





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.

*A mis padres*

*el Sr. Dn. Eduardo de la Llata*

*y la Sra. Dña. Herlinda Loyola de de la Llata.*

*A mi tia*

*la muy Rev. M. Sup.*

*Ma. de los Dolores Loyola H.M.I.G.*

*A la Universidad Labastida.*

*A mis maestros.*

*A mi condiscípula.*

## I.—RESUMEN.

### OBJETO.

Estudiar la influencia de los diversos factores en la determinación de la nicotina, por el método de Robinson.

### RESUMEN DEL METODO Y VENTAJAS SEGUN ROBINSON.

El método consiste en la precipitación de la nicotina con el reactivo de Valser y su cuanteo por nefelometría. Las ventajas del método según Robinson consisten en la separación de los diversos alcaloides precipitando de preferencia la nicotina, se pueden determinar cantidades muy pequeñas de ésta y el método es más rápido.

### RELACION DEL REACTIVO DE VALSER.

La relación en el reactivo de Valser de  $HgI_2$  y KI debe ser estequiométrica.

## **DILUCION.**

La dilución propuesta por Robinson es la mejor.

## **COLOIDE PROTECTOR.**

Siempre que la temperatura sea alta, temperatura ambiente y se trabaje sin coloide protector, la sedimentación es muy rápida.

## **TIEMPO PARA LAS LECTURAS.**

Sin control de temperatura (temperatura ambiente) a los 7' hay máxima absorción pero disminuye hasta los 10' y permanece practicamente constante hasta los 13'.

## **INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.**

ROBINSON NO MENCIONA LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y SE ENCONTRO QUE TIENE UNA IMPORTANCIA PRIMORDIAL. AL AUMENTAR LA TEMPERATURA DISMINUYEN LAS LECTURAS. DE AQUI QUE CONCENTRACIONES IGUALES DAN LECTURAS MUY DIFERENTES CON PEQUEÑAS VARIACIONES EN LA TEMPERATURA POR ESTO SE RECOMIENDA TRABAJAR A TEMPERATURA CONSTANTE DE TRES A CINCO GRADOS CENTIGRADOS.

## **RESULTADOS CON LOS TABACOS.**

Los resultados en las determinaciones en los tabacos coinciden con los obtenidos en el método oficial del ácido silicotúngstico.

## II.—INTRODUCCION.

### CLASIFICACION BOTANICA DEL TABACO.

El tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.) (1) es una planta de origen americano, que pertenece a la familia de las Solanáceas, género *Nicotiana*. Crece en forma de arbusto, de raíz fibrosa, tallo corto, vellosos; hojas espaciadas, grandes, oblongo-lanceoladas y glutinosas; flores en racimo de color amarillo pálido o rojo obscuro; fruto en cápsula cónica con muchas semillas pequeñas.

Existen, conocidas, más de 20 variedades de tabaco; las principales se clasifican en tabacos de hoja ancha y tabacos ordinarios.

Las hojas del tabaco contienen nicotina, combinada con ácidos cítrico, oxálico y málico (2,3,4,5,) así como otros alcaloides en menor proporción. Las hojas desecadas simplemente contienen mayor proporción de nicotina que las que han sufrido la fermentación especial a que se someten en las fábricas de cigarros, pues en la fermentación queda libre una parte de la nicotina —en el tabaco sin fermentar se encuentra formando sales— y se pierde volátil zándose y tal vez descomponiéndose.

Las hojas secas (4) contienen 22% de cenizas formadas casi completamente por sales de K, Ca, Mg,  $\text{NH}_4^+$  y Fe. Los compuestos orgáni-

cos son la celulosa, gomas, pectinas, ácidos málico, oxálico, acético, combinados con las bases antes citadas y con el alcaloide característico, la nicotina.

La proporción de nicotina en la planta es muy variable. Paul Koenig (6) encontró que el contenido de nicotina en hojas (secas) de tabaco verde, aumenta de la base de la hoja (1.61 %) a la punta (4.45 %), y disminuye un poco en las hojas superiores (3.75 %).

Schloesing (7) encontró que la cantidad de nicotina aumenta con el tiempo. En un análisis efectuado el 25 de mayo encontró 0.79 % y el 25 de septiembre 4.32 %.

### HISTORIA, DESCUBRIMIENTO, USOS, ACCION TOXICA.

Algunos escritores (1) refieren que al llegar Cristóbal Colón a la isla de San Salvador vieron a los indios que llevaban un tizón encendido en un extremo, chupaban el opuesto y aspiraban el humo, estaba formado de hojas enrolladas de *cojibá* o *cobivá*, nombre indígena del tabaco; otros mascaban las hojas o llenaban tubos de barro o cañas, los prendían y aspiraban el humo. Otros escritores dicen que en 1520 los españoles encontraron plantas de tabaco en Yucatán, cerca de Tabasco, de donde se cree originario el nombre de la planta. En 1518 el misionero español Fray Romano Pane, remitió a Carlos V semillas de la planta que el Emperador mandó sembrar y cultivar, desde esa época se cuenta la introducción del cultivo del tabaco en Europa. En 1560 lo dió a conocer en Francia Juan Nicot quien presentó la planta y el producto elaborado a la Reina Catalina de Médicis que la usó y recomendó las hojas verdes para la curación de las heridas. Después Linneo, según unos, y De la Champ, según otros, dieron el nombre genérico de NICOTIANA a este vegetal en memoria de Nicot.

Esta planta ha sido objeto de superstición y veneración en Europa desde su importación que se le llamó *yerba santa*, al extenderse su uso se extendieron las leyendas y supersticiones por toda el Asia.

El uso del tabaco ha sido objeto de restricciones; en Rusia en la época del Zar Pedro el Grande se llegó a castigar su uso con la amputación de la nariz, el Papa Urbano VIII prohibió el uso del rapé en la Iglesia.

En España en un principio se llevaba el tabaco de las Islas de Cuba y Santo Domingo hasta que en 1760 se estableció la fábrica en Sevilla.



El Padre Allouex S.J. misionero entre los utanaes en su "Relación de lo sucedido en los años 1666 y 1667 en la Nueva Francia" dice que éstos indios empleaban el tabaco en sus sacrificios al dios Sol, ya fuera para dar gracias por iluminar para matar a algún animal, para que siga iluminando y dando calor, etc.

El Padre Lafitau S.J. en su obra "Moeurs des sauvages américains" (II, Paris, 1726), los primitivos americanos atribuían a la planta el poder de amortiguar los apetitos carnales, de purificar el alma, esclarecer el espíritu, evocar a los espíritus y predisponerlos en favor de los pueblos; en las redes se ponían hojas para tener buena pesca.

El *cohoba* (tabaco entre los indios mexicanos), dice López de Gomara, lo mascaban los adivinos o absorbían su humo por la nariz lo que les producía una fuerte excitación en la que se les representaban visiones que luego transmitían al pueblo, contestaban que sucedería lo que el dios quisiera, pero nunca daban respuestas concretas.

Pedro Mártir en su libro "Novus orbis" dice que los indios de Nueva España hacían con el tabaco un licor que el cacique (también adivino) tomaba por la nariz y le producía una excitación tal que revolvió toda la choza preparada para el caso, luego se sentaba con la cabeza gacha y permanecía un rato al cabo del cual despertaba como de un sueño pronunciando palabras ininteligibles, los presentes, al preguntarle contestaba que había hablado con el espíritu y que le había prometido la victoria o bien la derrota por no cumplir lo mandado.

Los usos principales del tabaco son la fabricación de cigarros y puros y ya poco en medicina. La producción mundial (2) para el consumo humano e insecticidas es de más de 2.000.000 de toneladas de las cuales 60-70 toneladas son de nicotina pura.

La hoja de tabaco (1) está incluida en la Farmacopea española como narcótica e irritante. Se emplea en medicina en infusión, polvo y cocimientos; antes se usó (8,9) en forma de enema intestinal en los cólicos por invaginación intestinal, antiespasmódico en este caso; el mismo efecto se obtenía en casos de estrangulación herniana. En enema para expulsar los oxiuros. En tinturas para aplicación local en casos de reumatismo o neuralgias. Ningún medicamento debe usarse en el embarazo o la crianza.

La nicotina se clasifica (4) entre los tetánicos, acelera el corazón, aumenta la tensión arterial, produce sudoración, malestar y vómitos.

Se emplea también por la nariz contra la jaqueca y cefalalgia persistentes.

En horticultura y agricultura se emplea como insecticida eficaz (4, 8) también en veterinaria (5) para los borregos.

En un principio (4) se creyó que la nicotina mataba a los insectos por su acción cáustica, posteriormente se ha comprobado que su poder tóxico se debe a que se volatiliza y penetra en los estigmas, causando así la muerte del insecto.

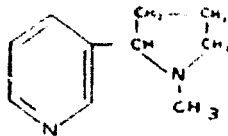
Sus intoxicaciones pueden ser agudas o crónicas. La dosis mortal varía de 1-5 mg. (5,7,8.) según el individuo, la dosis fatal varía de 0.04-0.1 gr. (2,7). Los síntomas agudos son (8): ardor faríngeo, bucal y epigástrico, salivación y calor, cefalalgia, vértigos, fotofobia, opresión, vómitos y algidez en las extremidades; la muerte se declara tras colapso y convulsiones que pueden durar de 10 minutos a algunas horas. La nicotina (5) actúa, como se ve, como paralizador del sistema nervioso y centro respiratorio. Puede provocar el aborto.

Dosis pequeñas (2) causan disnea, perspiración, transpiración y trastornos intestinales. La d-nicotina es 50 veces menos activa fisiológicamente que la l-nicotina natural. La nicotimina es muy venenosa con alta acción insecticida.

El tratamiento (8) en casos de intoxicación consiste en enemas de tanino o soluciones yodadas o al interior, respiración artificial, afusiones frías, café, alcanfor, amoníaco, se puede usar atropina.

### CLASIFICACION QUIMICA, ESTRUCTURA, SINTESIS, PROPIEDADES Y REACCIONES.

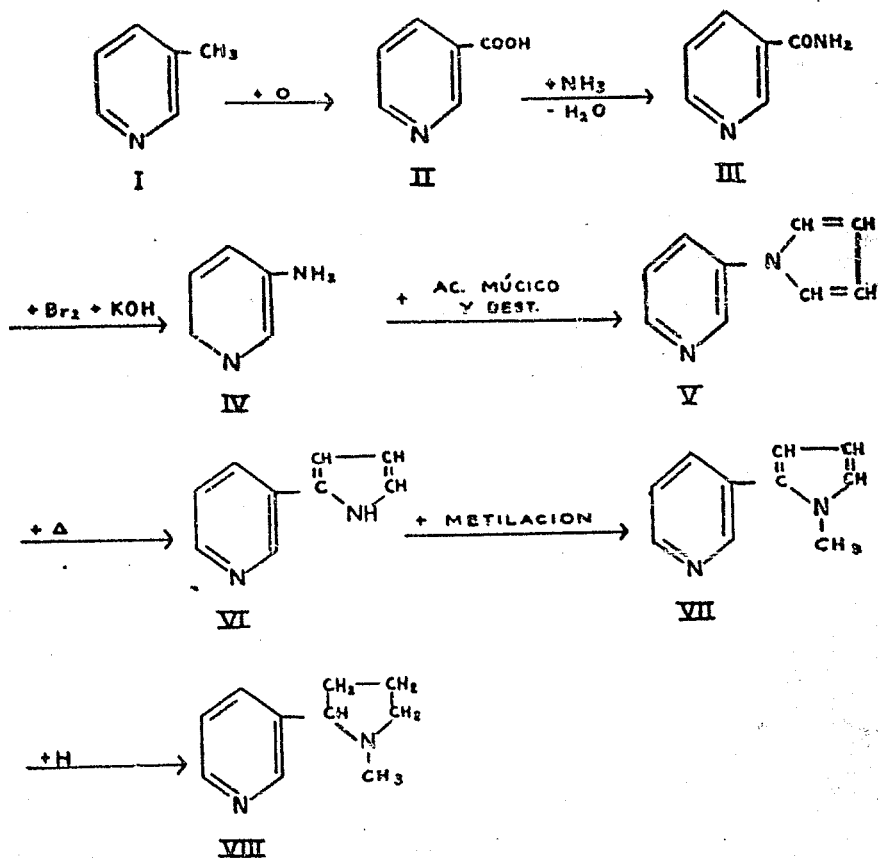
El principal alcaloide del tabaco es la nicotina. Recordaremos que no hay un criterio uniforme para la clasificación de alcaloides, en el caso particular de la nicotina, (10) como contiene un grupo pirrólico y un grupo piridinico, se suele clasificar en cualquiera de los dos grupos:-



