

Estudio químico-analítico del aceite de semillas de naranja

por

M. de Mingo, O. Fernández y A. Toledano

La naranja es una de las riquezas nacionales más estimables. Existen múltiples industrias derivadas de su total aprovechamiento, como, por ejemplo, las alimenticias, de preparación de bebidas refrescantes y zumos, la obtención de pectina, el beneficio de la esencia, los concentrados que sirven de materia prima para la posterior obtención de vitaminas y un número variable de otras secundarias.

No obstante, existe un producto de desecho al que no se le ha prestado todavía atención: es la grasa contenida en la semilla. De la bibliografía consultada no se ha obtenido dato alguno relacionado con su aprovechamiento, y los referentes a la composición de la grasa de la semilla son muy incompletos y de relativo valor. De aquí nuestro interés de estudiar las características fisicoquímicas del aceite de naranjas y completar así el cuadro analítico de las grasas obtenidas de las plantas de la familia de las Auranciáceas.

MATERIA PRIMA

Como materia prima para la obtención de la grasa hemos utilizado semillas de las plantaciones valencianas, correspondientes al *Citrus Aurantium*, que el Dr. Trigo nos ha suministrado generosamente, y a quien en este lugar expresamos nuestras más cumplidas gracias. Tales semillas proceden de los residuos de la preparación industrial de zumo. El marco industrial, después de limpio, se deja secar espontáneamente al aire y, por último, se separan por tamización las semillas enteras, perfectamente purgadas, de los residuos de endocarpio que las acompañan.

Según Diedrichs (1), las naranjas están constituidas por 27,82 grs. por 100 de epicarpio y mesocarpio, un 70,99 grs. por 100 de endocarpio y 1,99 grs. por 100 de semillas. Para sus investigaciones utilizó el

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Diedrichs: *Z. U. L.*, 1914.
 - (2) Diedrichs: *Z. U. L.*, 1914.
 - (3) Livache: *Compt. Rend.*, **96**, 260, 1883, y **102**, 1.167, 1886.
 - (4) Grün: *Analyse der Fette Wachse*, t. I, 186, 1925.
 - (5) A. Verley y F. Bölsing: *Berichte*, **34**, 3.354-59, 1901, y I. L. Peterson y E. S. West.: *J. biol. Chemistry*, **74**, 379, 1927.
 - (6) Schich y Halpern: *Chemiker Zeitung*, **31**, 297, 1907.
 - (7) E. Twitchell: *Deutsch Einheitsmethoden*, Witzöff, **54**, 1930.
 - (8) S. H. Bertran: *Dissertation Delft*. Rotterdam, 1928.
 - (9) *Abderhalden*, 439.
 - (10) E. Twitchell: *Z. U. L.*, **32**, 463, 1916.
 - (11) W. Heintz: *Liebigs Annalen*, **92**, 295.
 - (12) *Villavecchia*, t. I, 522, 1935.
 - (13) *Villavecchia*, t. I, 522, 1935.
 - (14) O. Hohner y C. A. Mitchell: *Analyst*, **21**, 316, 1896, referido en *Z. Annal. Chem.*, **39**, 176-179, 1900, y *Abderhalden*.
 - (15) *Abderhalden*, 441.
 - (16) W. Heintz: *Liebigs Annalen*, **92**, 295.
 - (17) H. Kriess y E. Roth: *Z. U. L.*, **25**, 81, 1913.
 - (18) Vongerichten: *Berichte*, **42**, 1.638-1.639, 1909.
 - (19) Ponzio: *Gazetta Chimica Italiana*, **35**, II, 571, 1905.
 - (20) Le Suer: *Journal of Chemical Society*, **85**, 1.713, 1904.
 - (21) Saytzev: *J. Pract. Chem.*, **33**, 300, 1866.
 - (22) Emdem: *Jour. Chem. Soc.*, **73**, 630.
 - (23) Le Suer: *Jour. Chem. Soc.*, **79**, 1.315.
 - (24) Meyer y Ecker: *Monatshefte fur Chemie*, **31**, 1.234, 1910.
 - (25) Fahrion: *Chem. Umschau*, **28**, 6, 1921.
 - (26) H. Matthesa y L. Rath: *Chem. Umschau Fette*, **22**, 15, 1915.
 - (27) Bauer y Hardegg: *Chem. Umschau*, **29**, 301, 1922.
 - (28) K. Täufel, M. de Mingo y H. Thaler: *Fette Umschau*, **42**, 142, 1935.
 - (29) Hildicht: *Jour. Soc. Chem.*, t. II, 3.106, 1927.
 - (30) Armstrong: *Jour. Soc. Chem. Ind.*, **44**, 431, 1925.
 - (31) Haworth: *Jour. of Chem. Soc.*, 1.454, 1929.
 - (32) Bauer y Krallis: *Chemische Umschau*, **38**, 201, 1931.
 - (33) I. Iwone y B. Suzuki: *Chem. Zentralblatt*, t. II, 2.594, 1931.
 - (34) Hawickenbrauch y Kaufmann: *Fette und Seifen*, **48**, 665, 1941.
 - (35) P. Kaufmann y W. O. Schubert: *Fette und Seifen*, **48**, 657, 1941.
 - (36) Grün y Janko: *Z. D. Öl. und fett. Ind.*, **41**, 553, 1921.
 - (37) Kaufmann: *Fette und Seifen*, **48**, 659, 1941.
-

aceite de las semillas, a las que asignó una riqueza de un 57,31 grs. por 100 de materia grasa.

Como los datos obtenidos por varios experimentadores eran poco congruentes, decidimos el estudio de la grasa con las técnicas modernas.

Rendimiento.—Las semillas secas al aire se descascarillan, proporcionando así un albumen fácilmente triturable.

La relación de epispermo a almendra encontrada es la siguiente:

144 grs. de semillas enteras.....	}	40 grs. de epispermo.
		104 grs. de albumen.

es decir, un 72,22 grs. por 100 de albumen y 27,77 grs. por 100 de epispermo.

Diedrichs estima la proporción de epispermo y albumen en 13,1 grs. y 86,9 grs. por 100 respectivamente (2).

Agotada la semilla total, previa trituración, proporciona un 36,2 grs. por 100 de aceite:

Semillas.....	67	gramos
Aceite obtenido.....	24,25	»
% de aceite en semillas ..	36,20	»

El albumen, liberado de la cascarilla y agotado igualmente con eter, suministra un porcentaje en aceite de 46,39 grs.

Albumen	73,46	gramos
Aceite obtenido.....	34,084	»
% de aceite en el albumen	46,39	»

Fácilmente se comprende que al epispermo de las semillas le corresponde una riqueza grasa de un 2,7 grs. por 100.

