

## La reacción de Bial y el contenido en pentosanas de la paja vizcachera *Stipa gynerioides Phil.*

POR EL DOCTOR

ERNESTO G. DANKERT \* e ING. AG. WILFREDO R. RENNER \*\*

Manfred Bial (1), basándose en ensayos previos efectuados por Salkowsky y Blumenthal, realizó un estudio tendiente, ante todo, a hacer más preciso el diagnóstico de la pentosuria, con el fin de que los pacientes en cuya orina se manifestaba la presencia de pentosas, no fueran considerados como diabéticos (es decir, que el diagnóstico estableciera claramente que no se trataba de *diabetes mellitus*)<sup>2</sup>. Para ello reemplazó el anterior tratamiento de la orina con ácido clorhídrico concentrado a ebullición en presencia de orcina (con lo que se originaba una materia colorante verde que se podía extraer con alcohol amílico y daba una banda de absorción característica) por otro ensayo más sencillo, basado en una simple adición de un reactivo (formado por 1 a 1,5 gramos de orcina, 500 gramos de ácido clorhídrico concentrado y 25 a 30 gotas de solución de cloruro férrico al 10 %). En dichas condiciones, una orina normal o diabética no reacciona, pero sí lo hace si se ha adicionado previamente pentosas, aún en muy pequeñas proporciones, mientras que, trabajando según la técnica primitiva, el resultado era negativo.

También permite el método de Bial reconocer el ácido glucurónico, para lo cual sólo se requiere hervir de 2 a 3 minutos, mientras que anteriormente se exigía una prolongada ebullición.

\* Profesor titular de Química Orgánica y Biológica.

\*\* Auxiliar de trabajos prácticos de Química Orgánica y Biológica.

<sup>1</sup> Los números entre paréntesis se refieren a la bibliografía citada al final de este trabajo.

<sup>2</sup> Creemos innecesario referirnos con más detalles a la importancia que ofrece tal diagnóstico, no sólo a los fines del tratamiento a seguir y al régimen necesario a adoptar por los pacientes, sino también por el especial significado que ofrece para contratar seguros de vida.

La gran sensibilidad de la reacción de Bial y las diversas aplicaciones que se le fueron hallando, indujeron a diversos investigadores a estudiarla más a fondo y a perfeccionarla. Cabe mencionar especialmente en este sentido los trabajos de Wanda Mejbaum (5), Willard L., McRary y Marion C. Slatery (4) y Walter E. Militzer (6), sobre todo, también desde el punto de vista de la determinación cuantitativa del contenido en pentosas de diversas sustancias, objetivo al que ya habían prestado atención Embden y Schwartz (3) y Dische y Schwartz (2), llegando estos últimos a poder determinar la presencia aún de miligramos de arabinosa, xilosa y ácido adenílico.

Ciertas apreciaciones en que los citados autores no llegan a coincidir totalmente nos indujeron a estudiar algunos detalles de la citada reacción, aplicándola en especial a la determinación del contenido en pentosas de una planta nuestra. Se trata de la «paja vizcachera» (*Stipa gynerioides Phil.*), siendo originario el material estudiado de la zona cordillerana de la provincia de Mendoza. Es una planta proveniente de regiones áridas, perteneciente a las gramíneas de la tribu Agrostidea. Se encuentra desde el Perú hasta las llanuras secas de Córdoba, San Luis, Oeste de Buenos Aires, Pampa Central y Mendoza hasta Río Negro<sup>3</sup>.

#### PREPARACIÓN DEL MATERIAL:

La parte aérea de la planta fué dividida en tres porciones aproximadamente iguales, que denominaremos: punta, centro y base. Se molió cada sección por separado en un molinillo simple y se extendieron luego los productos separadamente en cristalizadores anchos durante cuarenta y ocho horas. Una vez homogeneizadas a fondo las tres porciones, fueron envasadas en recipientes de vidrio tapados con tapones de corcho recubiertos con papel de estaño, con el fin de mantener invariable su proporción de humedad, en la medida de lo posible.

#### DETERMINACIONES:

a) *Humedad.* Para cada ensayo aislado de todos los que se citan en este trabajo se determinaba la humedad que presentaba la muestra en ese momento, calentando a 100-105° hasta constancia de peso. Los promedios de todas las determinaciones efectuadas fueron los siguientes:

<sup>3</sup> Las muestras respectivas nos fueron facilitadas por el Profesor Ing. Agr. Emilio F. Paulsen, a quien agradecemos en este lugar.