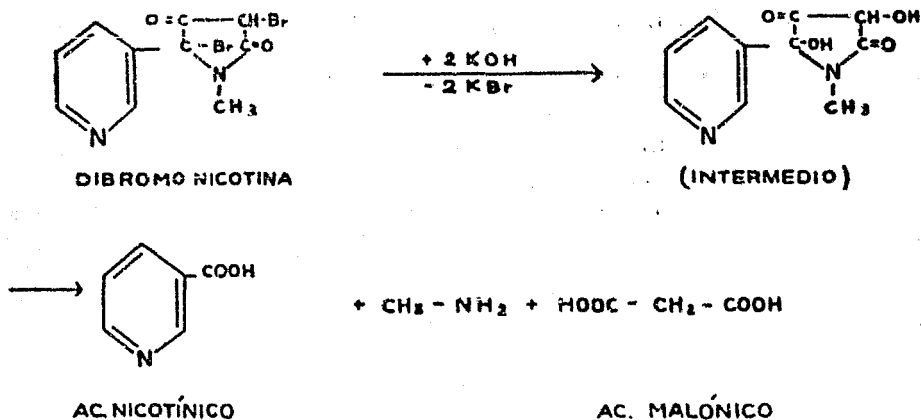
La estructura de este alcaloide fue dilucidada por Pictet (2,11) 1895-1904, este investigador partió de la  $\beta$ -picolina (1) que por oxi-

dación se transforma en ácido  $\beta$ -nicotínico (II) el cual con amoníaco dá la sal amónica y ésta calentada se transforma en la amida correspondiente (III). La amida por síntesis de Hoffman se transforma en la amina que corresponde (IV), ésta mezclada con ácido múxico y calentada hasta provocar la destilación da la  $\beta$ -n-pirrol piridina (V) que por nuevo calentamiento sufre una transposición dando la  $\beta$ - $\alpha$ -pirrol piridina (VI), la metilación de ésta fija el metilo en el N del pirrol formándose la nicotínica (VII) y ésta por hidrogenación selectiva dá la nicotina (VIII). Es conveniente hacer notar que esta última parte de la síntesis, la hidrogenación, fué la más difícil ya que necesitó para ella de los últimos cuatro años de su investigación.

A continuación se ponen las ecuaciones de ésta síntesis:

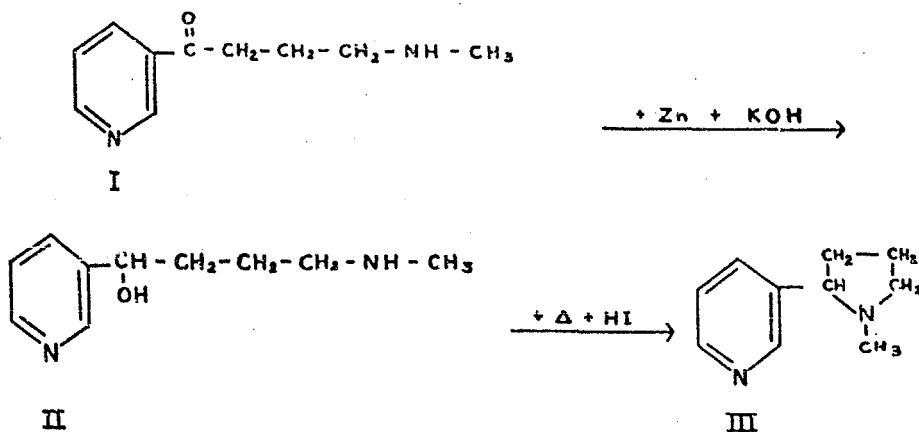


La unión del anillo piridinico (2) en la posición  $\alpha$  del núcleo pirrol se comprobó por degradación con  $\text{Br}_2$ .



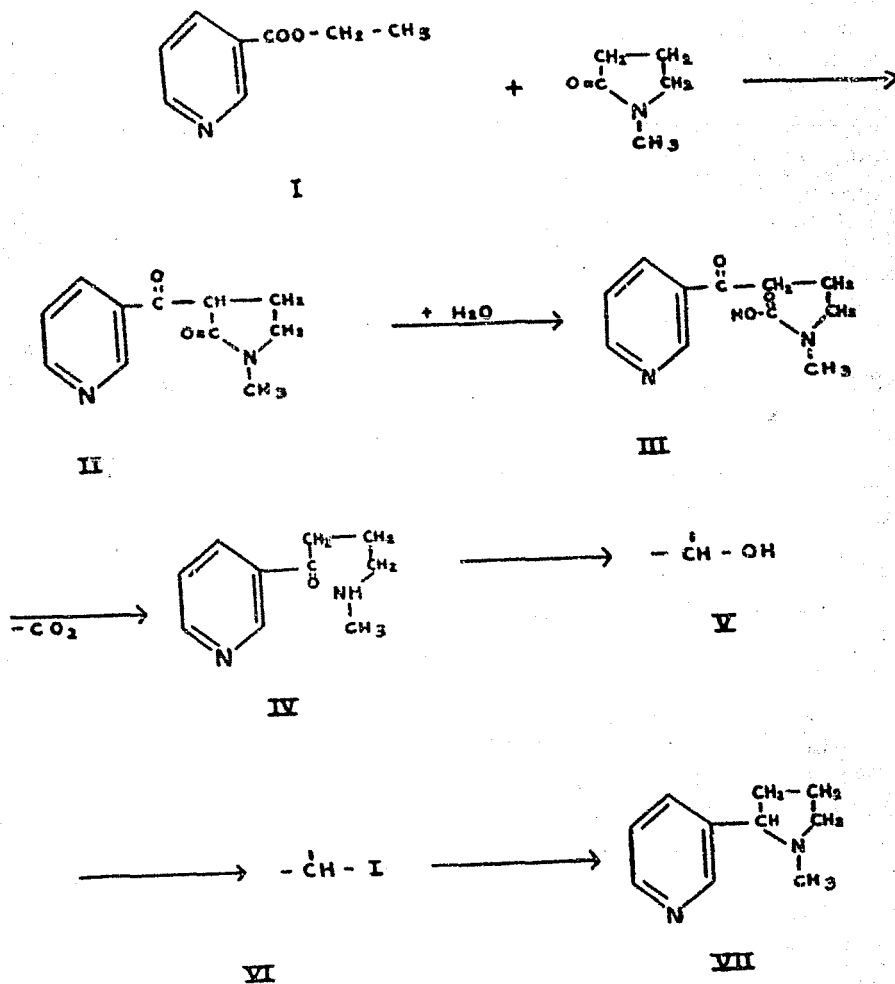
La aparición del ácido malónico de 3 carbonos muestra que el C que aparece en el grupo  $-\text{COOH}$  del ácido nicotínico debe ser el fin de una cadena de 4 C lo que es posible sólo si el núcleo pirrol está unido en posición  $\alpha$ .

Posteriormente ha sido sintetizada de diferente manera. Hill and Kelley (5) mencionan la síntesis a partir del  $\beta$ -metil amino butiril piridina (I), la que tratada con Zn y KOH dá el alcohol correspondiente (II)



y éste se cicliza bajo la acción del HI dando una mezcla de d-l-nicotina (III).

Otra síntesis (2). (Síntesis de Späth) parte del nicotinato de etilo (I) y la N-metil pirrolidona, que al reaccionar dan la  $\beta$ -piridil- $\beta$  n-metil- $\alpha$ -pirrolidónil cetona (II), que por hidrólisis (III), descarboxilación (IV), reducción con el alcohol correspondiente (V) y iodación (VI) dá la nicotina (VII).

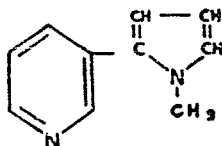


La nicotina tiene las propiedades generales de los alcaloides (12), por lo que se precipita de sus soluciones acuosas o ácidas por los llamados reactivos generales de los alcaloides: tanino, ácidos fosfomolibdico, fosfotúngstico, yodobismutato de K,  $K_2 [HgI_4]$ , lugol, etc.

La nicotina (2,3,4,5,8,10,13,14) es un líquido aceitoso transparente, incoloro, de olor fuerte semejante al del tabaco, que al oxidarse se vuelve pardo y espeso. Es soluble en  $H_2O$  a temperaturas menores de  $60^\circ C$ , alcohol, éter, trementina, en los ácidos diluidos con los que forma sales no volátiles parcialmente cristalizables. Es ópticamente activa, levógira de:  $[\alpha]_D^{20} = -166^\circ$  a  $-169.22^\circ$ . Sus sales son dextrógiras. A veces por síntesis (5) se obtiene la forma racémica, esto se puede resolver usando un ácido ópticamente activo. Tiene una densidad de  $D = 1.011 - 1.015$ . Su punto de ebullición es de:  $247^\circ - 249^\circ C$ . En el papel produce una mancha grasosa que se quita con el tiempo.

El  $H_2PtCl_6$ ,  $AuCl_3$ ,  $K_2 [HgI_4]$ , ácido tánico precipitan la nicotina de sus soluciones (13). En  $H_2SO_4$  la nicotina se disuelve sin coloración.

Con oxidantes (2) débiles se ataca el núcleo metil pirrol de la nicotina y resulta *nicotirina*, base intermedia que aparece en la síntesis de Pictet.



Los agentes oxidantes fuertes,  $HNO_3$ ,  $KMnO_4$  (2,5) la oxidan a ácido nicotínico. Esta reacción muestra que el anillo piridínico está unido en posición 3 ( $\beta$  al pirrólico).

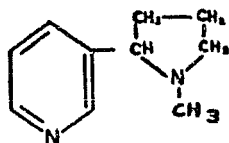
Si a una solución de una sal de nicotina se le agrega  $KOH$  ó  $NaOH$  y se agita con éter ó éter de petróleo, éstos extraen la nicotina que se recupera al evaporar el éter.

La nicotina (5) forma 2 diferentes monomethiodides, pero no forma acetil derivados con cloruro de acetilo, lo que demuestra que los 2 átomos de N deben ser terciarios.

En la tabla de Hagen (3) se mencionan como reactivos colorimétricos el  $HNO_3$  concentrado que dá con la nicotina coloración amarilla que vira el rojo primero, luego al violeta y finalmente se vuelve incolora; así como el reactivo de Fröhde (0.5gr. de molibdato de Na en 100 ml. de  $H_2SO_4$  concentrado) que dá coloración amarilla que vira al rosa.

## ALCALOIDES QUE ACOMPAÑAN A LA NICOTINA.

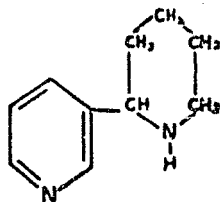
La nicotina es el alcaloide principal de la *Nicotiana tabacum*, L. en la que se encuentra de 0.6-9% (8,14). los tabacos de mejor calidad son los que contienen menor cantidad de este alcaloide.