Los datos relativos al contenido en aceite que hemos podido coleccionar se resumen en el siguiente cuadro:

	A. Grün	Lewkowitsch	Nosotros
% de aceite en las semillas .	33 — 37	20 — 28	36,2
% de aceite en el albumen....	54 — 47	—	46,39
% de aceite en el epispermo..	2	—	2,7

Nuestros valores concuerdan con los de A. Grün; solamente el rendimiento obtenido, trabajando con el albumen limpio, es inferior al que Grün asigna a estas semillas. Probablemente la causa de la disparidad estriba en que nosotros hemos agotado el albumen directamente, seco al aire, y quizá el autor a quien mencionamos haya procedido a una desecación previa, lo que, por otra parte, no está consignado en la fuente bibliográfica a que nos referimos.

Con los datos obtenidos podemos inquirir de modo aproximado el valor anual de beneficios de la grasa que, la cosecha española de naranjas, podría suministrar. No poseemos más información normal, para intentar este balance, que la publicada en el *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola* de 1935 (Ministerio de Agricultura).

He aquí resumidos tales valores:

GRASA DE SEMILLA QUE SE PUEDE OBTENER DE LA PRODUCCIÓN
DE NARANJA DE ESPAÑA

	Naranja	Semilla	Grasa
Por árbol... .. .	31,000 grs.	616,9 grs.	223,31 grs.
Producción total de España.	9.098,031 q. m.	181,050,81 q. m.	55.763,65 q. m.
$\frac{1}{2}$ » » »	—	—	27.881,82 »
$\frac{1}{3}$ » » »	—	—	18.587,88 »
$\frac{1}{4}$ » » »	—	—	13.940,91 »
$\frac{1}{5}$ » » »	—	—	11.152,73 »

Con sólo aprovechar un quinto de los residuos anuales de la cosecha naranjera, se podría obtener un beneficio de 11.000 quintales métricos, en números redondos, de grasa, lo que significa un aumento bastante considerable en materia prima para usos industriales de los más variados.

ESTUDIO QUÍMICO-ANÁLITICO

Caracteres.—El aceite obtenido constituye un líquido algo viscoso, de color amarillento y sabor amargo, debido a la hesperidina. Por enfriamiento enturbia, depositando glicéridos de los ácidos sólidos, que vuelven a disolverse en cuanto se eleva la temperatura. Lewkowitsch califica a esta grasa como un aceite semisecante poco conocido. Expuesto al aire, se espesa muy lentamente, no llegando a formar película. Interesa fijar el coeficiente de secantividad para la determinación defi-

nitiva del grupo a que pertenece la muestra en estudio. Para ello hemos seguido el método de Livache (3) que proporciona los siguientes valores, en el transcurso de una semana, al terminar la cual no se encontró aumento de peso:

DÍAS	Peso de la $c + p + a + o$	Aumento por oxígeno fijado		
		Parciales	Totales	%
22-1-42	22,6761 grs.			
23-1-42	22,0786 »		0,0025 grs.	0,49 grs.
24-1-42	22,0902 »	0,0116 grs.	0,0141 »	2,79 »
26-1-42	22,0990 »	0,0088 »	0,0229 »	4,53 »
27-1-42	22,1000 »	0,0010 »	0,0239 »	4,73 »
28-1-42	22,1003 »	0,0003 »	0,0242 »	4,79 »
29-1-42	22,1003 »	0,0000 »	0,0242 »	4,79 »

En función de estos datos, debemos calificar al aceite de semillas de naranja como no secante y perteneciente al grupo de los aceites de sésamo, cacahuet, colza, etc.

Reacciones coloreadas.—*Reacción de Haydenreich.*—Coloración amarillo ladrillo oscuro, que pierde en intensidad poco a poco, quedando a los tres minutos una capa homogénea de color amarillo claro.

Reacción de Hauchecorne.—Coloración amarillo pálida. Toma color rojo ladrillo claro al cabo de veinte minutos si la mezcla se coloca en baño de agua hirviente.

Reacción de Liebermann.—Coloración verde muy fugaz, quedando el líquido de color pardo.

Reacción de Macciotta.—A los dos minutos un color amarillo verde claro en la zona de contacto; a los cuatro minutos, se forma debajo de este anillo amarillo otro de color violeta, y, transcurrido algún tiempo, se produce en la capa etérea una fluorescencia verde.

CONSTANTES FÍSICAS

Densidad (D_{20}°)	0,9203
Índice de refracción (n_D^{25})	1,4666°
Grado refractométrico.	61,1
Viscosidad relativa (aceite a 60° y agua a 20° C.)	17,2
Polarización	No desvía el plano de luz.
Punto de solidificación	0,2°

CONSTANTES QUÍMICAS

El estudio sistemático se ha verificado siguiendo los métodos consignados en los *Deutsche Einheitsmethoden* de 1930, que constituyen, hasta que se publique la próxima edición, las normas unificadas para hacer comparativos los resultados obtenidos por distintos investigadores.

En el caso concreto del índice de iodo, hemos dado preferencia al método de Wijs, porque, según Grün (4), puede tener lugar una sustitución de hidrógeno por halógeno, cuando se opera con combinaciones muy no saturadas. Estima el mismo autor que con el método de Wijs es como hay menos peligro de sustitución, y sólo en los casos en que aquélla pueda presuponerse debe emplearse el método de Meigen y Winogradoff. Por otra parte, el método de Wijs está consignado oficialmente en los métodos americanos para análisis de cereales y grasas de 1935.

El índice de sulfocianógeno o de rodan, se ha realizado siguiendo las prescripciones de su descubridor, profesor doctor Kaufmann.

En el caso del índice de acetilo, se ha procedido según el método oficial alemán y el de A. Verley y F. Bölsing (5).

El residuo insaponificable se evaluó por el método de precisión de Schicht y Halpern (6), ya que, por el consignado en el Wizöff de 1930, se obtuvieron resultados discordantes en varias determinaciones seriadas.

CONSTANTES QUÍMICAS

Índice de ácido.. .. .	1,254
Índice de saponificación.. .. .	191,15
Índice de iodo. Farmacopea germánica.	93,10
Índice de iodo (Wijs).. .. .	103,5
Índice de sulfocianógeno.. .. .	61,27
Índice de acetilo (Wizöff).. .. .	5,83
Índice de acetilo (Verley-Bölsing).. .. .	8,54
Índice de Reichert-Meissl.. .. .	0,52
Índice de Polenske.. .. .	0,45
Insaponificable.. .. .	0,45
Índice de Hehner.	95,27
Índice de Hexabromo.. .. .	1,67
Secantividad (Livache).. .. .	4,79

ÁCIDOS GRASOS TOTALES

Los ácidos grasos totales se obtuvieron como operación complementaria de la determinación del residuo insaponificable. Con el fin, sin

embargo, de disponer de una cantidad mayor que nos permitiera su estudio inmediato partimos de un peso mayor de grasa neutra, 25 grs. Se saponificó, liberándole de insaponificable, y descompuestos los jabones con ácido clorhídrico al 20 por 100, se extrajeron los ácidos grasos con éter etílico, que, desecado con sulfato sódico anhidro, abandonó aquéllos en estado de pureza. Tales ácidos se desecaron en vacío, sobre ácido sulfúrico a 50° C.