MUESTRAS	HUMEDAD
Puntas .....	13,04 %
Centro .....	12,85 %
Base .....	12,87 %
Promedio de la planta entera	12,92 %

b) *Pentosanas*. Efectuáronse, ante todo, determinaciones para evaluar las pentosas según la forma tradicional, siguiendo el método de Tollens y Kroeber (8), recomendado por la Association of Official Agricultural Chemists. Es un método gravimétrico basado en precipitar mediante la floroglucina al furfural producido al atacar la pentosa con CIH al 12 %. En la primera serie de ensayos se seguía tal cual la marcha de la A. O. A. C., mientras que en la segunda, se extraía previamente el material con alcohol etílico al 80 % en un extractor Soxhlet durante 6 horas, antes de someterlo al método indicado.

Los promedios de los resultados obtenidos en varias determinaciones son los que a continuación se detallan (calculados sobre substancia seca):

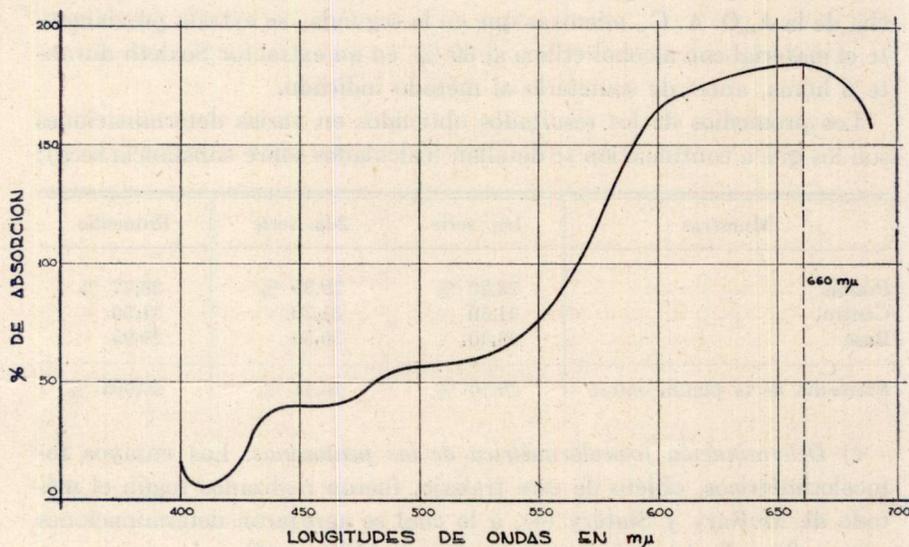
Muestras	Ira. serie	2da. serie	Promedio
Puntas .....	28,20 %	29,35 %	28,77 %
Centro .....	31,50 »	31,50 »	31,50 »
Base .....	29,40 »	30,50 »	29,95 »
Promedio de la planta entera	29,70 %	30,11 %	29,905 %

c) *Determinación fotolorimétrica de las pentosas*. Los ensayos fotolorimétricos, objeto de este trabajo, fueron realizados según el método de McRary y Slatery (4), a lo cual se agregaron determinaciones en que figuraba la variante propuesta por Militzer (6).

El método McRary y Slatery se basa en la utilización de la reacción de Bial, que da con las pentosas una coloración verde. El reactivo utilizado en los ensayos fué preparado de la siguiente manera: 2 gramos de orcina eran disueltos en 50 cm<sup>3</sup> de la solución de Cl<sub>3</sub> Fe (hexahidratado) al 1,5 % (P/V). A esta solución se agregaba suficiente CIH al 30 % (CIH concentrado p. e. 1,19 diluído con un quinto de su volumen de agua destilada), hasta completar un litro. La orcina da en rigor con las pentosas en medio ácido una coloración azul, pero ésta, en presencia de Cl<sub>3</sub> Fe (amarillo) se torna verde por superposición de ambos colores. En la variante introducida por Militzer, el alcohol butílico normal actúa eliminando el color amarillo del Cl<sub>3</sub> Fe, dejando actuar sólo el color azul de la reacción con orcina.

