

Investigación de derivados antraquinónicos en *Cassia frondosa* Ait

por

M. Montes G., L. Valenzuela R., T. Wilkomirsky F.
y M. T. Hoffman F.

De la Escuela de Química y Farmacia de la Universidad
de Concepción (Chile)

PRESENTADO POR EL ACADÉMICO NUMERARIO D. OBDULIO FERNÁNDEZ

RESUMEN

Se practica el análisis cuali y cuantitativo de los glucósidos antraquinónicos en sus diferentes formas, libres y combinadas, oxidadas y reducidas, en *Cassia frondosa* Ait, ex *Cassia stipulacea*.

Para separar e identificar los derivados antraquinónicos se emplean la cromatografía en capa fina y la electroforesis sobre papel. En la evaluación de estos compuestos se aplica un método colorimétrico basado en la reacción de Bornträger, expresando los resultados en isticina (1,8 dihidroxiantraquinona). Se completa el estudio con un ensayo farmacológico preliminar.

SUMMARY

The qualitative and quantitative analyses of the anthraquinonic glycosides, in their different stages, of *Cassia frondosa* Ait, ex *Cassia stipulacea* are reported.

The separation and characterization of these anthraquinonic glycosides were carried out by thin layer chromatography and paper electroforesis.

The quantitative determinations of these compounds by a colorimetric method are based on the Bornträger reaction.

Finally a preliminary pharmacologic study was done.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos antraquinónicos, libres o combinados, se presentan en los vegetales en formas oxidadas y reducidas. La investigación de ellos debe comprender aspectos tales como la extracción, purificación, hidrólisis y evaluación (1). Dada la estructura química si-

milar de estos componentes, la mayoría de las veces es difícil lograr su separación. Es por esto que día a día se incorporan a la analítica de estos componentes vegetales nuevas técnicas que permitan su estudio. Después de la cromatografía sobre papel, que permitió descubrir numerosos derivados antraquinónicos (2-9), se emplean en la actualidad la electroforesis sobre papel (10) y la cromatografía en capa fina (11, 12).

Esta última técnica ha alcanzado hoy día gran avance y perfeccionamiento, tal es así que figura en las modernas farmacopeas como ensayo de rigor para el análisis de estas drogas (13).

La combinación de los métodos cromatográficos y de electroforesis parece constituir el procedimiento más apropiado para separar e identificar estos componentes de la célula vegetal.

La investigación de los principios glucosídicos antraquinónicos se ha efectuado en numerosas plantas chilenas (14-18) con proyecciones de buscar nuevos representantes de acción similar a los antraglucósidos de especies extranjeras, que son en este momento los que utiliza la industria farmacéutica nacional.

Entre las especies autóctonas del género *Cassia* han sido objeto de estudio: *Cassia tomentosa* Lam, *Cassia acuta* Meyen, *Cassia cloisiana* Ph, *Cassia coquimbensis* Vagel (15).

Con estos antecedentes, y dentro de nuestra búsqueda de especies vegetales originarias de Chile y que puedan en un futuro servir a la terapéutica o industria del país, en la presente tesis nos ocupamos de la investigación de glucósidos antraquinónicos de *Cassia frondosa* Ait, ex *Cassia stipulacea*.

Las hojas de este arbusto, según Murillo (19), tienen propiedades purgantes y suelen reemplazar a las del sen, aunque su acción es menos enérgica.

El trabajo experimental se planificó de la siguiente forma:

- A) Ensayos de rigor y preliminares.
- B) Estudio de los componentes antraquinónicos, que en su aspecto cualitativo comprendió:

Microsublimación.

Métodos de extracción.

Separación e identificación por cromatografía en capa fina.

Separación e identificación por electroforesis sobre papel.

En la parte cuantitativa se procedió a la evaluación de las diferentes formas de antraquinónicos, tomando como base la reacción de Bornträger.

C) Ensayo farmacológico preliminar en ileon de conejo.

