Investigaciones sobre las semillas de Caloncoba Mannii (Oliv.) Gilg, de la Guinea Española

por el

Prof. César González Gómez y Albano Pereira J. or. (1)

Las semillas de esta especie nos fueron amablemente enviadas por el Ingeniero Agrónomo D. J. Nosti, Director de Agricultura de los Territorios Españoles del Golfo de Guinea, a quien sinceramente agradecemos tan singular deferencia.

Como no tenemos conocimiento de que se hayan realizado trabajos analíticos sobre las semillas de Caloncoba Mannii, emprendemos las investigaciones que vamos a exponer sucintamente en esta comunicación, con el fin de intentar enriquecer el grupo de los medicamentos anti-leprosos con la grasa de una especie más de Caloncoba, de la cual, en su día, la clínica dirá la última palabra.

Nuestra labor ha consistido en la investigación de las características morfológicas e histológicas de la semilla, su composición química global, estudio de los lípidos y ácidos grasos (caracteres, constantes físicas e índices químicos), y además en el reconocimiento del glucósido cianogenético encontrado en otras Flacourtiaceas, pero no citado, que sepamos, en la especie que nos ocupa.

La Caloncoba Mannii Gilg aparece descrita en 1908 (6). En 1921, el «Pflanzenwelt Afrikas» (7), menciona la Caloncoba Mannii (Oliv.) Gilg, propia de la pluvisilva del Camerum meridional. Posteriormente, Hutchinson (10), en 1927, considera sinónimas la Caloncoba Mannii Gilg y la Oncoba Mannii Oliv., dando como localidades la Nigeria meridional: Río Calabar, Oban, Eket, Bahía de Ambas, Victoria, Fernando Póo y el Camerum francés.

A pesar de lo consignado, la especie por nosotros estudiada la incluye Gilg (8), por último, en el género Camptostylus (Camptostylus Mannii) (Oliv.) Gilg=? Caloncoba Mannii Gilg.

⁽¹⁾ Bolseiro do Instituto para a Alta Cultura (Portugal).

Peso de las semillas y proporción de testa y albumen

1.000 semillas pesaron 48,39 gr., y el peso de 0,1 litro fué 44,66 gr. Presentaron 74,62 por 100 de albumen y 25,38 por 100 de testa.

Estimamos de interés este dato por haber observado que, con relación a las otras semillas del mismo género estudiadas por otros autores, la proporción de albumen es superior en ésta.

Morfología de la semilla

Las semillas son hemi-esféricas, ligeramente aovadas, con el hilo ancho en la cara aplanada y algo puntiaguda en uno de los extremos de ésta, 5 a 8 mm. de longitud, 4 a 6 mm. de anchura y 3 a 5 mm. de espesor; lisas por la cara convexa de color gris pardo oscuro y deslustradas, y algo más claras en la aplanada correspondiente al hilo; testa dura, quebradiza; almendra de colores gris exteriormente y blanco amarillenta en el interior, constituída por el embrión cuyos cotiledones discoideos y delgados tienen el nervio medio y los secundarios, a su vez ramificados, muy manifiestos y de tinte verdoso, y la radícula cilíndrica, alojada en un surco bien marcado en el espeso albumen que le envuelve.

HISTOLOGÍA DE LA SEMILLA

Epidermis formada por células poligonales de tinte amarillento, de paredes relativamente delgadas y algunas de ellas con contenido pardo. Debajo de ella existe una delgada capa de células parenquimáticas con drusas de oxalato cálcico, a las que siguen células pétreas más o menos ovoideas con gruesa pared y claras puntuaciones, en estrato relativamente delgado, seguido de otras capas de elementos también lignificados, de aspecto fibroso, dispuestas en empalizadas, que están en contacto directo con elementos obliterados pardos que la separan del albumen de la semilla, formado por células poligonales de paredes finas con contenido graso y corpúsculos de aleurona. El grueso albumen envuelve al embrión formado por un parenquima de finas células entre las que discurren los hacecillos o cordones procambiales.

