

Ensayo de un reactivo pícrico polivalente en gérmenes cristalinos

Dr. JUAN F. SAREDO

Director del Instituto de Química y Profesor de Química
Analítica de la F. de Química y Farmacia - Montevideo

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo tiene por objeto proponer un reactivo pícrico polivalente en gérmenes cristalinos, para ser empleado como reactivo corriente de orientación y caracterización en la investigación química toxicológica.

El reactivo ensayado es una suspensión, en una solución de ácido pícrico, de cristales bien triturados de los picratos de cocaína, novocaína, estricnina, atropina y heroína.

El mayor valor de un reactivo microquímico debe apreciarse prácticamente por su comportamiento frente a la substancia, acompañada por impurezas; en este caso el ideal hubiera sido hacer ensayos de mezclas con residuos ptomaínicos; no disponiendo de éstos en la cantidad apreciable que se puede requerir, los ensayos se realizaron tomando la quinina como índice de impureza.

Llevando el límite de impureza hasta un 75 por ciento de quinina y a una dilución del 2 o/oo, lo que equivale a disolver un residuo de 2 mgrs. que contiene mgr. 1.5 de quinina y mgr. 0.5 del alcaloide en 1 ml. de ácido clorhídrico 0.01N, ha sido posible con este reactivo obtener cristalizaciones con formas incipientes y algunas de ellas bastante características como para individualizar los alcaloides ensayados; en algunos casos se lograron obtener reacciones de orientación para límites de 90 por ciento de quinina y sólo 10 por ciento de alcaloide con soluciones al 1 o/oo.

Los resultados obtenidos por esta técnica, además de tener el valor de convertir un reactivo microquímico prácticamente abandonado en un reactivo de indiscutible valor, permiten establecer para las reacciones microcristalinas posibilidades de aplicación promisoras en los casos siempre difíciles de investigación de una substancia en medios impuros.

En un trabajo que publiqué recientemente en "Anales de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay", T. 49, diciembre de 1947, sobre "Reacciones Microcristalinas con Gérmenes" (1) tuve oportunidad de estudiar y destacar las ventajas del empleo sistemático de gérmenes cristalinos en dos reactivos clásicos de precipitación de alcaloides que fueron el ácido pícrico y el cloruro de oro.

Los resultados auspiciosos me indujeron a ensayar un reactivo pícrico polivalente en gérmenes cristalinos de picratos, de un grupo de alcaloides corrientes que demostraron poseer una capacidad de inducción intensa aún en mezclas complejas.

Los picratos que están en estas condiciones son los de: cocaína, novocaína, estricnina, heroína y atropina.

El comportamiento de la solución saturada de ácido pícrico, reactivo pícrico clásico, sobre las soluciones puras de dichos alcaloides puede sintetizarse: tendencia a originar un precipitado amorfo cuya transformación al estado cristalino es fácil y segura para el picrato de estricnina aun a diluciones de 1 en 20.000 dejando avanzar la evaporación has-

ta desecación en los bordes; para el picrato de heroína la evolución cristalina es en general segura hasta diluciones de 1 o/oo; la transformación es lenta, originándose al principio conglomerados en forma de rosetas que luego adquieren aspecto arborescente terminando en láminas exagonales bastante típicas; a mayor dilución la reacción es bastante irregular; para la atropina con soluciones al 2 o/oo es posible obtener fácilmente la cristalización en forma de láminas entrecortadas, siempre que se deje avanzar la desecación en los bordes; pero a la dilución del 1 o/oo la cristalización puede fracasar o hacerse dudosa.