PARTE EXPERIMENTAL

La planta fue recolectada en octubre de 1967 en la desembocadura del Bio-Bio, provincia de Concepción, y clasificada en el Departamento de Botánica de la Universidad como *Cassia frondosa* Ait, N. V. palo negro o quebracho, leguminosas-cesalpinoideas. El material vegetal de estudio consistió en las hojas y las ramas de esta planta.

ANÁLISIS QUÍMICO

La investigación de oxidasas y peroxidasas en la planta recién recolectada dio reacción negativa (20), por lo cual fue desecada a temperatura ambiente. En la droga pulverizada en forma grosera se efectuaron las siguientes determinaciones:

A) *Ensayos de rigor y preliminares* (21-22).

- 1) Determinación de humedad: p/v 8 por 100.
- 2) Determinación de cenizas totales: 7,4 g por 100.
- 3) Determinación de cenizas insolubles en HCl al 10 por 100: 0,51 g por 100.

Composición de las cenizas.—Para los cationes se aplicó la espectrografía de rayos X fluorescentes. En la determinación se utilizó un espectrógrafo-difractógrafo, tipo Norelco PW 1050-25, modelo Philips 1961, con cristal analizador de LiF. La fuente de excitación consistió en un tubo de rayos X de tungsteno (23). Los aniones se investigaron de acuerdo a las técnicas analíticas habituales.

Los resultados fueron los siguientes:

Cationes: Calcio, hierro, arsénico, rubidio, cobre, cinc y magnesio. Sodio y potasio a la llama.

Aniones: Cloruros, bromuros, carbonatos y sulfatos.

- 4) Determinación de nitrógeno total (24): 1,93 g por 100.

5) Ensayos en el infuso: Se preparó un infuso al 10 por 100 con el polvo de la planta, obteniéndose un líquido de color verde parduzco, olor característico, de sabor amargo y pH 4,5. En el infuso se investigaron: saponinas, taninos, flavonoides, mucílagos, azúcares reductores e indirectamente reductores. Los resultados fueron positivos para los taninos, mucílagos y azúcares reductores e indirectamente reductores. Los taninos presentes son de tipo hidrolizables o pirogálicos.

6) Ensayos en el polvo: Se investigaron alcaloides, glucósidos cianogenados y antraquinónicos. Estos últimos componentes dieron reacción de Bornträger positiva.

7) Determinación del coeficiente de solubilidad en g por 100:

Alcohol: 6.54	Eter de petróleo: 0.58
Eter etílico: 0.88	Acetona: 2.18
Cloroformo: 1.45	Benzol: 1.02
Agua: 7.82	

B) *Estudio cualitativo de los componentes antraquinónicos.*

Microsublimación.—Se obtuvo un sublimado amarillo, que tratado con gotas de álcalis dio color rojo. La observación al microscopio demuestra la presencia de cristales característicos, semejantes al ácido crisofánico.

Métodos de extracción.—Se estudiaron diversos métodos de extracción en diferentes condiciones de oxidación e hidrólisis, con el objeto de conocer el procedimiento más adecuado, que aplicado posteriormente al análisis permitiera evaluar los derivados antraquinónicos en todas sus formas.

Para la extracción se operó cada vez con dos gramos de planta pulverizada, de la manera siguiente:

Calentamiento a refljo con metanol en B. M. de acuerdo a Hörrhammer y Wagner (25) (extracto metanólico).

Hidrólisis con HCl metanólico al 10 por 100 y extracción con benzol, según Luckner (26) (extracto benzólico).

Hidrólisis con H_2SO_4 diluido en presencia de H_2O_2 y extracción con cloroformo, siguiendo la técnica de Fischer y Buchegger (27) (extracto clorofórmico).

Hidrólisis con HCl al 25 por 100 y CH_3COOH glacial y extracción con éter etílico, según Auterhoff (28) (extracto etéreo).

Cromatografía en capa fina.—Para conocer el número de compuestos antraquinónicos presentes en los extractos después de estos tratamientos, e procedió con cada uno de ellos al análisis cromatográfico en capa fina, según Stahl (11), con silicagel G de 0,5 mm de espesor. Se ensayaron los siguientes disolventes: metanol-acetato de etilo-agua (4,1:25:3,5) y benzol-acetato de etilo-ácido fórmico (75:24:1) (25 y 29). Como reveladores se usaron potasa alcohólica al 5 por 100, acetato de magnesio al 1 por 100 y vapores de amoníaco.

