muy pocas interrupciones radiales.



LÁMINA I.—HOLOCALYX BALANSÆ MICH.

- 1). Ramas con inflorescencia; 2). Foliolos; 3). Flor sin pétalos; 4). Cáliz con bracteolas; 5). Pétalo; 6). Flores, sección longitudinal (segun Micheli).

4) El liber está formado por células irregulares reunidas constituyendo una capa espesa.

5) El cambium es de formación muy escasa con muy pocas capas de células.

6) El leño presenta vasos de contorno circular y distribuídos irregularmente entre las fibras, que son muy abundantes. Los radios medulares están formados por una sola fila de células y son muy abundantes.

7) La médula está formada por células poligonales con membranas engrosadas y con abundantes puntuaciones simples y completamente llenas de granos de almidón. (Lám. II y III).

En la madera se observa una corteza delgada, gris oscura, casi lisa; es de color amarillento muy compacta y de dureza considerable. Lillo y Spegazzini (4) citan ejemplares de algunas regiones que tienen la madera de un color rojizo oscuro.

Hoja.— Las hojas son compuestas, bipinadas. Haciendo un corte transversal de un foliolo observamos:

1) La epidermis superior está formada por células de contorno irregular y ondulado cuando se ven en corte sagital y rectangulares en corte transversal.

2) Debajo de la epidermis hay un parénquima clorofílico en empalizada formado por dos capas de células de las cuales las de la superior son más alargadas que las inferiores.

3) A continuación de las dos capas de empalizada se observa el mesófilo esponjoso formado por células irregulares.

4) La epidermis inferior está formada por células con los mismos caracteres que las de la epidermis superior, pero más chicas que ellas. Los estomas son muy abundantes. Las nervaduras del foliolo en número de 14, de las cuales la mitad son más pequeñas, se caracterizan por presentar el haecillo fibrovascular completamente rodeado de fibras esclerosas con paredes engrosadas. (Lám. IV, fig. 1 y 2).

(4) Spegazzini C. y Girola C. D.—Catálogo descriptivo de maderas. 1910. Génera Siphonogamarum.—C. G. De Dalla Torre y H. Harnus, pág. 171.—Años 1900 a 1907.

Raíz. — La raíz presenta una estructura que lo mismo que la de la hoja y del tallo, no ofrece ninguna particularidad, siendo como la de aquella la común de las dicotiledóneas. Los elementos que la constituyen poseen los mismos caracteres que las de los tejidos análogos que se observan en el tallo. La diferente distribución de los tejidos puede verse en el esquema de la figura que representa un corte de la raíz en su estado secundario de desarrollo. (Lám. IV, fig. 3).

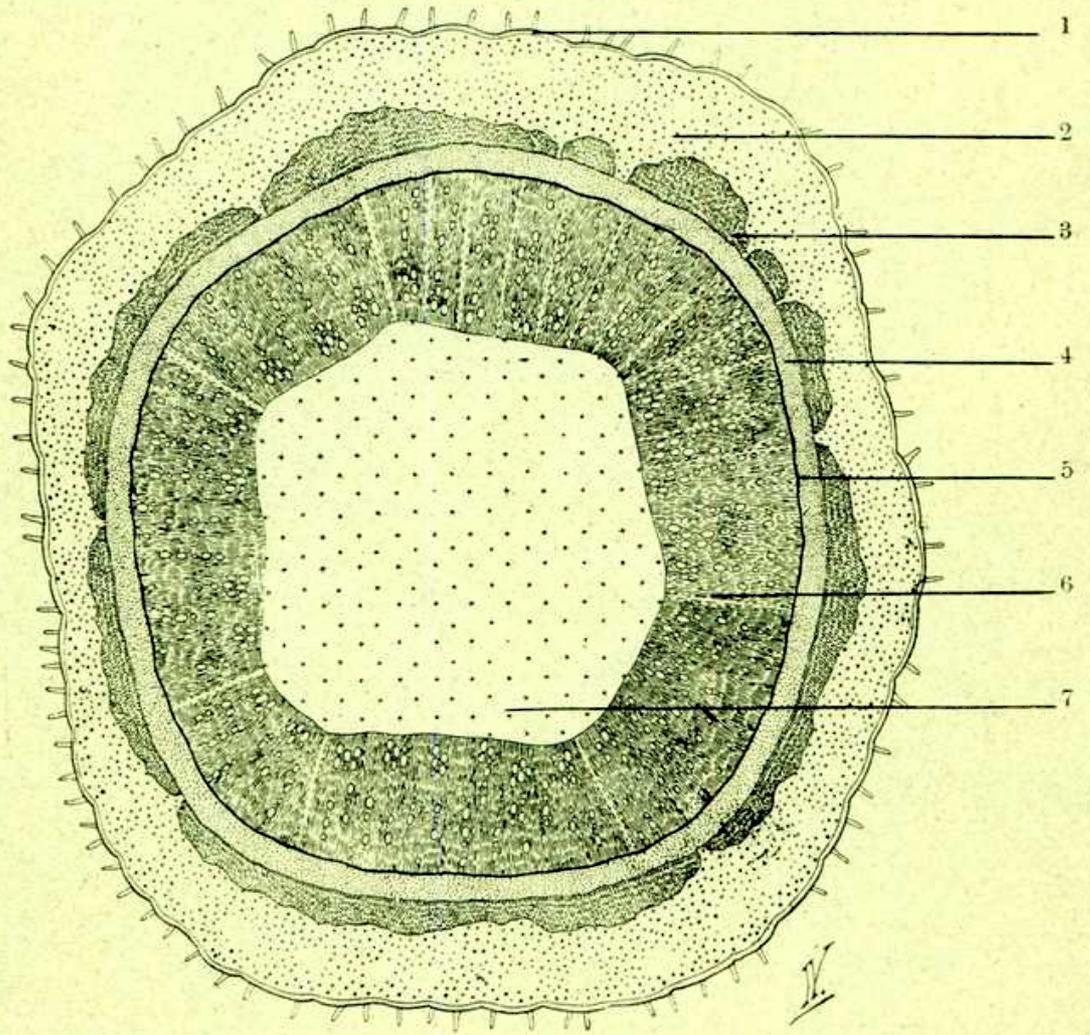


LÁMINA II.

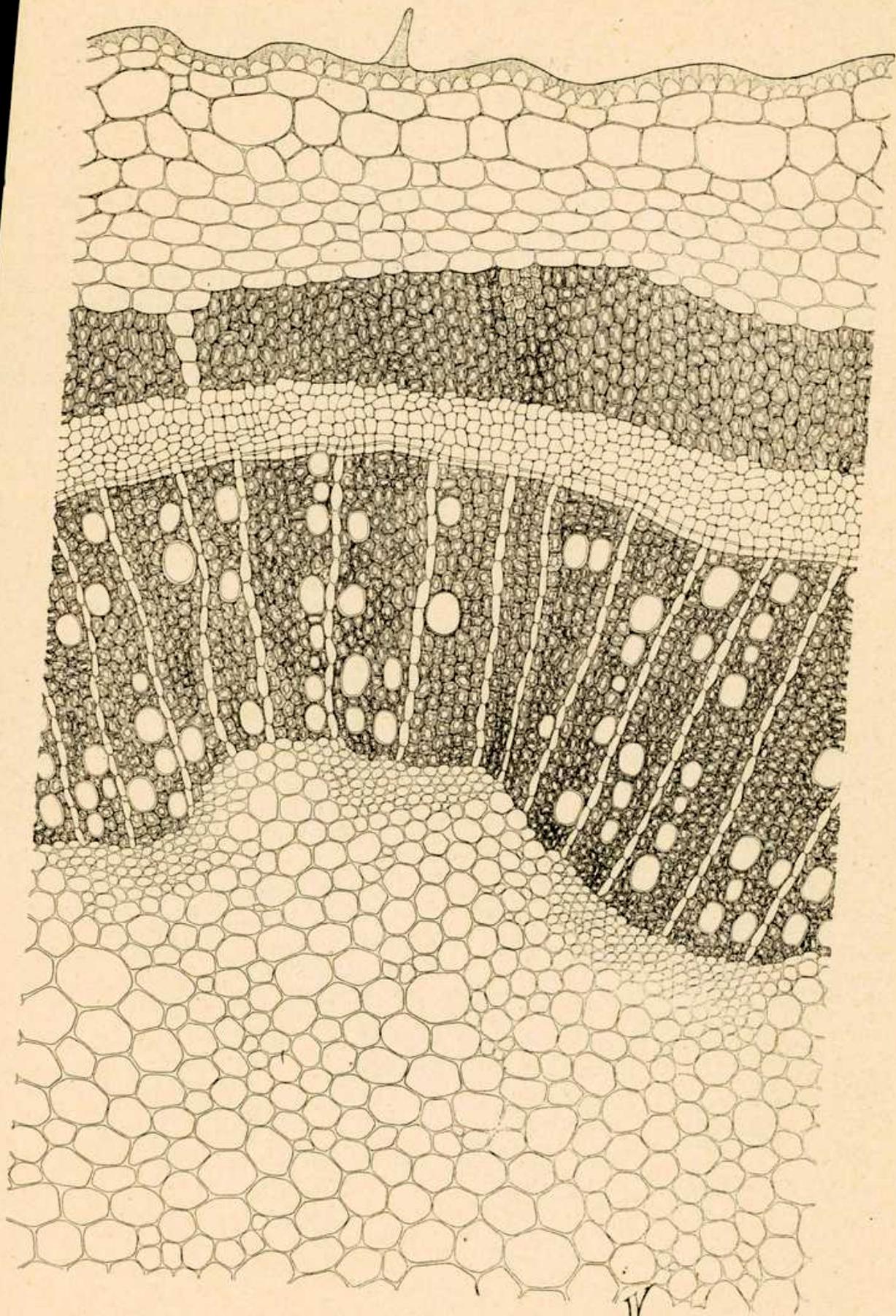


LÁMINA III.

II

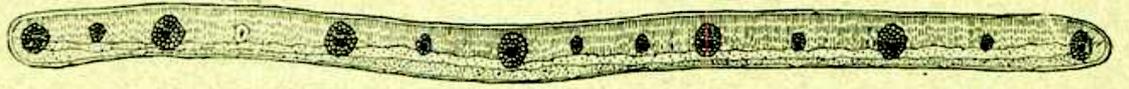


Fig. 1.

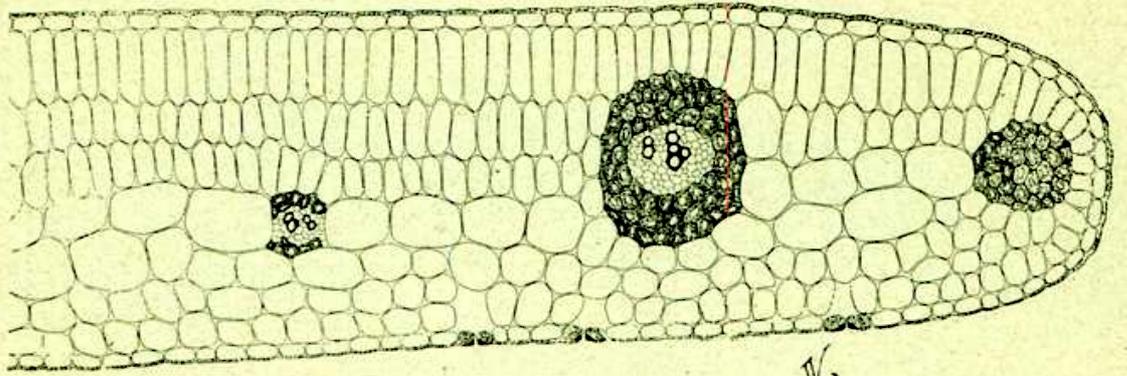


Fig. 2.

