

# — ANALES —

## DE LA ASOCIACION DE QUIMICA Y FARMACIA DEL URUGUAY

Avda. AGRACIADA 1464 [Piso 14] MONTEVIDEO - URUGUAY

Director: Quím. Farm. JOSE LUIS OLIVER VESCOVI

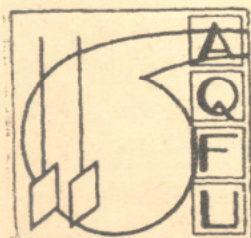
### SUMARIO:

Págs.

PRIMER CONGRESO PANAMERICANO DE FARMACIA . . . . .	73
PELUFFO, A. — Arechavaleta, (1838 - 1912) . . . . .	81
MORATO MANARO, J., GÜISSO, J. P. y POLLAK, E. — Contenido en vitamina "C" de algunas conservas comerciales de frutas y legumbres . . . . .	94
CHIARINO, J. C. — Contribución al estudio químico analítico funcional del ácido fólico sintético, (ácido pteroil glutámico) . . . . .	106
SAREDO, J. F. — Un rotífero (philodina roseola Ehrenberg), como reactivo microfisiológico en química toxicológica . . . . .	114
BABUGLIA, N. A. — La preparación industrial de los hidrolizados de caseína . . . . .	130
ESTABLE, J. E. — El efecto ocular de varias drogas irritantes, apli- cadas directamente sobre las membranas oculares . . . . .	134
ALCIATURI, F. A. — Contribución al estudio del significado de la ma- teria orgánica de las aguas, determinada en función del oxígeno consumido al permanganato de potasio en medio ácido . . . . .	148
CIGNOLI, F. — El Bálsamo de Fierabrás . . . . .	156
INDICE del Tomo 50, Nos. 1 y 2 . . . . .	199

## ACEPTAMOS CANJE

LA REPRODUCCION DE LOS TRABAJOS  
PUBLICADOS EN "ANALES", SOLO SE  
PERMITE, HACIENDO LA CITA RESPECTIVA



T O M O 5 0 N.º 2

A Ñ O 1 9 4 9

(publicado en Diciembre)



Nota de la Dirección. — Por omisión, este trabajo que fuere realizado conjuntamente con la Srta. **ERCILIA I. ONETO**, Química Farmacéutica del Laboratorio Central de Química del Ministerio de Salud Pública, aparece firmado por uno solo de los autores.



# CONTRIBUCION AL ESTUDIO QUIMICO ANALITICO FUNCIONAL DEL ACIDO FOLICO SINTETICO ( ACIDO PTEROIL GLUTAMICO )

por

JUAN CARLOS CHIARINO

Químico Farmacéutico. Profesor de Farmacia Química de la Facultad de Química y Farmacia de Montevideo. Jefe del Laboratorio Central de Química del M. de S. P.

## INTRODUCCIÓN

El ácido fólico (ácido pteroil-glutámico), también conocido con el nombre de vitamina M, vitamina Bc, o factor de crecimiento del lacto-bacillus casei, es uno de los factores que componen el complejo B que ha sido recientemente identificado y preparado sintéticamente después.

Su acción farmacológica está especialmente orientada en el tratamiento de las anemias macrocíticas o megaloblásticas, anemia perniciosa de Addison, anemia macrocíticas del embarazo, de la pelagra y en el esprús tropical.

