

Tesis de Posgrado

Determinación de glúcidos en la melaza de caña de azúcar y en el jugo de uva madura por cromatografía de partición sobre papel

Torlaschi, Roberto

1959

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:

Torlaschi, Roberto. (1959). Determinación de glúcidos en la melaza de caña de azúcar y en el jugo de uva madura por cromatografía de partición sobre papel. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0995_Torlaschi.pdf

Cita tipo Chicago:

Torlaschi, Roberto. "Determinación de glúcidos en la melaza de caña de azúcar y en el jugo de uva madura por cromatografía de partición sobre papel". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1959.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0995_Torlaschi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

(ORIENTACIÓN: ANÁLISIS MATEMÁTICO)

TESIS: 998

ROBERTO TORRES

1978

PADRINO DE TESIS:

Dr. ADOLFO LEANDRO MONTES

FOFBA.

T E S I S

DETERMINACION DE GLUCIDOS EN LA MELAZA DE CAÑA DE
AZUCAR. Y EN EL JUGO DE UVA MADURA
POR CROMATOGRAFIA DE PARTICION SOBRE PAPEL

Con el presente trabajo hemos pretendido utilizar los vastos alcances que suministra en el campo de la química analítica, la cromatografía de partición sobre papel, para determinar la composición en glúcidos de la melaza de caña nacional y del jugo de uva madura.

Para su mejor comprensión, hemos dividido nuestro trabajo en diferentes capítulos, que comprenden una introducción y generalidades, un detalle de cromatografía general, una descripción resumida sobre cromatografía de glúcidos, la descripción minuciosa de la parte experimental y por último el resumen y conclusiones. Asimismo se acompañan un conjunto de fotografías explicativas y de cuadros, los que puntualizan, los aspectos más notables del trabajo.

Desde este último punto de vista, hacemos constas que las muestras provenían de Estación Cruz Alta, estación Colombres, Provincia de Tucumán cosecha 1958 para melaza, y de Balmira, Provincia de Mendoza cosecha 1959, para la uva que correspondía al tipo "Moscatel". En todos los casos ya sea en la determinación cualitativa o cuantitativa partimos siempre del mismo peso de muestra 2 grs. Antes de proceder a la cromatografía propiamente dicha, debimos eliminar de las muestras en exámen, las sustancias interferentes, que correspondían a las proteínas y a las sales. El primer objetivo lo consigui-

Res. de tesis - 995

mos por medio de una defecación con sol. de acetato de plomo al 30 p.100 habiendo añadido previamente a la cantidad de muestra pesada algunos mililitros de agua destilada, y luego 0,5 ml de la solución de acetato de plomo, centrifugando y lavando dos veces con pequeñas porciones de agua destilada. Reunidos los líquidos de lavado, se procedió a eliminar las sales, por tratamiento con piridina anhidra (5 ml.), siguiendo la técnica de Malpress F. H. y Morrison A.B. Este método se basa en la solubilidad de los glúcidos en piridina y la manifiesta insolubilidad de las sales en ese mismo solvente cuando se ha tenido la precaución que se encuentre libre de agua. El residuo en la extracción piridílica lo hemos tomado con la cantidad conveniente de agua y sembrado con el auxilio de una pipeta capilar (calibrada cada 2 μ l. en el caso de la determinación cuantitativa) a lo largo de la línea de partida trazada sobre un papel Whatman N° 1 dimensionado en el sentido mayor de la hoja. Hemos utilizado la técnica descendente, empleando el desarrollo múltiple, a fin de que tuviese lugar la separación de los glúcidos contenidos. Como se sabe, este método consiste en someter al cromatograma a un primer desarrollo, luego de dejar secar se procede a un segundo desarrollo y así sucesivamente; en nuestro caso tres desarrollos eran suficientes, habiéndose determinado el valor R_f de cada glúcido, vale decir la relación que existe entre el corrimiento de cada uno de ellos respecto del que manifiesta la glucosa a igualdad de condiciones. Se empleó el solvente butanol, ácido acético, agua 4.1.5, que se dejaba decantar durante 20 minutos y empleaba la capa superior.

Pudimos identificar mediante el empleo de dis-

tintos reveladores (entre ellos sol. de Nitrato de plata, y urea, ác. clorhídrico, alcohol) 4 manchas para la melaza, que correspondían a sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa.

En el caso del jugo de uva obtuvimos también cuatro manchas correspondientes a sacarosa, glucosa y levulosa.

La cuarta mancha fué objeto de nuestra particular atención, pudimos comprobar que se trataba de un compuesto de naturaleza reductora, que parecía no presentar el grupo aldehído y sí poseer un grupo .CO.

Además por el valor R_g tan elevado que presenta parecería ser una pentosa.

A los fines de la determinación cuantitativa, practicamos una elución mecánica sobre los recortes de papel que contenían cada glúcido con 3 ml. de agua por agitación mecánica durante 3 horas, transvasando a un Erlenmeyer y lavando con agua hasta completar a 5 ml. Para determinar la posición de los glúcidos sobre el papel, objeto de la determinación cuantitativa, efectuamos en los extremos del mismo un desarrollo que serviría de testigo una vez revelado, lo que nos permitiría determinar la posición de los otros glúcidos sin revelar.

La valoración en sí, la conducimos empleando técnicas titrimétricas. Para los glúcidos reductores se empleó el método de Somogyi y para los no reductores (sacarosa) la técnica que emplea la oxidación con periodato. El primero de ellos se basa en la reducción del cobre bivalente del reactivo a monovalente, posterior oxidación con un exceso de iodo, y final valoración con una solución de hiposulfito de sodio.

El método con periodato, aprovecha el poder oxidante del metaperiodato de sodio en sol. 1/4 molar, que fracciona la molécula de la sacarosa, dando ácido fórmico, que se valora con solución de hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo como indicador.

Las soluciones testigos estaban constituidas por glúcidos puros (al 20% para sacarosa, glucosa y levulosa y al 2% para xilosa) las que también se hacían correr sobre el papel, a fin de que la recuperación de la muestra y testigo se operase en igualdad de condiciones, dado el poder reductor del propio papel.

El contenido porcentual de cada glúcido presente en las muestras, se detalla en el siguiente cuadro:

M E L A Z A		JUGO DE UVA	
	% en Peso		% en Peso
SACAROSA	38.25	SACAROSA	0.2
GLUCOSA	6.8	GLUCOSA	9.8
LEVULOSA	6.7	LEVULOSA	10.0
XILOSA	0.86		

Salvador L. Fuentes *[Signature]*

A
MIS PADRES

A
LAURA

DOS PALABRAS

MI deseo más ferviente es que estas palabras sean portadoras de la emoción y el agradecimiento que por propia decisión les he querido imprimir, que involucren a Dios y a mis padres que han permitido mi existencia, a todos los señores Profesores de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales que me han legado sus provechosos conocimientos y en modo particular a los Dres. Aldo Mitta, Donato Marsico, Ventura Morera y Pablo Verdier, la magnífica colaboración prestada durante el desarrollo del presente trabajo, al Dr. Pedro Cattaneo, excepcional bromatólogo argentino, por sus fervientes deseos, por la feliz realización de mis caros anhelos.

Quiero dedicar un párrafo aparte al Dr. Adolfo Leandro Montes, él ha sido para mí en todo momento un verdadero maestro y amigo que con sus profundos conocimientos y con sus palabras de aliento en los momentos más difíciles, ha contribuido a fortalecer mi espíritu, a todos ellos mi recuerdo impercedero y mi eterna gratitud.-

PROPOSITOS DEL PRESENTE TRABAJO

He querido utilizar los vastos alcances que suministra en el campo de la química analítica, la cromatografía de partición sobre papel, para determinar la composición en glúcidos de la melaza de caña nacional y del jugo de uva madura.

El propósito se encuentra ampliamente justificado, si se tiene en cuenta que los datos analíticos que se encuentran publicados en nuestra literatura son un tanto dispares y se remontan a muchos años atrás, nada mejor entonces que actualizarlos y comprobar cual es, exactamente, su composición.

En el caso del jugo de uva, resulta interesante determinar la presencia de cantidades ínfimas de sacarosa, puesto que las técnicas cromatográficas nos brindan armas muy exactas y de sencilla realización.

Tal ha sido mi deseo, he puesto en el trabajo todo el cariño y voluntad a mi alcance, por lo que lo elevo a la consideración de los Señores Profesores, rogando desde ya disculpen alguna pequeña falta, que se pudiera haber deslizado en el mismo, "Errare Humanum Est".-

INTRODUCCION Y GENERALIDADES

INTRODUCCION HISTORICA Y GENERALIDADES

Entre los numerosos métodos de análisis que se encuentran a disposición de los estudiosos es muy apreciado por su practicidad, su rapidez y por su elegante realización el de la cromatografía de partición.

Las primeras comunicaciones del empleo de la cromatografía, se atribuyen al biólogo Iswett, nacido en Asti (Italia) en 1872. En efecto hacia 1906 empleó para la separación de pigmentos vegetales, una columna rellena de carbonato de calcio, este tipo primitivo de cromatografía correspondía a la cromatografía de absorción.

Un notable mejoramiento en la resolución de mezclas diversas fué introducido con la cromatografía de partición, desarrollada por Martin y Singe, los que adoptaron esta definición por el hecho de que la separación viene determinada por los diferentes coeficientes de distribución entre la fase acuosa y no acuosa de cada uno de los componentes de la mezcla. Empleando gel de sílice, como soporte para la fase acuosa y como líquidos de desarrollo algunos solventes orgánicos no miscibles, pero saturables con agua, estos mismos investigadores lograron oportunamente separar algunos acetyl amino ácidos. No obstante este método no podía ser aplicado con igual éxito en la separación de amino ácidos libres como consecuencia de la fuerte absorción por parte del gel de sílice, por cuya razón Consden, Gordon y Martín en 1944, sustituyen la columna cromatográfica por tiras de papel de filtro, sobre la cual las sustancias a cromatografiar migraban gracias al transporte efectuado por el solvente que avanza por capilaridad.

De tal modo este nuevo método ofrecía un sinnúmero grande de ventajas, sobre todo porque podía ser aplicado a otros campos, abriendo nuevas vías a la indagación científica. Desde un punto de vista histórico, es interesante consignar, que esta nueva técnica, ha sido designada oportunamente con los nombres más diversos: "Papirografía, cografía, partografía, etc.", aunque la bibliografía actual la designa como: "Cromatografía" que es la forma como se la designa universalmente.

Por partición cromatográfica se entiende un método que permite separar de una mezcla, los diversos componentes, basándose en la diferencia de solubilidad de las diversas sustancias en un sistema a dos fases líquidas, una de las cuales es móvil y la otra fija y un soporte que en este caso particular, está constituido por la celulosa del papel. Ya he mencionado que la separación se produce en base al coeficiente de partición de cada sustancia entre el solvente que pasa a través del papel y el agua retenida por el mismo, lo que consecuentemente induce a deducir que cuanto más soluble sea una sustancia en agua, más lenta será su migración (por ej. ácido aspártico), en cambio cuanto más lipófila más rápida será (por ej. fenil alanina).

Una de las grandes ventajas de la cromatografía general, reside en las cantidades mínimas utilizadas en el análisis, del orden de gammas, de 10 a 20 gammas de cada sustancia disueltas en 0,1 cc. de solvente es suficiente.

Hace ya tres lustros que Consden, Gordon y Martin nos han dejado la magnífica técnica analítica realizable sobre pa-

pel, y en un balance general podemos decir que amplio y provechoso ha sido su aplicación, puesto que no se ha limitado su empleo a un determinado aspecto de la química o a un reducido número de sustancias, sino que bien vastos han sido sus alcances.

A título de ejemplo puedo citar su utilización en la determinación de la pureza de las más diversas sustancias orgánicas o minerales, en el control de procesos sintéticos, en la determinación de iones, en farmacología, en la alimentación etc.

De manera que hoy en día los químicos de todo el mundo tienen depositada en sus manos una técnica analítica de inestimable valor, por ello que no dudo que grandes sorpresas nos aguardan en los próximos años, saldrán a la luz muchos aspectos científicos hasta hoy desconocidos, a la par que se fortalecerán nuestros conocimientos y se dará un paso trascendental en la lucha cotidiana por el mejoramiento de la humanidad.

CROMATOGRAFIA GENERAL

CROMATOGRAFIA GENERAL

En la cromatografía en papel el esquema puede ser resumido en las siguientes etapas:

- 1) Deposición de la muestra a examinar sobre una tira o una hoja de papel de filtro.
- 2) Suspensión e introducción del cromatograma en la cámara de desarrollo, conteniendo uno o más solventes.
- 3) Desarrollo por períodos de tiempo distintos según la velocidad de migración del solvente que debe alcanzar la extremidad del papel.
- 4) Secado del cromatograma.
- 5) Revelado del cromatograma mediante un reactivo adecuado para establecer la posición de la mancha.
- 6) Determinación cuantitativa de cada componente.

En realidad Schönboin y Coppelarceder fueron los primeros en poner a punto un método de análisis basado en la absorción diferencial de la sustancia en exámen por parte de la celulosa.

Como he señalado oportunamente fué adoptado por Consden, Gordon y Martin (1) haciéndolo adaptable y permitiendo gracias a la diferencia en el coeficiente de partición entre la fase móvil (esto es el solvente) y la celulosa saturada de agua.

Martin y Singe (2) han estudiado una ecuación que permite el cálculo de la relación entre el coeficiente de partición y velocidad de movimiento de la banda:

$$R_f = \frac{A}{A_L + \alpha A_s}$$

Siendo:

A : Sección transversal del área del papel + agua + solvente.

A_L : Sección transversal de la fase solvente.

A_s : Sección transversal de la fase acuosa.

α : Coeficiente de partición.

$$R = \frac{\text{Concentración en fase solvente}}{\text{Concentración en fase acuosa.}}$$

Pero la determinación del valor R en el caso de la cromatografía sobre papel es difícil de establecer, por lo que se introdujo un nuevo símbolo R_f que se calcula del siguiente modo:

$$R_f = \frac{\text{Movimiento de la banda}}{\text{Movimiento del frente de avance del líquido}} = \frac{R A_L}{A} = \frac{A_L}{A_L + A_s \alpha} \quad \therefore \alpha = \frac{A_L}{R_f A_s} - \frac{A_L}{A_s} = \frac{A_L}{A_s} \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

Siendo $\frac{A_L}{A_s}$; Relación entre volumen del solvente y fase acuosa en el cromatograma.

VARIACIONES DEL VALOR R_f .

El valor R_f depende de una serie de factores:

- a) De la propia sustancia cromatografiada, en igualdad de condiciones una sustancia tiene un R_f característico.
- b) Del solvente empleado y de la concentración del mismo.
- c) Según el tipo de papel empleado.
- d) Según la técnica empleada.
- e) Según las condiciones siguientes:

- 1) pH
- 2) Temperatura
- 3) Duración de la cromatografía
- 4) Presencia de metales
- 5) Empleo de sustancias simples o de mezclas.