Composición química global de la semilla

- a) Agua.—Determinada por desecación en la estufa, 100-105°, hasta peso constante, resultó una media de 5,11 por 100.
- b) Lipidos.—La cantidad media de lípidos de varias determinaciones, efectuadas agotando con éter el polvo de la semilla previamente desecada durante 15 horas a 65-70°, fué de 41,10 por 100.

- c) Cenizas.—La cantidad media de cenizas, determinadas por calcinación al rojo sombra, teniendo la precaución de oxidar bien las partículas carbonosas (adición de algunas gotas de NO³H) y evitar la volatilización de cloruros, sulfatos y fosfatos alcalinos, resultó ser 3,86 por 100.
- d) Glúcidos totales.—Para su determinación, el polvo de semilla, desengrasado y seco, fué hidrolizado con ácido clorhídrico de densidad d=1,125, en prolongada ebullición, según la técnica de Liebermann-Lintner (21). Los azúcares reductores se dosaron por el método de Bertand (2), (3).

Media de las determinaciones efectuadas, 8,83 por 100 (en relación a semilla total).

e) Celulosa.—La determinación de la celulosa la hemos efectuado siguiendo la técnica de Vladescu (21), (26), que, en sus líneas generales, consiste en tratar el polvo de la droga finamente pulverizado, desengrasado y seco, con ácido nítrico de densidad d=1,13, haciendo burbujear en la mezcla una corriente de vapor de agua durante cinco minutos. El residuo es transferido a un filtro de cenizas conocidas tarado, donde es lavado con agua y alcohol-éter y después seco. Por pesada se obtiene la celulosa bruta. Se incinera residuo y filtro. Se resta del total el peso de las cenizas conocidas del filtro y después del peso de celulosa y cenizas, el de las cenizas, quedando el de la celulosa.

Media de los valores hallados, 16,77 por 100 (en relación a semilla total).

f) Prótidos totales.—Los prótidos totales expresados en albúmina, determinados por el método de Kjeldahl (11), empleando como catalizadores sulfato potásico y bióxido de cerio, y calculados multiplicando el nitrógeno obtenido por el factor 6,25, asciende en la semilla a 24,18 por 100 (en relación a semilla total).

RESUMEN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA GLOBAL DE C. MANNII

Agua	$5,11^{\circ}/_{0}$	Glücidos totales	8,83 %
Lipidos	41,10 %	Celulosa	16,77 %
Cenizas	3,86 0/0	Prótidos totales	24.18%

INVESTIGACIÓN DEL GLUCÓSIDO CIANOGENÉTICO

Antes de exponer los resultados de nuestras investigaciones en este punto, debemos recordar que ya en 1904 Power y Gornall (17), estudiando las semillas frescas—pues en la madurez desaparece—del Taraktogenos Kurzii encontraron 0,036 por 100 de ácido hidro-ciánico, produ-

cido por acción de una enzima hidrolítica de naturaleza proteica, que lograron aislar, así como el glucósido.

Es sabido también que Power y Lees (18) en 1905, de las semillas de Hydnocarpus odorata Ait. (= Gynocardia odorata R. Br.), falsa semilla de chaulmoogra, lograron aislar un glucósido cianogenético que llamaron Ginocardina (C¹³ H¹¹ O³ N) y una enzima denominada Ginocardasa. La Ginocardina, fisiológicamente inactiva, libera, por acción del fermento, al desdoblarse, CNH, glucosa y una di-cetona (C⁶ H³ O⁴). Estas simientes frescas encierran hasta un 1 por 100 de CNH.

Rosenthaler (20) en 1913, comprobó que las simientes de Hydnocarpus Wightiana contienen una enzima sintetizante de nitrilos, sin encontrar, no obstante, glucósido cianogenético alguno. Y posteriormente (1929) Peirier (15), demostró la presencia de un glucósido cianogenético en la semilla de Caloncoba glauca, pero no en la C. Welwitschii y C. echinata.