Los resultados obtenidos mediante el método descrito por McRary y Slatery son satisfactorios, habiéndose seguido la marcha analítica siguiente: Un gramo de muestra aproximadamente seca y molida es extraída continuamente con alcohol etílico al 80 % (V/V) durante 6 horas y los residuos son secados en la estufa durante corto tiempo a una temperatura de 70° a 80°. El material seco es llevado cuantitativamente a un matraz aforado de 200 cm<sup>3</sup>, agregándole unos 25 cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub> H<sub>2</sub> 2N, calentando después al bañomaría durante 10 a 15 minutos para humedecer los tejidos. Se agrega entonces una cantidad adicional de 75 cm<sup>3</sup>

### CURVAS DE ABSORCION



del mismo ácido para facilitar el proceso de hidrólisis a 100° C., durante todo el calentamiento 3 horas más.

Terminada la hidrólisis, los contenidos de los matraces son llevados a volumen y de allí se filtra una cierta porción. De este filtrado se toma una parte alícuota y se diluye de tal manera que contenga no más de 3 miligramos de pentosas en cada 100 cm<sup>3</sup>.

Por otra parte se procede a preparar la solución de pentosa standard <sup>4</sup>

<sup>4</sup> En este caso, d-xilosa especialmente purificada, de  $\left[ \alpha \right]_{D}^{20} = +19,4^{\circ}$  cedida amablemente por el Dr. Jorge Deferrari, de la Cátedra de Química Orgánica del Dr. Venancio Deulofeu (Facultad de Ciencias Físicas y Naturales), a quienes agradecemos en este sitio.

de una concentración de exactamente 2 miligramos en 100 cm<sup>3</sup>. Una vez preparado todo, se toman respectivamente: a) 3 cm<sup>3</sup> de solución problema; b) 5 cm<sup>3</sup> de la solución de pentosa standard (xilosa) y c) 5 cm<sup>3</sup> de agua destilada; a cada uno de estos volúmenes se agrega 15 cm<sup>3</sup> del reactivo con orcina, agitándolos y colocándolos luego en tubos de ensayo, dejando que reaccionen sus contenidos durante 20 minutos al bañomaría hirviente. Una vez transcurrido este tiempo, los tubos son enfriados mediante un chorro de agua exterior y llevados al fotocolorímetro para su dosificación.

El filtro utilizado en la medición fotocolorimétrica de pentosas es el que corresponde a la longitud de onda 660 m $\mu$ . Hemos construído la curva de absorción según la figura que sigue, de acuerdo con el compuesto coloreado formado por la acción de la xilosa con la orcina en presencia de ClH y Cl<sub>3</sub>Fe.

El aparato fotocolorimétrico empleado fué el de Klett-Summerson (7), el que acusa las siguientes características: Es un fotocolorímetro discontinuo, objetivo, cuyo sistema fotoeléctrico está constituído por dos células fotoeléctricas unidas en un circuito potenciométrico. La compensación que tiene lugar mediante las dos células fotoeléctricas anula las variaciones que puede experimentar la tensión de la red general, pudiéndose hacer así la conexión directa a ésta, evitándose el uso de pilas o acumuladores. El único interrogante es la posibilidad de que las dos células no respondan igualmente a los estímulos luminosos<sup>5</sup>.

Los promedios de los resultados obtenidos en la investigación, siguiendo la técnica de McRary y Slatery, fueron:

Muestra	1r. ensayo	2.º ensayo	3r. ensayo	4.º ensayo	Promedio
Puntas).....	26,27 %	26,66 %	28,39 %	28,30 %	27,40 %
Centro.....	28,48 »	28,69 »	28,70 »	29,12 »	28,74 »
Final.....	28,20 »	28,61 »	28,52 »	28,63 »	28,18 »
Promedio planta entera ..	27,65 %	27,98 %	28,52 %	28,63 %	28,18 %

Para la forma de proceder propuesta por Militzer, quien introdujo la variante del alcohol butílico normal, se tomaron 4 cm<sup>3</sup> de la solución que reaccionó con el reactivo de orcina (5 cm<sup>3</sup> de la solución problema y 15 cm<sup>3</sup> de reactivo), llevándose a enrase con alcohol butílico normal hasta completar 10 cm<sup>3</sup> en los tubos de ensayo. Previa agitación y ho-

<sup>5</sup> El aparato de Klett-Summerson nos fué facilitado por el Sr. Ing. Agr. Elvino Sartori, a quien agradecemos en este lugar.

mogeneización, se lleva el aparato fotocolorimétrico para su medición. Los resultados obtenidos en el ensayo fueron los siguientes (calculados sobre substancia seca):