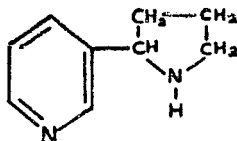
Ya en 1809 (8) Vauquelin había indicado la presencia de un principio picante y volátil en el tabaco; pero no fué descubierta hasta 1828 (14) por Posselt y Reiman, estudiada en 1891 por Blau y Pinner, sintetizada en 1895 por Pictet y posteriormente en 1904 (8) por Pinner, Blau, Wolffenstein y otros.

Pictet y Noga (2,14) han descrito la *nicotina* (p.e = 267), *isonicotina*, *nicotina*, *nicotelina* (p.e = 148), *nicotimina* (anabasina) (p.e = 150-155), *pirrolidina*, *N-metil-pirrolidina*; (15) *nornicotina* y *myosmina*, como alcaloides menores.

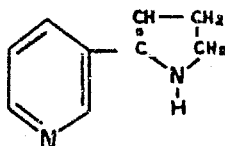
El más abundante (2) es la *nicotina* — según Ehrenstein debe ser una mezcla de 2 alcaloides—, ésta fué separada por cristalización fraccionada del picrato en *nornicotina* y 1- $\beta$ piridil- $\alpha$ -piperidina (fórmula dada por Pictet a la *nicotimina*).



La *nornicotina* puede prepararse por dimetilación de la *nicotina* o por síntesis total de la *piridina*, ambas, d y l-*nornicotina* se han encontrado en el tabaco.



Los constituyentes del humo del tabaco se han estudiado extensamente. Por lo menos 8 bases están presentes, de las cuales la miosmina y 3 sacratinas son responsables del aroma. La miosmina es el:  $\beta$ -piridil- $\alpha$ -pirolina.



## MÉTODOS ANALÍTICOS.

El método oficial para la determinación de la nicotina (16) está basado en la destilación con arrastre de vapor del tabaco o insecticidas en medio alcalino, con la posterior precipitación de la nicotina destilada con ácido silicotúngstico y calcinación.

Hay numerosas variantes de este método:

*Hans Brezina* (17).—Propone para evitar la solución salina y obtener mayor concentración de nicotina, pasar una corriente de vapor por una serie de matraces calentados a 102° C que contienen el problema. En esta forma se puede alcanzar una concentración hasta de 4% aunque no se agota la muestra.

\* *Karl Donyelmajer* (18).—Se puede hacer una extracción cuantitativa de la nicotina en solución acuosa alcalina con tricloro etileno. agitando esta solución con ácido sulfúrico diluido se recupera la nicotina.

*O. M. Shedd* (19).—Suprime la destilación de los métodos oficial y de Kissling por una extracción de la nicotina con éter, de éste se extrae con ácido y se completa como en los métodos anteriores. Es más rápido y tan exacto como el oficial.

\* *Hans Rundshagen* (20).—Este método es una modificación del de Tóth. Trata el tabaco con KOH, H<sub>2</sub>O y le agrega CaSO<sub>4</sub>, esta masa se trata con una mezcla de éter-éter de petróleo (1:1) para extraer la nicotina. Centrifugar, filtrar y titular el filtrado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1N usando iodesina como indicador.

*R. R. T. Young* (21).—Compara los métodos de Keller, Kissling y Tóth, modifica el de Keller. El tabaco lo agita con éter-éter de petróleo y KOH, filtra, toma una alícuota, le agrega álcali H<sub>2</sub>O y "cochineal" como



indicador, agrega con agitación un ligero exceso de HCl 0.1N y titula el exceso de HCl con NaOH 0.1N.

*L. Frank (22)*.—Alcaliniza el tabaco con KOH, extrae con éter-éter de petróleo, agita y deja reposar. Separa parte de la muestra y filtra por filtro cargado con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  fundido, lava con éter-éter de petróleo, destila éstos, extrae la masa verdosa con  $\text{H}_2\text{O}$  fría, filtra y titula con HCl 0.1N con rojo Congo como indicador.

*Yuzuru Okuda (23)*.—Destila la nicotina con arrastre de vapor y la recibe junto con el amoníaco en solución, ácida estándar. En una alícuota determina  $\text{NH}_3$  y nicotina con álcali estándar; en otra alícuota determina  $\text{NH}_3$  por titulación formal.

*J. Bodnár, Johann, Straub y Vitéz Ladislaus Nagy (24)*.—A la solución nicotina, éter-éter de petróleo, agregar HCl 0.01N,  $\text{H}_2\text{O}$  y una gota de rojo de metilo. Titular con NaON 0.01N hasta que aparezca color amarillo.

*J. Bodnár y Vitéz Ladislaus Nagy (25)*.—El tabaco verde se seca a  $95-97^\circ\text{C}$ , se pulveriza, se mezcla con NaOH y se extrae con éter-éter de petróleo, el extracto se filtra después de un tiempo de reposo, se le pasa aire para eliminar  $\text{NH}_3$ , se le añade  $\text{H}_2\text{O}$ , HCl 0.01N, rojo de metilo como indicador y se titula con NaOH 0.01N.

*James Burmann (26)*.—La muestra seca la alcaliniza con KOH ó NaOH, agita para eliminar  $\text{NH}_3$ , añade yeso, seca la masa con vacío, extrae con éter, filtra por filtro de pliegues, toma una alícuota y evapora el éter. Al residuo añade éter y agua a  $\text{pH} = 7$ , evapora el éter y titula con HCl 0.1N con púrpura de bromo cresol, compara el punto final con un estándar.

*B. Kasansky (27)*.—Destila como en el método oficial, afora a un volumen conocido, toma alícuotas, les añade  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y titula con ácido silicotúngstico. El reactivo lo estandariza con soluciones de nicotina pura.

*László, Nagy y Sándor Dickmann (28)*.—Determinan pequeñas cantidades de nicotina en cigarros y orina por precipitación con ácido silicotúngstico, disuelven el precipitado en cantidades conocidas de NaOH 0.01N y titulan el exceso de NaOH con HCl 0.01N con rojo de metilo.

*A. A. Shmuk y A. Borozdina (29)*.—Este método separa la nicotina de la nicotina con  $\text{HNO}_2$ , éste no afecta a la nicotina pero forma un compuesto nitroso con la nicotina, el cual no se precipita con ácido pícrico, filtra, lava el precipitado y titula la solución con NaOH 0.1N con fenoltaleína.

\* Nagy, István Vitéz. (30).—Este método es modificación del de Bodnár, lo hacen más exacto agitando en un agitador el polvo de tabaco con la mezcla extractiva y luego dejando reposar para evitar pérdida de la nicotina. Agregan  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{HCl}$  0.01N y titulan con  $\text{NaOH}$  0.01N.

(31) La nicotina se puede determinar por el método de Kjeldahl con periodo de digestión de 3-4 horas, y el Hg como catalizador.

N. S. Drozdov y V. P. Materanskaya (32).—Destilar la nicotina con vapor y neutralizar con ácido 0.1N frente a rojo de metilo, aforar, tomar alicuotas y precipitar con ácido picrico, reposar 1-2Hs a  $0^\circ\text{C}$ . Filtrar, lavar con  $\text{H}_2\text{O}$  helada, añadir  $\text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}_2$  ó  $\text{CHCl}_3$  y titular con azul de metileno 0.001N, el punto final es azul.

J. Bodnár e I. Porcsalmy (33).—El polvo de tabaco se alcaliniza con  $\text{NaOH}$ , se extrae con éter-éter de petróleo. Reposar, evaporar alicuotas y añadirles  $\text{H}_2\text{O}$  y rojo de metilo, titular con  $\text{HCl}$  0.01N. Nicotina y nornicotina se destilan juntas.

(8).—Secar el tabaco y pulverizarlo, añadir  $\text{NaOH}$  en solución alcohólica, dejar reposar, extraer con éter en un extractor de Soxhlet. Evaporar el éter, tratar el residuo con  $\text{NaOH}$  y destilar con vapor. Titular con  $\text{HCl}$  0.1N con ácido resólico ó luteol.

Forrest G. Houston (34).—Para separar la nicotina y nornicotina, Forrest empleó una columna de almidón. Pone la mezcla de alcaloides en la columna, lava con hexano y arrastra la nicotina, la nornicotina queda retenida en la columna de donde se quita con  $\text{HCCl}_3$ . Ambos alcaloides se titulan con  $\text{HCl}$  0.02N con verde de bromocresol.

Robert H. Cundiff and Peter C. Markunas. (35).—Este método determina nicotina, nornicotina y alcaloides totales del tabaco.

El tabaco se alcaliniza con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  se extrae con  $\text{HCCl}_3$  benceno, agitar, añadir celita y filtrar; tomar alicuotas, pasarles corriente de aire para eliminar  $\text{NH}_3$ , añadir anhídrido acético y cristal violeta, titular con  $\text{HClO}_4$  0.025 N hasta color verde como punto final.

Entre los métodos gravimétricos se encuentran los siguientes:

R. Sayre y E. Yanovsky (36).—Según este método la nicotina puede ser precipitada con ácido tánico o algún tanato de una infusión de tabaco previamente separado éste.

*Frederick D. Chattaway and George D. Parkes* (37).—Alcalinizar el tabaco con NaOH, extraer con éter en Soxhlet hasta agotar, destilar el éter, alcalinizar el residuo y destilar con vapor. Saturar el destilado con HCl y precipitar con solución de I<sub>2</sub> en HCl saturada de Cl<sub>2</sub>. El tetracloroyoduro de nicotina se sedimenta rápido como polvo microcristalino amarillo. Pasar el precipitado a crisoles tarados y secar a peso constante en desecador al vacío con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y CaO. El tetracloroyoduro de nicotina contiene 33.08% de ésta.

(38) Este método determina la nicotina como C<sub>10</sub> H<sub>14</sub> N<sub>2</sub>HgI<sub>2</sub>. Precipita la nicotina de una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con HgI<sub>2</sub> disuelto en Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, el precipitado lavado se reduce en solución alcalina con amalgama de Zn y el I<sub>2</sub> se determina por el método de Volhard. Es exacto aún en presencia de mucho NH<sub>3</sub>.

*W. Preiss* (39).—Preiss critica la no selectividad del ácido silicotúngstico y la naturaleza amorfa del precipitado; para cantidades pequeñas de nicotina (0.016 %) el método de Pfyl y Schmitt es satisfactorio si en vez de 1/3 del destilador se trata todo con exceso de HCl 0.1N, se concentra en baño de vapor y se precipita la nicotina total como dipicrato. Discute el uso del NaCl MgO y destilación con vapor.

*Constantin Pyriki* (40).—En vez de MgO sugerido en el proceso de Pfyl y Schmitt es conveniente usar K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ó NaOH y mejor aún la última, pues el K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> no siempre desaloja toda la nicotina en 300 ml. de destilado.

*M. G. Ruitikov* (41).—Destila por el método oficial, precipita con H<sub>8</sub>[Si(W<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>4</sub>] 2H<sub>2</sub>O, calentar el precipitado 3' a 85°C reposar 2 Hs. filtrar y calcinar como en el oficial 1/3 del tiempo del método de Javillier.

*N. H. Pizer* (42).—Igual al oficial, sólo que calcina a 1000°C sin pérdida aparente de WO<sub>3</sub>.

*W. Hämmerle y W. Weber* (43).—Igual al oficial sólo que después de precipitar calienta 5' a 80°C y reposa 3 Hs. en el refrigerador, filtrar, calcinar y pesar como el oficial.

*Joseph R. Spies* (44).—Este método es aplicable a determinaciones que tienen de 0.1-0.5 mg de nicotina.

Igual al oficial, pero lava el precipitado con HCl 0.05N (La solubilidad del silicotungstato de nicotina es mínima a esta concentración) y pasa el filtro a crisoles hervidos con HNO<sub>3</sub> y tarados, calcina a 650°C (a

mayor temperatura se perdería  $\text{SiO}_2 \cdot 12\text{W0}_3$ ) por 30' y se enfrían 2 Hs. en el desecador. Pesar.