De todo esto se desprende la necesidad de hacer constar juntamente con el valor Rf obtenido, el solvente y tipo de papel empleado, el procedimiento seguido y la duración del experimento para tener la máxima reproducibilidad. Los factores a) y b) no requieren explicación, en cambio analizaré los demás puntos:

c) Tipo de papel

Desde el punto de vista estructural, un pedazo de papel no es otra cosa que un amasado heterogeneo de fibra celulósica que ha sufrido una orientación particular durante el proceso de fabricación.

Esta orientación de la fibra debe ser tenida en cuenta para el trabajo cromatográfico, para ello se coloca una gota de colorante sobre el papel, se obtiene manchas de forma elíptica con el eje mayor en dirección del pasaje bajo los cilindros.

La relación entre eje mayor y menor constituye un índice, ya que permite establecer la orientación de la fibra porque la práctica enseña, que los cromatogramas son mucho mejores cuando el desarrollo tiene lugar en sentido del eje menor.

Dentro del tipo del papel los utilizados son los siguientes:

W 1. (Whatman N° 1) Da excelentes resultados con distintos solventes. Es el generalmente utilizado en nuestro País, pues es el

tipo que más abunda en el comercio.

N 2. Se debe usar con solventes rápidos, se obtienen generalmente manchas chicas y bien delimitadas.

N 3. Tiene fibra compacta y espesa, se han obtenido resultados satisfactorios empleándola con solidina, fenol, butanol.

N 4. Es generalmente utilizado para sustancias fenólicas.

N 42. Ha dado separaciones satisfactorias, pero resulta muy compacta para permitir un flujo conveniente del solvente.

S.S. 507. (Schleicher y Schull N° 507), da excelentes resultados en la separación cuantitativa de ácidos aminados, ya que se encuentra libre de impurezas y es denso, permitiendo un flujo lento del solvente.

S.S. 595. Da óptimas separaciones con valores generalmente altos del Rf.

S.S. 589 y 597. Son menos usados.

Duriox III priva de cenizas, ha sido muy poco usado.

Eaton and Dickerman N° 613 y Arches 302.

También se han hecho estudios de las equivalencias de los distintos tipos de papel, la que detallo a continuación:

Whatman N° 1	Schleicher y Schull N° 595
" N° 2	" " " N° 597
" N° 3	" " " N° 598
" N° 4	" " " N° 604
" N° 42	" " " N° 589
" N° 542	" " " N° 507

El papel utilizado en la cromatografía no debe ser tocado con la mano, sino con pinzas especiales, puesto que los

dedos siempre comunican sudor, grasa, sales, que son factores negativos en la obtención de los cromatogramas.

Otro de los factores que influyen apreciablemente está constituido por la forma de la tira de papel, este aspecto fué estudiado por Miller y Cleg (3), utilizando las formas más variadas de tiras de papel, lo que les ha permitido comprobar la influencia que tal efecto provoca en el desplazamiento del solvente. De tal modo se pudo llegar a la siguiente conclusión:

La velocidad de flujo del líquido en la tira depende simultáneamente del factor accesibilidad y del factor capilaridad. El primero de ellos está vinculado a la dimensión de la parte sumergida. Por otra parte hay una relación que expresa un vínculo entre el movimiento del líquido y tiempo de desarrollo: El cuadrado de la distancia (medida de la ascensión o expansión radial) es directamente proporcional al tiempo de desarrollo.

Con una aproximación mayor podemos escribir:

$$h^2 = Dt - b$$

h : ascensión del líquido en mm.

t : tiempo en minutos

D : constante para un dado tipo de papel y un dado líquido, tiene las dimensiones de un coeficiente de difusión y viene determinado tomando en consideración, la tensión superficial, la viscosidad y la densidad del líquido.

b : constante que equivale a un término independiente.

La expresión es válida después de un cierto tiempo ya que al principio el aflujo de líquido es caótico y desordenado. De manera que experimentalmente es necesario determinar h y t

después de un cierto tiempo de introducir el papel en el líquido, es decir cuando el movimiento se ha vuelto uniforme y responde exactamente a la expresión. Por consiguiente h es independiente de la longitud de la tira, pero depende de su forma.

El aumento de la velocidad de difusión (G) se calcula en base a la siguiente ecuación:

$$G = \frac{1 + R^2}{2R}$$

R: Relación entre el ancho mayor y menor.

Para una disminución de velocidad, es decir para el paso de una zona estrecha a una más amplia, la nueva velocidad es un recíproco $1/G$.

Ya que la velocidad de migración es la suma de dos factores, el primero de los cuales se define como factor de permeabilidad y el segundo como factor de accesibilidad, en el caso que se pase de una porción más ancha a otra más angosta de la tira, el factor capilaridad vendrá expresado por $1/R$ y el factor accesibilidad por R ; la nueva velocidad será:

$$V_2 = (1/R + R)$$

La velocidad inicial será regulada por condiciones tales para las que ambos factores equivalen a la unidad.

d) Técnica empleada

El método original de Consden y Coll contempla el empleo de recipientes conteniendo el solvente en la parte superior de la cámara de desarrollo. De dichos recipientes cuelgan las tiras u hojas de papel de filtro.

Una solución más simple ha sido propuesta por Williams y Kirby (4). Estos autores disponen cilindros de papel de filtro (con las gotas de la sustancia a examinar en la parte inferior) en un recipiente conteniendo el solvente el que migra por capilaridad. Se hace evidente que en la técnica descendente el factor capilaridad y gravedad actúan en el mismo sentido, determinando un avance más rápido, en cambio en la técnica ascendente la fuerza de gravedad se opone al factor capilaridad, con el consiguiente retardo en la velocidad de avance del frente del solvente.

e) Condiciones de desarrollo.

1) ph. El efecto fué estudiado por Consden, Gordon y Martin, cuyos estudios han llevado a una serie de conclusiones muy interesantes: el ph tiene la propiedad de modificar el Rf de las distintas sustancias, a la vez que modifica la forma y dimensiones de las mismas.

2) Temperatura. Las alteraciones producidas en el valor Rf por este efecto, se deben a un cambio en la composición de las fases. Por ejemplo en el sistema fenol-agua a un aumento de temperatura corresponde un aumento de la miscibilidad y por consiguiente de la velocidad de movimiento de la banda, en el sistema colidina-agua, lo contrario.

3) Duración de la cromatografía. Depende de la longitud de la tira de papel, de sus densidad y de la velocidad de migración del solvente. Los solventes utilizados son generalmente muy volátiles, por cuya razón cuando la cámara de desarrollo no se encuentra perfectamente cerrada, se pueden tener variaciones notables en la variación de las fases, con las consecuencias imaginables (basta recordar que el análisis cromatográfico se basa en la di-

ferencia del coeficiente de partición entre la fase móvil y el agua).

4) Presencia de metales. Puede producir la presencia de manchas coloreadas que interfieran con las características de otras sustancias, por ello solvente y cromatograma deben estar aislados del contacto con partes metálicas.

5) Empleo de sustancias simples o mezclas. Para el mismo solvente, el valor R_f varía según que se desarrolle una sustancia simple o una mezcla. El fenómeno es debido, a la interferencia entre los diversos componentes, o al distinto grado de solubilidad de una determinada sustancia en presencia de otras.

CROMATOGRAFAS MONO Y BIDIMENSIONALES

Muy a menudo en trabajos de cromatografía sobre papel se hace uso de la cromatografía uni o monodimensional. En pocas palabras diré que por cromatograma monodimensional se entiende el desarrollo hecho en una sola dirección. Se recurre a este sistema simple y rápido, en el caso de trabajos de orientación o de mezclas de pocas sustancias con valores de R_f bien diferentes a efectos de permitir una separación neta de las mismas.

A menudo en el caso que se quiera analizar una mezcla que contiene un número elevado de sustancias cuyos R_f , se encuentran muy próximos, se hace uso del cromatograma bidimensional. En lugar de tiras, se usa una hoja de papel según la técnica de Conden y Joll (más adelante la voy a detallar), se trata de desarrollar el cromatograma en una dirección empleando el solvente más volátil (por el hecho que se evapora más rápido), las manchas de las distintas sustancias se dispondrán a lo largo de la hoja,

perpendicularmente al camino a recorrer por el solvente, luego del desarrollo se seca el cromatograma, se gira a 90° y se sumerge en el segundo solvente, del lado que lleva las manchas, sufriendo las mismas una ulterior separación según la velocidad de migración de cada sustancia; esto facilita la individualización. Asimismo cuando el Rf de los diversos componentes es muy próximo existen otras alternativas cual sería el de utilizar dos cromatogramas con solventes distintos, los que individualmente permiten separar algunas de las sustancias de la mezcla. También ha sido utilizada con este propósito la técnica descendente, se deja gotear el cromatograma durante un cierto tiempo, de 36 a 48 hs. expresando la migración de cada uno de los componentes en base a la de otra sustancia tomada como tipo de comparación. Es importante en esta última técnica, cortar el borde extremo del papel en forma de dientes de serrucho, con lo que se facilita el goteado.

TECNICAS OPERATORIAS

La técnica descendente fué propuesta por Conden y Coll (5). En la cromatografía unidimensional se emplean tiras de papel de 1,5 cm. de ancho por 20 a 26 cm. de largo. De 4 a 8 cm. de borde se traza una línea con lápiz no copiativo (línea de partida), sobre la misma se coloca la gota y se sumerge el papel en el recipiente, fijándolo con una varilla de vidrio. Las gotas no deberán ser de gran tamaño alrededor de 5 mm. de diámetro lo que equivale a utilizar de 2 a 4 ul., conteniendo de 5 a 15 gammas de sustancia. Luego de secar, se introduce el cromatograma en la cuba que previamente se encuentra saturada con el solvente y luego se tapa con una lámina de vidrio tenien-

de la precaución de que no haya filtración de aire entre tapa y caba, por lo que se vas ligan los bordes para tener así un cierre hermético. Luego de que el solvente ha recorrido un trecho suficiente (15 a 50 cm.) en un tiempo que puede ser de 16 a 24 hs. según el tipo de papel, temperatura y solvente, se saca la tira, marca el frente del solvente y seca a 100°C. De inmediato se procede al revelado teniendo la precaución de contornear las manchas con lápiz, ya que el color con el tiempo se debilita. Cuando se deseen hacer un número grande de cromatogramas se utilizan hojas anchas de papel, y sobre la misma línea de partida se efectúa la siembra, dejando entre las gotas una distancia de 1,5 cm. Para el análisis bidimensional se recomiendan hojas standard de 18 x 22,5 cm. La solución en análisis (6-12 ul. conteniendo de 200 a 400 gamas de sustancia) se coloca en un ángulo de 6 cm. del borde. Se desarrolla en una dirección, se deja secar, se gira a 90°, se desarrolla con el segundo solvente, se seca y revela.

La técnica ascendente fué propuesta por Williams y Kyrbay (6). Presenta la ventaja de dar resultados más reproducibles y de requerir aparatos muy simples, a la vez que permite simultáneamente un número grande de análisis.

La cámara de desarrollo es generalmente de vidrio o terracota, el recipiente se aísla perfectamente del medio exterior esmerillando los bordes y untándolos con vaselina. Estas cámaras llevan su abertura apoyadas sobre una mesa de mármol o azulejos, o sino pueden ser usadas con la abertura hacia arriba recubriéndolas con una lámina de vidrio. Las dimensiones del papel son generalmente 50 cm. por 25. A lo largo del borde a 4 cm. se traza la línea de partida y con un intervalo de 1,5 cm. a 2 cm. se

colocan las gotas, el papel se enrolla en forma de cilindro y los bordes se pegan con tira plástica, aunque también se recomienda con el mismo fin ganchos metálicos adecuados. El cilindro de papel se coloca en un cristalizador, conteniendo el solvente, se tapa y se deja desarrollar durante un tiempo variable de 12 a 24 hs. hasta que el solvente haya alcanzado la parte superior. Simultáneamente se pueden hacer varios cromatogramas colocando otros cilindros de menor diámetro de 15 y 12 cms. respectivamente.

El mismo equipo puede ser utilizado para la cromatografía bidimensional. En este caso la gota se coloca en un papel de 27 cm. de lado a 3 cm. de los bordes.

Después de secar la gota, se enrolla y desarrolla en una dirección, cuando el solvente está por alcanzar el otro extremo, se saca, abre el rollo, seca, se vuelve a enrollar en el sentido perpendicular al eje del cilindro anterior, se coloca en el segundo solvente y luego del nuevo desarrollo, se abre, seca y revela.

Cromatografía sobre discos de papel circulares.

Esta técnica fué propuesta por Rutter (7) en una hoja de papel circular de 11 cm. de diámetro, se efectúan dos cortes a una distancia de 2 mm. hasta el centro, la especie de cola así obtenida, se pliega en sentido perpendicular al papel, hasta que sea de un tamaño de 1,5 cm., luego se la sumerge en la solución a examinar, por capilaridad, la solución sube por la cola y se difunde circularmente. La hoja es luego sacada y la cola se introduce en el solvente. La velocidad de desarrollo puede regularse mediante variaciones en el ancho de la cola y en la distancia del disco de papel de la superficie del solvente. Soluciones co-

láminas desarrolladas según esta técnica han permitido obtener anillos coloreados muy netos. En el caso de cromatogramas incoloros, después del desarrollo, se corta un sector de prueba, que se coloca apretándolo entre hojas de papel de filtro impregnado de reactivos capaces de dar con los constituyentes del cromatograma productos coloreados.

Cromatografía sobre discos de papel semicirculares.

Esta técnica fué propuesta por Marshall y Mittler (8) ha sido adoptado con bastante éxito en la separación de ácidos aminados con valores de R_f muy próximos, lo que ha permitido su separación sin recurrir a la técnica bidimensional. El método exige la preparación de tiras de papel de forma especial. Se usan tiras de papel que tengan 40 cm. de largo por 10 cm. de ancho. En la parte inferior de la tira se corta un pequeño rectángulo de 4 cm. de ancho por 2 cm. de largo, el que se une a la tira principal mediante un puente de 2 mm. de ancho por 15 mm. de largo. La solución a examinar se deposita con una pipeta especial, en el centro del rectángulo pequeño. Después de secar, el papel se cuelga de un gancho especial, de modo tal que el rectángulo inferior quede 2 mm. en el solvente. Sobre otras hojas de papel se colocan gotas de aminoácidos conocidos. Como equipo se puede adoptar una campana de vidrio, en la que introducen pequeñas cápsulas, conteniendo algunas de ellas, algodón hidrófilo impregnado con solvente saturado de agua. Las bandas de papel de filtro, son retiradas luego del desarrollo, se colocan en estufa para secarlas, luego que se observa la existencia de arcos concéntricos de las sustancias contenidas en la mezcla en análisis.