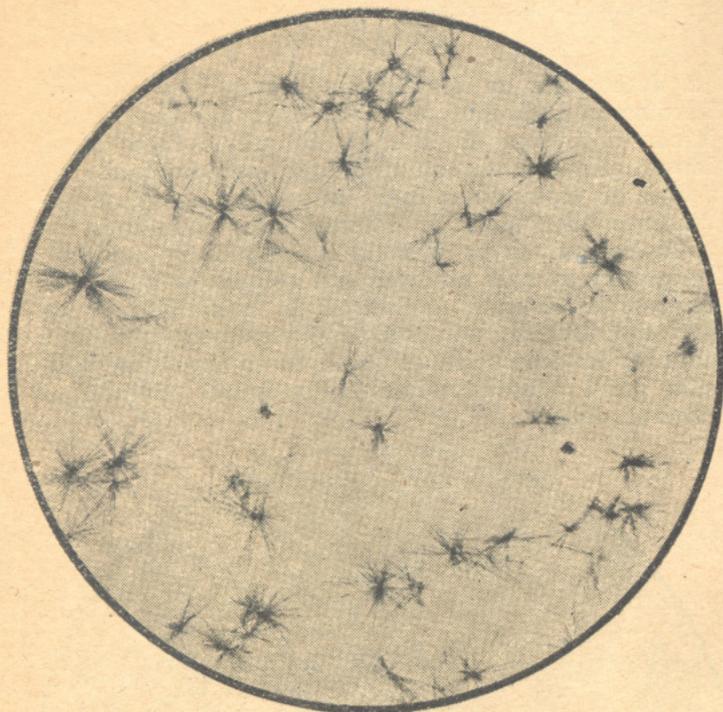


Fotomicrografía N° 1. — Picrato estricnina. Obtenida por difusión, empleando reactivo pícrico con gérmenes y una solución de estricnina impurificada con 50 % de novocaína.

Con la cocaína y novocaína la cristalización de preparaciones a la concentración del 2 o/oo es mala (fracasa alrededor del 80 %); a concentración del 1 % la probabilidad de cristalización espontánea es alrededor del 90 %.

Tratándose de soluciones puras el empleo de gérmenes cristalinos podría ser considerado técnicamente innecesario para el picrato de estricnina, pues sólo actuaría para provocar cristalizaciones más rápidas; en los demás casos las ventajas son más concluyentes, además de la rapidez nos da límites de reacciones seguras que para las suspensiones de gérmenes empleados son: para la heroína alrededor de 1 en 5.000, para la atropina 1 en 3.000, para la cocaína 1 en 8.000, y para la novocaína 1 en 20.000; si se deja avanzar la desecación hasta cristalización en los bordes, esa sensibilidad se puede duplicar.

Si consideramos los casos de alcaloides impuros, el empleo de gérmenes cristalinos adquiere importancia decisiva, pues aún en el caso del picrato de estricnina, cuya evolución cristalina es notable en soluciones puras es tan sensible a las impurezas que mezclada con novocaína o quinina en partes iguales tiende a dar cristalizaciones deformes o dejar de cristalizar; en residuos viscerales que contienen cantidades apreciables de estricnina basta un porcentaje débil de impurezas para impedir la cristalización



Fotomicrografía Nº 2. — Picrato de cocaína. Obtenida con una suspensión de gérmenes en un medio impurificado al 50 % de novocaína.

típica del picrato de estricnina mientras es fácil caracterizarla por las reacciones químicas y fisiológicas.

Es difícil prever la influencia de una impureza; en mi citado trabajo, después de estudiar 14 mezclas de alcaloides, en especial con cocaína, pude establecer que en general la impureza influye por su capacidad de precipitar abundantemente y en forma amorfa con el reactivo empleado; en el presente trabajo el ideal sería emplear diversos residuos ptomaínicos pero desgraciadamente no dispuse de las cantidades necesarias y me ví obligado a utilizar quinina. Este alcaloide reúne en principio las condiciones de impureza ideal, pues precipita abundantemente y en forma amorfa con el reactivo pícrico; la evolución cristalina es imperfecta o parece nula, pues sólo se observa la formación lenta e irregular de pequeñas esferas aceitosas que no molestan la observación de las reacciones con gérmenes.

El comportamiento de la quinina como impureza frente a los cinco alcaloides puede sintetizarse así: hasta la proporción del 10% modifica poco la capacidad de cristalización espontánea, pero luego se hace sensible de modo que con las soluciones al 1 o/oo en alcaloide y quinina, la espontaneidad es prácticamente nula para la atropina, cocaína, novocaína y estricnina; la heroína es relativamente menos sensible, pues a esa dilución, aunque la evolución cristalina es lenta y poco característica, un observador experimentado puede orientarse; si la proporción de quinina es del 75% la cristalización espontánea es prácticamente nula.

PREPARACION DEL REACTIVO PÍCRICO POLIVALENTE EN GERMENES CRISTALINOS.

Se comenzará por obtener alguna preparación bien cristalizada del picrato; para nuestro caso se obtendrá fácilmente por simple mezcla de una gota de reactivo pícrico con soluciones al 2 o/oo de los distintos alcaloides; para la estricnina, heroína y atropina basta hacer pocas preparaciones, para la cocaína y novocaína, conviene hacer una docena de preparaciones; las cristalizaciones más homogéneas se obtienen por siembra del reactivo pícrico antes de agregar la gota de alcaloide.

