

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

"CONTRIBUCION AL ESTUDIO FITOQUIMICO DEL RHAMNUS ALATERNUS L."

(Reconocimiento cualitativo y determinación cuantitativa de antraheterósidos.)

Tesis presentada para optar
al grado de Doctor en BIO-
QUIMICA Y FARMACIA.

p o r

VICTOR P. OLAECHEA

1945

Departamento de Farmacia Práctica. Cátedra de Farmacognosia.

Contribución N°:

4025

F a d r i n o d e F e s i n

P r o f e s o r D r. R A U L N I C O

A mie padres y hermana

Señor Decano:

Señores Consejeros:

Señores Profesores:

En cumplimiento de disposiciones reglamentarias, tengo el agrado de elevar a vuestra digna ración el presente trabajo de Tesis, a fin de optar al grado de Doctor en Bioquímica y Farmacia.

En forma especial quiero dejar expresa constancia de mi más completo y sincero reconocimiento al señor profesor Doctor Raúl Nico, quien me ha asesorado siempre con todo entusiasmo, allanándome múltiples dificultades en el logro de mi empeño, y teniendo siempre para mí un estímulo moral constante, de valor inapreciable.

Al señor profesor José F. Molfino, agradezco su atención por sus indicaciones sobre bibliografía botánica y criterio a seguir en su interpretación.

Al Doctor Manuel G. Escalante, a cuya gentil colaboración debo la ejecución e interpretación de los cortes histológicos de la droga, como así también de las descripciones botánicas.

Al señor profesor Dr. Jorge Gascón, autor de algunas de las fotografías que se adjuntan.

Al ayudante diplomado de la cátedra de Farmacognosia, señor Raúl M. Gonzalez, su atención constante y valiosas opiniones para solucionar distintos problemas.

Quiero también expresar mi reconocimiento a todos aquellos que en una u otra forma han contribuido a la realización del presente trabajo aliviando mis esfuerzos.

I N T R O D U C C I O N

Dos finalidades principales me han guiado en la elección y ejecución del presente tema y plan de tesis

La primera de ellas es contribuir con este modesto trabajo a un mejor conocimiento de las especies vegetales cultivadas en nuestro país, muchas de ellas de posible aplicación en terapéutica, como podría ocurrir con el *Rhamnus alaternus*, droga objeto de nuestro estudio.

La segunda de dichas finalidades es adquirir desenvoltura y criterio personal en la ejecución de trabajos tan interesantes como los que nos ofrece la Farmacognosia y Fitoquímica en general, comenzando para ello con la bibliografía, recolección y acondicionamiento de las muestras, selección de métodos, anátomo-histología y micrografía de las drogas, ejecución de técnicas de localización microquímica, etc., pasando por la evaluación cuantitativa de las hidroximetil-antraquinonas, compuestos estrechamente vinculados a la actividad fisiológica de la droga estudiada en nuestro caso.

Plan desarrollado

- 1.- Introducción.
- 2.- Ubicación taxonómica del *Rhamnus alaternus*.
- 3.- Descripción macrográfica de su corteza y hoja.
- 4.- Anatomía-histología. Micrografía del polvo de dichas drogas.
- 5.- Composición química de cortezas de especies del género *Rhamnus*.
- 6.- Vinculación de dicha estructura con la actividad farmacodinámica de la droga.
- 7.- Localización microquímica de las hidroximetil-antraquinonas.
- 8.- Preparación de la muestra para el análisis.
- 9.- Investigación cualitativa de antraheterósidos en una droga.
- 10.- Metodología del análisis cuantitativo de drogas de antraheterósidos.
- 11.- Elección del método analítico y su aplicación a la corteza y hoja de *Rhamnus alaternus*.
- 12.- Determinación de la sensibilidad de la reacción de Bornträger.
- 13.- Comentarios.
- 14.- Conclusiones.
- 15.- Bibliografía.

UBICACION TAXONOMICA DEL RHAMNUS ALATERNUS

A la especie estudiada, le corresponde, de acuerdo con el sistema de clasificación de Engler (1), la siguiente ubicación:

P a n e r ó g a m a s

A n g i o s p e r m a s

D i c o t i l e d ó n e a s

A r q u i c l a m í d e a s

Orden: R h a m n a l e s

Familia: R h a m n á c e a s

Género: R h a m n u s

Especie: R h m n u s A l a t e r n u s

F A M I L I A : R H A M N A C E A E

Esta interesante familia, del orden de las Rhamnales, difundida en todas las latitudes a excepción de las zonas polares, presenta los siguientes caracteres: (2) y (3).

Flores actinomorfas, hermafroditas o, por aborto, unisexuales, tetrámeras o pentámeras, dispuestas en racimos o cimas, siempre pedunculadas y con el receptáculo generalmente cóncavo. El cáliz puede ser tetra o pentámero, de lóbulos siempre triangulares, con profloración valvar. Corola de 4 - 5 pétalos pequeños que alternan con los lóbulos del cáliz, ordinariamente insertos en el borde del disco, con profloración valvar. En algunos casos los pétalos pueden faltar (*Colletia Pomaderris*). Estambres en un sólo ciclo, opuestos a los pétalos e insertos con ellos. Las anteras son introrsas, a veces ovoides, biloculares, con dehiscencia longitudinal; otras veces reniformes abriéndose por 2 valvas arqueadas y laterales. Ovario generalmente súpero, libre o adherente al disco, entonces semi-ífero, con 2 - 3 - 4 lóculos uni-ovulados, óvulos erguidos, anátropos. Fruto generalmente pequeño, drupáceo, que puede variar a capsular, siendo alado en las especies de gineceo ífero. Las semillas poseen testa lisa, rafe lateral ó dorsal, 2 cotiledones grandes con albúmen poco abundante; embrión ex-albuminado de radícula corta e ífera.

Las Rhamnaceae son plantas leñosas, árboles ó arbustos, raramente herbáceas, existiendo también algunas trepadoras.

Las hojas son simples, por lo general alternas, de tamaño variable, pubescentes, y a menudo caen a poco de formarse.

Las estípulas a veces caen, ó bien se mantienen herbáceas ó se transforman en espinas (4).

Afinidades: según M. de Jussieu, son afines a las Euphorbiaceas, de las que se diferencian por la inserción hipogina.

Distribución geográfica: con 48 géneros y más o menos 500 especies, podemos decir que no existe ningún país donde no se las encuentre, si exceptuamos las zonas polares. El género *Colletia* es exclusivo de América del Sud, como algunos otros lo son para Nueva Zelanda; los demás son bastante cosmopolitas. En nuestro país están ampliamente difundidas, existiendo en todas las provincias y territorios, incluso Tierra del Fuego. Los géneros *Colletia* y *Discaria* son los más representados; el primero en el Norte y Centro hasta la Patagonia, y el segundo en la Mesopotamia hasta Tierra del Fuego; las especies de *Gouania* son características de la selva subtropical. Hay 32 especies indígenas en la Argentina, comprendidas en 4 tribus.

Propiedades y empleos existen en esta familia especies importantes por su aplicación farmacéutica y práctica industrial.

El género *Rhamnus* suministra drogas purgantes, como el *Rhamnus Purshiana*, de la América septentrional, cuya corteza es la cáscara sagrada; con el mismo fin se utiliza la corteza del *Rhamnus Frángula* y los frutos del *Rhamnus Cathártica*, el espiño cerval.

Estos se utilizan también en tintorería, para la preparación del llamado verde vegetal, obtenido asimismo de los frutos inmaduros de otras especies próximas. La madera del *Rhamnus Cathártica*, de un bonito jaspeado, se emplea para trabajos de tornería; el carbón de la del *Rhamnus Frángula* da muy buenos resultados para fabricar pólvora.

En Jamaica se emplean los tallos de varias *Gouanias* en la fabricación de cerveza, por tener una substancia amarga parecida a la lupulina.

Con fines ornamentales se cultivan también varias especies.

Tribu: Rhamnae J. St. Hilaire, en Expos. Fam. 2:264, 1805 (5)

Arboles, arbustos ó enredadoras, de inflorescencia variable.

Flores de ovario ínfero o súpero. Fruto seco o drupáceo, trilocular ó 2 - 4 locular indehiscente o dehiscente por medio de 2 valvas.

Género: Rhamnus Linn, Sp. Pl., 1:193, 1753 (6)

Flores hermafroditas (7) hasta polígamo dioicas. Cáliz tetrámero o pentámero. Tubo urceolado, lóbulos triangulares ovados,

erectos. Interiormente carenados. Corola 4 - 5 mora o nula, insertada a la altura del borde superior del disco, acartuchada o plana. Estambres 4 - 5, filamentos brevísimos. Disco de margen tenue, tapizando el receptáculo. Ovario libre ovoideo, 3 - 4 locular, estilo brevemente alargado, y 3 - 4 ~~partido~~ partido, estigmas obtusos y papilosos. Drupa, oblonga hasta esférica, con el cáliz persistente cuando el fruto es joven, dehiscente o indehiscente. Semilla ovada, testa membranosa hasta coriácea, albúmen carnoso, cotiledones planos, o de margen recurvado, ténues, radícula breve. Arbustos ó árboles, de hojas alternas, raramente subopuestas, pecioladas, caducas o persistentes, penninervadas, de borde entero ó dentado. Estípulas pequeñas caducas. Flores axilares, en racimos ó cimas. Cima fasciculada.

Sub-género: Eurbanius Brong., en Ann.Sc.Nat. 1(10):360, 1827(8)
Flores polígamo-dioicas, de ovario hasta 4 locular, con 2 a 4 hendiduras dorsales ó con surcos medianos o bien algo laterales. Las semillas con frecuencia salen brotando del fruto.

Sección: Alaternus De Candolle, en Prodrorus, 2:23, 1825(9)
Flores pentámeras, androceo 5. Fruto baya de 3 semillas ó 2 por aborto de una. Semilla de cicatrícula no abierta. Arbustos sin espinas. Hojas perennes, coriáceas, glabras.

Especie: Rhamnus alaternus L., en Sp. Pl., 1:193, 1753 (6)

"inermis, floribus dioicis, estigmate triplici"

Arbusto de aproximadamente dos metros de altura, de abundante ramificación, con ramas glabras; hojas ovales o lanceoladas, de borde aserrado o casi entero, glabras. La cara superior brillante, lustrosa, posee un color verde oscuro, mientras que la inferior tiene un color verde amarillento. Flores en pequeños racimos o fascículos umbeloides, con 5 pétalos. Fruto, bayas, de color azul oscuro.

Localidad típica: "in Europa australi 5"

Distribución geográfica: sud de Europa y cultivado en Estados Unidos al Sud de Washington; en nuestro país escasamente cultivado con fines ornamentales.

3.- DESCRIPCION MACROGRAFICA DE SU CORTEZA Y HOJA.

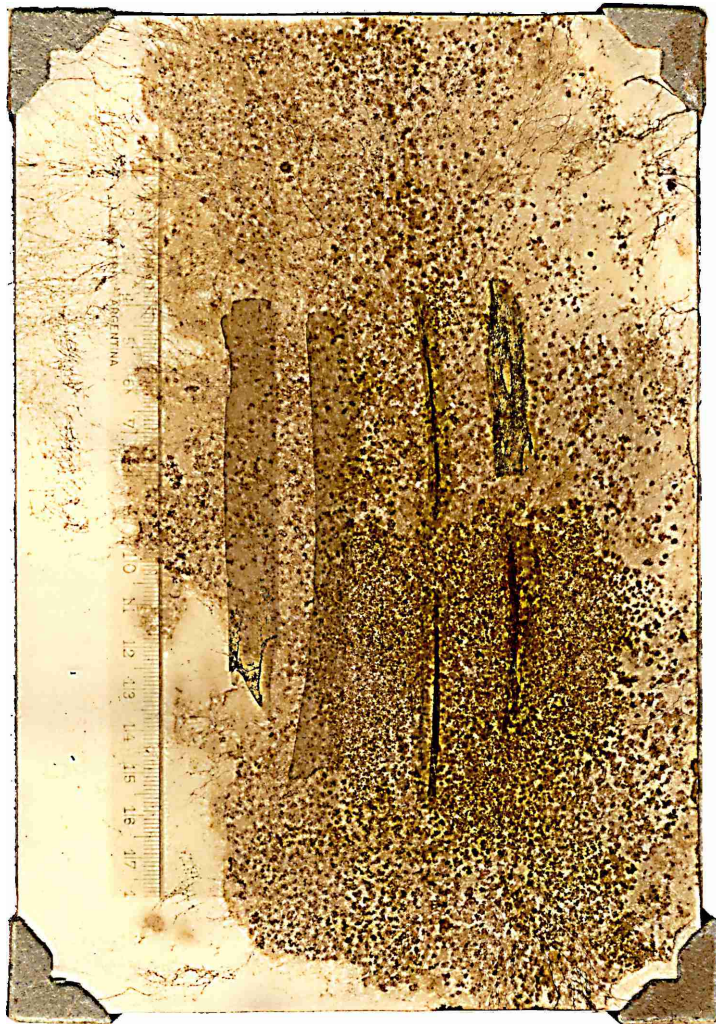
Las cortezas de *Rhamnus alaternus* se presentan en fragmentos irregulares, planos o curvados, de hasta 1 milímetro de espesor, a veces arrollados en forma de tubos simples o compuestos, de longitud variable. La superficie externa, de color gris parduzco a pardo claro, presenta cicatrices salientes, puntiformes, de 1 a 2 milímetros de diámetro; se observan también fisuras transversales delgadas y formaciones blanquecinas de líquenes.

La superficie interna es de color pardo rojizo, lisa, con numerosas líneas longitudinales paralelas y blanquecinas. La corteza es de fractura neta en el exterior, y fibrosa, de fibra larga, en la parte media e interior. Prácticamente inodora, ofrece un sabor amargo poco pronunciado en un comienzo, que luego se va intensificando, y que recuerda a la cáscara sagrada.

Las hojas son simples, ovales, de 3 á 6 centímetros de longitud pecioladas, de borde crenado y textura coriácea. La cara superior es lustrosa y de color verde oscuro, mientras que la inferior es amarillo-verdosa, con una nervadura central bien manifiesta, de la que parten nervios laterales como las barbas de una pluma (peninervada). Prácticamente glabras, existiendo pelos muy pequeños y escasos en la base de la cara ventral, a ambos lados de la nervadura central. Pecíolo de más o menos 1 centímetro de longitud, achatado y acanalado en su parte superior. Casi inodoras, poseen un sabor amargo poco pronunciado.



Rama joven de Rhamnus alaternus L.



Cortezas de Rhamnus alaternus L.

4.- ANATOMO - HISTOLOGIA

Para la obtención de los cortes histológicos, como así también en la ejecución de la técnica de doble coloración ensayada sobre los mismos, se ha seguido el criterio corriente indicado en el manual de "Manipulaciones de Botánica" del profesor Augusto C. Scala (10).

Referencias histológicas: Corte transversal del tallo de *Rhamnus alaternus*. Aumento 120 diámetros.

- 1) Epidermis: formada por células aplanadas cubiertas por una gruesa cutícula.
- 2) Parenquima cortical: medianamente desarrollado, en su parte interna hay pequeñas masas de colenquima (tejido de sostén), puede fácilmente observarse el principio de decorticación característico de esta especie.
- 3) Haces libero-leñosas: liber poco desarrollado pero muy apretado. Leño desarrollado y poco uniforme, se nota defectivamente la línea de los vasos de Primavera (probablemente debido al clima cambiante en temperatura.
- 4) Médula: central y pequeña con rayos medulares tortuosos y delgados hasta el parenquima cortical. Se notan inclusiones rojizo oscuras.