APLICACION DE LA SUSTANCIA Y METODOS DE SECADO DEL PAPEL

En la cromatografía sobre papel, tiene extraordinaria importancia, las dimensiones de la gota de la mezcla en análisis, ya que cuanto más grande e irregular, tanto más pequeño será la mancha sobre el cromatograma. Para la deposición de las gotas se usan pequeñas pipetas o capilares afilados y calibrados, o sino, minúsculas cucharitas de platino. Durante el secado es importante que el papel no entre en contacto con las partes metálicas de la estufa, por lo que se ha insistido en el empleo de sostenes de vidrio más o menos complicados.

Para tal fin, es muy usado en nuestros laboratorios un secador de cabello, que tiene la ventaja de no entrar en contacto íntimo con el papel, a la vez que es de gran maniabilidad y permite producir corriente de aire frío o caliente a voluntad del operador.

SOLVENTES

Al respecto, es muy grande la nómina de mezclas solventes diseminadas en la literatura cromatográfica, en cada caso el analista deberá proceder a consultar la bibliografía y adoptar la mezcla más adecuada según el trabajo que pretenda realizar; no obstante y en líneas muy generales se puede decir que las mismas deberán cumplir dos requisitos:

- 1) No deberán ser miscibles con agua.
- 2) Deberán retener en solución una cierta cantidad de agua y salvo en casos muy excepcionales deberán ser neutros.

REVELADO DE LAS MANCHAS

Una vez secado el papel, la operación subsiguiente será el de poner en evidencia las distintas manchas de cada componente de la muestra problema. Salvo contadas excepciones en que las sustancias de por sí posean color, en la mayoría de los casos el analista se encuentra en presencia de sustancias incoloras, por lo que será imprescindible proceder al revelado. Los métodos de revelado se pueden clasificar en dos grandes grupos:

a) Métodos químicos. Basados en el color que se produce entre el reactivo y la sustancia en exámen. Claro está, que como la reacción se produce sobre el mismo papel, se debe evitar en lo posible el empleo de ácidos o bases fuertes o el empleo de temperaturas elevadas que terminan por atacarlo.

b) Métodos físicos. Basados en la fluorescencia de las manchas, en la absorción a los rayos ultravioletas. Estos métodos son muy prácticos, simples y rápidos y en muchos casos han permitido efectuar determinaciones de carácter cuantitativo.

ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO

Uno de los grandes factores que orientan al analista en el aspecto cualitativo, viene determinado por el valor R_f , del que he hablado oportunamente, que es un valor característico de cada sustancia, cuando se opera en condiciones standard, de allí cuán importante es que todas las operaciones se realicen en iguales condiciones para que los datos sean comparables. Una orientación apreciable se basa también en el color de la mancha, pero sucede a veces que este último no es específico, por lo

que se deberá recurrir al desarrollo en un mismo cromatograma de la mezcla problema y de las sustancias puras, para comparar el valor R_f , que es el que dará la certeza absoluta de estar en presencia de la sustancia sospechada.

Desde el punto de vista cuantitativo, una idea aproximada se tiene por el hecho de que en los cromatogramas unidimensionales, cuando las manchas sean bien delimitadas, el tamaño e intensidad de color, disminuyen con el aumento de la dilución.

Para un aspecto exacto se aconsejan diversas técnicas:

- a) Cuando las manchas son bien delimitadas, se puede medir la longitud máxima de la mancha en la dirección de desarrollo del cromatograma. Se ha probado que existe una relación lineal con el logaritmo del contenido de la sustancia.
- b) Determinación de la superficie de la mancha por planimetría, también se basa en la existencia de una relación lineal con el logaritmo de la cantidad de sustancia contenida.
- c) Empleo de métodos físicos por análisis directo o indirecto del cromatograma.
- d) Métodos químicos basados en cortar el papel alrededor de la mancha, y llevarla a solución para poder efectuar un análisis cuantitativo.

CROMATOGRAFIA DE SUSTANCIAS RADIOACTIVAS

Un gran paso en el estudio de los fenómenos biológicos, ha podido lograrse mediante el empleo de isótopos radioactivos, estos elementos marcados han permitido establecer la distribución de diversas sustancias en exámenes en diversos órganos y

durante el desarrollo de los procesos metabólicos. Experiencias en este sentido se tienen con los trabajos de Rochez, Justiz y Coli, que operando sobre amino ácidos obtenidos por hidrólisis triptica de la tiroglobulina marcada I 131, han observado que la 3 moniodotirosina es un factor de la tiroglobulina; el trabajo realizado por Kornberg y Princer los que observaron la síntesis enzimática del difosfato pirdin nucleótico y del pirofosfato inorgánico de la nicotinamida mononucleótico empleando pirofosfato radioactivo.

Del conjunto de observaciones efectuadas resulta que la cromatografía de las sustancias radioactivas no se separa de la normal, la única diferencia está en el hecho de que el análisis cuantitativo no se produce en base a la identidad de la coloración, pero sí en base a la radioactividad que se determina por los métodos corrientes, como contador Geiger Miller o una cámara de ionización.

ELECTROFÓRESIS SOBRE PAPEL

Los trabajos en el orden cronológico de este importantísimo método fueron realizados por Tiselius, Wiedemann y Antweiler, las técnicas en un principio un tanto rudimentarias, fueron mejoradas gracias a los trabajos de Wiedeland, Fisher y Durrum, Cramer, Tiselius, Turba, Emenkel, con lo que se ha conseguido un método práctico aplicables incluso a la clínica médica, para el fraccionamiento de las proteínas mediante electrofóresis sobre papel.

En general el método se basa en la distinta movilidad de los constituyentes protéicos en un campo eléctrico a un determinado pH.

En realidad fué Wieland que sustituyó el tubo en U de Tiselius. La técnica es sencilla y puede decir en líneas muy generales que consiste en sumergir la tira de modo tal que su extremo pesque en el recipiente conteniendo un buffer adecuado, y los electrodos de Pt.

Cuando el papel se ha humedecido , en el centro de la hoja se coloca la mancha a examinar, luego se aplica una diferencia de potencial, las partículas protéicas con carga negativa migran a través del ánodo a velocidad diferentes según la identidad de la propia carga, mientras que algunas otras migran hacia el cátodo, probablemente como consecuencia de la formación de un flujo eléctrico endosmótico en esa dirección. Las proteínas se fijan mediante termocoagulación y finalmente se colorean con reactivos o identifican con métodos físicos.

CROMATOGRAFIA

de

GLUCIDOS

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE GLUCIDOS

Comenzaré por detallar los distintos factores que deben ser tenidos en cuenta por el analista.

1° Eliminación de las sustancias que interfieren.

Teóricamente la muestra no deberá contener más que glúcidos. Las proteínas y los compuestos nitrogenados de pesos moleculares elevados se precipitan según los protocolos usuales de la defecación, claro que hay muchas técnicas, pero generalmente se prefieren aquellas que no introducen sales minerales luego de haber eliminado la forma precipitada. De tal modo se pueden utilizar el acetato básico de plomo cuyo exceso es eliminado por el SH_2 , SO_4Zn con HONa u asociaciones mercuriales unidas a la barita. Es necesario tener especial cuidado en no utilizar un medio muy alcalino porque los azúcares suelen epimerizarse en esas condiciones.

2) Empleo de los intercambiadores de iones.

Es un método bastante seguro, pero muy largo porque se hace necesario purificar las columnas intercambiadoras y además ciertas resinas retienen en parte a los glúcidos. Se utiliza muchas veces, Amberlite IR 400 que tiene el defecto de la gran tendencia a producir epimerización de osas. En nuestro País este método ha sido utilizado en distintos trabajos de la especialidad por el Dr. Pablo Verdier con bastante éxito, pero la operación resulta larga y de mucho cuidado.

a) Extracción selectiva

En líneas generales la solución conteniendo las sales

es evaporada a seco y luego tratada con un solvente que extrae los glúcidos sin alterar las sales. Se ha utilizado con éxito el metanol y la piridina convenientemente purificados y si las operaciones se conducen con cuidado no se corre el riesgo de epimerización de osas.

b) Las sales pueden ser separadas por diálisis, pero la técnica solo es útil en el caso que la muestra contenga polisacáridos coloidales siempre que una electrodiálisis de muy corta duración haya sido empleada para eliminar la mayor parte de los electrolitos desplazables en el campo, antes de que los glúcidos se hayan difundido a través de las membranas intermedias.

Cuando en la muestra los glúcidos a cromatografiar se encuentran bajo forma de pentosanos, hexosanos u otros polímeros, se hace imprescindible proceder a una hidrólisis que se conduce en medio sulfúrico después de desproteínizar, eliminando el exceso de acidez con aguado bario y filtrando.

3) Testigo paralelo.

A parte del valor R_f de cada glúcido en análisis, la mejor y la más exacta manera de comprobar cualitativamente con carácter indubitable a un determinado glúcido, es la de aplicar a la misma hoja de papel un testigo, tal que luego del R_g revelado debe tener el mismo R_f que el correspondiente al azúcar sospechado. Respecto al valor de R_f de los glúcidos diré que muy a menudo suele ser reemplazado por el valor R_g , el cual presenta una conveniencia extraordinaria por dos razones:

1° El R_f de un determinado glúcido no se encuentra sujeto a las variaciones de los factores físicos de los cuales depende el R_f , porque se trata de un valor relativo.

2° Muy a menudo en la cromatografía de azúcares debido al hecho de que los glúcidos presentan valores R_f muy próximos se suele utilizar la técnica descendente y dejar gotear el cromatograma durante un cierto tiempo de 36 a 48 hs., lo que hace imposible determinar el R_f .

Browne, Hirst y Coll (9) introdujeron el valor R_g , que se define por la relación del corrimiento del azúcar en exámen e igual valor de la 2.3.4.6 tetrametil glucosa que hace las veces de azúcar de referencia. No obstante como este glúcido es bastante difícil de obtener, se suele referir al valor del R_g a la glucosa tomada como tipo. Es imprescindible para tomar en consideración el valor R_g que el testigo y muestra sean sometidas durante el tratamiento en igualdad de condiciones.

4) Elección de la mezcla solvente.

Son numerosas las mezclas que se pueden preparar a los fines de la separación de glúcidos. En estos casos la técnica unidimensional será suficiente a pesar del valor R_f próximo de los glúcidos puesto que el analista dispone de recursos sin recurrir a la técnica bidimensional que de tal modo solo queda circunscripta principalmente a la separación de aminoácidos. Claro está que ninguna mezcla solvente por sí sola es capaz de resolver todos los problemas, de manera que su elección estará condicionada al número y variedad de los cuerpos asociados que se deban separar, tomando como base en la elección el respecti-

vo valor R_f . En una revista reciente L. Houghs (10) tiene agrupados en un cuadro las principales mezclas solventes. En general las mezclas solventes se dividen en dos grandes grupos:

1° Bifásicos: que fueron empleados por primera vez por Partdridge, así por ejemplo fueron utilizados, fenol o colidina saturados de agua, n-butanol, ac. acético. La faz acuosa inferior se encarga de saturar la atmósfera del recinto, mientras la faz orgánica saturada de agua sirve para desarrollar el cromatograma. El empleo de los solventes bifásicos requiere extraordinario cuidado a saber:

a) La composición de dos fases es función de la temperatura, de ahí la necesidad de preparar la mezcla y efectuar el desarrollo a temperatura invariable.

b) Su empleo está limitado por el factor tiempo, cuando los componentes por este simple hecho puedan reaccionar entre sí, Ej. alcohol que sufre esterificación por la acción de un ácido, etc.

2° Monofásicos. Los solventes monofásicos tienen en general tres constituyentes:

a) el agua

b) un solvente orgánico miscible con el agua, etanol, isopropanol, acetona, piridina, ac. acético, formol, fenol, etc.

c) un solvente orgánico no miscible con el agua, más que en grado ínfimo n-butanol, isopentanol, acetato de etilo, alcohol bencílico, venceno, tolueno, éter de petróleo, etc. Para un volumen fijo de c), la proporción de a) en la mezcla aumenta con el volumen de b), verdadero agente de ligadura.

Se asocian a veces dos solventes del grupo b) a uno del grupo c), pero muy a menudo se prefiere asociar dos o va-

rios del c) a uno del grupo b). En este último caso el solvente b) tiene por papel principal regir la proporción del agua en la mezcla. En estas mezclas monofásicas la influencia de las variaciones de temperatura en el curso del desarrollo provoca menores perturbaciones que con las mezclas bifásicas. Procederé a continuación a referir algunas reglas que rigen la elección del solvente.

1° Deben asegurarse R_f vecinos de 0,20 para el principal constituyente a detectar, es decir que la mancha de este cuerpo debe colocarse a 20% del trayecto efectuado por el límite frontal del solvente sobre el papel. La práctica enseña que el valor R_f 0,20 permite las mejores separaciones. Por otra parte dos cuerpos no podrán ser separados cuando para el solvente elegido sus R_f no difieran en más del 3%.

La proporción de agua en la mezcla solvente es uno de los principales factores que regulan la velocidad de migración del glúcido, la que se acrecienta con la proporción de agua, tomando valores diferentes para los distintos glúcidos.

Otro de los factores que regulan la elección del solvente la constituye la proporción respectiva de los cuerpos a diferenciar. Es frecuente en bromatología, tener que caracterizar una débil proporción de un azúcar en presencia de dosis elevadas de otros azúcares, por ejemplo 0,5% de rafinosa en presencia de grandes cantidades de sacarosa en el azúcar de remolacha, algunos holósidos en el néctar de las flores en presencia de hexosas en las mieles etc. De tal modo las manchas de los azúcares que se encuentran en mayor proporción pueden recubrir las o hacerlas indistintas a la de los azúcares buscados.

Asimismo fuertes proporciones de azúcar modifican la velocidad de migración de los demás azúcares asociados. La literatura cita numerosos ejemplos para resolver estos problemas. He aquí un caso a título de ejemplo:

Se tenía una mezcla de manitriosa frente a pequeñas cantidades de estaquiosa, de galactosa y de melibiosa.

Para la separación, se ensayó entre otras, la mezcla acetato de etilo 30 vol, ácido acético 10 vol., agua 30 vol.; de tal modo si bien con este solvente estaquiosa y manitriosa no pueden ser separadas por cuanto sus R_f son idénticos, se consiguió separar a estos azúcares de la galactosa y melibiosa. Pero a pesar de esto como la manitriosa se encontraba en proporción mucho mayor, 200 veces la de la melibiosa y 400 la de la galactosa, se producía una disminución de los valores R_f de ambos azúcares, de tal modo que sus valores no coincidían con respecto a la de testigos constituidos por simples soluciones de melibiosa y galactosa. La mezcla estaquiosa, manitriosa pudo ser finalmente separada por el solvente: n-butanol 40 vol., etanol a 96° 10 vol., agua 43 vol., NH_3 al 10% 2 vol. La capa superior se utilizaba como fase móvil y el desarrollo se efectuaba en 4 días.

