

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

Aprovechamiento Químico de la Hiel de Buey

TESIS

que para su examen Profesional de Químico presenta

ARMANDO DELGADO ALVARADO

MEXICO
MCMXLV



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICAS

Aprovechamiento Químico de la Hiel de Buey

Tesis

que para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Químicas

ARMANDO IRIBARRE ALVARADO

MÉXICO
1957

Con profunda gratitud la dedico
a mis queridos padres y hermanos,

A mi querido hijo Hernan Emilio

Hago constar mi sincero agradecimiento
a mis estimados maestros de la
Escuela de C. C. Q. Q.

Al Gerente y Sub-Gerente de los "Laboratorios Rellnie, S. de R. L.",
por las facilidades que gentilmente se sirvieron prestarme
para llevar a cabo la parte práctica del presente trabajo

A mi estimado amigo Químico Antonio Peñalosa V.

APROVECHAMIENTO QUIMICO
DE LA
HIEL DE BUEY

CAPÍTULO I.—Generalidades.

CAPÍTULO II.—Propiedades Físicas y Químicas.
Reacciones de Identificación.

CAPÍTULO III.—Obtención de los principales ácidos biliares, taurina y glicocola, con fin industrial.

CAPÍTULO IV.—Conclusiones.—Bibliografía.

ALFONSO MARTÍNEZ

DE LA

CIUDAD DE

Carta I - General

Carta II - Historia y Geografía

Historia de la ciudad

Carta III - Descripción de las principales obras de arte y monumentos

Monumentos de la ciudad

Carta IV - Arte y Literatura

C A P I T U L O I

GENERALIDADES

HIEL - BILIS

CHAPTER
GENERAL
1888

HIEL - BILIS

Por hiel se entiende una mezcla de la secreción de las células hepáticas y de mucosidad, eliminada por las glándulas de los conductos biliares y de la mucosa de la vesícula biliar.

La secreción del hígado es lo que constituye propiamente la bilis, la cual es fluída y clara; la bilis que se recoge en la vesícula es más espesa, y como consecuencia de la mezcla con células, pigmentos, lecitina, mucina y otras sustancias es turbia y espesa y es lo que industrialmente se aprovecha, después de la matanza de los animales, principalmente del vacuno, para la obtención de los más diferentes productos químicos y para otros usos.

Esta bilis, pues, obtenida de la vesícula es lo que constituye propiamente la hiel. La bilis fresca obtenida de fístulas biliares es un líquido claro, unas veces bastante flúido, otras más viscoso, que aparte de glóbulos de moco, no tiene otros elementos formes. Su reacción es ligeramente alcalina, y en el hombre y en los carnívoros, es casi siempre de un color verde o pardo-amarillento; es marcadamente verde en los herbívoros.

Después de la muerte del animal, la vesícula biliar proporciona una buena cantidad de hiel, que es más concentrada que la obtenida en la fístula.

La cantidad de ésta varía de unos 100-200 cc. en el ganado adulto.

La cantidad de bilis segregada en el día es estimada diferentemente por distintos autores. En el hombre varía probablemente entre 500 y 1,000 c.c.

El color de la bilis lo da la preponderancia de alguno de los pigmentos que contiene; éstos, son, bilirrubina y la biliverdina. El primero le comunica preponderantemente un color amarillo o pardo-rojizo y el segundo una coloración verde. Como, decíamos, en la bilis de los herbívoros predomina esencialmente el segundo pigmento.

La bilis posee un olor almizclado, principalmente calentándola un poco. Este olor es predominante en casi todas las especies animales. El sabor es amargo y la reacción es alcalina. El peso específico de la bilis humana es de 1.026 a 1.032 si procede de la vesícula biliar, y de 1.011 si se ha obtenido mediante fístula.

En general la densidad varía en las distintas especies de animales, y aún en un mismo individuo presenta variaciones que dependen de la edad, salud, estación, alimentación etc. Se ha encontrado que más o menos está comprendida entre 1.008 y 1.040.

La mayor concentración de la bilis es aquella procedente de la vesícula biliar, lo cual se explica en parte, por las materias mucosas que recibe de las paredes de dicha cavidad. Sin embargo, en el cuadro siguiente, se demuestra que la pobreza en materias sólidas de la bilis obtenida por medio de fístula se debe principalmente a la escasez de sales biliares.

Esto se explica, según indicó por primera vez Schiff, si se admite que en el organismo hay normalmente una especie de circulación de bilis, desdoblándose una gran cantidad de sales biliares que pasan al intestino, siendo luego reabsorbidas y volviéndose, finalmente, a formar para ser de nuevo segregadas.

Esto evidentemente sería imposible si toda la bilis fuese lanzada al exterior mediante una fístula, encontrándose por lo mismo en la bilis extraída por canal, menor cantidad de sales biliares y por lo mismo menor densidad.

El contenido en sustancias sólidas se eleva en el hombre de 2-3%; en la bilis humana tomada de la vesícula biliar alcanza de 9-17% (Moeller y Thoms).

Composición de la bilis: (Thorpe)

	B de Fístula	B. de la Vesícula
Sales biliares.....	0.42	9.14
Colesterina, lecitina y grasa.....	0.07	1.18
Materia mucosa.....	0.17	2.98
Pigmentos	0.07	
Cenizas	0.66	0.78
Total materias sólidas.....	1.39	14.08
Agua por diferencia.....	98.61	85.92

Lebeau-Courtois da la composición promedio de diferentes bilis:

Agua	964.75	974.60
Residuo seco.....	35.25	25.40
Mucina	4.30	5.15
Sales biliares.....	18.25	9.05
Extracto etéreo:		
(Grasa, lecitina, colessterina).....	5.50	3.75
Sales (Cloruros, fosfatos).....	7.25	7.45

Se ha encontrado también que la presencia de pequeñas cantidades de mucina facilita la descomposición de la bilis; siendo, por lo tanto, las más flúidas y pobres en mucina las que se conservan más tiempo. Entre las sales minerales predominan el cloruro sódico y los fosfatos de Ca y de Fe.

Acción fisiológica.

Consideramos aquí someramente algunas de las teorías más admitidas respecto a la función fisiológica de este líquido en el metabolismo animal. Si bien dista mucho todavía de conocerse todas las funciones que cumple en el organismo.

Una de las teorías más aceptadas es la función que desempeña en los procesos digestivos, como es su intervención en la reabsorción de las grasas en el intestino.

La bilis es capaz de disolver pequeñas cantidades de grasas; los ácidos grasos libres se saponifican en el intestino, uniéndose con el catión de las sales de los ácidos biliares, dejando a éstos libres. Las grasas neutras se emulsionan fácilmente con esta mezcla de jabones y ácidos libres, siendo en estas condiciones fácilmente absorbidos por las vellosidades y membranas del intestino, para de allí transportarlas a los órganos en que se aprovechan.

Pero la acción más importante aún de la bilis, se manifiesta en el hecho de que las membranas animales empapadas con bilis dejan pasar la grasa emulsionada mucho más fácilmente que empapadas con agua pura. Así ocurre que a los perros, a los cuales se les extrae la bilis mediante una fístula experimental, sólo reabsorben el 40% de la grasa ingerida y el 60% reaparece en los excrementos; mientras que en estado normal se reabsorbe casi el 99% de la grasa administrada.

Así se explica la voracidad de los perros afectados por fístulas biliares, pues como estos animales no reabsorben la grasa de su alimentación, para mantener el equilibrio tienen que ingerir mayor cantidad de alimentos (carne e hidratos de carbono p. ej.)

Por otra parte, la falta de la bilis no perjudica en la reabsorción de las sustancias albuminoides, suministradas en forma de carne, ni tampoco a los hidratos de carbono ingeridos bajo la forma de pan, de azúcar. (Moeller y Thoms). Sin embargo, en su obra de "Organic Chemistry" II de Gilman se rechaza esta teoría anteriormente expuesta diciendo en pocas líneas que "estudios en animales privados de bilis, demuestran que la absorción de grasas se lleva a cabo aun en ausencia de bilis. Perros privados de bilis por operación quirúrgica sufren, sin embargo, de descalcificación de los huesos y desarrollan otras anomalías."

Con lo que como se ve, aun no hay claridad respecto a la función fisiológica que desempeña la bilis en el organismo animal.

Respecto a la formación de la bilis y especialmente de sus principales componentes, los ácidos biliares, se sabe que son productos de la actividad sintética del hígado.

"Aparentemente se forman en este órgano a partir de los amino-ácidos y no de las grasas, carbohidratos, o por la desintegración de esteroides (Gilman)". Es posible que una parte de la molécula se origina del amino-ácido y la otra, de alguna otra fuente" (ídem). Regulares cantidades de estos ácidos son sintetizados en el hígado; un perro, p. ej., de tamaño mediano produce más o menos 1.5 grs. diarios.

Principales sustancias de la bilis.

Anteriormente dimos algunos cuadros respecto a la composición de la bilis humana y de animales, sin entrar en detalles respecto a las sustancias encontradas. Aquí daremos una exposición corta de estas sustancias, siendo que se estudiarán su obtención en el cap. III y sus principales propiedades físicas y químicas en el cap. siguiente a éste.

Según Frerichs y Gorup-Besanez, la vesícula biliar de individuos sanos, muertos por accidente, contiene en 100 partes, por término medio:

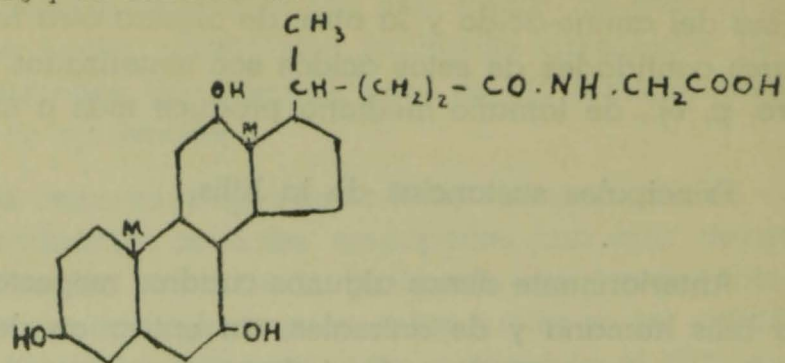
Agua	86.3
Sustancia sólida.....	13.7
Compuestos de moco y mat. colorantes.....	2.2
Glicocolato y Taurocolato sódicos.....	8.2
Colesterina, lecitina y grasa.....	2.5
Sales inorgánicas (fosfato férrico y rastros de Cu).....	0.8

Además, repetidas veces se han hallado en la bilis enzimas diastásicos y proteolíticos.

De los componentes orgánicos citados hay 2 clases de sustancias que, excepción hecha en la bilis, en circunstancias normales, no se encuentran en ninguna otra parte del organismo animal: los pigmentos y las sales biliares.

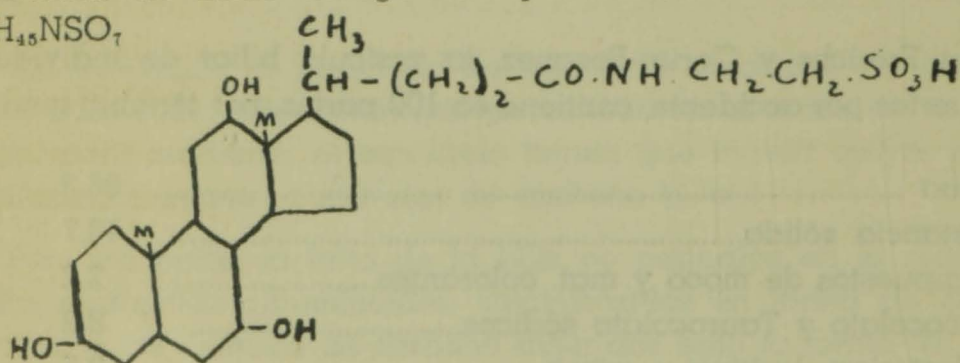
Su presencia en otras partes del organismo, dentro de límites clínicos, son casos patológicos. Siendo estas últimas sustancias exclusivas de la bilis, vamos a tratarlas:

Las sales biliares son esencialmente las sales sódicas (tratándose de los animales terrestres) o potásicas (animales marinos) de dos ácidos orgánicos, un ácido nitrogenado, que es el ácido glicocólico, cuya fórmula es $C_{26}H_{43}NO_6$ y la estructural:



ácido glicocólico

y también un ácido nitrogenado y sulfurado: el ácido taurocólico $C_{28}H_{45}NSO_7$



ácido taurocólico

Acompañados de otros dos ácidos: el ácido glicodesoxicólico y el ácido taurodesoxicólico, que derivan respectivamente de los dos ácidos precedentes.

En los diferentes grupos del reino animal se observan considerables variaciones en las sales biliares; así, por ej. en muchos peces se encuentran en la bilis, como decíamos, sales potásicas en vez de sódicas. Hay también variaciones en los mismos ácidos biliares, en el cerdo, por ej., el ácido hio-glico-cólico ocupa el lugar del ácido glicocólico ordinario; en el ganso se presenta el ácido queno-taurocólico $C_{29}H_{49}NSO_8$ en vez del ácido taurocólico común y este último es exclusivo componente de la bilis de perro.

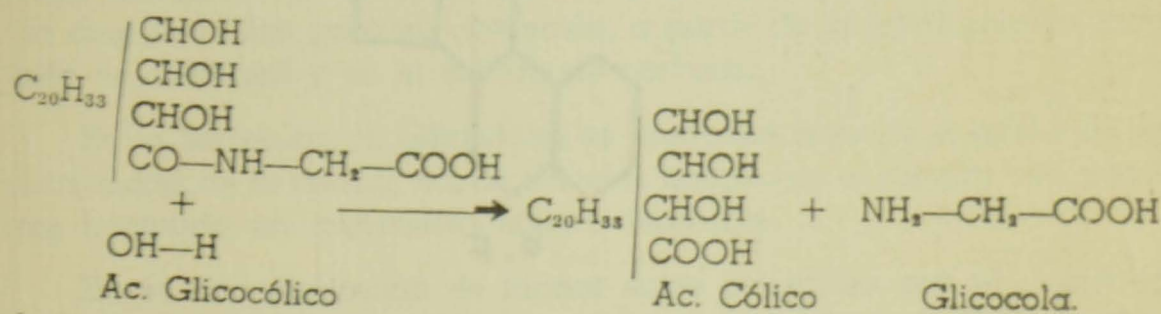
En el caso del hombre y del buey la sal más común es la sal sódica del ácido glicocólico, siendo menos abundante el taurocolato.

Los ácidos glicocólico y taurocólico son ácidos trioxi-monocarboxílicos o sea que contienen 3 radicales oxhidrídicos y un grupo ácido al final de la cadena lateral insertada al núcleo aromático. Este, como vemos, es un polinúcleo compuesto de 3 anillos ciclohexánicos y un cuarto anillo ciclopentánico, unidos entre sí por 2 carbonos comunes a cada anillo.

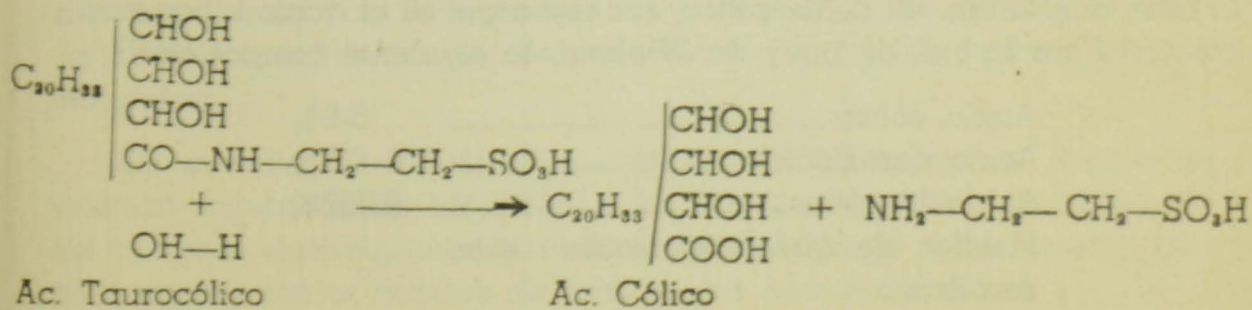
Estos se pueden considerar como compuestos derivados del ácido cólico.

Los 4 ácidos biliares (glico-y taurocólico y glico-y desoxicólico, a los que podemos agregar el ácido litocólico, pero que se presenta en pequeñísimas cantidades en la bilis humana y bovina, también en la forma de sal sódica) se designan con el nombre genérico de ácidos colálicos o colánicos y en realidad son ácidos conjugados de la glicocola y taurina (dos amino-ácidos) con el ácido cólico y desoxicólico.

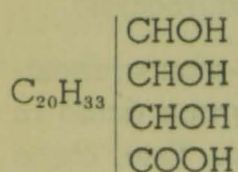
Las transformaciones hidrolíticas mediante las que se obtienen los ácidos cólico y desoxicólico a partir de esos ácidos complejos son del tipo siguiente:



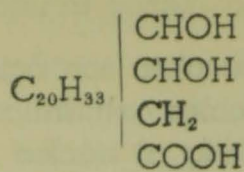
de la misma manera el ácido taurocólico:



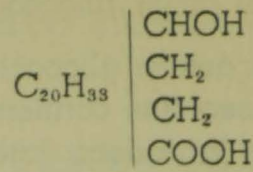
Así se obtienen los 3 ácidos principales componentes:



Ac. Cólico



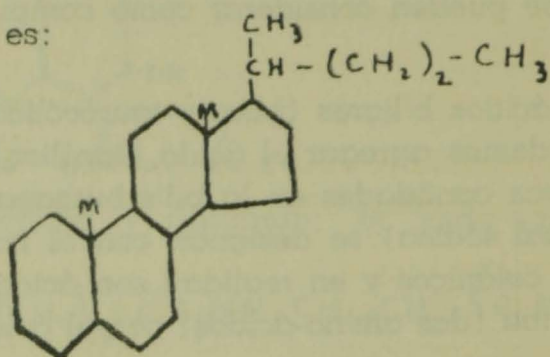
Ac. Desoxicólico



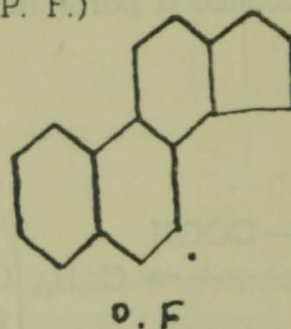
Ac. Litocólico

A su vez estos ácidos se consideran derivados del Colano, por lo que se les conoce con el nombre de "Derivados del Colano".