Las investigaciones del glucósido cianogenético en las semillas de C. Mannii fueron efectuadas siguiendo las indicaciones de la técnica de Guignard, procediendo como sigue:

10 gr. de polvo de semillas desengrasadas fueron introducidos en un Erlenmeyer de 100 c. c. juntamente con 30 c. c. de agua y 20 c. c. de una emulsión en agua de almendras dulces descorticadas (1:4). Mezclado el conjunto, fué rápida y herméticamente cerrado el matraz con un tapón de goma, teniendo colgada una tira de papel picro-sódico de Guinard, humedecido.

Para controlar el ensayo, fueron efectuados dos testigos: En un matraz de 100 c. c. fueron colocados 30 c. c. de agua y 20 c. c. de emulsión en agua de almendras dulces descorticadas (1:4). Igualmente se cerró con un tapón de goma, del que estaba colgada una tira de papel picro-sódico. En otro Erlenmeyer de igual capacidad fué colocada una maceración de hojas frescas de laurel cerezo al 5 por 100 (50 c. c.). Igualmente fué cerrado con tapón portador de una tirita de papel picro-sódico.

Los tres recipientes fueron colocados en la oscuridad, a temperatura de 20 grados.

El primer testigo tenía por objeto comprobar en las almendras la ausencia de amigdalina.

El segundo testigo estaba destinado a controlar la sensibilidad del papel picro-sódico utilizado y que había sido preparado pocas horas antes.

Los resultados logrados después de 15 minutos fueron los siguientes: El matraz que contenía polvo de semillas de Caloncoba Mannii mostraba el papel picro-sódico completamente rojo. El del que contenía la maceración de laurel cerezo, estaba mucho menos rojo, y el del que contenía sólo emulsión de almendras, no se había alterado.

8

Al cabo de 12 horas, el papel picro-sódico del matraz que contenía C. Mannii se mantenía sensiblemente igual. En el que contenía la hoja de laurel cerezo triturada, el papel picro-sódico se mostraba con intensa coloración roja, aunque menos acentuada que en el anterior. En cambio, en el que contenía solamente emulsión de almendras, la prueba continuaba siendo negativa.

Todos estos resultados son demostrativos de que las semillas de C. Mannii contienen un glucósido cianogenético, que denominamos Manniosido.

Comprobado esto, se planteó el problema de demostrar su localización en la semilla, al mismo tiempo que constatar la presencia del fermento encargado de su hidrolisis cuando por trituración se ponen ambas sustancias en contacto.

Para lo primero se practicó el ensayo siguiente: En un matraz de 100 c. c. fueron colocados 2 gr. de albumen desengrasado con 20 c. c. de agua y 10 c. c. de emulsión (1:4) de almendras dulces. En otro matraz de 100 c. c. fueron colocados 2 gr. de polvo de testa de semilla con 20 c. c. de agua y 10 c. c. de emulsión (1:4) de almendras.

Ambos matraces fueron tapados y agitados. Los tapones llevaban suspendidas las correspondientes tiras de papel picro-sódico de Guinard. Fueron colocados a 20 grados en la oscuridad.

Al cabo de 30 minutos, el papel del matraz que contenía el albumen tenía color rojo intenso. El papel del matraz que contenía polvo de testa de la semilla estaba inalterable.

Por estas pruebas queda comprobado que el glucósido está localizado en el albumen.

Para investigar la presencia del fermento, se colocaron en un matraz de 100 c. c. 2 gr. de albumen desengrasado con 30 c. c. de agua, se tapó herméticamente con tapón de goma provisto de una tirita de papel picro-sódico humedecido. Después de 30 minutos, el papel estaba teñido de rojo, siendo muy intensa la coloración al cabo de 12 horas. Esto demuestra que, al lado del glucósido cianogenético, la semilla de C. Mannii lleva su fermento hidrolítico.

ESTUDIO DE LOS LÍPIDOS

Obtención.