Por otra parte, la identificación definitiva de la melibiosa y galactosa asociadas a la manitriosa no puede ser realizada con claridad sin recurrir al solvente monofásico butanol, piridina, agua utilizando la técnica de desarrollo múltiple.

Se ha hecho una serie de consideraciones teóricas paralelamente verificadas por experiencias prácticas, lo que ha permitido a los autores (11) introducir en la separación de

glúcidos la técnica del desarrollo múltiple, que consiste en una serie de desarrollos sucesivos a fin de poder separar con un solo solvente distintos azúcares con valores de R_f muy próximos. La técnica consiste en lo siguiente: después del primer desarrollo, el papel se seca y luego se trata por el mismo solvente efectuando un segundo desarrollo y así sucesivamente, la práctica enseña que muchas veces se han precisado hasta cuatro desarrollos para que en ciertos casos complejos la separación tuviera lugar.

De tal modo se han obtenido separación de mezclas de azúcares imposibles de separar mediante otras técnicas, porque la técnica de los desarrollos sucesivos permite aumentar la separación de las manchas cuanto mayor sea el número de desarrollos.

Esta técnica es muy recomendable cuando el glúcido en mayor proporción tienda a dar manchas ovaladas de las cuales el gran eje se halla en sentido de migración del solvente, lo que hace que en parte o totalmente se encubran las manchas de los otros azúcares presentes en menor proporción. La interpretación práctica de esta técnica se basa en que al luego de un primer desarrollo, un segundo desarrollo hace que el solvente alcance ante todo parte de la mancha más próxima a su línea de partida, comenzando por hacer migrar esa parte de la mancha antes de impregnarla.

Después de desplazar la parte central un segundo desarrollo conduce a unas manchas menos ovaladas y más circulares y los cuerpos de R_f vecinos comienzan a separarse. Existen múlti-

tiples casos en que un solo desarrollo será suficiente para diferenciar las mezclas con fuerte preponderancia de uno de los constituyentes, esto solo es posible cuando los azúcares presentes tengan valores R_f bien distintos de aquel del constituyente principal, por ejemplo se ha podido separar 0,5% de sacarosa asociada a 99,5% de gencianosa, utilizando como fase móvil la capa superior del sistema: acetato de etilo 30 vol. ac. acético 10 vol.

INFLUENCIA DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS GLUCIDOS SOBRE SU VELOCIDAD DE MIGRACION

1º OSAS: En general para los solventes de carácter no fenólicos, se ha comprobado que la influencia estructural sobre la velocidad de migración viene determinada por la posición espacial de los hidroxilos sobre el núcleo piránico o furánico, aunque en pequeño grado también el número de estos hidroxilos ejerce su acción.

2) HOLOSIDOS:

a) La velocidad de migración también se ve influenciada por el número y en especial por la disposición espacial de los hidroxilos, análogamente como en el caso de las osas.

b) Los holósidos reductores con uniones 1-4 se desplazan más rápidamente que los no reductores de unión 1-6.

c) El núcleo furánico confiere mayor movilidad que el núcleo piránico.

d) El Peso Molecular tiene una extraordinaria influencia, para una serie de holósidos homólogos, el R_f disminuye regularmente

con el número de moléculas de osas asociadas.

Existe una relación matemática entre el Peso Molecular y el valor R_f . Los investigadores (12) han demostrado que si se lleva en abscisas en número de unidades de hexosas y en ordenadas el log. de la expresión $\alpha = \frac{R_f}{1 - R_f}$, los puntos figurativos correspondientes a los diversos holósidos se disponen a lo largo de una recta, partiendo del alto del eje de las ordenadas, para cortar sobre la recta a aquellas de las abscisas.

A cada serie de holósidos corresponde una recta de pendiente característica. La cromatografía sobre papel no solo permite determinar el número de moléculas asociadas, sino también la forma de encadenamiento de las mismas. Si por ejemplo se está en presencia de una serie de aldohexosas unidas por puentes 1-6, será suficiente que 2 de estas hexosas estén asociadas por un puente 1-4 para modificar el R_f de los holósidos respectivos.

3) HETEROSIDOS.

Se ha comprobado que la función oxidica y aglicona influyen sobre el valor R_f . Se han hecho estudios particulares sobre la influencia de la aglicona llegándose a la conclusión que en los heterósidos flavónicos el R_f resulta ser inversamente proporcional al número de oxidrilos fenólicos de la aglicona.

REVELADORES Y TÉCNICAS DE REVELADO DE LAS MANCHAS

En la cromatografía de azúcares se emplean tres principales grupos de reveladores:

- 1º - Los que utilizan las propiedades reductoras pseudoaldehídicas o pseudocetónicas.
 - 2º - Aquellos que oxidan las ligaduras alfa glicol y alcohol aldehído o alcohol cetona.
 - 3º - Aquellos basados en las propiedades específicas de osas aprovechando su comportamiento de dar derivados furfúricos, combinándose con aminas o fenoles para dar materias colorantes.
- 1º - Reactivos de agrupaciones pseudoaldehídicas o pseudocetónicas.

El revelador más antiguo dentro de este tipo es el nitrato de plata en medio alcalino, fué introducido por Partridge, se obtenían manchas marrones oscuras o negras según la cantidad de plata precipitada que dependía de la cantidad de osa presente.

Durante varios años fué objeto de sucesivas mejoras la técnica de Partridge. Este revelador ha sido objeto de críticas porque se le atribuye falta de especificidad, sobre todo cuando las condiciones operatorias son rigurosas y además porque los azúcares no reductores y los poliholes terminan por provocar reacciones debilmente positivas; por otra parte algunos papeles terminan por dar fondos ligeramente coloreados que dificultan la observación de las manchas.

Con bastante éxito se utilizan para estos azúcares revelarlos con cloruro de tetrafenil tetrazolio en solución

clorofórmica la que se pulveriza sobre el papel, después de tratamiento con soda con calentamiento durante 5 minutos a 100°C, dando manchas de formazano rojo vivo.

Se suele utilizar las sales de anilina (13) por ejemplo ftalato de anilina. Se producen manchas rosadas oscuras con fluorescencia roja cuando el azúcar es una aldopentosa. Los otros azúcares dan manchas marrón oliva con fluorescencia amarilla. El revelador es muy sensible se trabaja calentando a 105°C durante 10 minutos.

Muy recomendado resulta el empleo de otras sales de anilina, acetato, oxalato, clorhidrato, fosfato en soluciones al 5%, 0,5 y 0,1% (14) ya sea disueltas en agua, en ácido acético glacial o en n-butanol, en solución acuosa la máxima coloración se obtiene a los 10 minutos de calentar a 105°C, en cambio el revelado en solución acética o butílica, solo precisa 3 minutos a esa misma temperatura.

Las aldopentosas dan color rojo brillante, las aldohexosas y los ácidos urónicos una gama de colores de verde al marrón. En cambio las octosas son poco sensibles al reactivo.

De uso no tan frecuente citaré los siguientes reveladores:

- 1) Clorhidrato de p-anisidina en n-butanol. Solución al 3% (14)
- 2) difenil amina en n-butanol-metanol (1:1 v/v). Solución al 2% conteniendo ácido tricloroacético (14).
- 3) el ácido 3-4 dinitrobenzoico y el carbonato de sodio dan por calentamiento manchas azules de la sal sódica de la carboxi-2 nitro fenil hidroxamina, siendo la reacción más rápida con

cetosas que con las aldosas (15). La sensibilidad de este revelador es casi igual al del nitrato de plata alcalino, siendo superior al cloruro de trifenil tetrazoglio. Dentro de estos reveladores me referiré a los que se basan en la formación de derivados furfurílicos.

Con estos reactivos el tratamiento es el siguiente: la osas es calentada en presencia de un ácido fuerte, y se condensa con un fenol o con una amina para dar colorantes de los tonos más variados.

La dificultad principal consiste en elegir el ácido y establecer la concentración óptima, a fin de producir una condensación adecuada sin dañar el papel. Se deben desecar el ácido sulfúrico y nítrico, el primero porque carboniza el papel y el segundo porque provee de derivados coloreados con los fenoles o aminas del reactivo. También el clorhídrico concentrado ataca el papel, por lo que hay tendencia a utilizar el ácido fosfórico, el ácido ftálico, etc.

Resulta conveniente que el reactivo se encuentre disuelto en un solvente orgánico volátil, puesto que si la solución fuese acuosa hay tendencia a un relajamiento de la mancha del cuerpo a caracterizar. Se suelen utilizar el etanol, a diversas concentraciones, el n-propanol, el n-butanol. Dentro de los reactivos empleados, se utiliza la anilina que produce tonos de los más variados con las osas: rojo para las aldopentosas, y las metilaldopentosas, marrón en las aldehexosas, y con sus derivados metilados. La o-fenilendiamina produce aunque en forma poco específica derivados fluorescentes a la luz ultravioleta. La p-anisidina, tonos marrón a verde con aldohexosas, amarillo

con las estehexosas, rojo con los ácidos urónicos, verde con las metilpentosas.

Se suelen emplear regularmente fórmulas a base de difenilamina, dimetilaminilina, naftilamina, bencidina, etc.

Así la urea en medio clorhídrico reacciona más específicamente sobre las cetosas, por lo que resulta un excelente reactivo, dando coloraciones azules. En líneas muy generales se ha comprobado que los reactivos a base de aminos son más específicos sobre las aldosas, y aquellos otros de carácter fenólico son más específicos para cetosas. Por ello es que se han utilizado reactivos mixtos empleando aminofenoles. Los mejores resultados se obtuvieron con el o-amino fenol, que ha permitido caracterizar de 1 a 5 ugr de cada azúcar, resultando colores muy diferenciados, pentosas, azul; metil pentosas, rojo; dihexosa, marrón; cetohexosas, amarillo; ácido urónico, azul. Pero del cúmulo de reactivos que previamente se ha comentado, se suelen escoger rutinariamente unos cuantos que resultan ser más convenientes para los trabajos de rutina, los cuales se detallan a continuación:

1º) - B-naftilamina 0,1 gr., timol 1 gr., ácido ortofosfórico 2 cc., etanol de 80° 150 cc., se pulveriza el cromatograma, se calienta luego de secar, a 100° C (16) obteniéndose distintos colores, fructosa amarillo, en cambio glucosa, galactosa, melibiosa y maninotriosa producen manchas marrones.

2º) Anilina 0,4 cc., timol 2 gr., ácido ortofosfórico 2 cc., etanol de 80° c.s.p. 150 cc. se pulveriza, seca y calienta en estufa a 100°C durante 5 minutos, se observan manchas marrón

con glucosa, galactosa y los holósidos que encierran esas hexosas (17).

3) Naftoresorcinol 10 grs., etanol a 80° 150 cc., se pulveriza, seca en el mismo momento del empleo se agregan 3 gotas de ácido clorhídrico, la fructosa y holósidos que la contienen dan color rojo característico. (18)

4) Urea 5 grs., ácido clorhídrico 2N 20 cc., etanol a 80° 80 cc., se calienta a 100°C, se observan manchas azules con la fructosa y algo menos acentuada para los holósidos que la contienen (14).

5) Etalato de anilina 1,86 grs., 0,93 grs. de anilina, 100 ml. de butanol saturado con agua, se pulveriza la solución y se calienta a 105°C durante 10 minutos. (13)

6) Permanganato de potasio al 1% que contiene 2% de carbonato de sodio, se obtienen manchas amarillas sobre fondo púrpura, luego se secan las manchas son grises (19).

7) Benzidina 0,5 grs., 20 ml. de ácido acético, 80 ml. de alcohol absoluto, después de pulverizar y secar a 105°C durante 10 minutos se obtienen manchas marrones. (20)

8) Naftoresorcina al 2% en sol. alcohólica, ácido tricloroacético en solución acuosa al 2% 1 vol. (v/v), después de secar se lleva a estufa, se calienta a 100°C y se observan manchas rojo brillante para la sacarosa, fructosa, y sorbosa. (21)

9) Resorcina al 3% en ácido clorhídrico y alcohol da manchas rojas (14).

May a menudo, los reveladores se clasifican por su propiedad de actuar sobre los azúcares reductores y sobre los no

reductores, por consiguiente a continuación se agrupan los que se han señalado.

Para azúcares reductores:

- 1) B-naftil amina
- 2) Anilina
- 3) Ftalato de anilina
- 4) Permanganato de potasio
- 5) Benzidina.

Para azúcares no reductores:

- 1) Resorcina
 - 2) Urea
 - 3) Naftoresorcina.
-

PARTS EXPERIMENTAL

Antes de comenzar con el análisis de las muestras, se efectuaron distintos ensayos con soluciones de diversos glúcidos puros en agua los que fueron sembrados a lo largo de la línea de partida trazada sobre un trozo de papel Whatman N° 1 a 4 cm. del borde inferior del papel con lápiz no copiativo.

Esta operación resulta imprescindible para adquirir una práctica suficiente de cromatografía puesto que ha permitido sacar una serie de conclusiones interesantes. Las gotas de las distintas soluciones azucaradas al 1% (xilosa, glucosa, lactosa, galactosa, levulosa y sacarosa) empleadas, se sembraron a una distancia entre sí de 2,5 cm. con el auxilio de un tubo capilar, tal que permitiese obtener gotas de no más de 5 mm. de diámetro, luego de dejar secar el papel se enrollaba en forma de cilindro pegando sus bordes con tela adhesiva y se efectuó un desarrollo ascendente empleando el solvente acetato de etilo, ac. acético, agua (3.1.3).

Este solvente forma dos capas, de manera tal que una vez agregado los componentes que lo forman se dejaba decantar durante 20 minutos y se utilizaba la capa superior. Luego de 24 hs. de desarrollo, se procedió a su revelado habiendo secado previamente el papel. El revelador que empleamos primitivamente es el propuesto por: (22)

Solución A: Solución acuosa saturada de nitrato de plata, se toman 0,5 ml. y se completan a 100 ml. con acetona.

Solución B: 0,5 grs. de hidróxido de sodio disueltos en 100 ml. de etanol.

El cromatograma es sumergido en la solución A, secado

al aire y luego sumergido en la solución B, dejándolo secar nuevamente al aire, las manchas aparecen en los dos primeros minutos.