*A. W. Avens y G. W. Pearce* (45).—Los autores estudian los errores del método oficial: retención del reactivo en el filtro, efecto de la temperatura en la solubilidad del precipitado. La temperatura, según Avens y Pearce, de digestión debe ser de 0.-10°C, el filtro C.S. y S No. 589 y los lavados con  $\text{HCl}$  1:2000.

Los resultados son un poco más altos que en el método oficial.

*Ts. Staiikov* (46).—Se determina por el método de Pfyl Schmitt (C.A.22-1214). El dipicrato se seca y pesa en crisoles tarados.

*C. V. Bowden y W. F. Barthel* (47).—Destila como en el oficial. Del destilado una alícuota se sigue por el oficial y otra se trata con  $\text{HNO}_3$ , se destila con arrastre de vapor, se precipita con ácido silicotúngstico y se sigue como la anterior, el objeto de esta 2a. muestra es aislar la nornicotina que se determina por diferencia. El método es útil cuando está presente la nornicotina.

*Manfredo Brichta* (48).—Destila como el oficial, evapora a 150 ml., precipita con ácido silico molibdicó (dá precipitado amarillo verdoso de composición constante,  $(\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2)_2 \cdot \text{SiO}_3 \cdot 12\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , filtra, lava con  $\text{HNO}_3$  al 0.5 %, seca a 110-120°C y pesa.

*R. B. Griffith y R. N. Jeffrey* (49).—Señalan un nuevo aparato en el que destilan en 5-7 minutos con un volumen final de destilado de 75-250 ml. De aquí se toman alícuotas para la precipitación con ácido silicotúngstico. Usan crisoles Silas en vez de Gooch, pues facilitan las operaciones sin disminuir la exactitud.

*C. L. Ogg, C. O. Willits y Constantine Ricciati* (50).—Este método hace mínimo el efecto de la interferencia por las sales de amonio.

Destilar por el oficial. Tomar alícuotas, añadirles  $\text{HCl}$  y ácido silicotúngstico, calentar el precipitado en baño de vapor por 0-30 minutos hasta disolución del mismo, llevar al refrigerador a 5°C por 18 horas. Pasar el precipitado a crisol de Gooch tarado, calcinar primero a 650°C por 2 horas y luego a 800°C por 15 minutos. Pesar.

Entre los métodos cromatográficos y colorimétricos están los siguientes:

*László Barta y Zoltán Marschek* (51).—Al tabaco picado agregar solución de bromocianina y solución alcohólica de  $\beta$ -naftil-amina, agitar y dejar reposar. Filtrar y determinar la intensidad del color en el colorímetro por comparación con soluciones estándar de nicotina.

*A. S. Borozdina* (52).—Extraer tabaco con NaOH y  $C_6H_6$ , agitar, sedimentar y a una alícuota de la solución añadir  $H_2SO_4$  0.1N, agitar, separar la capa ácida y repetir ésta extracción. De los extractos tomar porciones, añadirles rojo de metilo y titular con NaOH 0.1N. Agregar NaOH en cantidad igual a la usada en la titulación, al residuo de los extractos ácidos añadir agua saturada de anilina y BrCN, dejar reposar. Comparar el color desarrollado con estándares conocidos.

*Louis Feinstein y E. T. McCabe* (53).—Sánchez en su método usa vainillina y HCl concentrado, el color varía del rojo rosa a rojo cereza obscuro, de acuerdo con la concentración de nicotina.

El método modificado deshidrogena la nicotina con negro de Pt y calienta cuidando que el alcaloide se evapore, dejar enfriar, agregar  $H_2O$  destilada y filtrar. A una porción del filtrado agregar  $H_3PO_4$  y vainillina (.5 de vainillina en 100 ml. de  $H_3PO_4$  al 85%), notar el cambio de color.

Otra modificación es usando el reactivo de Meltzer  $CS_2 \cdot CH_3 \cdot CH_2 \cdot OH$  y  $CuSO_4$ . La nicotina da solución blanca o ligeramente turbia, la nor nicotina y nicotimina una solución café negruzca.

*J. Cuzin y D. Schwartz* (54).—La nicotina en las hojas verdes se puede determinar usando BrCN y bencidina para desarrollar un color que se lee en el fotocolorímetro con luz de 4300 Å.

*Lee Leiserson and Thomas B. Walker* (55).—Los alcaloides del tabaco (humo, cigarros, etc.) se pueden separar rociando el papel cromatográfico con una solución buffer de acetato con pH = 5.6. Al papel se aplican las soluciones de tabaco y se revela con butanol. El cromatograma se seca al aire y aparecen manchas coloreadas donde se han depositado los alcaloides por el revelador.

*R. N. Jeffrey y W. H. Eoff* (56).—Por este método se determinan los distintos alcaloides y la proporción aproximada en que se encuentran en el tabaco. El papel cromatográfico tratado con solución buffer de fosfato a pH = 6.5 se pone sobre las hojas del tabaco maceradas con acetona, dejar reposar, tratar con alcohol y solución buffer de acetato pH = 5.6 y luego en tanques con BrCN. Secar a la luz fluorescente o del día. La nico-

tina produce manchas amarillo limón; nicotimina amarilla que se vuelve rosada con el reposo; nornicotina amarilla.

Hay otros métodos: polarimétricos, refractométricos, espectrofotométricos, conductométricos, por absorción ultravioleta etc., entre ellos están:

*A. Tingle y A. A. Ferguson (57).*—Este método toma muestras grandes de tabaco, alcaliniza  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  y destila con arrastre de vapor, el destilado acidificado lo concentra en baño de vapor, esta solución se precipita con  $\text{KOH}$  y se clarifica con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  sedimentar, decantar y examinar el líquido en un polarímetro.

El destilado en vez de acidificarse se puede extraer la nicotina con  $\text{HCl}_3$ , los extractos se acidifican con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  N y se leen.

*P. J. Fryer y C. H. Fryer (58).*—Para la determinación de la nicotina comercial, se toma el índice de refracción de las soluciones y comparan las lecturas en registros tabulados que dan el % de nicotina. El  $\text{NH}_3$ ,  $\text{OH}$  alcalinos o carbonatos no interfieren. Según los autores este método es superior al polarimétrico.

*P. S. Larson y H. B. Haag (59).*—La nicotina y nornicotina en mezclas se pueden determinar por las diferentes reacciones con  $\text{BrCN}$ . Las lecturas se toman en el espectrofotómetro.

*R. Ripau Tilić y F. Cristea (60).*—Por el método conductométrico de estos autores es posible determinar la nicotina en soluciones ácidas y alcalinas, lo han demostrado por las medidas conductométricas dadas después de la inmediata formación del compuesto  $2\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot [\text{Si}(\text{W}_2\text{O}_7)_6] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , difícilmente soluble en agua en el cual se determina la nicotina.

*B. Rama Moorthy, B. C. Chatterjee, C. Dakshinamurti y K. C. Gulati (61).*—De la nicotina destilada se determina ésta por su máxima absorción ultravioleta a 259Å.

Entre los métodos nefelométricos para la determinación de nicotina están los que a continuación se dan:

(62).—Este método se basa en la turbidez blanca que produce el ácido silicorúngstico cuando se agrega a una solución diluida, neutra o ácida de nicotina. Esta turbidez puede ser determinada nefelométricamente. Se encontró que las soluciones en  $\text{HCl}$  0.005 N son más exactas pues hay menor solubilidad del precipitado.

*Tokuichiro Kozu* (63).—Añadir ácido silicotúngstico a una solución diluida, neutra o ácida de nicotina; disolver el precipitado por calentamiento, enfriar, añadir solución reciente de almidón como coloide protector, reposar y determinar la turbidez en el nefelómetro. El método es exacto y sensible.

*K. B. Trifonova* (64).—Tomar cantidades iguales de una solución estandar de nicotina y de problema, añadir solución de HCl y ácido silicotúngstico hasta obtener la misma opalescencia en el problema y el estandar. Los resultados son satisfactorios.

*A. Verda y E. Herzfeld* (65).—Destilar el tabaco con vapor, recibir el destilado en goma arábiga, mezclar y tomar 2 porciones de 5 ml., añadir a cada una 5 ml. de goma arábiga al 1 %, mezclar, tomar 5 ml. y añadir otros 5 ml. de goma y así sucesivamente, cada tubo representa la mitad del anterior. Añadir a cada uno 5 ml de ácido silicotúngstico hasta donde no haya opalescencia. Comparar con estándares.

*L. N. Markwood* (66).—Precipitar una solución de nicotina con ácido fóstofúngstico ( $P_2O_5 \cdot 24 WO_3 \cdot 24 H_2O$ ), aclarar la suspensión por calentamiento, enfriar, reposar y leer en el fotoelectrofotómetro, al que se ha determinado una curva con soluciones estandar.

*C. Rinthakul y J. Hannen* (67).—Destilar la nicotina por el método oficial, del destilado hacer extracciones con petróleo, tratar el extracto con HCl y aforar. Tomar alícuotas, añadirles azul de bromotimol 0.04 % y buffer a pH = 5, agitar con  $CHCl_3$ . La nicotina se determina por el examen del  $CHCl_3$  coloreado en un absorciómetro Spekker con filtro violeta No. 601.

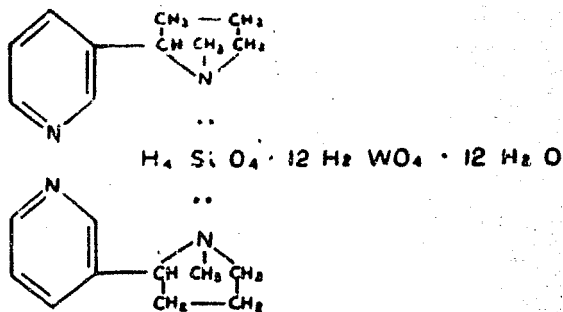
*C. O. Willits, Margaret L. Swain, J. A. Connelly y B. A. Brice* (68).—El destilado por el método oficial se diluye y acidifica hasta densidades observadas con longitud de onda de 326 y 259  $m\mu$ , que varíen de 0.2-0.8. Se corren solución estandar de nicotina y agua destilada acidificada como blanco. La densidad en una celda de 1 cm. a 236  $m\mu$  será la variación específica.

### III.—TRABAJO EXPERIMENTAL

#### PRIMERA PARTE.

#### DESCRIPCION DEL METODO OFICIAL.

El método oficial está basado en la precipitación estequiométrica de una solución de nicotina en un medio ligeramente ácido con ácido silicotúngstico ésta precipitación ocurre en relación de 2 moléculas de nicotina por una de ácido silicotúngstico. (16-69).





**Método.**—Montar un aparato para destilación con arrastre de vapor con matraz de Kjeldahl y bulbo de trampa. Pesar muestras de tabaco (secado en la estufa por 3 Hs. a 115°C) de 2-3 gr. y colocarlas en el matraz Kjeldahl, añadir ahí 6 gr. de MgO, unos pedacitos de piedra pomez y un poco de parafina (para evitar que haga espuma) añadir de 50-75 ml. de H<sub>2</sub>O dest. Comenzar la destilación y recibir el destilado en un vaso de 800 a 1000 ml. que tenga 10 ml. de HCl al 20% (la punta del refrigerante debe quedar en la solución). Destilar lo más rápidamente posible. Cuando haya destilado un volumen de 500-600 ml. probar unas gotas del destilado con ácido silicotúngstico, si no hay precipitación, suspender la destilación. Aforar el destilado a 1000 ml. de ahí tomar 250 ml. y precipitar con 7.5 ml. de HCl al 20% y 7.5 ml. de ácido silicotúngstico. (4H<sub>2</sub>O.SiO<sub>2</sub>. 12WO<sub>3</sub>. 22H<sub>2</sub>O P.m = 3,311.516, los 4H<sub>2</sub>O. SiO<sub>2</sub>. 10WO<sub>3</sub>. 3H<sub>2</sub>O y 4H<sub>2</sub>O.SiO<sub>2</sub>. 12WO<sub>3</sub>. 20H<sub>2</sub>O no deben usarse pues no dan precipitados cristalinos con la nicotina) al 12%, agitar y dejar reposar de 18 a 24 horas.