Obtenida una cristalización bien homogénea, empleando el reactivo pícrico, se pasan los cristales en suspensión a un tubo de centrifuga y para obtener una cantidad conveniente de precipitado cristalino basta agregar espaciadamente solución de alcaloide al 2 o/oo, pero cuidando que el ácido pícrico esté relativamente en exceso.

Para preparar suspensiones individuales de gérmenes, cada tubo se tratará en la forma que luego se describe; para la suspensión polivalente se mezclarán las distintas suspensiones, abandonándose unas 48 horas para asegurar una mutua saturación. Se procede a centrifugar, se decanta la solución y el residuo desecado parcialmente con tiras de papel de filtro, se somete luego a una prolongada trituración, empleando una varilla, de extremo redondeado, a la llama; la trituración debe dejar al final partículas muy tenues en suspensión.

Se reincorporan la solución pícrica al tubo, se homogeniza la suspensión y dejándola en reposo o someténdola a lenta centrifugación, se separa la parte más gruesa; la suspensión de gérmenes debe tener débil opalescencia y estar constituida por partículas corpusculares como un polvo o impureza amorfa; lógicamente en una microgota de este reactivo hay decenas de gérmenes cristalinos.

ENSAYO DEL REACTIVO PROPUESTO

Límite de aplicabilidad en mezclas con quinina y residuos ptomaínicos; conservación de la suspensión. El ensayo se realizó mezclando soluciones al estado de clorhidrato del alcaloide a ensayar y de quinina

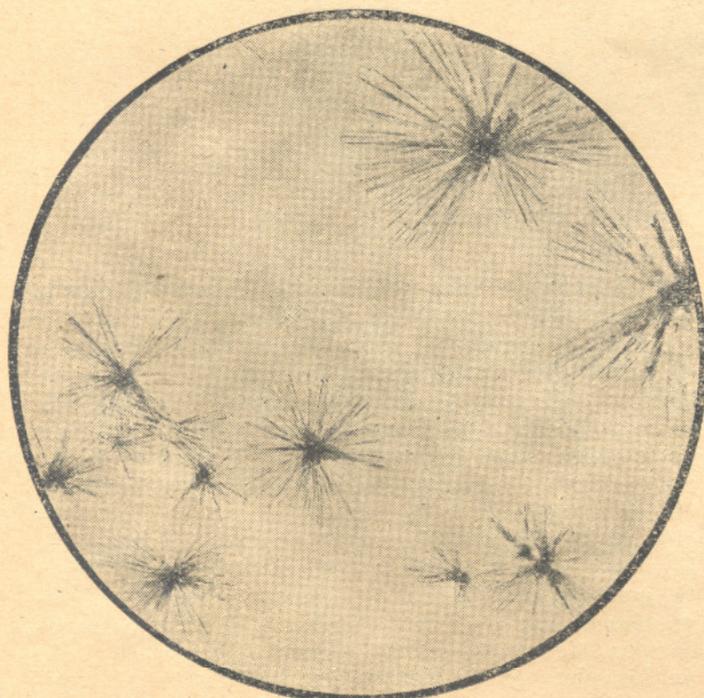


Fotomicrografía Nº 3. — Picrato de atropina. Solución al 1 o/oo sembrada lateralmente con gérmenes de picrato de atropina.

en medio ácido clorhídrico 0.01N. Las reacciones se hicieron por difusión poniendo cerca las 2 gotas, el tamaño de la gota del reactivo es aproximadamente una vez y media mayor que la gota de solución de alcaloide, se unen luego con un trozo de papel o alambre metálico tratando que queden definidas 3 zonas; zona de reactivo en exceso, zona con exceso de solución de alcaloide y zona de precipitación.