Caracteres organolépticos.—Se obtuvo una masa semisólida de olor típico y característico a grasa, de color casi blanco, tirando algo al crema. No es dura, y su consistencia es más bien parecida a la de la manteca de cerdo. El sabor es ligeramente amargo, como el de la grasa neutra.

Analíticamente presenta las siguientes constantes físico-químicas:

Punto de fusión.....	37° — 41,25°
Punto de solidificación (Título).....	35,4°
Índice de refracción (n_D^{40}).....	1,4558
Grado refractométrico a 40°.....	44,9
Índice de iodo.....	110,35
Índice de sulfocianógeno.....	63,16
Número de neutralización.....	212,2
Peso molecular medio.....	280,3
Porcentaje de ácidos grasos teórico.....	95,67

Los ácidos grasos totales cuyas características hemos fijado, son, naturalmente, una mezcla de distintos ácidos saturados y no saturados. Entre estos últimos deben existir términos en cuya cadena la no saturación sea doble y quizá triple, y para resolver este empeño—confirmado, además, por la diferencia numérica entre los índices de iodo y de sulfocianógeno—, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, no hay más remedio que llegar a la separación de los componentes sólidos (saturados?) y líquidos (no saturados?) que forman parte y dan característica típica a cada grasa.

ÁCIDOS GRASOS SÓLIDOS

Evaluación y separación.—La proporción en que entran a formar parte del aceite los componentes ácidos sólidos (saturados?) ha sido determinada por dos métodos fundamentales, que han permitido, al mismo tiempo, profundizar más en lo que se refiere a rendimiento y calidad de los componentes obtenidos. Han sido aquéllos el método clásico de Twitchell (7) y el de S. H. Bertram (8). Los valores obtenidos

con uno y otro método se consignan a continuación, en tantos por cientos referidos a ácidos grasos totales:

MÉTODO DE TWITCHELL

Cantidad pesada de ácidos grasos totales	Peso de ácidos grasos sólidos	% de ácidos grasos sólidos
2,0655 grs.	0,3580 grs.	17,38 grs.
4,7056 >	0,8637 >	18,35 >
4,9252 >	0,9485 >	19,25 >

MÉTODO DE S. H. BERTRAM

Cantidad pesada de ácidos grasos totales	Peso de ácidos grasos sólidos	% de ácidos grasos sólidos
4,9848 grs.	1,3833 grs.	27,75 grs.
5,0180 >	1,4030 >	27,95 >

Nosotros hemos encontrado, para el índice de iodo de las fracciones sólidas obtenidas por uno y otro método, valores que confirman la más exacta separación, según S. H. Bertram.

Índice de iodo de los ácidos grasos sólidos:

2,17 Twitchell.

1,61 Bertram.

El método de Bertram constituye, pues, el de elección para evaluar los ácidos grasos sólidos de una grasa.

Lo expuesto encuentra su confirmación si se sigue el camino iniciado por Kaufmann en sus estudios rodanométricos. Este autor, a base de consideraciones teóricas y resultados experimentales sobre la fijación de halógeno y sulfocianógeno en la molécula de los ácidos grasos, ha deducido una serie de fórmulas con las que se puede calcular el porcentaje de ácidos sólidos y líquidos.

Tales ecuaciones conducen a obtener valores que, en nuestro caso concreto, concuerdan extraordinariamente con la realidad, obteniéndose

así un valor de 27,09 grs. por 100 de ácidos grasos sólidos. Valor también acorde con el resultado práctico de 27,85 grs. por 100 de ácidos sólidos obtenidos según el procedimiento de S. H. Bertram.

Aspecto cualitativo-cuantitativo.—Los ácidos grasos sólidos obtenidos según S. H. Bertram, presentan las siguientes características:

Punto de fusión.....	56,25° — 56,75°
Punto de solidificación.....	54,25°
Índice de refracción (n_D^{40}).....	1,4415
Grado refractométrico a 40°.....	24,0
Índice de iodo.....	1,61
Número de neutralización.....	208,3
Peso molecular medio.....	269,3

El índice de refracción de los ácidos sólidos, aunque no definitivo, permite hacer algunas consideraciones de tipo cuantitativo.

El valor encontrado es de 1,4462 a 25°C. Tanto el ácido palmítico como el esteárico, presentan valores de 1,4434 y 1,4565, respectivamente, a 25°C. y la semisuma se aproxima bastante al resultado experimental. Podría pensarse que los ácidos sólidos, brásídico y erúcido, con índices de refracción parecidos, estuvieran también presentes, pero el bajo índice de iodo de los ácidos grasos sólidos obtenidos experimentalmente, descarta esta posibilidad, ya que el índice de iodo de los mencionados ácidos es de 75.

Los puntos de fusión y solidificación, el índice de refracción y el peso molecular medio, orientan en el sentido de que, fundamentalmente, sólo hay una mezcla de ácidos palmítico y esteárico. El punto de fusión obtenido de 56,25° — 56,75° corresponde al de la mezcla eutéctica de partes iguales de palmítico y esteárico, 55,5° — 56,5° difícilmente desdoblable, que motivó por su constancia en las propiedades físicas, se la conceptuase como una especie química, el ácido datúrico o margárico. Según Abderhalden (9), la resolución de una tal mezcla de modo cuantitativo en sus componentes, puede realizarse en función del peso molecular, si sólo existen dos ácidos, y por tal método indicamos más adelante el resultado conseguido. E. Twitchell (10) pudo comprobar que los puntos de fusión de los ácidos grasos experimentaban grandes depresiones cuando se encontraban mezclados, descendiendo el esteárico y palmítico de 69,3° y 62,6°, respectivamente, a un punto de fusión constante de 55,5° — 56,5° C.

W. Heintz (11) estudió, con fines cuantitativos, tales depresiones en mezclas de porcentajes conocidos de ácidos palmítico y esteárico, construyendo una tabla de valores que permite calcular, en función del punto de fusión, la composición de la mezcla. Valiéndonos de ella, en-

contramos para el punto de fusión observado, $56,25^{\circ}\text{C}$, una proporción de 60 partes de ácido palmítico por 40 partes de ácido esteárico.