Al cabo de ese tiempo filtrar a través de filtro de cenizas conocidas (No. 40), lavar el precipitado con HCl 1:1000 hasta que unas gotas del destilado no den precipitado con unas gotas de la solución de nicotina. Calcinar el filtro y llevar a peso constante en la mufla a 1000°C. Pueden usarse crisoles de níquel, platino o de porcelana. Para el cálculo de los resultados (16.69) se emplea el factor empírico 0.1141.

$$\% = \frac{P \times F \times 1000 \times 100}{V \times M}$$

Para encontrar la relación estequiométrica en que se verifica la reacción se utilizó la fórmula:

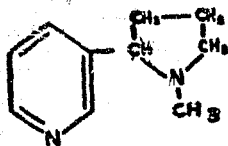
$$F = \frac{P \times N}{\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3}$$

F = Factor empírico.

P = Peso molecular de la nicotina.

n = A número de moléculas de nicotina.

$$F = 0.1141$$



$$\begin{aligned} C &= 12.01 \times 10 = 120.1 \\ H &= 1.008 \times 15 = 15.12 \\ N &= 14.008 \times 2 = 28.016 \\ \hline &163.236 \end{aligned}$$

$$P = 163.236$$

$$\begin{aligned} W &= 183.92 \times 12 = 2207.04 \\ Si &= 28.06 \times 1 = 28.06 \\ O &= 16.00 \times 38 = 608.00 \\ \hline &2843.10 \end{aligned}$$

$$SiO_2 \cdot 12WO_3 = 2843.10$$

$$\therefore 0.1141 = \frac{163.236 \times n}{2843.10}$$

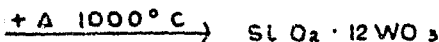
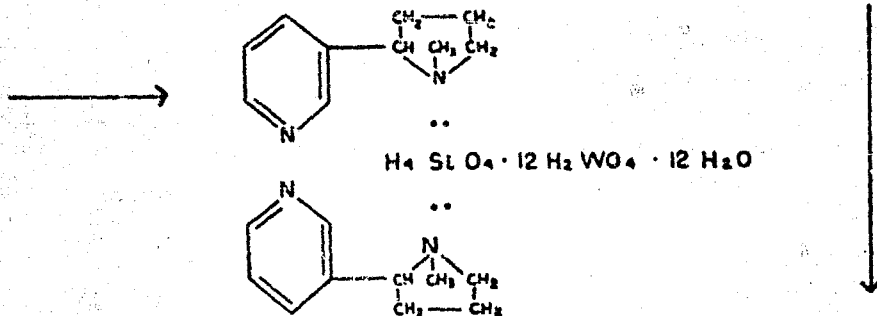
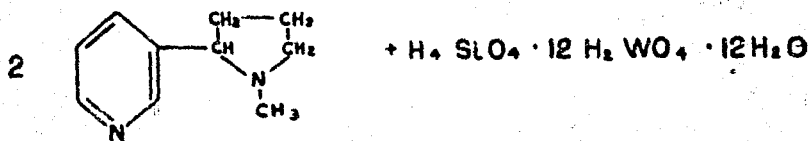
$$2843.10 \times 0.1141 = 163.236 n$$

$$324.39771 = 163.236 n$$

$$n = \frac{324.39771}{163.236} = 1.98$$

$$n = 1.98$$

De donde resulta que reaccionan en relación de una molécula de ácido silicotúngstico por dos moléculas de nicotina. La relación se puede interpretar por la reacción:



### DESCRIPCION DETALLADA DEL METODO DE ROBINSON. COLORIMETRO.

*Preparación de la muestra.*—(70) Las muestras de tabaco se pasan por un molino chico de Wiley. Los valores de humedad (3 horas a 100°C en estufa de aire) se determinan antes y después de pulverizar si se desean reportar los valores de la nicotina en la muestra como se recibió. Los insecticidas líquidos se pesan en un tubo pequeño y luego se trasvasan con un poco de agua en matraces volumétricos, se diluyen a un volumen conocido, se mezclan y filtran. Los insecticidas en polvo pueden ser tratados como los polvos de tabaco.

*Reactivos.* — a).—Reactivo de Valser.—Disolver 70 grs. de HgI<sub>2</sub> en una solución de 50 gr. de KI en H<sub>2</sub>O destilada. Añadir 5 ml. de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N y diluir a 500 ml. Agregar 1 ml. de solución recientemente prepa-

rada de almidón al reactivo, el que indicará la presencia de  $I_2$  libre. éste se puede quitar con unas pocas gotas de  $Na_2S_2O_3$  0.1N.

b) —  $H_2SO_4$  10N

c) —  $H_2SO_4$  0.2N

d) — Solución de almidón al 1%

e) — Salicilato de nicotina (eudermol).

*Solución estándar de Nicotina.*—Destilar una cantidad de salicilato de nicotina de una solución de NaOH al 30% en el aparato de Clough, con una concentración suficiente para dar un destilado que cuando se diluye a un volumen conocido tenga una concentración exacta de 50 y de nicotina pura por ml. en  $H_2SO_4$  0.2N.

*Procedimiento.*—Colocar en un matraz Kjeldahl de 100 ml. una cantidad de tabaco en polvo o insecticida que se suponga contiene 7.5 mg. de nicotina, añadir 30 ml. de NaOH al 30%. En el micro-Kjeldahl de destilación, destilar tan rápido como sea posible, el destilado recibirlo en un matraz volumétrico de 250 ml. que contenga 5 ml. de  $H_2SO_4$  10N. El volumen de la suspensión de tabaco en la cámara de destilación debe gradualmente disminuir a cerca de 10 ml. durante la destilación, si no, calentar el fondo del matraz que contiene la muestra con un micro mechero Bunsen. La punta del condensador debe estar sumergida en el ácido. La destilación se detiene a los 30' o antes de alcanzar la marca de aforación en el matraz volumétrico, (ésto sucede casi siempre). El destilado se diluye a un volumen conocido con  $H_2O$  destilada y se mezcla.

Alicuotas de 3 ml. en triplicado se colocan en celdas de absorción cilíndricas de 25 ml. y 23 mm. de diámetro. Alicuotas de 3 ml. de solución estándar de nicotina, también en triplicado se colocan en otras celdas. Se prepara una celda en blanco que contenga 3 ml. de  $H_2SO_4$  0.2N.

Agregar a cada tubo 2 ml. de solución de almidón al 1% y 17 ml. de agua. Tapar los tubos con tapón de hule y mezclar por inversión.

A intervalos de 30" agregar sucesivamente a cada celda un ml. de reactivo de Valsen, mezclar por inversión y leer en el espectrofotómetro exactamente 10 minutos después (tomados en la primera adición de precipitante), leer la absorción de cada celda con intervalos de 30" en el mismo orden en que se precipitó, con el tubo en blanco que no contiene nicotina

ajustar el cero de absorción. El filtro 525 y la luz de intensidad B, se encontraron satisfactorios en el electrofotómetro de Fisher.

Cuando los valores de absorción encontrados quedaban en la porción en línea recta de la curva de calibración (4-8  $\gamma$  de nicotina por ml.) la media aritmética de la determinación por triplicado se usa para calcular el % de nicotina de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ nicotina} = \frac{0.00015 \times A_x \times V \times 100}{\text{peso de la muestra} \times [0.529 (A_k - A_x) + A_k] \times 3}$$

donde: 0.529 ( $A_k - A_x$ ) es un factor empírico derivado para corregir la solubilidad del yodomercurato de nicotina a 26°C.

$A_x$  = Absorción de la suspensión de la muestra.

$A_k$  = Absorción de la solución estandar de nicotina (equivalente a 0.000150 gr. de nicotina).

$V$  = Volúmen final del destilado (250 ml.).

**MODIFICACIONES DEL METODO DE ROBINSON.**—Para la solución estandar se empleó sulfato de nicotina en vez de salicilato.

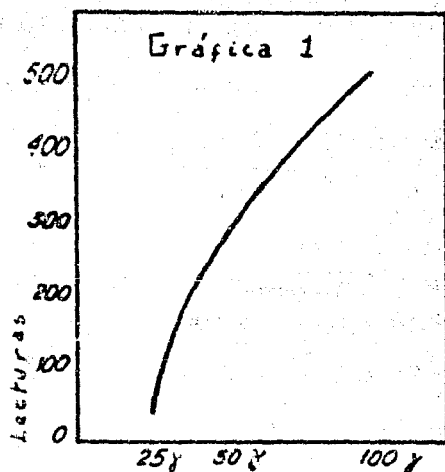
Como no se encontró el aparato de Clough en el mercado las soluciones se obtuvieron por el método oficial.

De la solución aforada a 1000 ml. se tomaron partes alicuotas de 9 ml. por duplicado, se pusieron en vaso de precipitado de 100 ml. Simultáneamente se tomaron un estandar y un blanco conteniendo el primero 9 ml. de solución de nicotina y al 2º 9 ml. de  $H_2SO_4$  0.2N.

A cada vaso se le agregaron 6 ml. de solución de almidón al 1% (71) y 51 ml. de  $H_2O$  destilada, se agita.

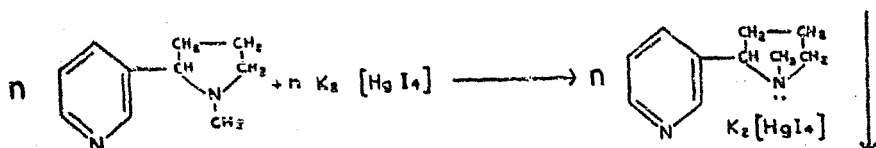
A intervalos de 30" se agregan a cada vaso 3 ml. de reactivo de Valseser, se mezcla, se deja reaccionar durante 9'30", se vacía a la celda industrial del fotocolorímetro de Klett-Summerson modelo 900.3, empleando un espesor de problema de 25 mm. y filtro verde No. 54 para longitud de onda de 500-700  $m\mu$ .

Para evitar el uso del factor se construyó una curva de referencia para 25, 50 y 100 $\gamma$ .



Se había pensado utilizar simultáneamente soluciones tipo y la gráfica para investigar el grado de seguridad de ésta.

**INTERPRETACION DE LAS REACCIONES.**—El reactivo de Valser (70) es una solución de yodomercurato de potasio  $K_2 [Hg I_4]$  que reacciona con la nicotina según la ecuación



El precipitado que se forma se flocula y sedimenta en forma relativamente rápida lo que dificulta la lectura, esto se evita en parte, si se trabaja a temperaturas altas, con el empleo del almidón (o glucosa o sucrosa según Robinson (70)). A bajas temperaturas el precipitado es suficientemente estable.