La fórmula del Colano es:



que es un compuesto policíclico, cuyo núcleo fundamental es el ciclo-pentano-perhidro-fenantreno (C. P. F.)



Datos cuidadosos cuantitativos en que entran los ácidos biliares en la bilis, aún faltan. El ácido cólico, sin embargo, es el ácido biliar más común. Para la hiel de buey da Wieland, la siguiente composición:

Acido cólico.....	5-6%
Acido desoxicólico.....	0.6-0.8%
Acido litocólico.....	0.002%
Huellas de quenodesoxicólico este- rocólico.	

Hager cita en su libro "Tratado de Farmacia Práctica" además, la presencia de urea y entre los fosfatos los de Ca, Mg y Fe.

En la bilis humana además, se presenta el ácido félico $C_{23}H_{40}O_4$.

En las demás especies de animales, además del ácido cólico se han encontrado los siguientes: el ácido ursocolálico (Hammarsten) de fórmula $C_{18}H_{28}O_4$ ó $C_{19}H_{30}O_4$, encontrado en la bilis del oso.

El mismo químico Hammarsten ha encontrado los ácidos α -foce-taurócólico y el β -foce-taurócólico que el autor llama ácido isocolálico, en la bilis de morsa. Ya habíamos citado los ácidos hígolicólico en la del cerdo y el queno-taurócólico en la del ganso etc.

Continuando la composición principal de la bilis, estudiaremos brevemente los pigmentos biliares: la bilirrubina y la biliverdina.

La bilirrubina tiene la fórmula $C_{16}H_{18}N_2O_3$ y en los omnívoros colorea a la bilis de amarillo a rojo-pardo; los cálculos biliares de las reses vacunas son ricos en la combinación cálcica de la bilirrubina, y se usan para obtenerla en cantidades relativamente grandes. Funciona en solución como ácido débil, es soluble en las soluciones de álcalis, insoluble en agua, en alcohol y en éter, soluble en cloroformo (lo cual se utiliza para su obtención, a partir de la bilis) soluble también en el benzol y en el sulfuro de carbono.

En la secreción, la bilirrubina se mantiene disuelta a causa de la alcalinidad de la misma; en los cálculos biliares se encuentra casi siempre formando un compuesto cálcico insoluble.

Es en esta propiedad de formar sales insolubles con el calcio en que se basa un método para su obtención a partir de la bilis, la cual diluída se trata con lechada de cal y al precipitado de bilirrubinato de calcio formado se le descompone con H Cl. diluído y se extrae con cloroformo.

De la solución clorofórmica cristaliza la bilirrubina en pequeños prismas rojo-amarillos idénticos a los cristales que se encuentran en las antiguas extravasiones sanguíneas por efecto de contusiones y que se designan con el nombre de cristales de hematoidina.

Añadiendo alcohol a la solución clorofórmica de la bilirrubina, ésta precipita bajo la forma de polvo amarillo amorfo.

Expuesta al aire, en vasijas planas, una solución alcalina de bilirrubina absorbe oxígeno, adquiriendo color verde, a causa de la transformación de la bilirrubina en biliverdina $C_{16}H_{18}N_2O_4$ materia también colorante, contenida en la bilis fresca de los herbívoros. La biliverdina es insoluble en agua, éter y cloroformo, es soluble en alcohol, al cual comunica un color verde azulado y en lejía alcalina, dando coloración verde. Hasta ahora sólo se ha obtenido amorfa.

Los pigmentos biliares han de considerarse sin duda como productos de descomposición de la hemoglobina, aunque hasta hoy no se haya conseguido aislarlos u obtenerlos artificialmente de ella. En los experimentos se ha llegado, sin embargo, a la conclusión que el pigmento de la bilis es un derivado exento de hierro, del pigmento de la sangre; es, en efecto, idéntico a la sustancia llamada hematoidina, la cual es cristalina, según acabamos de exponer. Por otra parte, a menudo se encuentra en la bilis hematoporfirina, producto de descomposición de la hemoglobina, de la cual también puede obtenerse artificialmente. Los pigmentos biliares no dan bandas de absorción con el espectroscopio y se reconocen por medio de varias reacciones coloreadas de las cuales la más conocida es la de Gmelin, que consiste en el juego de colores (verde, azul, rojo y finalmente amarillo) que se produce por la acción oxidante del ácido nítrico fumante. El producto final amarillo es la sustancia llamada coletelina: $C_{16}H_{18}N_2O_6$.

Por reducción fuera del organismo, se obtiene un producto llamado hidrobilirrubina: $C_{32}H_{40}N_4O_7$.

En el intestino se forma un compuesto semejante a éste, pero no idéntico, ya que contiene menos nitrógeno, la estercobilina, el pigmento de los excrementos; una parte de la estercobilina es absorbida y se expulsa luego por la orina, en la cual toma el nombre de urobilina.

Respecto a la mucina biliar sólo diremos que es la materia viscosa de la bilis de algunos animales, por ej. en el hombre se trata de una verdadera mucina; en el buey es una nucleoproteína.

La coleslerina o coleslerol es de los otros componentes de la bilis el más interesante, aunque normalmente se encuentra en ella en pequeñas cantidades; puede presentarse en exceso y formar las concreciones denominadas "cálculos biliares" que generalmente están más o menos teñidos de pigmentos biliares.

El coleslerol es un alcohol monoatómico no saturado que corresponde a la fórmula empírica $C_{27}H_{45}OH$.

Windaus y otros investigadores han demostrado que pertenece a la serie de compuestos terpénicos que, anteriormente, sólo se habían encontrado entre los productos de excreción de la vida vegetal.

En otro de los capítulos estudiaremos la relación que hay entre este compuesto y los ácidos biliares desde el punto de vista de constitución y la clase de compuestos intermediarios.

La lecitina es un fosfátido de la glicerina, en la cual un radical alcohol terciario, ha sido saturado con una molécula de ácido fosfórico, y los otros dos restantes pueden estar combinados con cualquiera de los tres ácidos grasos: esteárico, oléico o palmítico.

A su vez, la molécula de fosfórico forma un éster con la colina.

Las lecitinas α - y β - son los más comunes fosfátidos.

Pueden considerarse las lecitinas como grasas en las cuales un grupo de radical ácido ha sido reemplazado por un complejo del ácido fosfórico.

Por medio de la hidrólisis las lecitinas dan glicerina, una mezcla de ácidos grasos, ácido fosfórico y la base cuaternaria, la colina:

Grandes cantidades de las lecitinas se hallan en la yema de huevo, en el hígado y en el cerebro.

Como las grasas, son solubles en éter y otros disolventes orgánicos, pero insolubles en el agua. Es una masa cerosa, higroscópica, de color amarillo-café. Cuando está recién obtenida es casi blanca, pero rápidamente se altera y se pone amarilla en contacto con el aire.

Se hincha en el agua y en solución de cloruro de sodio formando una solución coloidal soluble en cerca de 12 partes de alcohol absoluto frío, en cloroformo, éter de petróleo; poco soluble en benzol.

HISTORIA DE LA INVESTIGACION ACERCA DE LA BILIS

Las primeras investigaciones acerca de la constitución de la bilis, tratan de la separación de una "resina biliar" (bile-resin) y de una sustancia denominada "picromel" (bitter-sweet) por medio del acetato neutro de plomo (Thenard, 1807; Gmelin, 1826; Berzelius, 1809-40-42).

Este último investigador obtuvo fracciones similares, una fracción ácida conocida con el nombre de "ácido colínico" (Fellinsäure y Cholinsäure), y una sustancia neutra denominada "bilin", que correspondía al "picromel".

Pero Braconnot en 1829 afirmaba lo siguiente: "Los médicos en el pasado la consideraban (a la bilis) como un jabón, lo cual encuentro correcto; sin embargo que no es la opinión de muchos químicos contemporáneos como De Fourcroy, Thenard y Berzelius."

Otros varios químicos reconocían que el "picromel" no es una sustancia neutra, sino una mezcla de ácidos cuyas sales de plomo son solubles en un exceso de acetato de sodio o de amonio. Precipitan por el acetato básico de plomo y no difieren fundamentalmente de los ácidos que componen la "resina-biliar".

Demarçay (1838) fué el primero que estableció la uniformidad de la materia sólida en la bilis, nueve décimos de la cual consiste de un jabón de sodio del ácido coléico (Choleinsäure), o como decía Liebig "ácido biliar" (Gallensäure). La naturaleza de las variadas operaciones químicas que dan por resultado el desdoblamiento de las sales biliares del aminoácido del ácido biliar, no fué claramente comprendida por Demarçay y sus contemporáneos.

El tratamiento de la bilis con ácidos minerales originaba el "ácido coloidínico" de acuerdo con Demarçay, Pelouze y Dumas (1838), más pobre en oxígeno que el "ácido cólico" y que suponían como compuesto de una mezcla impurificada de ácido cólico y desoxicólico, parcialmente combinados.

El alto contenido en azufre de la bilis fué observado por primera vez por Vogel en 1812; pero el contenido en azufre de la taurina fué pasado por alto hasta que Redtenbacher lo determinó.

El tratamiento con los álcalis originaba un ácido libre de nitrógeno llamado "ácido cólico" por Demarcay.

Puesto que Gmelin había aplicado el término de ácido cólico a un ácido nitrogenado (el glicocólico), propuso Liebig para el ácido de Demarcay el nombre de "ácido colínico" que fué después reemplazado por el "ácido colálico" un término que se abandonó a fines del siglo pasado por el original de "ácido cólico".

El aislamiento de fracciones libres de nitrógeno, fueron obtenidas por medio de procesos de putrefacción. Al químico alemán Plattner en 1845-1846 le corresponde el mérito de haber preparado por primera vez ácidos biliares en el estado cristalino, añadiendo éter a una solución alcohólica de bilis seca; un método que había sido ideado por VERDEIL.

Al producto así obtenido se le llama aún frecuentemente "bilis cristalizada de PLATTNER".

Este procedimiento se ha seguido aplicando en casi todos los países y está consignado en las Farmacopeas con distintas modificaciones.

A mediados del siglo XIX el estudio de los ácidos biliares fué dominado por dos tendencias, a saber: degradación oxidante o desintegración parcial por medio de diferentes oxidantes, lo que daba origen a un variado número de ácidos polivalentes, en adición a otros más bajos y más altos ácidos grasos, los últimos, de acuerdo con los conocimientos modernos, preexistentes en la bilis como ácidos coléicos y que después estudiaremos con más detalles.

Por otra parte, el estudio de la bilis de varias especies de animales, que es de interés en relación con el estudio comparativo del metabolismo ayudó a dilucidar el carácter químico de los ácidos biliares en muchos puntos esenciales.

Simultáneamente con el desarrollo de la anatomía comparada, las investigaciones de SCHLIEPER y otros autores condujo en poco tiempo al descubrimiento de la composición dúal de los ácidos biliares conjugados. GUNDELACH y STRECKER (este último, uno de los más ameritados investigadores en el campo químico de la bilis) reconocieron el carácter peculiar del ácido hioglicodesoxicólico o "hiocolínico" en la bilis del cerdo y Marsson encontró la especificidad del ácido "quencolínico" (tauroquenodesoxicólico) en la bilis del ganso.

Uno de los ácidos, llamado "ácido cólico" de Gmelin (ya citado) que pudo ser obtenido de la bilis cristalizada de Plattner precipitando con ácido mineral diluído, fué relativamente fácil de aislar (Strecker).

El mismo autor facilitó el conocimiento de sus propiedades al descubrir el "ácido paracólico" (que es el actual ácido paraglicocólico) que fué obtenido a partir del ácido glicocólico, por un proceso de isomerización, aún hoy no completamente dilucidado, y que dificulta la obtención del ácido glicocólico completamente puro. Ahora bien, puesto que ambos ácidos "cólico" y "paracólico" de Gmelin, eran libres de azufre, supúsose que el variable contenido en azufre del ácido biliar crudo dependía de la presencia de cantidades variables de un segundo ácido biliar que contenía azufre pero que no se podía aislar.

Los ácidos no nitrogenados, obtenidos por saponificación alcalina del ácido cólico, se llamaron "ácidos colálicos", siendo la terminación "al" para indicar el origen del tratamiento con álcalis para su obtención. Actualmente se llama también ácidos colálicos, a estos ácidos, o bien ácido cólico.

Strecker parece haber sido uno de los primeros químicos que notaron la insuficiencia de los análisis elementales cuantitativos, en los compuestos orgánicos de peso molecular elevado. Tomando en cuenta las grandes variaciones en el contenido de azufre y la inseguridad del análisis de nitrógeno en su tiempo, hizo especial hincapié en la importancia del análisis de las varias sales metálicas de los ácidos biliares; en otras palabras, en la determinación de los equivalentes ácidos.

De esa manera pudo establecer las fórmulas correctas: $C_{26}H_{43}O_6N$ y $C_{24}H_{40}O_5$, como las composiciones elementales del ácido "cólico" (de Gmelin) y del ácido "colálico" (ácido cólico) respectivamente. La diferencia entre estas dos fórmulas anteriores, aumentada con una molécula de agua nos da el compuesto $C_{26}H_{45}O_6N$ que reconoció como la fórmula de la glicina o glicocola, subsecuentemente aislada, por él mismo, de la bilis.

Reconoció también de una vez, la analogía estructural del ácido hipúrico, que había sido recientemente formulado por Dessaignes, como la benzoil-glicina (1853).

La presencia de la glicina explicaba de una vez la procedencia de amoníaco, como un producto de descomposición de la bilis. Por analogía, la taurina fué reconocida como la parte conjugada que contenía el azufre.

De acuerdo con los conocimientos recientes se sabe que la taurina no se puede obtener pura a partir de la hiel de buey.

Este ácido taurocólico se encontró bastante en el filtrado del tratamiento de acetato de plomo ("picromel") acompañado de cantidades considerables de ácido glicocólico.

Strecker reconoció la fórmula del ácido taurocólico como $C_{26}H_{45}O_7NS$ (ácido colálico + taurina — agua) que era el ácido que se denominaba "coléico".

El primer autor que usó con propiedad los nombres de ácido glicocólico y taurocólico, como se emplean hoy día, para los dos ácidos biliares conjugados componentes de la bilis, fué Lehmann (1850).

Thudichum en 1861 parece que fué el primero que reconoció claramente que la bilis de buey contenía otros ácidos biliares que difieren no solamente por los aminoácidos copulados con ellos, sino también, en el promedio de nitrógeno.

Lachinof aisló el "ácido coléico" de la bilis de buey, donde acompañaba al ácido cólico en la relación 1:10; este ácido tiene un contenido de oxígeno más bajo que el cólico, comparable al del Hiodesoxicólico.

Mylius en 1886 aisló otro ácido de la bilis de buey putrefacta y le denominó ácido desoxicólico. Mylius suponía este ácido como proveniente del ácido cólico por reducción y por eso mismo le denominó ácido desoxicólico.

Sobre la identidad de estos dos ácidos, el "ácido coléico" o "coleínico" de Lachinof y el "desoxicólico" de Mylius se suscitó una extensa polémica entre estos investigadores, a la cual se unieron luego otros químicos de su tiempo.

La relación o parentesco, entre estos dos ácidos estaba a oscuras por la incertidumbre de si el "ácido coléico" tenía igual número de carbonos que los otros ácidos biliares.

Lachinof y Lassar-Cohn, entre otros, los suponían a ambos el mismo ácido, a lo cual no acordaban las investigaciones llevadas a cabo por Mylius, Vahlen, Pregl y Hammarsten que aislaron a los ácidos, siendo el más abundante el ácido desoxicólico. Ambos ácidos dan sales de bario, que son mucho más insolubles en agua que la sal de bario del cólico y en esta propiedad se funda la separación de ambos del ácido cólico.

Para la separación de las sales de bario del ácido coleínico y del desoxicólico, no se encontró un método perfectamente comprobado y se obtiene por lo regular una mezcla de sales de bario de ambos ácidos, o bien, a los dos ácidos mezclados. Al recristalizarlos del ácido acético, resultaban idénticos y por una oxigenación moderada daban el mismo ácido dehidrocólico.

Por esta razón, los términos "ácido coléico" o "coleínico" y "ácido desoxicólico" fueron usados indistintamente durante 3 décadas, hasta que los trabajos de WIELAND-SORGE (1916) aclararon definitivamente que el "ácido coléico" era un compuesto molecular de 8 moléculas de ácido desoxicólico con una molécula de un ácido graso, una concepción que armonizaba las contradicciones aparentes.