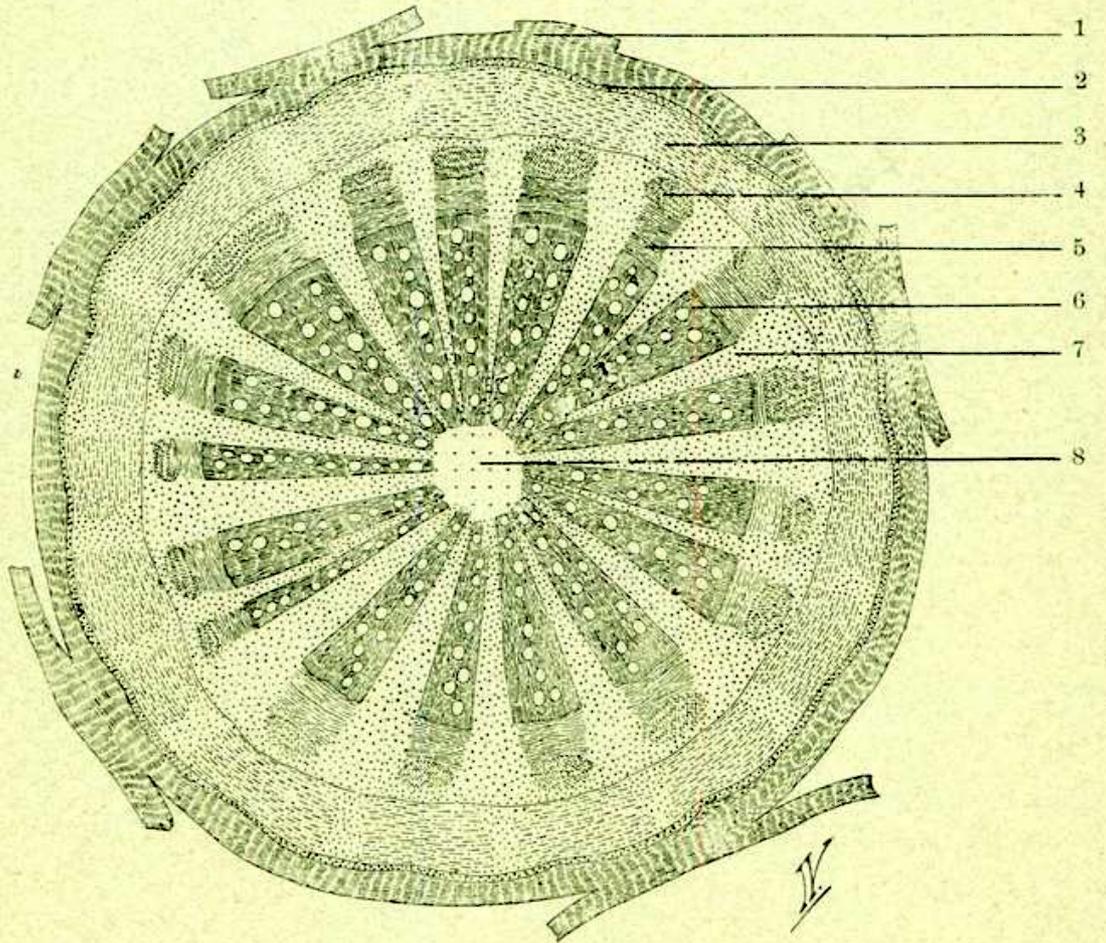


Fig. 3.

LÁMINA IV.

CAPÍTULO II.

Estudio Fitoquímico.

Ensayos preliminares. -- Antes de comenzar el análisis sistemático del vegetal, era menester verificar algunos ensayos previos que indicaran la orientación en las marchas de extracción, buscando en lo posible de seleccionar el método que debíamos adoptar para el caso de la existencia de varios principios activos, cuya naturaleza se establecería.

Para este efecto se hicieron hervir 20 gramos de folíolos frescos machacados y agitados continuamente; por otra parte se hizo una maceración acuosa de la misma cantidad de folíolos que dieron después de 24 horas un pronunciado olor a almendras.

Tanto el líquido de ebullición como el de maceración dieron después de filtrados un líquido de color amarillo verdoso de reacción ácida a los papeles reactivos; en el líquido, el sabor es amargo y astringente debido esto último a las materias tanantes.

I. -- A una porción de cada uno de dichos líquidos se le virtió una solución de acetato de plomo, produciéndose en ambos casos un precipitado blanco amarillento constituido por ácidos, materia tanante y albúminas; los líquidos filtrados al añadir una solución de subacetato de plomo precipitan nuevamente sustancias de color blanco que contienen gomas y parte de un cuerpo que por apropiadas caracterizaciones resultó ser de naturaleza cianoglucosídica. Este cuerpo no se notó en el líquido obtenido por ebullición. Al líquido residual de estas precipitaciones se le hizo pasar una corriente de hidrógeno

sulfurado para eliminar el exceso de plomo y una vez filtrado se le sometió a una corriente de anhídrido carbónico para expulsar el exceso de aquel gas, después de lo cual se notó aún la presencia de glucósido.

II. — Se procedió a la caracterización de saponinas calentándose el líquido a ebullición para destruir los saponoides, agitándose luego fuertemente; la ausencia de espuma persistente nos señaló la carencia de aquella substancia.

III. Vertiendo una cantidad igual del líquido en ensayo sobre otra de reactivo Fehling, hirviendo, y manteniendo la ebullición no se producía reducción; la reacción aparece únicamente cuando se digiere durante largo rato con un ácido mineral diluido, el clorhídrico, por ejemplo.

IV. — Las determinaciones cualitativas del ácido cianhídrico dieron resultados positivos con el líquido proveniente de maceración, notándose desde ya la acción de un fermento desdoblante. La caracterización de ese ácido se hizo por los distintos papeles reactivos recomendados para el caso, pudiendo anotar el distinto grado de sensibilidad que ellos presentan, reaccionando algunos con otras substancias. Hemos utilizado el papel picro-sódico de Guignard, el guayaco-cúprico de Schönbein y el de fenolftaleína reducida y sal de cobre de Thierry, operando con las indicaciones de sus autores.

En el estudio del *Phaseolus lunatus* L., recomienda Guignard (1) el uso del papel picro-sódico, que por la acción del ácido cianhídrico da un color rojo subido que se debe al ácido isopurpúrico de Hlasiwetz, sensible según dicho autor a gramos 0.00005 después de 12 horas y a 0.00002 a las 24 horas. En algunos casos he notado que cuando la existencia del ácido cianhídrico es demasiado pequeña el cambio de coloración resultaba poco nítida y considerablemente retardada cuando el papel se seca. M. Mirande ha perfeccionado (2) ese procedimiento haciendo actuar substancias que suspenden la acción clorofiliana, como los vapores de mercurio, sulfuro de carbono y anestésicos, cloroformo, éter, cloruro de etilo, que ejercen una

(1) Guignard L. — L'Haricot à acide cyanhydrique, *Phaseolus lunatus* L. — C. R. Acad. 1906. CXLII, P. 545. — Bull. Sc. Pharm. 1906. XIII, p. 193.

(2) Mirande M. — C. R. Acad. 1909, CXLIX, p. 140.

influencia notable sobre las plantas que contienen compuestos cianícos de manera tal que expuestos a su acción ellos desprenden ácido cianhídrico mucho más rápidamente, tanto a la luz como a la obscuridad. Por este método los resultados de la reacción se notan más rápidamente; veremos más adelante las comprobaciones experimentales a que han dado origen la interpretación de la acción anestésica.

Las cintas de papeles embebidas en solución de sulfato cúprico al 3 % e impregnada luego en soluciones distintas: tintura de resina de guayaco al 2 % (Schönbein) producen un color azul; con guayacol, color rojo granate; con α naftol, da azul claro; con veratrilamina, da violeta (Bourquelot y Bougault); con benecidina coloración índigo (Moiz); con ftalofenona en medio alcalino, color rojo (Thierry); reacciones todas estas concurrentes para una determinación más segura.

En el caso de la fenolftaleína reducida, el viraje de color es rápido y nítido, manteniendo su coloración durante algunas horas, pero las emanaciones ulteriores del vegetal, llegan hasta decolorar dicho papel.

La caracterización más segura y terminante, consiste en destilar y verificar con el destilado la reacción del azul de Prusia o la del sulfocianuro de hierro, siendo la primera hasta la aplicación cuantitativa en el método preconizado por Berl y Delpy (3).

Además de los ensayos cualitativos en las investigaciones preliminares se verificaron algunos datos de carácter cuantitativo como la humedad y cenizas por los métodos corrientes. Los resultados obtenidos en la primera determinación se expresan a continuación:

Humedad de foliolas (frescas).....	grs.	59.10 °.
» » » (secadas al aire)	»	9.20 »
» » ramas herbáceas.....		49.89 »
» » »	»	30.07 »
» » tallos.....	»	28.12 »
» » semillas	»	13.34 »

(3) E. Berl y Max Delpy.—B. d. D. Ch. G. 1910 Über die quantitative colorimetrische Bestimmung kleiner Blausäure Menge.

En el capítulo correspondiente se encontrarán los datos referentes a las cenizas cuya determinación global es la siguiente:

Cenizas de foliolas.....	grs.	6.935	%.
» » ramas y tallos.....	»	7.643	»
» » raíces.....	»	9.810	»
» » semillas.....	»	8.200	»

Las semillas conservadas desde hace cinco años no fueron facilitadas por el Profesor Domínguez.

Son de un color pardo bastante duras y presentan aspecto de no haberse alterado mayormente.

Diez de estas semillas desprovistas de la película, dejadas por unos días en secador pesaban grs. 8.57; la semilla más chica pesa grs. 0.525 y la mayor grs. 1.25.

Comprobóse en un ensayo la ausencia de ácido cianhídrico en la película, hecho que fué también constatado en las ramas y tallos del vegetal.

No se efectuaron otras determinaciones sobre las semillas por no ser frescas, como hubiera sido de desear; se comprobó en cambio en ellas la existencia de ácido cianhídrico al estado de glucósido.

Análisis inmediato cualitativo y cuantitativo.

Hemos efectuado el análisis inmediato cualitativo y cuantitativo a objeto de obtener indicaciones sobre la posible existencia de otros principios activos y determinar a su vez los principios inmediatos del vegetal.

Algunas fracciones fueron ensayadas desde el punto de vista toxicológico descartándose en otras, las sustancias de interés secundario.

Se tomaron a los efectos consiguientes 75 grs. de hojas secadas al aire, se trituraron en molinillo y se sometieron a la extracción en Soxhlet, dejando actuar cada disolvente tanto tiempo hasta el agotamiento del material. Siguióse el procedimiento Dragendorff adoptándose la técnica indicada por el Dr. L. Rosenthaler (1).

1. Medio de extracción: Éter de petróleo p. e. 35-40°.

Dió un extractivo verde obscuro por transparencia y violeta por refracción, debido a los componentes de la clorófila. Por agitación del líquido con agua acidulada con ácido clorhídrico se investigó la presencia de alcaloides con los reactivos comunes, Mayer, Fröde, Bouchardat, Dragendorff, etc., dando resultados negativos. Esta fracción está compuesta en su mayor parte de grasas vegetales, fitoestearinas difícil de purificar no obstante haberlos hervido repetidas veces con agua acidulada.

Lavado perfectamente el líquido y llevado a extracto, se tomó por alcohol hirviendo, disolviéndose a más de compuestos clorofílicos una cera que precipitó en forma de copos blancos al ser tratados por agua; se determinó el punto de fusión de la

(1) Rosenthaler L. — Grundzüge der Chemischen Pflanzenuntersuchung, 1901.
Dragendorff — Schlaglenhaufen Analyse del Vegetaux. (Enc. Fremy).

grasa que resultó igual a 48°: a temperatura más elevada desprendía humos y olor característicos de las grasas al quemarse: su índice de refracción tomado en refractómetro Zeiss es de 1,517 y el de saponificación de 148. No fueron posibles otras determinaciones debido a la exigüidad del extracto.

Con otra porción del extracto se lo sometió a ebullición en 50 cc. de agua y una vez filtrado se le agregó una cierta cantidad de emulsina preparada por el método de Bourquelot, se la dejó actuar durante 48 horas, al cabo de dicho tiempo fué expuesta a los papeles reactivos, no acusando el menor indicio de ácido cianhídrico.