Las semillas fueron finamente trituradas en un molino, y el producto obtenido, después de desecado en la estufa a 70º durante 24 horas, fué agotado por el éter en aparatos de Soxhlet. El líquido extraído fué deshidratado con sulfato sódico seco, filtrado y finalmente destilado a baño maría y presión reducida para separarlo del éter.

Caracteres organolépticos.

La grasa, de consistencia mantecosa, es amarillo claro cuando sólida, tomando color ambarino al fundirse; tiene olor suave no desagradable y sabor ligeramente acre.

Constantes físicas.

1. Peso específico.—Fué determinado a 30°, por medio del picnómetro, utilizando mercurio.

Dividiendo el peso del volumen de grasa por el del mercurio y multiplicando el cociente por 13,5333 (peso específico del mercurio a 30°), se ha obtenido el peso específico:

$$D_{80^{\circ}} = 0.9495$$

2. Indice de refracción.—En su determinación se utilizó un refractómetro de Abbe, de prismas calentables, regulando la temperatura mediante corriente de agua con dispositivo apropiado. Las lecturas se hicieron a los 5 minutos de regulada la temperatura, dada la influencia que este dato tiene sobre la constante.

Se han hecho las determinaciones a 25°, 30°, 40° y 50°. Se presentan, además de los índices de refracción tomados a estas temperaturas, también los correspondientes grados refractométricos y la refracción específica, calculada ésta por la fórmula de Lorentz-Lorenz, en función de la densidad y del índice de refracción:

$$R = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \times \frac{1}{d}$$

3. Poder rotatorio.—Se realizó la determinación con un polarímetro de Laurent, utilizando una solución aproximadamente al 10 por 100 de grasa en cloroformo puro, ópticamente inactivo.

Se operó a 20°, con un tubo de un decímetro, y como sistema de iluminación se utilizó una lámpara eléctrica, interponiendo entre ella y el polarímetro una solución acuosa de dicromato potásico al 1 por 100.

Media de los valores hallados: $(\alpha)^{20^{\circ}} = +40.5^{\circ}$.

4. Punto de fusión.—Fué determinado por el método del tubo capilar, con dispositivo de Thiel.

Resultados logrados
$$\dots$$
 Comienzo de fusión a 36°. Término de fusión a 38,5°.

5. Punto de solidificación.—Su fundió previamente la grasa a baño maría y se colocó en un tubo de ensayo de paredes delgadas hasta aproximadamente la mitad. Se adaptó a la boca del tubo un tapón atravesado por un agitador anular y por un termómetro dividido en décimas de grado, cuyo depósito de mercurio se quedaba a la mitad de la columna grasa. Se introdujo el conjunto en un vaso que contenía ácido sulfúrico previamente calentado a 60°. Se dejó enfriar, observando la marcha del termómetro. Se tomó como punto de solidificación aquella temperatura en que la grasa empezaba a enturbiarse y el termómetro se estacionó.

Valor de las determinaciones efectuadas: 25,5°.

6. Solubilidad.—La grasa de C. Mannii es soluble, en todas las proporciones, en éter etílico, éter de petróleo, tetracloruro de carbono y cloroformo; en ácido acético, en caliente, es también muy soluble; en alcohol absoluto es relativamente poco soluble.

Solubilidad en alcohol absoluto.—Fué determinada según el método de Tortelli (24), a la temperatura ambiente de 18°.

Valor encontrado: 7,3 gr./100 c. c.

Solubilidad en ácido acético.—Se determinó la cantidad de ácido acético (al 98 por 100) que la grasa admite a la temperatura de 30°, siguiendo las indicaciones generales de la técnica de Jean, modificada por Otero Aenlle (14).

Cantidad de ácido acético que la grasa admite a 30°: 80 por 100.

7. Temperatura critica en ácido acético.—Hemos seguido las indicaciones generales de la técnica de Crismer (4), (5). Nosotros hemos empleado ácido acético al 98 por 100.