Si en lugar del punto de fusión tomamos como referencia el de solidificación encontrado por nosotros para los ácidos sólidos, $54,25^{\circ}\text{C}$, se obtiene un porcentaje de 60 partes de ácido palmítico por 40 partes de ácido esteárico (12).

El número de neutralización de los ácidos sólidos, sirvió también a Mangold y Marazza (13) para resolver el problema. Por este camino, obtuvimos un valor experimental de 55 partes de ácido palmítico por 45 de ácido esteárico.

El método que O. Hehner y C. A. Mitchell (14) desarrollaron para desdoblar las mezclas de ácido esteárico y palmítico, fundado en utilizar como medio de cristalización alcohol saturado de ácido esteárico, no conduce, según Kreiss y Hafner (15), a resultados aceptables, porque las disoluciones alcohólicas de ácido esteárico, presentan fenómenos de sobresaturación que determinan errores en los resultados finales, y W. Heintz (16) reconoció que las mezclas de ácidos grasos no se dejaban descomponer por cristalización fraccionada, al extremo de que se las podía conceptuar como individualidades químicas, con el consiguiente error.

Anteriormente hemos indicado la posibilidad de utilizar el peso molecular medio de los ácidos sólidos para averiguar su composición. El número de neutralización encontrado por nosotros para los ácidos grasos sólidos, 208,3, corresponde a un peso molecular medio de 269,3. Si consideramos ahora los pesos moleculares de los ácidos palmítico y esteárico, así como sus respectivos números de neutralización, veremos:

	Peso molecular	Número de neutralización
Ácido esteárico.....	284,29	197,55
Ácido palmítico.....	256,26	219,15

Que los valores alcanzados por nosotros corresponden sensiblemente a la media aritmética de los números de neutralización y peso molecular de los ácidos palmítico y esteárico.

Media del peso molecular.....	270,27
Media del número de neutralización.....	208,3

Quiere esto decir que los dos ácidos, palmítico y esteárico, se encuentran en una proporción muy próxima a la relación 1 : 1.

Podría objetarse que no hemos tomado en cuenta la posible presencia de ácido aráquico, abundantemente repartido en los aceites obtenidos de semilla. Teóricamente, los elevados pesos moleculares del ácido aráquico (312) y del lignocerico (368) descartan esta posibilidad. Sin embargo, no hemos renunciado a su comprobación experimental, utilizando el método de H. Kreiss y E. Roth (17). Siguiendo esta técnica, no hemos obtenido ningún precipitado a partir de la segunda cristalización, de los ácidos grasos sólidos, en alcohol de 90°.

Queda descartada también la posible existencia, en gran cantidad, de ácidos saturados de cadena corta, pues el pequeño número de Reichert-Meissl, expresión cuantitativa aproximada del contenido en ácidos saturados hasta el término 12, nos afirma en la creencia de su poca significación e importancia cuantitativo-cualitativa como constituyentes que prestasen a esta grasa una característica particular.

Podemos deducir que, en función de los valores experimentales hallados por el método de Heintz y Mangold y Marazza, la mezcla de ácidos grasos sólidos está constituida verosimilmente por ácido palmítico y esteárico en la proporción de 57,5 y 42,5 grs. por 100 respectivamente. Tales valores son, a nuestro modesto juicio, la expresión media más aproximada a la realidad.

ÁCIDOS GRASOS LÍQUIDOS

El estudio cualitativo de la fracción que contienen los denominados ácidos grasos líquidos, se ha realizado tradicionalmente por tres métodos fundamentales: El primero de ellos se debe a K. Hazura, y está fundado en oxidar con permauganato potásico en medio alcalino una disolución de los ácidos grasos líquidos, aislamiento posterior de los distintos oxiácidos producidos, aprovechando su distinta solubilidad en agua (ácido hexaoxiesteárico) y en éter (ácidos dioxi y tetraoxiesteáricos) y caracterización de ellos, bien por su punto de fusión y forma cristalina o por el índice de acetilo. El segundo método se funda en la capacidad fijadora de halógeno que presentan tales ácidos disueltos en un disolvente neutro (acetona, cloroformo, éter de petróleo), aislamiento de los derivados bromados por su distinta solubilidad en el éter de petróleo y caracterización del derivado halogenado por su punto de fusión y contenido en bromo. Y, por último, el tercer método, supone la destilación en alto vacío, bien de los ácidos grasos directamente o de sus respectivos esteres metílicos o etílicos.

Método de K. Hazura.—Los ácidos líquidos necesarios se obtuvieron por el método de Twitchell, y con ellos se procedió a la oxidación siguiendo paso a paso el método original de K. Hazura \times partiendo de

30 grs. de ácidos líquidos. He aquí, ahora, las distintas fracciones obtenidas, fracciones que, fueron recrystalizadas en alcohol de 96° y desecadas sobre plato poroso en vacío.

1.^a *Fracción*.—Tablillas rómbicas que se funden de 121,5° a 122°C. Corresponden al ácido dioxiesteárico obtenido por oxidación del ácido petroselinico en disolución alcohólica con permanganato potásico, ácido al que Vongerichten asignó un punto de fusión de 122°C (18).

2.^a *Fracción*.—Cuerpo sólido que se funde a 127° C. Parece corresponder al ácido dioxiesteárico que obtuvo Ponzio por oxidación del ácido oleico $\Delta 2 - 3$ con permanganato al 1 por 100 (19). Le Suer obtuvo también el mismo ácido (20).

3.^a *Fracción*.—Escamas blancas, que funden de 133°C 135,7°C. Este ácido fué obtenido por Saytzew y le asignó un punto de fusión de 136,5°C (21). Emden le asignó un punto de fusión de 134°C (22), pero según Le Suer (23), funde de 131,5° C a 132° C. Nuestra fracción corresponde indudablemente a este ácido, cuyo punto de fusión ha sido tan debatido.

4.^a *Fracción*.—El residuo de la purificación etérea de los oxiácidos insolubles en agua fué recrystalizado en alcohol de 96°, y obtuvimos un cuerpo sólido, blanco, que fundió a 154°C. Este cuerpo corresponde al ácido tetraoxiesteárico que, Meyer y Ecker aislaron por cristalización en alcohol de 30°, y se fundía a 158°C (24). Fahrion le obtuvo partiendo del ácido linoleico del aceite de semilla de algodón y se funde a 152° C (25). H. Matthes y L. Raht le asignan un punto de fusión de 156° (26).

5.^a *Fracción*.—Procede de las aguas de filtración que se alcalinizaron, concentraron y, por último, descompusieron con ácido sulfúrico en presencia de rojo Congo. La cantidad obtenida fué casi insignificante, y fundió, previa cristalización, a 170°C. Corresponde este punto de fusión al del ácido insolinusínico, que Bauer y Hardegg (27) aislaron oxidando ácido linoléico con permanganato potásico en solución alcalina, y también al ácido que K. Täufel, M. de Mingo y H. Thaler (28) obtuvieron con aceite de linaza y que se fundía a 171,5° C.