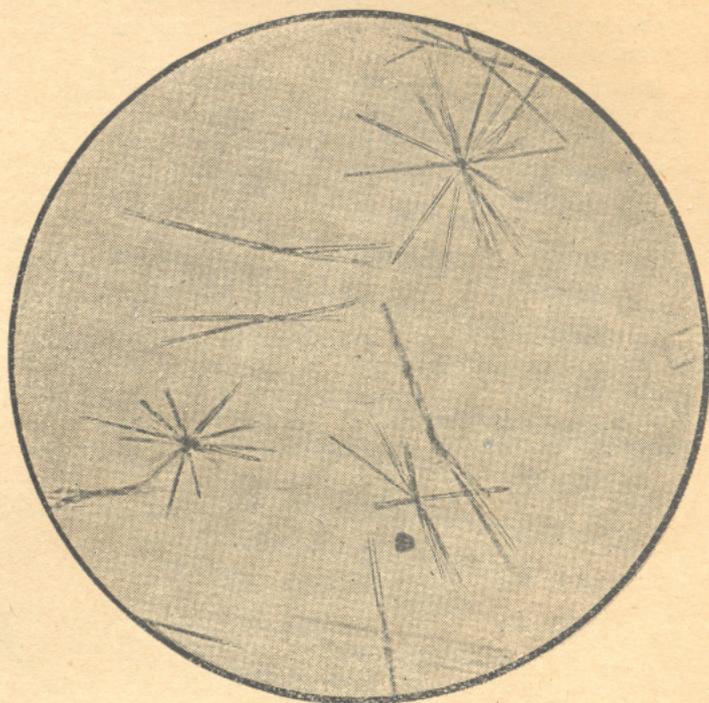
La preparación se cubre con un vaso; se observa a intervalos de 5 a 10 minutos hasta los primeros veinte minutos, dentro ese periodo, tratándose de soluciones hasta con el 50% de quinina y dilución al 1 o/oo del alcaloide, es posible observar cristalizaciones bien aparentes, pero si se desea alcanzar mayor sensibilidad en presencia de mayor proporción de impureza, la preparación se debe observar hasta que la evaporación provoque una desecación incipiente en los bordes, en esta forma es fácil obtener reacciones netamente positivas dentro de los siguientes límites: Estricnina con 90% de Quinina a la dilución del 0.2 o/oo; lo que equivale a un residuo de 2mgr. formado de mgr. 1.8 de quinina y 0.2 de estricnina disuelto en 1 ml. de ácido clorhídrico 0.01N. La reacción con la estricnina evoluciona rápidamente (5 minutos) originando conglomerados poliédricos dispuestos en la zona de alcaloide en exceso cercana al límite de la zona de precipitación; mayor concentración y menor impureza la cristalización se hace más típica; por lo general pequeños prismas aislados, sólo las soluciones con alrededor de 25 % de quinina es posible observar cristalización absolutamente típica (fotomicrografía 1) (2).

Es posible para los demás alcaloides alcanzar un límite semejante, pero las reacciones pierden regularidad y es necesario dejar avanzar la evaporación observando cuidadosamente la preparación instantes antes de su desecación. El límite más seguro para la cocaína, heroína, atropina y novocaína debe estimarse para una proporción de quinina del 75% a una dilución del 0.5 o/oo del alcaloide, lo que equivale a un residuo de mgr.2 que contiene mgr.1.5 de quinina y mgr.0.5 de alcaloide disuelto en 1 ml. de ácido clorhídrico 0.01N.



Fotomicrografía N° 4. — Picrato de atropina. Obtenida sembrando con gérmenes de picrato de tropacocaína.

Dentro de esos límites y observando hasta principio de desecación a los bordes: la cocaína produce conglomerados espinosos semejantes a la fotomicrografía (N° 2); la atropina maclas de láminas semejantes a las más imperfectas de la fotomicrografía N° 3; la novocaína forma conglomerados globulares, a veces conglomerados de pequeñas láminas irregulares; avanzando la desecación, conglomerados globulares con agujas cortas, esta última forma es quizá la más característica; en los de estos tres al-



Fotomicrografía N° 5. — Picrato de tropacocaína. Solución 1 en 10.000 sembrada por sus propios gérmenes.

caloides la posición preferente de los núcleos cristalinos es en la zona pícrica (exceso de reactivo) en un principio en los bordes externos al lado de la zona de precipitación, luego en todo el borde adyacente donde se inicia la desecación; respecto a la heroína sólo se observa formas globulares, conglomerados de aspecto arriñonados, que se localizan en la zona pícrica bordeando la zona de precipitación.

Es lógico suponer, y la experiencia lo demuestra, que a mayores concentraciones y menor proporción de impurezas, la formación de centros cristalinos es más rápida y la cristalización más típica.

Considero conveniente que cada operador ensaye su reactivo y anote cuidadosamente las características de su comportamiento con soluciones puras y en mezclas de distintas concentraciones; es posible que variando las proporciones de excesos relativos de los distintos picratos el hábito cristalino se modifique, pues un picrato en exceso puede actuar como impureza adicional. (Véase fotomicrografía N° 4 de la cristalización inducida del picrato de atropina con el de tropacocaína y compárese con la N° 3).