La porción soluble en alcohol constituida por una pequeña cantidad de ceras y resinas se hizo evaporar y se pesó. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Extracto total.....	grs. 2.51	°.
Substancias solubles en agua.....	» 0.212	»
» insolubles en agua....	2.296	»
Cenizas del extracto total.....	» 0.008	»
Cuerpos solubles en alcohol a 95°..	» 0.483	»
Grasas.....	» 0.326	»
Ceras y resinas.....	» 0.108	»

2. Medio de extracción: éter sulfúrico absoluto.

El vegetal agotado por el éter de petróleo una vez eliminado el resto de ese disolvente se le somete a la acción del éter etílico, con el cual se extrae un residuo abundante compuesto casi con exclusividad de resinas coloreadas por la clorófila: contieno además algunos ácidos orgánicos y cuerpos indiferentes: efectuóse una agitación con ácido clorhídrico diluido, en todo análoga a la realizada con el disolvente anterior, comprobándose de la misma manera la ausencia de glucósidos, compuestos generadores de ácido cianhídrico y alcaloides. Luego se hizo actuar sobre el extracto la serie de disolventes conocidos: agua, alcohol, sulfuro de carbono.

Esta fracción dió los valores siguientes:

Extracto total.....	grs. 5.93	%
Cenizas del extracto total.....	» 0.2250	»
Materias solubles en agua a 100°..	» 0.2825	»
» insolubles.....	» 5.6475	»

Cenizas del extracto acuoso.....	grs.	0.0250	%.
Resinas	>	1.8165	>
Ceras	>	0.4740	>
Substancias grasas	>	2.035	>
Pérdidas.....	>	1.2970	>

3. Disolvente: alcohol absoluto.

Se saca el material del extractor y previo secado se le digiere durante varias horas en un matraz con refrigerante a reflujo, se filtra en caliente y el filtrado se abandona durante algún tiempo hasta enfriamiento completo; se depositó un hidrato de carbono y una pequeña cantidad de una substancia que resultó ser cianogenética. Por concentración en el vacío hasta la quinta parte de su volumen primitivo el depósito aumentó al enfriarse, luego se filtró. El líquido se privó por destilación de gran parte del alcohol que aún tenía y se agitó con éter produciéndose así un precipitado, soluble en agua, que resultó estar constituido en su totalidad por taninos.

Quedó de este tratamiento una pequeña cantidad de substancia insoluble en el agua que resultó soluble en cambio en hidrato de potasio y que se considera como flobafenos. Los cuerpos que se encuentran en la solución acuosa se trató de separarlos por el llamado método de los plomos de Rohleder cuyo principio es el de la precipitación fraccionada por el acetato y subacetato de plomo, que describiremos más adelante.

Concentrada la solución etéreo-alcohólica, se comprobó en el residuo la presencia de algunas materias tanantes de naturaleza glucosídicas. La fracción insoluble en agua resultó abundante, compuesta en su mayor parte de resina para cuya investigación nos hemos servido de las indicaciones de Tschirch; el fraccionamiento dió por resultado la separación de una pequeñísima porción de aceite etéreo soluble en éter de petróleo arrastrable por el vapor de agua, que se separó sin estudiarlo, debido al exiguo rendimiento; la resina presentó los caracteres de una gomo-resina.

Después de la precipitación de la solución acuosa por el acetato se hicieron las valoraciones del azúcar reductor. La solución acuosa nos sirvió para efectuar un ensayo toxicológico que se indica en el cuadro respectivo.

Según lo expuesto, los resultados obtenidos fueron:

Extracto total.	grs.	9.98	°
Cenizas del extracto total.	»	1.2530	»
Substancias solubles en agua.	»	4.8685	»
Cenizas del extracto.	»	0.8920	»
Materias en agua (clorófila, resinas, ceras, etc.)	»	5.1135	
Extracto de solución etéreo alcohólica.	»	2.780	
Substancias del extracto acuoso ppbles. por acetato de plomo.	»	1.1485	
Substancias ppbles. por subacetato de plomo	»	0.907	
Substancias no precipitables.		2.810	
Azúcares reductores	»	0.000	
Azúcares no reductores en glucosa.	»	1.105	
No determinado.	»	1.705	»

4. Substancias solubles en agua destilada fría.

Dejóse evaporar al aire el alcohol que impregnaba las hojas residuales de la extracción anterior, luego se añadió 220 cc. de agua permaneciendo en maceración durante 48 horas agitando con frecuencia, renovóse en dicho intervalo varias veces el agua reuniéndose al final todas las porciones.

Un volumen determinado del líquido se agitó con otro igual de alcohol que hizo aparecer un precipitado constituido en su mayor parte por substancias mucilaginosas, albúminas y también sales. Filtróse la solución alcohólica y se evaporó en el vacío a baja temperatura; la solución alcohólica se tomó por agua y se le aplicó el método de los plomos eliminándose el exceso de plomo en la forma ya indicada mediante una corriente de hidrógeno sulfurado y este a su vez por anhídrido carbónico.

El acetato de plomo precipitó un cuerpo caracterizado como albúmina y el subacetato precipitó substancias mucilaginosas que englobaba parte de una substancia cianoglucosídica. Parte del líquido residual se llevó a sequedad en el vacío una vez eliminado el plomo; obtuviéronse residuos mamelonados insoluble en alcohol absoluto, soluble perfectamente en agua que

desdoblado por ácidos dió las características de un glucósido cianogenético.

Los valores del extracto acuoso fueron:

Extracto acuoso total.....	grs.	10.02	°.
Cenizas del extracto.....	»	2.854	»
Substancias ppbles. por alcohol.....		0.758	»
»	» acetato de plomo..	»	3.025
»	» subacetato de plomo	»	0.240
Azúcares reductores	»	0.000	
Hidratos de carbono en glucosa.....	»	2.130	»
Nitrógeno total.....		0.682	»
No determinado	»	1.013	»

5. Materias solubles en agua hirviendo.

Esta extracción cedió pocas sustancias al disolvente encontrándose al lado de un polisacárido, mucilagos difícilmente solubles precipitables por el subacetato de plomo. La solución contenía además sustancias pécticas y xilanas que precipitan amorfas por agregado de alcohol. Se comprobó la ausencia de cuerpos de naturaleza cianogenética.

Los valores obtenidos para este fraccionamiento son los siguientes:

Extracto total.....	grs.	1.55	°.
Cenizas.....	»	0.365	»
Substancias ppbles. por subacetato de plomo.....	»	0.547	»
Pérdidas..		0.438	»

6. Disolvente: agua acidulada con ácido clorhídrico al 2 °.

Esta fracción así como las siguientes ofrecen escaso interés y solo se verificaron para completar el cuadro analítico.

La solución ácida en contacto con el material durante 5 días solubilizó las sales orgánicas difícilmente solubles de otra manera, como el tartrato y oxalato de calcio, caracterizados después de hervir el líquido con carbonato de sodio. Se determinó el almidón por el método que Fleurent aconseja, separándose también las materias albuminoides.

Los resultados fueron los siguientes:

Extracto total.....	grs.	7.14	%
Cenizas del extracto	»	1.485	»
Albuminoides.....	»	2.130	»
Polisacáridos.....	»	3.425	»

7. Substancias solubles en solución de potasa al 5 %.

El material de la operación anterior se agitó con agua hasta eliminación de acidez y luego se puso en baño maría con una solución alcalina renovada tantas veces hasta obtener una solución clara; se reunieron al final todas las fracciones dando un líquido coloreado de verde pardusco.

Por acidificación cuidadosa del líquido, resultó un abundante precipitado constituido por materias membranosas con regular cantidad de hemicelulosas y flobafenes de color pardusco que reducen al reactivo Fehling verificándose además algunas reacciones de taninos.

Los flobafenes por sí solos son insolubles en agua siéndolo cuando se encuentran en presencia de cuerpos tánicos.

Evaporada la solución acuosa a seco en el vacío y tomado el residuo con alcohol absoluto permanecen los flobafenes insolubles.

Se efectuaron en esta fracción las siguientes determinaciones:

Extracto total	grs.	23.60	%
Substancias ppbles. por acidulación ...	»	16.85	»
Substancias no ppbles. por acidulación	»	6.75	»

8. Extracción ácida.

El material de la extracción anterior lavado perfectamente con agua destilada se calentó con una solución clorhídrica al 5 %. Comprobóse estar constituido el extracto por oxilulosa debido a su reacción en frío con el sulfato de fenilhidrazina dando un color amarillo que por calentamiento intensificó su color; por otra parte redujo el reactivo Fehling y dió las reacciones que caracterizan al furfurool.

Este extracto dió	grs.	6.85	%
-------------------------	------	------	---

9. Materias residuales.

El residuo de la operación anterior constituido en su totalidad por celulosa, lignina y sales fué lavado repetidamente y secado en estufa, arrojando el siguiente resultado:

Lignina y celulosa	grs. 23.05 %.
Por incineración dejó cenizas	> 0.85 >

Por los datos que anteceden queda establecido como disolvente más apropiado para la substancia cianogenética el agua, pues es en dicha fracción donde se señaló la presencia de la casi totalidad del principio del vegetal; pero debido al desdoblamiento por un agente hidrolizante propio de la planta fué necesario para extraer el glucósido utilizar un procedimiento más conveniente o inactivar el fermento.

El fraccionamiento del *Holocalyx Balansae* Mich. dió en resumen el siguiente resultado:

Humedad.....	grs. 9.20 %.
Fracción soluble en:	
1. Eter de petróleo.....	> 2.51 >
2. Eter sulfúrico.....	> 5.93 >
3. Alcohol absoluto	> 9.96 >
4. Agua fría.....	> 10.02 >
5. Agua hirviendo.....	> 1.55 >
6. Agua acidulada HCl 2 %.....	7.14 >
7. Agua alcalina KOH 5 %.....	> 23.60 >
8. Agua acidulada HCl 5 %.....	> 6.85 >
9. Residuo insoluble (celulosa lignina)..	> 22.20 >
Sales minerales del residuo.....	0.85 >
Pérdidas.....	0.20 >
	100.00

• MÉTODO DE LOS PLOMOS

Este método propuesto por Rohleder es aplicado en los casos que se señalan en la marcha analítica anterior y no deja de tener sus ventajas en la sistemática de los análisis de vegetales.

En nuestro ensayo hemos anotado su aplicabilidad desde el ensayo preliminar y lo utilizamos también sobre macerados del vegetal inactivado y después de haber sido extraído con éter.

Siguiendo las indicaciones de Rosenthaler obtuvimos una idea más acabada respecto de los taninos, ácidos orgánicos, glucósidos, cuerpos colorantes, etc.

Como por este método se obtienen las combinaciones plúmbeas que permiten obtener y separar líquidos claros las distintas fracciones se prestan a una investigación más cómoda. Se extrajeron con éter 100 grs. de hojas secadas al aire y machacadas, haciéndolas macerar luego con 250 cc. de agua, efectuando la inactivación del fermento por un tratamiento previo en autoclave durante 5 minutos; se filtró al cabo de 24 horas hirviéndose el residuo con 150 cc. más de agua reuniéndose luego ambos líquidos. La solución obtenida se precipitó con solución de acetato de plomo al 10 % dando un residuo blanco (A), se filtró, se lavó con solución de acetato y luego con agua hasta eliminación de acidez. Resultó un líquido de color amarillo el que precipitó con solución de subacetato de plomo siendo filtrado y lavado en igual forma que el anterior (precipitado B).

Ambos líquidos eliminados del exceso de plomo por la corriente de hidrógeno sulfurado corresponden a los precipitados A y B respectivamente.

Los resultados numéricos obtenidos son los siguientes expresados en vegetal seco:

Residuo del extracto acuoso	grs.	11.70 %
Substancias ppbles. por acetato de plomo.	»	6.575 »
» » » sub » » » ...	»	4.030 »
» no »	»	1.105 »

El precipitado A que se trató con alcohol hirviendo se solubilizó en parte, se filtró y se eliminó el plomo como ya se ha dicho y luego por evaporación en el vacío se evaporó a sequedad comprobándose que el residuo estaba constituido por un flobafeno insoluble debido a la descomposición de parte de los taninos y notándose la presencia de ácidos tártrico y oxálico, no así la de glucósidos.