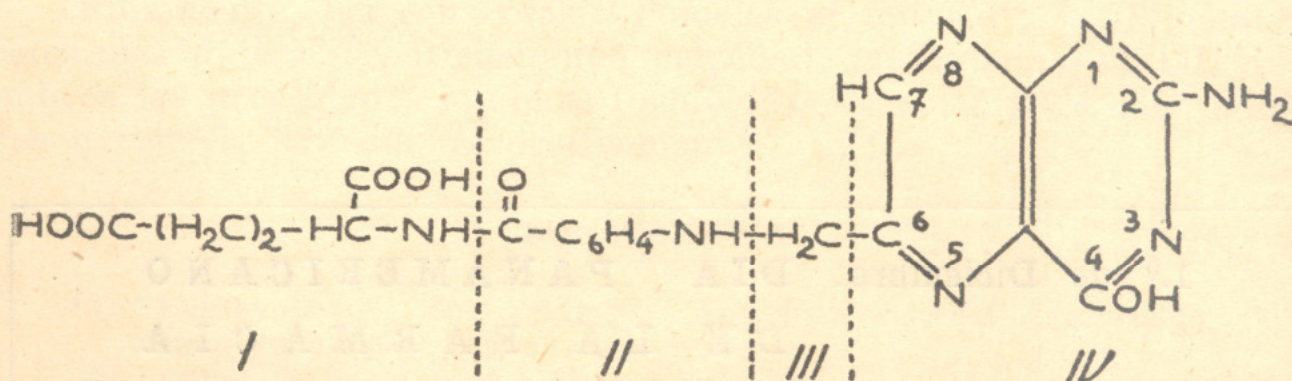
El ácido fólico activo es el ácido monoglutámico ya que se han identificado otros ácidos fólicos que se diferencian de éste por poseer en su constitución una cadena, con 3 o con 7 moléculas de ácido glutámico, denominados por esa causa di y exa-glutamil-fólicos.

## HISTORIA

En el año 1941, se demostró que existía en el hígado, en las hojas de espinaca (*beta vulgaris*), otros vegetales y en la levadura de cerveza (*saccharomices cerevisine*), una sustancia que era necesaria para el mejor desarrollo del lactobacillus casei, razón por la cual se le ha designado con ese nombre.

Fué aislado en 1943, recibiendo el nombre de ácido fólico y sintetizado en 1945 por Angier, Stokstad y numerosos colaboradores.

Su fórmula bruta en la siguiente:





Como ha podido comprobarse que en la constitución del principio antianémico del hígado, existía el ácido glutámico, se creyó que el ácido fólico no era otra cosa que el principio activo de este elemento; trabajos posteriores eliminaron esta hipótesis, quedando aún este problema sin resolver.

Si bien es cierto que la literatura científica bajo el punto de vista clínico es muy abundante y profusa, debe hacerse destacar también que ella es escasa o casi nula en lo que se relaciona con el aspecto químico-analítico, de sumo interés para los sectores técnicos que deben controlar químicamente los medicamentos a base de este nuevo agente terapéutico, hasta ahora procedente únicamente de una sola firma de EE. UU.

Es en ese orden de ideas que hemos realizado un estudio físico y químico funcional, teniendo como base para esto último, la fórmula química desarrollada, asignada por sus preparadores y utilizando en primer término un producto puro, llegado a nuestras manos, obtenido directamente de las fuentes de origen, cuyos resultados pasamos a exponer.

Bajo el punto de vista químico orgánico, el ácido fólico, debe ser considerado como un polipéptido (tripéptido), constituido por una cadena, con una molécula de cada una de ácido glutámico, ácido paraaminobenzoico, y el ptiridilo, núcleo heterocíclico biexagonal conteniendo 4 átomos de nitrógeno, una función fenólica y una función amina primaria.

#### CARACTERES FÍSICOS

Se presenta bajo forma de un polvo amarillo, constituido por pequeñas agujas cortas, observables al microscopio.

Es muy poco, o casi insoluble en el agua, indiferente a los disolventes orgánicos comunes (agua, alcohol, cloroformo, acetona, bencol, acetato de etilo, etc.).

No es deliquescente, ni higroscópico, es fluorescente. Es estable a la temperatura ambiente, y en solución diluida, y a un pH 9. Parece ser alterado por la acción de la luz, sobre todo en solución alcalina. Dado su carácter polipéptídico es capaz de dar iones anfibios y por tanto poseer un punto isoeléctrico que hemos determinado y hallado en la zona ácida entre un pH 4 y 4,5 aproximadamente.

Así pues, si a una solución de ácido fólico en soda normal o sea transformándolo en folato de sodio, que tenga un pH 8, o algo más, se le adiciona lentamente ácido clorhídrico normal, se producirá una precipitación cuando llegue la solución a un pH entre 4 y 4,5.

La precipitación puede ser inmediata cuando las cantidades son algo apreciables, pero en el caso de encontrarse en pequeñas cantidades puede demorar hasta 24 horas, para lo cual es conveniente utilizar tubos de ensayo cónicos.