**ESTUDIO DE LA RELACION  $HgI_2-KI$ .**—Los alcaloides tienen la propiedad de ser precipitados por los metales pesados. La precipitación de la nicotina en el método de Robinson (70) se basa en esta propiedad, pues usa el reactivo de Valser que es una solución de yodomercurato de po-

tasio  $K_2 [HgI_4]$ , la relación de  $HgI_2$  - KI debe de ser estequiométrica y el reactivo de Völsner que tiene 70 gr. de  $HgI_2$  y 50 gr. de KI sigue esta relación:

$$\begin{array}{r} Hg - 200.6 \times 1 = 200.6 \\ I - 126.93 \times 2 = 253.86 \\ \hline 454.46 \end{array}$$

$$Pm/HgI_2 = \frac{454.46}{1}$$

$$\begin{array}{r} K - 39.10 \times 1 = 39.10 \\ I - 126.93 \times 1 = 126.93 \\ \hline 166.03 \end{array}$$

$$Pm/KI = \frac{166.03}{1}$$

$$\frac{HgI_2 \times 2KI}{454 \quad 166 \times 2} > K_2 [HgI_4]$$

$$\frac{332}{454}$$

$$454 - 332$$

$$70 - x = \frac{332 \times 70}{454} = 51 \text{ gr./KI}$$

Se propuso estudiar otras relaciones  $HgI_2$  - KI, para ver los efectos en la precipitación. Estas relaciones fueron

TABLA No. 1

	$HgI_2$	KI	Relación molar	
1	70	50	1	2
2	70	70	1	2.8
3	70	100	1	4

La cantidad de KI no puede disminuirse de 50 gr. porque con cantidades menores ya no se disuelve el  $HgI_2$ .

Los resultados fueron:

TABLA No. 2

		10'	11'	12'		10'	11'	12'
1	100 $\gamma$	520	520	520	2	410	410	400
1	150 $\gamma$	550	550	540	2	430	430	425

Por las tablas se vé que la relación No. 1 es la más apropiada (Reactivo de Valser). La relación No. 2 dá lecturas un poco más bajas y la relación No. 3 no precipita la solución de nicotina en ninguna concentración.

Estos valores están hechos a temperaturas arriba de 20°C, sin control.

### ESTUDIO DE LA RELACION DE DILUCION.

Se ensayó la importancia que puede tener la variación de dilución, para ésto se hicieron 3 corridas con las cantidades indicadas en la tabla.

TABLA No. 3

	Prob.	Alm.	H <sub>2</sub> O	R. de Valser
1.—	9 ml.	6 ml.	40 ml.	3 ml.
2.—	9 "	6 "	51 "	3 "
2.—	9 "	6 "	60 "	3 "

Trabajando a la temperatura de 5°C. se obtuvieron los resultados siguientes:



**TABLA No. 4**

Dil.		T°C	10'	11'	12'	13'	14'
1.—	100 γ	5°	710	710	710	710	710
2.—	100 γ	5°	710	710	710	710	710
3.—	100 γ	5°	680	680	680	680	680

De donde se vé que un aumento de concentración no modifica las lecturas y que en cambio la dilución las hace más pequeñas, es decir, que la técnica de Robinson está en el límite máximo de dilución.

#### ESTUDIO DE LA CANTIDAD DE ALMIDON.

Las micelas del almidón actúan como coloide protector englobando las partículas del precipitado, entonces por la repulsión, debida a la carga eléctrica igual de las micelas disminuye la velocidad de sedimentación.

Para comprobar se utilizaron soluciones de 100 y 150 γ de nicotina por ml. y se trabajó a la temperatura ambiente con los siguientes resultados:

**TABLA No. 5**

	almidón	7'	8'	9'	10'
100 γ	nada	77	77	75	72
100 γ	6 ml.	570	520	500	490
150 γ	nada	120	120	118	118
150 γ	6 ml.	610	600	590	575

En la práctica se vió que a temperatura de 20°C o más sí tenía influencia esta acción protectora, mientras que a temperaturas de 3-5°C las lecturas fueron iguales sin almidón o con cantidades variables de él.

TABLA No. 6

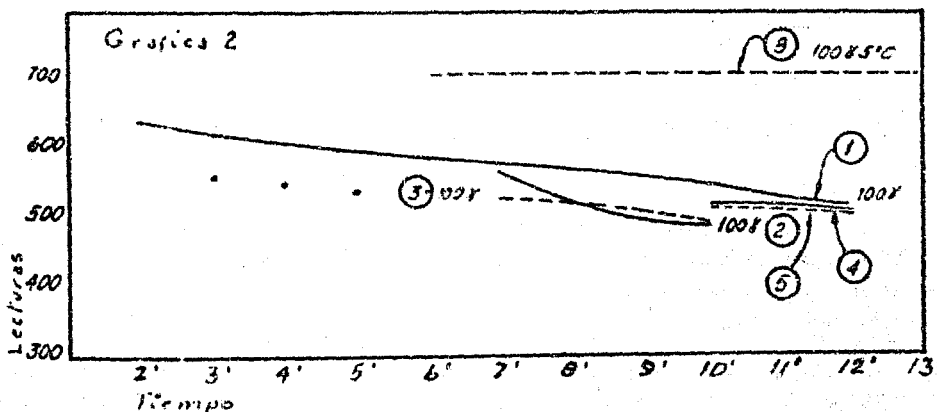
	almidón	T°C	10'	11'	12'	13'	14'
100 γ	nada	5°	710	710	705	705	705
100 γ	6 ml.	5°	710	710	710	710	705
100 γ	8 ml.	5°	710	710	710	705	700

ESTUDIO DE TIEMPO PARA LAS LECTURAS.

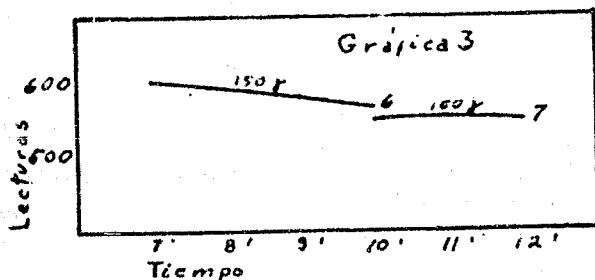
La reacción entre la nicotina y el reactivo de Valser parece ser instantánea o a lo menos muy rápida porque ya a los 2' se obtienen lecturas que van disminuyendo a medida que pasa el tiempo, así se observa en las siguientes tablas y en las gráficas 2 y 3.

TABLA No. 7

	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'
1.-100 γ	640	620	610	600	590	580	570	560	550	530	520
2.-100 γ						570	520	500	490		
3.-100 γ		560	550	540	540	530	520	510	495		
4.-100 γ									520	520	510
5.-100 γ									520	510	500



	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'
6.-150 y						610	600	580	575		
7.-150 y									560	560	555
.-150 y									550	550	540



En las gráficas se observa que a la temperatura ambiente no hay mucha regularidad entre la lectura y el tiempo; así únicamente las curvas 1 y 3 tienen pendientes prácticamente constantes, en cambio la curva 2 cae rápidamente entre los 7 y los 8'.

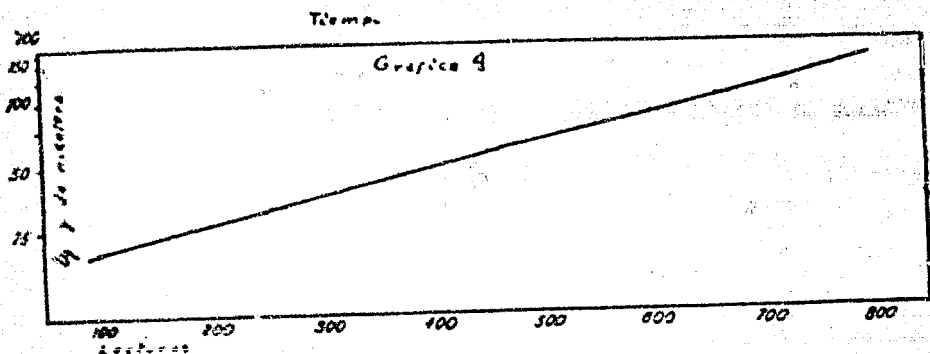
Esto no sucede si se trabaja a temperatura de 3 a 5°C como se ve en la línea 8 de la gráfica 2, que permanece a igual valor desde los 7 hasta los 14'.

Por conveniencia operatoria se continuó tomando la lectura a los 10'.

## RESUMEN Y CONSECUENCIAS DE LOS PUNTOS ANTERIORES.

De los estudios anteriores resultó que en el método de Robinson se habían encontrado las óptimas condiciones de trabajo ya que únicamente podrían variarse con alguna ventaja la dilución, trabajando con soluciones más concentradas y el tiempo, ya que se podrían hacer lecturas desde los 2'.

Con los datos obtenidos se construyó la gráfica No. 4 que se pensó utilizar para la determinación de nicotina en el tabaco.



## SEGUNDA PARTE.

### RESULTADO CON LOS PRIMEROS ANALISIS DE TABACO.

Al hacer el primer análisis del tabaco corriendo simultáneamente un estándar, resultó que el valor obtenido con la gráfica, difería mucho del referido al estándar, además repitiendo la valoración los resultados eran bastante dispersos, por esto se pensó que debía existir un factor perturbador y el único probable parecía la temperatura porque las experiencias de la primera parte se efectuaron en la tarde y en días en los que la temperatura era más o menos la misma; en cambio, las primeras valoraciones de nicotina se hicieron a veces en la mañana, a veces en la tarde y en días en los que la variación térmica llegaba hasta a  $10^{\circ}\text{C}$ .

Para comprobar la hipótesis anterior se hicieron nuevas titulaciones a las temperaturas de 5, 10 y  $20^{\circ}\text{C}$ .

### ESTUDIO DEL FACTOR TEMPERATURA.

Para poder trabajar a las temperaturas de 5, 10 y  $20^{\circ}\text{C}$ , se usaron baños enfriadores a temperatura constante y en los que se enfriaban tanto los problemas como los estándares, muestras en blanco y reactivo de Valser.

Al final de la valoración se media la temperatura de nuevo y nunca fué superior a 3°C de diferencia.

**TABLA DE CONCENTRACION Y TEMPERATURAS.**

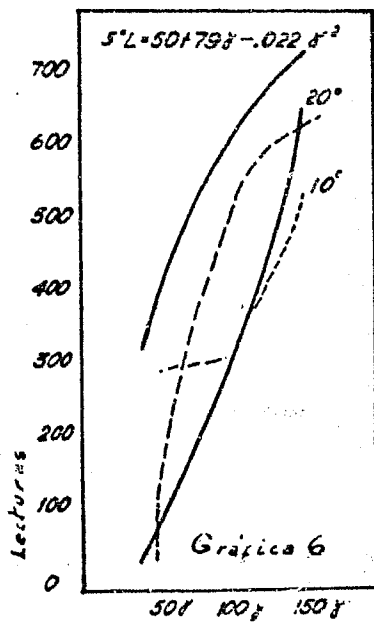
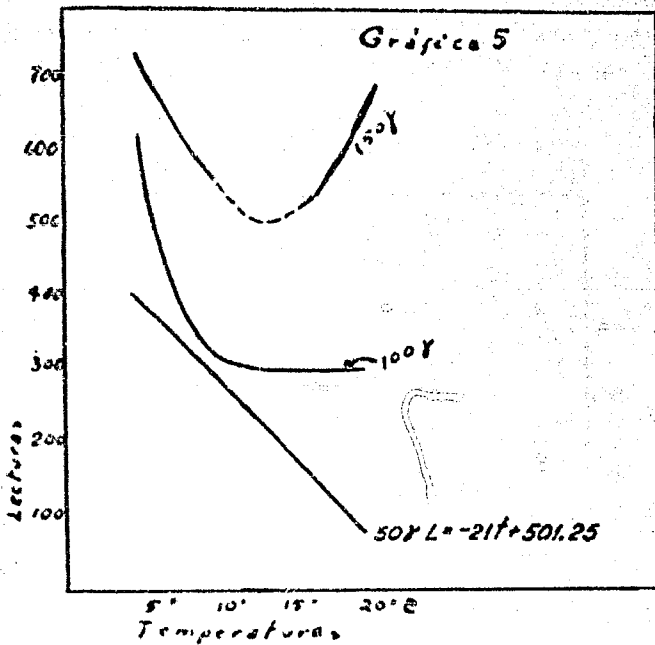
**TABLA No. 8**

	T°C	10'	11'	12'	13'	14'
50 γ	5°	390	390	380	375	360
50 γ	10°	330	300	260	206	155
50 γ	20°	85	80	80	80	75
100 γ	5°	710	710	710	710	705
100 γ	10°	670	670	670	650	640
100 γ	20°	550	485	350	185	160
150 γ	5°	740	740	700	680	650
150 γ	10°	650	630	610	550	440
150 γ	20°	570	450	375	375	360

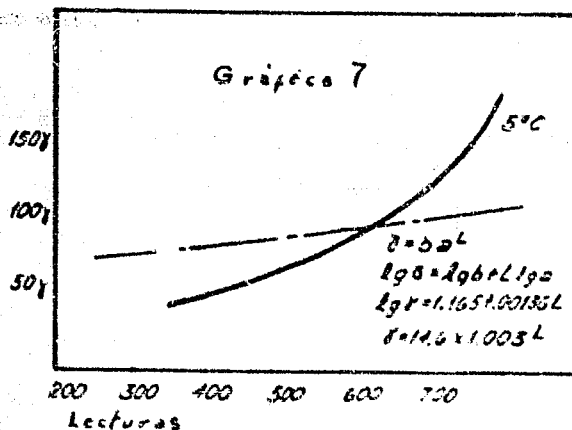
En la gráfica 5 se han tabulado lecturas y temperaturas para concentraciones iguales. En la gráfica 6 empleando los mismos datos se han graficado lecturas y concentraciones. En estas gráficas se estableció un ajuste lineal para 50 γ y un ajuste parabólico para 5°C.