Corte transversal de la corteza de *Rhamnus alaternus*.

Aumento 450 diámetros.

- 1) **Epidermis:** las células que forman la epidermis son aplanadas, la pared basal es plana completamente y la superior o externa es ligeramente abovedada y recubierta por una gruesa capa de cutina que toma su forma.
- 2) **Parenquima cortical:** es bastante regular. Las primeras capas de células son más pequeñas y más planas, en cambio las restantes son más grandes y más globosas pero siempre predomina el ancho. Las tres primeras capas del parenquima cortical, es decir, las externas, se encuentran interrumpidas por la abundante acumulación de una sustancia de color rojizo oscuro que persiste luego de la fijación y montaje del corte histológico, pudiendo notarse como una mancha oscura en la microfotografía.

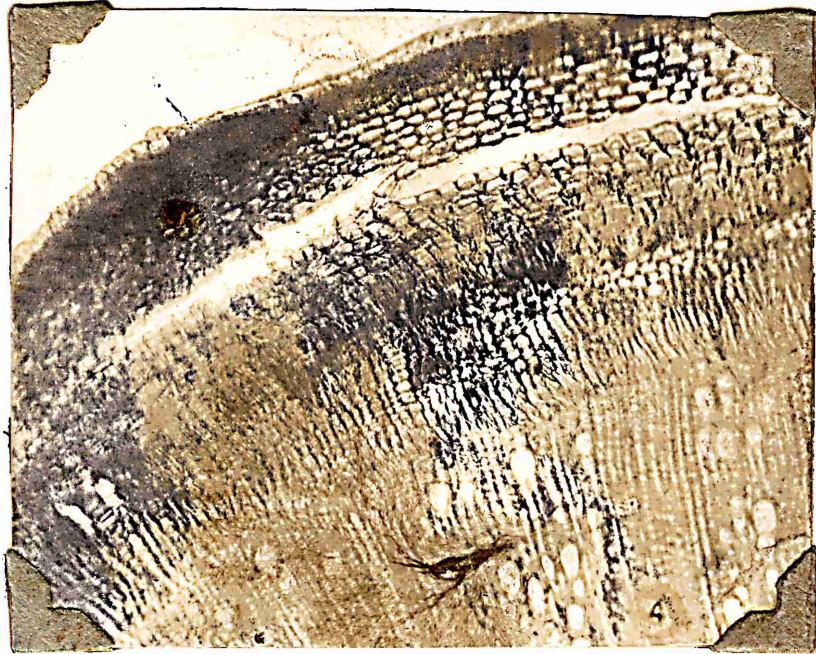
Corte transversal de la hoja de Rhamnus alaternus.

Aumento 120 diámetros.

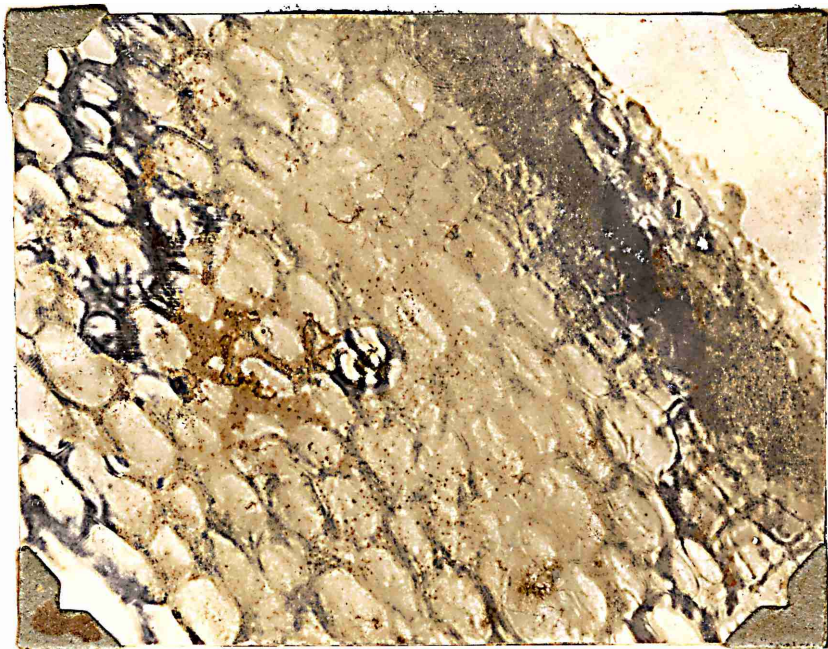
- 1) **Epidermis:** En la epidermis superior hay células regulares poco aplanadas, mayormente no interrumpidas por estomas, cubiertas por una cutícula gruesa. Completamente glabra.

En la epidermis inferior hay células regulares menores a las de la superior, alternadas por frecuentes estomas.

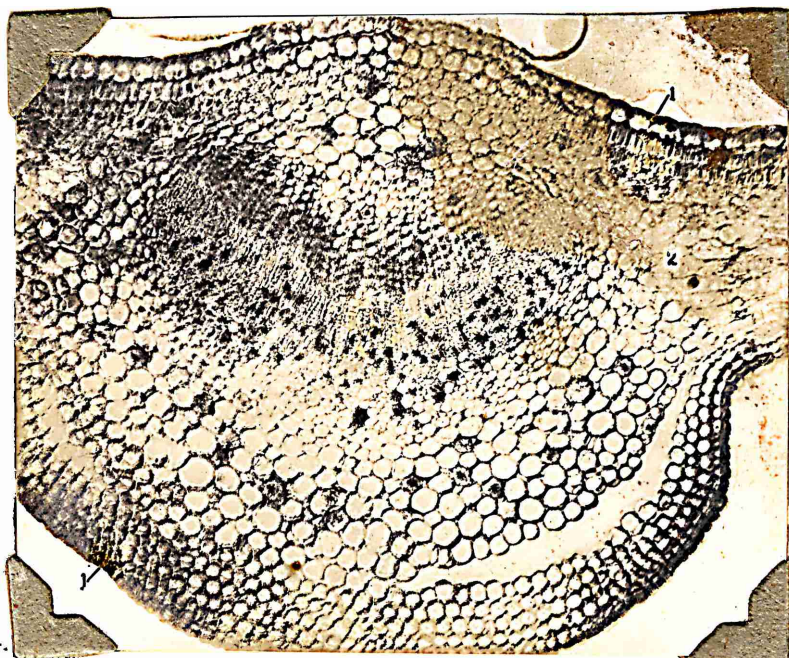
- 2) **Mesófilo:** de estructura heterogénea; el parenquima empalizada es apretado y en dos capas, el parenquima lagunoso es flojo y de células irregulares.



Corte transversal del tallo. Aumento 120 diámetros.



Corte transversal de corteza. Aumento 450 diámetros.



Corte transversal de hoja. Aumento 120 diámetros.

3) Nervadura media: es prominente inferiormente. El haz líbero-leñoso se dispone semi-lunariamente siendo el leño (xiloma) menor que el liber (floema) pero ambos de vasos apretados. En el liber se notan inclusiones rojizo oscuras. Debajo del haz se dispone un parenquima de células grandes que disminuyen en tamaño al acercarse a la cara inferior. En este parenquima se encuentran cristales agregados en drusas. La estructura corresponde a la hoja de una mesófito típica.

Micrografía del polvo de dichas drogas

Tanto en el polvo de cortezas como en el de hojas, hemos obtenido buenos resultados utilizando solución acuosa de hidrato de cloral (20:50) para la suspensión y clarificación de las drogas citadas.

El polvo se agita enérgicamente en un tubo pequeño con la solución de hidrato de cloral, a fin de obtener una suspensión homogénea, dejando luego reposar para la espontánea eliminación de las burbujas de aire incorporadas por la agitación. Con una pipeta fina se translada a un portaobjeto una pequeña cantidad de suspensión, la que se cubre luego con un cubreobjeto, con lo que queda lista la preparación para ser observada con el microscopio.

En una primera observación utilizando pequeño aumento, nos orientamos acerca de la homogeneidad de la distribución de los elementos del preparado, como así también de su cantidad y naturaleza. Recurriendo luego a un aumento mayor, efectuamos el estudio de los distintos elementos, cuyas dimensiones se determinan posteriormente mediante el empleo del ocular micrométrico.

En la suspensión de polvo de corteza que presenta una coloración amarillo parduzca, hemos podido observar la presencia de los siguientes elementos: numerosas fibras leñosas, de aproximadamente 200 micrones de longitud, a las cuales se encuentran adheridas fibras cristalinas conteniendo prismas monoclinicos de oxalato de calcio; fragmentos de suber de coloración pardo rojiza; prismas monoclinicos de oxalato de calcio, aislados y agregados en rosetas. Estas rosetas de prismas poseen comunmente 25 micrones de diámetro, pudiendo llegar en algunos casos hasta 50 micrones. Fragmentos de parénquima y rayos medulares; floema.

En las figuras hemos utilizado las siguientes referencias:

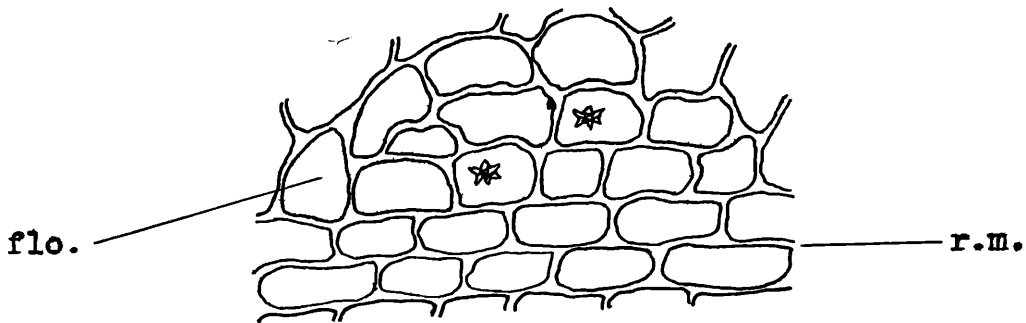
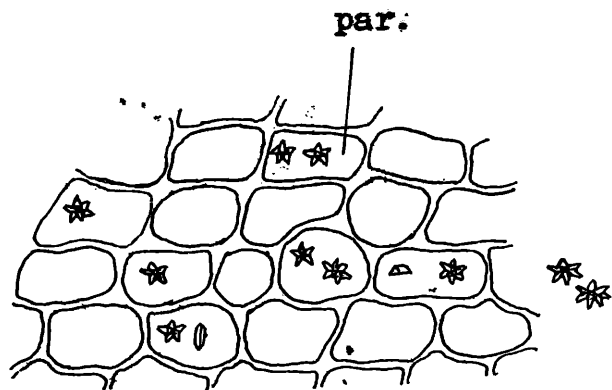
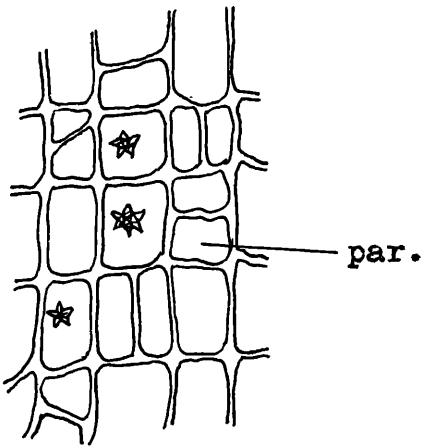
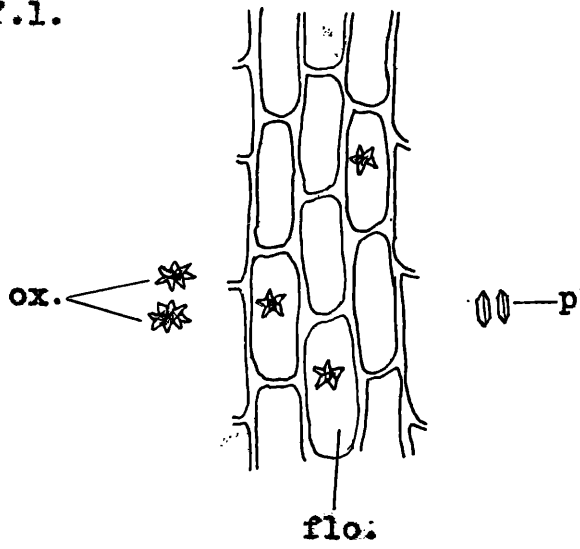
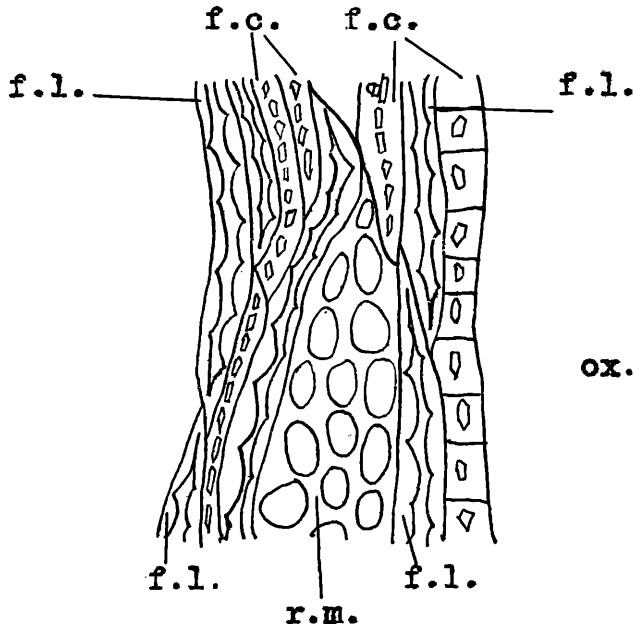
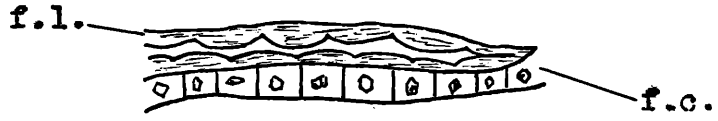
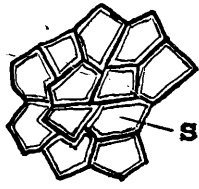
- f.l. : fibra leñosa
- f.c. : fibra cristalina
- s : súber
- ox : rosetas de oxalato de calcio
- p : prismas aislados de oxalato de calcio
- par : trozos de parénquima con oxalato de calcio
- r.m. : porción de rayo medular
- flo : floema

En la suspensión del polvo de hojas, que presenta una coloración verde amarillenta, hemos observado los siguientes elementos: trozos de parénquima con rosetas de oxalato de calcio; pelos simples de 110 a 200 micrones de longitud, de paredes gruesas y extremidad aguda. Restos de epidermis con células de paredes delgadas, más bien sinuosas algunos de estos restos con estomas elípticos, rodeados de 5 - 6 células. Prismas monoclinicos aislados y agregados en rosetas de oxalato de calcio, de 15 - 35 micrones ; vasos espiralados; fibras cristalinas y leñosas.