En estas condiciones operatorias se detectó mayor número de manchas para los extractos clorofórmicos y etéreo, 5 y 4 respectivamente, no lográndose una separación en forma nítida.

Para obtener un mayor poder resolutivo, se ensayaron otros disolventes, entre éstos éter de petróleo saturado de metanol al 97 por 100 (18), isobutanol-tolueno saturado saturado de agua (50:50:10) (30). Este último demostró ser el más eficaz en la separación de los constituyentes antraquinónicos. Al emplear la mezcla isobutanol-tolueno-saturado de agua (50:50:10), se utilizó para el ensayo cromatográfico en capa fina el extracto clorofórmico, que se agotó con solución alcalina de Auterhoff (165 ml de NaOH de 30 por 100, 100 ml de amoníaco al 20 por 100 y agua c. s. p. 1000 ml). El camino recorrido fue aproximadamente de 15 cm, y el tiempo de desarrollo de dos horas, a temperatura de más o menos 18° C.

Como sustancias de control se emplearon senósidos A y B, alizarina, aloína, antraquinona, ácido crisofánico, emodina, 1,4 dihidroxiantraquinona, 1,5 dihidroxiantraquinona, 1,8 dihidroxiantraquinona y rheína, disueltas en solución alcalina de Auterhoff. En este caso no es necesario emplear reveladores de coloración.

En estas condiciones se identificaron en la planta en estudio: ácido crisofánico, emodina y rheína. Las dos primeras sustancias presentan los siguientes R_f : 0,36 y 0,92, respectivamente. La rheína permanece en el punto de origen. Las características del cromatograma se indican en la tabla 1.

Electroforesis sobre papel.—Los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina se complementaron con la técnica de electroforesis sobre papel, siguiendo el procedimiento indicado por Roux (10).

Para determinar las condiciones óptimas de separación se efectuaron diversas experiencias (regulador, pH, voltaje, tiempo).

En los ensayos de electroforesis se utilizó el aparato Elphor, trabajando en las condiciones siguientes: 110 volts, pH variable, tiempo: siete y quince horas, bandas de papel filtro Wabtmann núm. 1 de 28,5 x 3,8 cm. La solución problema analizada consistió en el extracto clorofórmico.

TABLA 1

Cromatografía en capa fina de los componentes antraquinónicos de Cassia frondosa Ait.

Rf	Extracto V	Problema UV	Sustancias identificadas
0.00	R	R	Rheina
0.19	R	R	—
0.36	R	R	Acido crisofánico
0.92	A	R	Emodina

R = rosado

A = amarillo

Se ensayaron diversas soluciones reguladoras: ácido bórico, 0,2 M; bórax, 0,05 M en rangos de pH 7,6-9,2 (31); bórax, 0,05 M; hidróxido de sodio, 0,2 M con valores de pH comprendidos entre 9,28-10,1 (31); fosfato monopotásico, 0,2 M; hidróxido de sodio, 0,2 M en escalas de pH de 5,8 a 8 (32).

Cuando se utilizaron soluciones reguladoras de pH alcalino, no hubo necesidad de emplear revelador. A pesar de que la mezcla bórax 0,05 M-hidróxido de sodio 0,2 M dio el mejor resultado, no fue definitivamente resolutoria para las sustancias encontradas por cromatografía.

Se procedió a practicar un nuevo ensayo, en el cual se modificaron las condiciones experimentales anteriores. Estas consistieron en trabajar a 220 voltios por veinticuatro horas, en bandas de papel Schleicher Schull 2043 a, utilizando como regulador barbitol 0,01 M, barbitol sódico 0,05 M, pH 8,6 (33). El extracto clorofórmico de la droga y las sustancias de control se trataron con solución alcalina de Auterhoff antes de la siembra.

En estas condiciones operatorias se logró un mayor poder resolutivo, obteniéndose la separación y comprobación de la presencia de ácido crisofánico, emodina y rheína, como se observa en la tabla 2.