Critica de los resultados obtenidos.—El índice de iodo de 133,5 de los ácidos líquidos muestra la presencia de ácidos no saturados superiores al ácido oleico. Los índices de sulfocianógeno y de iodo del aceite de semillas de naranja confirman más este criterio al observar la marcada diferencia entre uno y otro.

La presencia de distintos isómeros oleicos generadores de distintos ácidos dioxiesteáricos en una misma grasa natural, no ha sido señalada, y aunque el estudio de la estructura de los glicéridos ha conducido a la afirmación de que la naturaleza produce fundamentalmente glicéridos mixtos, no se ha señalado todavía con argumentos convincentes el hecho de presentarse los distintos isómeros de un mismo ácido en la

grasa de una sola especie vegetal. A resolver este problema de extraordinario interés biológico, han tendido los trabajos de Hildicht (29) y de Armstrong (30), quienes han elaborado nuevos métodos de trabajo para el estudio directo de la constitución de los glicéridos naturales. En la serie linoleica las dos formas *alfa* y *beta* del ácido linoleico, han sido señaladas en especies vegetales distintas, a saber: el *Papaver Somniferus* y la soja hispida, pero no en la misma grasa de una sola especie vegetal (31).

¿Cómo explicarnos los resultados experimentales encontrados por nosotros? No hay más posibilidad que admitir una emigración del doble enlace en el momento de verificarse la oxidación en medio alcalino. Este criterio está sustentado por Bauer y Krallis (32) al afirmar que, la emigración del doble enlace es la única posibilidad de explicar los fenómenos que se producen al oxidar el ácido oleico en medio alcalino con permanganato potásico y en medio ácido por perhidrol. En el mismo sentido abunda la opinión de una autoridad como T. P. Hildicht, y es definitiva como afirmatoria de esta hipótesis la observación por I. Iwone y Suzuki (33) de cuatro estereoisómeros de los ácidos dioxi y dibromoesteáricos partiendo del mismo ácido oleico y desdoblado los racémicos por medio de la estricnina. Este hecho no tiene más explicación que una emigración en la posición del doble enlace, no solamente en los ácidos de la serie oleica, sino en algunos de la linoleica. Tal fenómeno se ha comprobado. Véanse si no los trabajos de Hawickenbrauch y Kaufmann (34).

Nuestros resultados experimentales no tienen en la actualidad más explicación que la de admitir durante la oxidación con permanganato potásico en medio alcalino una emigración o salto del doble enlace.

En el aceite de semillas de naranja se encuentran también, como hemos visto, ácidos doblemente no saturados, el linoleico normal y pequeñísima cantidad de linoléico.

Nótese las constantes analíticas de los ácidos líquidos estudiados:

Indice de refracción $(n)_{D}^{25^{\circ}}$	1,4554
Indice de iodo	135,5
Punto de fusión del hexabromuro	181,7"

Determinación cuantitativa del ácido oleico y del ácido linoleico.—Número de Rodan, según Kaufmann.—Este número mide la cantidad de sulfocianógeno, que fija una grasa, expresada por la equivalencia de iodo correspondiente a 100 grs. de aquella, y se ha verificado según los *Einheitliche. Untersuch.*

Resultados obtenidos:

ACEITE DE SEMILLAS DE NARANJA

Peso de la grasa	Número de Rodan	Media
0,3113 grs.	61,91	
0,2638 »	61,15	61,27
0,2558 »	60,77	

ÁCIDOS GRASOS TOTALES

Peso de los ácidos grasos totales	Número de Rodan	Media
0,2444 grs.	63,15	
0,2508 »	63,16	63,16
0,2343 »	63,18	

Con este dato y el correspondiente índice de iodo de la grasa, se puede calcular siguiendo a H. P. Kaufmann y W. O. Schubert (35) el porcentaje de ácido oleico y linoleico existentes en los ácidos grasos totales. Para ello hacemos uso de la fórmula consignada por aquellos investigadores:

$$L = 1,104 (J Z - Rh)$$

$$O = 1,113 (2 Rh Z - J Z)$$

en la que L y O representan los ácidos linoleico y oleico respectivamente, y J Z y Rh Z los índices de iodo y sulfocianógeno de la grasa. Sustituyendo en la fórmula los valores 103,5 para el índice de iodo y 61,2 para el número de rodan, se obtiene 46,69 grs. por 100 de ácido linoleico y 21,03 grs. por 100 de ácido oleico.

Determinación del ácido linolénico.—Para ello se ha procedido al aislamiento del derivado bromado correspondiente, según los métodos varias veces referidos.

Resultados:

Peso de ácidos grasos totales	Peso del derivado hexabromado	% de derivado hexabromado	Número de hexabromo
2,6150 grs.	0,0450 grs.	1,72 grs.	1,67 grs. %
2,7032 »	0,0441 »	1,63 »	

El valor de 1,67 grs. por 100 se denomina índice o número de hexabromuro. De él se puede pasar al porcentaje de ácido linolénico multiplicando por el factor de transformación 0,36, obteniendo así una cantidad de 0,612 grs. de ácido linolénico por 100.

Los valores numéricos obtenidos para las fracciones ácidos sólidos y líquidos respectivamente, permiten establecer la composición centesimal más próxima a la realidad, que presentan los componentes ácidos del aceite de semillas de naranja. Hela aquí:

Acido linoleico	46,69 grs. %
Acido linolénico	0,612 » »
Acido oleico	21,03 » »
Acidos sólidos (Bertram)	27,85 » »

Si a estos valores añadimos el correspondiente al residuo insaponificable, valor que es igual a 0,45 grs. por 100, obtendremos una cifra de 96,632 grs. La diferencia a ciento, corresponde a la glicerina, es decir, 3,368 grs. por 100.

Ya en imprenta este trabajo, conocemos los resultados obtenidos por H. P. Kaufmann (Dissertation Ramadan 1931), sobre la composición del aceite de semillas de naranja, que transcribimos: Rendimiento en grasa, 30 por 100. Contenido en ácidos grasos, 88,9 grs. por 100. Ácidos sólidos (Bertram), 29,1 grs. por 100.

Constantes del aceite: VZ = 205; SZ = 1,74; JZ = 98,3; RhZ = 62,4; insaponificable = 0,478 grs. por 100; Hexa Z = 3,16. Composición de los ácidos grasos: Ácidos saturados = 29,1 grs. por 100; ácido oleico = 29,5 grs. por 100; ácido linoleico = 40,5 grs. por 100; ácido linolénico = 1,1 grs. por 100.