En realidad el revelador empleado solo evidencia la presencia de azúcares reductores, no obstante y a pesar de ser muy sensible, resulta ser poco específico, por cuanto también la sacarosa resulta dar reacción positiva. Claro está que la observación experimentada permite diferenciar a esta última de los demás glúcidos reductores por cuanto estos últimos producen manchas marrón oscuro bastante rápidamente, no así la sacarosa que comienza dando un poco después una mancha gris metálica, que al cabo de algunos minutos (5 minutos) se confunde con la que dan los glúcidos reductores. Ya se ha hablado, en el capítulo correspondiente a la parte teórica, de la poca especificidad de este revelador, pero esto se compensa por la rapidez de su acción revelante y por la comodidad que representa no tener que trabajar en caliente como en la mayoría de los otros reveladores. Asimismo su sensibilidad resulta inconveniente puesto que al cabo de 10 minutos y por acción de la luz, se deposita plata metálica en todo el cromatograma, que si bien no inhibe la observación de las manchas, quita el magnífico contraste blanco del papel de extraordinaria importancia cuando se desea luego sacar la fotografía del cromatograma. Por ello hemos empleado una solución de hiposulfito sódico al 5% con la cual se trataba el cromatograma después de revelado para sacar el exceso de plata. Para esta operación de revelado se empleó una bandeja que me es construido con chapa galvanizada de 25 cm. por 40 cm., similar a la que se utiliza en la copia de planos.

Del conjunto de estas operaciones preliminares hemos extraído las siguientes conclusiones:

- 1° - La imposibilidad absoluta de separar con esta técnica algunos glúcidos entre sí, como ser levulosa de glucosa, o galactosa de glucosa, porque sus R_f son muy próximos.
- 2° - El inconveniente de depositar gotas cuyos diámetro no se acerque a los 5 mm. por el agrandamiento de la mancha y la formación de colas.
- 3° - El mal delineamiento de las manchas una vez revelado el cromatograma, cuando sobre el mismo punto de partida se hicieron siembras de dos gotas correspondientes a otros tantos glúcidos sin haber secado previamente la anterior.
- 4° - Las pentosas tienen mayor desplazamiento o sea mayor R_f que las hexosas y a su vez éstas mayor que los disacáridos.

Hemos resuelto detallar el trabajo realizado englobándolo para su mejor comprensión bajo los siguientes rubros:

- 1) Preparación de la muestra a cromatografiar.
 - 2) Sembrado de las gotas y desarrollo.
 - 3) Revelado y determinación cualitativa.
 - 4) Determinación cuantitativa.
-
- A) Determinación de glúcidos en la melaza de caña de azúcar nacional.

La melaza que se ha empleado en el presente trabajo proviene de Cruz Alta, estación Colombres, Provincia de Tucumán y pertenece a la cosecha del año 1958.

1°) - Preparación de la muestra a cromatografiar.

Como se ha dicho anteriormente la muestra a cromatografiar requiere previamente un tratamiento para eliminar las proteínas y sales que son las sustancias interferentes, sobre todo estas últimas que se encuentra en elevado tenor (la literatura cita del 8 al 12% de cenizas para la melaza nacional).

Para ello en tubo de centrifuga perfectamente limpio y seco se pesaron 2 gra. y se diluyeron con 5 ml. de agua destilada, luego se añadió 0,5 ml. de una solución saturada de acetato de plomo.

A continuación se procedió a centrifugar durante 10 minutos, transvasando el líquido sobrenadante límpido a un vaso de precipitados de 50 ml. El residuo fué tomado dos veces más con agua destilada y centrifugado, reuniendo todos los líquidos de lavado en el vasito anterior. Con esta operación la muestra quedó libre de proteínas, pasando en solución las sales, incluso algo de acetato de plomo empleado en la defecación, y los glúcidos.

En este punto el líquido presentaba un color ligeramente amarillento, que habría de intensificarse apreciablemente al concentrar la solución en las operaciones subsiguientes. Posteriormente se procedió a eliminar las sales, etapa que podíamos haber realizado empleando resinas intercambiadoras de iones, pero preferimos ensayar con tal fin la piridina anhidra tan recomendada por la literatura europea, pero tan poco empleada en los distintos trabajos de la especialidad realizados en nuestro país. Para ello hubimos de partir de una piridina con algún contenido agua, que conseguimos e-

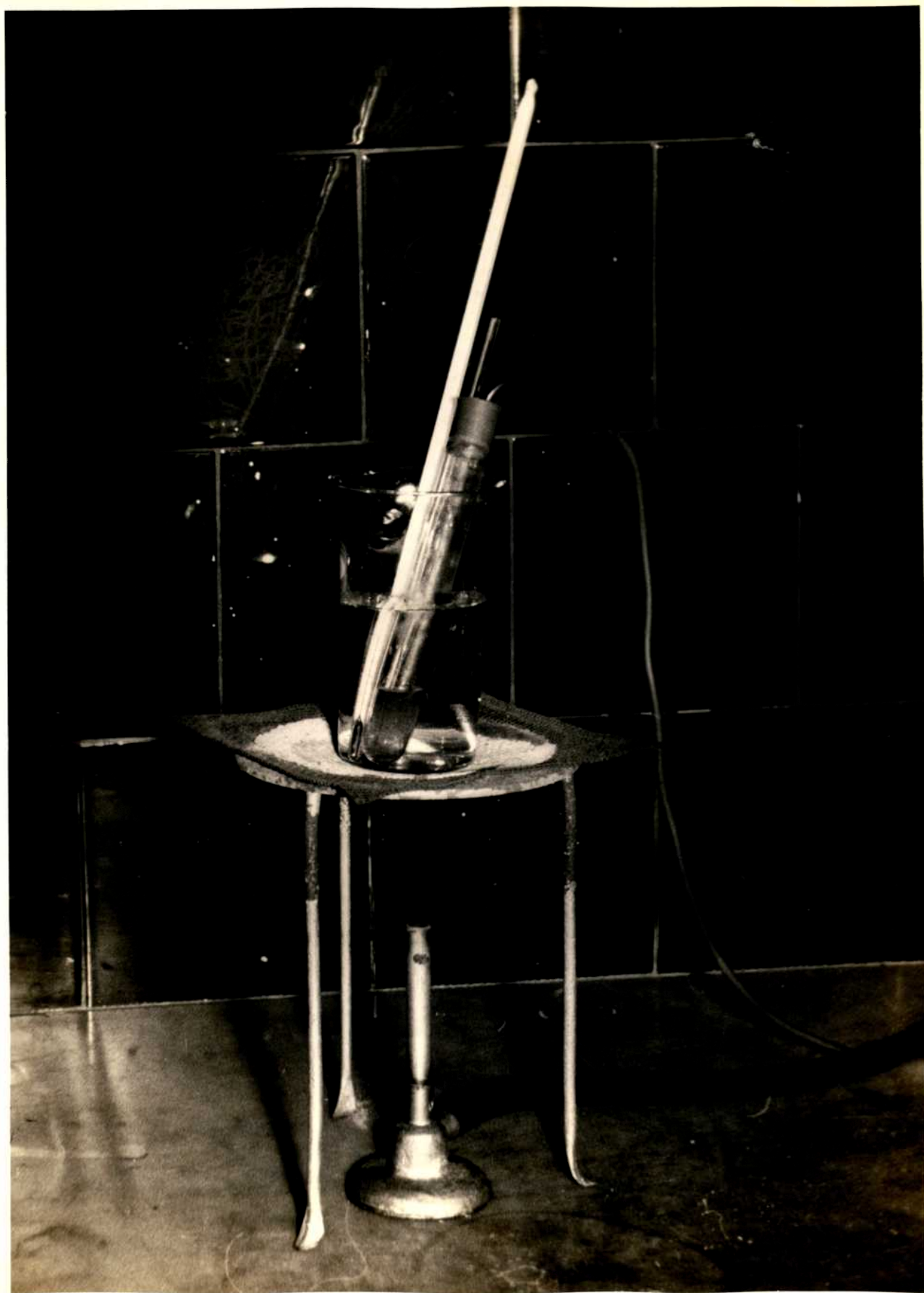
liminar por destilación a reflujo teniendo en cuenta el Punto de Ebullición de la piridina (116°C). La eliminación del agua se hace imprescindible por cuanto el método se basa en la solubilidad de los glúcidos, y la manifiesta insolubilidad de las sales en piridina, con lo cual estas últimas pueden ser así eliminadas por una simple filtración. Esta técnica pertenece a Malpress F.H. y Morrison A.B. (23) y consiste en lo siguiente:

El líquido centrifugado se lleva a seco en baño de María, el residuo una vez frío se toma con 5 ml. de piridina anhidra y se calienta durante 10 minutos a 100 °C, cualquier resto sólido adherido a las paredes se introduce dentro la piridina mediante una varilla de vidrio, se enfría filtra y se procede a eliminar la piridina por destilación a presión reducida cuidando de no pasarse de los 40°C de temperatura y el residuo se toma con la cantidad conveniente de agua. Hemos seguido paso a paso esta técnica y el residuo fué tomado con 1 ml. de agua. Para la destilación al vacío se construyó un dispositivo especial cuyo detalle se observa en la fotografía N° 1. De tal modo se obtiene un concentrado de los azúcares en 1 ml.

La solución en este punto presenta un color intensamente amarillo y para la conservación tanto de la muestra como de las soluciones patrones de los distintos glúcidos, las hemos adicionado de dos gotas de tolaol y mantenido en heladera.

2°) - Sembrado de las gotas y desarrollo.

El sembrado de las gotas se efectuó con una pipeta



DETALLE DE LA FOTOGRAFIA N° 1

DESTILANDO AL VACIO

Se aprecia un vaso de precipitado que contiene agua y un tubo de ensayo de paredes gruesas con tapón de goma y dos tubos que lo atraviesan, uno de ellos conectado a la trompa y el otro comunicando con la atmósfera en un extremo y el otro extremo en forma de capilar sumergido en la solución piridínica a evaporar.-

capilar, sobre papel Whatman N° 1 cuyas dimensiones eran de 18 cm. de ancho x 54 cm. de largo, dimensionado en el sentido mayor de la hoja. Las gotas se depositaron teniendo la precaución de que no fuesen de más de 5 mm. de diámetro, situándolas entre sí a 2 cm. de distancia.

Como de los ensayos previos se había observado, que resultaba imposible la separación perfecta de los glúcidos presentes en la muestra mediante un solo desarrollo, optamos por seguir la técnica del desarrollo múltiple. La misma consiste en efectuar un primer desarrollo, dejar secar el cromatograma y efectuar un nuevo desarrollo y así sucesivamente hasta obtener una perfecta separación.

Originalmente habíamos pensado que la resolución podría llevarse a cabo empleando la técnica descendente y dejando gotear el cromatograma durante un período de 36 a 48 hs.

Para esta técnica ensayamos varios solventes, acetato de etilo 100 ml. piridina 50 ml. agua 60 ml. y también n-butanol 100 ml. piridina 50 ml. y agua 60 ml., pero los resultados no fueron satisfactorios por cuanto si se dejaba actuar el solvente 36 hs. los glúcidos no se presentaban separados y si se aumentaba a un tiempo mayor, escapaban por el otro extremo del papel sin separarse. Los mismos solventes se ensayaron también con la técnica ascendente siguiendo el método del desarrollo múltiple pero los resultados eran similares a los obtenidos con la técnica descendente. En todos los casos cuando empleábamos estos solventes, se tuvo la precaución de dejarlos en decantación durante 2 hs. y se tomaba la capa superior en el desarrollo, se prevenía de tal modo que corriesen dos fases por el

cromatograma.

Finalmente ensayamos el solvente n-butanol 4, ac. acético 1, agua 5. Para ello se tomaban 40 ml de n-butanol 10 ml. de ac. acético y 50 ml. de agua, la mezcla se pasaba a una ampolla de decantación, se agitaba, se dejaba en reposo $\frac{1}{2}$ hora y se tomaba la capa superior. El papel una vez sembrado se introducía con el solvente en la cámara de desarrollo descendente, la que previamente habíamos saturado con el solvente. La cámara de desarrollo fué especialmente adaptada por nosotros, para ello construimos un soporte de madera que sostenía una cuba "Pyrex" con dos trozos de vidrio para sostener el papel (ver fotografía N° 2). Cada desarrollo duraba 24 hs. al cabo de los cuales se sacaba el papel se lo dejaba secar y se cambiaba el solvente (por cuanto se había formado acetato de butilo, por acción del ácido sobre el alcohol) y se procedía a un nuevo desarrollo. Se observó que al cabo de 3 desarrollos la separación resultaba efectiva y que la misma tenía lugar en forma gradual y paulatina luego de cada desarrollo, como se puede apreciar en la fotografía N° 3.

2) Revelado y determinación cualitativa

Luego de efectuar el último desarrollo el papel se deja secar bien y se procede a efectuar su revelado. Esta operación consiste en tratar el cromatograma con un agente químico adecuado que sea capaz de reaccionar con el glúcido produciendo una coloración característica de modo tal de ponerlo en evidencia. Ya se ha hablado en el capítulo correspondiente a la parte teórica de las condiciones que deben reunir estos a-



DETALLE DE LA FOTOGRAFIA N° 2

CUBA DE DESARROLLO

Esta cuba de desarrollo, especialmente adaptada por nosotros para el trabajo, está constituida por dos recipientes de vidrio que se unen en la parte central, vaselinando previamente los bordes y sujetadas por una goma de 10 cm. de ancho. En su interior se aprecia un soporte de madera que sostiene una cubeta tipo "Pirax" que es donde se coloca el solvente.

Si bien el soporte de madera tiene el inconveniente que debe ser utilizado con un solo solvente, por las cantidades del mismo que retiene este material, presenta algunas ventajas frente a otros, por ej. vidrio por el peligro de su rotura al manipular, o metales que rápidamente se corroen y que pueden afectar al papel, cuando al menor descuido, entran en contacto con el mismo.--

gentes químicos denominado reveladores. En el trabajo hemos ensayado diferentes reveladores, oportunamente citamos el nitrato de plata del que ya nos hemos ocupado. Entre los que fueron objeto de nuestra atención particular mencionaremos los siguientes:

1° - Ftalato de anilina (13). Se disuelven 1,66 grs. de ácido ftálico y 0,93 grs. de anilina en 100 ml. de butanol previamente saturado de agua, se rocía el cromatograma y se lleva a estufa a 105°C durante 10 minutos.

Si bien este revelador es bastante sensible (solo reacciona con los azúcares reductores) tiene el inconveniente de que si bien produce manchas rojo marrones delineadas, el papel toma un tinte rosado, que puede llegar a encubrir la mancha producida por un glúcido, cuando este último se encuentra en muy baja concentración. Asimismo resulta molesto controlar el proceso con estufas como la que hemos empleado en el trabajo que carecen de ventana de vidrio adecuada, lo que obliga a abrir la puerta a cada instante con el consiguiente descenso de la temperatura. Además el menor descuido, si la temperatura se eleva algunos grados, el papel se tuesta, lo que ocasiona pérdidas insalvables.