TABLA 2

Electroforesis sobre papel de los componentes antraquinónicos de Cassia frondosa Ait.

BANDAS		MIGRACIONES EN cm.	
V	UV	Extracto problema	Sustancias identificadas
P	P	0.0	—
A pál.	R—A pál.	0.2	Rheína
R	R	0.8	Emodina
P	P	1.3	—
R	R	1.7	Acido crisofánico

P = pardo

A pál. = amarillo pálido

R—A pál. = rosado-amarillo pálido

R = Rosado

Evaluación colorimétrica de las diferentes formas de derivados antraquinónicos en Cassia frondosa Ait.—Se empleó el procedimiento colorimétrico habitual basado en la reacción de Bornträger, con una técnica análoga a la seguida por Bezanger-Beanquesne (34) y Urtubía (18) para la separación de las siguientes formas posibles: libres oxidadas, libres reducidas, combinadas oxidada sy combinadas reducidas. Se utilizó cloroformo como líquido de extracción, debido a que demostró ser el más selectivo. Después de las extracciones, los líquidos obtenidos se trataron con reactivo de Auterhoff para la determinación colorimétrica. Las lecturas se efectuaron al espectrofotómetro Beckmann B, en cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor y a una longitud de onda de 540 μ u, haciendo una curva de calibración de isticina entre 0,01-0,1 mg/ml.

1) *Formas libre oxidadas.*—Se utilizaron 5 g de droga en polvo, que se extrajeron con cloroformo por calentamiento a reflujo. Se obtuvo una parte líquida clorofórmica (A) y un residuo o marco.

2) *Formas libres reducidas*.—Se determinaron en una parte alícuota del extracto clorofórmico anterior, oxidando por calentamiento al B. M. con agitación constante. Por diferencia con el valor encontrado en A, se obtienen las formas libres reducidas.

3) *Formas combinadas oxidadas*.—El marco que resultó de la extracción clorofórmica se trató nuevamente con este disolvente en presencia de H_2SO_4 10 N. El líquido clorofórmico obtenido se separó en dos partes: B y C. En la fracción B se determinaron las formas oxidadas combinadas. Como también fue de interés conocer los derivados antraquinónicos ácidos procedentes de heterósidos (rhéina), la fracción C se agotó con solución saturada de bicarbonato de sodio. Después de neutralizar con HCl, se extrajo con éter. La solución etérea obtenida, tratada con reactivo de Auterhoff, se sometió a la lectura colorimétrica.

4) *Formas combinadas reducidas*.—La valoración se efectuó de manera similar al procedimiento empleado para las formas libres reducidas.

Resultados: expresados en g % isticina

Compuestos oxidados libres:	0.012	
Compuestos oxidados combinados: .	0.235	
Formas oxidadas totales:	0.267	(incluido derivados
Formas reducidas libres:	0.0185	ácidos 0.015)
Formas reducidas combinadas: . . .	0.025	
Formas reducidas totales:	0.0435	

C) *Ensayo farmacológico preliminar.*

Con el fin de profundizar en la investigación de *Cassia frondosa* Ait, se efectuaron ensayos en animales de experimentación, para conocer acerca de su efecto a nivel intestinal, ya que se le adscribe actividad catártica.

Sobre el modo y lugar de acción de estas drogas en el intestino, las opiniones varían considerablemente (35, 36, 37).

La evaluación de la eficacia de un laxante por investigación en experimentación animal tiene serias dificultades, ya que en los animales no ocurre constipación espontáneamente. Además, la investigación debe incluir el estudio de las respectivas influencias del colon,