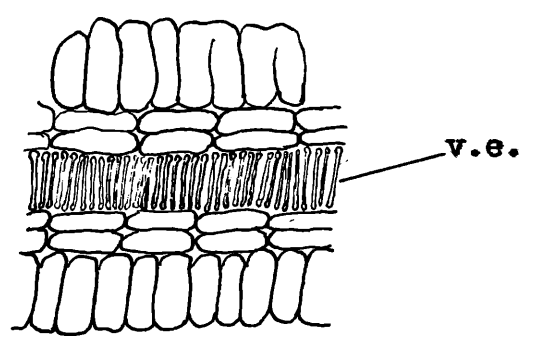
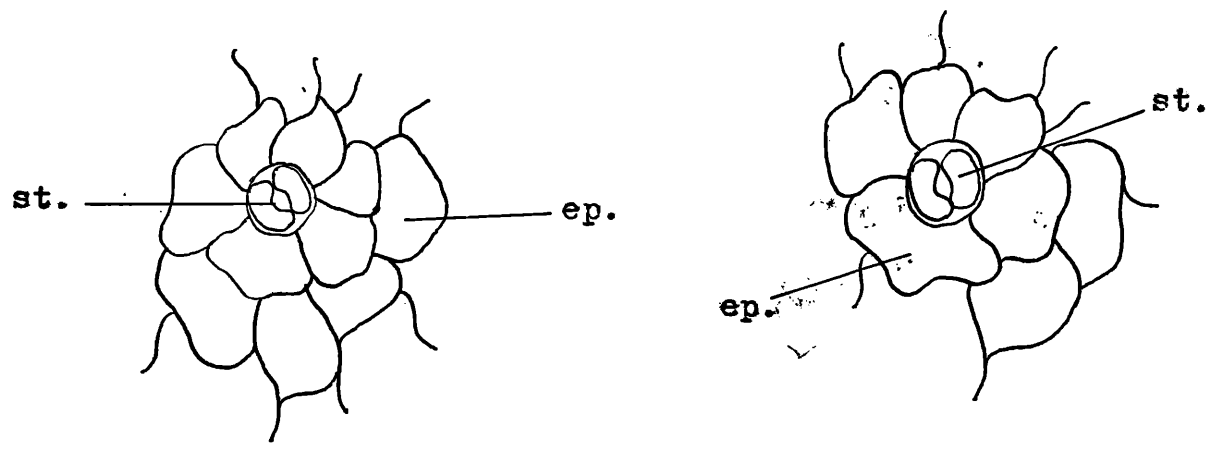
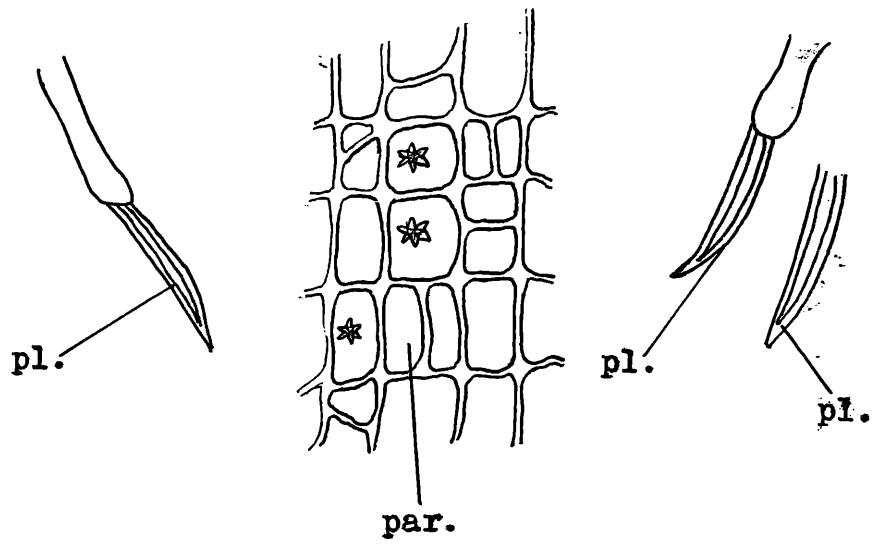
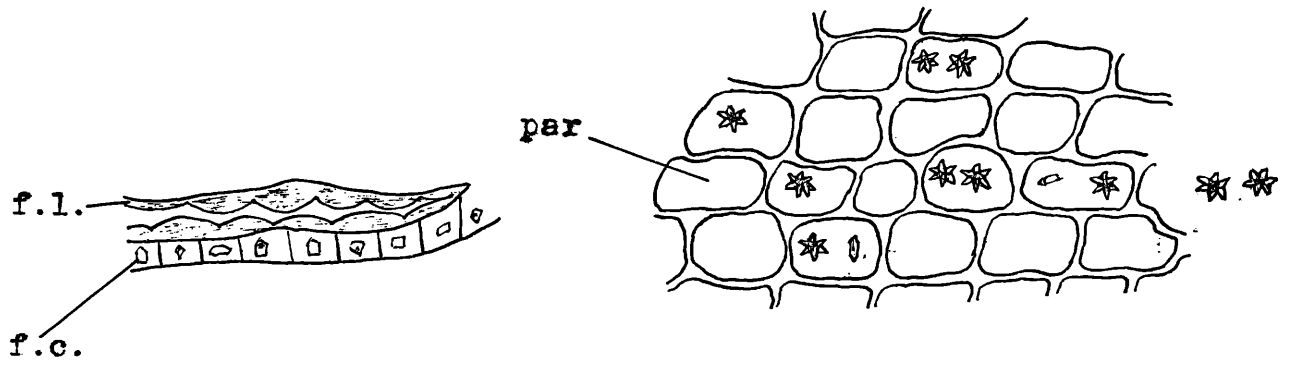
Referencias de las figuras: hemos utilizado las mismas que en el polvo de cortezas, para aquellos elementos comunes, pero agregando ahora las siguientes:

- p.l. : pelo epidérmico
- ep : restos de epidermis
- st : estoma
- v.e. : vasos espiralados y tejidos vecinos.

MICROGRAFIA DEL POLVO DE CORTEZAS



MICROGRAFIA DEL POLVO DE HOJAS



5.- COMPOSICION QUIMICA DE CORTEZAS DE ESPECIES DEL GENERO
RHAMNUS.

En la corteza de la especie oficial, *Rhamnus Purshiana*, encontramos una serie de constituyentes: resinas, materias grasas, almidón, tanino, un principio amargo, un xanthorhamósido (que se desdobla en rhamnosa y rhamnentina ó metil quercetina), enzimas, oxalato de calcio, etc., y finalmente heterósidos antraquinónicos y sus productos de desdoblamiento.

Consideraremos aquí en forma muy general algunos de estos constituyentes, para luego dedicar atención preferente a los compuestos antraquinónicos.

Los lípidos de la cáscara sagrada están representados fundamentalmente por araquidato de rhamnol, fitosterol, ácido araquídico, palmítico, oleico, linoleico y linolénico.

El principio amargo poseyendo una función lactona, tiene la propiedad de dar sales mucho menos amargas. Este conocimiento se aprovecha en la preparación de los llamados extractos fluidos y elixires "insípidos" de cáscara sagrada, ya sea macerando antes de la extracción el polvo de droga humedecido y con óxido de magnesio o tratando un extracto con un álcali, por ejemplo hidróxido de potasio. Se obtiene así un producto de sabor menos desagradable, pero

también de menor actividad fisiológica como consecuencia de la destrucción de algunos principios purgantes (Wenzel, 1886) (11) y (12).

El empleo de la corteza fresca o reciente va acompañado de trastornos dolorosos y eméticos, los cuales no se manifiestan cuando se emplea droga estacionada durante un tiempo prolongado. Por esto las farmacopeas aconsejan utilizar cortezas que tengan como mínimo un año de envejecimiento.

Se ha pensado sin ninguna base experimental, que la causa de estos efectos secundarios sea una enzima, la que se destruiría con el tiempo.

Otros autores consideran como responsables de aquellos trastornos, a una sustancia albuminoide, la rhamtoxina, principio que espontáneamente o por acción enzimática se iría destruyendo o modificando progresivamente con el tiempo hasta desaparecer (13) y (14).

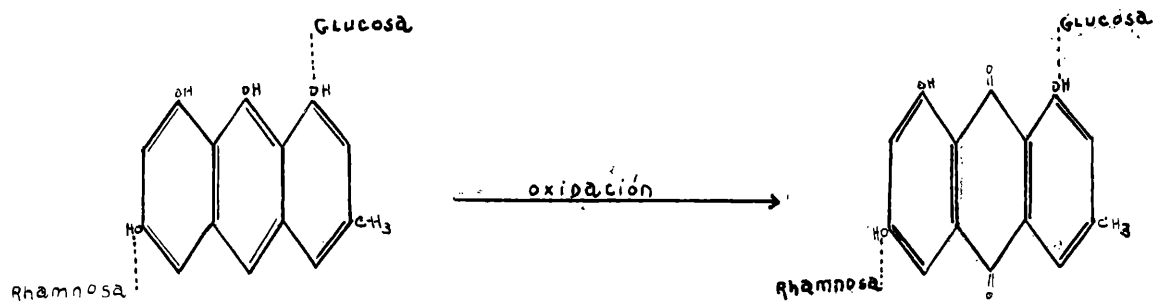
Se ha comprobado por otra parte, que el calentamiento a 100°, o mejor aún la estabilización inmediatamente después de obtenida la droga, destruyendo las diastases y cualquier otra sustancia termolábil, como preconiza Maurin, son suficientes para impedir esa acción indeseable (15). Dicha acción sería producida entonces por un principio modificable con el tiempo o la temperatura, tratándose bien de una enzima o de una sustancia especial, que podría ser la rhamtoxina.

Con respecto a los antraheterósidos, todavía no se posee un conocimiento completo y exacto de los mismos, debido a la fácil transformación de estos principios.

De acuerdo a las experiencias de Casparris y Maeder (16) el heterósido fundamental sería la glucofrangulina, que estos autores consiguieron aislar de la corteza del *Rhamnus Frángula* con una técnica especial, y cuya presencia se ha comprobado también en el *Rhamnus Purshiana*.

La glucofrangulina, de fórmula bruta $C_{27}H_{30}O_{14} \cdot H_2O$, se presenta como un compuesto amarillento, soluble en agua, alcohol metílico, alcohol etílico, ácido acético y piridina; insoluble en benceno, cloroformo, éter, sulfuro de carbono, etc. Hidrolizada con $SO_4 H_2$ al 5 %, se genera un 40 % de frángula-emodina que se puede cristalizar, y una mezcla equimolecular de dextrosa y rhamosa (60 %), con trazas de fructosa y pequeñas cantidades de crisofanol y emodina monometil-éter. Se ha demostrado que no es una mezcla de rhamnósido y glucósido, sino un antraquinona-biórido en el que intervienen ambos azúcares simultáneamente.

Es decir: glucofrangulina = glucosa + emodina + rhamosa.
Este compuesto posiblemente no se halla como tal en la droga fresca, sino que se encontraría en forma de biósido de antra-nol, el cual durante la desecación, bajo la influencia de fermentos oxidantes se transformaría en parte al menos en el biósido antraquinónico correspondiente.



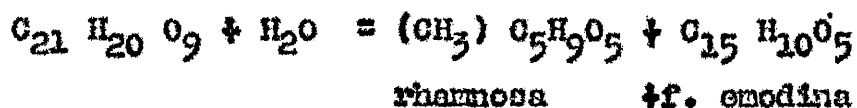
antranol biósido de la frángula-emodina

antraquinona biósido de la frángula-emodina

Si teóricamente separamos la glucosa de la glucofrangulina, obtenemos la frangulina, (rhamnosa + emodina), compuesto que también ha sido aislado de los *Rhamnus Frángula* y *Purshiana*, y que se presenta en forma de finas agujas brillantes, de color amarillo naranja, inodoras, de sabor ligeramente amargo (17).

Cristaliza con una molécula de agua que pierde a 90° en el vacío; es levo-rotatoria : $\alpha_D = -134.4$, trabajando en solución acética. Calentada en el block de Maquenne, pasa al rojo ladrillo hacia 197° sin fundir; el producto transformado funde a 249°. Es casi insoluble en agua fría, cloroformo y alcohol metílico. Soluble en 150 partes de alcohol amílico a 100°, y en 75 partes de una mezcla de agua y piridina a 90°.

El alcohol clorhídrico diluido la desdobla en rhamnosa o metil pentosa y en emodina (frángula-emodina)



En cuanto a la purshiana y cascarina, obtenidas también como antraheterósidos, se ha podido demostrar por las experiencias de Gowett (18), que solo son formas impuras de emodina.

Pietsch ha aislado un nuevo heterósido, al que denomina peristaltina, cuya fórmula bruta es $C_{14}H_{18}O_8$ (18).

Con el mismo nombre suele indicarse también a veces, a los heterósidos del Rhamnus Frángula que se solubilizan en agua (24).

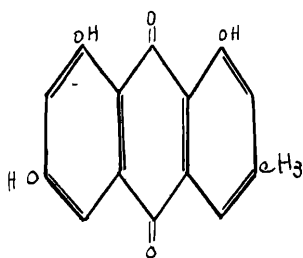
El frangularósido, de fórmula $C_{21}H_{24}O_9$ es un antraheterósido insoluble en agua, aislado por Bridel y Charaux de la corteza de Rhamnus Frángula (19); se presenta en forma de prismas amarillos, de punto de fusión $254^{\circ}C$, *levo-rotatorio*; por hidrólisis produce rhamnosa y frangularol; el último es un derivado antranólico, fácilmente oxidable transformándose en una substancia pardo oscura.

Bridel y Charaux (20), que han realizado un estudio intenso y completo de la corteza de Rhamnus Cathártica, han aislado de la misma 3 antraheterósidos solubles en agua. El más abundante de éstos, produce por hidrólisis enzimática glucosa y un rhamnósido insoluble de la emodina, conocido como frangulina o rhamnosanthina. El compuesto primitivo parecería ser entonces del tipo de la glucofrangulina, que hemos indicado en las cortezas de los Rhamnus Frángula y Purshiana.

El segundo heterósido, presente en pequeña cantidad, se hidroliza por una enzima de la corteza, originando glucosa y emodina.

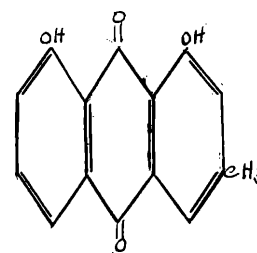
El tercero no es atacado por las enzimas, pero puede ser hidrolizado por un ácido, con formación de emodina y un azúcar reductor.

De las hidroximetil-antraquinonas obtenidas por hidrólisis de los antraheterósidos, las mejor conocidas tanto desde el punto de vista químico como farmacológico, son la emodina (frángula-emodina) y el ácido crisofánico:



frángula-emodina

1 - 6 - 8 trihidroxi-
3 metil-antraquinona

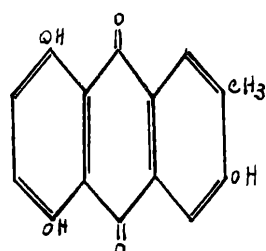


ácido crisofánico

1 - 8 dihidroxi-3 metil-
antraquinona

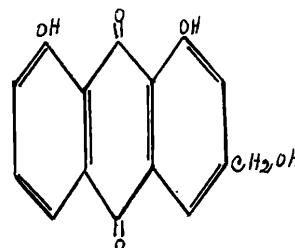
La frángula-emodina se presenta en forma de agujas sedosas, amarillo rojizas, brillantes, sublimables. Su punto de fusión es 256°- 257° ; insoluble en agua, se disuelve bien en alcohol, benceno, cloroformo, éter, etc., como así también en los hidróxidos alcalinos, con los que da soluciones de color rojo cereza.