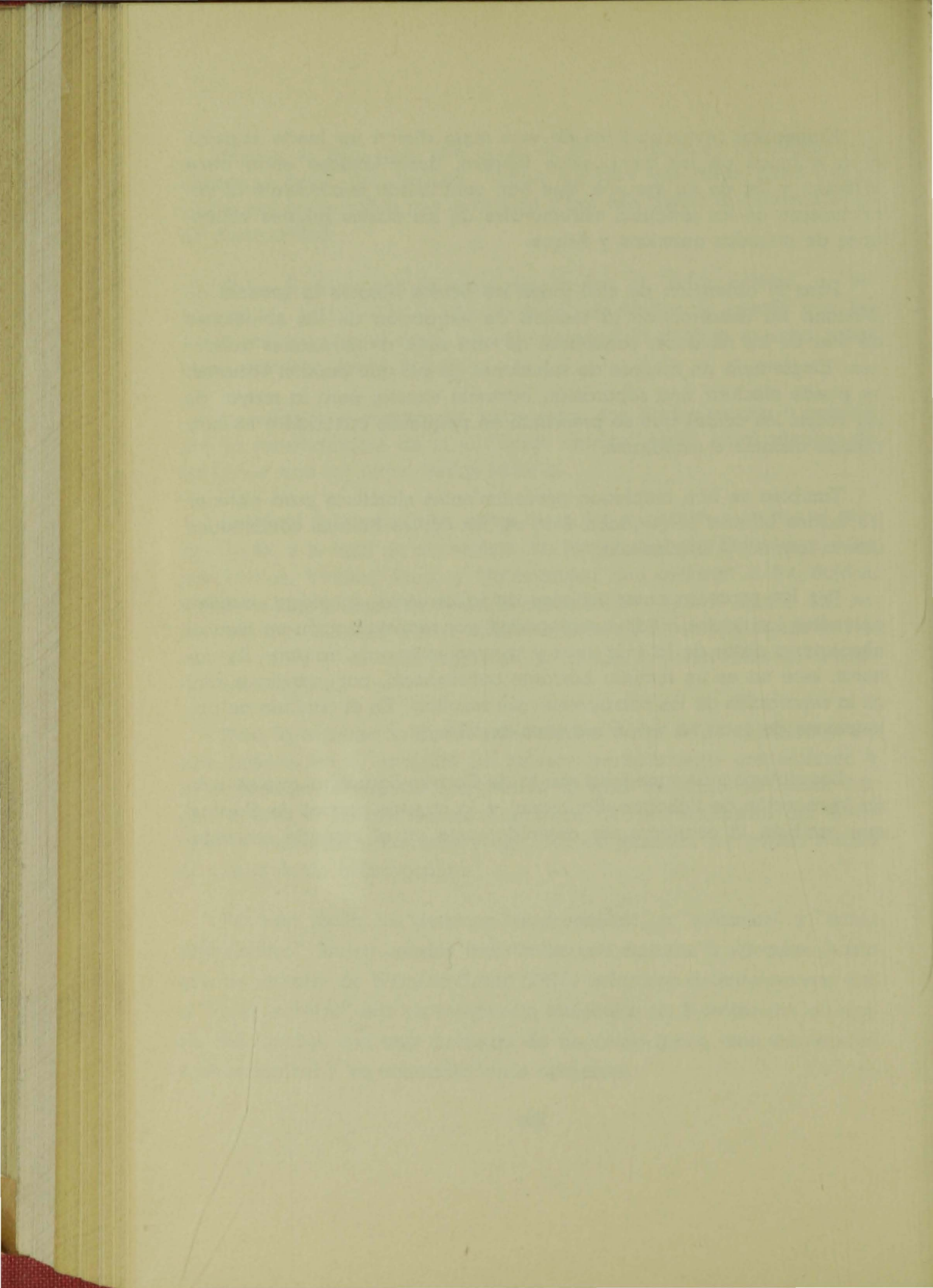
Numerosos investigadores de este siglo dieron un fuerte impulso a la química de los compuestos biliares, descollándose entre otros WIELAND y los de su escuela, que han contribuído eficazmente al conocimiento de las fórmulas estructurales de los ácidos biliares valiéndose de métodos químicos y físicos.

Para la obtención de casi todos los ácidos biliares la escuela de Wieland ha desarrollado la técnica de extracción de las soluciones de éter de los residuos, valiéndose de una serie de soluciones tampones. Empleando un número de soluciones de pH que pueden variarse, se puede efectuar una separación bastante exacta; pero la mayor de las veces, los ácidos que se presentan en pequeñas cantidades no han podido aislarse o estudiarse.

También se han empleado procedimientos sintéticos para obtener los ácidos biliares conjugados, esto es, los ácidos biliares combinados con la taurina y la glicocola.

Por los procedimientos usuales de laboratorio, en efecto, pueden obtenerse los ácidos biliares conjugados, por recristalización en alcohol absoluto, a partir de la bilis seca y convenientemente tratada. En general, este no es un método bastante satisfactorio, por cuanto es difícil la separación de los compuestos que resultan. En el capítulo de obtenciones de éstos se verán mayores detalles.

Las síntesis más conocidas son la de Cortese-Baumann, que se vale de la reacción de Schotten-Baumann; y la síntesis parcial de Curtius, que también la estudiaremos detenidamente en el capítulo segundo.



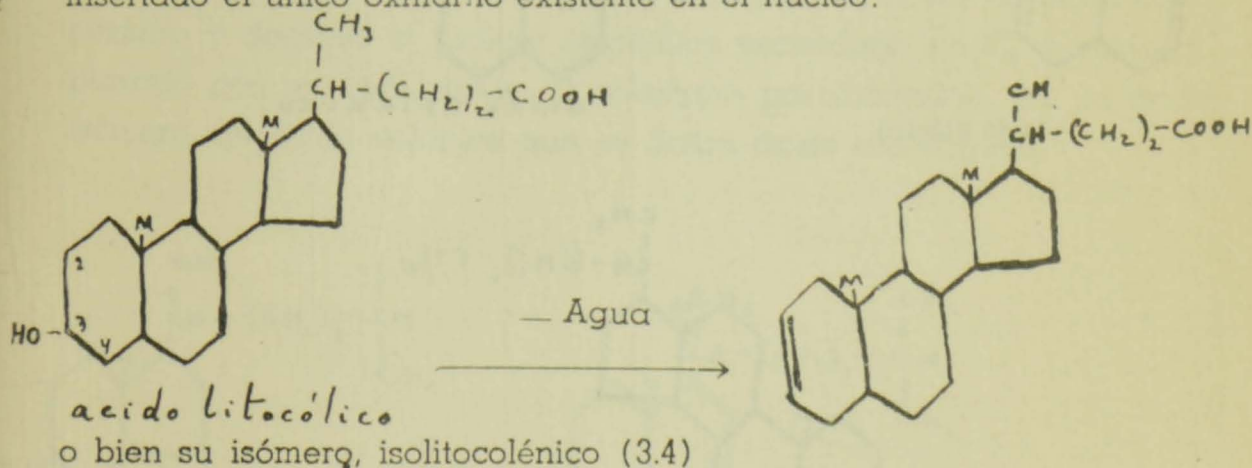
CAPITULO II
PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS
REACCIONES DE IDENTIFICACION

CONTINUED
PROCEEDINGS OF THE
COMMISSION OF ENQUIRY

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

En el capítulo I vimos someramente que los principales ácidos biliares, a saber, el litocólico, el desoxicólico y el cólico se consideran como derivados del colano.

En efecto, al calentar los ácidos biliares en el vacío pierden agua, formando ácidos no saturados. Así en el caso del ácido litocólico se forma una doble ligadura en el anillo A que es donde se encuentra insertado el único oxhidrilo existente en el núcleo:

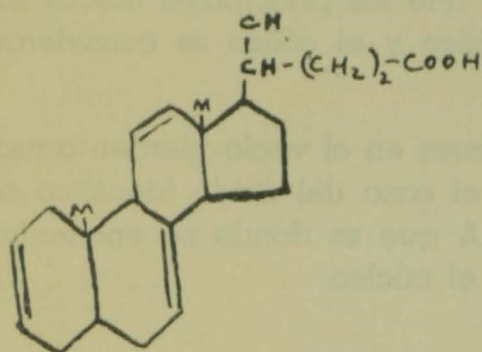


En el caso del ácido cólico se forman 3 dobles ligaduras, por tener 3 grupos oxidrúlicos, cada uno en el anillo A, B y C, en los C_3 , C_7 y C_{12} formándose un ácido triénico. Por ej.

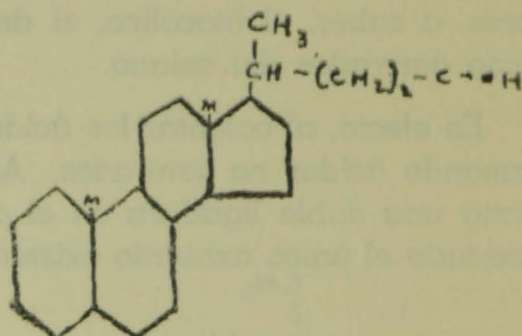
Todos estos ácidos no saturados por hidrogenación, dan un mismo ácido con 4 anillos saturados, a saber, el ácido colánico: $C_{27}H_{48}COOH$.

Si a este ácido le reducimos en el carboxilo de la cadena lateral se obtiene el colano.

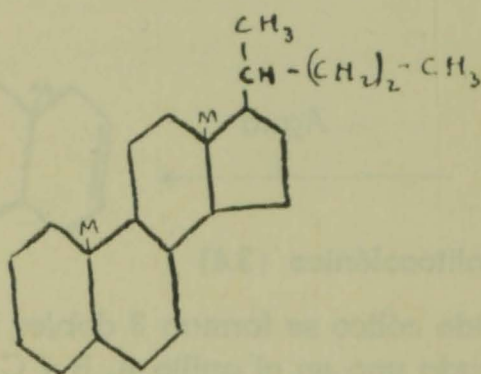
Con lo cual asentamos la relación estructural de estos compuestos.



ácido triénico



ácido colánico



colano

5

También los ácidos biliares están ligados a los derivados del colestano, entre ellos, el principal es la colesteroína o colesterol.

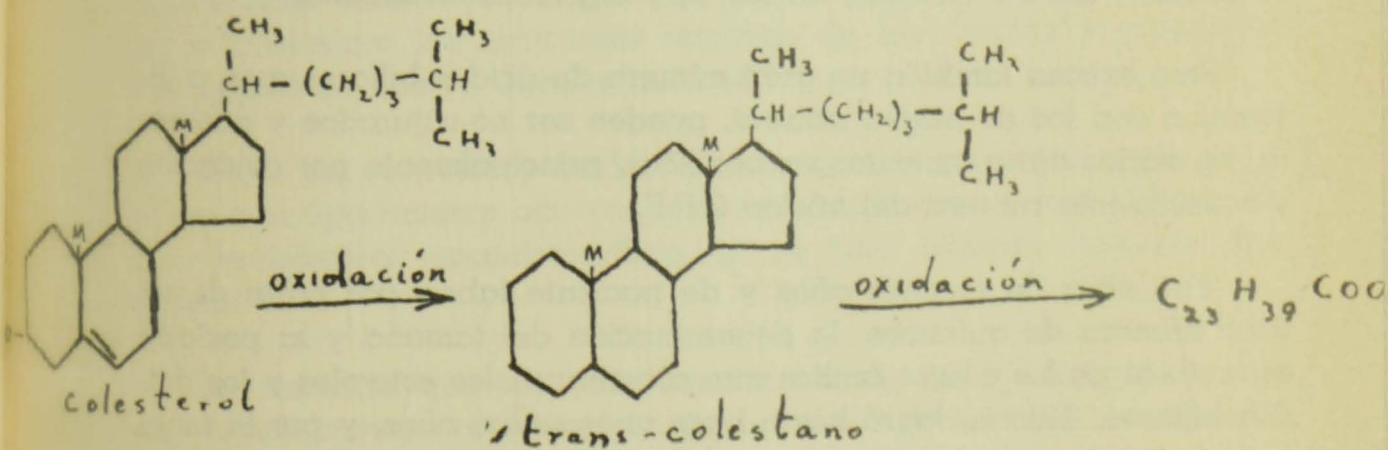
El ácido colánico puede ser obtenido por la oxidación con ácido crómico a partir del coprostanol, hidrocarburo de fórmula $C_{27}H_{48}$, que es el dimetil 10-13-2 (metil.6-heptil).17-C.P.F.

El coprostano a su vez se prepara por reducción de un esteroil que se llama Coprosterol y que se encuentra en las heces fecales. Con lo cual se demuestra el parentesco existente entre los ácidos biliares y el extenso grupo de los esteroides.

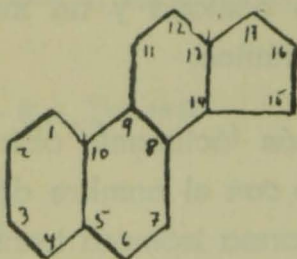
En la oxidación del coprostano efectuada con ácido crómico se elimina el grupo isopropilo como acetona y un metileno se oxida a carboxilo, formándose el ácido colánico.

A su vez, el hidrocarburo más fácilmente obtenible a partir del colesterol por reducción se conoce con el nombre de colestano, el cual es isómero del coprostano, es la forma isómera trans-.

En la reducción del colesterol se hidrogena la doble ligadura C₅-C₆ primero y después el radical alcohólico secundario en C₃ y es reemplazado por un Hidrógeno. El colestano por oxidación da un ácido isómero del ácido colánico que se llama ácido alocolánico.



También vimos en el cap. I que el núcleo fundamental de los ácidos biliares es el ciclopentano-perhidrofenantreno. El cual núcleo constituye la base de la nomenclatura de todos estos compuestos, los esteroides, los ácidos biliares y las hormonas, y las vitaminas D y a su vez las interrelaciones químicas de parentesco.



Los ácidos biliares además de asemejarse a los esteroides por el núcleo fundamental, se relacionan además por los siguientes caracteres: poseen igualmente grupos metílicos en los carbonos 10 y 13, una cadena lateral en el C₁₇ y en el C₃ un radical oxidrónico. A diferencia con el colesterol, el cual lleva una doble ligadura, el ácido cólico es saturado y lleva 2 OH más en los C₇ y C₁₂ respectivamente.

Pero existen también un gran número de ácidos biliares que, a diferencia con los de origen natural, pueden ser no-saturados y además tienen varios agrupamientos carboxílicos, principalmente por oxidación y consiguiente ruptura del núcleo C.P.F.

Fué obra de muchos años y de paciente labor, por parte de un gran número de químicos, la determinación del tamaño y la posición estructural de los cuatro anillos que constituyen los esteroides y los ácidos biliares. Esto se logró hasta hace unos pocos años, y por lo tanto la química de estos compuestos es, en gran parte, recientísima.

Es muy interesante hacer notar que la dimensión de la molécula, en los cristales de algunos esteroides y derivados, efectuada en el año 1932, por medio de rayos X, hizo necesaria la corrección de la disposición de los anillos que hasta entonces se usaba.

La disposición de los mismos correspondía con los de una molécula que contenía un polianillo fenantrénico hidrogenado o saturado, al cual se fusionaba un anillo pentagonal adicional.

En los subsiguientes años se comprobó esta disposición para todos los esteroides.

Nomenclatura

Anteriormente hemos visto algunos casos de isomería, que bien puede ser isomería de lugar o también estereoisomería. La presencia de compuestos isómeros y aun la denominación de los diferentes ácidos biliares y sus derivados hace forzosa la nomenclatura para estos compuestos.

La isomería cis-trans del coprostanol y del colestanol y la del ácido colánico y el alicolánico nos presenta ambos casos de isomería.

El número de los posibles estereoisómeros es muy grande. Por medio de transformaciones apropiadas, ha sido posible de asignar configuraciones estereoquímicas a los grupos oxhidrúlicos en los esteroides y determinar las posiciones relativas de los átomos y grupos en los lugares en que se unen a los anillos.

Todos los esteroides y ácidos biliares que se presentan en la naturaleza son ópticamente activos, pero en ningún caso se ha hallado un par de isómeros enantiomórficos, ni se han logrado preparar por síntesis.

Los nombres que son comunmente usuales para los ácidos biliares, frecuentemente contienen un prefijo que indica la procedencia del ácido.

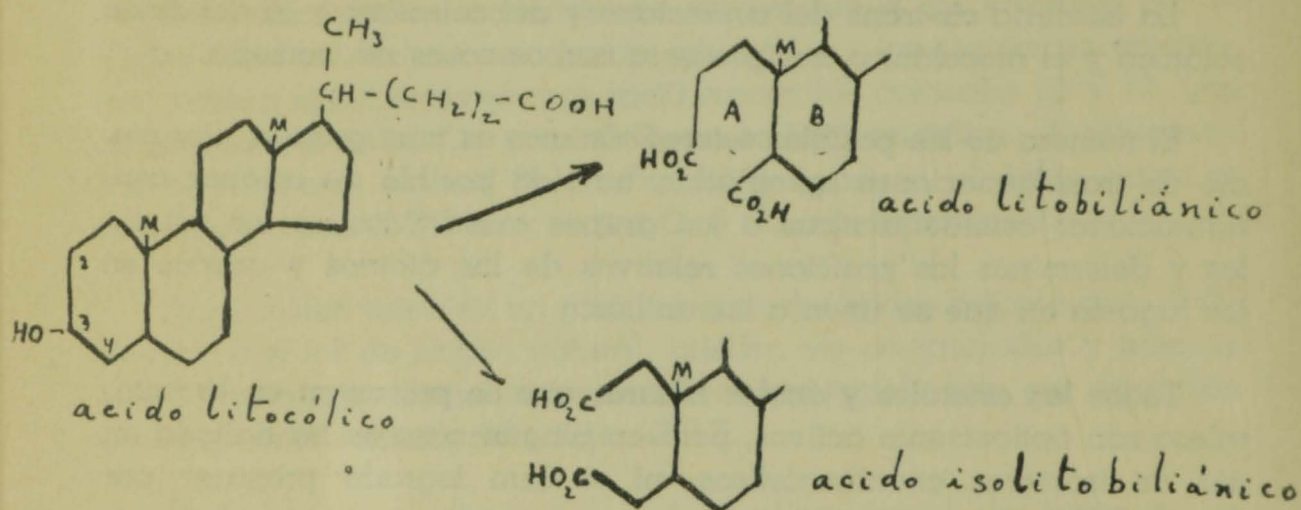
Sistemáticamente los ácidos se designan como derivados del ácido colánico o sus estereoisómeros alicolánicos; pero no se ha desarrollado ningún sistema para los productos de degradación formados por oxidación.

Estos últimos compuestos deben ser nombrados por aquellas denominaciones que se les aplicaron cuando no estaban totalmente dilucidadas las composiciones. Sin embargo, se siguen ciertas reglas:

Los ácidos tricarbónicos o cetocarboxílicos formados por la ruptura del anillo A entre los C₃ y C₄ son conocidos con el nombre de ácidos BILIANICOS.