Como se ve la temperatura tiene una influencia marcada, de aquí que a temperaturas bajas las lecturas son más altas y tienen mayor estabilidad.

Por todo lo anterior se propone trabajar a temperatura de 3 a 5°C porque si se baja más la temperatura puede haber precipitación de alguno de los reactivos, aunque trabajando en estas condiciones de temperatura



se vió posteriormente que podía construirse una curva de referencia (Gráfica No. 7) sin necesidad de emplear estándar, para el caso de que se deseara emplear éste o se trabajara a temperaturas diferentes se construyó un nomograma.



El nomograma consta de 5 líneas en la primera se busca la lectura del problema a la temperatura de 5°C, se une ésta con la cuarta línea en la lectura correspondiente al estándar, la línea que une estos dos puntos determina en la segunda columna una lectura de referencia la que se une con la concentración en  $\gamma$  del estándar que se encuentra en la tercera columna. La prolongación determina en la última línea la concentración dada en  $\gamma$  y en % de nicotina.

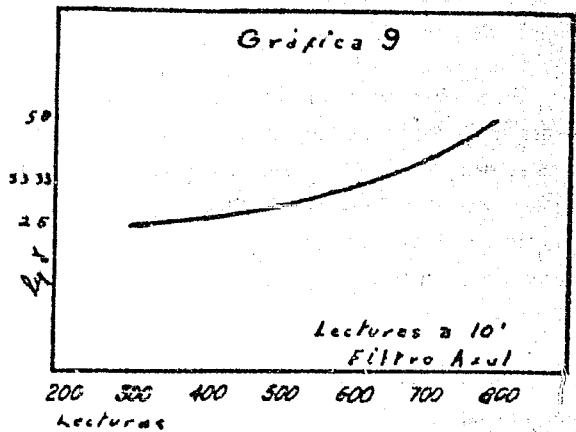
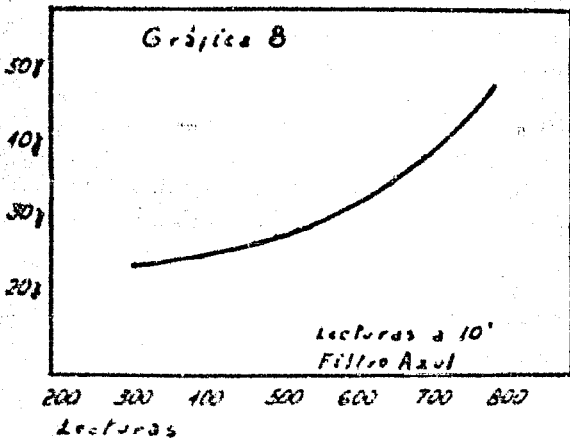
## FILTROS.

En el trabajo original de Robinson se utiliza el filtro para 525  $m\mu$ . Por otra parte en nefelometría (72) se recomienda el filtro azul.

Todos los valores mencionados anteriormente se hicieron con filtro verde número 54 para longitud de onda de 500 a 700  $m\mu$ ; se ensayó la posibilidad de usar el filtro azul con los resultados de la siguiente tabla.

TABLA No. 9

	T°C	10'	11'	12'	13'	14'
10 γ	5°	2	2	—	—	—
25 γ	5°	310	297	286	272	256
33.33 γ	5°	610	610	600	600	580
50 γ	5°	800	800	780	780	760
100 γ	5°	+1000	+1000	—	—	—





De las lecturas obtenidas resulta que para cantidades menores de 50 y es preferible el filtro azul y filtro verde para cantidades mayores.

### METODO DEFINITIVO.

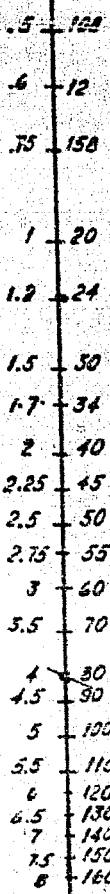
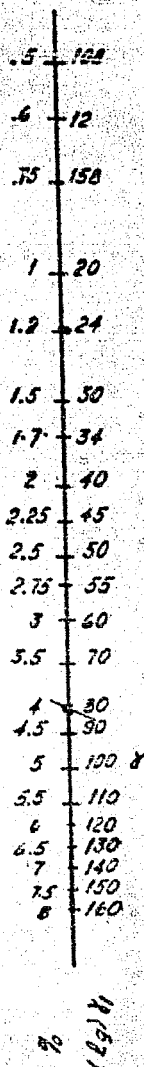
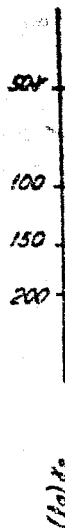
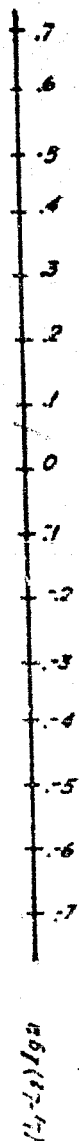
Montar un aparato para destilación con arrastre de vapor con matraz de Kjeldahl y bulbo de trampa. Pesar muestras de tabaco (secado en la estufa por 3 horas a 115°C) de 2 a 3 gr. y colocarlas en el matraz Kjeldahl, añadir ahí 6 gr. de MgO (16, 69) (o bien 10 gr. de NaCl y 10 ml. de NaOH al 30%), unos pedacitos de piedra pómez y un poco de parafina para evitar que haga espuma, añadir de 50 a 70 ml. de agua destilada. Comenzar la destilación y recibir el destilado en un vaso de 800 ml. que tenga 10 ml. de HCl al 20% (la punta del refrigerante debe quedar en la solución). Destilar lo más rápidamente posible. Cuando haya destilado un volumen de 500 a 600 ml. probar unas gotas del destilado con ácido silicotúngstico, si no hay precipitación suspender la destilación. Aforar el destilado a 1000 ml.

De esta solución tomar alícuotas de 9 ml. por duplicado y ponerlas en un vaso de precipitado de 100 ml. Simultáneamente tomar un estándar y una muestra en blanco que contienen el primero 9 ml. de solución de nicotina (100 y por ml.) y la segunda 9 ml. de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2N.

A cada vaso agregar 6 ml. de solución de almidón al 1% (71) y 51 ml. de agua destilada; agitar.

Poner los vasos en los baños enfriadores hasta que tengan una temperatura de 3-5° C. entonces a intervalos de 30" agregar a cada vaso 3 ml. de reactivo de Valser (también a la temperatura de 3-5° C). mezclar y dejar reaccionar durante 9' 30", vaciar a la celda industrial del fotocolorímetro de Klett-Summerson modelo 900.3, empleando un espesor de problema de 25 mm. y filtro verde número 54 para longitud de onda de 500 a 700 m  $\mu$ .

Anotar las lecturas y encontrar los resultados en el nomograma correspondiente.



$$y = ba^x$$

$$\lg y = \lg b + x \lg a$$

$$\lg y = 1.165 + 0.00136 x$$

$$y_1/y_2 = a^{x_1 - x_2}$$

$$\lg y_1 - \lg y_2 = (x_1 - x_2) \lg a$$

- $x_1 = t$  / ml en el problema
- $L_1 =$  Lectura del problema a  $5^\circ C$
- $L_2 =$  " del Tiempo a  $5^\circ C$
- $x = t$  / ml en el problema

## TERCERA PARTE.

El fin práctico de la tesis es el de aplicar el método nefelométrico a los análisis de tabacos y de insecticidas. El análisis de tabacos tiene importancia industrial porque la cantidad de nicotina es uno de los valores que sirven para conocer la calidad del tabaco y para calcular la mezcla. La dosificación en insecticidas tiene un fin de control que se puede usar desde el punto de vista fiscal o desde el punto de vista biológico.

### ANÁLISIS DE TABACOS Y DE INSECTICIDAS. PREPARACION DE LA MUESTRA.

Para el caso de los tabacos se toman muestras de cada paca, tomando hojas de la parte central y de la parte exterior. Todas las muestras de una partida se mezclan, pican y envasan en frascos de cierre hermético. De estos frascos se toman las muestras para los diversos análisis de los cuales sólo se mencionarán las determinaciones de humedad y de nicotina.

En los insecticidas si son en forma líquida, hay que asegurarse de que el contenido sea homogéneo, si no fuera así y el precipitado fuera abundante, habría que filtrar, determinar el % de precipitado y analizar por separado precipitado y solución. Si el producto tuviera poco o ningún precipitado bastará con agitar antes de tomar la muestra.

Tratándose de insecticidas sólidos hay que observar su homogeneidad, de preferencia examinando pequeñas muestras en el microscopio. Si es homogéneo, o después de homogeneizar si es necesario, se tomarán las muestras para el análisis procurando de todos modos que éstas sean por duplicado o triplicado.

### TECNICA.

*Determinación de humedad.*—En los tabacos e insecticidas sólidos se sigue la misma técnica. Tomar muestras de 10 gr. en cajas de Petri y secarlas en la estufa a 115°C durante 3 horas, enfriar en desecador, pesar. La pérdida de peso se toma como humedad.

Se recomienda determinar la nicotina empleando la muestra desecada en vez de pesar y referir después los resultados a muestra seca.

En esta tesis las determinaciones de nicotina se hicieron siempre en muestras secas.

La humedad en el tabaco es variable, oscilando entre 19 y 22 %.

*Determinación de nicotina.*—Esta determinación ya está descrita en la primera parte de este capítulo.

### CALCULO DE RESULTADOS EN EL METODO OFICIAL.

Para calcular los resultados tanto en insecticidas como en muestra de tabaco, se emplea la fórmula: (16. 69)

$$\% = \frac{P \times F \times 1000 \times 100}{V \times M}$$

P — Peso del precipitado.

F — Factor empirico de nicotina en silicotungstato de nicotina.

1000 — Volúmen a que se lleva el destilado.

100 — Para reportar en %.

V — Volúmen de la alícuota tomada.

M — Peso de la muestra de tabaco o insecticida.

Por Ej:

P — 0. 11426

F — 0. 1141

M — 2 gr.