En cuanto al ácido crisofánico, llamado también crisofanol, se presenta en forma de cristales amarillos, de punto de fusión 196° . Sublima lentamente sin descomposición, casi insoluble en agua, soluble en benceno, cloroformo, ácido acético glacial, lo mismo que en las soluciones de hidróxidos alcalinos. Si la solución alcalina de color rojo cereza, se reduce calentando en presencia de Zn, aparece la coloración amarilla del antranol formado. Este se reoxida con toda facilidad, actuando el ácido crisofánico en este sentido, como un verdadero indicador de óxido-reducción. De menor importancia, y existentes en menor proporción en las cortezas de Khammus, son la inoemodina y la áloe-emodina:



inoemodina

3-5-8 trihidroxi-2 metil
antraquinona



áloe - emodina

3 oximetil-1-8- dihidroxi-
antraquinona

Bridel y Charaux han comprobado que estos compuestos no existen al estado de libertad en la droga fresca (20) y por consiguiente tampoco en el vegetal, por lo

que llegan a la conclusión de que ellos aparecen posteriormente como consecuencia de la actividad enzimática sobre los heterósidos (biósidos) antraquinólicos presentes, los cuales se oxidan e hidrolizan.

Sin embargo llama la atención que la mayoría de los resultados presentados por diversos autores de análisis cuantitativos de cortezas de *Rhamnus* incluyen valores para las hidroximetil-antraquinonas libres. Podría abrirse un interrogante respecto a si el tratamiento experimentado por las muestras analizadas por esos autores, o por tan solo el tiempo de estacionamiento, si no han sido bien estabilizadas, sean los causantes de la hidrólisis de los heterósidos con liberación de las hidroximetil-antraquinonas.

Planteadas esa cuestión, la comprobamos experimentalmente con cortezas de *Rhamnus alaternus* de la siguiente manera:

1) Se efectúa una extracción con éter etílico de la corteza fresca inmediatamente de haberse separado del vegetal. Luego de filtrar, se agita este extractivo con solución de amoníaco al 10 %, obteniéndose una coloración rosada bien manifiesta en la capa acuosa amoniaca, lo que nos revela la presencia de hidroximetil-antraquinonas libres.

2) La corteza separada del vegetal, se estabiliza inmediatamente por calentamiento a la estufa a 100° durante 30 minutos. Sobre la misma realizamos luego la extracción etérea, como en el caso anterior, agitando luego el extractivo filtrado con solución de amoníaco al 10%. La coloración rosada en la capa acuosa amoniaca, es también notable.

En conclusión: en la corteza de *Rhamnus alaternus* existen compuestos hidroximetil-antraquinónicos libres.

6.- VINCULACION DE LA ESTRUCTURA QUIMICA CON LA ACTIVIDAD FARMACODINAMICA DE LA DROGA.-

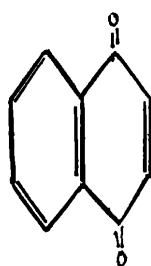
Estudiando las drogas de antraheterósidos, Tschirch ha llegado a la conclusión de que la actividad de las mismas está condicionada a la presencia de hidroximetil-antraquinonas, ya sea al estado de libertad, o en forma de combinación hidrolizable en el medio alcalino intestinal. Con tal motivo considera al núcleo quinónico, como a un grupo "ecoproticóforo", cuya concentración define la actividad de la droga, la cual puede apreciarse en base al color rojo que dicho núcleo adquiere en solución alcalina.

Si bien hoy sabemos que estos compuestos antraquinónicos no son los responsables absolutos del efecto fisiológico de la droga, pueda decirse que ellos desempeñan en la misma, el papel fundamental.

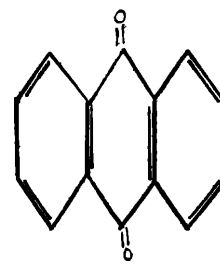
Se ha comprobado que la función quinónica siempre confiere actividad purgante:



benzoquinona



naftoquinona



antraquinona

Pero tienen un serio inconveniente para ser utilizadas como tales: son venenos protoplasmáticos violentos, que atacan las células, glóbulos rojos, mucosas, etc.

Se ha pensado entonces en la modificación de su estructura, introduciendo hidroxilos fenólicos y grupos alquilo. Cuando se introducen hidroxilos fenólicos en las posiciones 1-6-8 de la antraquinona, y un grupo metilo en posición 3, se obtiene el compuesto de acción más favorable, que como vemos, se trata de la emodina, indicada en el capítulo anterior, y que constituye un aglucón de fundamental importancia, dentro de los antraheterósidos de las drogas vegetales, especialmente del tipo de los Rhamnus.

Si el número de hidroxilos aumenta, se obtiene un efecto desfavorable.

Si en la molécula de antraquinona se introducen hidroxilos fenólicos sólo en las posiciones 1 y 8, y un radical metilo en 3, llegamos a otro compuesto interesante: el ácido crisofánico, también existente en las drogas señaladas.

En estos compuestos dihidroxilados, juega un papel importante el factor isomería, pues la posición 1 - 2 confiere al compuesto sobre todo propiedades tinctoriales, como ocurre con la alizarina (1 - 2 dihidroxi-antraquinona), materia colorante roja, extraída de la raíz de *Rubia tinctorum*.

Queda así demostrada la actividad purgante de los compuestos quinónicos, y la estrecha relación

existente entre la estructura química y las propiedades del compuesto.

Las hidroximetil-antraquinonas parecen ejercer una acción fisiológica más marcada, cuando se encuentran al estado de reducción. En el ruibarbo por lo menos, Wasicky (21) ha demostrado que los rizomas recogidos en invierno, que sólo poseen derivados antraquinónicos reducidos, tienen un efecto purgante mucho más enérgico que los rizomas de verano, cuyas antraquinonas se encuentran oxidadas.

El tanino también influye de acuerdo a la concentración en que se encuentre. En pequeña cantidad puede considerarse ventajoso, pues disminuye la absorción de los derivados antracénicos y facilita su penetración hasta las partes más distantes del intestino grueso; concentraciones grandes pueden en cambio llegar a anular el efecto purgante.

Vemos pues que intervienen distintos factores en la actividad de la droga; si a esto sumamos el hecho de haberse aislado por lo menos un antraheterósido prácticamente inerte (22) se justifica como lo demuestra Morrison (23) que el color de la reacción de Bornträger, clásica de las hidroximetil-antraquinonas, no siempre corre paralela con la actividad terapéutica.

La experimentación biológica confirma que ninguna fracción es responsable por sí sola del efecto total, sino que el mismo es la resultante de la acción combinada de una serie de sustancias de efecto sinérgico (24).

Con respecto a las características terapéuticas de las cortezas de Rhamnus, nos referiremos sólo a la especie oficial Rhamnus Purshiana. (11) y (25).

Utilizada en forma empírica desde antiguo por los indígenas de California y la costa del Pacífico, se caracteriza por su acción suave, la que se ejerce sobre el intestino grueso, estimulando los movimientos peristálticos del mismo.

Antes de actuar, debe atravesar por consiguiente el intestino delgado, en cuyo medio alcalino se hidrolizan los antraheterósidos a expensas de los jugos digestivos, lo que explica su acción retardada. El funcionamiento y tiempo de evacuación del estómago no se modifica, del mismo modo que tampoco se modifica la actividad motora del intestino delgado.

La omodina es parcialmente absorbida y eliminada por la orina, a la que colorea de amarillo cuando la misma es ácida, y con una coloración roja cuando ella es alcalina. Durante la lactancia, puede eliminarse también en la leche en cantidad relativamente elevada.

La cáscara sagrada se utiliza preferentemente para corregir la constipación habitual, donde no solamente actúa como un laxante, sino que restablece el tono natural del cólon.

En ciertos casos, el empleo prolongado de preparaciones de cáscara sagrada ha llevado a una pigmentación melanótica de la mucosa rectal.

7.- LOCALIZACION MICROQUIMICA DE LAS HIDROXIMETIL-ANTRAQUINONAS

Sobre los cortes histológicos de la droga hemos efectuado la localización microquímica de los compuestos hidroximetil-antraquinónicos. Aprovechamos para ello la reacción coloreada en rojo que dichos compuestos producen en presencia de los álcalis, especialmente el amoníaco y los hidróxidos alcalinos.

Hemos realizado ensayos comparativos utilizando amoníaco concentrado, dilución de amoníaco al 10 %, solución de hidróxido de sodio al 10 %, solución saturada de carbonato de sodio e hidróxido de sodio al 40 %. Los mejores resultados los hemos obtenido empleando el reactivo citado en último término. Los cortes histológicos previamente humedecidos con agua destilada durante 1 - 2 minutos, son llevados a un porta objeto, donde se tratan posteriormente con una gota de solución de Na.OH al 40 %. La coloración aparece en forma prácticamente instantánea, y se mantiene sin modificación apreciable durante un tiempo prolongado.

La localización histológica muestra que los compuestos hidroximetil-antraquinónicos se reparten sobre todo en el parénquima cortical, el líber y los radios medulares de la corteza. En la hoja se encuentran preferentemente en el líber de la nervadura central, y en menor proporción en el leño de la misma.

8. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL ANALISIS.

Hemos utilizado muestras obtenidas del Jardín Botánico de la Facultad de Agronomía, y del Zoológico de la ciudad de La Plata.

La corteza fué separada cuidadosamente del leño y colocada en la estufa a 100° durante 30 minutos. La finalidad principal de esta operación es estabilizar la droga por destrucción de las enzimas, evitando así el desdoblamiento posterior de los antraheterósidos. Debemos consignar que por circunstancias especiales, la corteza fué separada y estabilizada luego de varios días de haberse separado las ramas del vegetal. La corteza, ya estabilizada y seca, es fácilmente desmenuzable a la presión, quedando en condiciones de ser molida sin dificultad en un molinillo corriente de granos. Las porciones más gruesas son nuevamente pasadas por el molinillo hasta obtener un polvo homogéneo, que cumpla con las exigencias de los polvos finos de la Farmacopea Argentina, 3ra. edición, lo que se verifica cuando todas sus partículas pasan a través del tamiz n° 30 y no más del 40 % a través del tamiz n° 40. Se lo envasa finalmente en frascos de buen cierre, mantenidos al abrigo de la humedad.

Las hojas de *Rharrnus alaternus* fueron estabilizadas el mismo día de la recolección, sumergiéndolas en agua hirviendo por espacio de 2 minutos y una vez secas por abandono espontáneo sobre papel de filtro, se completó esa operación calentándolas a la estufa a 60° - 70°. Estas hojas fueron luego molidas como en el caso anterior, y el polvo envasado en frascos de buen cierre, a los efectos de preservarlo de la humedad.

9. Investigación cualitativa de antraheterósidos en una droga.

El sen, ruibarbo, cáscara sagrada, y en general todas las drogas que poseen antraheterósidos, ofrecen reacciones de coloración características que permiten individualizar tales compuestos. La parte agluconica de los mismos, constituida por hidroximetil-antraquinonas, es la responsable de esas reacciones de coloración, como así también de que dichas drogas se conozcan corrientemente con el nombre de drogas de antraheterósidos.

Todas esas reacciones se efectúan con una técnica semejante, basada en el siguiente hecho: al agitar con amoníaco la solución etérea, benzólica o piridinica de compuestos hidroximetil-antraquinónicos, la capa acuosa amoniaca adquiere una coloración que va del rosado al rojo cereza en relación con la concentración existente de tales compuestos. En forma mucho más excepcional, el agregado de amoníaco se efectúa sobre la extracción acuosa directa de la droga, o bien se hacen toques con dicho reactivo sobre las masas obtenidas por sublimación.

Veremos los siguientes ensayos encuadrados dentro de ese criterio:

- 1.-) Reacción de Bornträger
- 2.-) Reacción de Lentage y otras
- 3.-) Ensayos de caracterización de la F. A. III edición
- 4.-) Técnica con microsublimación

Con la reacción de Bornträger, atribuida antes a Henry y Guibourt (1814), se puede llevar a cabo un doble examen: el de las hidroximetil-antraquinonas que existen al estado de libertad, y el de aquellas que se encuentran en forma de combinación hidrolizable, para lo cual procedemos así: a) La extracción directa de la droga con solvente orgánico, se filtra y se agita con dilución de amoníaco al 10 %. Una reacción positiva revela la presencia de aglucones hidroximetil-antraquinónicos libres, solubilizados en el solvente empleado en la extracción.

b) Se efectúa previamente el desdoblamiento por hidrólisis de los antraheterósidos, empleando un ácido ó un álcali diluido en caliente. En el primer caso, luego de la hidrólisis ácida, se extrae con éter, benzol, etc., agregando posteriormente el amoníaco. Si se ha empleado en cambio solución alcohólica ó acuosa de hidróxido de potasio, es necesario llevar el medio a reacción ácida antes de comenzar a extraer con el solvente elegido.

Trabajando sobre droga hidrolizada, la reacción es mucho más notable; lo que ya nos lleva cualitativamente al conocimiento de que la mayor parte de las hidroximetil-antraquinonas se halla al estado de combinación.

La reacción primitiva de Bornträger (26) permite revelar en forma global la presencia de estos compuestos, así refiriéndose a hojas de sen, el autor aconseja practicarla sobre 0,5 gr. de droga pulverizada, la cual se hierve con 10 ml. de solución alcohólica de hidróxido de pota-

sio al 10 % durante 2 minutos. Después de diluir con 10 ml. de agua y filtrar, se acidifica el filtrado con ácido clorhídrico, extrayendo luego con éter. El decantado etéreo se agita posteriormente con solución de amoníaco Tschirch y Pedersen han estudiado la especificidad de esta reacción, recurriendo al examen espectroscópico. Llegan en base a él, a la conclusión de que es propia de los compuestos antracénicos existentes en las drogas vegetales (27).

La reacción de Borntráger ha sido modificada por Lestage, utilizando piridina como solvente de extracción, obteniéndose iguales resultados con el empleo de cantidad menor de droga e inferiores volúmenes de reactivos (28). Se agitan 0,02 a 0,03 grs. del material sospechoso con 1 - 2 ml. de piridina, separándose luego por decantación el líquido extractivo claro, que posteriormente se trata con 3 - 4 gotas de solución de amoníaco. Si la reacción es positiva aparece una intensa coloración roja, diluyéndose luego con agua destilada.

Para la investigación de las hidroximetil-antraquinonas existentes al estado de combinación heterosídica debe procederse primero a la hidrólisis de la droga.

La reacción aquí practicada fué publicada por Lestage en 1922, y constituye junto con la de Borntráger antes indicada, una de las reacciones clásicas para la búsqueda de antraheterosídeos en una droga.

El profesor vienés Richard Wasicky, trabajando en los laboratorios de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Pablo, ha efectuado un estudio crítico de la reacción de Bornträger (21). En base a él queda perfectamente determinado que si existen hidroximetil-antraquinonas reducidas en la droga, ellas darán con el amoníaco una coloración amarilla, que poco a poco va pasando a un rosado débil, para adquirir a las 24 horas una intensidad máxima cuando la oxidación ha finalizado.

Agregando 1 - 2 gotas de agua oxigenada al 10 % se acelera la oxidación. Si no existen compuestos de reducción aparece rápido el tinte rosa o rojo cereza. Existiendo una mezcla de ambas, aparece en el momento inicial una coloración mixta.

Wasicky practica su reacción en esta forma: 0,5 grs. de material se hierven con 15 ml. de alcohol al 25 (en volumen); filtrar en caliente no importando posible turbidez; 10 ml. de filtrado se acidifican con 4 ml. de solución de ácido sulfúrico al 10 %; mantener el líquido a ebullición 15 minutos. Después de enfriar se completa si es preciso a 12 ml. con agua y se agita con 16 ml. de benzol; 5 ml. de benzol se agitan con 5 ml. de dilución de amoníaco al 10 %.