Con el precipitado B se siguió un procedimiento de solubilización análogo al anterior omitiendo el agregado de ácido acético al

residuo de tratamiento alcohólico; en él se comprobó la existencia de un hidrato de carbono insoluble en alcohol absoluto y cuya naturaleza la establecimos al aislar el principio activo.

En el líquido B neutralizado con carbonato de sodio se comprobaron cuerpos mucilaginosos y gluocosídicos.

En ninguna de las fracciones que por este método resultan se constató la presencia de alcaloides. Los residuos plúmbicos investigados de acuerdo con las indicaciones que se dan al respecto no revelaron mayores datos respecto del carácter de los compuestos cianogenéticos.

De la misma manera que con las combinaciones plúmbicas se comportan distintas sales, hidróxidos o carbonatos de cobre. Se puede por ejemplo, precipitar primero por carbonato las sustancias mucilaginosas y tánicas, continuando luego con hidróxido precipitan otros cuerpos. Aún no ha sido establecida una marcha analítica de esta naturaleza.

El resultado de estas investigaciones indicó la presencia de un ácido tánico y de su correspondiente flobafeno comprobándose también la presencia de dos ácidos orgánicos, tártrico y oxálico, así como la ausencia de alcaloides.

El agua de la solución residual de la primera precipitación con la sal de plomo contenía la mayor parte del glucósido.

Estudio Microquímico

La mayor parte de los glucósidos cianogenéticos aislados en los vegetales tienen la propiedad de desdoblarse por la acción de distintos agentes, tales como los ácidos diluidos, álcalis, fermentos solubles, agua a ebullición, calor, bromo o electrolisis. En ningún caso se ha comprobado que el desdoblamiento se produjera sin la acción de alguno de los agentes mencionados, siendo en cambio común notar la existencia de fermentos específicos de acción bien definida como en el caso de la reacción provocada por la mirosina sobre el mironato de potasio de la mostaza negra y cuya acción se extiende sobre los glucósidos con azufre en su molécula.

Por el estudio microquímico de los contenidos celulares, trató de establecer Guignard (1) por analogía con las reacciones de localización de los productos de secreción depositados en los elementos histológicos característicos, reacciones de la misma naturaleza para la emulsina. La dificultad de este intento estaba en la no existencia de reacciones específicas para los cuerpos de naturaleza distásica cuya composición es desconocida y cuyas reacciones son comunes con las sustancias albuminoideas que constituyen a su vez el protoplasma de las células.

La acción del tanino es por otra parte opuesta a la emulsina y por consecuencia cualquier localización en esas condiciones trae el inconveniente de desparramar el ácido cianhídrico en el seno del protoplasma, impidiendo el objeto que se persigue. Además no existen las investigaciones fito-histológicas aplicadas directamente con un solo reactivo que caracteriza la emul-

(1) Guignard León. — Sur la localisation, dans les amandes et le laurier-cerise des principes qui fournissent l'acide cyanhydrique.

sina y en ese sentido lo expresan diversos autores consultados (2).

Resultados más satisfactorios, obtuvo Treubb, localizando en cambio los glucósidos y de acuerdo con sus indicaciones hemos ensayado su procedimiento operando sobre 28 cortes de hojas de *Holocalyx Balansae* y otras tantas de *Prunus laurus cerasus*, como testigo.

Funda Treubb su método en la fijación del resto cianhídrico por la potasa alcohólica, haciendo luego actuar una sal ferrosa sobre el cianuro formado, originándose el ferrocianuro de potasio que fácilmente se caracteriza por una sal férrica. Con ese objeto indica la utilización de una solución ferroso-férrica después de haber hecho la fijación para luego eliminar el exceso de hierro por ácido clorhídrico.

Los resultados han sido poco satisfactorios puesto que recién a las 48 horas se colorearon tan solo dos preparaciones: hemos tratado entonces de modificar la técnica en distintos sentidos, obteniéndose los mejores resultados fraccionando la solución ferroso-férrica de acuerdo a las reacciones que se producen «in-vitro».

Se sometieron las hojas a una estabilización en auto-clave para inactivar el fermento y luego se hicieron cortes delgados, pero que comprendiesen por lo menos una capa de células intactas, se sumergieron en seguida durante medio minuto en solución alcohólica de potasa al 5 %. Los cortes son transportados de allí a una solución de sulfato ferroso al 2,5 % a 60° C. durante 10 minutos y luego por 5 minutos en solución de ácido clorhídrico (un vol. de ácido concentrado en 6 vol. de agua); los cortes se dejan finalmente 5 minutos en solución de cloruro férrico al 1 % y después de un rápido lavaje son observados al microscopio.

Los haces fibrovasculares de 22 cortes sobre 30 se colorearon en azul celeste, adquiriendo también esta coloración los vasos leñosos. Se hicieron preparaciones análogas con cortes de pedúnculos foliares herbáceos, siendo los resultados menos nítidos.

(2) Thouvenin M. — Précis de Microchimie végétale. 1901.

Mialock. — Técnica histológica vegetal y micro-química. 1908.

Poulsen V. A. — Microchimie végétale.

Aislamiento y estudio del principio cianogenético.

Para el aislamiento de la sustancia cianogenética se tentaron diversos procedimientos, entre los que se puede citar el que usan Alsberg y Black y que no nos dió resultado alguno. Dicho método se funda en que el agua es el mejor disolvente para extraer los compuestos de la naturaleza del que nos ocupa; el extracto acuoso es tratado con solución saturada de barita hasta que se forme precipitado. Después de filtración se elimina el exceso de barita por una corriente de anhídrido carbónico. El líquido es clarificado por congelación del agua, eliminándose los cristales de hielo de la solución.

Si bien es cierto que operando en esa forma se tiene una solución concentrada de sustancia cianogenética, ésta aparece siempre acompañada de sal de bario, cuya toxicidad es manifiesta, siendo difícil separarla y aislar la especie como para efectuar experiencias toxicológicas.

Machacados perfectamente 300 grs. de hojas inactivadas en autoclave se sometieron a la extracción con alcohol a 95° evaporándose luego el líquido a presión reducida hasta consistencia de extracto, el que se hirvió con 200 cc. de agua para separar las resinas disueltas.

El líquido acuoso se trató con una solución de acetato de plomo que dió un abundante precipitado eliminándose el exceso de plomo por una corriente de hidrógeno sulfurado y luego éste por anhídrido carbónico. Evaporóse al vacío y a baja temperatura hasta consistencia de extracto y por lavado con una mezcla de alcohol y éter se alejaron otras impurezas.

Se filtra y disuelve el precipitado con poca agua y se deja evaporar la solución espontáneamente sobre ácido sulfúrico.

El residuo de esta evaporación que se presenta en forma de pequeños mamelones, se toma nuevamente con poca cantidad de agua dejándose evaporar en la misma forma anterior, lavándose el residuo repetidas veces con mezcla de alcohol y éter y finalmente con éter puro.

Se obtiene así un residuo amorfo que se trató repetidamente de hacer cristalizar tomándolo por distintos disolventes: aparte de presentar escasa solubilidad en los medios citados, éter, éter de petróleo, alcohol absoluto, hemos ensayado otros como el tetracloruro de carbono, acetona, cloroformo y éter acético sin obtener mejores resultados.

Este último disolvente tan recomendado para la extracción de cianoglucósidos presenta un serio inconveniente debido a la acidez con que siempre se presenta. Finalmente fué secado el residuo obtenido en presencia de ácido sulfúrico y luego a estufa a 95°.

El rendimiento es de grs. 0,65 % de hojas secadas al aire. Por los ensayos cualitativos establecimos que el cuerpo obtenido tiene todas las características de un glucósido cianogénico: es de color blanco amarillento, su sabor tomado con debidas precauciones resultó ser amargo, es fácilmente soluble en agua.

El punto de fusión para la substancia purificada es de 131-133° entrando en descomposición entre los 10° arriba de la temperatura mencionada: es levogiro, y su desviación polarimétrica para la solución al 10 % a la temperatura del laboratorio (18°) es de $-25^{\circ}7$.

Se ensayó una solución acuosa al 10 % sometiéndola a la acción de diversos agentes desdoblantes, notándose al producir la escisión de la molécula, un pronunciado olor al ácido cianhídrico puesto en libertad.

Guiados por las indicaciones de Bourquelot y por los trabajos de Willmann hemos notado que la planta tiene un fermento propio desdoblante que es el que actúa, pero así mismo dicho desdoblamiento no es total, puesto que efectuado el arrastre por vapor de agua despues de 24 horas y añadiendo emulsina, resultaba por nuevo arrastre una pequeña cantidad de ácido cianhídrico que se debía sumar a la anteriormente determinada.

Las valoraciones del ácido cianhídrico se efectuaron por el

método volumétrico de Liebig-Denigés, comprobado con el método gravimétrico, obteniendo en tres ensayos distintos los resultados siguientes, lo que arroja un término medio del total de grs. 9,376 de ácido cianhídrico.

I)	Acido cianhídrico	grs.	8,752	0,668	9,42
II)	»	»	9,305	0,425	9,73
III)	»	»	8,515	0,765	9,28

À continuación verificamos el nitrógeno total por medio de un Kjeldahl, operando sobre grs. 0,20 de substancia y se obtuvo después de la titulación 0,1343 de nitrógeno que corresponde a grs. 6,867 de nitrógeno % total y grs. 10,66 % de ácido cianhídrico, valor que nos da una pequeña diferencia con las determinaciones anteriores y que nos demuestra la ausencia de otras agrupaciones nitrogenadas en la molécula.

La determinación de hidrato de carbono ya puesto de manifiesto, se llevó a cabo en líquido completamente hidrolizado, operando sobre un volumen fijo después de haberlo dejado reposar durante 36 horas, al cabo de cuyo tiempo se midió la polarización, observando en un aparato Laurent con luz de sodio.

Teniendo en cuenta que un grado de rotación es igual a $\frac{1,8961}{l}$ gramos de dextrosa por 100 cc. y como la longitud l del tubo era de 20 centímetros: rotación de $1^\circ =$ grs. 0,948 de dextrosa por 100 centímetros cúbicos.

La desviación dextrógira fué de $D = 15,368$ que corresponden a grs. 14,569 de glucosa en la solución al 10 % de los 20 cc. de líquido.

Con el mismo líquido anterior se verificó la reacción de la fenilhidraizna de Fischer haciendo actuar solución acética del reactivo sobre el líquido neutralizado; la reacción no bien nítida al principio, se manifestó después del enturbiamiento amarillento que la caracteriza, por la aparición de una sustancia cristalizable, que purificada por alcohol cristalizó en agujas, cuyo punto de fusión era igual a 205° ; por este hecho quedó demostrada la presencia de glucosa en la substancia reductora, notándose aparte, otra substancia con la misma característica.

Expresando el resultado obtenido en la observación polarimétrica en dextrosa anhidra y no teniendo en cuenta la va-

riación del poder rotatorio específico con la concentración resulta obtenerse: 72,843 grs. % de glucosa.

Habiase observado entre los productos de desdoblamiento un cuerpo de función acetónica, tratóse de ponerlo de relieve por medio de reacciones apropiadas, investigando previamente la existencia del núcleo bencénico para lo cual se hicieron ensayos de nitración por una parte y oxidación por la mezcla crómica por otra, sin resultado alguno, pero en cambio se notó como producto de oxidación el ácido acético.

A más de las reacciones características del grupo carbonilo, se investigó la acetona cualitativamente, tanto en soluciones desdobladas, como en el destilado, por la reacción de la orto-nitrobenzaldehida agregada en cristales en medio fuertemente alcalino, que transforma la acetona en índigo cuyo solo color azul es arrastrado por el éter.

La determinación cuantitativa de la acetona se hizo al estado de yodoformo por el método de Krämer sobre substancia desdoblada haciéndose las valoraciones por duplicado.