Alcoholisis.—Lo hasta ahora transcrito, permite formarse como una idea muy aproximada a la verdad, de la composición cualitativo-cuantitativo del aceite que estudiamos. Sin embargo, se insiste en que el camino más práctico para el estudio de los componentes saturados y no saturados de una grasa o aceite, es precisamente, la destilación fraccio-

nada en vacío de los esteres metílicos obtenidos de la grasa natural sin necesidad de separarla antes en sus componentes sólidos y líquidos.

Por este método, los resultados obtenidos por nosotros no pueden considerarse como halagüeños, ya que no se ha conseguido un resultado que se pudiera considerar como satisfactorio.

1.^a *Fracción*.—Se recogió lo que destiló hasta 198°C, límite del palmitato de metilo. Se obtuvo una masa semisólida de color amarillo pálido, que presenta las siguientes constantes:

$(n)_D^{45} = 1,4496$	
Índice de saponificación.....	202,9

El ester metil palmítico, hierve a 198°C a 15 mm. y tiene un índice de refracción a 45° de 1,4311 (48) y un índice de saponificación de 207,9. Parece como si el destilado estuviera formado en su mayoría por palmitato de metilo, junto a una pequeña fracción líquida. A fin de caracterizar más escrupulosamente los componentes de esta fracción, se procede a separarla en sus fracciones sólida y líquida. Para ello se saponifica el conjunto, beneficiando los ácidos grasos—previa descomposición con ácido sulfúrico—por extracción etérea. El residuo de destilar el éter, constituido por los ácidos, se desdobra en sólidos y líquidos por el método de Twitchell.

Valores obtenidos:

ÁCIDOS SÓLIDOS

Punto de fusión.....	61°
Número de neutralización.....	217
Peso molecular medio ..	258

ÁCIDOS LÍQUIDOS

Índice de iodo.....	53
---------------------	----

Las constantes de los ácidos sólidos corresponden sensiblemente a las del ácido palmítico confirmando, pues, su presencia. La fracción líquida presenta un índice de iodo excesivamente bajo, que no permite adscribirlo a ningún ácido no saturado existente en las sustancias grasas naturales. Más bien habrá que pensar en una impurificación que determina el descenso en el índice de iodo.

2.^a *Fracción*.—Constituida por lo que destila entre 198° y 207°C a 15 mm. de mercurio: Representa unos 14 grs. de un líquido de color amarillento que suministra los siguientes valores:

Índice de refracción a 21,5°	1,4528
Número de neutralización.....	192,8
Índice de iodo.....	87,16
Peso molecular medio	291

Esta fracción debería estar constituida, lógicamente, por productos que contuviesen derivados del ácido palmítico, ya que los puntos de ebullición de los esteres metílicos de los ácidos esteárico, oleico y lino-leico, oscilan entre 211° y 215°C. a 15 mm. No obstante, algo ha destilado, y las constantes indican la presencia de compuestos no saturados, de una parte, más otra sólida que se deposita al enfriar el destilado a unos 20°. En consecuencia, procedemos a fraccionar esta porción recogiendo dos subfracciones que, por separado, se saponifican después, determinando en cada una los componentes sólidos y líquidos por el ya mencionado método de Twitchell.

1.° *Subfracción*.—Se recoge lo que destila entre 198° y 201° a 11 mm. de presión. Al cabo de cuatro días deposita una parte sólida. Índice de iodo, 85,10, que corresponde al valor teórico, de 85,8 del ester metil-oleico.

Separada en sus componentes sólidos y líquidos, se encuentran para los ácidos sólidos las siguientes características:

Punto de fusión.....	61°
Número de neutralización.	216,9
Peso molecular medio.....	258,6

Estas constantes corresponden al ácido palmítico, al que la bibliografía asigna las siguientes constantes:

Punto de fusión.....	62°
Número de neutralización.	218,9
Peso molecular medio.....	256,8

2.° *Subfracción*.—Comprende lo que destiló entre 201° y 206° a 13,5 mm. Líquido de color amarillo claro, en el seno del cual se deposita un abundante precipitado blanco. Separada esta fracción en los componentes sólidos y líquidos, previa saponificación, se obtuvo:

ACIDOS SÓLIDOS

Punto de fusión.....	62,8
Número de neutralización.....	214,8
Peso molecular medio.....	261,2

Sensiblemente, estas constantes corresponden a un ácido análogo al de la subfracción anterior, algo impurificado.

ACIDOS LÍQUIDOS

Índice de iodo 74,45

Si se piensa en que quizá no sea completa la separación total de los ácidos sólidos, es probable que éstos, al mezclarse con el oleico, determinen un descenso del índice correspondiente al oleico.

3.º *Fracción*.—Comprende lo que destila entre 207º y 230º a 15 mm. de presión. Es una sustancia líquida, fluída, que a 19º solidifica casi por completo. A partir de 224º se desprenden productos gaseosos que pican fuertemente en los ojos y no se condensan, razón por la que no se rebasa la temperatura de 230º.

Analizada, presenta las siguientes constantes:

Índice de saponificación.. 190,9
Índice de iodo..... 96,06

Tales valores indican la presencia de ésteres de ácidos no saturados al considerar los correspondientes teóricos del ester metil-oleico y linoleato de metilo, que son, respectivamente, 85,8 y 173,2.

El índice de saponificación de esta fracción bruta no permite concluir consecuencias precisas, ya que los valores de los esterres metílicos de los ácidos esteárico, oleico y linoleico, destilables a esta temperatura, oscilan entre:

Ester metil-esteárico..... 181,36
Ester metil-oleico..... 189,34
Ester metil-linoleico 190,65

y el valor encontrado no es diferencial para ninguno de ellos. Se impone, por lo tanto, una nueva rectificación que, realizada, suministra las dos siguientes subfracciones:

1.º *Subfracción*.—Se recoge lo que destila entre 206º y 216º a 14,5 mm. Constituye una sustancia fundamentalmente sólida, acompañada de una pequeña parte líquida. Separada, previa saponificación, en los componentes sólidos y líquidos, se obtiene:

ACIDOS SÓLIDOS

Punto de fusión..... 68º
Número de neutralización..... 197,1
Peso molecular medio... 284,6

ACIDOS LÍQUIDOS

Índice de iodo 84,12

Los componentes sólidos corresponden en sus constantes a los valores del ácido esteárico, cuyo número de neutralización y peso molecular medio son 197,3 y 284,3, respectivamente.

La parte líquida no corresponde, por su índice de iodo, a ninguna fracción que pudiera adscribirse a los ácidos oleico, linoleico o linoléico.