Una técnica semejante a ésta, es la que realiza J. B. Fairbairn (29) aplicable tanto a drogas como a preparaciones farmacéuticas. Es esencial una ajustada separación de las dos capas líquidas, prefiriendo este autor dentro

de los solventes orgánicos el benzol y el tetracloruro de carbono.

La Farmacopea Argentina, tercera edición (30), al referirse a cáscara sagrada indica los siguientes ensayos de identidad:

a) Añádase 0,1 gr. de cáscara sagrada pulverizada a 10 ml. de agua caliente; agítense la mezcla a intervalos hasta enfriar; filtrese; dilúyase el filtrado con el agua necesaria para obtener 10 ml. agregando luego 10 ml. de solución amoniacal (aproximadamente al 10 % P/V de gas amoníaco); la mezcla toma color amarillo anaranjado. Hemos podido observar que un suave tinte rosado aparece con el tiempo, indudablemente por oxidación de los compuestos antraquinónicos reducidos, tal como indica Wasicky.

b) Macérese 0,1 gr. de cáscara sagrada pulverizada con 10 gotas de alcohol; añádanse 10 ml. de agua, hiérvase la mezcla, enfríese y filtrese; agitar el filtrado con 10 ml. de éter y separar la capa etérea amarilla; agítense 3 ml. de esta solución etérea con 3 ml. de solución reactivo de amoníaco, y dilúyase la solución amoniacal separada con 20 ml. de agua: la mezcla permanece coloreada de rojo amarillento bien manifiesto.

Estos ensayos de la Farmacopea Argentina, son también indicados por la Farmacopea de los Estados Unidos de América (31), en la que se cita además una prueba directa de la droga con amoníaco, que ha de dar color rojo en caso positivo.

Hemos comprobado experimentalmente trabajando con corteza estabilizada de *Rhamnus alaternus*, que la reacción de Bornträger produce una coloración de máxima intensidad dentro de la hora de efectuada. Dicha comparación experimental la efectuamos así: se extrae la droga directamente con éter, y con el extractivo así obtenido se efectúan estos 2 ensayos:

Tubo n° 1: Se agitan 3 ml. del mismo con igual volumen de solución de amoníaco al 10 %, agregando luego dos gotas de agua destilada.

Tubo n° 2: se repite el ensayo en la misma forma que en el caso anterior, pero sin el agregado de las 2 gotas de agua destilada, en cuyo reemplazo se agregan 2 gotas de agua oxigenada 10 volúmenes. En esa forma si existen compuestos antraquinónicos reducidos, ellos se oxidarán más rápidamente, tal como indica Wasicky (21).

En el tubo n° 2 puede observarse que la coloración obtenida en la capa acuosa amoniaca es mucho más intensa que en su paralela del tubo n° 1, y que se mantiene prácticamente constante desde los primeros minutos de efectuada la reacción, mientras que en el tubo n° 1, la coloración rosada que como decimos es en el comienzo menos notable, alcanza a adquirir dentro de una hora, su intensidad máxima, semejante a la del tubo n° 2.

Mediante técnicas con microsublimación, puede también revelarse si una droga posee o no compuestos hidroximetil-antraquinónicos; si estos no se encuentran

al estado de libertad, deberán ser previamente liberados de su combinación heterosídica hidrolisable, como lo hace L. Koffler (32) quien indica humedecer en un porta-objeto una pequeña cantidad de muestra con ácido clorhídrico concentrado, colocar el cubre, y calentar con micromechero. Luego se levanta parcialmente el cubre a un lado y se aplica en forma rápida una pequeña cantidad de solución de acetato de etilo y tetracloroetano en volúmenes iguales; nuevamente se aplica el calor. Luego de 5 - 10 minutos pueden observarse cristales bien formados, que se disuelven en hidróxido de potasio con un color rojo cereza. En el caso de la cáscara sagrada el producto de sublimación se presenta en forma de masas redondeadas, amarillentas, que se solubilizan en la forma indicada.

La aplicación de los citados ensayos al *Rhamnus alaternus*, objeto de nuestro estudio, conduce a las siguientes conclusiones:

a) Trabajando con corteza estabilizada (no inmediatamente después de cortada la rama), la reacción de Bornträger revela en forma neta la presencia de hidroximetil-antraquinonas, tanto al estado de libertad como en forma de combinación hidrolisable. No puede pensarse que la existencia de hidroximetil-antraquinonas libres sea una consecuencia de la acción enzimática producida durante el transcurso del tiempo entre el momento de corte de las ramas del vegetal y el de separación de la corteza de esas ramas, pues en el

capítulo 5 de este trabajo ya hemos citado nuestra experiencia sobre corteza fresca recién quitada del vegetal, y corteza estabilizada inmediatamente después de su separación del mismo, lo que nos llevó a concluir que en la corteza de *Rhamnus alaternus* existen originariamente hidroximetil-antraquinonas libres.

b) Una coloración más intensa luego del desdoblamiento hidrolítico, indica ya cualitativamente un predominio de la forma combinada.

c) La hidrólisis alcalina, origina un producto de difícil filtrado, con retención más o menos grande de antraquinonas por el insoluble, debiendo además acidificarse el líquido de filtración. La hidrólisis directa con un ácido mineral diluido, más sencillo, no tiene tales inconvenientes.

d) Una parte de las hidroximetil-antraquinonas se encuentra en forma de compuestos de reducción ~~en~~ como lo revela nuestra experiencia citada anteriormente, realizada siguiendo a Wasieky.

Los ensayos practicados sobre hoja estabilizada permitieron establecer que en ella no existen hidroximetil-antraquinonas libres, sino que las mismas se encuentran totalmente en forma de combinación hidrolizable.

Hemos comprobado también experimentalmente que si a las hojas de *Rhamnus alaternus*, se las abandona espontáneamente a la temperatura del laboratorio durante un

cierto tiempo (varios meses en este caso), ellas conducen a una reacción de Bornträgger positiva cuando se investigan las hidroximetil-antraquinonas libres. Roto el equilibrio físico-químico celular con el envejecimiento de la droga, comienza pues el desdoblamiento de los antraheterósidos por acción enzimática.

10. Metodología del análisis cuantitativo de drogas de antrahetero-
róidos.-

Dada la estrecha vinculación existente entre el contenido de antraheteróidos de droga y su actividad fisiológica, es de mucha importancia la determinación cuantitativa de los mismos. Debemos tener en cuenta que en los distintos procedimientos utilizados con ese fin, lo que en realidad se investiga y valora es la parte no glucídica, que representada por compuestos hidroximetil-antraquinónicos, constituye los aglucones de dichos antraheteróidos. Numerosos son los métodos propuestos para esta valoración, pero nosotros sólo indicaremos a continuación en forma clasificada los principales:

- | | | |
|-----------------|------------------------------|---------------------------|
| Gravimétricos: | con hidrólisis
alcalina.- | (Tschirch y Edner |
| | | (Geo. E. E'we y Chas E. |
| | | (Vandérkleed |
| | | (Tunmann |
| | con hidrólisis
ácida.- | (Daels |
| | | (Tunmann |
| | | (Anónimo |
| | | (J. A. Gunton y Geo.D. |
| | | (Beal. |
| | | (H.C. Fuller |
| | (M. C. Tuminkatti y G. | |
| | (D. Beal | |
| | (Edgard O. Eaton | |
| Colorimétricos: | | (Tschirch-Christofaletti |
| | | (Warin |
| | | (Maurin |
| | | (Fuller |
| Biológicos | | |

Las operaciones sucesivas que generalmente se siguen en los métodos gravimétricos son las siguientes:

1^a) Agotamiento de la droga con un solvente orgánico.

2^a) Separación de las hidroximetil-antraquinonas de este extractivo mediante el empleo de una solución acuosa alcalina.

3^a) Purificación de dicha solución (eliminación de ácidos grasos, esteroides etc.) por lavados con el mismo solvente orgánico puro.

4^a) Acidificación de la solución alcalina por un ácido mineral.

5^a) Extracción de los compuestos antraquinónicos contenidos utilizando el mismo solvente.

6^a) Lavados del extractivo con agua ácida o simplemente agua destilada.

7^a) Evaporación del extractivo.

8^a) Secado y pesado del residuo obtenido, correspondiente a las hidroximetil-antraquinonas libres.

Si luego de la primera operación indicada, la droga residual se somete a un proceso de hidrólisis y los reactivos empleados en esta hidrólisis y la propia droga remanente de ella se agotan con el mismo solvente orgánico y se vuelve a aplicar sobre este extractivo una técnica semejante, (2^a y sucesivos), el residuo al final pesado nos permite conocer el contenido de hidroximetil-antraquinonas existentes al estado de combinación heterosídica.

El primer método que consideraremos es el único que en forma más o menos amplia se aparta del diseño general que hemos indicado.

Así Tschirch y Bärner (33), teniendo en cuenta el carácter fenólico de estas sustancias, sugieren la posibilidad de aplicar el método de Bader, de precipitación de fenoles como compuestos hidroximato; utilizan como reactivo precipitante p. diazonitroanilina.

La determinación se efectúa trabajando sobre 0,5 a 1 gr. de droga, a la que agotan con sucesivas porciones de solución alcohólica de hidróxido de potasio en caliente. Luego de destilar el exceso alcohol, el residuo se diluye con agua destilada acidificándose después con ácido clorhídrico.

Aparece un precipitado que se separa por filtración, se lava con agua acidulada y se seca.

Este precipitado que lleva las hidroximetil-antraquinonas más o menos impurificadas, se agota con cloroformo junto con el papel de filtro en un extractor Soxhlet. Terminada esta operación se destila el cloroformo, y el residuo se disuelve en solución de carbonato de sodio al 5 %, diluyendo después con agua. A esta solución se le agrega el diazoreactivo, dejando caer luego ácido clorhídrico gota a gota hasta que la materia colorante se separe por completo.

Luego de algunas horas se filtra a través de papel tarado bien seco, se lava el precipitado hasta que no haya reacción de ácido clorhídrico, se seca a 70° y se pesa.

Los autores refieren el resultado en ácido crisofánico, de acuerdo con esta reacción:



Pesada $\approx 0,5682$ \approx equivalente en ácido crisofánico.

Se ha comprobado posteriormente (34) que este método es poco apropiado; los resultados fueron algo bajos en el caso del ruibarbo, siendo altos en el caso del *Rhamnus Frángula* y muy altos en el *Furshiana*.

Geo. E. Ewe y Chas. E. Vanderkleed publican posteriormente como *Botas de Laboratorio* (35), un método destinado a mejorar las determinaciones de emodina en drogas: Se calienta la misma con reflujo en presencia de solución alcohólica de hidróxido de potasio al 2 %. Una vez frío se filtra el líquido sobre algodón y se repiten las extracciones alcalinas hasta agotar. Se concentran a baño maria los líquidos de extracción casi hasta sequedad, para diluir luego y pasar a una ampolla de decantación donde se acidifica posteriormente por agregado lento de ácido sulfúrico al 10 %.

Mediante sucesivas extracciones con éter, se separan de la solución acuosa ácida los compuestos antraquinónicos, procediéndose luego a la concentración de los líquidos etéreos hasta un pequeño volumen, el cual previo agregado de amoníaco concentrado se lleva casi a sequedad en un baño de vapor.

Se disuelve el residuo con agua y ácido sulfúrico al 10 % en

caliente, manteniendo una agitación casi constante. Una vez frío se filtra por filtro pequeño, el cual por otra parte se somete a un nuevo tratamiento con ácido sulfúrico al 5 %. Los líquidos ácidos reunidos se extraen finalmente con sucesivas porciones de éter hasta agotar, evaporando luego el solvente en un vaso tarado. Se seca a la estufa a una temperatura que no debe pasar de 60° durante 2 horas y luego se lleva a un secador hasta peso constante.

Este método, uno de los que requiere mayor número de operaciones, no lo hemos visto citado en la bibliografía consultada posteriormente.

Terminaremos la reseña de los métodos que emplean la hidrólisis alcalina, refiriéndonos al método de Tumann, indicado por Hager en su Tratado de Farmacia Práctica (36).

La droga se hierve con solución de hidróxido de sodio al 4 %, tratamiento que luego se repite sobre el residuo de decantación, a fin de agotarla. Llama la atención, la diferencia notable existente entre los tiempos de agotamiento de este método de Tumann y el anterior de Geo. E. Ewe y Chas E. Vanderkleed.

El extractivo alcalino se acidifica con ácido clorhídrico, agitándose luego intensamente con cloroformo la solución obtenida; luego de 2 horas de reposo se filtra la mayor parte del cloroformo sobre filtro de pliegues. Una parte alícuota del cloroformo filtrado se extrae nuevamente con solución de hidróxido de sodio al 4 %, procediéndose luego al filtrado del

líquido alcalino rojo.

Un volumen conocido del mismo se acidifica con ácido clorhídrico diluido, y se deja en contacto durante la noche. El precipitado se recoge finalmente sobre filtro tarado, se lava con agua clorhídrica 1:100, se seca a 60° y se pesa.

Según S. H. Umanskú no es posible obtener datos correctos empleando el método de Tunmann (37). De acuerdo a sus experiencias, se obtienen resultados más aceptables si se finaliza dicho método con una determinación colorimétrica, comparando con solución testigo de emedina.

Comenzaremos a considerar ahora aquellos métodos que recurren al empleo de ácidos para producir el desdoblamiento hidrolítico. La mayoría de los investigadores se inclina por ellos, deduciéndose por otra parte de las experiencias de J. E. Fairbairn, que la hidrólisis ácida es la más conveniente, tanto en la búsqueda cualitativa como en la valoración cuantitativa de antraheterósidos. (38).

En el método de Daels (39), clásico podíamos decir, se investigan tanto las hidroximetil-antraquinonas existentes al estado de libertad, como aquellas, que se encuentran en forma de combinación hidrálizable. La investigación de las primeras se efectúa sobre el extractivo cloroformico directo de la droga, mientras que las segundas, luego de la hidrólisis de los antraheterósidos con ácido sulfúrico en presencia de cloroformo; en esta forma las hidroximetil-antraquinonas van siendo disueltas a medida que se liberan, sustrayéndose a la acción del ácido, que de lo contrario

las destruiría parcialmente.

L i b r e g: el líquido clorofórmico se agota por sucesivas extracciones con solución acuosa de hidróxido de sodio al 5 %; una vez lavado este extractivo con cloroformo, se acidifica la solución alcalina con ácido clorhídrico, y se extrae con cloroformo; luego se filtra y se destila a sequedad en un vaso tarado.

C o m b i n a c i o n e s: la droga residual resultante del primer agotamiento clorofórmico, se hidroliza con solución de ácido sulfúrico al 25 % en presencia de cloroformo, por espacio de dos horas y media. Sobre una parte alícuota de la solución clorofórmica filtrada se continúa la determinación.

Este extractivo lleva solubilizadas varias impurezas que se eliminan por agitación con solución acuosa de bisulfito de sodio al 10 % y filtrado posterior. Luego de hacer un nuevo lavado con solución de ácido clorhídrico al 1 % y filtrar, se procede a la destilación de 100 ml. de líquido clorofórmico en un baloncito tarado.