A tal efecto se tomaron 0.50 grs. de substancia, se disolvieron en 10 cc. de una solución de ácido clorhídrico, dejándose desdoblar durante 24 horas en tubos cerrados, al cabo de ese tiempo se neutralizó por adición de soda y luego se le virtió agitando 10 cc. de solución de hidrato de sodio 2/N y 10 cc. de yodo 2 N. Se dejó en reposo durante una hora y añadió 10 cc. de éter exento de alcohol y se dejó reposar, luego de haberse agitado, se leyó el volumen ocupado por el éter, evaporándose una parte alícuota sobre cristalizador tarado y dejando secar los cristales de yodoformo formados, en secador, para efectuar en seguida la pesada. Teniendo en cuenta que a 100 partes de yodoformo corresponden 14,72 de acetona y operando con las indicaciones detalladas más arriba, hemos obtenido:

I) determ. grs. 0,5839 de yodoformo

II) » » 0,6055

corresponden a acetona:

I) grs. 0,8582 y expresados en 100 de glucósido resulta: grs. 17,164 %.

II) grs. 0,9053 o sean grs. 18,106 %.

resultando un término medio de 17,63 grs. % de acetona en el glucósido.

El método de Strache (1) para la determinación cuantitativa indirecta de los compuestos con grupo carbonílico (aldehidas y acetonas) basado en la acción de un exceso de solución valorada de fenilhidrazina, titulando la parte no combinada con solución de reactivo Fehling, se ensayó con resultado poco satisfactorio, debido a la dificultad de separar las dos sustancias reductoras.

Con los datos obtenidos se puede establecer la composición siguiente para el glucósido:

Acido cianhídrico	grs.	9,37	%.
Glucosa	>	72,80	>
Acetona	>	17,63	>

Este análisis funcional nos ha dado los datos suficientes para que se nos revelase una sustancia de naturaleza cianoglucosídica cuyas proporciones la colocan entre las que presentan la composición de la linamarina o faseolunatina de constitución conocidas y estudiadas detalladamente por Dunstan y Henry.

Por el estudio de sus propiedades veremos toda la analogía que conserva con dichos cuerpos; por lo pronto, los productos de su desdoblamiento por ácidos diluidos y fermentos, salvo ligeras variantes, dan una idea clara de su constitución.

Por calentamiento del glucósido con una solución de álcali fijo, se produce el desprendimiento de nitrógeno, en forma de amoníaco, dando lugar a un ácido faseolunatínico, que, por acción de ácidos diluidos, genera a un ácido oxibutírico, que es revelado, por su olor característico y por su inactividad a la luz polarizada, debido a la compensación de los antípodas ópticos, separables únicamente por la brucina.

No obstante haber establecido Kohn-Abrest (2) la diferenciación de tres compuestos cianogenéticos que funden a temperaturas distintas, atribuyéndole composiciones también distintas, Dunstan y Henry sostienen que en definitiva no es más que

(1) Giral y Pereira José. — Análisis orgánico funcional 1913. Zeitsch. — F. analyt. Chemie 1892, p. 573.

(2) Kohn-Abrest. — C. R. Acad. 1905 CXLII, p. 586. — Kohn-Abrest. C. R. Acad. 1906, CXLIII, p. 182.

un solo compuesto, fusible a la temperatura más elevada, o sea 130°, demostrándolo acabadamente (3) y desvirtuando el fraccionamiento, que aquel autor preconiza. Por nuestra parte nos hace pensar, que tal diferenciación no es más que fruto de la técnica empleada, y en ese sentido debemos hacer notar el arrastre de otras sustancias, por los disolventes utilizados, muchas veces difíciles de separar del principio en estudio.

Fundándonos en los trabajos de E. Fischer (4), quien hace actuar otros fermentos sobre la amígdalina, pusimos en presencia el glucósido con levadura de cerveza; la existencia de un polisacárido en la molécula sería revelada en este caso por la formación de productos de transición, que una vez separados permitirían caracterizar un nuevo compuesto revelable al desdoblamiento.

La acción de la levadura resulta ser parecida a la de los demás agentes usados, pero con una lentitud extremada, notándose recién el desdoblamiento a los cuatro días, lo que nos hace suponer la existencia de pequeñísimas cantidades de emulsina en la levadura de cerveza; los ensayos toxicológicos confirmaron la acción lenta de la levadura.

Establecida la composición del glucósido por identificaciones de los productos de hidrólisis y por el estudio de sus propiedades, estamos en condiciones de asignarle la fórmula de constitución de los alfa-glucósidos, debido a su desdoblamiento mediante la emulsina y basándonos en las consideraciones que Plimmer hace para estos casos (8). De acuerdo con este autor podríamos suponer un desarrollo de la forma siguiente:

(3) Dunstan-Wyndhan R. y Henry Thomas. — A. Sur la formation de l'acide cyanhydrique dans les végétaux. — *An. de ch. et. Ph.* 1907 X, Serie VIII,

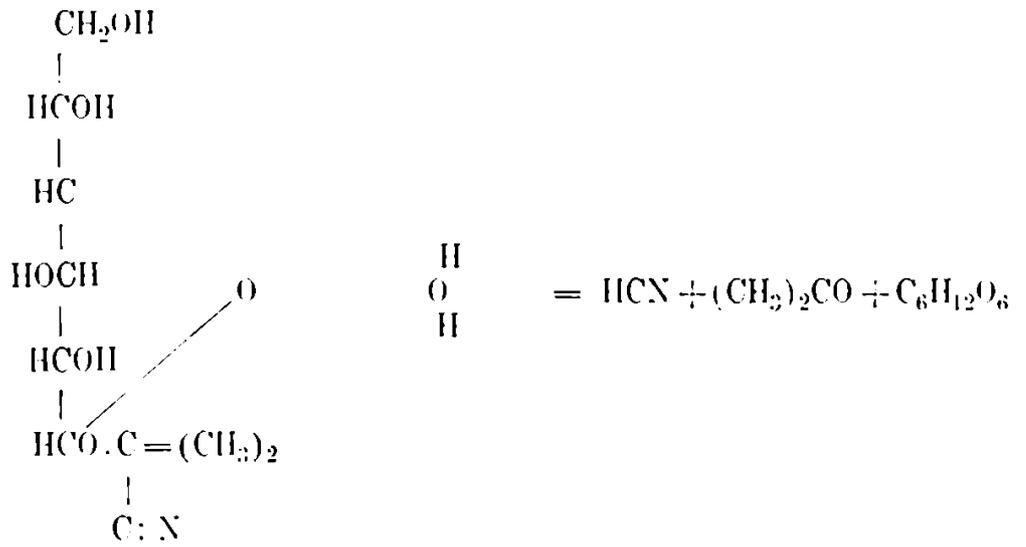
(4) *B. D. Ch. G.* 1895 XXVIII. pag. 1509.

(5) Alsberg C. L. y Black. — Concerning the distribution of cyanogen ingrasses especially in the genera *Panicularis* or *Glyceria* and the *Tridens* or *Sieglingia*. *The J. of Biol. Ch.* 1915 XXI (3) pág. 601 U. S.

(6) Willaman J. J. — The estimation of hidrocyanic acid and the probable form in which it ocures in *Sorghum vulgare*. — *The J. of Biol.* 1917 XXIX (1) pág. 25.

(7) Tollens. — *Les Hydrates de carbone*. Trad. Bourgeois L. 1896. — *Lassar-Cohn. Arbeitsmethoden für organisch-chemischen laboratorien*, 4ª edición 1907.

(8) Plimer R. H. Aders. — *Pract. Org. and Bio-Ch.* 1918, p. 154-214.



Como vemos, nos encontramos ante un éter α glucosídico de la acetona cianhidrina, cuya naturaleza es bien manifiesta por su desdoblamiento con la emulsina.

Composición de las cenizas.

Como un estudio de conjunto del «alecrin» no ha sido emprendido hasta la fecha, se carecen en absoluto de datos referentes al análisis de cenizas, siendo ésta la primera contribución que sobre el tema se efectúa.

El análisis se ha realizado sobre un residuo de incineración de ramas y hojas y parte de leño, de las plantas que se cultivan en el Jardín Botánico, llevándose a cabo la calcinación con las precauciones que al efecto indica Fresenius en su «*Traité d'analyse chimique quantitative*» (1) cuyos métodos se han adoptado también para la marcha analítica salvo en los casos que era más ventajoso utilizar otros, que sin sacrificar su exactitud, fueran más expeditivos.

Por un ensayo previo se verificó la presencia de los elementos comunes en las cenizas formándose de paso una idea, aunque aproximada sobre las cantidades de Fe_2O_3 , Al_2O_3 , CaO , MgO , P_2O_5 , SO_3 , etc., y notándose de paso la ausencia de elementos raros.

Hemos visto anteriormente la riqueza de cenizas de las distintas partes del vegetal secado al aire; la proporción es de grs. 7,56 de vegetal seco en las partes estudiadas. Se ha podido constatar la presencia de gran cantidad de CaO y Al_2O_3 encontrándose en cambio vestigios de hierro.

La valoración de la alcalinidad correspondiente a carbonatos y bicarbonatos solubles fueron de grs. 2,288 % y grs. 1,496 % respectivamente, ambos expresados en CO_2 .

Sobre el líquido proveniente de la neutralización anterior se determinaron cloruros por volumetría (Mohr), con solución de nitrato de plata N/20.

La determinación del manganeso se verificó por colorimetría

(1) Fresenius R. — *Traité d'Analyse Chimique Quantitative*, trad. L. Gautier.

eliminando los cloruros de la solución nítrica con óxido de plata y siguiendo el método que describe Treadwell, (pág. 336) (2).

Las operaciones que originaron la insolubilización de la SiO_2 y la precipitación de sulfatos son lo suficientemente conocidas como para evitarme su descripción. La separación de Fe_2O_3 , Al_2O_3 , CaO y MgO no ofrecen particularidad alguna siendo sus valoraciones efectuadas por los métodos corrientes.

El fósforo se determinó por el método de Sonnenschein modificado por Woy, y para el sodio y potasio, se siguió el método de Schlösing-Wense, tratando las soluciones concentradas de sus cloruros por solución de ácido perclórico dos veces para obtener así perfectamente separadas la sal insoluble de potasio.

El anhídrido carbónico se determinó volumétricamente desde que la ausencia de hierro no produciría inconvenientes por absorción de ácido.

Los valores previos obtenidos fueron:

Cenizas solubles.....	grs.	30.50	%
insolubles.....	»	69.50	»
Alcalinidad de carbonatos.....	»	2.288	°
» de bicarbonatos.....		1.496	»

Los resultados del conjunto son los siguientes:

	En 100 partes de cenizas gramos	En 100 partes de vegetal gramos
Residuo insoluble: Arena.....	1.45	0.1102
Carbón.....	0.75	0.0570
SiO_2	3.20	0.2432
Aluminio expresado en Al_2O_3	11.80	0.8968
Hierro » » Fe_2O_3 (vestigios)	—	—
Manganeso » » MnO	0.014	0.0011
Calcio » » CaO	35.95	2.7322
Magnesio » » MgO	2.16	0.1642
Potasio » » K_2O	9.01	0.6842
Sodio » » Na_2O	5.57	0.4238
Sulfatos » » SO_3	2.87	0.2181
Cloruros » » Cl	1.70	0.1292
Fosfatos » » P_2O_5	3.52	0.2675
Carbonatos » » CO_2	21.99	1.6315

(2) Treadwell F. P.—Tratatto di chimica analitica, 1907.

CAPÍTULO III.

Los principios cianogenéticos en los vegetales

Entre las numerosas especies vegetales con principios tóxicos no son precisamente los que tienen sustancias cianogénicas los que más se hayan caracterizado por su actividad en ese sentido. Por el contrario, son muy numerosas las plantas en esas condiciones que ocupan un lugar preponderante en la nutrición, ya como forrajes o ya como alimentos para el hombre, debiéndose observar que en muchos casos, los accidentes consignados fueron debidos a la similitud de los frutos que contenían glucósidos con otros muy parecidos en los que no se habían señalado tales principios.

El descubrimiento del ácido cianhídrico en el *Phaseolus Lunatus* L. procedente de Java, por Davidson en 1884 y su introducción en Europa, trajo aparejada una serie de accidentes que se observaron y caracterizaron detenidamente y obligaron a las autoridades la adopción de disposiciones precaucionales a consecuencia del informe de Guignard. (1)

En algunos casos los glucósidos cianogenéticos existen únicamente en semillas, quedando por consecuencia el peligro relativamente alejado, puesto que por su sabor amargo o poco apetente no invitan a ser ingeridas en cantidades como para llegar a ser tóxicas.