Valor hallado: 35°.

8. Coeficiente térmico.—Para la determinación de esta constante, que expresa el aumento de temperatura que se observa cuando una grasa reacciona con el ácido sulfúrico concentrado, se siguió la técnica de Mitchell (12).

Fué realizado un ensayo en blanco, no observándose ningún aumento de temperatura al mezclar el ácido sulfúrico con el tetracloruro de carbono.

Valor encontrado: 14º.

9. Examen a la luz ultravioleta.—Observada en capa delgada sobre una cápsula de porcelana, la grasa presentó una fluorescencia blanco-azulado-amarillento.

Constantes químicas.

1. Indice de yodo.—Hemos seguido el método de Rosemund y Kuhnhenm (19), (21), que utiliza como agente de halogenación el sulfato de di-bromo-piridina en solución acética, compuesto de adición que es capaz de ceder su bromo para fijarse en los dobles enlaces.

Se practicaron ensayos en blanco.

Media de los valores hallados: 80,7.

2. Indice de saponificación.—Ha sido determinado por el método corrientemente expuesto en los tratados de análisis.

Se realizaron, en las mismas condiciones, ensayos en blanco.

Media de los valores hallados: 207,2.

3. Indice de acidez.—Se determinó por el método corriente.

Indice de acidez: 46,2.

Acidez expresada en ácido oleico: 23,2 por 100.

4. Indice de ester.—Fué calculado por diferencia entre el índice de saponificación y el índice de acidez.

Valor hallado: 161,0.

5. Indice de Hehner.—Expresa el porcentaje de ácidos grasos insolubles en el agua contenidos en 1 gr. de grasa. En realidad, es el porcentaje de ácidos grasos insolubles mas el residuo insaponificable correspondiente.

Se determinó por el método corriente (25).

Media de los valores hallados: 91,6.

6. Indice de Reichert-Meisel.—Como se sabe, indica el número de centímetros cúbicos de lejía alcalina N/10 necesarios para neutralizar los ácidos grasos volátiles y solubles en agua, obtenidos a partir de 5 gr. de grasa, operando en determinadas condiciones y contenidos en 110 c. c. de líquido destilado.

Los ácidos contenidos en este destilado son butírico, caproico y algo de caprílico.

Media de los valores logrados: 4,32.

7. Indice de Polenske.—Como es bien conocido, expresa el número de centímetros cúbicos de lejía N/10 necesarios para neutralizar la acidez correspondiente a los ácidos volátiles insolubles en agua, obtenidos a partir de 5 gr. de grasa y que van contenidos en 110 c. c. de destilado.

Los ácidos valorados de esta manera, son principalmente caprílico y caprínico.

Fué determinado por la técnica de Polenske (25).

Media de los valores logrados: 1,98.

8. Determinación cuantitativa de residuo insaponificable.—Se efectuó según la técnica de Santos Ruiz y J. Hernst (22).

Media de los valores hallados: 2,56 por 100.

ACIDOS GRASOS

Obtención.

Fueron obtenidos a partir de las soluciones jabonosas que quedaron después de la separación del residuo insaponificable. Se reunieron todas ellas en una cápsula y se calentó a baño maría para eliminar el alcohol y éter que contenían. El líquido caliente se trató con ácido sulfúrico 2N hasta reacción francamente ácida, separándose los ácidos grasos en forma de gotas blancas que, por acción del calor, se reúnen en la superficie formando una capa oleosa que rápidamente se solidifica.

Separada así la torta, se coloca en un filtro humedecido y se lava, como en la determinación del índice de Hehner, con agua hirviente hasta reacción neutra de las aguas de lavado; se deja escurrir el agua y se filtra en caliente.

Los ácidos así obtenidos rápidamente se solidifican, presentándose como una masa dura amarillenta con brillo céreo y olor semejante al de la grasa. Después de privarlos de la humedad por reposo en la estufa a 60-70° y en el desecador de cloruro cálcico hasta peso constante, se determinaron sus principales constantes físico-químicas, fundiéndolos siempre previamente, tal como hicimos en la grasa, a fin de que las muestras sean homogéneas.