2° - Fosfato de anilina 14 al 5% en agua, butanol o ácido acético, se calienta en estufa a 105°C durante 3 minutos cuando la disolución se hizo en ácido acético y en cambio cuando se efectuó en agua o en butanol se requieren 10 minutos de calentamiento, aunque en este último caso la coloración es menos intensa. Este revelador es similar al anterior aunque parecería ser algo menos sensible. No obstante diferencia en

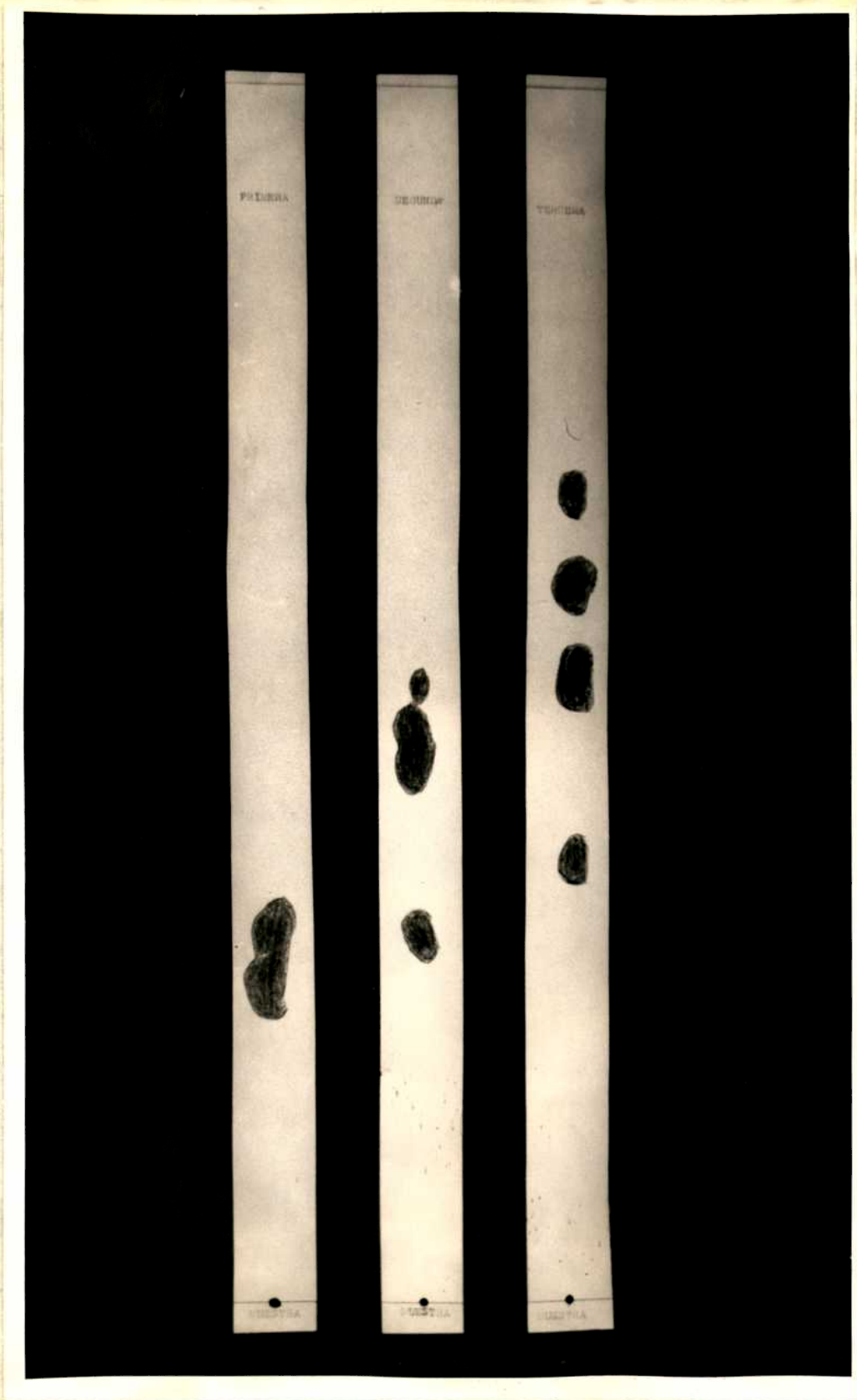
parte a los distintos azúcares reductores así las aldopentosas dan color rojo brillante, las aldehexosas una gama de colores que van del verde al marrón y en cambio las cetosas son muy poco sensibles.

3° - Resorcina (14). Se prepara una solución disolviendo 3 grs. de resorcina en 80 ml. de alcohol y 20 ml. de ácido clorhídrico 2 Normal, se calienta en estufa a 105° durante 10 minutos.

Este revelador no reacciona con las aldosas, pero sí con las cetosas y con los di y trisacaridos que la contienen dando un hermoso color rojo. No obstante hemos observado que su empleo resulta ser muy delicado, puesto que si se prolonga el tiempo de calentamiento todo el papel se tinte de rojo tornando indistinta la mancha provocada por el glúcido. Asimismo y aunque hayamos seguido fielmente las indicaciones, las manchas rojas se desvanecian al cabo de unos pocos minutos. De manera que estos dos grandes defectos debemos señalarle.

4° - Urea: (14) Se disuelven 5 grs. de urea, en 20 ml. de ácido clorhídrico 2 Normal y 80 ml. de etanol, se calienta en estufa a 105° durante 10 minutos.

Este revelador es para cetosas o para compuestos que la contienen, produce manchas azules, que se tornan muy oscuras a medida que aumenta la concentración del glúcido en exámen. Además nuestra observación ha permitido constatar que basta con calentar a 95°C y que resulta muy conveniente por su especificidad, sensibilidad y porque no tinte el resto del papel, lo que permite obtener manchas bien delineadas.



DETALLE DE LA FOTOGRAFIA N° 3

DESARROLLOS MULTIPLES

Se observa en forma perfectamente apreciable como el número de desarrollos influye en la correcta separación de los glúcidos contenidos en la melaza analizada.

En síntesis, hemos adoptado para nuestro trabajo dos reveladores, el nitrato de plata, y el de urea, alcohol clorhídrico por las ventajas que oportunamente puntualizaremos. De tal modo y por el simple hecho del revelado, hemos podido diferenciar las aldosas de las cetosas o compuestos que las posean.

Es indudable, que de tal modo poseíamos medios de inestimable valor que servían de verdadero auxilio, para el posterior análisis cualitativo.

Es claro que para tener absoluta certeza en la determinación cualitativa procedimos a sembrar a más de la muestra, en puntos diferentes sobre la misma línea de partida, cada uno de los glúcidos sospechados, lo que nos permitió identificar en forma indubitable las cuatro manchas (ver figura N° 5) que resultaron correspondier a la sacarosa, glucosa, levulosa y xilosa. Como por esta técnica resulta imposible expresar el Rf de cada glúcido hemos determinado los valores Rgx 100 cuyo detalle se puede apreciar en el cuadro N° 1.

CUADRO N° 1

GLUCIDOS	f.cm.	Rgx100.	SOLVENTE	HORAS de DESARROLLO	FRENTE del SOLVENTE.
SACAROSA	17	70.8	ETANOL	3 desarrollos de 24 horas cada uno	46 cms.
GLUCOSA	24	100	Acido Acético		
LEVULOSA	27.5	114,5	Agua		
XILOSA	31.5	131,2	se utiliza la capa superior		

4) Determinación cuantitativa

Para la determinación cuantitativa hemos preferido los métodos por elución y posterior valoración titrimétrica de la sustancia contenida en el solvente, que en este caso es el agua.

En el caso de los glúcidos reductores se ha utilizado el método de Sonoggi (24). El que se basa en la reducción del cobre del reactivo a cobre monovalente, su posterior oxidación a cobre bivalente por acción del yodo, y final valoración del exceso con una solución de hiposulfito sódico.

En el caso de la sacarosa se ha empleado el método de la oxidación con periodato (25), que se basa en la oxidación por parte de este reactivo de los compuestos que posean grupos exhidrilos sobre los átomos de carbono adyacentes con formación de aldehidos y iodato de sodio. Si los aldehidos resultantes poseen grupos exhidrilos sobre el átomo de carbono adyacente se formará ácido fórmico, que se valora con una solución de hidróxido de sodio.

Pero antes de entrar en el detalle de estos métodos, se explicará como se efectuaron el conjunto de las operaciones. Sobre un papel de 18 x 54 cm. se trazó a 6 cm. del borde, la línea de partida, y sobre la misma se sembraron a 3 cm. de distancia entre sí, la muestra y las soluciones patrones de cada uno de los glúcidos. Se emplearon 2 grs. de muestra perfectamente pesada y luego de eliminar sales y proteínas fué disuelta en agua destilada hasta completar 1 ml. En los dos extremos se depositaron 2 gotas (una para cada uno) y



DETALLE DE LA FOTOGRAFIA N° 4

SEMBRANDO

Resulta muy importante durante la siembra, no tocar el papel con la mano, que siempre comunica suciedad, sudor, grasa, etc. por lo que resulta conveniente colocar un papel por debajo de la mano.

luego sucesivamente con pipeta calibrada de 2 ml. 1 gota (para evaluar glucosa, levulosa y xilosa), 1 gota (para evaluar sacarosa (habiendo diluido la muestra a 5 ml.)), 1 gota de las soluciones patrones, de glucosa, sacarosa, levulosa al 20% y 2 gotas de xilosa al 2%. Hemos procedido de esta manera, porque resulta conveniente para la determinación cuantitativa que la cantidad de glúcido de las soluciones patrones no difiera en forma muy apreciable a la cantidad contenida en la muestra.

Luego de efectuado el desarrollo múltiple, revelamos las tiras extremas que correspondían al testigo, con lo cual se tenía la absoluta certeza de la posición de los glúcidos sin revelar, de la muestra y de los patrones.

Posteriormente recortamos el papel y los distintos trozos se colocaron en tubos de ensayo, con auxilio de una varilla, luego a cada tubo se le añadieron 3 ml. de agua destilada. Por último procedimos a efectuar una agitación mecánica de 350 golpes por minuto durante un lapso de 3 horas, con lo cual los glúcidos pasan a la solución en forma total.-

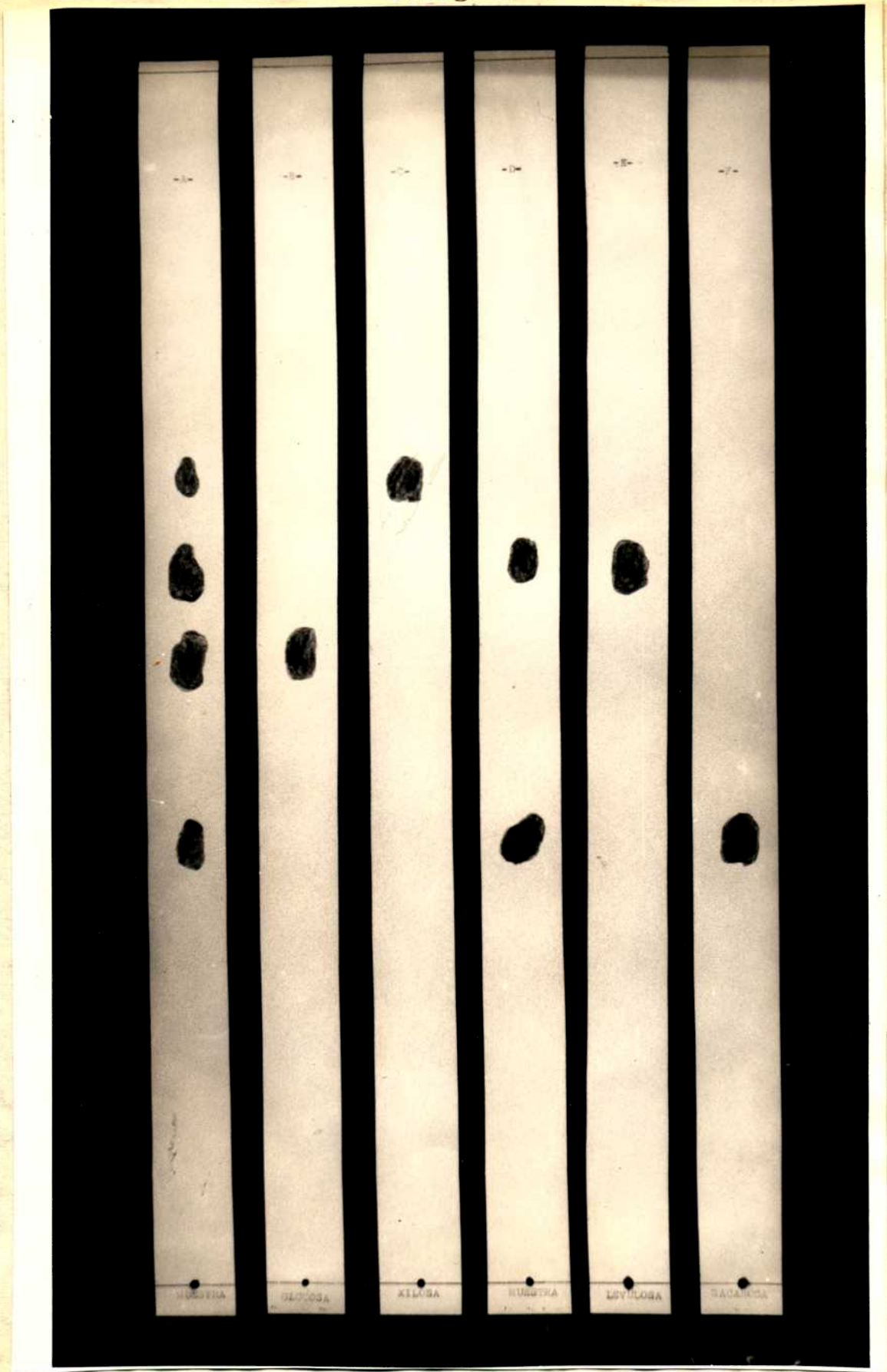
Para los glúcidos reductores ya se ha dicho que empleamos el método de Somogyi. Se procede así: a 5 ml. del líquido se añaden 5 ml. de reactivo de Somogyi. Se calienta a baño María durante 20 minutos (enérgico), luego se enfría bajo la canilla se añaden 0,5 ml. de solución de yoduro de potasio al 2,5% y 1,5 ml. de ácido sulfúrico 3 Normal, y se titula con hiposulfito de sodio N/200.

Un litro del reactivo de Somogyi contiene, 28 grs. de fosfato disódico, anhidro, 100 ml. de hidróxido de sodio normal, 40 grs. de tartrato doble de sodio y potasio, 8 grs. de sulfato cúprico y 180 grs. de sulfato de sodio anhidro. Además el reactivo se adiciona de 5 ml. de sol. de iodato de potasio normal cuando la cantidad de glucido a valorar no exceda de 0,5 mgrs.

Si la cantidad de glucido excediera de 0,5 mgrs. se añaden 10 ml. de iodato de potasio normal por litro de reactivo, teniendo en cuenta que al final se deberán añadir, 1 ml. de ioduro de potasio al 2,5%.