(1) Guignard L. — L'Haricot à acide cyanhydrique. *Phaseolus Lunatus* L. 1906.

Guignard L. — Sur la localisation dans les amandes amères et le laurier cerise des principes qui fournissent l'acide cyanhydrique. *J. Bot.* 1890, página 22.

Por la aplicación del método de Bourquelot (2-3) en la investigación de los glucósidos, utilizando la emulsina como agente desdoblante se verificaron una serie de estudios que llevaron a descubrir 9 glucósidos, entre los cuales habían algunos no cianogénéticos, encontrándose la bibliografía de éstos, en las actas del «Seventh International Congress of Applied Chemistry de 1909» en la sección Bioquímica, página 121.

Hasta la fecha se han aislado unos 10 glucósidos generadores de ácido cianhídrico que se enumeran por orden cronológico a continuación:

Amigalina 1830 (4).

Linamarina 1891 (5). = Faseolunatina 1903 (6).

Amigdonitrilglucósido 1895 (7), preparada por hidrólisis de la amigdalina y los fermentos de la levadura de cerveza.

Lotusina 1900 (8).

Dhurrina 1902 (9). — Glucósido del Sorghum vulgare de América 1903 (10).

Karakina y Corinocarpina 1903 (11), aún poco estudiados.

Gynocardyns 1904 (12).

Isoamigdalina 1904 (13).

Sambunigrina 1905 (14).

(2) Bourquelot et Herissey. — Journ Ph. et Ch. 1894 (5) XX, página 433.

(3) Bourquelot E. — Sur l'emploi des enzymes comme reactif dans les recherches de laboratoire. J. de Ph. et Ch (6) XXV, página 378, año 1907.

(4) Robiquet et Boutron Charland. — An. Chim. Phys. p. 352 XLIV, 1830.

(5) Jorissen et Hairs. — Bull. Ac. Roy. Belg. (3) XXI, N° 5. 1891.

(6) Dunstan, Henry et Auld. — Proceed. Roy. Soc. LXXVIII, página 145 y 142. 1906.

Dunstan y Henry. — Ibid. LXXII, 285. 1903.

(7) E. Fischer. — Ber. d. d. Ch. G. XXVIII, p. 1508. 1895.

Herissey — Presence de l'amigdonitril glocoside dans le Cerasus Padus. Delarb, J. Ph. — et Ch. (6) XXVI, p. 198. 1907.

(8) Dunstan y Henry — Proceed. Roy. Soc. LXVII, p. 224. 1900.

(9) Ibid. LXVIII, p. 374. 1901.

(10) Ibid. LXX, 153. 1902.

(11) Slade. — J. Am. Ch. Soc. XXV, 55. 1903.

(12) Easterfield et Aston. — Proceed. Ch. Soc. XIX, p. 191. 1903.

(13) Power ed. Gornall. — Proceed. Ch. Soc. XX, p. 137. 1904.

(14) Power ed Lees. — Ibid. XXI, p. 88. 1905.

Prulaurasina 1905 (15).

Vicianina 1906 (16).

Dejando de lado la descripción de cada uno de ellos y dejando para el capítulo siguiente el estudio de la significación fisiológica del ácido cianhídrico en las plantas, podemos decir por ahora, de una manera general, que el mecanismo de la producción del HCN resulta del desdoblamiento por hidrólisis de principios inmediatos de naturaleza glucosídica bajo la influencia de un fermento soluble. Esta acción es modificada por varias causas, que en ciertas ocasiones exaltan las cualidades tóxicas, como se ha comprobado al revelar de una manera más rápida, el ácido cianhídrico por la acción de los anestésicos (17) o por el excesivo enfriamiento como ha sido también demostrado en un estudio sobre el *Sorghum vulgare* (18), observándose muy interesantes fenómenos.

Debe tenerse en cuenta sobre todo que por la anestesia se consigue un resultado notable en la práctica comercial, debido a las floraciones forzadas que se provocan, hecho explicable, por el aumento de la permeabilidad de los tejidos, con una consecuencia de la más rápida absorción del agua. La relación de la anestesia, con la actividad de los fenómenos enzimáticos, es el objeto de uno de los más interesantes trabajos de los hermanos Armstrong. En último análisis se puede decir con estos autores, que se produce una modificación de la presión osmótica de los tejidos originando una disociación química en el sentido de la reacción $(H_2O) x \longrightarrow x H_2O$ quedando roto el equilibrio de tal modo que al incorporarse una nueva cantidad de agua lo restablece mecánicamente.

Otro hecho de orden general, es el que me manifestó el profesor Dominguez, que se refiere a la existencia de las saponinas en los vegetales, observando que su ausencia pareciera

(15) Dakin—J. Ch. Soc. Trans. LXXXV. p. 1512. 1904.

Bourquelot et Danjou—C. R. Acad. CXXI. p. 59. 1905.

Heryssey. - J. de Ph. et de Ch (6) XXIII. p. 5. 1986.

(16) G. Bertrand.—C. R. Acad. CXLIII, p. 839. 1906.

(17) Mirande M.—Influence exercée par certaines vapeurs sur la cyanogenese vegetale. Procède rapide pour la recherche des plantes à acide cyanhydrique — C. R. Acad. 1909—CXLIX, p. 140.

(18) Willaman J. J. — The J. of. Biol. Ch. p. 137. XXIX N° 1, 1917. The effect of anesthetics and of frosting on the cyanogenetic compounds of *Sorghum vulgare*.

coincidir con la comprobación de glucósidos cianogénéticos en aquellas plantas que las llevan, lo que vendría a explicar la forma de intermediario en que actúan estos principios dentro de los vegetales. Sería interesante una vez conocidos estos compuestos efectuar un estudio de conjunto, tendiente a esclarecer bien la cuestión.

La observación del profesor Dominguez está fundada en las investigaciones químicas de más de 500 vegetales.

En otro sentido es conocida la variación de la cianogénesis con las condiciones climatéricas, influyendo grandemente sobre el contenido en ácido cianhídrico, y hasta se podría deducir por su existencia el grado de desarrollo de la planta.

El caso típico de estas variaciones lo presentan algunas especies del género *Stipa* (19): *Stipa leptostachia* Griseb. y *St. Bomani* Hauman, conocidas por los indígenas con el nombre de «vizeacheras»; en estas especies se ha comprobado la influencia del suelo encontrándose por tal causa también ejemplares que carecían en absoluto de ácido cianhídrico (20).

Guiados por los numerosos envenenamientos de ganados Alsborgs y Black (21), hicieron una investigación de conjunto en Norte América encontrando ácido cianhídrico en 6 especies de 32 plantas forrageras analizadas.

A propósito es interesante hacer notar el caso del *Sorghum vulgare* introducido como planta forragera en aquel país por Turkey en 1830: traía esta planta abundantes recomendaciones por sus cualidades alimenticias y fué muy difundida en los campos con buen resultado al administrarse en mezclas conocidas.

(19) Boman E. — Deux *Stipa* de l'Amérique du Sud developpent de l'acide cyanhydrique. Bull. du Museum d'histoire naturelle, 1905, N° 5, p. 337.

Hebert A. — Recherches sur la presence de l'acide cyanhydrique chez diverses plantes. Bull. Soc. Ch. XXXV. p. 919. 1906.

(20) Spegazzini C. — *Stipae platenses*. An. del Museo Nacional de Montevideo. T. 4, p. 115. 1901.

(21) Loc. Cit.

Pero empezaron a sobrevenir los primeros accidentes y efectuada una observación cuidadosa, Spillman (22), llamó la atención recomendando su exterminación. Antes de introducirse era ya conocida la acción tóxica de esa gramínea. en la India, y Pease lo atribuyó entonces al nitrato de potasio encontrado en un 25 % del vegetal. Crawford A. C. (23), efectuó un estudio sobre su principio activo, la dhurrina, dando ciertas recomendaciones a los ganaderos. Lo cierto es que la variación de la toxicidad del sorgo es debida a los bruscos cambios de temperatura, siendo en ciertos casos beneficioso administrarlo en mezcla con otras plantas como alimentos para los animales.

Esto también ha sido observado en nuestro país, obligando en ciertas provincias la adopción de reglamentaciones preventivas.

(22) Spillman W. J. — Extermination of Johnson Grass.
Bull. — Dept. of Agric. U. S. N. N° 72. 1905.

(23) Crawford A. C. — The poisonous action of Johnson Grass.
Ibid. N° 90. 1906.

Papel fisiológico, bioquímico y fisicoquímico del glucósido

Lo esencial cuando se estudian los casos de cianogénesis es: 1º) determinar la naturaleza del cianogenético; 2º) su valoración; 3º) su situación en el vegetal, y 4º) su reacción por el tratamiento mecánico y químico de la planta.

De todos estos aspectos que presenta la cuestión, los dos primeros son los que han recibido mayor atención y aún no se tienen todos los datos necesarios como para poder abarcar un estudio completo.

Hemos visto el número de glucósidos que han sido aislados e identificados hasta la fecha, número bastante reducido, dándose muchos casos en que los investigadores se han concretado tan solo a la determinación del ácido cianhídrico del vegetal y no del glucósido que es lo que más interesa para un estudio amplio, reduciendo con esos trabajos otros de mayor alcance.

Interesa además el conocimiento del enlace del glucósido por las consideraciones que se hacen sobre su hidrólisis para referirlo luego al estudio del vegetal (1). Son los fenómenos de autólisis los que más han llamado la atención y el procedimiento usado con más frecuencia para las preparaciones farmacológicas desde que lo descubriera Böhm en 1803 con el agua de laurel cerezo.

El fenómeno de autólisis depende directamente de la existencia del glucósido y de la glucosidasa en el mismo tejido; con-

(1) H. Euler. — Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie, página 132, 2ª parte. 1919.

comitancia que es el factor principal de todas las síntesis proteicas de los vegetales.

Por otra parte debido a la analogía con la asimilación del carbono (2), Schimper ha emitido una teoría en la que sostiene la formación de albuminoides en el vegetal debido a un proceso fotoquímico.

Admite con tal motivo dicho autor que la única vía de incorporación del nitrógeno es en forma de sal inorgánica, por lo común nitratos, cuyo catión al unirse con el ácido oxálico forma el oxalato de cal y prepara la reducción del nitrato mediante los hidratos de carbono. La reducción se verificaría por etapas sucesivas, en las que la energía necesaria, expresada en calorías sería facilitada por la conocida acción sintética de la clorófila. La acción foto-sintética es rebatida por Zaleski y Suzuki quienes hacen experiencias concluyentes al respecto y tratan de desvirtuar la reacción que durante largo tiempo se admitió como debida a la luz.

La reacción reductora estaría expresada según el esquema:



que tampoco se había comprobado con demostraciones concluyentes y rigurosas.

La influencia nula de la luz es demostrada por varios autores entre los cuales Godlewsky hace experiencias que publica en el Bull. Acad. Sc. de Cracovia, 1903, y por las que demuestra que los contenidos de nitrato varían muy poco cultivando plantas a la luz y a la oscuridad:

Nitrógeno determinado en Sol. de nitrato	En forma de nitrógeno libre	
43,12 %	21,68	a la luz
44,12 »	23,64	a la obscuridad

El hecho comprobado por Schimper de que el contenido en nitrato en las hojas es constante mientras el hidrato de carbono disminuye, demostraría la formación de albuminoides admitiendo la probabilidad de una formación intermedia de nitrito.

Otra hipótesis debida a Bach-Laurent y Marchel sostiene una

(2) Gautier Armand. Cours de Chimie. T. III. Ch. Biol. 1892.

reducción posterior en el sentido de la formación de la hidroxilamina (NH_2OH) para originar la formamida en la acción clorofílica (H.CONH_2) hecho que estaría de acuerdo con la formación de asparagina (2).