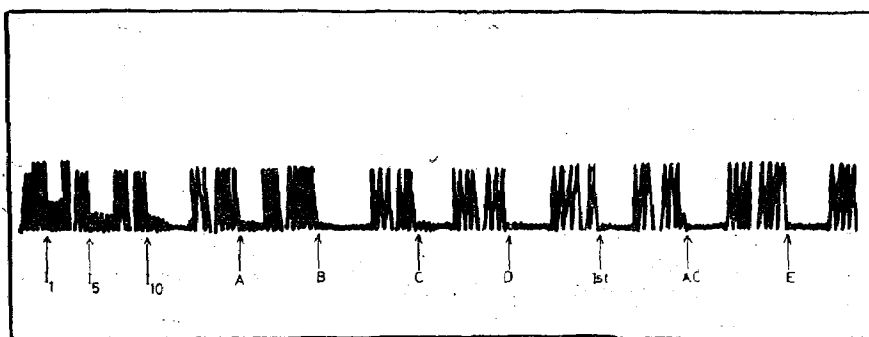
sigmoide y recto en la formación de las heces y en la defecación. Así, fue necesario estudiar la efectividad de la planta, ya sea por aumento de la actividad motora del intestino normal, o bien contrarrestando el efecto de una droga inhibidora (38).

Los métodos de reciente introducción, si bien es cierto, permiten dar una medida más acertada de la motilidad intestinal, utilizan técnicas complejas de elevado costo, lo cual hace difícil llevarlas a la práctica. Entre ellos figuran la radiotelemetría (38), isótopos radiactivos o método roentgenológicos, que visualizan el pasaje de una comida de Ba.

En este trabajo se siguió la técnica de Magnus para intestino aislado (39), utilizando íleon de conejo sumergido en tyrode oxigenado a 37° C y colon distal en las mismas condiciones experimentales.

GRÁFICO 1

Acción de algunos derivados antraquinónicos sobre la motilidad espontánea de íleon aislado de conejo.



I₁ = Infuso al 1 %
I₅ = Infuso al 5 %
I₁₀ = Infuso al 10 %

D = A + B + C
Ist = Isticina
AC = Acido crisofánico
D = Emodina

A = Formas libres oxidadas + formas libres reducidas
B = Formas oxidadas y reducidas provenientes de heterósidos
C = Formas ácidas provenientes de heterósidos.

Se determina la acción de los infusos al 1, 5 y 10 por 100; de las soluciones de antraquinónicos en sus diferentes formas (A, B, C y D) que se obtuvieron a partir de la droga en polvo, como se indicó

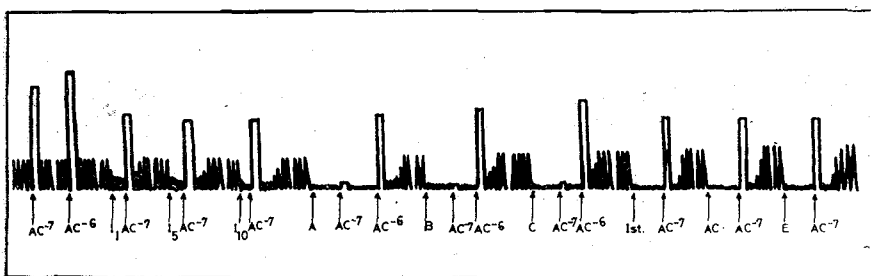
en la valoración, y de soluciones de isticina, ácido crisofánico y emodina en concentraciones de 0,002 g por 100. Estas dos últimas sustancias se detectaron en la droga por cromatografía en capa fina y electroforesis sobre papel.

En estas experiencias se apreció claramente una disminución parcial de la motilidad espontánea en el trocito de íleon al administrar el infuso 1 por 100 y una inhibición total con los infusos al 5 y 10 por 100; e igual inhibición total, con las soluciones de antraquinónicos A, B, C y D, y con las soluciones control de isticina, ácido crisofánico y emodina.

En seguida se ensayaron las posibles modificaciones que estos derivados antraquinónicos, presentes en los infusos, en las diferentes formas extraídas de la planta, como las sustancias antraquinónicas puras, tendrían sobre la contracción producida por histamina y acetilcolina.

GRÁFICO 2

Interacción de algunos derivados antraquinónicos y acetilcolina en íleon aislado de conejo.



La contracción producida por histamina no presentó disminución significativa si el intestino se encuentra bajo los efectos de las soluciones en estudio. Los infusos al 1, 5 y 10 por 100 inhiben parcialmente el efecto de la acetilcolina — 7, y las soluciones de antraquinónicos A, B y C la antagonizan totalmente. Sobre acetilcolina — 6 el efecto es parcial. Las soluciones patrón de antraquinónicos puros producen un descenso parcial de la contracción debida a la acetilcolina — 7.