Los distintos ácidos biliánicos se diferencian por medio de un prefijo describiendo el compuesto de parentesco. Así el ácido litocólico da el ácido LITOBILIANICO.

Aquí expondremos la reacción que consiste en tratar el ácido litocólico con ácido nítrico, oxidándolo y ocasionando la ruptura del anillo A entre los C₃-C₄, que es donde se inserta el radical OH, dando lugar a dos ácidos litobiliánicos isómeros, que se diferencian en que se verifica la ruptura de la unión de uno de los dos carbonos vecinos al que está la inserción oxidrífica:

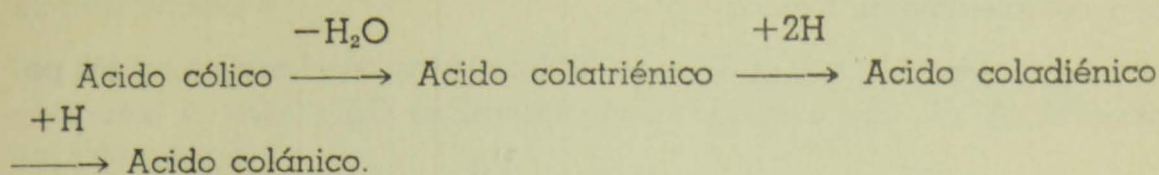


La ruptura del anillo A entre los C₂-C₃, forma los ácidos Isobiliánicos.

El ácido Tilobiliánico es el nombre que se aplica a los ácidos tricarbónicos obtenido por la ruptura sucesiva, por medio de oxidación, del anillo B.

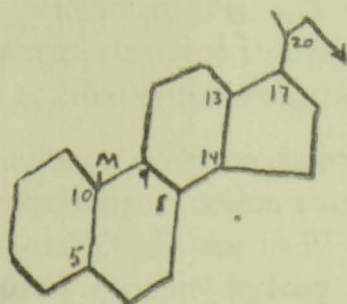
Los ácidos Etiobiliánicos se forman por la ruptura del anillo D, después de que la cadena lateral alifática, insertada en el C₁₇ ha sido eliminada.

En general en la nomenclatura conforme a Wieland, se toman como base de designación los ácidos siguientes:



Se designan con el nombre de epi- a aquellos ácidos biliares que tienen el OH en el C₃ en posición TRANS con relación al CH₃ insertado en C₁₀.

Una ojeada en la fórmula del ácido colánico o del colestano nos revela la presencia de 8 átomos de carbono asimétricos, a saber: C₅ y C₁₀, C₈ y C₉, C₁₃ y C₁₄, C₁₇ y C₂₀ - los cuales dan la existencia de 256 esteroisómeros del ácido colánico y los correspondientes colestanos:



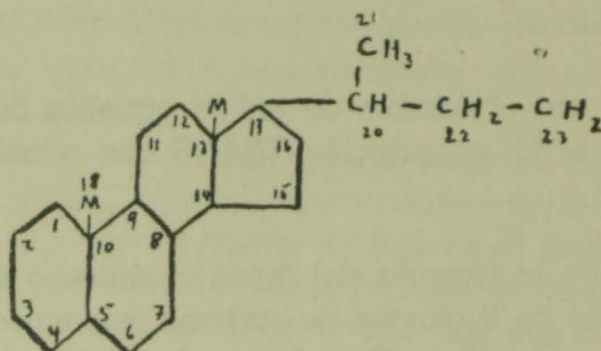
PROPIEDADES QUIMICAS

La naturaleza se vale de varios procedimientos para hacer solubles en agua compuestos hidroaromáticos policíclicos, de tal modo que pueden ser llevados de los órganos en que se sintetizan, a aquellos en que se ejecuta una función específica y de allí reintegrados a sus lugares de almacenamiento.

Los ácidos biliares naturales el cólico, desoxicólico, queno-y hio-desoxicólico y otros diferentes ácidos están por lo regular acoplados por medio de una unión péptida a los amino-ácidos glicina y taurina, formando compuestos solubles.

La misma combinación con la taurina y glicocola parece ser un proceso de disminuir la toxicidad, puesto que los ácidos biliares libres son completamente tóxicos.

Los ácidos biliares pueden ser hidroxilados en el núcleo en las posiciones C_3 ; C_7 , C_{12} , o en la cadena lateral en C_{25} .

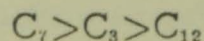


En los ácidos biliares de procedencia natural el C_{3-OH} es trans- con respecto al $\text{CH}_3(\text{M})$ del C_{10} ; por lo mismo, estos ácidos pueden relacionarse con la isomería epicoprosterol, la cual isomería es comprobable por medio de complicados experimentos bioquímicos.

De los trabajos de Lettré se saca en conclusión que la posición espacial de $C_7\text{-OH}$ en los ácidos cólico y quenodesoxicólico es trans- con respecto al grupo $C_{10}\text{-CH}_3$. El grupo $C_{12}\text{-OH}$ que se presenta en varios de los ácidos biliares, está probablemente en una posición trans- con respecto al grupo adjunto $C_{13}\text{-CH}_3$.

Hay una acentuada diferenciación en lo que respecta a la reactividad de los diferentes grupos OH.

Basándose en la facilidad de la esterificación y deshidrogenación, se hace la siguiente escala de reactividad de los OH de los siguientes carbonos, por orden decreciente:



Un grupo OH en el C_6 es más activo que uno en C_3 .

La desacetilación de los compuestos acetílicos se verifica más fácilmente en C_3 que en C_7 . Diferencias semejantes en la reactividad se presentan en los ácidos cetobiliares o dehidrobiliares en general.

La hidrogenación catalítica de los grupos carbonílicos se verifica más fácilmente en C_3 , con los en C_6 y C_7 carbonilos, como intermedios en reactividad, y el más difícil en el C_{12} .

Con la reducción de Clemmensen solo en el C_3 carbonilo puede realizarse la reducción. Así es que el orden de actividad en hidrogenaciones empieza con $C_3 > C_7 > C_{12}$.

El sabor característico amargo de la bilis es debido a los ácidos biliares. Este sabor es una función del grado de hidroxilación, pues los mono- y dihidroxiácidos son insípidos.

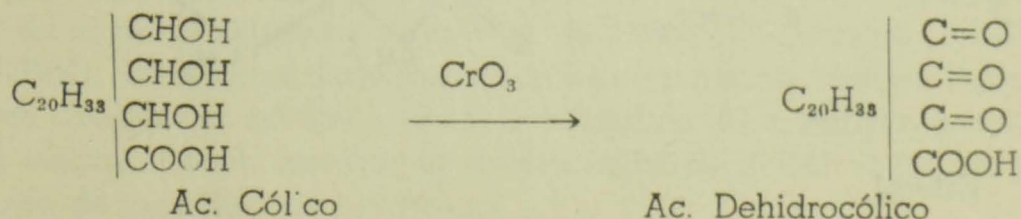
La copulación con glicina o taurina modifica el sabor considerablemente produciendo en algunos casos un sabor inicial dulce que es luego reemplazado por el amargo. Cuando los ácidos biliares se calientan en el vacío se verifica una deshidratación, produciéndose un ácido no-saturado.

Por métodos más fuertes de deshidratación se forman anhídridos y conduce a la polimerización de los ácidos biliares, formándose unas masas amorfas insolubles conocidas con el nombre de "dislisinas" (dyslysins).

Estudiaremos brevemente las reacciones características de los principales agentes oxidantes y reductores

AGENTES DE OXIDACION

Los agentes de oxidación constituyen los más importantes reactivos para la exploración del esqueleto carbónico de los ácidos biliares. El trióxido de cromo CrO_3 en solución acética o sulfúrica, es el más específico oxidante para las transformaciones del OH alcohólico secundario en grupos cetónicos, cuando se trabaja a bajas temperaturas. El ejemplo clásico de la deshidrogenación del ácido cólico a un tri-cetoácido llamado ácido dehidrocólico (Hammarsten 1881) es el siguiente:



Los productos de la reacción con los otros ácidos son también llamados dehidroácidos, a saber: dehidrodesoxicólico, dehidrolitocólico etc.

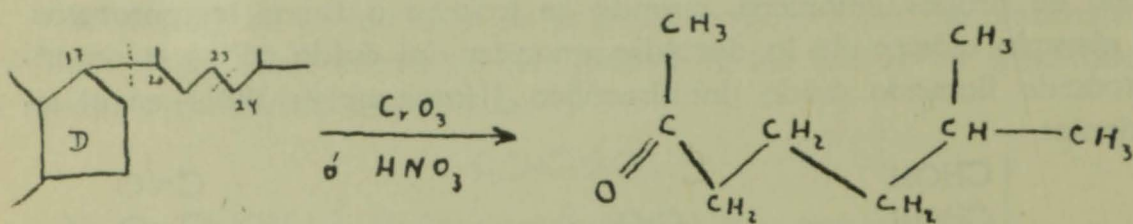
Sus derivados funcionales nitrogenados como oximas, semicarbazonas e hidrazonas, son sumamente útiles para la determinación definitiva de estos ácidos. Estos cetoácidos son las sustancias intermedias indispensables en los procesos de sustitución de grupos alcohólicos secundarios por grupos metilénicos

El CrO_3 , el HNO_3 y el Br_2 rompen el grupo- $\text{CH}_2\text{-CO}$ en -COOH //COOH- algunas veces por intermedio de las dicetonas -CO-CO- , las cuales han sido aisladas y obtenidas en casos raros.

El CrO_3 se usa a menudo seguido de la adición de O , a una doble ligadura para obtener el máximo estado posible de oxidación.

El anillo D que lleva la cadena lateral alifática insertada en el C_{17} , es el último expuesto al ataque de oxidantes; puesto que en los ácidos biliares y en los esteroides nunca contiene un grupo oxhidrílico. Así es que en los procesos oxidantes se romperán dos o tres anillos que llevan OH pero el anillo D quedará intacto.

El CrO_3 se usa para la degradación oxidante de la cadena lateral resultando la formación del ácido hidroxi-isobutírico:

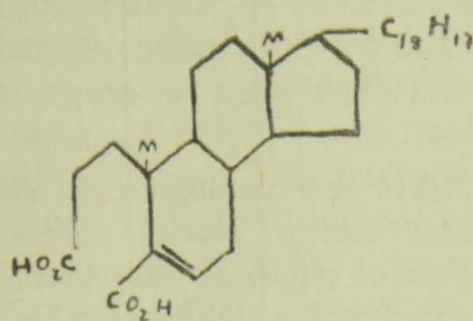


Esterol

El CuO se usa algunas veces en vez del CrO₃ cuando se trata de obtener una acción menos fuerte.

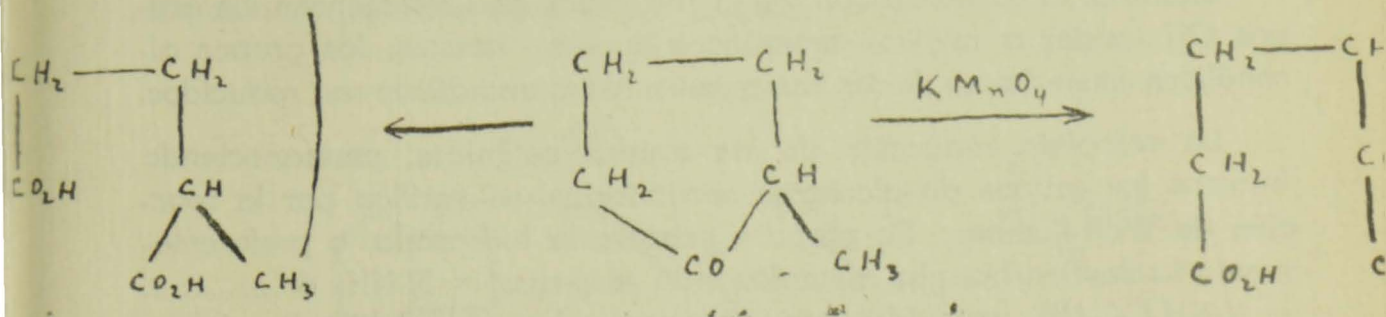
La acción del Br₂ sobre los grupos OH es específica: en el caso del ácido cólico el Bromo rompe el anillo A entre los átomos C₃-C₄, oxida el grupo OH menos expuesto del C₁₂ a un -COOH; pero deja el OH en C₇ intacto.

El uso del hipobromito de potasio sobre el colesterol forma el ácido de Diels:



Acido de Diels

El KMnO₄ difiere de los otros agentes de oxidación por su acción sobre los grupos -CO. Desune un grupo carbonílico de un carbón terciario, de un secundario vecino. Como ejemplo tenemos la alfa-metilciclopentanona:



Acido Metilpimélico alfa-metilciclopentanona delta-ácido cetocaproico que da el delta-cetocaproico, en vez del ácido metilpimélico. Mientras el KMnO₄ ha sido el oxidante tradicional para las dobles ligaduras en los compuestos alifáticos desde los tiempos de v. Baeyer; el método más elegante para efectuar la introducción de 2 OH vecinales es el empleo de peróxido de hidrógeno.

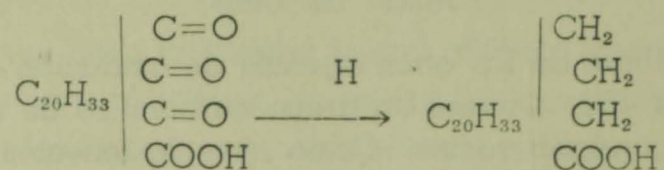
El tetraacetato de Pb es un oxidante específico para la formación de glicoles.

El ácido nítrico sobre los ácidos biliares verifica la ruptura de 2 ó 3 anillos A, B, C; sin embargo, como esta reacción no es específica sobre un determinado anillo, no es usual.

La reducción de los grupos cetónicos a CH-OH y α -CH₂- puede verificarse por distintos métodos.

Dos son los métodos más específicos para la completa reducción de los cetogrupos: el de Clemmensen y el de KISHNER-WOLF-. Ninguno de los dos afectan las dobles ligaduras coexistentes con el grupo cetónico; y el segundo método deja los grupos alcohólicos secundarios intactos.

Clemmensen en 1913-1914 usó amalgama de zinc en la presencia de ácido clorhídrico, en ácido acético glacial, para la reducción de los grupos cetónicos en compuestos alifáticos, hidroaromáticos, aromáticos, etc. por ej., el ácido dehidrocólico se reduce a ácido colánico:



Mientras de acuerdo con las experiencias de Clemmensen los grupos OH unidos a núcleos aromáticos quedan intactos, los grupos alcohólicos secundarios de los compuestos hidroaromáticos son reducidos.

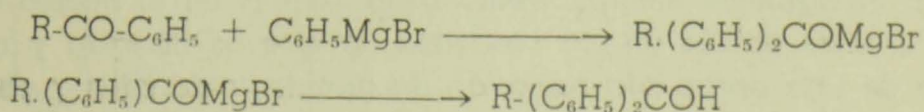
La completa reducción de los grupos cetónicos, permaneciendo intactos los grupos de alcoholes secundarios, se verifica por la reacción de Wolf-Kishner: Se prepara primero la hidrazona, o preferentemente la semicarbazona reemplazando el grupo = N-NH₂ ó = N-NH-CO-NH₂, por hidrógeno. Tampoco afecta las dobles ligaduras.

Numerosos reactivos actúan menos enérgicamente sobre los grupos cetónicos, reduciéndolos solamente al estado de grupos alcohólicos secundarios. El sodio, la amalgama de sodio, el zinc, el aluminio, etc., actúan sobre alcoholes o aun en medio alcalino para originar hidrógeno nascente.

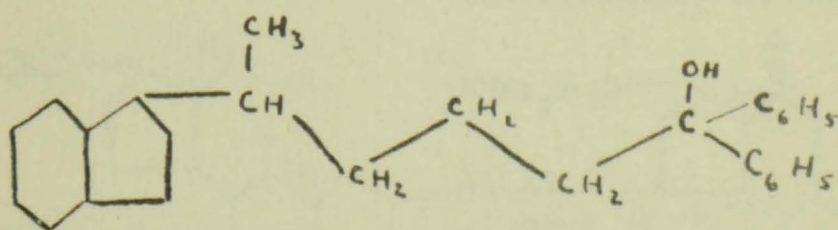
El punto de ebullición del solvente determinado fija la temperatura a la cual se efectúa la reacción. La naturaleza del metal empleado y también la acidez o el pH del medio influyen la especificidad de la reacción.

Similares consideraciones se aplican a métodos de hidrogenación catalítica usando níquel, paladio y varias formas de platino, entre los cuales el catalizador de platino de Willstaetter y el óxido de platino de Adams son de máxima importancia. Ellos permiten en muchos casos, que la hidrogenación se haga a una temperatura normal y presión normal que no sería posible con otros catalizadores.