Referente a la acción sobre residuos ptomainicos he tenido sólo tres oportunidades para ensayarlo, la acción del reactivo polivalente fué negativa; mezclando esos residuos en partes iguales con los alcaloides estudiados las reacciones fueron bien aparentes dejando la impresión que de haber existido en las vísceras correspondientes, hubieran sido constataadas por el reactivo pícrico polivalente en gérmenes.

Respecto a la conservación de la actividad de la suspensión cabe teóricamente esperar que los cristales triturados y más pequeños tiendan a originar

crisales mayores y perfeccionados; esto lleva a amortiguar la actividad de los gérmenes y provocar confusiones al observar las preparaciones al microscopio; en la práctica este proceso resulta muy lento, lo que puede atribuirse a que se parte de edificios cristalinos bien estabilizados por un envejecimiento de unas 48 horas en sus aguas madres; además la regeneración de la suspensión es sencilla, cuando efectuado un examen microscópico se constata partículas demasiado gruesas o vestigios de cristales definidos, se procede a una nueva y minuciosa trituración o repetir el proceso indicado en la preparación de la suspensión.

Durante las experiencias realizadas he constatado que una suspensión polivalente de gérmenes ha mantenido prácticamente su actividad por lo menos durante tres meses; pues aún se conserva para ulteriores ensayos.

INTERPRETACION DE LAS REACCIONES CON GERMENES Y CAUSAS DE ERRORES

La interpretación de una reacción con gérmenes cristalinos es la de provocar la formación de cristales idénticos al cristal madre, pero si el germen actúa en un medio impuro, el germen tiende a crecer pero la cristalización puede tomar aspectos muy dis-

risticos, el efecto puede llamarse "efecto germen no típico" y la reacción sólo tiene valor como reacción de orientación.

El empleo simultáneo de muchos gérmenes, suspensiones de gérmenes, produce múltiples centros de cristalización orientando al operador con mayor seguridad que si hubiese empleado un solo germen, el cual al desplazarse en la preparación podría aparecer como una impureza indiferente; es ésta una opinión personal y creo que la práctica adquirida por otros operadores podría considerar técnicamente preferible emplear un solo germen de tamaño y aspecto controlado.

Las principales causas de errores son: 1º Posibilidad de producirse una reacción espontánea que pueda atribuirse a la acción de los gérmenes. Considero conveniente hacer una doble reacción comparativa empleando simultáneamente un reactivo pícrico corriente y el reactivo polivalente. 2º Cristalización por inducción. La acción de un germen al provocar una cristalización no es específica; es un hecho conocido que un cristal es capaz de inducir la cristalización de otra especie química cuyas redes cristalinas armonicen en tamaño y forma, por lo demás, la capacidad de inducción cristalina se le considera una consecuencia del isomorfismo y hasta se le ha considerado una prueba de isomorfismo.



Fotomicrografía N° 6. — Picrato de Pantocaína. Solución al 2 o/oo sembrada con picrato de tropacocaína.

tintos a las formas típicas y según la naturaleza del medio, puede sólo mostrar su acción aumentando de tamaño y originando conglomerados más o menos poliédricos, y otras veces cristales deformes pero siempre de difícil individualización.

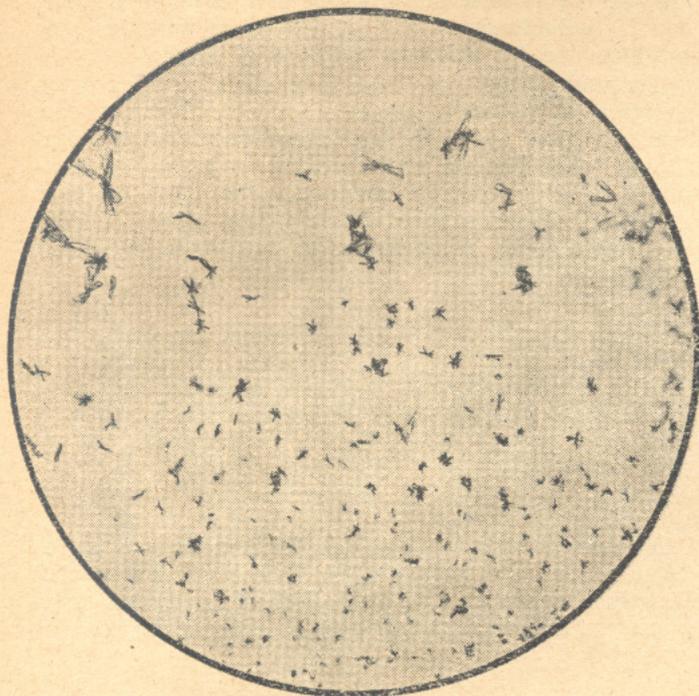
Así podríamos llamar "efecto germen típico" cuando el germen se comporta reproduciendo exactamente el hábito cristalino de las preparaciones con sustancia pura; en el caso de las suspensiones de gérmenes se produce un número apreciable de centros de cristalización que evolucionan dando cristales más o menos perfectos según el germen difunda a una zona más libre, originando así los cristales más perfeccionados. (Fotomicrografías N° 1 y 3). En estos casos las reacciones pueden considerarse relativamente como características.