CON ALCOHOL n-BUTILICO

Muestra	1er. ensayo	2do. ensayo	Promedio
Puntas .....	26,83 %	28,53 %	27,68 %
Centro .....	29,12 »	29,40 »	29,26 »
Final .....	27,09 »	29,04 »	28,06 »
Promedio planta entera .....	27,68 %	28,99 %	28,33 %

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se observa que, en general, el tercio medio de la planta es el que contiene el mayor porcentaje de pentosanas (cualquiera sea el método ensayado, tanto el habitual por precipitación de Tollens y Kroeber, como el indicado por McRary y Slatery; y también en el que aplica la variante de Militzer). En cambio, el extremo superior (la punta) es la parte que menor contenido presenta (en todos los métodos aplicados).

De una manera general, los métodos fotocolorimétricos dan un resultado más bajo que el método tradicional oficializado de la A. O. A. C., no habiéndose encontrado ninguna ventaja decidida en la utilización del alcohol butílico normal preconizada por Militzer, con respecto al método de McRary y Slatery.

Haciendo un estudio comparativo entre el método oficial de Tollens y Kroeber y el de McRary y Slatery, aún comprendiendo que para una conclusión definitiva se requeriría un número mayor de ensayos, se deduce como suficientemente establecido que el método fotocolorimétrico de estos últimos autores aparece como más cómodo y mucho más rápido que el método oficial, pero solamente para trabajos en serie, donde se requiere datos comparativos, ante todo.

En cuanto al hecho de que los resultados fotocolorimétricos resulten en general visiblemente inferiores a los del método oficial de Tollens y Kroeber, es de interés hacer constar una opinión divulgada entre ciertos analistas de que el método oficial proporciona datos algo elevados, casi siempre. Pero ello constituiría un problema aparte, que pensamos abordar en forma más amplia en otro trabajo.

THE BIAL REACTION AND THE CONTENTS OF PENTOSANES  
IN STIPA GYNERIOIDES PHIL

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

In general it is observed, that it is the middle third of the plant that contains the main percent of pentosane, whichever method is the employed, the habitual by precipitation of Tollens and Kroeber as well as the one indicated by McRary and Slatery; and also in that which applies the variance of Miltzer. On the other hand, the utmost point is the part which presents the smallest content (in all the methods used).

In a general way the photolorimetric methods have given a lower result as the traditional method officialized by the A. O. A. C., not having found any determining advantage in the utilization of normal butylic alcohol preconized by Miltzer with respect to the method of McRary and Slatery.

Making a comparative study between the official method of Tollens and Kroeber, and that of McRary and Slatery, notwithstanding having in mind that for a definite conclusion a greater number of investigations would be required, it is deduced as sufficiently established that the photolorimetric method of these latter authors appears to be more convenient and much swifter as the official method is, but only for works in series, where comparative data are required above all.

As regards the fact that the photolorimetric results give in general a recognizable inferior result as that of the official method by Tollens and Kroeber, it is of interest to remember a popularized opinion between certain analysts that the official method supplies almost always somewhat elevated data. But this would constitute a separate problem which we think to occupy us more extensively in another work.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. BIAL, MANFRED, *Die Diagnose der Pentosurie*. Deutsche medizinische Wochenschrift, 28, 1904, pág. 253.
2. DISCHE y SCHWARTZ, *Mikroch. Acta (Oesterreich)*, 11, 1938, pág. 13.
3. EMBDEN y SCHWARTZ, *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 201, 1931, pág. 149.
4. MCRARY, WILLARD, L. y SLATERY, MARION, C., *Determinación colorimétrica de pentosas y pentosanas*. Archives of Biochemistry, 6, 1945, pág. 151.
5. MEJBAUM, WANDA, *Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen*. Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie, 258, 1939, pág. 117.
6. MILITZER, WALTER, E., *Informe sobre el reactivo orcinol*. Archives of Biochemistry, 9, 1946, pág. 85.
7. SUMMERSON, WILLIAM, *A simplified test tube photoelectric colorimeter and the use of the photoelectric colorimeter in colorimetric analysis*. The Journal of Biological Chemistry 130 (1935), pág. 149. Puede consultarse con provecho el resumen que sobre la descripción de este aparato figura en MARENZI, CARDINI, BANFI y VILLALONGA, *Bioquímica Analítica Cuantitativa*.
8. TOLLENS y KROEBER, Association of Official Agricultural Chemists, 6a. Edición, pág. 412.