Los últimos mililitros son eliminados con la ayuda de una corriente de aire a 60° - 70° para prevenir decoloración G. D. Deal y H. G. T. Kattz (40) experimentando el método de Daels, comprueban que las extracciones con hidróxido de sodio son lentas, dependiendo la velocidad de agotamiento, del tiempo y energía de la agitación; las emulsiones son de poca estabilidad. Los extractivos de hidróxido de sodio abandonados toda la noche separan un precipitado gelatinoso incoloro, que a veces oculta algo de la sal alcalina rosada de las hidroximetil-antraquinonas.

Con una técnica similar a la de su anterior método con hidrólisis alcalina, O. Tunnann (41) modifica el método de Daels, a fin de adaptarlo a la determinación de los antraquinónicos totales del *Rhamnus Carniólica*.

En el *J. Pharm. de Bélgica* (42) se publica posteriormente un método anónimo muy semejante al de Daels, diferenciándose de él, sólo en que filtra a través de Kieselgur, luego del tratamiento con solución acuosa de bisulfito de sodio al 10 %.

En forma también parecida, J. A. Gunton y Geo de Beal (43) realizan en 1922 determinaciones cuantitativas sobre *Rhamnus Frángula*, ruibarbo y cáscara sagrada, comparando los porcentajes de hidroximetil-antraquinonas libres, combinadas, y totales.

Henry C. Fuller, del Institute of Industrial Research, Washington (44), indica el siguiente método destinado a drogas antraquinónicas y sus extractos fluidos. La droga en presencia de cloroformo se calienta por espacio de 15 minutos con reflujo. Una vez frío se decanta el líquido extractivo, continuando las agitaciones de la droga residual con sucesivas porciones de cloroformo hasta agotarla. Las hidroximetil-antraquinonas contenidas en este extractivo cloroformico son separadas del mismo mediante repetidas extracciones con solución acuosa de hidróxido de sodio al 10 %. Se reúnen las soluciones alcalinas, y luego de un lavado con éter etílico, se acidifican con ácido clorhídrico. Los compuestos antraquinónicos son extraídos de esta solución acuosa

ácida mediante nuevos tratamientos con cloroformo; una vez lavados los líquidos clorofórmicos con agua, se filtran y evaporan en una cápsula tarada.

Para investigar las hidroximetil-antraquinonas combinadas, la droga residual de la primera extracción se somete a un proceso de hidrólisis, siguiéndose una técnica semejante a la de Daels; se completa únicamente con un último lavado de la solución clorofórmica con agua, antes de filtrar y evaporar.

Posteriormente Fuller modificó su método, recurriendo a la hidrólisis directa de la droga, con el fin de determinar en forma global los compuestos antraquinónicos (45). Colaboradores de Fuller sugieren que la cantidad grande de cloroformo requerida por el método, es un inconveniente del mismo, siendo de desear una reducción en su empleo. Los resultados analíticos obtenidos parecen ser muy satisfactorios.

Si bien el método de Daels es adoptado como un procedimiento general, Mapparna G. Tuminkatti y G. D. Beal (46) estudian sus causas de error encontrando 3 tipos de sustancias contaminantes:

- 1^a) Un residuo con ácidos grasos y ésteres de fitosterol
- 2^a) Una sustancia oscura insoluble en agua y cloroformo, probablemente formada de antraquinonas.
- 3^a) Una sustancia amarilla, soluble en agua, la cual es extraída de dicho solvente por éter o cloroformo.

Estos investigadores consiguen la eliminación de dichas impurezas recurriendo al empleo de carbón decolorante Norit, el cual adsorbe las sustancias grasas.

En la determinación de las hidroximetil-antraquinonas libres, proceden en forma semejante a Daels, pero consideran al residuo pesado como un compuesto impuro. Este residuo es luego disuelto en cloroformo y agitado con un gramo de Norit; una vez filtrado, se lava el filtro, destilándose posteriormente la solución cloroformica en el mismo vaso tarado; se seca a 70° una hora y se pesa. Se resta el peso de las impurezas así obtenidas, del residuo impuro anterior, tomándose la diferencia como el peso de las antraquinonas libres puras.

En la determinación de las hidroximetil-antraquinonas combinadas, los autores se apartan bastante del método de Daels, llegando finalmente a un residuo impuro, el cual mediante un tratamiento con Norit semejante al citado, permite conocer el peso verdadero de los compuestos antraquinónicos.

En el método de Kröber (47), citado por Hager en su Tratado de Farmacia Práctica, se incurre en el error de hidrolizar la droga en ausencia de solvente orgánico. La destrucción parcial del heterósido en esas condiciones hace inaplicable este procedimiento.

Y para finalizar con los métodos gravimétricos, indicaremos aquél que será empleado en la determinación de los antraheterósidos del *Rhamnus alaternus*.

Es el método de Edgard O. Eaton, que perfeccionado por el mismo autor en trabajos posteriores, tiende a ser estandarizado en *Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*, de 1940. (48). Las hidroximetil-antraquinonas libres que se hallan en forma de sales, se liberan de ese estado, gracias a una acidez marcadamente débil, tal que no inicie la hidrólisis de los antraheterósidos. Se procede posteriormente a extraer con cloroformo estos aglucones o geninas libres, empleando en esta operación un mínimo de calor. Para la determinación de las existentes como antraheterósidos, se recurre a la acción hidrolítica de un ácido mineral en caliente, quien actúa además sobre ciertos cuerpos resinosos de origen antraquinónico. Se utiliza por otra parte un aparato de extracción continua, de modo que los vapores de solvente orgánico producidos por calentamiento, una vez condensados en el refrigerante, caen gota a gota sobre el material dispuesto en el extractor propiamente dicho. Alcanzado cierto nivel, el líquido extractivo sifona al Frlonmeyer que lleva el solvente, cerrándose así el circuito (ver *Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*, 29: 594 (1940

En el método primitivo de Eaton, preconizado para extractos fluidos (49), se utiliza solución normal de hidróxido de sodio saturada de sal, a los efectos de agotar el extractivo cloroformico de la droga.

El mismo autor años más tarde comprueba que la solución saturada de carbonato de sodio sustituye

con ventaja al hidróxido de sodio; por otra parte, lavados previos de la solución clorofórmica de hidroximetil-antraquinonasa con solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5 %, tienen la propiedad de eliminar vestigios de ácido glicirrícico.

En base a estas consideraciones Eaton publica en 1955 su método reajustado (59), que en síntesis es el siguiente: se extrae la droga con cloroformo en un medio débilmente acético y evitando la elevación de temperatura, hasta que el solvente pase totalmente incoloro ó bien con ligera coloración amarilla correspondiente a una sustancia no antraquinónica.

Este extractivo clorofórmico que lleva los compuestos antraquinónicos libres, es desechado por el autor, teniendo en cuenta que los mismos son fisiológicamente menos activos, que aquellos que se encuentran en forma de combinación heterosídica. La droga residual se hidroliza con solución de ácido sulfúrico 1:1 en presencia de cloroformo, operación que se efectúa en el mismo extractor continuo, hasta lograr un agotamiento completo. El líquido clorofórmico obtenido se pasa a una ampolla de decantación, donde se lava con solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5 %, con el fin de eliminar vestigios de ácido glicirrícico. Los compuestos hidroximetil-antraquinónicos se separan luego mediante sucesivas extracciones con solución saturada de carbonato de sodio, las cuales una vez reunidas, se lavan con el mismo solvente orgánico puro a fin de eliminar impurezas lipídicas.

La solución alcalina se acidifica cuidadosamente con ácido clorhídrico, procediéndose luego a extraer nuevamente con cloroformo hasta agotar; el extractivo cloroformico luego de un lavado con agua destilada, se filtra sobre filtro previamente humedecido con cloroformo, y se evapora en un crisol tarado manteniéndolo luego a la estufa a 100° dos horas.

Haremos referencia ahora a los métodos colorimétricos, considerados por muchos autores como los más simples y prácticos, si bien necesitan un testigo preparado con emodina pura.

Al método de Tschirch - Christoffletti podemos considerarlo un método clásico, pues a pesar de adolecer de una seria causa de error, es la base de los distintos métodos gravimétricos y colorimétricos (51).

La droga se hidroliza directamente con solución de ácido sulfúrico al 5 %, para lo cual se calienta con reflujo durante 15 minutos; una vez frío y sin filtrar, se agota con sucesivas porciones de éter sulfúrico, hasta que éste, agitado con solución de hidróxido de potasio, no ceda a la misma ninguna coloración rosada.

El extractivo etéreo se agota por sucesivos tratamientos con solución de hidróxido de potasio al 5 %, llevándose luego a volumen la solución obtenida; una parte alícuota de la misma se compara colorimétricamente con la solución testigo, la que se ha preparado disolviendo un miligramo de Alco-emodina muy pura en 1.000 ml. de agua alcalinizada con hidróxido de potasio.

Como podemos observar, la droga se hidroliza directamente con solución de ácido sulfúrico, lo que lleva a una destrucción parcial de las hidroximetil-antraquinonas como consecuencia del calentamiento directo en dicho medio. Esta operación como se ha indicado anteriormente debe realizarse en presencia de solvente orgánico. Se ha comprobado por otra parte, que también el tiempo de hidrólisis es insuficiente. Aplicando el método de Tschirch-Christofolotti; Dacis ha encontrado en algunos casos solamente la mitad del contenido verdadero de astragalinas.

Un método original dentro de la colorimetría es el ideado por Marin (52) en 1905, teniendo en cuenta que los colores rosa y verde son complementarios; en base a ello, se trata de neutralizar la coloración roja de una solución alcalina de emodina por medio de otra solución verde tomada como tipo. Utiliza a este respecto una solución de cloruro de níquel, preparada a partir de níquel metálico puro, de modo que corresponde a 0,001 gr. de emodina pura disuelta en 100 ml. de agua ligeramente alcalina. Se toman dos tubos de igual diámetro y se disponen el uno delante del otro; en uno se coloca la solución de sal de níquel y en el otro la emodina. En esas condiciones un fondo blanco situado a la distancia, al ser visto a través de los tubos, aparece rosado. Se agrega poco a poco agua destilada a la solución de emodina, agitando cada vez para mezclar, hasta que se vea el fondo blanco. Si predomina el color verde se trabaja con una solución alcalina más concentrada.

En el método de Maurin (53), preferido por muchos autores la droga se hidroliza con solución de ácido sulfúrico en presencia de cloroformo; como álcali de agotamiento se emplea luego solución de hidróxido de potasio al 5 %, llevándose posteriormente los líquidos extractivos a volumen con agua destilada. Se compara finalmente al colorímetro con una solución tipo que tenga un centigramo de esodina en un litro de solución de hidróxido de potasio al 5 %.

Durante varios años H. O. Fuller, ha procurado llegar a un método colorimétrico que ofrezca las mismas garantías que una buena determinación gravimétrica. Los resultados irregulares obtenidos en un cordozo (54) se deberían sobre todo al calentamiento en presencia de ácido sulfúrico, como así también a un agotamiento incompleto de las hidroximetil-antraquinonas por el cloroformo y quizá por el álcali.

Experiencias posteriores han permitido llegar a conclusiones más satisfactorias (55) siguiendo una técnica que en la primera parte es igual a la gravimétrica del mismo autor, a la que nos hemos referido anteriormente, ya que sigue según dicho método hasta el punto donde las antraquinonas son extraídas del cloroformo por medio de solución de hidróxido de sodio al 10 %. De aquí se sigue de la siguiente manera: los líquidos alcalinos se llevan a volumen, efectuándose con esa solución la colorimetría en tubos de Hessler; la solución testigo se prepara a partir de producto obtenido ensayando gravimétricamente la droga. Sin embargo en ciertos casos tal método sólo ha dado una idea aproximada, pero no una seguridad completa (56).

Se ha recurrido también a los métodos biológicos para conocer la actividad catártica de las drogas de antraheterósidos; podemos decir al respecto, que si bien las tentativas realizadas son muchas, ninguna de ellas ha sido impresa en la práctica corriente. Para estas investigaciones se han utilizado ratas blancas, perros, gatos, e incluso la experiencia humana, refiriéndose los resultados a la mínima cantidad de droga que produce el efecto deseado.

Se han utilizado también los métodos biológicos para investigar cuales son los constituyentes activos de la droga. Así por ejemplo, trabajando sobre cáscara sagrada Melvin W. Green, C. G. King y George D. Seal, utilizan como preparación standard de referencia el extracto fluido de la U. S. P. Na. Edición cuya actividad fisiológica comparan con los extractivos de corteza de cáscara sagrada en distintos solventes (57) y (58). Si bien el método no es rigurosamente cuantitativo, es lo suficientemente exacto trabajando con cobayos, como para determinar la actividad de la droga y sus productos de extracción.

Y para finalizar este capítulo de metodología analítica, diremos que en los últimos años se han realizado también tentativas para aplicar el análisis cromatográfico a las drogas de antraheterósidos. Si bien todavía sin un carácter cuantitativo, se ha conseguido aislar e identificar de los extractos acuoso y alcohólico de *Rhamnus Frángula* a varios constituyentes activos por distintos procedimientos. El adsorbente utilizado en estas operaciones fué el óxido de magnesio, quedando ahora el problema de la selectividad del mismo, para una sola o un cierto número de sustancias. (59).

11 Elección del método analítico y su aplicación a la corteza y hoja de Rhamnus alaternus.

De los métodos gravimétricos, el que reúne a nuestro criterio, la mayoría de las ventajas de los distintos procedimientos descritos anteriormente, es el método de Edgard O. Eaton, en el cual las distintas operaciones realizadas aseguran teóricamente la pureza del residuo obtenido.

Dicha pureza puede controlarse por otra parte, lo que es una ventaja incuestionable de la gravimetría.

Los métodos colorimétricos, mucho más rápidos aunque tal vez no tan exactos, no hemos tenido oportunidad de experimentarlos como incluíamos en nuestro plan inicial de trabajo, debido a que no hemos podido conseguir en plaza emodina pura, a fin de preparar las soluciones testigo.

Adoptando entonces la técnica aconsejada en Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, del año 1940, para valoración de extractos fluidos (método de Eaton), hemos de aplicar dicho procedimiento a la corteza y hoja de Rhamnus alaternus.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de cloroformo requerida por este método, y el costo elevado del mismo en los momentos de iniciar el presente trabajo, hemos tenido la necesidad de sustituirlo por otro solvente más económico decidiéndonos por el éter de petróleo, que si bien no

es tan buen solvente como el cloroformo, puede sustituirlo si se recurre a un mayor tiempo de extracción. Hemos comprobado previamente que el éter de petróleo solubiliza a todos los compuestos hidroximetil-antraquinónicos extraíbles por el cloroformo. Efectivamente, el residuo resultante de la evaporación de un extractivo cloroformico de la droga, se disuelve en forma íntegra si se lo agita con sucesivas porciones de éter de petróleo. Para más seguridad, comprobamos que se llega así a una reacción de Bornträger negativa en la última extracción etérea de aquel residuo cloroformico.

Como control de las distintas extracciones realizadas en las muestras, hemos adoptado la reacción de Bornträger, la cual siendo negativa nos asegura que los agotamientos han sido completos, como así también que los distintos líquidos de lavado no se llevan principios hidroximetil-antraquinónicos.

A fin de asegurar la pureza del residuo pesado, hemos procedido al control microscópico del mismo, operación importante, pues pueden existir como impurezas pequeños cristales (cloruro de sodio?). Elegido ya el método y señalado el criterio a seguir durante su ejecución, la cuestión previa que debemos enfocar es el remplazo del extractor continuo de líquido con líquido utilizado en el procedimiento de Anton, por un extractor de sólido con líquido.