Una sucesión de reacciones Grignard, probaron ser un medio muy valioso en la destrucción gradual de la cadena alifática lateral de los ácidos biliares, la cual fué estudiada en gran detalle por Wieland y sus colaboradores en el caso del ácido colánico. El éster etílico de este ácido se convierte por tratamiento con el reactivo de Grignard apropiado, en el difenilo-, el dimetilo- o el diisopropilcarbinol-:

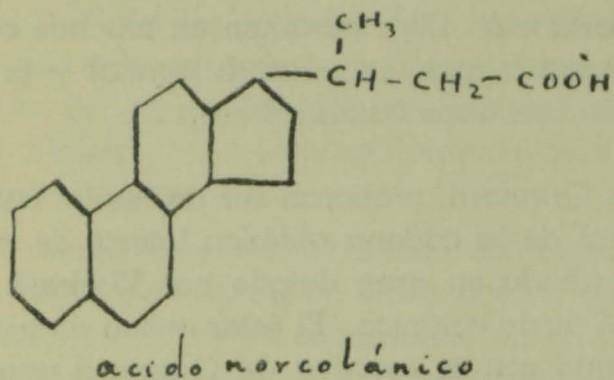
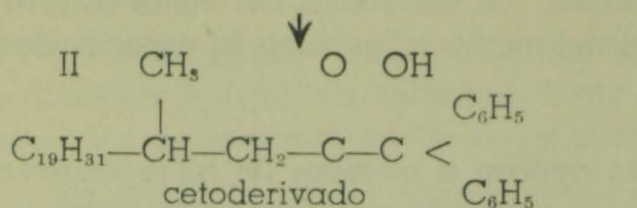
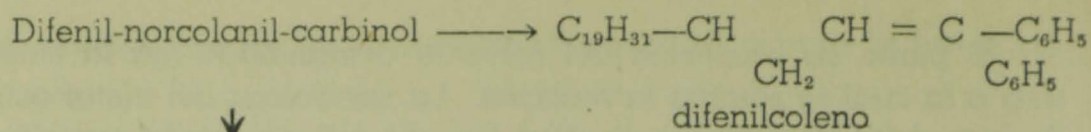


(R=colanil). Sustituyendo en R tenemos:



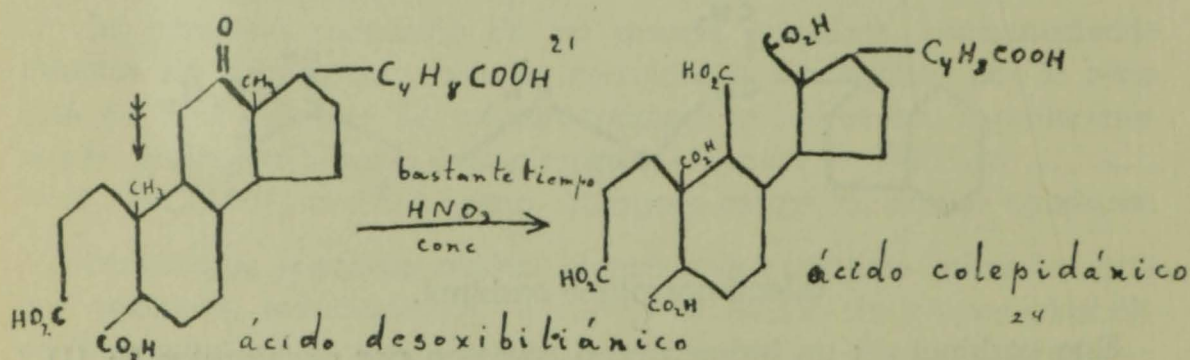
difenil-norcolanil-carbinol.

Este carbinol da un hidrocarburo olefínico por deshidratación (I) y un cetoderivado por oxidación (II). Ambos derivados pueden ser oxidados con CrO_3 al ácido norcolánico (III):



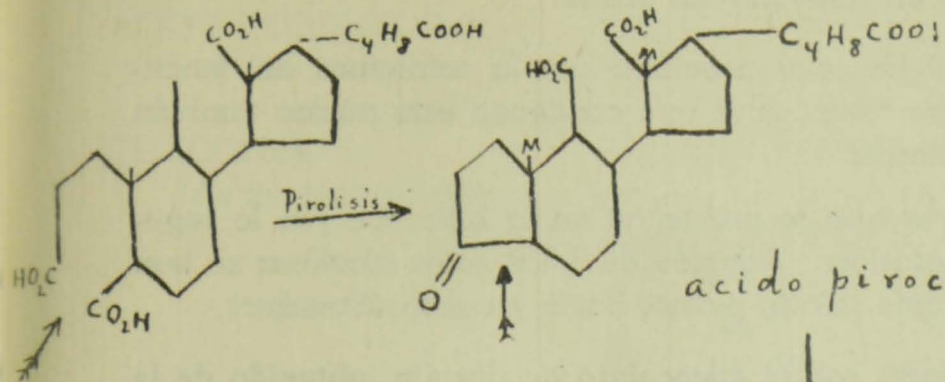
En el siguiente ejemplo vemos que los OH en el núcleo debilitan los diferentes anillos en los carbonos en que se insertan y que, por medio de una apropiada selección de agentes oxidantes y pirólisis se puede efectuar la desintegración del núcleo, paso a paso.

El óxido crómico en frío efectúa el cambio de los grupos OH en grupos cetónicos, los cuales, por tratamiento con HNO_3 concentrado y con el $KMnO_4$ rompen el anillo:



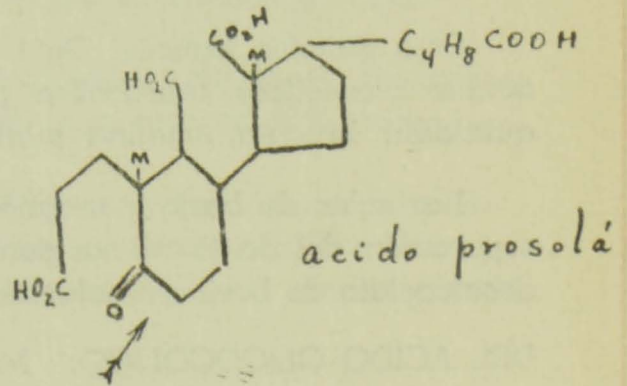
Las reacciones continúan a la vuelta:

\downarrow HNO_3
conc.



acido pirocoloidánico

\downarrow KMnO_4

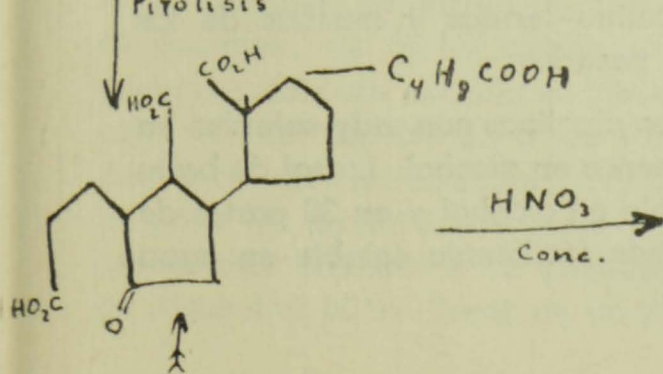


acido prosolá

\leftarrow HNO_3
conc.

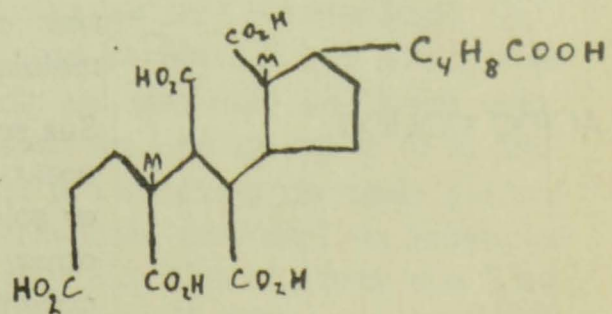
acido solanético

\downarrow Pirólisis



acido pirosofanético

\rightarrow HNO_3
conc.



acido biloidánico

SALES DE LOS ACIDOS BILIARES

Las sales solubles de los ácidos biliares abaten la tensión superficial del agua hasta un determinado grado.

Esta propiedad debe estar asociada con la estructura del fenantreno, puesto que otros compuestos que contienen este núcleo también tienen la misma propiedad.

Estas sales biliares que se presentan en la bilis, son por lo regular sales sódicas o potásicas. Además de estas sales alcalinas se han preparado las de amonio, plata, plomo, bario y calcio (Strecker).

Otras sales biliares son el glicocolato de uranilo, obtenido de la sal férrica tratándola con nitrato de uranilo, en solución de ácido acético.

Además se han preparado sales alcaloideas de los ácidos biliares, ya conocidas por BRACONNOT.

Otro químico francés: De L'Arbre, obtuvo sales insolubles de los ácidos glicocólicos, taurocólico y glico-hio-desoxicólico con estricnina, quinidina, brucina, emetina, morfina, nicotina, etc.

Las sales de bario y magnesio del desoxicólico, se usan para su separación del ácido cólico, pero el colato de bario arrastra algo de desoxicolato de bario en solución (Pregl).

DEL ACIDO GLICOCOLICO: Muy solubles en agua las sales alcalino-térreas; insolubles las de metales pesados: Fe . . . Pb . .

DEL ACIDO TAUROCOLICO: Son solubles en agua las sales alcalinas, alcalino--térreas y muchas de los metales pesados.

ACIDO COLICO: Sus sales alcalinas son muy solubles en agua, menos en alcohol. La sal de bario es soluble en alcohol y en 30 partes de agua; más fácilmente soluble en agua caliente.

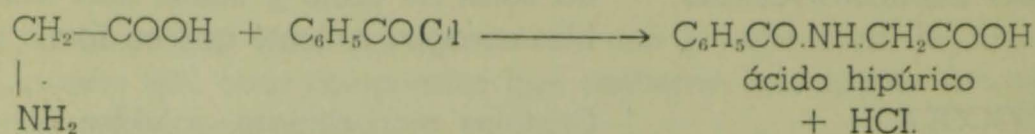
ACIDO DESOXICOLICO:	La sal de bario es muy poco soluble en agua, más soluble en alcohol.
ACIDO DEHIDROCOLICO:	Da sales de bario y calcio más insoluble en agua caliente que en fría.
GLICOCOLA (Acido amino-acético):	Cristales monoclinicos, solubles en 4.3 partes de agua fría. Poco soluble en alcohol absoluto y en éter. Inodora. Sabor del polvo: claramente dulce. Se precipita de una solución alcohólica de $C_2H_5O_2N-HCl$ introduciendo una corriente de NH_3 como un compuesto $2C_2H_5O_2N. HCl$ P.M. 75.05 Constituyentes: Acido acético = 79.99%; N = 18.66%. Primeramente aislado de la gelatina por Braconnot en 1820.

Preparado sintéticamente por la combinación del ácido monoclo-roacético y el NH_3 . El ácido amno-acético comercial es 99% puro.

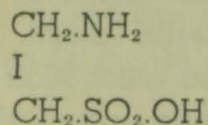
El P.E. = 1.16 — P.F. cerca de 260° descomponiéndose, poniéndose café cerca de $230^\circ C$.- 1 gr. se disuelve en cerca de 1000 cc. de alcohol. Las soluciones acuosas son escasamente ácidas con el papel tornasol.

Pruebas: a) Desprende Nitrógeno tratado con HNO_2 b) Hirviendo una solución de 0.2 grs. de la sustancia en 1cc. de agua más o menos 1 minuto con poco polvo de CuO , filtrando la solución azul oscura en caliente, formación de agujas celestes de Cu-aminoácido. H_2O al enfriarse: c) Si se añade una gota de fenol a una solución de glicina y después hipoclorito de sodio se desarrolla un bonito color azul. d) Se disuelve 0.1 g. de sustancia en 1 cc. de agua; se le añaden 3 cc. de una solución alcohólica fría saturada de ácido pícrico; después de agitar fuertemente (y solamente entonces) se forma un precipitado abundante de cristales amarillos. Filtrar, lavar con 2 cc. de alcohol al 50%. Secar en un plato poroso 15 minutos a los $100^\circ C$.

Los picratos resultantes ennegrecen y descomponen con efervescencia a los 198-201°C. e) Obtención del ácido hipúrico por reacción de la glicina con el cloruro de benzoílo:



Taurina (Acido amino-etano-sulfónico o aminoetiónico)



Prismas monoclínicos de 4-6 caras (cristalizado de alcohol al 50%). Color blanco o blanco amarillento o polvo cristalizado.

Funde arriba de los 240°C y se descompone cerca de los 300°C.

Soluble a 12° en 15.5 partes de agua. Insoluble en alcohol absoluto y éter. Reacciona neutro. En solución alcalina es más soluble en agua o en alcohol. Sus soluciones no precipitan con sales de metales pesados.

Prueba: a) Después de fundirlo con alcali y nitrato (o sea oxidándole) da su solución una reacción abundante del ion SO_4'' . b) Se hierve la solución con óxido mercuríco recién precipitado, se forma un polvo, muy poco soluble en agua caliente. c) Con fenol (pocos cristales) y HCl agitar y calentar un poco \longrightarrow coloración azul!

COMPUESTOS MOLECULARES

La propiedad de formar compuestos moleculares es muy acentuada en los ácidos biliares, y como comunmente se obtienen, cristalizan con una molécula de solvente de cristalización.

Uno de los pocos compuestos monomoleculares es el compuesto azul, formado cuando se mezclan una solución alcohólica de ácido cólico con una solución de yodo en yoduro de potasio, en las proporciones debidas $\longrightarrow (\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{I})_4 \cdot \text{KI.H}_2\text{O}$.

Con una gran variedad de sustancias el ácido desoxicólico forma una serie de compuestos moleculares, solubles en agua, que se conocen con el nombre colectivo de "ácidos coleicos".

Los compuestos formados con los ácidos grasos fueron los primeros que se conocieron.

Con peso molecular creciente, la proporción molecular de la relación Acido biliar: Acido graso pasa de 1:1 con el ácido acético, a 8:1 con el ácido esteárico.

Como la formación de estos compuestos de los "ácidos coleicos" es debida a valencias de coordinación, los compuestos son convenientemente descritos por un número de coordinación que expresa el número de moléculas de ácido desoxicólico combinado con una molécula de una segunda sustancia.

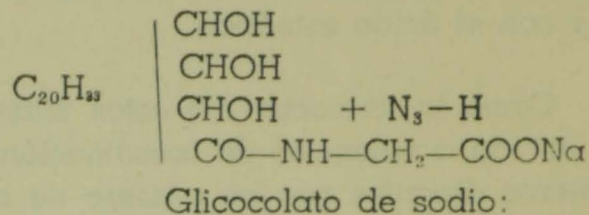
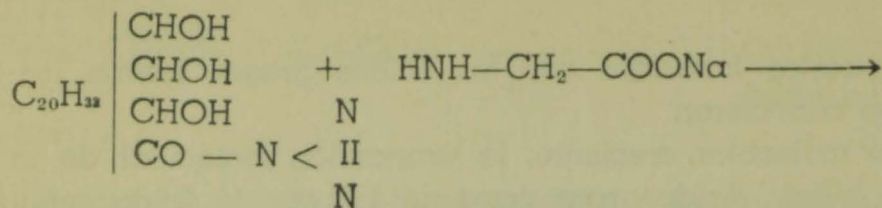
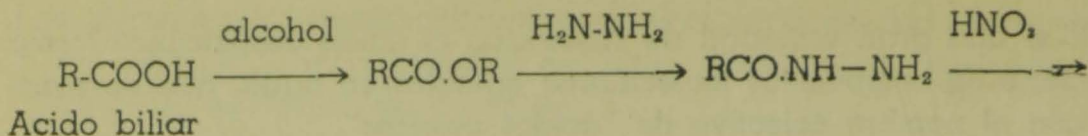
Los ácidos coleínicos o coleicos son sustancias muy estables y entre ellos no solamente se encuentran los productos de adición de los ácidos grasos ya citados sino otros que se forman por adición de fenoles, hidrocarburos, cetonas, estricnina, quinina, etc.

SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS BILIARES COPULADOS

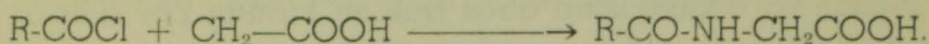
La síntesis de los ácidos biliares copulados no puede ser realizada por la condensación directa de los constituyentes.

El ácido cólico más la glicina, cuando se calientan juntas, a los 190-200°C durante 12-24 horas, originan un producto que contiene aproximadamente un átomo de Nitrógeno para 50 átomos de Carbono, llamado "glicod'slisina" que fué también obtenido del ácido glicocólico por calentamiento prolongado.

La primera síntesis de los ácidos glico y tauro-cólicos fué realizada por Bondi y Mueller (1906) por medio del colato de etilo, colilhidrazido y colilazido, tratándolo con la glicocola, siguiendo el método de Curtius y no empleando el cloruro de acetilo.



El método de Cortese-Baumann bloquea los oxidrilos por tratamiento con ácido fórmico y los formilésteres se acoplan con la glicina por el procedimiento usual de Schotten-Baumann, para lo cual se obtiene el cloruro de los ésteres R-COCl y luego se trata con la glicocola:



(R. = resto éster)

SOLUBILIDADES DE ÁCIDOS Y SALES EN VARIOS SOLVENTES

(de acuerdo con Gilbert 1926)

Gramos por litro.