V — 250 ml.

$$\% = \frac{0.11426 \times 0.1141 \times 1000 \times 100}{250 \times 2}$$

Nicotina — 2.606 %

## CALCULO DE RESULTADOS EN EL METODO NEFELOMETRICO.

Se intentó establecer una curva de valoración empleando los datos de la tabla 8 y sobre papel milimétrico, resultando una línea curva **Gráfica No. 5**) como de esta manera la interpolación resulta defectuosa se empleó papel semilogarítmico, resultando una línea recta. (**Gráfica No. 7**) la que tiene por ecuación:

$$\lg \gamma = 1.165 + 0.00136 L$$

en donde  $\gamma$  representa las unidades de nicotina (en  $\gamma$ ) y L la lectura en el nefelómetro de Klett.

La línea obtenida puede ser utilizada como referencia siempre que se trabaje constantemente en las mismas condiciones. Como puede ser más conveniente hacer el análisis siempre contra un estándar porque así las mismas fluctuaciones de temperatura del problema ocurren en el estándar, se calculó el nomograma partiendo de las ecuaciones exponenciales:

$$\gamma_1 = b a^{L_1}$$

$$\gamma_2 = b a^{L_2}$$

en las que  $b$  representa el antilogaritmo de 1.167 y  $a$  el antilogaritmo de 0.00136.

Relacionando a estas ecuaciones se transforman en:

$$\lg \gamma_1 - \lg \gamma_2 = (L_1 - L_2) \lg a$$

que es la que sirvió como base para el cálculo del nomograma.

La misma ecuación será la que se utilice si se desea calcular algebraicamente el resultado analítico.

## TABLAS DE RESULTADOS.

A continuación se tabulan los resultados obtenidos por ambos métodos y la diferencia entre ellos.

“ TABLA No. 10

Muestra	% de Nicotina Método Oficial	% de Nicotina Mé- todo Nefelométrico	Diferen- cia
1.—Huasteco A	2.69	2.59	—0.1
2.—Huasteco B	3.44	3.40	—0.04
3.—Huasteco C	3.11	3.21	+0.1
4.—Tlapacoyan A	2.57	2.40	—0.17
5.—Tlapacoyan B	2.13	1.95	—0.18
6.—Tepic Resolana 56	0.49	0.67	+0.18 *
7.—Faros Putla Gde.	1.85	1.60	—0.25
8.—Faros Putla Chica	1.60	1.45	—0.15
9.—Burley Md.	1.42	1.40	—0.02
10.—Virginia	1.68	1.45	—0.23
11.—Carmencitas (Cigarros)	1.68	1.45	—0.23
12.—Raleigh (Cigarros)	1.22	1.20	—0.02
13.—Black leaf (Insec icida)	40.00	40.00	0

\* Por el método oficial no hubo precipitación en esta muestra sino hasta las 7 horas, formándose un precipitado muy escaso.

#### **IV.—DISCUSION Y CONCLUSIONES.**

##### **COMPARACION DEL METODO OFICIAL Y EL NEFELOMETRICO (VELOCIDAD, EXACTITUD, MATERIAL, ETC.)**

El Método oficial es un método exacto pero que tiene el inconveniente de la duración.

En el método nefelométrico la destilación puede hacerse con material ordinario de los laboratorios y no requiere otro aparato especializado que el fotocolorímetro. Una determinación puede verificarse en sólo 3 horas lo que representa un ahorro considerable de tiempo.

La exactitud es suficiente para los fines técnicos ya que la diferencia más grande fué de 0.25% diferencia que por otra parte se explica porque se ha valorado sólo nicotina y no los alcaloides secundarios, siempre que se trabaje a temperaturas de 3-5° C; la necesidad de controlar la temperatura dentro de estos límites es la única dificultad del procedimiento.

#### **CONCLUSION.**

DEL TRABAJO ANTERIOR SE CONCLUYE QUE EL METODO NEFELOMETRICO ES EXACTO Y CONVENIENTE SU INTRODUCCION EN LOS ANALISIS DE RUTINA.



## V.—BIBLIOGRAFIA.

- 1.—Enciclopedia universal ilustrada, Espasa Calpe. S. A. Tomo 58 página 1299 y sig.
- 2.—Gilman. Organic Chemistry and advanced treatise. Vol. II (1944) Pág. 1190.
- 3.—Molinas Héctor. Química general y aplicación a la industria. Química Orgánica Tomo II. Gustavo Gili Ed. 2a. Ed. (1923) Pág. 393 - 398.
- 4.—Diccionario de Agricultura Zootecnia y Veterinaria. Publicaciones Herrerías. Tomo II. Págs. 680 y 754. (1943).
- 5.—Hill and Kelley. Organic Chemistry. (1948) - Cap. 44. Pág. 809.
- 6.—C. A. 26: 1639. Paul Koenig. Z. Untersuch. Lebensm. 62. 87-93 (1931).
- 7.—Trivisonno Nicolas. Toxicología. 2a. Ed. (1938). Lib. "Vázquez" B. Aires. Págs. 371 - 373.
- 8.—Enciclopedia universal ilustrada. Editorial Espasa Calpe. Tomo 38. Pág. 603.
- 9.—Dr. Luis G. Cabrera. Plantas curativas de México. Ediciones Cicerón. Ed. 4a. (1950). Pág. 217.
- 10.—Karrer Pablo. Tratado de Química Orgánica. Marín Ed. (1950). Pág. 989.

- 11.—Gostnes Rossaiken. Outlines of biochemistry. 2a. Ed. John Wiley Ed. (1938). Pág. 568.
- 12.—Holleman - Richter. Tratado de Química Orgánica. Pág. 674.
- 13.—A. Classen. Análisis Químico. Pág. 220.
- 14.—Richter Victor von. Organic Chemistry. Vol. III. Nordemann publishing company. Amsterdam y New York (1923) páginas 230 y 231.
- 15.—Fieser Louis F. y Fieser Maria. Organic Chemistry. 2a. Ed. D. C. Heath y C°. (1950). Pág. 865.
- 16.—Association of official agricultural chemists. Official methods of analysis. 6a. Ed. (1950). Págs. 69-70-5.104-5.
- 17.—C. A. 11: 2944. Fachl. Mitt. österr. Tabakregie (1916). 3pp. Chem. Zentr. (1917) 1.700-1.
- 18.—C. A. 13: 2958. Chem. Ztg. 42. 290 (1918).
- 19.—C. A. 17: 3747. J. Agr. Research 24, 961-70 (1923).
- 20.—C. A. 20: 1193. Chem. Ztg. 50. 42 (1926).
- 21.—C. A. 20: 2723. New Zeland J. Sci. Tech. 8, 129-42 (1926).
- 22.—C. A. 21: 4017. Chem. Ztg. 51.658 (1927).
- 23.—C. A. 22: 2637. J. Biochem. (Japan) 8,361-4 (1938).
- 24.—C. A. 22: 4720. Biochem. Ztg. 195: 103-17 (1928).
- 25.—C. A. 23: 3050. Biochem. Z. 206, 410-5 (1929).
- 26.—James Bermann. Helv. Chim. Acta 13. 785-7 (1930).
- 27.—C. A. 24: 1947 Z. Anal. Chem. 83, 107-14 (1931).
- 28.—C. A. 27: 3777. Magyar Gyógyszerész tud. Társaság Ertesítője 9,210- 5 (1933).
- 29.—C. A. 34: 7063. J. Applied. Chem. U.S.S.R. 12. 1582-5 (1939).
- 30.—C. A. 38: 5754. Ber. Ungar. Pharm. Ges. 18-333-6. (1942).
- 31.—Anal. Chem. Vol. 17, número 7-437 (1945).
- 32.—C. A. 43: 5537 c. Zhur. Anal. Khim. 2,1720 (1947).
- 33.—C. A. 47: 2726. Rev. intern. tabacs. 27,147. (1952).
- 34.—Forrest G. Houston. Anal. Chem. Vol. 24. Núm. 11-1831 (1952).
- 35.—Robert H. Cundiff and Peter C. Markunas. Anal Chem. Vol. 27, número 10-1650 (1955).
- 36.—C. A. P13: 1126. U. S. 1,294,310 (1918).
- 37.—C. A. 24: 1465. J. Chem. Soc. 2817-20 (1929).
- 38.—C. A. 24: 3602.
- 39.—C. A. 26: 5379. Chem. Ztg. 56,623-4 (1932).
- 40.—C. A. 27: 3287. Pharm. Zentralhalle 74,253-7 (1933).
- 41.—C. A. 28: 574. Khim. Farm. Prom. 140-2 (1933).

- 42.—C. A. 29: 886. J. Soc. Chem. Ind. 53. 356-T (1934).
- 43.—C. A. 31: 5722. Mitt Lebensm. Hyg. 27,46-8 (1936).
- 44.—Joseph R. Spies. Anal. Chem. Vol. 9. número 1-46 (1937).
- 45.—A. W. Avens y G. W. Pearce. Anal. Chem. Vol. 11. número 9-505 (1939).
- 46.—C. A. 37: 5928. Z. Untersuch. Lebensm 84, 492-7 (1942).
- 47.—C. C. Bowden y W. F. Barthel. Anal. Chem. Vol. 15. Núm. 12-740 (1943).
- 48.—C. A. 39: 2468. Rev. Brasil. Quim. (São Paulo), 18,388-90 (1944).
- 49.—R. B. Griffith y R. N. Jeffrey. Anal. Chem. Vol. 20. número 4-307 (1948).
- 50.—C. L. Ogg, C. O. Willits y Constantine Ricciuti. Anal. Chem. Vol. 22. número 2-325 (1950).
- 51.—C. A. 31: 5105. Mezőgazdasági Kutatasok 10, 29-35 (1937).
- 52.—C. A. 32: 5579. Vsesoyuz. Inst. Tabach Makhoroch Prom. número 133,158-65 (1937).
- 53.—Louis Feinstein y E. T. McCabe. Anal. Chem. Vol. 23. número 2-385 (1951).
- 54.—C. A. 48: 9021 d. Am. insst. exptl. tabac. Bergerac. I número 3,61-9 (1952).
- 55.—Lee Leiserson y Thomas B. Walker. Anal. Chem. Vol. 27. número 7-1129 (1955).
- 56.—R. N. Jeffrey y W. H. Eoff. Anal. Chem. Vol. 27. número 12-1903 (1955).
- 57.—C. A. 11: 1015. Trans. Proc. Roy. Soc. Canadá [3] 10,27-31 (1916).
- 58.—C. A. 14: 310. Fryer. Analyst 44, 363-9 (1919).
- 59.—P. S. Larson y H. B. Haag. Anal. Chem. Vol. 16. número 2-86 (1944).
- 60.—C. A. 32: 9391. Z. Untersuch. Lebensm. 76, 44-51 (1938).
- 61.—C. A. 47: 821 g. (Indian Agr. Research Inst. New Delhi) Nature 169,112 (1952).
- 62.—Snell. Colorimetric Methods of Analysis. Vol. II - pág. 538-39.
- 63.—C. A. 26: 2553. J. Agr. Chem. Soc. Japan 7, 977-83 (1931).
- 64.—C. A. 34: 56. Zavodskaya Lab. 8, 731 (1939).
- 65.—C. A. 34: 2288. Z. Anal. Chem. 118, 913 (1939).
- 66.—C. A. 35: 855. J. Assoc. Official, agr. Chem. 23,800-4 (1940).
- 67.—C. A. 44: 9119c. Soc. Chem. Ind. (London) 69,126-8 (1950).

- 68.—C. O. Willits, Margaret L. Swain, J. A. Connell y B. A. Brice. Anal. Chem. Vol. 22, número 3-430 (1950).
- 69.—Brown and Williamson Tobacco corporation. Standard method of analysis.
- 70.—Richard H. Robinson, Anal. Chem. Vol. 27, Núm. 8,1351 (1955).
- 71.—AOAC. 6a. Ed. (1950) Pág. 50-5.3.
- 72.—Klett Summerson. Photoelectric colorimeter. Industrial manual. 1a. Parte. Pág. 4.

+