Es necesario tener en cuenta que el primer agotamiento de la droga se realizará en un medio muy débilmente ácido, debiendo evitarse toda elevación de temperatura, pues en caso contrario se corre el riesgo de iniciar el desdoblamiento hidrolítico de los antrahoterbenoides. Hemos ideado para la extracción el

dispositivo que indicamos más adelante (figura 1).

La droga colocada en el pequeño dedal de extracción va siendo extraída por el solvente que cae frío, gota a gota luego de haberse condensado en el refrigerante. Sobre la solución obtenida que lleva los aglucones o geninas al estado de libertad, se aplica posteriormente el método de Eaton.

En la operación de hidrólisis, destinada a liberar las hidroximetil-antraquinonas de su combinación heterosídica, hemos seguido el criterio de la mayoría de los investigadores, es decir tratar la droga residual de la extracción de las hidroximetil-antraquinonas libres, con ácido sulfúrico al 25 % en presencia del solvente orgánico, calentando a ebullición con reflujo durante dos horas y media. En esa forma ya estamos en condiciones de seguir aplicando la técnica elegida sobre la solución extractiva de éter de petróleo.

Antes de entrar a considerar el método en detalles, nos hemos de referir a una operación que merece ser destacada en forma preferente, y es la destinada a eliminar los vestigios de ácido glicirricico.

Con este fin la solución extractiva de la droga en éter de petróleo, se lava por agitación 3 veces con 10 ml. de solución de bicarbonato de sodio al 5 %, preparada en agua fría y a la que se agrega 1 ml. de ácido clorhídrico 0,1 N para asegurar la ausencia de carbonatos. La solución acuosa toma sin embargo, a medida que se agita, una coloración rosada, que se mantiene aún después de tratarla 3 veces con nuevas porciones de éter de petróleo a fin de extraerle los vestigios de antraquinonas que pueda contener. El solvente orgánico acusa en el último lavado una reacción de Bornträger negativa; a pesar de ello, si a la solución alcalina antes de desecharla como dice el método,

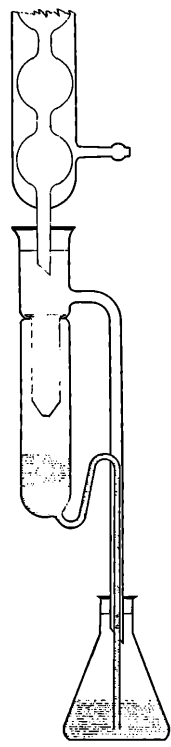


Figura 1

se la acidifica con ácido clorhídrico y extrae nuevamente, este extractivo conduce a una reacción francamente positiva. A la misma conclusión se llega trabajando con una solución de bicarbonato de sodio al 2 %, como indica H.C. Fuller.

Se nos presentan pues aquí dos posibilidades:

- a) la solución de bicarbonato de sodio se carbonata parcialmente, convirtiéndose en un reactivo de extracción.
- b) la solución de bicarbonato de sodio extrae como tal una parte de las hidroximetil-antraquinonas, que luego se desecan.

La primera de esas posibilidades se confirma prácticamente, pues la solución de bicarbonato de sodio luego del tercer lavado con éter de petróleo acusa fuerte reacción de carbonatos; esto se revela por agregado de unas gotas de fenolftaleína: el líquido se tinte en toda su extensión de un rosa intenso. En el transcurso de la operación se forma entonces carbonato de sodio que es precisamente el reactivo de separación empleado más adelante en el método.

La segunda de esas posibilidades no se cumple, pues asegurando la existencia del bicarbonato de sodio como tal, por medio de una corriente de anhídrido carbónico, dicho reactivo no extrae el compuesto a investigar. Experimentalmente hemos procedido así: antes de utilizar la solución de bicarbonato de sodio se le hace burbujear anhídrido carbónico de un aparato de Kipp por espacio de 30 minutos; en esa forma se asegura la ausencia de carbonatos, lo que se confirma haciendo la reacción sobre 2 - 3 ml. a los que se agrega solución de fenolftaleína: la solución no ha de colorearse.

Se lava entonces 3 veces el extractivo obtenido de la droga con 10 ml. de solución de bicarbonato de sodio al 5 %, cada vez, manteniendo el burbujeo de anhídrido carbónico. Siempre en la misma atmósfera gaseosa, se lavan 3 veces las soluciones alcalinas reunidas con 10 ml. de éter de petróleo, haciendo en el último lavado la reacción de Bornträger para verificar que no existen vestigios extraíbles de antraquinonas. Como comprobación final, se acidifica la solución de bicarbonato de sodio con ácido clorhídrico y se extrae nuevamente. El extractivo no acusa ahora ninguna reacción con la solución de amoníaco.

El resto de las operaciones analíticas no necesita ningún comentario especial, por lo que las observaciones correspondientes las haremos al hablar del método en general.

El procedimiento seguido trabajando sobre la corteza estabilizada ha sido el siguiente:

- 1) Se tara el pequeño dispositivo de extracción, cuya extremidad inferior se ha obturado con algodón.
- 2) Se vuelve a pesar con 2 gramos aproximadamente de droga, colocando finalmente en la parte superior una pequeña rodaja de papel de filtro.
- 3) Armamos luego el aparato, pero sin adaptar todavía el refrigerante; en esa forma se dejan caer sobre el dedal de extracción gota a gota desde una bureta 140 ml. de éter de petróleo, acidificados previamente con una gota de solución de ácido acético al 1 %. Esta operación conducida lentamente, permite obtener un líquido extractivo amarillo intenso, muy rico en el principio a investigar.

4) Conectamos luego el refrigerante y se prosigue la extracción en el extractor continuo. Esta operación debe seguirse atentamente pues hay momentos en que la droga tiende a levantarse, originando vías de preferencia, que luego dificultan el agotamiento. Este inconveniente se evita colocando perlas de vidrio en la parte superior y regulando además la llama en forma adecuada.

Luego de dos horas y media se suspende la operación, cuando ya el solvente pasa totalmente incoloro; la reacción de Bornträger practicada en este momento es negativa. Se lava cuidadosamente el aparato con éter de petróleo, reuniendo la solución total en una ampolla de decantación.

5) Se procede a eliminar los vestigios de ácido glicirrético mediante 3 lavados con 10 ml. de solución de bicarbonato de sodio al 5 %; la solución alcalina se lava luego 3 veces con 10 ml. de éter de petróleo, que luego se reúne a la solución principal; con un último lavado nos aseguramos que ya el solvente no extrae en absoluto compuestos antraquinónicos. Para comprobar que tampoco se pierden al estado de combinación, se acidifica el bicarbonato de sodio con ácido clorhídrico y se extrae posteriormente con éter de petróleo, realizando también aquí la reacción del amoníaco. Como ya hemos indicado antes, todas estas operaciones se realizan en atmósfera de anhídrido carbónico, para lo cual este gas, proveniente de un aparato de Kipp, se hace burbujear en la ampolla por espacio de algunos minutos.

Las emulsiones formadas se componen con relativa facilidad si se las deja reposar un momento; en caso contrario se agregan algunas gotas de alcohol etílico.

6) Los compuestos hidroximetil-antraquinónicos son extraídos de la solución de éter de petróleo, mediante una agitación enérgica y prolongada con solución saturada de carbonato de sodio. Son necesarias dos extracciones con 40 ml. de solución alcalina, agitando una hora por vez en agitador mecánico. Mediante una última extracción con 10 ml. de agua destilada se arrastran de la solución de solvente orgánico, los posibles vestigios de solución de carbonato de sodio que tendrían disueltos los componentes que nos interesan. Se comprueba que el agotamiento ha sido total efectuando la reacción de Bernträger sobre la solución de éter de petróleo.

7) Se eliminan las impurezas lipídicas de la solución alcalina mediante 5 extracciones de 10 ml. de éter de petróleo; finalmente se lavan éstos con 10 ml. de agua destilada que se refina a la solución de carbonato de sodio. Antes de desechar la solución de solvente orgánico se observa que no adquiere coloración por el agregado de solución de amoníaco.

8) Procedemos luego a acidificar con ácido clorhídrico gota a gota, los extractivos en carbonato de sodio, mientras se va agitando con cuidado para evitar proyecciones por efervescencia del líquido; el color rojo intenso de la solución alcalina se va atenuando en forma progresiva a medida que nos acercamos a la zona de neutralidad, para adquirir luego en medio ácido un color amarillo claro.

9) Las hidroximetil-antraquinonas liberadas en esta forma de su combinación salina, se vuelven a extraer con éter de petróleo. Se requieren para éste 3 tratamientos de 30 ml. cada uno, con una agitación enérgica de 45 minutos por vez.

10) Reunidas las soluciones de éter de petróleo, se las lava 3 veces con 10 ml. de agua destilada o mejor aún agua bidestilada. Esta operación de lavado es de suma importancia, pues la última extracción se ha realizado en un medio muy rico en sales, que pueden quedar en el éter disueltas en el agua, pues la solución salina lógicamente saturará al éter después de la agitación; si estas sales no son eliminadas por completo, anularán la determinación gravimétrica como lo decimos en (15).

11) Decantada la capa acuosa, se lava por agitación con 10 ml. de éter de petróleo, el que se reunirá luego a la solución principal. Antes de desechar la capa acuosa, se extrae otra vez con éter de petróleo, para verificar por agregado de amoníaco que no contiene vestigios del principio a investigar.

12) Sobre papel de filtro muy pequeño, previamente humedecido con éter de petróleo, se procede a filtrar la solución. El papel de filtro tiene la propiedad de retener por adsorción parte de los compuestos antraquinónicos, por lo cual después de la filtración debe lavarse con 20 - 30 ml. de solvente gota a gota hasta que el mismo no indique reacción al amoníaco.

13) Se procede luego a la evaporación del solvente gota a gota en forma muy cuidadosa y lenta. No es posible efectuar la operación en vidrio de reloj ni en cápsula, pues la gota se extiende rápidamente con el riesgo de alcanzar el borde y pasar a la cara exterior del dispositivo de evaporación. El empleo de corriente de aire da buen resultado, pero exige atención constante por la causa señalada, y requiere por otra

parte varias horas. La evaporación al vacío sin elevación de temperatura, es también poco aceptable. La forma más correcta y práctica de conducir esta operación, aunque lenta también, es emplear un vasito tarado de unos 10 centímetros de altura por 3 - 4 centímetros de diámetro, el cual va sumergido parcialmente ($\frac{3}{4}$ partes de su altura) en agua calentada a 70° - 80° .

De esta manera el solvente, que se deja caer gota a gota en forma espaciada desde una bureta, se evapora en forma casi instantánea, de modo que el ascenso por las paredes es insignificante; aún acelerando la evaporación dentro de ciertos límites, el solvente nunca sube más allá de la altura correspondiente al nivel del agua del baño exterior.

14) Se mantiene a la estufa a 100° por espacio de una hora, pasando luego a un secador con cloruro de calcio durante 30 minutos, pesándose finalmente. Hemos podido comprobar que la permanencia en la estufa a 100° una hora, es suficiente para obtener una pesada prácticamente constante, sin necesidad de emplear 2 horas como aconseja el método.

15) Observación microscópica del producto obtenido, que se presenta en forma de masas amarillentas, totalmente solubles en soluciones de amoníaco, hidróxido de sodio ó carbonato de sodio, tomando una coloración rojo intensa. Si los lavados efectuados con agua destilada en la operación (10) no son hechos en número suficiente, se pueden observar con el microscopio cristales, que suponemos sean de cloruro de sodio, resultante de la neutralización del carbonato de sodio con ácido

clorhídrico. El dato obtenido en esas condiciones no puede por consiguiente ser considerado verdadero.

16) Nos pareció curioso e interesante conocer el punto de fusión de este residuo; utilizando el aparato de Fisher, hemos comprobado que fué de $68^{\circ} - 70^{\circ}$, relativamente bajo, si se lo compara con el de la emodina y ácido crisofánico puros.

La droga agotada en el extractor continuo, se transfiere a un Erlenmeyer de 500 ml. donde se hidroliza calentando a ebullición durante dos horas y media con 50 ml. de ácido sulfúrico al 25 % en presencia de 200 ml. de éter de petróleo; es conveniente utilizar perlas de vidrio para facilitar la agitación, evitando además así la adherencia del polvo a las paredes.

Este tiempo de hidrólisis, adoptado en forma casi general en los distintos métodos que utilizan cloroformo como solvente de extracción, no ha sido suficiente en nuestro caso. Efectivamente, luego de decantar la solución de éter de petróleo, y lavar la droga residual varias veces hasta reacción de Bornträger negativa, hemos hidrolizado nuevamente en presencia de nuevo éter de petróleo; la reacción es de nuevo fuertemente positiva, por lo que hemos ido aumentando el tiempo de hidrólisis a razón de 30 minutos por vez, llegando a un tiempo mínimo de 4 horas para que la operación sea completa y no acause reacción al amoníaco.

El empleo de un solvente de menor punto de ebullición como es el éter de petróleo (temperatura inicial de destilación 35° , mientras el cloroformo destila a 61°) podría explicar que el tiempo requerido por la hidrólisis sea mayor.

Sobre la solución que lleva los productos de hidrólisis, se aplican con el mismo criterio las distintas operaciones de extracción y purificación señaladas anteriormente. El tiempo requerido en las mismas es ahora superior, como consecuencia de una mayor concentración de las hidroximetil-antraquinonas provenientes de una combinación hidrolizable, en comparación con las que existían libres directamente.

Los datos analíticos obtenidos trabajando sobre corteza estabilizada han sido los siguientes:

Humedad: se ha efectuado esta operación sobre 2 gramos de polvo de droga, manteniéndose a la estufa a 100° hasta peso constante.

Valor obtenido: 13,537 gr. % P/P.

Cenizas totales: 9,349 gr. % P/P.

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 %: 0,413 % P/P.

Hidroxitetil - Antraquinonas P/P.

<u>Expe- riencia</u>	<u>Peso de muestra analizada</u>	<u>Libres</u>	<u>%</u>	<u>Combi- nadas</u>	<u>%</u>	<u>Totales %</u>
1ra.	1,9926 g.	0,0039 g.	0,195 %	0,0066 g.	0,331 %	0,526 %
2da.	1,9922 "	0,0043 "	0,215 "	0,0068 "	0,341 "	0,556 "
3ra.	1,9950 "	0,0037 "	0,185 "	0,0071 "	0,355 "	0,540 "
4ta.	2,0128 "	0,0040 "	0,198 "	0,0073 "	0,362 "	0,560 "
5ta.	2,0059 "	0,0042 "	0,209 "	0,0070 "	0,348 "	0,557 "
6ta.	2,0055 "	0,0037 "	0,184 "	0,0069 "	0,344 "	0,528 "

Hidroximetil-antraquinonas libres: promedio % P/P: 0,197 gr.

Hidroximetil-antraquinonas combinadas: " " " : 0,346 "

Hidroximetil-antraquinonas totales: " " " : 0,544 "

Los valores indicados en por ciento P/P, referidos a droga seca son los siguientes:

Cenizas totales: 10,812 gr. % P/P.

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 %: 0,593 g. % P/P.

Hidroximetil - antraquinonas % P/P.

<u>Experiencia</u>	<u>Libres</u>	<u>Combinadas</u>	<u>Totales</u>
1ra.	0,225 g.	0,382 g.	0,607 g.
2da.	0,248 "	0,394 "	0,642 "
3ra.	0,213 "	0,410 "	0,623 "
4ta.	0,228 "	0,418 "	0,646 "
5ta.	0,241 "	0,402 "	0,643 "
6ta.	0,207 "	0,397 "	0,604 "

Hidroximetil-antraquinonas libres: promedio % P/P: 0,227 g.