Substancia	Agua	Alcohol	Eter	Cloroformo	Benceno
Acido cólico	0.28	30.56	1.22	5.08	0.36
„ Desoxicólico	0.24	220.70	1.16	2.94	0.12
„ Dehidrocólico	0.18	3.3	0.46	9.04	1.04
„ Apocólico	0.8	39.86	0.02	19.92	0.4
Colato de Sodio	>570	18.12	0.12	1.44	0.1
Desoxicolato de sodio	>333	32.12	0.12	0.08	1.46
Glicocolato de sodio	>273	340	0.08	0.52	0.1
Taurocolato de sodio	>235	Muy soluble	insoluble	3.16	Insoluble

Substancia	Acetona	Acido acético glacial
	28.24	152.12
	10.46	8.06
	7.76	7.42
	13.72	38.36
	0.28	95.25
	1.64	29.9
	0.28
Insoluble	

ROTACIÓN ESPECÍFICA DE LOS ACIDOS BILIARES

(Josephson 1935)

ÁCIDO	CONCENTRACIÓN %	SOLVENTE	ROTACIÓN ESPECÍFICA			
			6867	6563	5843	λ
Cólico	0.432-1.440	alcohol	25.40	27.78	35.07	Angstrom
Cólico	0.5-5.0	ác. acético.	26.70	29.21	37.52	
Cólico	0.277-1.107	acetona	28.13	30.71	37.94	
Cólico	0.179	cloroformo..	15.77	17.17	24.11	
Colato de Na	2.5	agua	21.50	23.30	29.50	
Colato de Na	0.5	agua	23.50	25.00	32.50	
Desoxicólico	0.5-5.0	alcohol	40.91	44.30	55.56	
Desoxicólico	0.212-0.849	acético	40.47	44.17	55.06	
Desoxicólico	0.240-0.960	acetona	40.63	43.49	55.99	
Desoxicolato Na ..	2.5	agua	32.90	36.10	45.70	
Desoxicolato Na ..	0.5	agua	38.00	41.50	52.50	
Glicocólico	2.5	alcohol	22.60	25.50	32.50	
Glicocolato de Na	2.5	agua	20.10	22.20	27.80	
Taurocólico	1.64	alcohol	21.43	23.08	28.74	
Taurocolato de Na	2.5	agua	16.40	17.70	22.10	

ACIDOS	CRISTALIZACION	P. FUSION
GLICOCOLICO	Polvo blanco cristallino (Merck-Index)	154-155°C.
	Agujas Incoloras Brillantes (Lebeau-Courtois)	133°C. 132-134°C. (Emich) 138-140 „ (Medwedew). 152 „
TAUROCOLICO	Polvo Amarillento Delicuescente (Merck-Index)	~125°C.
	Agujas Brillante Higrosópicas (Lebeau-Courtois)
	Agujas o Prismas Cúbicos (Hammarsten)	Abajo 100° se hace color café
COLICO	Polvo Cristalino Blanco (Merck-Index)	199-201°C.
	Pequeños Prismas anhidros (de agua) Octaedros-Cuadráticos (de alcohol) (Lebeau-Courtois)	~195°C.
	Cristales Tetraédricos (de alcohol)	195-196°C.
	Prismas (de agua) (Hammarsten)	

DEHIDROCOLICO	Agujas finas	237°C. (Lebeau-Courtois) 228-222°C. (Hammarsten)
DESOXICOLICO	Polvo Blanco Cristalino (Merck-Index)	172°C. 173 ° (Lebeau-Courtois)
	Agujas (de acético) (de acetona) (Hammarsten)	144-145°C. 172-173 °
TAURINA	Polvo Cristalino Blanco o Amarillo (Merck-Index)	~300°C.
	Prismas Monoclínico-prismáticos (Beilstein)
	Prismas-Monoclínico-prismáticos (Hans Mayer)	Arriba de 240°C.
GLICOCOLA	Cristales monoclinico-prismáticos (Mulliken).	~225 °
	Cristales Blancos e Incoloros (Merck-Index).	~260 °

REACCIONES COLORIDAS DE LOS ACIDOS BILIARES

En el curso de las reacciones coloridas probablemente hay formación de ácidos no saturados (Sobotka).

Las más importantes de las reacciones coloridas son las siguientes:

A).—REACCION DE PETTENKOFFER:

Una solución de una sal biliar se mezcla con unas pocas gotas de una solución de sacarosa y se trata con ácido sulfúrico concentrado. Se desarrolla un color rojo que rápidamente pasa por el púrpura y al azul-rojo.

Con solo la sacarosa y en ausencia del ácido biliar se observa un color café indefinible debido a la caramelización de los carbohidratos.

Se han propuesto algunas modificaciones al método original, particularmente el uso del furfural en lugar de sacarosa.

LEBEAU-COURTOIS LA DA CON MÁS DETALLES:

A una solución diluida de ácido biliar se le agrega muy lentamente los dos tercios de su volumen de H_2SO_4 conc. evitando que se eleve la temperatura arriba de $70^\circ C$. Se le agrega después algunas gotas de una solución de azúcar al 10%; se desarrolla en seguida una coloración rojo-púrpura. Esta reacción se debe a la acción sobre las sales biliares, del furfural que se forma del azúcar y del ácido sulfúrico.

Pero como esta reacción no es específica de los ácidos biliares DRECHSEL introdujo el empleo del ácido fosfórico en vez del sulfúrico concentrado, para evitar la caramelización de los carbohidratos.

La reacción no es dada por el ácido dehidrocólico ni por los cetoácidos; consecuentemente, la existencia de un grupo OH en el anillo B es aparentemente necesario para efectuar el cambio de color.

Positiva con el cólico, desoxicólico y ácidos biliares conjugados.

B).—REACCION DE UDRANSKY (1888):

Es propiamente una modificación de la reacción anterior. Ha sustituido el azúcar directamente por el furfural, y agrega a 1 cc. de la solución que se prueba, 1 cc. de una solución acuosa de furfural a 1 por mil, y 1 cc. de H_2SO_4 , operando lentamente a fin de evitar el alza de la temperatura, como se indicó antes.

En esta reacción, en lugar de H_2SO_4 , es de interés emplear ácido fosfórico, para evitar coloraciones molestas que se originan en algunos casos. Se procede como sigue:

Al líquido que se prueba, se le agrega una pequeña cantidad de solución alcohólica de furfural y después el ácido fosfórico siruposo en exceso. Se calienta entonces a $100^\circ C$ algunos minutos y se deja enfriar, se le agrega un volumen igual de ácido acético, desarrollándose entonces una coloración azul-verdosa.

Esta reacción junto con el examen espectroscópico del color, permite la dosificación colorimétrica de los ácidos biliares. (Lebeau-Courtois).

C).—Reacción de HAMMARSTEN:

Esta reacción es propiamente de deshidratación del ácido biliar por tratamiento con el ácido mineral.

Se añade ácido cólico en polvo a una solución de HCl conc. y se desarrolla un color violeta que gradualmente pasa por el verde hasta el amarillo, después de algún tiempo.

Es positiva con ácido cólico y los biliares conjugados y con el apocólico; pero negativa con los ácidos saturados dioxicolánicos.

D).—Reacción de LIEBERMANN:

Esta reacción se verifica análoga a los esteroides.

Se emplean los ácidos biliares en polvo puesto que son insolubles en el cloroformo, que es el medio que se emplea. El color varía según la naturaleza del ácido biliar:

A una suspensión en cloroformo del ácido biliar se le agrega sul-

fúrico y la temperatura se mantiene entre los 15-20° C. Al poco tiempo hay formación de color.

E).—Reacción de MYLIUS:

Se disuelven 20 mgm. de ácido cólico en 0.5 cc. de alcohol, se le añade 1 cc. de 0.1 N de yodo y se diluye poco a poco con agua. Precipitan cristales amarillos con lustre metálico, que son azules al través de la luz.

Es negativa para los ácidos colénicos, biliares conjugados y hio-cólicos.

En la modificación de Ville se procede como sigue:

A 2 cc. de una solución alcohólica al 0.5% de ácido cólico, se le añaden 20 cc. de una mezcla de 0.5 cc. de solución 1 N de yodo y además 200 cc. de solución de NaCl al 30%.

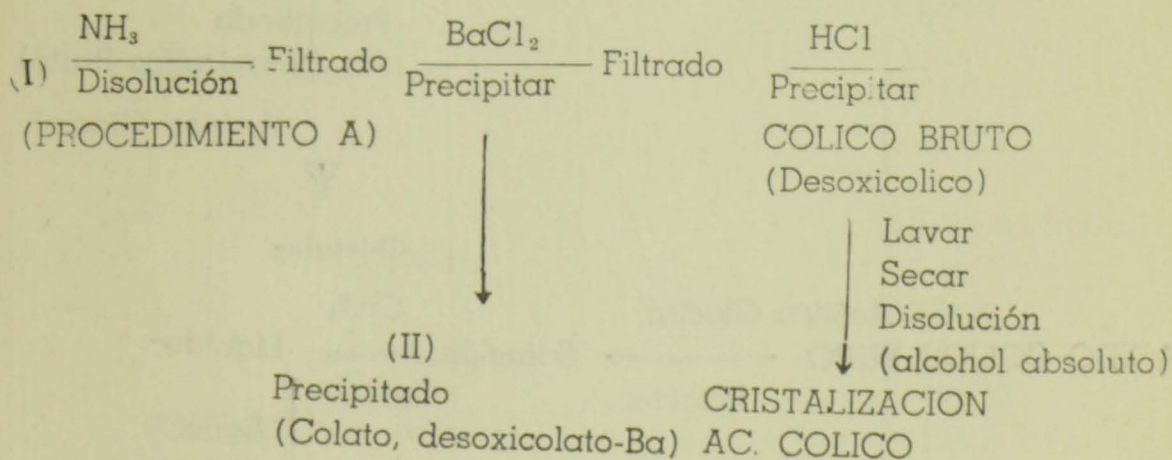
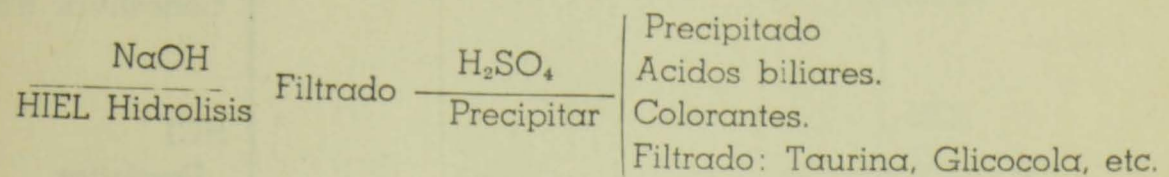
Se verifica una precipitación inmediata de los cristales azules. (Merck-Index).

Respecto a las reacciones coloridas para la glicocola y la taurina, fueron dadas al tratarse las propiedades físicas y químicas de estas sustancias.

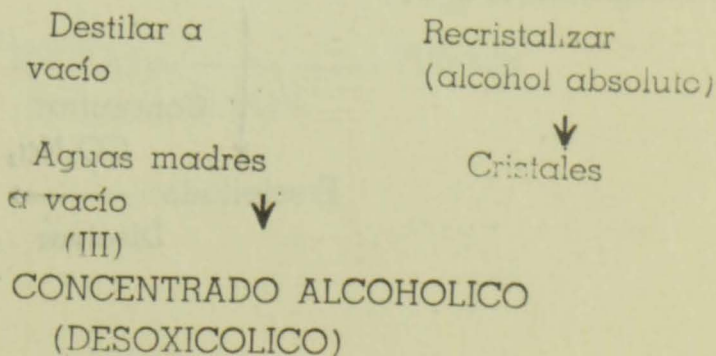
Véanse reacciones *b* y *c* para la Glicocola y reacción *c* para la Taurina.

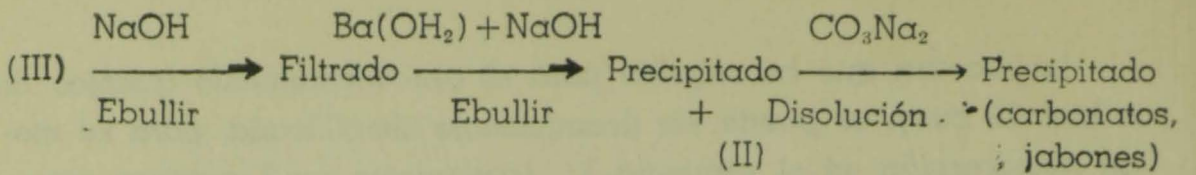
CAPITULO III
OBTENCION DE LOS PRINCIPALES ACIDOS BILIARES
TAURINA Y GLICOCOLA, CON FIN IDUSTRIAL

La marcha que he seguido para el aprovechamiento químico de la hiel de buey, se puede ver grandemente simplificada, para su mejor comprensión en el esquema 1: (compuesto de 3 cuadros concatenados).



Aguas madres Cristales





(Procedimiento B).

Filtrado
 ↓
 Concentrar B.M

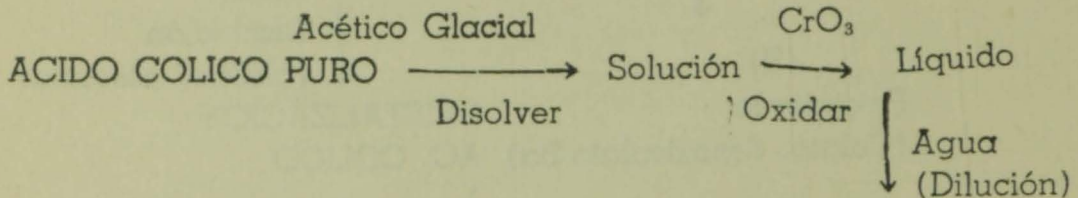
↓
 HCl
 Precipitar

Precipitado
 (Ac. Desoxicólico Bruto)

Acético Glacial



Cristales



↓
 Precipitado
 (AC. DEHIDROCOLICO BRUTO)

(PROCEDIMIENTO C)

Filtrado

↓
 Concentrar
 CO_3Na_2

Precipitado $\xrightarrow{\text{Disolver}}$

CO_3Na_2

↓
 Disolver

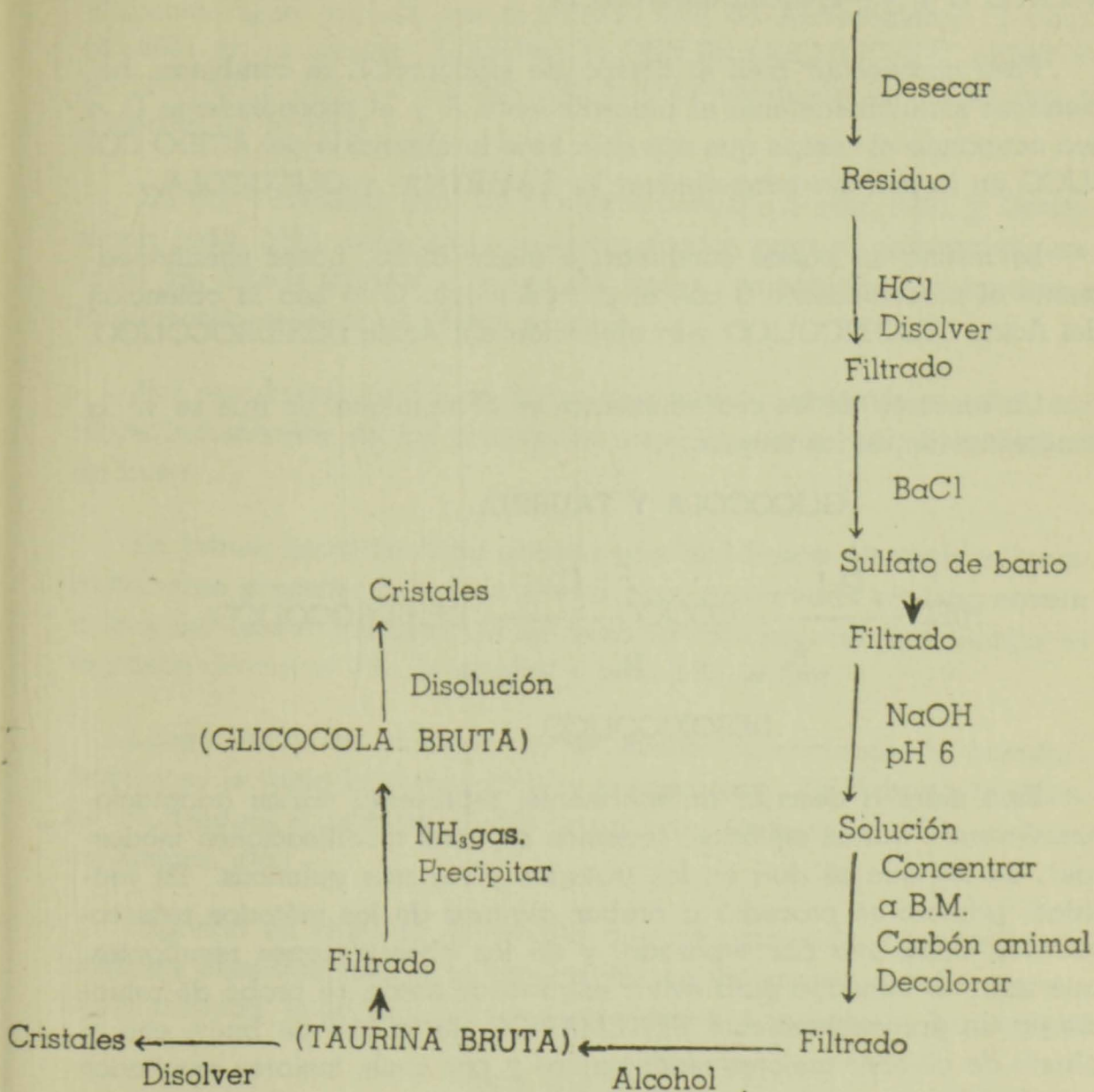
HCl

Filtrado DEHIDROCOLICO

↓
 Alcohol
 ↓
 Disolver
 Cristales

evaporar B.M.

(IV) \longrightarrow Concentrado líquido \longrightarrow Sulfato de sodio (cristales)



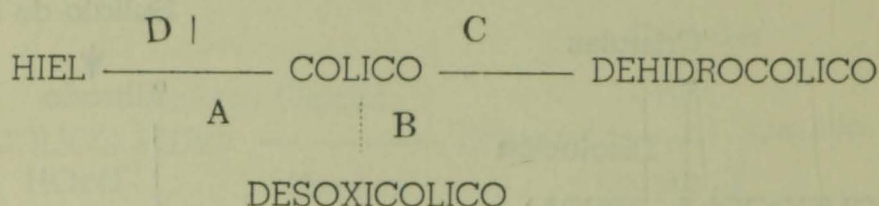
Digamos aquí rápidamente que esta marcha sistemática se sigue así: 1.—PROCEDIMIENTO A; 2.—PROCEDIMIENTO B; 3.—PROCEDIMIENTO C y 4.—PROCEDIMIENTO D.

Para aprovechar bien el tiempo de elaboración se combinan, haciéndose simultáneamente el procedimiento A y el procedimiento D, o sea ocupando el tiempo que nos deja libre la obtención del ACIDO COLICO en la marcha para obtener la TAURINA y GLICOCOLA.

Lo mismo se puede combinar, o mejor dicho, hacer simultáneamente el procedimiento B con el procedimiento C; o sea la obtención del Acido DESOXICOLICO y la obtención del Acido DEHIDROCOLICO.