Cuando los gérmenes simplemente se ensanchan o dan cristalizaciones deformes sin cristales caracte-

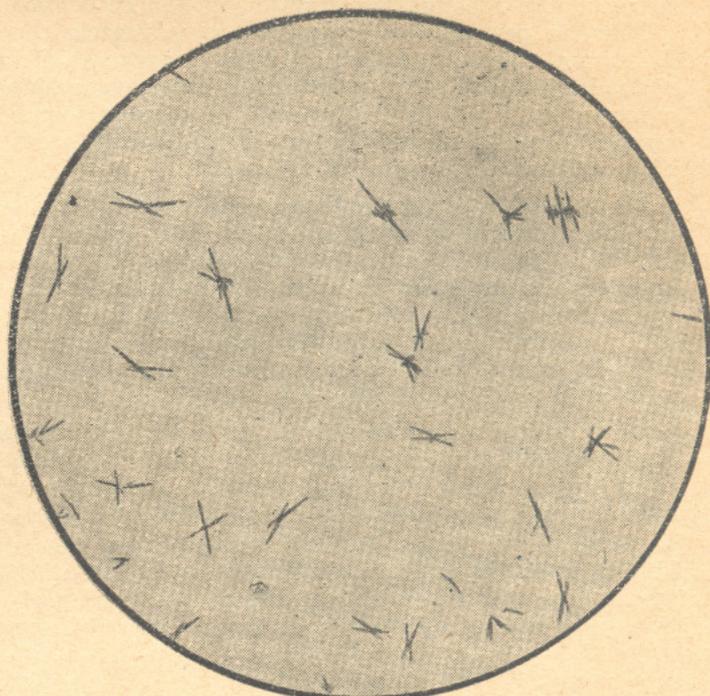
En mi trabajo citado, utilizando en forma combinada una serie de suspensiones cristalinas, 11 de picrato y 10 de cloroauratos, sobre veinte alcaloides fuera de los límites de espontaneidad cristalina, se constataron únicamente seis casos de interferencias, número reducido si se tiene en cuenta que el número de combinaciones es superior a 400; pero el hecho más notable es que el hábito cristalino de las reacciones inducidas fueron tan distintas a la cristalización típica del cristal madre, que parece imposible llevara a error a quien aplique el concepto de "efecto germen típico". Basta comparar las fotomicrografías de los casos más notables: El picrato tropacocaína (fotomicrografía 5) induce la cristalización de los picratos de atropina y pantocaína (fotomicrografías 4 y 6, respectivamente). El aurato de α Eucaina (fotomicrografía 7) induce la cristalización del aurato de atropina (fotomicrografía 8). Los au-

ratos de cocaína y de benzoilecgonina se inducen recíprocamente (fotomicrografía 9 y 10 respectivamente). Lógicamente para explicar estos hechos habría que hacer estudios cristalográficos completos de dichos compuestos, pero pueden adelantarse dos hipótesis: 1º la inducción cristalina de dichos casos no es de naturaleza isomórfica, creo que pueden exis-

entonces pueden surgir errores si el observador pretende sacar conclusiones definitivas de la simple observación del hábito cristalino; queda el recurso de completar la caracterización mediante medidas cristalográficas en especial las basadas en las propiedades ópticas, pero considero difícil que esas medidas se puedan hacer sobre microcristales con la



Fotomicrografía Nº 7. — Cristales de cloro aurato en α eucaina. Solución 0,25 o/oo de α eucaina sembrada con sus propios gérmenes.