Los resultados pueden apreciarse en el gráfico 2.

Las experiencias anteriores se repitieron utilizando la misma técnica en colon distal, según indicaciones de Valette y col. (40), no obteniéndose cambio apreciable de las contracciones normales de esta fracción del intestino grueso.

Cabe hacer notar que el método utilizado permite apreciar solamente modificaciones del tono de intestino aislado, el que obviamente presenta condiciones diferentes de las del intestino *in vivo*.

CONCLUSIONES

1) El estudio practicado en *Cassia frondosa* Ait permitió evidenciar en esta planta la presencia de heterósidos antraquinónicos.

2) En la extracción de los diversos componentes de este tipo resultó ser el cloroformo el disolvente más selectivo.

3) La cromatografía en capa fina, con el empleo de isobutanol-tolueno saturado de agua (50:50:10), fue eficaz para la separación de los constituyentes antraquinónicos.

4) La electroforesis sobre papel, utilizando la solución reguladora barbital 0,01 M-barbital sódico 0,05 M de pH 8,6, dio los mejores resultados en el estudio de detección de estos compuestos.

5) El empleo de estas técnicas permiten identificar en esta planta la presencia de ácido crisofánico, emodina y rheína.

6) Los resultados obtenidos en cromatografía en capa fina se comprueban y concuerdan con los obtenidos por electroforesis sobre papel, presentando esta última la ventaja de su mayor poder resolutivo.

7) En el ensayo farmacológico practicado en íleon de conejo, el infuso de la droga al 1 por 100 mostró una disminución parcial de la motilidad; ésta fue total con los infusos al 5 y 10 por 100. Los infusos inhiben parcialmente el efecto de la acetilcolina. — 7.

8) Las soluciones de antraquinónicos A, B y C mostraron una inhibición total de la motilidad intestinal. El mismo efecto se produjo con las soluciones de control: isticina, ácido crisofánico y emodina.

9) Las soluciones de antraquinónicos A, B y C antagonizaron totalmente el efecto de la acetilcolina — 7; el descenso fue parcial con las soluciones de antraquinónicos de control frente a la contracción producida por acetilcolina — 7.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BOGGIANO Z., G.: «Anales de la Facultad de Química y Farmacia», Universidad de Concepción, XIII-XIV, 43 (1962-63).
- (2) SHIBATA, S.; TAKITO, M., y TANAKA, O.: «J. Amer. Chem. Soc.», 72, 2789-2790 (1950).
- (3) BETTS T., J.; FAIRBAIRN, J. W., y MITAL, V. K.: «J. Pharm. Pharmacol.», 10, 436-441 (1958).
- (4) CRELLIN J., K.; FAIRBAIRN, J. W.; FRIEDMANN, C. A., y RYAN, H. A.: «J. Pharm. Pharmacol.», 13, 639-640 (1961). fl
- (5) FAIRBAIRN, J. W.; FRIEDMANN, C. A., y RYAN, H. A.: «J. Pharm. Pharmacol.», 10, 186-192 T (1958), Suppl.
- (6) FAIRBAIRN, J. W., y MICHAELS, L.: «J. Pharm. Pharmacol.», 2, 807-812 (1950).
- (7) DEQUEKER, R.: «Boll. Chim. Farm.», 101, 290-302 (1962).
- (8) LEMLI, J.: «Pharm. Tijdsch. Belg.», 40, 149-154 (1963).
- (9) LEMLI, J.; DEQUEKER, R., y CUVEELE, J.: «Pharm. Weekel.», 99, 589-592 (1964).
- (10) ROUX, M. A.: «Ann. Pharm. Franc.», 14, 212 (1956).
- (11) STAHL, E.: *Dünnschicht Chromatografie*, Springer-Verlag, Berlín (1962).
- (12) HÖRHAMMER, L.; WAGNER, H., y BITTNER, G.: «Pharm. Ztg.», 108, 259-262 (1963).
- (13) ANTON, R., y DUQUENOIS, P.: «Ann. Pharm. Franc.», 25, 590 (1967).
- (14) CARBONE, R. A.: Tesis de químico-farmacéutico, Universidad de Chile (1934).
- (15) VENEGAS S., D.: Tesis de químico-farmacéutico, Universidad de Chile (1937).
- (16) HENRÍQUEZ U., N.: «Anales de la Facultad de Química y Farmacia», Universidad de Chile, XII, 113 (1960).
- (17) REYES M., O.: «Anales de la Facultad de Química y Farmacia», Universidad de Concepción, XV, 55 (1964).
- (18) URTUBIA M., R.: «Anales de la Facultad de Química y Farmacia», Universidad de Chile, XVIII, 19 (1966).
- (19) MURILLO, A.: *Plantas Medicinales du Chili*, Exposition Universelle de París (1889).
- (20) PAECH, K. y TRACEY, M. V.: *Modern Methods of Planta Analysis*, IV, 235, Springer-Verlag, Berlín (1956).
- (21) JENKINS, G. L.; DUMEZ A., G.; CHRISTIAN J., E., y HAGER G., P.: *Química farmacéutica cuantitativa*, 328-330, Editorial Atlante, S. A., México D. F. (1951).
- (22) *Ibid.*: 316-317.
- (23) CATICHA, E. S.: *Espectrografía de rayos X fluorescentes*, Departamento de Física del Estado Sólido, Facultad de Ingeniería y Agrimensura, Montevideo, Uruguay (1959).