La teoría cianhídrica es descripta ya por Gautier en su «Cours de Chimie Biologique», trae como argumentación una serie de reacciones más o menos fundadas, por las que sostiene, la acción del ácido fórmico sobre el ácido cianhídrico para originar albúminas; también la acción directa del ácido cianhídrico y el agua para dar compuestos de la urea, etc.

En la actualidad esas reacciones no se admiten como para explicar la función asimilativa del ázoe.

En su estudio sobre el *Pangium edule* Reinw (3), Treubb, hace una serie de observaciones tendientes a demostrar que la reducción de los nitratos llega a la formación de un grupo cianhídrico incorporado al hidrato de carbono para luego dar la amida correspondiente. Esta explicación de los hechos provoca como es natural un cambio completo en las ideas y desde entonces el interés es cada vez mayor para dilucidar el problema.

Admitía Treubb desde luego, la no influencia directa de la luz en esas reacciones de albuminoides, lo que no obstaba en cambio para admitir que existía una cierta relación entre la producción del grupo cianhídrico y la asimilación del carbono. Este hecho muy significativo, trae consigo como condición indispensable para la formación del compuesto cianhídrico en el *Pangium*, la presencia del hidrato de carbono.

Desde el punto de vista químico, la hipótesis no tiene objeciones desde que el ácido nítrico en presencia de un hidrato de carbono reductor da lugar a la formación del ácido cianhídrico, existiendo para corroborar esta afirmación el trabajo de Luis Henry sobre la oxidación espontánea del ácido nitroláctico que origina un compuesto de naturaleza cianhídrica. La composición muy simple del ácido cianhídrico y la facilidad con la cual da compuestos complejos, parecen colocarlo

(3) Treubb M. Sur la localisation, le transporte et le role de l'acide cyanhydrique dans le *Pangium edule* Reinw. An. du Jar. Bot. de Buitenzorg XIII. pág. 1 a 81. en Recueil des travaux Ch. des Pays Bas. 1895.

en las condiciones necesarias como para considerarlo el punto de partida de una síntesis de las materias albuminoides (4) al formar, por ejemplo, una cianhidrina de la fructuosa, que fácilmente pasa a amida, para constituir luego la sustancia plástica de los tejidos vegetales.

Naturalmente llama la atención, el caso que presentan los hongos, por la capacidad que tienen para construir albúminas, como también amidas, sin la acción fotosintética: se debe tener en cuenta para considerar este caso, que el estudio se simplifica por la facilidad con que se puede modificar en diversos sentidos los materiales constructivos y las condiciones de la investigación. En los vegetales superiores, es necesario tomar como punto de partida la utilización de los nitrilos, para formar los compuestos albumínicos y considerar así, la combinación del nitrógeno en el grupo ciánico, como una etapa del metabolismo constructivo.

La explicación de Treubb, es en cierto modo fundada, puesto que para nada se explica la acumulación de reservas alimenticias a base de glucósidos, en las hojas de vegetales que las cambian anualmente.

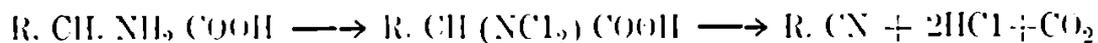
En lo referente a la localización de los tejidos que contienen el principio cianogenético, es dable admitir, que, debido a una diferenciación más elevada y a la consecuente división del trabajo, la asimilación esté circunscripta a tejidos determinados, que como en el caso de *Holocalyx Balansae* son el conducto de la savia ascendente.

En otro orden de ideas, el grupo ciánico, al entrar a formar parte de las moléculas del glucósido, constituye en conjunto, un compuesto, químicamente bien definido, pero para la planta, no es más que un producto intermediario; cosa demostrable por la facilidad que posee el ácido cianhídrico, para polimerizarse, y que se adapta en cada caso a las actividades celulares; explicaría así la existencia de numerosos cianoglucósidos cuya diferenciación consiste en la variedad de hidrato de carbono que contienen, como por ejemplo la maltosa en la amigdalina, glucosa en la linsmarina y otros, la ramosa en la taxicantina, etc.

(4) Ber. d. d. Ch. -- G. p. 3066 y pág. 221. XVIII y XIX.

No obstante, esta interpretación debemos admitirla con circunspección y prudencia, puesto que la formación del ácido cianhídrico ha sido también puesta de manifiesto como producto de retrogradación de la misma materia albuminoide, siendo posible con esto, admitir la formación de urea en los vegetales, como actividad del metabolismo destructivo, según parecen demostrarlo los trabajos de Fosse.

Los estudios de Dakin (5), establecen de una manera irrefutable, la formación de grupos nitrilos en una reacción que el autor desarrolla y que exponemos a continuación: La sodio p. toluensulfocloramida, reacciona con los aminoácidos dando los correspondientes aldeidos. La reacción sobre la histidina, da por resultado la oxidación de acuerdo con el desarrollo siguiente:



De esta manera la histidina, puede ser oxidada hasta llegar a la cianometil-glioxalina y después se reduce a aminoetil-glioxalina, sin dificultad.

Es interesante también hacer notar los trabajos de Plimmer (6), sobre la formación de ácido cianhídrico por oxidación de las albúminas, quien llega a comprobar las oximiidas derivados de Hantzsch (7), que contienen el grupo $=N.OH$, que al hervirse con agua dan el ácido cianhídrico.

Cualquiera sea la forma de interpretar la procedencia del ácido cianhídrico, se llega siempre a un acuerdo respecto a su importancia en el papel sintético, contribuyendo a sustentar este aserto, la mayor cantidad de plantas cuyos órganos contienen ácido cianhídrico y que se descubren continuamente.

Por nuestra parte hemos efectuado una determinación preliminar de HCN, en las hojas, con desdoblamiento debido a la acción de los propios fermentos de la planta, machacando al efecto hojas puestas a macerar durante 24 horas para luego efectuar arrastres con vapor de agua y recoger el ácido cianhídrico desprendido sobre solución de hidrato de potasio al 10 %.

(5) Dakin H. D. -- The oxidation of amino-acids to cyanides. Biochem. J. 1916 (10), pág. 319 a 323.

(6) Plimmer R. H. Aders. -- The formation of prussic acid by the oxidation of albumins. The J. of Physiology London, 1904, XXXI, pág. 65.

(7) L. A. CCXXII, pág. 65, 1884.

Para la titulación hemos contralorado diversos métodos entre los cuales se preconizan el de Liebig, Deniges, Buignet y Fordos y Gielis.

Está basado el primero, en la formación de argenti-cianuro de potasio, soluble hasta aparecer el precipitado del cianuro simple, que indica el final de la reacción, algunos usan como indicador el cromato de potasio; el que nos dió mejores resultados, es el de Deniges, que se funda en la absorción del ácido cianhídrico, por el amoniaco, titulación con nitrato de plata N/10, usando como indicador el yoduro de potasio; por el método de Buignet la titulación se verifica con solución empírica de sulfato de cobre, formándose en coprocianuro-amoniacoal, hasta la aparición de precipitado de óxido de cobre que indica el final de la reacción; el último método mencionado lo hemos utilizado en pocas ocasiones y constituye una sencilla titulación yodométrica con solución N/10.

Las primeras observaciones dieron los siguientes resultados:

I)	sobre folíolas secadas al aire....	grs. 0,1125	%
II)	» » frescas	> 0,1380	>
III)	secadas en estufa..	> 0,0651	>

Evidentemente durante el secado en estufa, debió desprenderse gran parte de ácido cianhídrico; fué entonces necesario efectuar observaciones meticolosas, para determinar el desprendimiento del ácido cianhídrico que se ponía en libertad, en los tres casos que habíamos planteado.

Como se ve, existe una disminueción de ácido cianhídrico de las folíolas secadas al aire con relación a las frescas y tratamos de establecer si esta diferencia era debido a la liberación de ácido cianhídrico o a su incorporación al vegetal.

Colocamos al efecto en un matraz grande y de cuello ancho 100 grs. de folíolas desmenuzadas que se taparon perfectamente. No se notó en los papeles reactivos ningún desprendimiento de ácido cianhídrico. Al mismo matraz se le colocó luego un cierre que daba entrada a dos tubos, uno proveniente de una serie de secadores con cloruro de calcio, ácido sulfúrico e hidrato de potasio que dan entrada al aire que circula, y el otro de salida para los gases que se conducen a una serie de tubos de absorción como los usados en análisis elemental, cargados todos con hidrato de potasio; antes de la batería de absorción se había

colocado un tubo vacío para recoger el vapor de agua proveniente de la humedad de las hojas, intercalándose además, varios pequeños tubos testigos con papeles sensibles. La circulación del aire, se provocó por una bomba de absorción, que determinaba un burbugeo pausado. Cada operación duró 3 a 4 días.

Como dijimos, la primera verificación fué hecha en blanco para revelar si las folíolas frescas desprendían ácido cianhídrico debido a la acción de la diastasa hidrolizante, espontáneamente y a la temperatura ordinaria; después de tres días de pasaje de aire, los tubos testigos no acusaron la menor presencia de ácido cianhídrico. Con igual resultado se efectuó experiencia análoga manteniendo el matraz en la obscuridad.

Prosiguiendo las observaciones se colocó el matraz en estufa, a temperatura constante y ya a los 37°C. los papeles reactivos acusaron desprendimientos; la temperatura se subió hasta 65 y se mantuvo durante 5 días pasándose luego a la titulación de los líquidos del burbugeo.

Se procedió de esta manera: 1° con folíolas frescas, 2° con folíolas secadas al aire, 3° con folíolas inactivadas en autoclave durante 5'.

Las observaciones fueron las siguientes:

	Cantidad en gramos.	Ácido cianhídrico absorbido en los tubos.		HCN residual en las hojas.	Total.	
I).	100	---	0,0051	0,0046	0,1220	0,1317
II).	50	0,0037	0,0075	0,0023	0,0957	0,1092
III).	50	0,0026	0,0018	0,0031	0,1100	0,1175

Por la inspección de los totales que anteceden se notará en seguida que la cantidad de ácido cianhídrico en la planta es mucho mayor al que se deduce calculándolo del glucósido aislado, lo que fácilmente se puede atribuir a la insuficiente extracción o a la existencia del grupo cianhídrico en combinación labil no glucosídica. Esto último es mas difícil de admitir.

En vista de estos resultados hemos decidido emprender una investigación detallada que será motivo de una próxima publicación.

(8) Willaman J. J.--The estimation of Hydrocyanic acid, and the probable form in which it occurs in Sorghum vulgare. — The J. of Biol. Ch. 1917, XXIX (1), pág. 25.

Plantas cianogenéticas descubiertas desde 1906.

La lista de plantas que va a continuación, está constituida por las que han sido descubiertas con posterioridad a la publicación de los primeros cuadros de Greshoff y no aparecen tampoco, en el cuadro más completo que trae el suplemento de la enciclopedia Guareschi del año 1906-1907.

Las determinaciones botánicas han sido hechas por el señor José F. Molfino.

Forman parte, en total, 60 especies nuevas, repartidas en 18 familias con 46 géneros.

Muchas de las plantas señaladas como cianogenéticas lo son únicamente en algunos de sus órganos vegetativos, frutos o semillas, mientras que en otras la cianogénesis es general.

Familia	Especie	Cita bibliográfica
Polypodiaceae . .	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kunth.	Mirande M. — C. R. Acad. CLXVII, pag. 695. 1918.
	<i>Cystopteris alpina</i> Desv.	Id. id.
Taxaceae	<i>Taxus baccata</i> L.	Lefèvre Ch. — J. Ph. C. XXVI, p. 241. 1907.
Scheuchzeriaceae	<i>Scheuchzeris palustris</i> L.	Greshoff — Year book of. ph.
	<i>Triglochin maritima</i> L.	Ph. Weekblad. — T. 45 p. 181. 1907.
	<i>Triglochin palustris</i> L.	—
Gramineae	<i>Agropyrum repens</i> (L.) Beauv.	Wehmer C. — 1911. Die Pflanzenstoffe. p. 60 (1).
	<i>Briza minor</i> L.	Couperot E. — J. Ph. et. Ch.
	<i>Briza scabra</i> (Nees) Eck.	Dominguez J. A. (1).
	<i>Catabrosa aquatica</i> Beauv.	