Este precipitado cristalino recogido con una pipeta pasteur y observado al microscopio, se presenta en forma de pequeñas agujas, tal como se presenta el producto puro o sino en forma de cristales chatos, oblongos, solos o agrupados en maclas, que semejan flores de crisantemo amarillo, vistos por la parte superior.

Cuando se calienta progresivamente un tubo de vidrio capilar de paredes finas que lo contenga, no funde, sino que a una temperatura entre 200° y 210°, se carboniza, dando lugar así a una constante física de caracterización.

### PROPIEDADES QUÍMICAS

Su carácter de anfólito, le permite dar dos tipos de sales, con los álcalis: folatos y con los ácidos (clorhídrico, por ejemp.), clorhidratos, propiedad ésta que le permite ser absorbido por el organismo con suma facilidad, tal como ocurre con las sulfamidas.

Posse un débil poder reductor frente a reactivos oxidantes (nitrato de plata al 5%, licor de Fehling, ferricianuro férrico, recientemente preparado, etc.), en base a lo cual hemos instituído algunas reacciones. Este poder reductor puede ser atribuído al hecho de presentarse en el núcleo heterocíclico, en un mismo hexágono, las funciones amina primaria y fenol, caso muy similar al paraaminofenol, cuyo poder reductor es elevado como es bien notorio.

### CARACTERIZACIÓN

#### *a) Métodos físicos*

Como métodos de caracterización deben citarse la insolubilidad ya indicada, su aspecto físico macro y microscópico, su punto isoeléctrico y su punto de carbonización, (200/210° C).

Cuando se encuentre en algunas formas farmacéuticas (inyectables, comprimidos, elixir, etc.), puede ser puesto en evidencia, mediante la separación por precipitación (rápida o lenta) en su punto isoeléctrico en la forma ya citada y su observación consiguiente al microscopio.

En determinados casos es factible separarlo por centrifugación, tratar el precipitado por unas gotas de soda normal y llevado al punto isoeléctrico por medio de algunas gotas de ácido clorhídrico N/1 y seguidas de la observación microscópica.

#### *b) Métodos químicos*

Los métodos químicos están basados en la caracterización de los grupos moleculares: ácido glutámico, ácido paraaminobenzoico y ptiridilo.

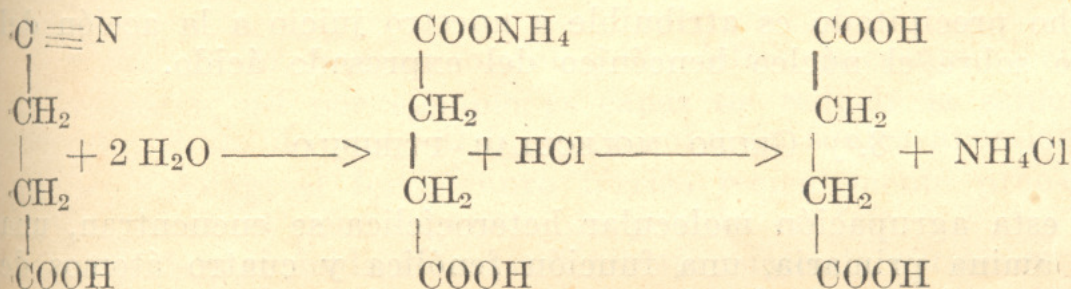
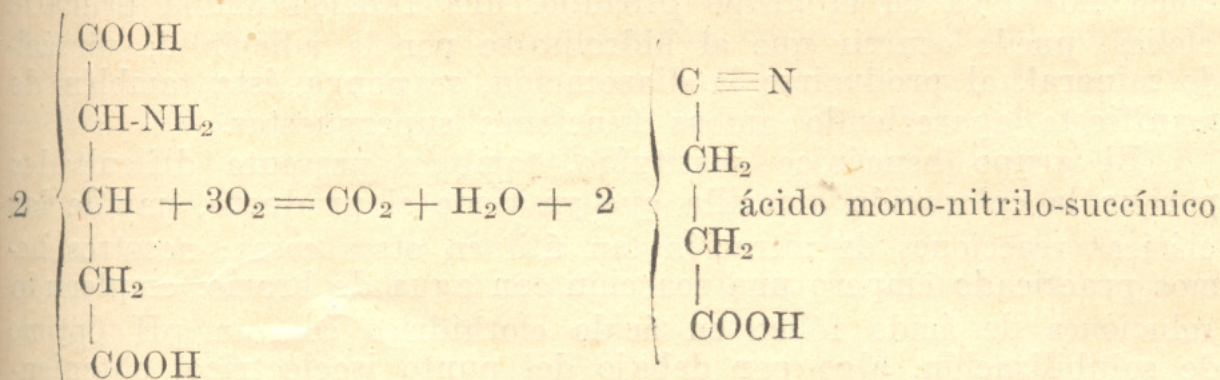