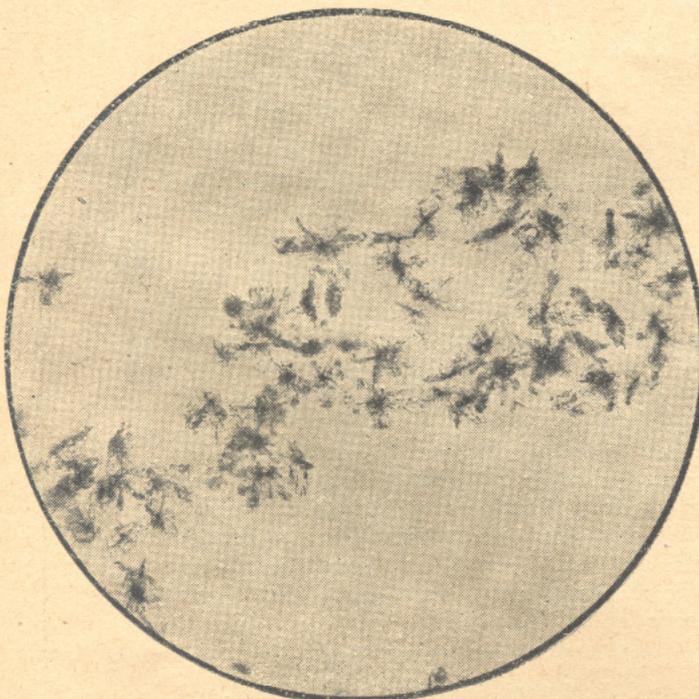
Microfotografía Nº 9. — Cloro aurato de cocaína. Producido con solución de cocaína al 1 en 20.000, sembrado con gérmenes de benzoil ecgonina.

tir inducciones por adsorción y polaridad. 2º el aspecto de las preparaciones es debida a asociaciones cristalinas de cristales unitarios muy semejantes, pero con direcciones de asociación particulares y entonces resultan hábitos cristalinos distintos.

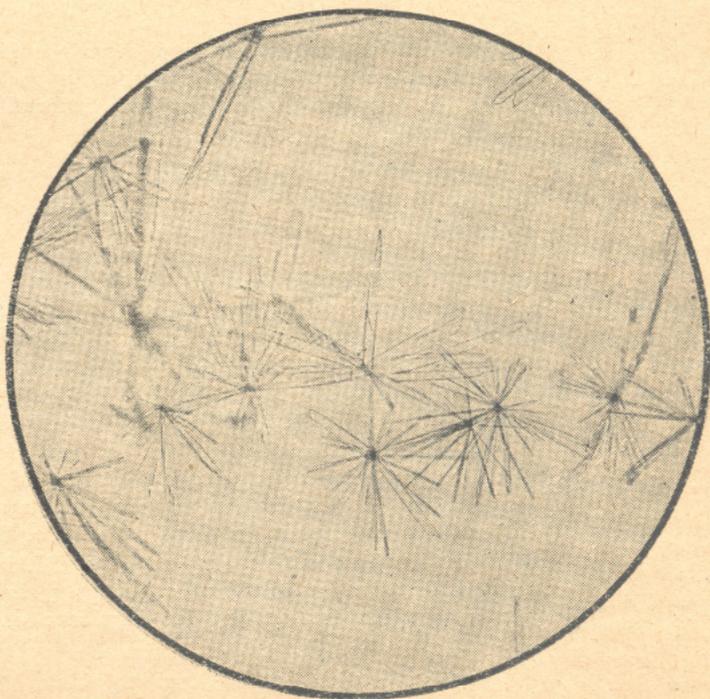
Estos casos no excluyen las posibilidades de cristalizaciones inducidas de aspectos muy semejantes y

seguridad y precisión como para definir casos de isomorfismo; posiblemente la obtención de Lauegramas podría ser sino más factible, por lo menos más seguro.

Como verificaciones complementarias técnicamente sencillas tendríamos: 1º Observación de un acercamiento a las formas típicas a medida que se aplica



Fotomicrografía Nº 8. — Cristales de cloro aurato de atropina. Solución de atropina al 1 o/oo sembrada con gérmenes de cloro aurato de α eucaina.