Un resumen de los procedimientos es el siguiente, en que se vé la concatenación de los mismos:

GLICOCOLA Y TAURINA



Esta marcha descrita anteriormente, representa varias adaptaciones de entre varios métodos, (además algunas modificaciones modestas), de los que se dan en los tratados y revistas químicas. En realidad, primero se procedió a probar algunos de los métodos más conocidos, cada uno por separado, y de las observaciones resultantes, que aquí no expongo para evitar engorrosos datos, se probó de refundir en un aprovechamiento SISTEMATICO de la hiel de buey, con el objeto de obtener mejores rendimientos y por ende, mejores resultados económicos.

En efecto, no encontré en los métodos que estudié y apliqué, la obtención de la glicocola y taurina (PROCEDIMIENTO D), como aprovechables productos secundarios de la hidrólisis efectuada con la bilis, para la obtención de los ácidos biliares como productos principales.

En el Beilstein (IV, pág. 528) se describe el método de hidrólisis con HCl de la bilis para la exclusiva obtención de la taurina y glicocola. Igual sucede con el método que da Abderhalden (II págs. 645-666) en su tratado "HANDBUCH DER BIOCHEMISCHEN ARBEITSMETHODEN"; también se trata de la sola obtención de la taurina y glicocola de la bilis.

En otros métodos que da Lebeau-Courtois (II pág. 840) y Gattermann (pág. 395), entre otros, se dan métodos para el aprovechamiento de los ácidos biliares y no de sus bases componentes, la taurina y la glicocola, durante el mismo proceso.

Por eso mismo probé de hacer una marcha sistemática total, con miras industriales, de los principales productos que componen la hiel de buey.

En primer lugar se debe obtener una hiel fresca de rastro e inmediatamente proceder a la hidrólisis o bien conservarla en una nevera a lo sumo uno o dos días. Si se necesita almacenarla más tiempo se le puede adicionar 3% de alcohol o bien 1% de éter.

Luego, antes de proceder a las demás operaciones de transformación se le toma la densidad y la temperatura. Se decanta también de los residuos o asientos que la impurifican (asiento amarillo, de moco, sangre, etc.)

Expongo en seguida el método que he empleado, apuntando de paso las observaciones más importantes de fenómenos que se presentan a menudo, a fin de que sirvan de jalones o índices en la marcha.

M A R C H A

Se tratan 1-3 kgs. de hiel de buey con 80-240 grs. de sosa industrial en escamas, disolviendo primero la sosa en 200-600 cc. de agua (solución al 40% de sosa). En los métodos de Lebeau-Courtois y Gattermann la solución de sosa es al 30%.

Se hierve a baño de aire, en ebullición lenta durante 30 horas, en un vaso grande de precipitado, llenándolo hasta la mitad solamente, agitando de vez en cuando y reponiendo el agua que se evapora. El color de la mezcla pasa de amarillo-verde a un color verde olivo oscuro al final de la hidrólisis.

Se filtra la solución fría y el líquido hidrolizado se precipita a los 80°C con solución de H_2SO_4 al 10%, agitando constantemente hasta que no precipite más y que dé coloración verde-azulada con el papel indicador de Rojo Congo.

(Se puede hacer la precipitación también en frío, pero la consistencia de la masa chiclosa es más fluida y más difícil de lavar).

(Cuando la precipitación se verifica con HCl al 50%, el color es rojo sangre, semejando hígado fresco, chicloso y desprende un olor desagradable). En el seno del líquido se forma un precipitado coposo, no chicloso, más o menos abundante y de color crema; y la masa resinosa, café a verde el color, forma una galleta en la superficie o se va al fondo; pudiendo a veces tornarse porosa y arenosa después de las 24 horas de dejar reposar el líquido en que ha precipitado. A las 24 horas se decanta y si es necesario se filtra al vacío.

(Se guarda el filtrado amarillo-anaranjado que constituye el producto (IV) del cuadro N° 1). (Cuando el pH del líquido no es el del vire del indicador Rojo-Congo 4-4.5 si no superior a éste, se forma una suspensión coloidal que pasa al travez del papel filtro).

El precipitado se lava varias veces con agua corriente de la llave, moldeando la pasta correosa con los dedos (color café a verde oscuro) y se extiende sobre una lámina de zinc en capa delgada; (no se debe usar recipiente de vidrio para secarla en la estufa porque se adhiere la resina tenazmente no pudiéndose después separarla sin riesgo de quebrarlo), y se lleva la lámina a la estufa de aire para secarla a los 80°C. A las 4 horas se saca y se la tritura en un mortero y se vuelve a llevar a secar a la estufa otras 4 horas. Luego se tritura finamente y se extiende en una hoja de papel para que termine de secar

al aire. A las 24 horas se pesa para determinar el rendimiento de los ácidos biliares brutos, (ácidos cólico y desoxicólico). El color de este polvo fino varía del verde claro al color del cemento (Producto (I) cuadro N° 1). De aquí sigue la marcha del procedimiento A.

"PROCEDIMIENTO A" Obtención del Acido Cólico.

En este procedimiento se siguen cualquiera de las dos modalidades siguientes *a* o *b* para llegar a obtener el ácido cólico:

a.—Conforme a esta primera modalidad se pone el producto (I) con su peso de alcohol absoluto 48 horas o más en el refrigerador, se filtra (guardar el filtrado alcohólico verde oscuro) y el precipitado se disuelve en la necesaria solución de sosa al 1% y se reprecipita con solución de ácido sulfúrico al 30%, calentando algo, hasta reacción ácida al indicador Rojo Congo.

Se asienta un precipitado verde viscoso que luego se decanta, se lava para eliminar el exceso de ácido y se lleva a la estufa a los 75°C a secar.

El rendimiento del cólico bruto así obtenido es de 50% del producto (I).

b.—En esta otra modalidad no se trata inmediatamente con alcohol el producto (I). Es como sigue:

Se disuelve el producto en agua, agregando el suficiente NH_3 para llevarlo a solución, primero con un litro de volumen de agua amoniacal al 5%, y si es necesario, calentando algo.

Se filtra del residuo insoluble y después se diluye con agua de modo que el producto I se halle en una concentración de un 2% como máximo en solución. Se precipita en frío con una solución de Ba Cl_2 al 20% hasta que el líquido claro que sobrenada no precipite más al agregarle nueva porción de la solución. El precipitado es coposo de color crema claro y compuesto principalmente de desoxicolato de bario y algo de colato. Se separa del líquido por filtración, se lava algo con agua, se seca al aire y se pesa para obtener el rendimiento. (Producto (II)). Los filtrados se concentran evaporando un tercio del volumen

en una charola grande a baño maría, e inyectando sobre la superficie del líquido un chorro de aire. Por desprenderse el amoníaco precipita algo el ácido cólico, filtrándose y llevándolo de nuevo en solución con la necesaria solución de sosa y a los filtrados se les precipita en frío con HCl concentrado, agitando, hasta que no precipita más y dé reacción ácida al Congo Rojo.

Se obtiene una masa porosa crema clara o una galleta y algo de precipitado coposo blanco.

Se decanta y filtra, se lava el ácido cólico bruto con agua hasta eliminar el HCl. Se trata el ácido secado al aire y pulverizado, después de tomar el rendimiento, con alcohol de 95% (a lo más dos partes con respecto al peso del ácido).

O bien, se trata la masa con alcohol absoluto empleando poco y agitando o también moldeando la masa embebida con poco alcohol absoluto y tratar de obtener una pasta de cristales.

En todos los 3 casos se obtiene una cristalización del ácido cólico, que se separa del líquido alcohólico filtrando al vacío y lavando con poco alcohol absoluto para obtener los cristales más puros y blancos. Se guardan estos líquidos alcohólicos bastante oscuros porque contienen algo de ácido desoxicólico y constituyen el producto III.

El ácido cólico que se obtiene, casi completamente blanco, debe recristalizarse de alcohol absoluto hirviendo hasta que los cristales fundan a los 195-196°C.

De las aguas madres de cristalización se obtiene concentrando al vacío nuevas cantidades de ácido cólico, que se someten al proceso, hasta obtener su punto de fusión.

El rendimiento en puro ácido, calculando libre de alcohol, es de 35-40% del ácido cólico bruto.

La primera extracción con alcohol es bastante negra y como decíamos, contiene bastante ácido desoxicólico. En el Capítulo siguiente daremos las razones porqué se prefiere esta modalidad b a la a que ya expusimos también.

Sucede a veces, sin embargo, que ni aún siguiendo la modalidad *b* se obtienen los ácidos brutos del cólico en condiciones satisfactorias de cristalización. PREGL Y LANGHELD emplearon para estos casos el siguiente procedimiento, porque las hieles de verano de Alemania daban a veces un ácido cólico bruto difícil de cristalizar:

Del filtrado de la precipitación con $BaCl_2$, se precipitó con HCl concentrado el ácido cólico bruto (véase cuadro N° 1, Procedimiento A). Se seca completamente, se pulveriza y se disuelve en agua agregando el suficiente amoníaco, de modo de obtener, en este caso, una solución al 1% del ácido bruto y después se precipita, tanto como sea posible, con una solución de $BaCl_2$ al 20% (una solución más concentrada del ácido biliar no precipita con la solución de $BaCl_2$). Por este medio se precipitan las materias que estorban la cristalización, y del filtrado se puede obtener, precipitando con HCl concentrado un ácido cólico que reúne las condiciones para cristalizar bien.

"PROCEDIMIENTO B" OBTENCIÓN DE ACIDO DESOXICÓLICO

Del producto líquido (III), y posteriormente en la marcha, agregando el producto (II) (desoxicolato de bario etc.) (véase cuadro N° 2), se obtiene el ácido desoxicólico.

A los extractos alcohólicos fuertemente coloridos que se obtuvieron al lavar el ácido cólico bruto (por cualquiera de las dos modalidades *a* o *b* en el procedimiento A) y lo mismo a las aguas madres alcohólicas de cristalización, se les juntan, se les alcaniza débilmente y se les libera del alcohol destilando a B.M., y se hierve a reflujo a B.M. después de agregarle más solución de álcali de modo que dé reacción francamente básica con el papel de fenolftaleína, durante 12 horas.

Se deja enfriar y se le agrega $Ba(OH)_2$ anhídrico comercial en un 15-20% de peso respecto al del producto (I). Se hierve otras 12 horas a reflujo en B.M. se deja enfriar y se filtra a la trompa de vacío (cristalización crema oscura). Se guarda el filtrado oscuro que contiene algo de colato de bario y que se usa al final.

Esta precipitación se seca al aire o en desecador de vacío y se junta con la del producto (II). Se pesan para tomar rendimiento.

Este precipitado se compone principalmente de desoxicolato de bario, algo de colato y de carbonato de bario, jabones de bario pero en pequenísimas cantidades etc.

Se disuelve el precipitado de bario en alcohol frío agotándolo tres veces con pequeñas porciones, y filtrando al vacío para que escurra bien del residuo insoluble y colorido de crema oscuro. Al filtrado se le trata en caliente y a B.M. con exceso de solución de soda industrial y se lleva a sequedad, se pulveriza finamente y se agota la masa de nuevo con alcohol. Por este medio se elimina una gran cantidad de carbonatos, no siendo necesaria una decoloración posterior aunque el color sea amarillo-café.

Si fuera bastante oscuro se puede emplear un poco de carbón animal, se calienta y se filtra. El líquido alcohólico se evapora a sequedad en charola a B.M. e inyectando en la superficie un chorro de aire. Se disuelve el residuo en agua y se precipita con HCl. El precipitado se lava bien (crema claro) y se seca al aire o en desecador de vacío.

El ácido bien pulverizado y tomado el rendimiento, se trata con muy poco acético glacial caliente y se deja cristalizar hasta que los cristales tengan un P.F. de 144-145°C. Recristalizado en acetona debe tener un P.F. de 172-173°C. Recristalizado de alcohol absoluto hirviendo un P.F. 176-178°C.

Del filtrado de la precipitación con $Ba(OH)_2$ y que guardamos, se precipitan los ácidos no transformados o que pasaron en solución, con HCl y se obtiene una masa chiclosa crema compuesta principalmente de cólico y desoxicólico brutos. Cuando las cantidades industriales de esta mezcla son bastante grandes, se les seca, se toma el peso y se considera como producto (I) principalmente para obtener el ácido cólico.

"PROCEDIMIENTO C". OBTENCIÓN DE ÁCIDO DEHIDROCÓLICO

Siguiendo nuestra marcha sistemática y conforme al cuadro N° 2 pasaríamos a la obtención del ácido dehidrocólico a partir del ácido cólico puro.

En la obtención de este ácido se sigue el método original que empleó HAMMARSTEN para su obtención, a partir del ácido cólico puro. Consiste en la oxidación de este ácido con una solución de trióxido de cromo en acético glacial, por medio de la cual se transforman los radicales alcohólicos secundarios en núcleos cetónicos, o sea, que la reacción más propiamente se debe llamar deshidrogenación.

Se disuelve el ácido cólico en ácido acético glacial de tal modo que se prepare una solución del 10-15% de cólico. Se le agrega lentamente a esta solución otra solución al 10% de CrO_3 en ácido acético también glacial. En estas condiciones se reduce rápidamente el óxido crómico y se oxida el ácido cólico. Ocurre que así siempre se calienta la mezcla de estas soluciones; pero si se agrega la solución crómica de una bureta en cantidades pequeñas, por ej. de 5 a 10 cc. y en caso necesario, antes de agregarle otra porción, se le enfría un poco, se puede evitar que la temperatura pase de los 40-50°C. En estas condiciones se verifica perfectamente la oxidación y se pueden hacer reaccionar en una hora 50-75 grs. de ácido cólico en solución, repartiéndola en varios matraces de 100-150cc.

La mezcla de los líquidos permanece clara, no así el color que varía gradualmente y la temperatura al paso que se va agregando la solución crómica. Al agregar los primeros 25 cc. de 5 en 5 cc. la solución del ácido cólico adquiere un color plomizo, teniendo siempre el cuidado de agitar continuamente.

Cuando se oxidan en un Erlenmeyer de boca ancha por ej. 25 grs. de ácido, en solución de 250 cc. de ácido acético glacial y se le agregan poco a poco unos 50 cc. de la solución crómica, la mezcla pasa de color plomizo a un tinte más verde, conservando este color indefinido hasta el final de la reacción. Se cuida que la temperatura, como decíamos, no pase de los 40-50°C. El final se reconoce que al agregarle la solución crómica de 10 en 10 cc. seguidos, a intervalos cortos, no se eleva la temperatura, aún después de agregarle 30 cc. El color plomo-verduzco presenta un tinte amarillento al agitar la mezcla

y observar la capa delgada que resbala en la pared del matraz.

En todo el proceso no se desprenden gases, ni se forma precipitado y solo en el caso en que el ácido cólico no se encuentra exento completamente de alcohol de cristalización, se aprecia un olor inconfundible de éster acético.

Después que ha terminado la reacción se deja la mezcla una hora en reposo y se le diluye con un volumen 2-3 veces mayor de agua y se filtra pasados unos 3 días en el refrigerador.

Cuando el ácido precipitado es muy fino y difícil de filtrar, se calienta la solución, que adquiere un color verde-violeta, con lo cual los cristales que se obtienen después son más grandes.

Se le filtra, se lavan los cristales con poca agua y se disuelven en la solución necesaria de soda (al 1%), y se hierve; se filtra del hidróxido de cromo formado y se precipita la solución con HCl. Se filtra, se lava un poco y se cristaliza de agua hirviente o de alcohol hirviente. P.F. 222-228-230°C.

"PROCEDIMIENTO D" OBTENCIÓN DE GLICOCOLA Y TAURINA

Anteriormente expuse que en los métodos que dan los tratados de química, para la obtención de los ácidos biliares, se concretan solo a éstos y no aprovechan en ninguna forma el filtrado (IV) que queda al separar el producto (I) (véase cuadro N° 1).

En el "Tratado de Química Orgánica" de Beilstein (IV pág. 528), se dan por separado la obtención de la Taurina y Glicocola, efectuando la hidrólisis de los ácidos biliares de la hiel de buey con HCl concentrado. Más o menos semejante es la obtención de las mismas sustancias anfóteras, taurina y glicocola, en la obra "Métodos Bioquímicos" de Abderhalden. (II pág. 663).

Basándose en la composición química de los ácidos biliares, presentes en una regular proporción pareados con la taurina y glicocola en la hiel del ganado, y en que para obtener los ácidos libres se debe efectuar una hidrólisis, supuse que del filtrado de la precipitación de los ácidos biliares libres, serían extraíbles la glicocola y la taurina, mejorando en esta forma el aprovechamiento de la materia prima.

Tenemos que en este filtrado (IV) se hallan presentes, además de los dos amino-ácidos, una fuerte cantidad de sulfato de sodio (o cloruro de sodio en caso que se precipitó el producto (I) con HCl) un exceso del ácido inorgánico empleado, colorantes etc. De estos productos las sustancias aprovechables para mejorar el rendimiento económico, son la glicocola y el sulfato de sodio.

La glicocola (además la taurina) es importante de obtenerse si tomamos en cuenta que las operaciones que se llevan a cabo son esencialmente de evaporación, filtración y extracción con disolventes industriales. Además de que ya tratándose de un proceso en escala industrial, donde se trabaja con cantidades grandes de hiel, los rendimientos económicos deben ser más favorables que en la simple obtención del laboratorio; siendo también que adelantamos en este camino al tratar de recuperar la buena cantidad de sulfato de sodio que se ha formado, porque realizamos una concentración del filtrado (IV). Por estas razones y para completar una marcha sistemática de aprovechamiento de la hiel del ganado he aplicado el siguiente método, con resultados bastante satisfactorios:

El filtrado (IV), que presenta una coloración anaranjada más o menos intensa, se concentra evaporando a B.M. en una charola y aplicándole a la superficie un chorro de aire, hasta reducirlo a unos 500 cc. y se deja enfriar. A las 24 horas se forman grandes y pequeños cristales prismáticos de $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, se decanta el líquido, se lavan un poco los cristales con agua fría y los lavados se juntan al líquido decantado, y se guardan estos cristales para obtener posteriormente el rendimiento de sulfato de sodio. El líquido decantado se evapora otra vez en la forma descrita y se concentra hasta los 200 cc., formándose a las 24 horas una nueva cristalización de sulfato. Se decanta etc. y en caliente se precipita el exceso de ácido sulfúrico con una solución saturada y caliente de Ba Cl_2 industrial, hasta que el líquido claro que sobrenada no precipita más, teniendo cuidado de no excederse en el empleo del precipitante. Se filtra en caliente, teniendo el líquido entonces una reacción débilmente ácida al indicador tornasol. Se trata el filtrado con unos pocos gramos de carbón animal para decolorarlo, calentando algo a B.M. y filtrando. El filtrado debe ser poco colorido y se lleva a sequedad en la forma ya descrita.