- (24) PEACH, K., y TRACEY, M. V.: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, I, 479-483, Springer-Verlag, Berlín (1956).
- (25) HÖRHABBER, L.; WAGNER, H., y HÖRHAMMER, H. P.: *Deutsche Apotheker-Zeitung*, 563 (1967).
- (26) LUCKNER, M.: *Vorschriften für die chemische Untersuchung von Drogen*, 34 (1963).
- (27) FISCHER, R., y BUCHEGGER, H.: *Prüfung und Verarbeitung von Arzneidrogen*, F. Gstirner, I, 177-313 (1955).
- (28) AUTERHOFF, H.: *Prüfung und Verarbeitung von Arzneidrogen*, F. Gstirner, I, 179 (1955).
- (29) FISCHER, R., y BUCHEGGER, H.: *Prüfung und Verarbeitung von Arzneidrogen*, F. Gstirner, I, 177 y 313 (1955).
- (30) BUCHI, J., y SCHUMACHER, H.: «*Pharmaceutica Acta Helvetica*», 31, 417 (1956).
- (31) COLOWICK, S. P., y KAPLAN N., O.: *Methods in Enzymology*, I, 145-146, Academic Press. Incl. Publishers, New York (1955).
- (32) SORENSEN, C., y VOGEL, A.: *Quantitative Inorganic Analyses*, 2.^a ed., 869-870, Longmans Green y Co. London (1957).
- (33) CORE, C. A., y KIRCH, R. E.: «*Journal of the American Pharm. Assoc.*», 47, 513 (1958).
- (34) BEZANGER-BEANQUESNE, L.: «*Ann. Pharm. Franc.*», 20, 1, 443-447 (1962).
- (35) CARNOT, P. y GLENARD, R.: «*C. R. Soc. Biol.*», 74, 120 (1913).
- (36) LENZ, E.: «*Arch. int. Pharmacol.*», 28 75 (1924)..
- (37) ROWLANDS, E. N.: *Quantitative Methods in Human Pharmacology and Therapeutics*, D. R. Laurence M. D. Pergamon Press., N. Y., London, París 31-39.
- (38) NODINE H., J., y SIEGLER, E. P.: *Animal and clinical pharmacologic Techniques in Drug Evaluation*, Year Book Medical Publishers Inc. Chicago, 480-486 (1964).
- (39) IBÁÑEZ S., G.: Tesis para optar al grado de licenciado en Química y Farmacia, Universidad de Concepción (1968).
- (40) VALETTE, G., y LEBOEUP, H.: «*Ann. Pharm. Franc.*», V, 89 (1947).