1.º) GRUPO MOLECULAR - ÁCIDO GLUTÁMICO

La presencia de este ácido en la molécula del ácido fólico, puede revelarse por su transformación en ácido succínico, mediante hidrólisis y acción del hipoclorito de soda. Además, la presencia de grupos carboxilos, se puede comprobar por su acción frente a la mezcla de yodato y yoduro de potasio en solución, la cual es capaz de poner en presencia de débiles concentraciones de iones hidrógenos yodo en libertad, según pasamos más adelante a exponer.

*Transformación en ácido succínico y posteriormente éste en pirrol.*

Esta transformación está fundada a nuestro juicio, en las reacciones químicas que describimos (partiendo del ácido glutámico, proveniente de la hidrólisis).



Las ecuaciones correspondientes a la transformación subsiguiente en pirrol, la omitimos por ser suficientemente conocida.

He aquí la técnica seguida, para esta reacción:

En un vidrio de reloj, se ponen unos cristales de ácido fólico y se adicionan unas gotas de ácido clorhídrico de  $D = 1,19$ , se evapora al B.M., el residuo toma un color verde. Luego se agregan unas gotas de una solución de hipoclorito de sodio y se evapora nuevamente al B.M. a sequedad, se agregan unas gotas de ácido clorhídrico y agua y se evapora a sequedad otra vez.

Se pasa el residuo de la evaporación a un tubo de ensayo y se agrega zinc puro en polvo (0.10) y amoníaco (2 cc.), se calienta hasta desaparición de vapores alcalinos y se introduce entonces en



el borde del tubo una astilla de madera de pino, impregnada en ácido clorhídrico, la cual se tiñe en rojo naranja.

En esta reacción se produce una coloración verde al ser evaporado el ácido fólico al B.M. con el ácido clorhídrico, que constituye a su vez una reacción cromática cuyo mecanismo no conocemos.

La presencia de los grupos carboxilos libres puede ponerse de manifiesto agitando una solución de yoduro y yodato de potasio con una pequeña cantidad de ácido fólico puro, aparecerá un color pardo. Agitando el contenido del tubo con cloroformo, tomará éste, color violeta debido a la presencia de yodo.

### 2.º) GRUPO MOLECULAR - PARAAMINOBENZOICO

Esta agrupación molecular, no presenta reacciones específicas; como existe ya en el grupo ptiridilo, una función amina primaria cíclica, puede ocurrir que al hidrolisarse por la adición de un ácido mineral, al producirse la diazotación, se ponga ésta también de manifiesto apareciendo ambas funciones superpuestas.

El grupo bencénico sustituido, también presenta dificultades porque la coloración amarilla que ya tiene el producto, impide las clásicas reacciones de nitración tan útil en otros casos; nosotros hemos practicado empero una reacción con agua de bromo, empleando soluciones de ácido fólico en ácido clorhídrico con un pH óptimo de solubilización, algo por debajo del punto isoeléctrico, obteniendo una precipitación neta, con cierta gelificación de color amarilla.

Dicho precipitado es atribuible a nuestro juicio a la acción del halógeno sobre el núcleo bencénico del expresado ácido.

### 3.º) GRUPO MOLECULAR - PTIRIDILO

En esta agrupación molecular heterocíclica se encuentran, una función amina primaria, una función fenólica y cuatro átomos de nitrógeno en forma de funciones aminas terciarias.

Las funciones amina primaria, terciaria y fenólica han sido investigadas por los procedimientos siguientes:

#### *Amina primaria:*

a) Agregando a una solución de ácido fólico salificado, unas gotas de hipoclorito de sodio, aparecerá un color pardo.

b) Agregando al ácido fólico, salificado por medio de un ácido, unas gotas de nitrito de sodio, y luego naftol alfa o resorcina en medio alcalino, aparecerá un color rojo (reacción de copulación).

c) Agregando al ácido fólico, salificado por medio de un ácido, unas gotas de nitrito de sodio y luego dimetilanilina disuelta en ácido clorhídrico, aparecerá una coloración rojiza (reacción de copulación).