Antes de añadir el iodato de potasio al reactivo es menester dejar que la solución se estabilice, por el término de 48 hs., luego decantar, añadir el residuo filtrándolo previamente y por último añadir el yodato de potasio. La valoración se debe conducir con cuidado por las pequeñas cantidades de cobre involucradas, que resultan fácilmente oxidables por acción del oxígeno del aire, justamente una de las funciones del sulfato de sodio del reactivo es la de prevenir este inconveniente. No obstante en el Erlenmeyer donde se efectuó la valoración y con el mismo fin, hemos adaptado un tapón con una válvula especial que permite expulsar los vapores sin que se produzca entrada de oxígeno atmosférico.

Para sacarosa empleamos el método del periodato de sodio que consiste en lo siguiente: El líquido eluido (5 ml), que contiene de 0,2 a 5 mgrs. de azúcar, se oxidan con 1 ml de metaperiodato de sodio 1/4 molar y se calienta



DETALLE DE LA FOTOGRAFIA N° 5

ANALISIS CUALITATIVO DE LA MELAZA

La tira marcada con A corresponde a la muestra revelada con nitrato de plata, comenzando de abajo se aprecian las manchas correspondientes a sacarosa, glucosa, levulosa y xilosa.

Sobre las tiras B y C se observan las manchas correspondientes a glucosa y xilosa reveladas con nitrato de plata.

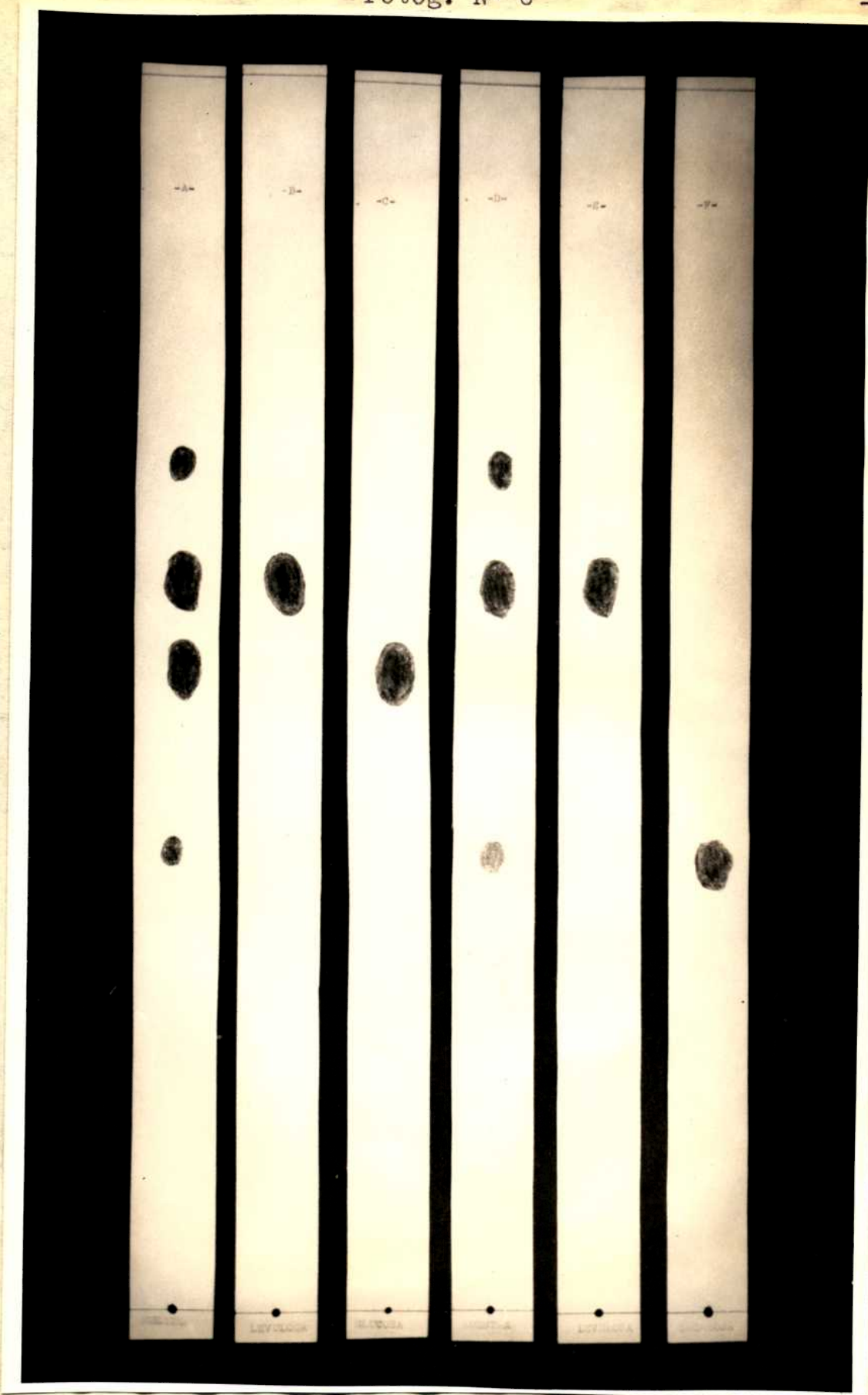
En la tira D se ha revelado la muestra con el reactivo urea-ac. clorhídrico, las manchas corresponden a sacarosa y levulosa.

Las tiras E y F se han revelado también con el reactivo urea-ac. clorhídrico y muestran las manchas típicas de sacarosa y levulosa.

en bañe de María por 30 minutos. Se enfría, se añaden 0,2 ml. de glicol, y se titula con hidróxido de sodio $n/100$ en presencia de rojo de metilo como indicador.

Tanto en este método como en el de Somogyi, es importante controlar el tiempo de calentamiento a fin de que la reacción sea total, así por ejemplo se sabe que la reacción para la glucosa es completa a los 10 minutos, pero para otros glúcidos se necesitan 20 minutos, análogamente pasa con el caso de la sacarosa, de tal modo hemos aumentado el tiempo del tratamiento en B.M a fin de dar un margen de seguridad. En el método de periodato es importante agregar el glicol al final por cuanto el exceso de reactivo se transforma en iodato que resulta ser neutro al rojo de metilo. Asimismo es importante neutralizar previamente el glicol en presencia de 2 gotas de rojo de metilo y conducir la valoración también con 2 gotas de indicador hasta que se alcance la misma coloración. Otra de las precauciones que se deben tener es la de prevenir la evaporación del ácido fórmico que se va formando durante el calentamiento para ello lo hemos conducido a reflujo en un pequeño balón con tapa esmerilada de vidrio provista de un tubo de 1 mt. de largo y que luego de enfriar se lavaba con la misma cantidad de agua destilada para la muestra y testigo.

Además hemos tenido especial cuidado de la absoluta limpieza del material involucrado en la valoración, tubos de ensayo, pipetas, buretas, erlenmeyer, etc. los que fueron lavados repetidamente, incluso con mezcla sulfocrómica, en-



DETALLE DE LA FOTOGRAFIA N° 6

ANALISIS CUALITATIVO DEL JUGO DE UVA

La tira A corresponde a la muestra revelada con nitrato de plata, se aprecian comenzando desde abajo, las manchas correspondientes a sacarosa, glucosa, levulosa, y la que corresponde al compuesto de caracter cetónico.

Las tiras B y C presentan las manchas testigo de glucosa y levulosa, reveladas con nitrato de plata.

La tira D corresponde a la muestra revelada con el reactivo urea-ac.clorhídrico.

Las tiras E y F corresponden a las manchas testigo de levulosa y sacarosa, reveladas con el reactivo urea-ac.clorhídrico.

juagados con agua destilada y secados.

El líquido de elución 3 ml., contenido en cada uno de los tubos de ensayo se transvasaron a un Erlenmeyer de 50 ml. de capacidad (los que correspondían a los azúcares reductores) y al baloncito (los que correspondían a sacarosa) empleando 1 ml. en cada lavado hasta completar a 5 ml.

Los datos de la valoración, así como los porcentajes de cada uno de los glúcidos contenidos en la muestra se detallan en los cuadros N° 2 y 3.

C U A D R O N° 2

VALORACION DE LOS TESTIGOS DE MELAZA

GLUCIDOS	Concentración de la solución testigo. Ga/100 ml.	Número de gotas de 2 ml. sembrados	Peso del testigo sembrado γ_s	ml. de 520_3 Na $_2$ N/200 gastados en la valoración del reactivo.	ml. de 520_3 Na $_2$ N/200 gastados en la valoración de los testigos.	Diferencia ml.	γ_s de glúcido por ml. de 520_3 Na $_2$ N/200
-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	-7-	-8-
GLUCOSA	20	1	400	6.25	3.18	3.07	130.3
LAVULOSA	20	1	400	6.25	3.315	2.935	136.3
XILOSA	2	2	80	6.25	5.67	0.58	137.9

GLUCIDO	Concentración de la solución testigo. Ga/100 ml.	Número de gotas de 2 ml. sembrados	Peso del testigo sembrado γ_s	ml. de HONa N/100 gastados en la valoración del testigo	γ_s de glúcido por ml. de HONa N/100
-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-
SACAROSA	20	1	400	1.15	347.8

VALORACION DE LA MUESTRA DE MELAZA

GLUCIDOS	Peso de la substancia grs.	Volumen a que se llevó la muestra. ml.	Número de gotas de 2 ml sembradas	ml. de S2O3 Na2 n/200 gastados en la valoración del reactivo.	ml. de S2O3 Na2 n/200 gastados con la valoración de las muestras.	Diferencia ml.	Crs. de glucóido en la cantidad de muestra empleada	Cantidad porcentual de glucóido grs/100 gr.
-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	-7-	-8-	-9-
GLUCOSA	2	1	1	6.25	4.15	2.1	0.1368	6.84
LEVULOSA	2	1	1	6.25	4.3	1.95	0.1329	6.7
XILOSA	2	1	1	6.25	6	0.25	0.0172	0.86

GLUCIDO	Peso de la substancia grs.	Volumen a que se llevó la muestra ml.	Número de gotas de 2 ml sembradas	ml. de HONa N/100 gastados en la valoración de la muestra.	Crs. de glucóido en la cantidad de la muestra empleada.	Cantidad porcentual de glucóido grs/100gr.
-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	-7-
SACAROSA	2	5	1	0.88	0.7651	38.25

B) Determinación de glúcidos en el jugo de uva madura.

Como la época que correspondía a nuestro trabajo no coincidía con la de la vendimia, optamos a título de ensayo, analizar un jugo de uva en botella.

Escogimos para ello uno de la marca "Pirámida", que nos permitió observar cuatro manchas, caracterizamos a tres que correspondían a glucosa, levulosa y xilosa y la última por su $R_g \times 100 : 170,2$ correspondería a la ribosa. Atribuímos en este punto, la ausencia de la sacarosa a que tal vez por tratarse de un jugo viejo se hubiera desdoblada por acción enzimática en glucosa y levulosa. Por ello decidimos esperar la vendimia para tener uva madura. Para el trabajo empleamos uva "Moscatel" proveniente de la zona de Palmira, Provincia de Mendoza y correspondiente a la cosecha del año en curso.

Empleamos la misma técnica que para el caso de la melaza, con lo que pudimos apreciar 4 manchas correspondientes a sacarosa glucosa y levulosa (ver fotografía N° 6). La cuarta mancha fué objeto de nuestra atención particular, presentaba un R_g ligeramente superior al de la xilosa $R_g \times 100 : 140,5$, tratada con el revelador de nitrato de plata se presentaba como un cuerpo de características reductoras, tratada con fosfato de anilina al 5% en ácido acético y en n-butanol no se obtenía ninguna coloración - (Como se ha dicho este revelador no da reacción con cetosas). Con los reactivos urea-clorhídrico y con resorcina -ac.clorhídrico (que sabemos son específicos para cetosas o para compuestos que posean la agrupación CO) se obtenía coloración azul y rojo respectivamente, que resultaban ser más intensas que las obtenidas con la sacarosa de la mues-

tra. Del conjunto de lo anteriormente expuesto, se puede decir que el compuesto en exámen sería una pentosa por el $R_g \times 100$ tan elevado que presenta y además por su comportamiento frente a los distintos reveladores, poseería grupo CO.

A los fines de la determinación cuantitativa hemos empleado los mismos métodos que para el caso de la melaza, utilizando los testigos y muestra en las concentraciones adecuadas, los que conjuntamente con los resultados se muestran en los cuadros N° 4 y 5 que se muestran a continuación.

C U A D R O N° 4

VALORACION DE LOS TESTIGOS DE JUGO DE UVA

GLUCIDOS	Concentración de la solución testigo g/100 ml.	Número de gotas de 2 ml sembrados	Peso del testigo sembrado	ml. de S ₂ O ₃ Na ₂ N/200 gastados en la valoración del reactivo.	ml. de S ₂ O ₃ Na ₂ N/200 gastados en la valoración de los testigos.	Diferencia ml.	de glúcido por ml. de S ₂ O ₃ Na ₂ N/200
-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	-7-	-8-
GLUCOSA	20%	1	400	6.25	3.24	3.01	132.9
LEVULOSA	20%	1	400	6.25	3.4	2.85	140.4

GLUCIDO	Concentración de la solución testigo grs/100 ml.	Número de gotas de 2 ml sembrados	Peso del testigo sembrado	ml. de HONa N/100 gastados en la valoración del testigo.	de glúcido por ml. de HONa N/100
-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-
SACAROSA	20	1	400	1.16	344.8

VALORACION DE LA MUESTRA DE JUGO DE UVA

GLUCIDOS	Peso de la substancia grs.	Volumen a que se levó la muestra ml.	Número de gotas de 2 ml sembradas	ml. de 3203 Na_2 N/200 gastados en la valoración del reactivo	ml. de 3203 Na_2 N/200 gastados en la valoración de la muestra.	Diferencia 5-6- ml.	Grs. de glúcido do en la cantidad de la muestra empleada.	Cantidad porcentual de o/glúcido grs/100grs.
-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	-7-	-8-	-9-
GLUCOSA	2	1	1	6.25	3.3	2.95	0.19602	9.8
LEVULOSA	2	1	1	6.25	3.4	2.85	0.20007	10

GLUCIDO	Peso de la muestra grs.	Volumen a que se levó la muestra ml.	Número de gotas de 2 ml sembradas	ml. de HCNH N/100 gastados en la valoración de la muestra.	Grs. de glúcido en la cantidad de muestra empleada	Cantidad porcentual de glúcido grs/100grs.
-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	-7-
SACAROSA	2	0.5	15	0.7	0.00402	0.2

RESUMEN

Hemos utilizado los vastos alcances que presenta al analista la cromatografía sobre papel para determinar la composición en glúcidos del jugo de uva madura y la melaza de caña nacional.

El tratamiento a que hemos sometido las muestras, de uva y melaza en todas sus etapas son similares de manera que las detallaré en conjunto.