Se extrae el residuo de sales, blanco, con una solución de HCl 5%, empleando de 2-3 volúmenes que el valor numérico del peso del residuo, se calienta un poco agitando para que se disuelva, se filtra de la parte insoluble y al filtrado se le precipita con un volumen 10 veces mayor de alcohol al 95%. Aquí se separa la mayor parte de la taurina, dando un precipitado blanco grumoso, abundante, mientras que la glicocola queda en solución.

El filtrado alcohólico se lleva a sequedad, en la mismas condiciones conocidas, se disuelve en la cantidad justa de HCl al 5% y se precipita de nuevo con alcohol algo de taurina que iba disuelta.

La taurina se lava unas tres veces con agua para eliminar el alcohol que retiene consigo y después se trata con agua hirviente de la cual cristaliza en polvo blanco que se asienta. Se toma el rendimiento.

El filtrado alcohólico, libre de taurina, que contiene disuelta la glicocola, se satura en frío con una corriente de gas NH_3 (que se puede obtener a partir de solución comercial de amoníaco o de sales de amonio, agregando poco a poco sosa concentrada en solución), con lo cual precipitan grumos blancos abundantes de glicocola.

Se seca en el desecador sobre H_2SO_4 concentrado, previamente lavado, se pulveriza y se toma rendimiento.

OBTENCIÓN DE LAS SALES BILIARES

Las sales biliares obtenidas por el procedimiento de Plattner, se conocen con el nombre de bilis cristalizada y en el comercio con el nombre de bilis descolesterinizada y despigmentada.

Las sales biliares, según LEBEAU-COURTOIS, "son esencialmente las sales sódicas (tratándose de los animales terrestres) o potásicas (animales marinos) de dos ácidos orgánicos, un ácido nitrogenado: el ácido glicocólico $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NO}_6$ y un ácido nitrogenado y sulfurado: el ácido taurocólico $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NSO}_7$, acompañados de otros dos ácidos: el ácido glicodesoxicólico y el ácido taurodesoxicólico, que derivan respectivamente de los ácidos precedentes".

La bilis de las diferentes especies animales no contiene siempre las dos variedades de sales, es así como la bilis de perro no contiene más que taurocolato. La sal más común, como es en el caso del hombre y del buey, el glicocolato de sodio, es claramente más abundante que el taurocolato.

PREPARACION

La preparación de la mezcla de estas sales biliares se puede hacer de la manera siguiente:

Se mezclan 200 partes de bilis de buey con 20 partes de carbón animal (10:1) finamente molido y se evapora hasta sequedad usando un baño de aire. Esto se efectúa lo mejor en una cacerola de hierro, porque en recipiente de vidrio se adhiere sólidamente la pasta negra seca a las paredes, siendo peligroso de romperlo al tratar de desprenderla para efectuar la disolución posterior.

Se trata el residuo seco con alcohol absoluto que disuelve las sales biliares y los lipoides. Se emplea alcohol absoluto 3-4 veces al volumen del residuo seco. Se lleva el líquido alcohólico que contiene el carbón animal a un recipiente herméticamente cerrado y se le deja 24 horas. Se filtra, el filtrado debe ser completamente incoloro (no amarillo, en cuyo caso se le agrega nuevamente un poco de carbón animal porque la bilis cristalizada no se obtiene pura) y se le adiciona éter en exceso, unas 3 veces el volumen anterior que insolubiliza solamente las sales biliares. Lo mejor es agregar primero dos veces el volumen y guardar el líquido, en Erlenmeyer tapado, en el refrigerador unas 24 horas, con lo cual se obtiene un precipitado fino de agujas sedosas que se forman en el asiento y en las paredes del frasco y que presentan el aspecto de un erizo con las agujas en disposición concéntrica.

Luego se le agrega el otro volumen de éter y se lleva nuevamente al refrigerador por otras 24 horas. De esta manera no se precipitan todas las sales inmediatamente, en una masa pastosa y pegajosa, como cuando se le agrega el éter de una sola vez, aunque se presenta a veces que después cristaliza. El precipitado se filtra del resto del líquido a vacío, se extiende en una cápsula y se lleva al desecador

de vacío en presencia de CaCl_2 anhidro. A las 24 horas se pesa y se tiene el rendimiento que es de un 6-7% con respecto a la bilis tratada.

Una separación de los ácidos glicocólico y taurocólico no tendría objeto desde el punto de vista comercial. Desde el punto de vista químico si se puede efectuar, para lo cual se aprovecha la escasa solubilidad del ácido glicocólico en el agua (1:300) comparada con la gran solubilidad del ácido taurocólico.

SEPARACION

Se disuelve la bilis cristalizada en una pequeña cantidad de agua (1:1.5,) tomando el aspecto de jarabe, y se liberan los ácidos biliares por adición cuidadosa de una solución al 33% de H_2SO_4 , agitando con una varilla de vidrio y observando hasta que presente opalescencia y marcada turbidez a la luz, se le agrega después la mitad de su volumen de agua y se lleva al refrigerador durante 24 horas; se obtiene un precipitado de aspecto gelatinoso blanco abundante de ácido glicocólico bruto que se filtra, se lava y se seca en desecador de vacío o al aire.

El líquido filtrado que contiene el ácido taurocólico se evapora en charola a sequedad en B.M. El residuo se trata con poco alcohol, siendo el mejor por diferentes pruebas de solubilidad llevadas a cabo con iguales pesos del ácido e iguales volúmenes de alcohol de diferentes grados, el de 50°. Luego se trata la solución alcohólica con un volumen igual de éter, con lo que precipita el ácido taurocólico. A las 24 horas, se filtra al vacío y se guarda herméticamente cerrado.

La purificación del ácido glicocólico se efectúa disolviendo en alcohol absoluto y después precipitándolo con un volumen doble de éter hasta formación de flóculos. Después de estar en el refrigerador unas 24 horas, se filtra, se seca y se pesa.

NOTA.—Para preparar el ácido taurocólico al estado de pureza se parte de la bilis de perro, que solo contiene taurocolato de sodio.

RENDIMIENTO N° 1

	Peso Volumen.	Densidad	Gasto de NaOH gramos	Hidrólisis T. horas.
HIEL	1.— 1.750 cc.	1.015 (4° C)	88	9
	2.— 1.500 cc.	1.020 (14°C)	150	18
	3.— 1.500 gr.	120	24
	4.— 3.000 gr.	240	30
	PRECIPITADO (I)* Porciento (I) gramos.			
	1.— 70	3.9 %	} Acido Cólico bruto.	
	2.— 80	5.28		
	3.— 80	5.33		
	4.— 160	5.33		

* Se entiende bien lavado, seco y pulverizado.

RENDIMIENTO 2°

Producto I	Ac. Cólico						
Ac. Cólico bruto, muestras:	Sustan- cia	Precipi- tado grs.	Ba (II)	Repreci- pitado grs.	Ac.Cólico Crist. grs.	C.R.M. %	P. Fusión
1	15	7.5		5.3
2	51.3	27.		15.	1.1	2.1	194.5
3	120	50		58.7	5.5	4.6	195.6
4	160	90		111.	10.8	6.1	195.4

NOTA: El porciento es con respecto a la cantidad de muestra empleada. Para obtener las cristalizaciones se lleva a cabo la modificación de Pregl-Langheld.

R E N D I M I E N T O N º 3

Precipitado. II Desoxicolato-Ba (poco colato) Muestras:	Sustancia grs.	Ac. Desoxicólico grs. (en polvo)	Por ciento
1	27	3.6	13.3 %
2	38	4.5	11.8 %
3	58	8.0	13.8 %
4	90	13.2	14.66 %

R E N D I M I E N T O 4º

Ac. Cólico Crist. Muestras:	Sustancias grs.	Ac. Dehidro- cólico 1ª Crist.	2ª Crist.	3ª Crist.	Suma %	P. F.
1	20	2.5	2.8	5.9	56	222°
2	20	1.8	3.3	4.5	48	224°
3	25	3.8	4.7	6.2	58.8	225.6°
4	25	1.5	4.5	8.3	57.2	225.8°

* La primera cristalización se obtiene al duplicar con agua el volumen de la mezcla cólico-crómica y siguiendo la purificación. La segunda cristalización se obtiene al evaporar en baño maría el líquido de cristalización anterior a la mitad y se continúa la purificación. La tercera se obtiene al diluir con agua al doble el volumen que queda anteriormente.

Si se efectúan los lavados de las anteriores cristalizaciones con agua fría de manera de eliminar el exceso de ácido acético y de iones Cr, . . . se obtiene un ácido Dehidrocólico lo suficientemente puro.

R E N D I M I E N T O 5º

Bilis grs.	Filtrado (IV)	residuo * grs.	Glicocola ** grs.	Taurina *** grs.	Sulfato de Na bruto, grs.
1000	38	8.9	1.2	78
1000	40	9.5	1.4	82
1500	58	12.	1.9	190
3000	100	21.	2.2	210

* Este residuo de sales es el que se obtiene si en el cuadro 3 de obtenciones evaporamos a sequedad el filtrado obtenido después de decolorar con carbón animal.

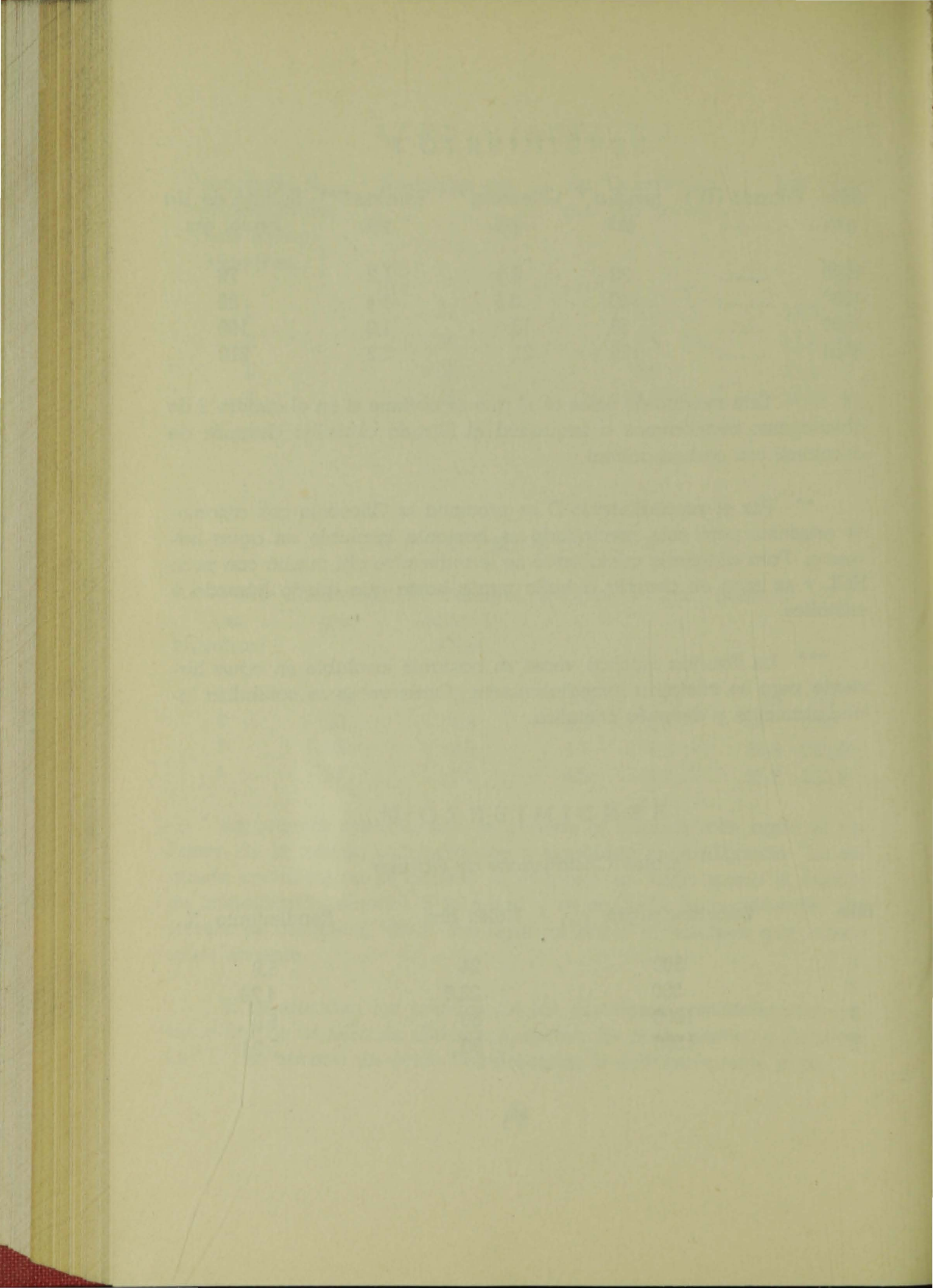
** Por el procedimiento D se precipita la Glicocola con amoníaco gaseoso, pero este precipitado es bastante insoluble en agua hirviente. Para obtenerlo cristalizado se le redisuelve ahí mismo con poco HCl y se seca en charola a baño maría hasta que quede húmedo y cristalice.

*** La Taurina muchas veces es bastante insoluble en agua hirviente pero se cristaliza inmediatamente. Otras veces se solubiliza inmediatamente y después cristaliza.

R E N D I M I E N T O 6º

Sales Cristalizadas de Plattner

Bilis	Substancia grs.	Sales grs.	Rendimiento %.
1	500	24	5.8
2	500	23.8	4.76
3	1000	50	5.0
4	1500	80	5.33



CAPITULO IV
CONCLUSIONES - BIBLIOGRAFIA

VI. CANTON
CONSTITUTIONS - BREVETARIA

CONCLUSIONES

1.—Este campo de la química, como otros muchos, ofrece un interés considerable tanto al químico como al biólogo. Y aunque esta tesis no fué de carácter biológico sino meramente químico, no pudiéndose de todas maneras desentender absolutamente de ese tema, hemos podido observar antes que la función que desempeña en el organismo animal la abundante secreción de bilis, realizada por un órgano tan importante con el hígado, no está aún definitivamente dilucida.

2.—Después de las investigaciones químicas brillantes de Windaus, Wieland, Borsche, etc. la parte químico-analítica de sus componentes es muy conocida. Sin embargo, es de recalcar el hecho de que no existe una concordancia completa en algunos de los datos físicos tan esenciales, dados por diferentes investigadores, como son: el sistema de cristalización, el punto de fusión etc. de los principales ácidos biliares naturales.

3.—Igualmente no existe un método comprobado para la obtención, variando en general los rendimientos según sea el ácido que se obtenga, siendo el de más bajo por ciento el ácido cólico cristalizado. Esto se debe a que la hiel de buey en México, análogamente a las hieles de verano en Alemania, contiene posiblemente sustancias denominadas "dislisinas" que impiden la cristalización del ácido cólico, debiendo de aplicarse el Método de Pregl y Langheld con lo cual se bajan considerablemente los rendimientos.

4.—La tendencia en este trabajo no ha sido dirigida a desarrollar el plan industrial completo, incluyendo los estudios económicos respectivos, sino solamente el estudio químico que sea la base para determinar si la obtención de estos productos es económica desde el punto de vista industrial.

5.—De este trabajo puedo establecer que: por el método anteriormente dado, se puede llegar a obtener los siguientes derivados y productos de la bilis: Ácido Cólico, Desoxicólico, Dehidrocólico Glicocola, Taurina y Sal cristalizada de Plattner; que para la obtención de dichos compuestos he seguido un método que es un resultado de la adaptación de algunos de los métodos más conocidos; que el método total de dichas obtenciones constituye una marcha coordinada y sistemática, resultado del trabajo general de la tesis y que por lo tanto no aparece en tal forma en ninguna literatura; que la obtención del ácido cólico principalmente, en su forma cristalina o pura es bastante difícil, alcanzando por lo mismo un alto precio en el comercio, donde por lo regular se vende en polvo, no cristalizado; que la obtención de la Glicocola y la Taurina, en esta marcha también es parte importante del trabajo realizado en esta tesis.

BIBLIOGRAFIA

- Harry Sobotka "The Chemistry of Sterids" N. Y. 1938.
- H. Gilman "Organic Chemistry" An advanced treatise. N. Y. 1938
2 Tomos (II, 1299-1313).
- Beilstein "Handbuch Von Organische Chemie" N. Y. Edwards Brothers.
- Abderhalden "Biochemischen Arbeitsmethode" 3 Tomos, Berlín 1910.
- P. Lebeau G. Courtois "Traité de Pharmacie Chimique" 3 Tomos, París 1938.
- Merck-Index Philadelphia, 1940.
- Moeller y Thoms "Enciclopedia Completa de Farmacia" 15 Tomos (III, 248) Madrid 1916.
- Hager "Tratado de farmacia práctica" 3 Tomos (I, 838) Buenos Aires 1942.
- C. A. Rojahn F. Giral "Preparación de productos químicos y químico-farmacéuticos" 2 Tomos, México 1942.
- L. Gattermann "The practical Methods of Organic Chemistry" N. Y. 1932.
- J. Bryant Conant "The Chemistry of Organic Compounds" N. Y. 1939.