### *Aminas terciarias*

Para poder efectuar las clásicas reacciones de aminas terciarias, es necesario llevar las soluciones en ácido clorhídrico del ácido fólico, a un ph. 3, aproximadamente, pues de lo contrario las reacciones son negativas. Efectuada esta corrección, se puede investigar por medio de los reactivos de esta función (Bouchardat, Dragendorff, Mayer, etc.).

En las mismas condiciones se obtiene con una solución reactivo de bicloruro de mercurio al 5%, un precipitado gelatinoso amarillo muy abundante, que también atribuimos a la función amina terciaria.

### *Función fenólica*

Como hemos visto en las citadas reacciones anteriores de copulación, el ácido fólico salificado actúa como primer miembro, de esta diazo reacción; ahora bien, debido a la presencia de un grupo fenólico, en su molécula, es capaz de actuar como segundo elemento.

Para esta reacción debe utilizarse el ácido sulfanílico diazotado con el cual da una coloración roja, el ácido fólico en medio alcalino.

Además la función fenólica aparece con los reactivos de Millón y de Marquis en forma apreciable, siguiendo la técnica utilizada corrientemente.

### *Reacciones de reducción*

Como ya lo expresamos, el ácido fólico, presenta cierto carácter reductor, así por ejemplo es capaz de reducir la solución reactivo de nitrato de plata al 5 %, en solución sódica amoniaca, el licor de Fehling, el ferricianuro férrico recientemente preparado.

Decolora el permanganato de potasio en frío.

Tratando el ácido fólico con nitroprusiato de potasio y unas gotas de soda N/1, luego agregando ácido acético hasta acidez, da un color verde. Esta reacción se favorece si se calienta ligeramente al baño maría, el tubo de ensayo que lo contiene.

Tratado el ácido fólico con ácido sulfúrico al 1/5, conteniendo yodato de potasio, toma lentamente una coloración violeta que no pasa al cloroformo, posiblemente, debido a la acción del ácido yódico puesto en libertad, sobre el ácido fólico.

### *Métodos de dosificación*

El método de dosificación difundido en la escasa bibliografía es: por determinación cuantitativa del nitrógeno, siguiendo el método de Kjeldahl (22,21 de nitrógeno %).

Existe también una constante química frente a la solución va-



lorada de soda N/10 que se mide por el número de centímetros cúbicos gastados para determinada cantidad del producto (1 gr.: 67,98 Na OH N/10).

Hemos instituido dos métodos que nos han dado resultados concordantes: uno basado en su carácter ácido, procedimiento por el método directo; cuando se encuentra al estado de folato se procede por retorno, empleando un exceso de  $\text{SO}^4\text{H}^2$  N/10 y determinando el exceso con NaOH N/10, en ambos casos utilizamos la fenolftaleína como indicador. Dividiendo el P M entre 2,5 da el equivalente químico o sea el peso normal.

El primer método citado nos ha permitido dosificar el ácido fólico, cuando se encuentra al estado de tal en las especialidades (comprimidos, cápsulas, etc.), y utilizamos el método por retorno cuando se encuentra al estado de folato de sodio (inyectable).