(1) El profesor Dominguez ha comprobado la ausencia de este carácter en los ejemplares ensayados.

Familia	Especie	Cita bibliográfica
Gramineae	<i>Cortaderia dioica</i> (Spreng). Speg.	Fitschy J. — Ph. Ch. (6). XXIV, p. 355. 1906.
	<i>Chloris distichophylla</i> Lag	Speg. Botto. 1910. Tesis.
	<i>Cynodon Dactylon</i> (L.) Pers.	Couperot E. — J. Ph. Ch. XXVIII, p. 542. 1908.
	<i>Festuca Poa</i> Kth.	Couperot E.
	<i>Glyceria canadensis</i> Trin.	—
	<i>Glyceria fluitans</i> (L.) R. Br.	Damann C.
	<i>Glyceria nervata</i> Trin.	Alsberg et Black. — J. Biol. Ch. Vol. XXI.
	<i>Holcus lanatus</i> L.	Couperot E.
	<i>Lamarekia aurea</i> Moench.	Id.
	<i>Melica andina</i> Hauman.	Dominguez J. A. (*)
	<i>Melica sarmentosa</i> Nees.	Id. id.
	<i>Panicum sanguinale</i> L.	Collier P. — Report of the Bot. and chem. ongrases and Forage Plants.
	<i>Poa pratensis</i> L.	Couperot E.
	<i>Stipa tortilis</i> DC.	Id.
	<i>Triodia flava</i> (L.) Hitch.	Alsberg et Black.
	<i>Uniola latifolia</i> Mich.	—
Commelinaceae .	<i>Tinantia fuga</i> Scheidw.	Mirande. C. R. Acad. 1912. p. 434.
Ranunculaceae. .	<i>Isopyrum thalictroides</i> L.	Id.
	<i>Thalicttrum augustifolium</i> L.	Id.
	<i>Thalicttrum foetidum</i> L.	Id.
Magnoliaceae. . .	<i>Liriodendron tulipifera</i> L.	Id.
Calyceanthaceae .	<i>Calycanthus floridus</i> L.	Id.
	<i>Calycanthus laevigatus</i> Willd.	Id.
	<i>Calycanthus occidentalis</i> Hook. et Arn.	Id.
	<i>Chimonanthus fragrans</i> Lindl.	Id.
Papaveraceae. . .	<i>Papaver nudicale</i> L.	Mirande. — C. R. Acad. 1913.
Fumariaceae. . . .	<i>Dicentra spectabilis</i> Lem.	Id.
Crassulaceae . . .	<i>Sedum anopetalum</i> DC.	Id. C. R. Biol. pag. 434.
	<i>Sedum nicaense</i> All	Id. id.
Rosaceae	<i>Prunus brigantiaea</i> Vill.	Id. id.
	<i>Prunus Padus</i> L.	Herissey. — J. Ph. Ch. XXVI. pag. 194.
	<i>Prunus Persica</i> Stokes.	—
Leguminoseae . .	<i>Holocalyx Balansae</i> Mich.	Dominguez (*)
	<i>Lotus ornithopodioides</i> L.	Mirande. C. R. Biol. pag. 434.
	<i>Trifolium repens</i> L.	Id. — C. R. Acad. 1912.
Halorrhagidaceae	<i>Halorrhagis alata</i> Jacq.	Id. — C. R. Biol. 1913, p. 434

Familia	Especie	Cita bibliográfica
Oenotheraceae ..	<i>Gaurea biennis</i> L.....	Mirande. — C. R. Biol. 1913. p. 434.
	<i>Jussieua suffruticosa</i> L.....	Dominguez (*)
	<i>Jussieua bonariensis</i> Mich.....	Id.
	<i>Jussieua longifolia</i> DC.....	Id.
Ericaceae	<i>Erica multiflora</i> L.....	Mirande. C. R. Biol. 1913, p. 434.
Campanulaceae..	<i>Campanula garganica</i> Ten....	Id. id.
Compositae.....	<i>Centaurea Crocodylium</i> L.....	Mirande. — C. R. Acad. 1912.
	<i>Florestina pedata</i> Cass.....	Id. — C. R. Biol. 1913.
	<i>Hymenoxys Tweedii</i> Hook .. .	Spegazzini. 1908.
	<i>Centaurea montana</i> L.....	Couperot E.
	<i>Centaurea solstitialis</i> L.....	Id.
	<i>Chrysanthemum caucasicum</i> Pers.....	Id.
	<i>Cirsium arvensis</i> Scop.....	Id.
	<i>Dimorphotheca pluvialis</i> Moench.	Id.
	<i>Saussurea candicans</i> C. B. Clarke.....	Id.

(*) Dominguez J. A., Molfino J. F. y Gallelli E. L. de. — Contribución al estudio de la composición química de las plantas argentinas. Primera contribución, series I-V. Trab. del Inst. de Bot. y Farm. n° 49; Buenos Aires. •

Acción Tóxica

El glucósido cianogenético que nos ocupa y en general todos los glucósidos de igual naturaleza son tóxicos debido al ácido cianhídrico que ponen en libertad por desdoblamiento, cuya dosis mortal para el hombre es bien conocida.

Como por los ensayos químicos se había podido establecer las fracciones que contenía el principio activo, los ensayos toxicológicos redujéronse entonces a la investigación con las infusiones acuosas en que la acción de la emulsina del vegetal había dado algún indicio de haber actuado extendiéndose también a algunas otras infusiones en que se había notado la presencia de cuerpo cianogenético.

Los casos anotados como positivos son todos aquellos en que se produjo el deceso instantáneamente o con algunos minutos de intervalo. Todas las soluciones fueron llevadas previamente con cloruro de sodio a la concentración del suero fisiológico.

El primer grupo de experiencias se efectuó con infusiones y el segundo en soluciones de glucósido desdoblado con distintos agentes.

Estas experiencias realizadas en el Instituto Bacteriológico las debo a la deferencia del doctor Bernardo A. Houssay.

Primer grupo. 21 — IV — 1919

INYECCIÓN EN PALOMAS POR VÍA INTRAMUSCULAR

Detalle	Se inyectan	Cant.	Marca	
1) — Hojas inactivadas, maceradas con agua.....	5 cc.	grs. 0,245	s. mar.	vive
1) Hojas inactivadas, machacadas con agua, líquido decolorado con negro animal.....	10 cc.	» 0,490	ala iz.	vive

Detalle	Se inyectan	Cant.	Marca		
2) — Líquido anterior tratado por método de los plomos y desdoblado	a)	5 cc. grs.	0,170	ala der.	vive
3) —	b)	5 cc. »	0,08	p. der.	vivo
4) — Líquido acuoso separado del extracto alcohólico	5 cc. »	0,320	c. diag. dor.	vive	
5) — Fraccionamiento del líquido anterior por el método de los plomos y tratamiento con emulsina	a)	5 cc. »	0,060	c. tij.	vive
6) —	b)	5 cc. »	0,045	dos alas	vive
7) — Maceración directa de hojas ..	5 cc. »	0,224	c. cortada	—	
* * * ..	10 cc. »	0,450	negra s. m.	‡	
8) — Método de los plomos al líquido anterior.....	a)	5 cc. »	0,114	p. izq.	vive
		10 cc. »	0,228	lomo	‡
	b)	5 cc. »	0,170	rab.	‡

La titulación del ácido cianhídrico de cada porción fué establecida una vez comprobados los casos señalados como positivos, efectuándose el arrastre por vapor de agua y determinación volumétrica; los resultados fueron los siguientes:

I).....	grs.	‰	0,012
II).....	»	»	0,0095
III).....	»	»	0,007

Segundo grupo de experiencias, 24—IV—1919

Experimentos en palomas. Con solución al 10 ‰ de glucósido en suero fisiológico por vía intravenosa.

1) — Testigo 5 cc. sin desdoblar, sin marca.....	250 grs.	vive
2) — 5 cc. más levadura 5 ‰ en estufa ½ h., c. tijera	290 »	vivo
3) — 5 cc. más levadura 10 ‰ en estufa 2 h., p. der.		
HCN. libre.....	0,004	
4) — 2 cc. más ácido tártrico 2 días, p. izq.....	0,007	

5) — 2 cc. más sol. HCl en estufa $\frac{1}{2}$ h., neutralizado, rabona HCN. libre.....	0,008	‡
6) — 15 cc. más sol. HCl. 48 h. en estufa neutralizado, alas.....	0,006	‡
7) — 1 cc. id. id. c. diagonal.....		revive
8) — 2 cc. más 0,10 emulsina 24 h., a. der.....	0,009	‡
9) — 1 cc. más 0,10 emulsina 24 h., a. izq.....	0,006	‡
10) — Testigo 0,10 de emulsina.....		vive

En cuanto a los casos de envenenamiento en el hombre por principios cianoglucósicos se citan el cortejo de caracteres que acarrea, por diversos autores. Toxicológicamente importante es el hecho que el envenenamiento por ácido cianhídrico en todos los casos mortales observados (1) han sido sin alteración de la sangre, encontrándose únicamente en el tractus intestinal y en la orina, donde se puede determinar cuantitativamente. La reacción de la orina es ácida hasta 14 días después del deceso, encontrándose en todos los casos albúmina y un sedimento que contiene pus y epitelio pavimentosa.

(1) Robertson A. und Wynne A. J.—Ein fall von massenvergiftung durch Blausaure nach geuuss von Kratokbohnen.—Zeit. f. anal. Ch. (Fresenius) p. 735-190.

Conclusiones

La substancia extraída del *Holocalyx Balansae* Mich. por el procedimiento que hemos utilizado, es un glucósido cianogénético amorfo cuya molécula contiene una agrupación acetónica.

El desdoblamiento por ácido y emulsina revelan su constitución y lo identifican con el cuerpo aislado y estudiado por Dunstan y Henry.

No se ha notado la presencia de otro glucósido ni de principios alcaloídicos.

La planta tiene un fermento desdoblante propio que es el que provoca la autólisis de la substancia glucosídica.

La localización del principio cianhídrico en el vegetal, según la técnica de Treubb, es necesario modificarla en la forma indicada.

En la interpretación de la manera de incorporarse la substancia nitrogenada en el vegetal, se debe considerar la substancia cianogénica como formando parte del metabolismo constructivo.

La toxicidad de los cianoglucósidos en todos los casos es debido al ácido cianhídrico que ponen en libertad, actuando únicamente cuando el desdoblamiento se ha manifestado.

JUAN PELISCH.

Buenos Aires, Junio 11 de 1919.

Buenos Aires, Junio 11 de 1919.

Pase a la comisión N° 22 para que se sirva estudiar la presente tesis.

AGUSTÍN MERCAU,
Decano.

Pedro J. Coni,
Secretario.

Buenos Aires, Junio 17 de 1919.

Los miembros de la comisión N° 22 que suscriben, han estudiado la tesis presentada por el ex-alumno Juan Pelisch y resuelven aceptarla.

Enrique Herrero Ducloux, Julio J. Gatti, Angel Sabattini, Tomás J. Rumi, Martiniano M. Leguizamón Pondal, Luciano P. J. Palet, Atilio Bado, Victor J. Bernaola, Jorge Magnín, Horacio Damianovich.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN.....	9
CAPÍTULO I.	
Descripción Botánica.....	13
Datos relativos a la especie en estudio.....	13
Género Holocalyx.....	14
Holocalyx Balansae Mich.....	14
Caracteres anatómicos e histológicos de la especie.....	16
Tallo.....	16
Hoja.....	18
Raíz.....	19
CAPÍTULO II.	
Estudio Fitoquímico.....	23
Ensayos preliminares.....	23
Análisis inmediato cualitativo y cuantitativo.....	27
Estudio microquímico.....	36
Aislamiento y estudio del principio cianogenético.....	38
Composición de las cenizas.....	45
CAPÍTULO III.	
Los principios cianogenéticos en los vegetales.....	47
Papel fisiológico, bioquímico y fisico-químico del glucósido.....	52
Cuadro de plantas cianogenéticas descubiertas desde 1906.....	59
Acción Tóxica.....	62
CONCLUSIONES.....	65