Microfotografía Nº 10. — Cloro-aurato de benzoil ecgonina. Producido con solución de benzoil ecgonina al 1 en 2.000, sembrado con gérmenes de cocaína.

al residuo un método de purificación selectivo, ya sea por simple extracción o preferentemente por adsorción. 2º Aplicar la prueba de ratificación de forma o sea el mantenimiento del hábito cristalino al mezclarse con la supuesta especie química.

La prueba de ratificación de forma que se menciona más arriba está basada en el hecho generalmente observado que las propiedades físicas de una sustancia permanecen invariables si se mezcla con la misma sustancia; pero si la sustancia es distinta, las propiedades pueden sufrir variaciones más o menos notables. Esta propiedad es corrientemente empleada en la identificación de sustancias orgánicas mediante el punto de fusión.

La aplicación de este artificio a las reacciones micro-cristalinas puede realizarse en esta forma: Si una solución de X produce determinada cristalización, espontánea o con gérmenes, y queremos verificar que se trata de una sustancia A, basta preparar una solución con A y mezclarla con la solución X, si la mezcla reproduce una cristalización idéntica a X y A puede admitirse la identidad.

La experiencia resulta más nítida si las soluciones X y A se diluyen a un límite en el cual la reacción cristalina es apreciable, pero diluidas al doble resultan nulas o despreciables. Para hacer el ensayo se mezclan en partes iguales; y sobre una misma lámina y en las mismas condiciones se realizan las tres reacciones; soluciones A y X en límite de positivo, y la mezcla de ambas; el ensayo efectuado en

esta forma lo he llamado "prueba de ratificación de forma".

Si la reacción en la mezcla es nula se puede establecer la no identidad; si la cristalización se mantiene semejante a A y X la prueba de identidad queda limitada por las posibilidades de isomorfismo.

En los casos de soluciones impuras es conveniente ampliar la prueba haciendo la comparación no solo con las soluciones A y X en límite de positivo, sino también con las mismas, diluidas al medio.

Tratándose de una caracterización química toxicológica la posición correcta es considerar a este reactivo como todos los similares, reactivos de orientación sobre posible presencia de un grupo de alcaloides, y si es posible mediante cualquier artificio observar un acercamiento a la forma típica se debe ir directamente a verificar la presencia mediante otras reacciones.

(1) En el citado trabajo figuran 29 citas bibliográficas sobre el tema.

(2) Las fotomicrografías han sido obtenidas por el Sr. Marcos Santa Rosa, encargado del Laboratorio Fototécnico del Instituto de Higiene Experimental, a quien agradezco su eficiente colaboración.

NOTA: La Dirección de "Ph" agradece a los "Anales de la Asociación de Química y Farmacia" la colaboración al facilitarles los clisés de las fotomicrografías correspondientes a este trabajo.



Identificación de alcoholes con 2-4 dinitrofenilhidrazina

F. R. DUKE y R. C. WITMAN

El procedimiento descrito aquí sirve para la determinación rápida de alcoholes primarios y secundarios no interfiriendo la presencia de agua. El método se basa en la oxidación del alcohol al correspondiente compuesto carboxilado e identificación de éste por el 2-4 dinitrofenilhidrazina.

REACTIVOS. — Una solución salinada de permanganato en ácido sulfúrico 2 M. Una solución saturada de ácido oxálico y una solución al 1 % de dinitrofenilhidrazina en ácido perclórico 2 M.

PROCEDIMIENTO. — A 10 ml. de la solución de permanganato se añade 0,5 ml. del alcohol a investigar; se agita y el color del permanganato se cambia por el marrón del bióxido de manganeso. Se añade suficiente ácido oxálico para reducir el bióxido de manganeso presente, entonces se agregan 20 ml. del reactivo 2-4 dinitrofenilhidrazina. Se diluye con 25 ml. de agua, se filtra la hidrazona formada, se lava con agua y se recristaliza en alcohol. Por el punto de fusión se identifica el compuesto carboxilado formado.

El procedimiento fué estudiado y aplicado para alcoholes primarios y secundarios. Los alcoholes terciarios reducen con dificultad el permanganato y los productos que se forman son mezclas de compuestos carboxilados. Ninguna sustancia fácilmente oxidable o compuestos carboxilados interfieren en el procedimiento. El ácido perclórico es usado en la preparación del reactivo por dos razones: la dinitrofenilhidrazina es soluble en el ácido perclórico sin necesidad de agregar solventes orgánicos y la precipitación de la hidrazona es más rápida y más completa cuando el ácido perclórico es usado en la reacción.

Analytical Chemistry - May 1948.