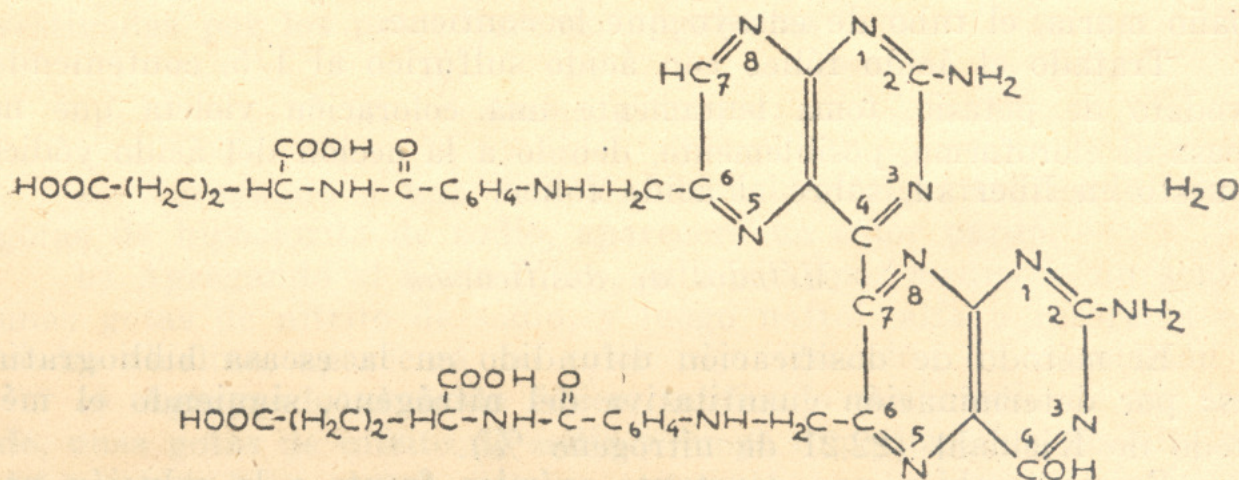
El segundo método está fundado en la acción que tiene el bromo naciente sobre los núcleos aromáticos que posee el ácido fólico y utilizando por consiguiente el método de Koppeschaar. En este caso el P.N. equivale a la novena parte del P.M. = 441/9.

#### CONSIDERACIONES

De todo lo que hemos expuesto precedentemente se deducen a nuestro juicio dos hechos fundamentales:

1.º) La importancia que tiene la concentración de hidrogeniones (pH) en la química cualitativa del ácido fólico, que hemos instituido, sin cuya determinación previa o corrección subsiguiente los resultados son negativos.

2.º) El hecho de que los factores que hemos encontrado para determinar los equivalentes químicos, por acidimetría y por bromometría, sean 2,5 y 9 respectivamente, número fraccionario el primero e impar el segundo, nos induce a emitir la hipótesis de que el verdadero peso molecular y la fórmula, desde luego; posean un valor doble del asignado por sus autores.





Si se toma como fórmula la que venimos de presentar, con una molécula de agua de cristalización, daría lugar a un factor 5 para la acidez y 18 para la dosificación bromométrica, factores más correctos y de acuerdo con la teoría, pues correspondería así a cinco agrupaciones ácidas (4 carboxilos y un fenol), y a nueve hidrógenos sustituibles por el halógeno, 8 correspondientes a los grupos beneénicos del ácido paraaminobenzoico y uno del grupo pteridilo, resultando además 9 moléculas de ácido bromhídrico que se ponen en libertad, con un total de 18 átomos de bromo consumidos, de acuerdo con las reglas de los números pares en la halogenación.

## BIBLIOGRAFIA

- Montequi, Santos Ruiz. — Acido fólico. Estado actual, 1946.  
Spies. — Experiences with folic acid, 1947.  
Farmaleta. — Buenos Aires, 1947. (Traducido de la Press Medicale).  
J. Esteve.  
Hutchings, Bohonos y Peterson. — Purificación y propiedades de un factor eluato, requerido por ciertas bacterias que producen la fermentación láctica.  
Abstracts of the annals of the New York Academy of Sciences. Folic acid.  
Folic acid. (The present status of lactobacillus casei factor).  
Folvite - Lederle. (Monografía).  
Dr. Tom D. Spies, Dr. Guillermo García López, Dr. Arístides Menéndez y Mary B. Koch, B. A. El efecto del ácido fólico sobre el sprue.  
Angier, Boothe, Hutchine, Mowat, Semb, Stokstad y colaboradores. — Synthesis of a compound identical with the L. Casey Factor isolated from liver. Science. 102, 227 (agosto 31 de 1945).  
Ingram. Los ácidos fólicos. Monografía.  
Folic acid. (Calco Chemical División, American Cyanamid Company). Monografía.  
Winton. Analysis of food, 1944.  
Revista "El Farmacéutico". Febrero de 1947.  
Spies, García López, Milanés, Aramburú. Synthetic folic acid. The Journal of the American Medical Association.

---

1.º de Diciembre: DIA PANAMERICANO  
DE LA FARMACIA