Constantes físicas.

1. Indice de refracción.—Se procedió análogamente como en la grasa, pero haciendo las lecturas a 50°, 60° y 70°.

Resultados obtenidos:

2. Punto de fusión.—Fué determinado como la grasa.

3. Punto de solidificación.—Se siguió el mismo método que en la grasa.

Resultado obtenido: 45,5°.

- 4. Poder rotatorio.—Determinado análogamente como en la grasa, resultó $(a)^{20^{\circ}} = +46.3^{\circ}$.
- 5. Examen a la luz ultravioleta.—Observados en capa delgada, han presentado fluorescencia amarillo-verdosa.

Constantes químicas.

- 1. Indice de yodo.—Se utilizó la misma técnica que para la grasa. Media de los resultados obtenidos: 88,67.
- 2. Indice de neutralización.—Se determinó de la misma forma que el de saponificación en la grasa.

Media de los resultados hallados: 217,72.

3. Peso molecular medio.—Fué deducido por cálculo a partir del índice de neutralización, según la relación:

$$\frac{\text{I. n.}}{1} = \frac{56.104}{PM} \quad \text{Por consiguiente:} \quad PM = \frac{56.104}{\text{I. n.}}$$

Resultado logrado: 257,68.

4. Indice de acetilo.—Es expresado, como se sabe, por el número de miligramos de KOH necesarios para neutralizar el ácido acético obtenido por saponificación de 1 gr. de sustancia acetilada.

Fué determinado por el método de Lewkowitsch, modificado por Santos Ruiz y Sans Muñoz (23).

En su cálculo se utiliza la fórmula:

$$\frac{V_2 - V_1}{1 - 0,00075 \times V_1}$$

 $V_1 =$ índice de neutralización de los ácidos grasos.

 $V_2 =$ índice de saponificación del producto acetilado.

Media de los valores obtenidos: 12,31.

RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS EFECTUADAS CON LA GRASA Y ÁCIDOS GRASOS

Grasa.

Peso específico a 30° : $D_{30} = 0.9495$.

Indice de refracción:	Grado refractométrico:	Refracción especifica:
$n_{25^{\circ}} = 1,4787$	80,7	0,2976
$n_{80} = 1,4770$	77,8	·
n_{40} = 1,4735	72,0	
$n_{50}^{\circ} = 1,4698$	66,0	
	!	

Punto de fusión	36 38,5°.
Punto de solidificación	25,5°.
Solubilidad en alcohol absoluto, a 18°	7,3 gr./100 c. c.
Temperatura crítica en ácido acético	35°.
Coeficiente térmico	14°.

Examen a la luz ultravioleta: Fluorescencia blanco-azulado-amarillento.

Indice de yodo	80,7
Indice de saponificación	207,2
Indice de acidez	46,2
Acidez expresada en ácido oleico	23,2
Indice de ester	161,0
Indice de Hehner	91,6
Indice de Reichert-Meisel	4,32
Indice de Polenske	1,98
Insaponificable	$2,56^{\circ}/_{0}$.

Acidos grasos.

	refracción:	n _{50°}	=1,4630
Indice de	refracción:	n ₆₀ 0	=1,4592
	{	$n_{70^{\circ}}$	=1,4551

Punto de fusión	48.51,5°.
Punto de solidificación	45,5°.
Poder rotatorio	46,3°.

Examen a la luz ultravioleta: Fluorescencia amarillento-verdosa.

Indice de yodo	88,67
Indice de neutralización	217,72
Peso molecular medio	257,68
Indice de acetilo	12.31

CONCLUSIONES

Cotejando la composición global de la semilla de Caloncoba Mannii con las dadas por otros autores sobre las C. Welwitschii (13), (15), (16), (21), C. glauca (13), (15), (16) y C. echinata (1), (9), se acusa una mayor riqueza en lípidos en la semilla por nosotros estudiada, explicable esto porque la cantidad de testa en relación al peso total de la semilla es menor que en aquéllas.