2.º *Subfracción*.—Se recoge lo que destila entre 216º y el tope de temperatura a 14,5 mm. de presión. Saponificada y desdoblada por el método de Twitchell, se obtienen los siguientes resultados:

ACIDOS SÓLIDOS

Punto de fusión 68º
 Número de neutralización 196
 Peso molecular medio 286,2

ACIDOS LÍQUIDOS

Índice de iodo 108

La fracción sólida corresponde en sus constantes, sensiblemente, a las del ácido esteárico. La parte líquida, a una mezcla, indesdoblable por la vecindad en los puntos de ebullición, de ácidos oleico y linoleico; de aquí que el índice de iodo se mueva entre los dos extremos de 90 y 181, de los ácidos oleico y linoleico, respectivamente.

Lo transcrito permite una visión de conjunto en lo que a la composición ácido-grasa se refiere, pero no es lo completa que debiera para deducir conclusiones definitivas. Para alcanzar éstas es preciso profundizar más, y a este fin, realizamos el desdoblamiento por la técnica que describiremos a continuación, junto con los resultados experimentales.

Separación de los componentes saturados y no saturados, por el método de bromación de Grün y Janko.—Los autores mencionados (36) han elaborado un método en el que la fracción no saturada se separa por destilación de los ésteres metílicos de los ácidos no saturados bromados, pues el punto de ebullición de éstos es, en igualdad de las demás condiciones, mucho más alto que el del correspondiente ácido saturado. El éster metil-bromo-esteárico hierve a 192º a 2 mm. de presión, y el éster metil-esteárico a 172º a la misma presión. Teóricamente no se puede hacer al método preconizado ninguna objeción; pero en la práctica los resultados conseguidos por nosotros, siguiendo exactamente las prescripciones de los autores mencionados, no permiten deducir una conclusión halagüeña en el sentido de obtener una separación absoluta de la parte saturada y de la que no lo es.

El método, para su realización, se divide en cuatro operaciones fundamentales: 1.ª Preparación de los ésteres metílicos. 2.ª Bromación. 3.ª Destilación, y 4.ª Desbromación de los ésteres metílicos.

Primer experimento.—Partimos de 16 gramos de ésteres metílicos preparados según Haller. Estos se broman con 3,7 c. c. de bromo puro, obteniendo un peso de derivado bromado de 17,64 grs. Fraccionado éste en vacío, se obtuvieron las siguientes porciones:

DESTILACIÓN

Presión	Temperatura	Producto destilado
705 mm.	112° — 113°	Destila poco, solidificando en parte con color pardo.
11 »	140° —	Muy poco, sólido, color pardo.
7 »	178° —	Idem, id.
7 »	190° — 195°	Idem, id.

Todas las fracciones recogidas presentan un intenso color pardo oscuro y olor a bromo, quedando en el matraz un residuo casi negro y pastoso. Parece como si hubiera habido una separación de halógeno con descomposición del producto, lo que imposibilita un trabajo posterior.

Segundo experimento.—Partimos de 20 gramos de ésteres metílicos que se halogenan con 4,63 c. c. de bromo. Obtenemos 19,71 grs. de ésteres bromados totales, perfectamente transparentes y de color caramelo, que destilamos en vacío.

DESTILACIÓN

Presión	Temperatura	Producto destilado
2 mm.	148° — 149,5°	Muy pequeña cantidad, sólida, incolora. Se observa * descenso termométrico.
2 »	174° — 177°	Producto sólido e incoloro.
2 »	178° —	Producto sólido mezclado a algo de líquido. Coloreado.

Rendimiento.—19,71 grs. de derivado bromado proporcionan un peso de destilado total de 2,75 grs., o sea un 14 por 100 del rendimiento. Quedan en el matraz de destilación 16,38 grs. de residuo, lo que supone una pérdida de 0,58 grs. La temperatura no ha rebasado los 178°, porque al llegar a este punto, se inicia la descomposición del contenido del matraz, desprendiéndose humos coloreados y pasando al colector una o dos gotas de líquido teñido, correspondiente a la tercera fracción, lo que indica se debe suspender la destilación.

A fin de comprobar si el destilado incoloro está constituido solamente por esteres de los ácidos saturados sólidos, le saponificamos, descomponiendo después con exceso de ácido mineral y recogiendo en éter. Destilado éste, obtenemos 2,36 grs. de ácidos grasos sólidos, en los que procedemos a determinar el índice de iodo.

1.º—0,7018 grs. acs. grasos sólidos: Índice de iodo = 38,42
 2.º—0,4748 » » » » » » » = 38,91

Como consecuencia del estudio de estos datos, debemos concluir que la fracción considerada como saturada, no lo es en la realidad, puesto que la fijación de halógeno demuestra, de manera indudable, el paso de componentes no saturados, cuya separación por este camino no es lo precisa y segura que cabía esperar, confirmando así el criterio sustentado, entre otros, por Kaufmann (50), quien asegura que el método es laborioso y poco exacto para poderle considerar como de aplicación general.

CONCLUSIONES

- I) Se ha verificado una revisión general de las constantes físico-químicas conocidas del aceite de semillas de naranja, corrigiéndolas en algunos casos y ampliándolas en otros, con las nuevas adquisiciones científicas en la química de las sustancias grasas.
- II) Se han fijado por primera vez las constantes o índices analíticos correspondientes a las fracciones de los ácidos grasos sólidos y ácidos grasos líquidos de este aceite.
- III) Se ha determinado la composición cuantitativa, más aproximada a la realidad, de los ácidos grasos sólidos, y se ha fijado, al mismo tiempo, el porcentaje existente de éstos en el aceite de semillas de naranja.

- IV) Se ha determinado por primera vez la proporción centesimal de los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico presentes en esta grasa.
- V) Se han obtenido distintos isómeros de los ácidos dioxiesteáricos partiendo del mismo ácido oleico natural, demostrando con ello la posibilidad de la emigración o salto del doble enlace cuando el ácido oleico se oxida en medio alcalino con permanganato potásico.
- VI) Se ha comprobado la dificultad de separar los componentes ácidos, saturados y no saturados, del aceite de semillas de naranja por el método de Grün y Janko.
- VII) Se ha confirmado la exactitud del método de S. H. Bertram para la separación y evaluación de los ácidos grasos sólidos.