Las muestras provenían de Cruz Alta, estación Colombres Prov. de Tucumán cosecha 1958 para la melaza y de Palmira Prov. de Mendoza cosecha 1959 para la uva que correspondía al tipo "Moscatel".

Para la determinación cualitativa se pesaron 2 grs. se diluyeron con 5 ml. de agua y por agregado de 0,5 ml. de sol. de acetato de plomo saturado con lo que por centrifugación conseguimos eliminar las proteínas. Las muestras fueron liberadas de sales siguiendo la técnica (23) de Malpress H y Morrison A.B. que emplea piridina anhidra en la cual resultan ser solubles los glúcidos e insolubles las sales.

De tal modo procedimos a eliminar el líquido centrifugado por evaporación a baño de María y luego añadimos 5 ml de piridina, calentamos durante 10 minutos a 100 °C hasta obtener una perfecta solubilización, enfriamos, filtramos y eliminamos la piridina destilando al vacío a temperatura no mayor de 40°C. Una vez eliminada la piridina añadimos 1 ml. de agua destilada con lo que teníamos la muestra libre de sales y proteínas y pronta para ser depositada sobre el papel.

El papel empleado era el Whatman número 1, dis-

puesto en el sentido mayor de la hoja y cuyas dimensiones eran de 18 x 54 cm., lo que nos permitía efectuar seis siembras a una distancia de 1,5 cm. entre sí.

Empleamos en el trabajo la técnica descendente, siguiendo el método de los desarrollos múltiples. Este método, que consiste en someter al cromatograma a una serie de desarrollos sucesivos nos ha permitido resolver el problema que se presentaba dado los valores R_f muy próximos de los glúcidos componentes. Hemos ensayado diferentes reveladores, de los cuales para el trabajo de rutina escogimos dos:

1 - (22) Solución A : Solución acuosa saturada de nitrato de plata, se toman 0,5 ml. y se completan a 100 ml. con acetona.

Solución B : 0,5 grs. de hidróxido de sodio disueltos en 500 ml. de alcohol etílico.

El cromatograma seco se sumerge en la solución A, se deja secar, y luego en la solución B, las manchas aparecen en los dos primeros minutos.

Este revelador actúa sobre los glúcidos reductores, pero dada su extraordinaria sensibilidad también acusa reacción positiva la sacarosa, pero la observación detenida de la evolución del color de la mancha permite distinguirla. En efecto, en lugar de dar manchas marrones oscuras, como lo hacen los glúcidos reductores, comienza dando un tono grisáceo y luego de 5 minutos se torna igual a la de los glúcidos reductores.

2 - (14). Se disuelven 5 grs. de urea en 20 ml. de ácido clorhídrico 2 Normal y 80 ml. de tanol de 96°, se rocía el cromatograma y se calienta en estufa a 105°C durante 10 minutos.

Este revelador da coloración azul, con los glúcidos que poseen grupo CO, que se oscurece con el aumento de concentración. Resulta ser muy específico y sensible. En cambio las aldosas no reaccionan.

Hemos empleado el solvente butanol, ácido acético, agua 4.1.5, empleando la capa superior luego de dejar decantar durante 20 minutos.

De tal modo hemos podido caracterizar para la muestra 4 manchas, que correspondían a sacarosa, glucosa, levulosa y xilosa. En el jugo de uva observamos también cuatro manchas, reconocimos a tres de ellas a saber, sacarosa, glucosa y levulosa. Respecto de la cuarta mancha comprobamos que se trataba de un compuesto reductor puesto que daba reacción positiva con el revelador de nitrato de plata, además con el reactivo urea -ácido clorhídrico (azul) y con el resorcina-ácido clorhídrico (rojo) y negativa con el fosfato de anilina disuelto en butanol y ácido acético. Todo esto asociado al alto valor RG x 100: 140,5, parecería indicar que el compuesto en examen se trata de una pentosa con agrupación CO.

A los fines de la determinación cuantitativa hemos preferido los métodos titrimétricos que se realiza sobre el líquido eluido. Para ello hemos empleado soluciones patrones

y la muestra en concentraciones adecuadas, sembrando el cromatograma y revelando solamente las franjas externas, que también correspondían a la muestra, con lo que se tenía la absoluta certeza de la posición de los glúcidos de los patrones y de la propia muestra sin revelar. Para la elución hemos recortado el papel, colocado en tubos de ensayos con 3 ml. de agua y procedido a una agitación mecánica durante 3 horas a 350 golpes por minuto.

Finalmente hemos incorporado el líquido de elución al Erlenmeyer donde se efectuaría la valoración, lavando dos veces con 1 ml. de agua destilada hasta completar a 5 ml.

A los fines de la determinación cuantitativa hemos preferido las técnicas titrimétricas. Para los glúcidos reductores se ha empleado el método de Somogyi (24) y para la sacarosa el método de la oxidación con periodato (25). El primero de estos métodos aprovecha el poder reductor de los glúcidos, que transforma el cobre del reactivo a cuproso, su posterior oxidación a cobre bivalente por intermedio del Ioduro de potasio en medio ácido y final valoración del iodo en exceso, empleando una solución de hiposulfito de sodio. El segundo de ellos se basa en la acción oxidante del periodato, que fracciona la molécula del glúcido dando ácido fórmico que se valora con una solución de hidróxido de sodio.

El método de Somogyi se conduce así: a 5 ml. del eluido se añaden 5 ml. del reactivo de Somogyi, se calienta en Baño de María (enérgico) durante 20 minutos, se enfría bajo la canilla se agregan 0,5 ml. de solución de ioduro de po-

potasio al 2,5% y 1,5 ml. de ácido sulfúrico 3 N, se titula con hiposulfito de sodio N/200.

La solución de Somogyi contiene en un litro: 28 grs. de fosfato disódico anhidro, 100 ml. de hidróxido de sodio 1 N, 40 grs. de sal de Rochelle, 3 grs. de sulfato cúprico y 180 grs. de sulfato de sodio anhidro. Luego de dejar en reposo la solución durante 48 hs. se la filtra y agrega 5ml. de solución norma 1 de iodato de potasio.

A los fines de la valoración es menester adaptar al Erlenmeyer donde se efectúa el calentamiento una pequeña válvula que permita expulsar los vapores sin dejar la posibilidad de entrada de aire a fin de prevenir la oxidación del cobre monovalente.

El método al periodato procede así: a 5ml. del eluido se adiciona 1 ml. de solución 0.25 molar de metaperiodato de sodio, se calienta en Baño de María durante 30 minutos, se enfría bajo la canilla, se agrega 0,2 ml. de glicol y se valora con solución de hidróxido de sodio N/100 en presencia de dos gotas de rojo de metilo.

El añadido de glicol tiene por objeto destruir el exceso de reactivo transformándolo en iodato, nastro al rojo de metilo. Resulta imprescindible adaptar un refrigerante a reflujo de 1 metro provisto de tapa esmerilada, durante el calentamiento, a fin de evitar que escape el ácido fórmico a medida que se va formando.

Resulta imprescindible que las soluciones patrones se hagan correr en el cromatograma, puesto que el papel comunica un ligero poder reductor al líquido de elución,

con lo que se asegura que el mismo poder reductor se ha incorporado en la recuperación de los glúcidos de la muestra y de las soluciones patrones, cuando se ha tenido la precaución de trabajar sobre recortes de igual superficie para ambos casos.

Se han empleado soluciones patrones al 20% p/v de glucosa, sacarosa y levulosa y al 2% p/v para xilosa.

El contenido en glúcidos de la melaza y del jugo de uva, se detalla en el cuadro N° 6.

CUADRO N° 6

MELAZA		JUGO DE UVA	
	% en Peso		% en Peso
SACAROSA	38.25	SACAROSA	0.2
GLUCOSA	6.8	GLUCOSA	9.8
LEVULOSA	6.7	LEVULOSA	10.0
XILOSA	0.86		

CONCLUSIONS

El presente trabajo nos ha dejado una serie importante de conclusiones, las que correctamente interpretadas serán de extraordinaria aplicación en los trabajos futuros de la especialidad.-

1°) Se demuestra la extraordinaria eficacia de la piridina anhidra en la separación de las sales de la muestra, que resulta ser tan eficaz como las resinas intercambiadoras de iones, pero de más fácil manipulación y con un tiempo de trabajo mucho menor.

2°) Recomendamos la técnica del desarrollo múltiple, que si bien presenta la desventaja de tener que sacar el papel, secarlo y volver a efectuar un nuevo corrimiento, respecto del método que deja gotear el cromatograma, resulta de ser de mayor aplicación puesto que puede ser útil en la cromatografía ascendente, justamente donde sería imposible emplear la técnica del goteado.

3°) La presente técnica permitirá investigar no sólo la composición en glúcidos de las diversas variedades de frutas del país, sino que convenientemente adaptada resultará eficaz como método de control bromatológico en diferentes productos, por ej., mieles, dulces, jaleas, etc.

4°) También permite investigar los glúcidos presentes en el reino vegetal bajo la forma de pentosanos, hexosanos, etc. efectuado previamente una hidrólisis en medio sulfúrico y neutralizando con solución de hidróxido de bario.

5°) Hemos comprobado la extraordinaria sensibilidad y practicidad de los reveladores empleados en nuestro

trabajo de rutina, sol. de nitrato de plata y urea-alcohol-ácido clorhídrico, este último por su extraordinaria especificidad.

6°) Por último se observa la extraordinaria eficacia de las técnicas cromatográficas, nos han permitido encontrar azúcares cuya concentración es muy inferior a la de otros presentes en la muestra, y nos ha dado la satisfacción de caracterizar una sustancia de carácter cetónico en el jugo de uva, cuya correcta individualización, no dudamos, que se produzca en un futuro cercano.

Adolfo Montes Adolfo Montes

OBRAS GENERALES DE CONSULTA

- 1° - Lederer Edgar y Lederer Michael - Chromatography, a review of principles and applications -, 1953.-
- 2° - Kramer Friedrich - Papierchromatographie, 1954.-
- 3° - Franco Savoia - Cromatografia su carta, 1953.-
- 4° - Giuseppe Schoen - Analisi cromatografica su carta, 1954.-
- 5° - J.A. Gautier - Mises au Point de Chimie analytique pure et appliquee et D'Analyse Bromatologique - Quinta conferencia - P. Dupaigne L'Analyse des jus de fruits, pág. 80.-
- 6° - Richard Block, E. Durrum, Gunterzweig - A manual of paper chromatography and paper electrophoresis, 1958.-
- 7° - J. A. Gautier - Mises au Point de Chimie Analytique pure et appliquee et D'Analyses Bromatologique - Cuarta Conferencia - Juan Emilio Curtois - Quelques acquisitions récentes dans le domaine de l'analyse des glucides pág. 1 y siguientes.-

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Gordon, Martin y Singe "Biochem J" - 1944,38,224.-
- 2 - Martin e Synge "Biochem J" 1941,35,1358.-
- 3 - Müller y Cleg "Anal Chem" 1951,23,403.-
- 4 - Williams y Kirby "Science" 1948,107,481.-

- 5 - Gordon, Martin y Singe "Biochem J" 1944,38,224.-
- 6 - Williams y Kirby "Science" 1948,107,481.-
- 7 - Rutter "Nature" 1948,101,435.-
- 8 - Marschall y Mittwer "C.R.Soc.Biol" 1951,145,417.-
- 9 - Browne, Hirst y Coll "Nature" 1948,161,720.-
- 10 - Hough, Analyays of mixtures of sugar paper and cellulose column cromatography, in Glick-Methods of Biochemicals Analysis 1954 - la p.205,242.-
- 11 - Jeanes A, Wise C. S. y Dimmler R.J. "Anal.Chem" 1951, 23,415.-
- 12 - French D, Wild G.M.J.L. "Amer,Chem.Soc" 1953,76,2612.-
- 13 - Partridge S.M. "Nature" 1949,164,443.-
- 14 - Hough Jones J.K.R. y Wadman ..H. "J.Chem.Soc." 1950,1702.-
- 15 - Weygand F. y Hoffman H. "Chem.Ber." 1950,83,405.-
- 16 - J.A.Gautier - Mises au point de chimie analytique pure et appliquee et d'analyses bromatologique - Cuarta Conferencia - Juan Emilio Curtois Quelque aquisitions récents dans le domaine de l'analyse des glucides pag. 1 a 33.-
- 17 - J.A.Gautier - Mises au point de chimie analytique pure et appliquee et d'analyses bromatologique - Cuarta Conferencia - Juan Emilio Curtois Quelque aquisitions récents dans le domaine de l'analyse des glucides pag. 1 a 33.-

- 18 - J.A.Gautier - Mises au point de chimie analytique pure et appliquée et d'analyses bromatologique - Cuarta Conferencia - Juan Emilio Curtois Quelques acquisitions récentes dans le domaine de l'analyse des glucides pág. 1 a 33.-
 - 19 - Paesu F.M., Mora T.F., Kent. P.W. "Science" 1949, 110, 446.-
 - 20 - Herricks R.H. "Nature" 1949, 164, 444.-
 - 21 - Forayth W.G. "Nature" 1948, 161, 239.-
 - 22 - Trevelian, Proctor y Harrison, "Nature" 1950, 166, 444.-
 - 23 - Malpress F.H. y Morrison A.B. "Nature" 164, 963, 1949.-
 - 24 - Somogyi "J.Biol.Chem" 1945, 160, 61.-
 - 25 - Hirst E.L., Jones J.K.N. "J.Chem.Soc." 1949-1659.-
-

I N D I C E

Página

PROPOSITOS DEL PRESENTE TRABAJO.....	1
INTRODUCCION Y GENERALIDADES	2
CROMATOGRAFIA GENERAL	5
CROMATOGRAFIA DE GLUCIDOS	22
PARTE EXPERIMENTAL	37
RESUMEN	70
CONCLUSIONES	76

F O T O G R A F I A S

FOTOGRAFIA N° 1 - DESTILANDO AL VACIO	43
FOTOGRAFIA N° 2 - CUBA DE DESARROLLO	46
FOTOGRAFIA N° 3 - DESARROLLOS MULTIPLES	50
FOTOGRAFIA N° 4 - SEMBRANDO	54
FOTOGRAFIA N° 5 - ANALISIS CUALITATIVO DE MELAZA .	58
FOTOGRAFIA N° 6 - ANALISIS CUALITATIVO DE JUGO DE UVA	61

C U A D R O S

CUADRO N° 1 - VALORES R _g	52
CUADRO N° 2 - VALORACION DE LOS TESTIGOS DE MELAZA	64
CUADRO N° 3 - VALORACION DE LA MUESTRA DE MELAZA..	65
CUADRO N° 4 - VALORACION DE LOS TESTIGOS DE JUGO DE UVA	68

Página

CUADRO N° 5 - VALORACION DE LA MUESTRA DE JUGO DE UVA	69
CUADRO N° 6 - COMPOSICION CUANTITATIVA DE LA MELAZA DE CAÑA Y DEL JUGO DE UVA...	75