El poder rotatorio dextrogiro de la grasa se aproxima al de las tres Caloncobas antes mencionadas. Por el valor de los índices de yodo de la grasa y ácidos grasos, se deduce que la proporción de ácidos grasos no saturados debe ser también aproximadamente igual al de la contenida en aquéllas. Ambos datos tienen extraordinario interés, desde el momento que la intensidad de sus propiedades terapéuticas, como en los de aquéllas, parece estar en relación directa con el poder rotatorio y su grado de insaturación.

Sería interesante, una vez investigadas a fondo las propiedades antileprosas del aceite de Caloncoba Mannii y su grado de eficacia, en comparación con los otros aceites de chaulmoogra, organizar racionalmente la recolección, y, si necesario fuese, fomentar su cultivo para asegurar a la terapéutica el suministro de un material o de sus derivados (esteres etílicos, etc.), de tan alto interés farmacológico y, por tanto, humanitario.

Interesa destacar lo relativo al glucósido cianogenético encontrado, pues ello, aparte del hecho en sí, es de gran interés para la farmacoquímica comparada, pues, como se ha indicado, se han encontrado también tales heteróxidos en especies no sólo de la misma familia, sino del mismo género.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ANDRÉ, E. & JOUATTE.—Bull. Sc. Pharm., 35, 81, 1928.
- (2) BERTRAND, G.- Bull. Soc. Chim., 35, 1,285, 1906.
- (3) COMENGE, M.-Análisis de Alimentos, Madrid, 173, 1934.
- (4) CRISMER.—Bull. Assoc. Belg. Chim., 9, 145, 1895.
- (5) CRISMER.—Bull. Assoc. Belg. Chim., 10, 312, 1896.
- (6) ENGLER .- Bot. Jaharb., 40, 462, 1908.
- (7) ENGLER. Pflanzenwelt Afrikas, III (2), 569, 1921.
- (8) ENGLER, A. & PRANTL, K .- Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Leipzig, 377, 1925.
- (9) FRANÇOIS, TH.-Bull. Sc. Pharmacol, 36, 339, 1929.
- (10) HUTCHINSON.-Flora of West Tropical Africa, I, 161, 1927,
- (11) KJRLDAHL, S.-Zeitschr. Analyt. Chem., 22, 336, 1883.
- (12) MITCHEL .- The Analyst, 26, 69, 1901.
- (13) NOSTI, J.-Public. Minist, Agric., Madrid, 1944.
- (14) OTERO AENLE.-Tesis Doct. Farm., Madrid, 1943.
- (15) PEIRIER.-J. Pharm. Chim., 10, 124, 1929.
- (16) PERROT, E. & FRANÇOIS.-Bull. Sc. Pharm., 36, 551, 1929.
- (17) POWER & GORNALL.-Jour. Chem. Soc., London, 85, 838-851, 1904.
- (18) POWER & LEES .- Proc. Chem. Soc., 21, 88, 1905.
- (19) ROSENMUND & KUHNHENM .- Z. f. unters. d. naurungs. u. Gen., 46, 154, 1923.
- (20) ROSENTHALER.-Arch. Pharm., 56, 251, 1913.
- (21) SANTOS MERINO, A .- Tesis Doct. Farm., Madrid, 1945.
- (22) SANTOS RUIZ A. & ERNST J.-An. Soc. Esp. Fis. Quim., 39, 529, 1943.
- (23) SANTOS RUIZ & SANS MUÑOZ.-An. Soc. Esp. Fis. Quim., 27, 207, 1941.
- (24) TORTELLI.-Metodi Generali, 574, 1901.
- (25) VILLAVECCHIA, V. Tratado Quim. Anal. Aplic., II, 500-501, 1944.
- (26) VLADESCU.-Ann. des Ferment., 5, 546, 1940.