Hidroximetil-antraquinonas combinadas: " " " : 0,400 g.

Hidroximetil-antraquinonas totales: " " " : 0,627 g.

12. Determinaciones analíticas sobre hoja estabilizada.

Hemos comprobado analíticamente que en la hoja estabilizada no existen hidroximetil-antraquinonas al estado de libertad, sino que se encuentran en forma de combinación hidrolizable. Hemos procedido pues a la hidrólisis directa de la droga, siguiendo una técnica semejante a la empleada en el caso de la corteza.

Las extracciones con carbonato de sodio son algo más lentas, necesitándose 3 tratamientos de 40 ml. cada uno, agitando una hora cada vez en agitador mecánico.

La operación más larga es la última extracción con éter de petróleo, después de haber acidificado la solución alcalina con ácido clorhídrico. Si bien la mayor parte del principio a investigar se extrae en un comienzo coloreando de amarillo al solvente, la parte residual es muy lentamente extraíble, por lo que resulta difícil ver una reacción de Borntrüger francamente negativa.

Se requiere para ello como mínimo 5 extracciones con 50 ml. de solvente, manteniendo en cada caso una enérgica agitación de 90 minutos en agitador mecánico. Lo mismo que en todas las determinaciones anteriores, hemos practicado el control microscópico del residuo obtenido para comprobar que no existen cristales extraños (de cloruro de sodio ?).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Humedad: 8,457 g. % P/P.

Cenizas totales: 10,581 gr. % P/P.

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 %: 0,535 g. % P/P.

Hidroximetil-antraquinonas P/P.

<u>Expe- riencia</u>	<u>Peso de muestra analizada</u>	<u>Valor encon- trado en esa cantidad.--</u>	<u>en 100 gr.</u>	<u>Promedio %</u>
1ra.	2,0103 g.	0,0152 g.	0,756	
2da.	2,002 "	0,0148 "	0,739	
3ra.	1,9943 "	0,0146 "	0,732	
4ta.	2,0057 "	0,0149 "	0,742	0,744 gr.
5ta.	1,9832 "	0,015 "	0,752	
6ta.	1,9721 "	0,0147 "	0,745	

Referencia de los valores indicadores para la droga seca:

Cenizas totales: 11,537 gr. % P/P.

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 %: 0,365 g. % P/P.

Hidroximetil-antraquinonas % P/P.

<u>Experiencias</u>	<u>Promedio</u>	
1ra.	0,825 gr.	
2da.	0,807	
3ra.	0,799 "	0,812 gr.
4ta.	0,809 "	
5ta.	0,821 "	
6ta.	0,813 "	

La obtención de un valor del contenido en hidroximetil-antraquinonas sea en corteza u hoja estabilizada, emplea un tiempo aproximado de una semana, dado el número de operaciones y la duración de las mismas.

Determinación de la sensibilidad de la reacción de Bornträger

Disolviendo en éter de petróleo una cantidad exacta del residuo obtenido, considerado hidroximetil entraquinonas, hemos preparado una solución tipo de concentración conocida, con la cual se ha determinado la sensibilidad de la reacción de Bornträger.

Previamente hemos comparado las intensidades de las coloraciones desarrolladas empleando iguales volúmenes de esa solución tipo, y de solución de amoníaco al 10 %, ó amoníaco concentrado, o solución saturada de carbonato de sodio, ó solución de hidróxido de sodio al 10 %.

Si bien las diferencias de coloración fueron poco pronunciadas, ligeramente más intensa fué la obtenida empleando solución de amoníaco al 10 %, siguiendo luego en intensidad decreciente los otros reactivos en el orden más arriba indicado.

Elegido así el reactivo, podríamos decir más sensible para efectuar la reacción de Bornträger, se continúa con el estudio de la sensibilidad de la reacción. Para ello se prepararon varias diluciones en éter de petróleo de aquella solución tipo, hasta obtener las concentraciones entre 5 y 35 gamas por ml. con diferencias de 3 gamas por ml. entre dos sucesivas.

Para hacer las lecturas en mejores condiciones se han utilizado tubos de ensayo de vidrio incoloro, de 10 cm. de altura por 1 cm. de diámetro y con fondo plano a fin de asegurar una iluminación uniforme.

2 ml. de cada una de las diluciones de la solución tipo, se agitan con igual volumen de solución de amoníaco al 10 %; también se prepara finalmente una prueba en blanco que sólo

lleva éter de petróleo y amoníaco. Por comparación con el tubo que lleva la prueba en blanco puede ya verse una coloración rosada mínima, en el tubo que lleva una concentración de 9 gamas por ml. Debemos consignar sin embargo, que dicha coloración observada aisladamente, es decir, sin comparar con el tubo que lleva la prueba en blanco, nos llevaría a decidir esa reacción de Bornträger como negativa. En realidad todas las diluciones que poseen menos de 14 gamas por ml. ofrecen una coloración que solamente se observa por contraste con la prueba en blanco. Podríamos señalar entonces dos límites para la sensibilidad de la reacción de Bornträger: el primero correspondiente a una concentración de 9 gamas por ml. se observa solo por comparación con la prueba en blanco y el segundo correspondiente a una concentración de 14 gamas por ml. se observa también aisladamente y por lo tanto debe considerarse como la sensibilidad de esa reacción tal como se la lee en la práctica corriente.

Aclaremos que en este estudio de la sensibilidad de la reacción de Bornträger se empleó como solvente de las hidroximetil-antraquinonas el éter de petróleo, por ser el solvente utilizado en todo el presente trabajo. Por lo tanto cuando controlábamos un agotamiento o una extracción de tales principios durante el método de análisis cuantitativo adoptado y proseguíamos hasta conseguir una reacción de Bornträger negativa, estábamos seguros de que la cantidad de ellos que así se desoccharía o quedaría sin extraer no era superior a la que hemos determinado para el solvente ensayado.

13.- C o m e n t a r i o s

1.-) El estudio crítico teórico comparativo de los distintos procedimientos gravimétricos y colorimétricos destinados a la evaluación cuantitativa de hidroximetil-antraquinonas, nos permite suponer que el método gravimétrico propuesto por el J. Assoc. Official Agr. Chem., es el que reúne las mayores ventajas, por lo cual ha sido adoptado.

2.-) La operación destinada a eliminar los vestigios de ácido glicirrícico mediante sucesivos lavados con solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5 %, no puede realizarse en la práctica corriente tal como se indica en dicho método, pues la carbonatación parcial del reactivo, lleva a perder parte del principio a investigar, que luego no se recupera. Este inconveniente se subsana haciendo burbujear anhídrido carbónico de un aparato de Kipp durante el tiempo que lleva ejecutar esa operación.

3.-) Antes de evaporar el extractivo final que lleva las hidroximetil-antraquinonas, es indispensable realizar sobre el mismo un número suficiente de lavados con agua destilada, a fin de eliminar por completo residuos salinos, pues de lo contrario el producto final contiene cristales extraños (cloruro de sodio?) que se pesarán junto con los compuestos hidroximetil-antraquinónicos. La presencia de estos cristales, observables con el microscopio, hacen que el dato obtenido no pueda ser considerado como verdadero.

4.-) La obtención de un valor analítico, sea sobre corteza u hoja, con la técnica seguida por nosotros, en la práctica requiere un tiempo aproximado de una semana, dado el número de operaciones realizadas y el tiempo que demandan algunas de ellas.

5.-) Las muestras analizadas de cortezas de *Rhamnus alaternus*, tomadas de arbustos cultivados en la ciudad de La Plata, poseen un contenido de hidroximetil-antraquinonas aproximadamente igual a un tercio de la cantidad existente en ejemplares que crecen espontáneamente en el sud de Europa, sobre todo en la región Mediterránea. El hecho de ser una especie cultivada, a lo que se suman posibles diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los suelos, como así también diferencias de clima, podrían ser los causantes de ese menor contenido de dichos principios.

6.-) Las hojas poseen un contenido de hidroximetil-antraquinonas algo superior a las cortezas ($> 0,185$ gr. % de muestra), pero siempre muy inferior a la hoja de la misma especie europea (también aproximadamente un tercio).

7.-) Si bien faltaría agregar valores fisiológicos de la droga para abrir un juicio más exacto sobre su valor terapéutico, y por lo tanto su importancia económica, el contenido de hidroximetil-antraquinonas existente tanto en corteza como en hoja de *Rhamnus alaternus*, no permite cifrar grandes esperanzas con miras a su explotación, al menos en las condiciones de cultivo de las plantas estudiadas. Las muestras analizadas, que representan a un número reducido de ejemplares, no permiten establecer una conclusión definitiva al respecto.

8.-) Se han ensayado distintos reactivos para la localización microquímica de las hidroximetil-antraquinonas, obteniéndose los mejores resultados con el empleo de solución de hidróxido de sodio al 40 %.

9.-) La sensibilidad de la reacción de Borntráger, practicada en las condiciones del método por nosotros seguido, es tal que permite revelar, sin comparación con ninguna prueba en blanco, la presencia de 14 gamas de hidroximetil-antraquinonas por mililitro,

mientras que leída por comparación con dicha prueba, permite revelar 9 gamas por mililitro.

14 CONCLUSIONES

- 1^o) En la operación destinada a eliminar los vestigios de ácido glicirrúico, es indispensable trabajar en atmósfera de anhídrido carbónico.
- 2^o) Es muy conveniente el control microscópico del residuo obtenido, a fin de ilustrarnos sobre la pureza del mismo, y asegurar la ausencia de cristales extraños.
- 3^o) La corteza de *Rhamnus alaternus* posee hidroximetil-antraquinonas tanto libres (prom.: 0,227 gr. %), como al estado de combinación hidrolizable (prom.: 0,400 gr. %).
- 4^o) La hoja de *Rhamnus alaternus* posee todas sus hidroximetil-antraquinonas al estado de combinación hidrolizable (prom.: 0,812g%).
- 5^o) La localización microquímica realizada sobre cortes histológicos, revela que las hidroximetil-antraquinonas se distribuyen en el parénquima cortical, el líber y los radios medulares de la corteza. En la hoja se encuentran preferentemente en el líber de la nervadura central, y en menor proporción en el leño de las mismas.
- 6^o) La sensibilidad de la reacción de Bornträger, determinada en condiciones semejantes a las seguidas en nuestro método de análisis cuantitativo, fué de 14 gamas por mililitro.

Victor P. Olacchia

15.- B I B L I O G R A F I A

- 1) Engler-Diels; Syllabus der Pflanzenfamilien, p.272, 1936.
- 2) Lindley; veg. King., 107; 1853
- 3) Escalante M.G.; Las Rhamnáceas argentinas, en Tesis Museo La Plata (Inédito).
- 4) Solereder H.; Systematic Anatomy of the Dicotyledons, 2 vol. Oxford, 1908.
- 5) St. Hilaire J.; en Ex pos. Fam., 2: 264; 1805.
- 6) Linn. Sp. Pl.; 1: 193, 1753
- 7) Bentham, G. et Hooker, J.D.; Genera Plantarum, 1 (1): 377, 1862.
- 8) Brong., en Ann. Sc. Nat. 1 (10): 360, 1827
- 9) De Candolle, en Prodrumus, 2: 23, 1825.
- 10) Scala A.C., Manipulaciones de Botánica, 1913.
- 11) Sollmann, A Manual of Pharmacology, Sixth Edition, p.203, 1943.
- 12) Denston, T.C.,; A Text- Book of Pharmacognosy, London, p.226:1939
- 13) Hager; Tratado de Farmacia Práctica, 1:656, 1942.
- 14) Schmidt E.; Química Farmacéutica, 3:946, 1911.
- 15) Liot- Goris; Pharmacie Galenique, 2:1088 , 1939.
- 16) Chemical Abstracts, 21:2169, 1927
- 17) Lebeau,P., et Courtois, G.; Traité de Pharmacie Chimique, 2a. Edition, 2 (2): 1723, 1938.
- 18) United States Dispensatory - Wood-Osol- 23a Edition. p.282:1943
- 19) Bridel et Charaux, Bull. Soc.Chim.Biopl., 17:780, 1935
- 20) Bridel et Charaux, Bull.Soc.Chim.Biol., 15:642, 1933
- 21) Wasicky R.; Boletin de la Academia Nacional de Farmacia de Río de Janeiro, 4: 133, 1942.
- 22) Sipple H.L.; King C.G. and Beal G.D.; J.Am.Pharm.Assoc.23:205, 1934.
- 23) Morrison S.W.,; J.Am.Pharm.Assoc., 20:1276, 1931
- 24) Melvin W. Green, King.C.G., and Beal G.D.; J.AmPharm.Assoc. 25:107, 1936.
- 25) Goodman y Gilman; The Pharmacological Basis of Therapeutics, p. 798, 1940.

- 26) The Merck Index- Fifth Edition, p.655, 1940.
- 27) Journal de Pharmacie et Chimie, p.351, 1898.
- 28) Lestage J.A.; Bull.Trav. Soc.Pharm.Bordeaux, 60:110, 1922.
- 29) Fairbairn J.E.; Chemical Abstracts, 36:6306, 1942
- 30) Farmacopea Nacional Argentina, Tercera Edición, p.170, 1943
- 31) Pharmacopoeia of the United States, Twelfth Revision, p.123, 1942
- 32) Kofler, L.; Chemical Abstracts, 13:2969, 1919.
- 33) Tschirch A. y Edner J.C.A.; 2:1327, 1908
- 34) Tschirch A. y Pool J.F.A. C.A.; 3:473, 1909.
- 35) Geo E. E'wo y Chas E. Vanderkleed C.A. 7:3530 (1913)
- 36) Tunmann O.; en Hager, Tratado de Farmacia Práctica 1:656, 1942.
- 37) Umanski S.M., C.A.; 32:9395, 1938
- 38) Fairbairn J.E.; Tribuna Farmacéutica de Brasil, 10:183, 1942
- 39) Daels, Félix, C.A., 7:4042, 1913.
- 40) Beal G.D., y Katti M.C.T., C.A. 20: 1888, 1926
- 41) Tunmann O., Chemical Society Abstracts, 9 (2): 60, 1916
- 42) Anónimo. C.A., 13: 1618, 1919
- 43) Gunton J.A., y Beal, Geo D.,; C.A., 17:325, 1923.
- 44) Fuller H.C.; J. Assoc. Official Agr. Chem. 5: 575, 1922.
- 45) Fuller H.C.; H.Assoc. Official Agr. Chem., 7:7, 1923.
- 46) Mupanna C. Tuminkatti y Beal G.D., J.Am.Pharm.Assoc. 15:847, 1926.
- 47) Kroeber, en Hager, Tratado de Farmacia Práctica, 1:656, 1942
- 48) J.Assoc.Official Agr. Chem. 29:594, 1940
- 49) Eaton, Edgard O.; J. Assoc.Official Agr. Chem. 12:277, 1929.
- 50) Eaton, Edgard O., Ibid.; 16:81, 1933.
- 51) Tschirch-Christofoletti; Journal de Pharmacie et Chimie, 6 (20); 112, 1904)
- 52) Warin M.J.; Journal de Pharmacie et Chimie, p.253, 1905.
- 53) Maurin E.; Bull.sciences pharmacol., 28:373, 1921.
- 54) Fuller H.C.; J.Assoc.Official Agr.Chem. 8:536, 1925.
- 55) Fuller H.C. Ibid., 9, 306, 1926.