*Universidad Central.—Facultad de Farmacia.
Laboratorio de Análisis de Medicamentos Orgánicos.
Sección de Química del Instituto Nacional de Sanidad.*

Madrid, 29 de Mayo de 1942.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Diedrichs: *Z. U. L.*, 1914.
 - (2) Diedrichs: *Z. U. L.*, 1914.
 - (3) Livache: *Compt. Rend.*, **96**, 260, 1883, y **102**, 1.167, 1886.
 - (4) Grün: *Analyse der Fette Wachse*, t. I, 186, 1925.
 - (5) A. Verley y F. Bölsing: *Berichte*, **34**, 3.354-59, 1901, y I. L. Peterson y E. S. West.: *J. biol. Chemistry*, **74**, 379, 1927.
 - (6) Schich y Halpern: *Chemiker Zeitung*, **31**, 297, 1907.
 - (7) E. Twitchell: *Deutsch Einheitsmethoden*, Witzöff, **54**, 1930.
 - (8) S. H. Bertran: *Dissertation Delft*. Rotterdam, 1928.
 - (9) *Abderhalden*, 439.
 - (10) E. Twitchell: *Z. U. L.*, **32**, 463, 1916.
 - (11) W. Heintz: *Liebigs Annalen*, **92**, 295.
 - (12) *Villavecchia*, t. I, 522, 1935.
 - (13) *Villavecchia*, t. I, 522, 1935.
 - (14) O. Hohner y C. A. Mitchell: *Analyst*, **21**, 316, 1896, referido en *Z. Annal. Chem.*, **39**, 176-179, 1900, y *Abderhalden*.
 - (15) *Abderhalden*, 441.
 - (16) W. Heintz: *Liebigs Annalen*, **92**, 295.
 - (17) H. Kriess y E. Roth: *Z. U. L.*, **25**, 81, 1913.
 - (18) Vongerichten: *Berichte*, **42**, 1.638-1.639, 1909.
 - (19) Ponzio: *Gazetta Chimica Italiana*, **35**, II, 571, 1905.
 - (20) Le Suer: *Journal of Chemical Society*, **85**, 1.713, 1904.
 - (21) Saytzev: *J. Pract. Chem.*, **33**, 300, 1866.
 - (22) Emdem: *Jour. Chem. Soc.*, **73**, 630.
 - (23) Le Suer: *Jour. Chem. Soc.*, **79**, 1.315.
 - (24) Meyer y Ecker: *Monatshefte für Chemie*, **31**, 1.234, 1910.
 - (25) Fahrion: *Chem. Umschau*, **28**, 6, 1921.
 - (26) H. Matthesa y L. Rath: *Chem. Umschau Fette*, **22**, 15, 1915.
 - (27) Bauer y Hardegg: *Chem. Umschau*, **29**, 301, 1922.
 - (28) K. Täufel, M. de Mingo y H. Thaler: *Fette Umschau*, **42**, 142, 1935.
 - (29) Hildicht: *Jour. Soc. Chem.*, t. II, 3.106, 1927.
 - (30) Armstrong: *Jour. Soc. Chem. Ind.*, **44**, 431, 1925.
 - (31) Haworth: *Jour. of Chem. Soc.*, 1.454, 1929.
 - (32) Bauer y Krallis: *Chemische Umschau*, **38**, 201, 1931.
 - (33) I. Iwone y B. Suzuki: *Chem. Zentralblatt*, t. II, 2.594, 1931.
 - (34) Hawickenbrauch y Kaufmann: *Fette und Seifen*, **48**, 665, 1941.
 - (35) P. Kaufmann y W. O. Schubert: *Fette und Seifen*, **48**, 657, 1941.
 - (36) Grün y Janko: *Z. D. Öl. und fett. Ind.*, **41**, 553, 1921.
 - (37) Kaufmann: *Fette und Seifen*, **48**, 659, 1941.
-

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Diedrichs: *Z. U. L.*, 1914.
- (2) Diedrichs: *Z. U. L.*, 1914.
- (3) Livache: *Compt. Rend.*, **96**, 260, 1883, y **102**, 1.167, 1886.
- (4) Grün: *Analyse der Fette Wachse*, t. I, 186, 1925.
- (5) A. Verley y F. Bölsing: *Berichte*, **34**, 3.354-59, 1901, y I. L. Peterson y E. S. West.: *J. biol. Chemistry*, **74**, 379, 1927.
- (6) Schich y Halpern: *Chemiker Zeitung*, **31**, 297, 1907.
- (7) E. Twitchell: *Deutsch Einheitsmethoden*, Witzöff, **54**, 1930.
- (8) S. H. Bertran: *Dissertation Delft*. Rotterdam, 1928.
- (9) *Abderhalden*, 439.
- (10) E. Twitchell: *Z. U. L.*, **32**, 463, 1916.
- (11) W. Heintz: *Liebigs Annalen*, **92**, 295.
- (12) *Villavecchia*, t. I, 522, 1935.
- (13) *Villavecchia*, t. I, 522, 1935.
- (14) O. Hohner y C. A. Mitchell: *Analyst*, **21**, 316, 1896, referido en *Z. Annal. Chem.*, **39**, 176-179, 1900, y *Abderhalden*.
- (15) *Abderhalden*, 441.
- (16) W. Heintz: *Liebigs Annalen*, **92**, 295.
- (17) H. Kriess y E. Roth: *Z. U. L.*, **25**, 81, 1913.
- (18) Vongerichten: *Berichte*, **42**, 1.638-1.639, 1909.
- (19) Ponzio: *Gazetta Chimica Italiana*, **35**, II, 571, 1905.
- (20) Le Suer: *Journal of Chemical Society*, **85**, 1.713, 1904.
- (21) Saytzev: *J. Pract. Chem.*, **33**, 300, 1866.
- (22) Emdem: *Jour. Chem. Soc.*, **73**, 630.
- (23) Le Suer: *Jour. Chem. Soc.*, **79**, 1.315.
- (24) Meyer y Ecker: *Monatshefte fur Chemie*, **31**, 1.234, 1910.
- (25) Fahrion: *Chem. Umschau*, **28**, 6, 1921.
- (26) H. Matthesa y L. Rath: *Chem. Umschau Fette*, **22**, 15, 1915.
- (27) Bauer y Hardegg: *Chem. Umschau*, **29**, 301, 1922.
- (28) K. Täufel, M. de Mingo y H. Thaler: *Fette Umschau*, **42**, 142, 1935.
- (29) Hildicht: *Jour. Soc. Chem.*, t. II, 3.106, 1927.
- (30) Armstrong: *Jour. Soc. Chem. Ind.*, **44**, 431, 1925.
- (31) Haworth: *Jour. of Chem. Soc.*, 1.454, 1929.
- (32) Bauer y Krallis: *Chemische Umschau*, **38**, 201, 1931.
- (33) I. Iwone y B. Suzuki: *Chem. Zentralblatt*, t. II, 2.594, 1931.
- (34) Hawickenbrauch y Kaufmann: *Fette und Seifen*, **48**, 665, 1941.
- (35) P. Kaufmann y W. O. Schubert: *Fette und Seifen*, **48**, 657, 1941.
- (36) Grün y Janko: *Z. D. Öl. und fett. Ind.*, **41**, 553, 1921.
- (37) Kaufmann: *Fette und Seifen*, **48**, 659, 1941.