

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

"INVESTIGACION DE RUTINA
EN LAS INFLORESCENCIAS
DE LA HYDRANGEA MACROPHYLLA"

Tesis presentada para optar
al grado de
Doctor en Bioquímica y Farmacia.

por

Raúl F. BALADO.-

Instituto Superior de Investigaciones Científicas

"Carlos A. Sagastume"

1948.-

Padrino de Tesis:

Profesor: Señor: José F. Molfino:-

En cumplimiento de disposiciones reglamentarias, me es grato presentar este trabajo de tesis con el objeto de optar al grado de Doctor en Bioquímica y Farmacia:

Debo dejar constancia del mayor agradecimiento a todas las personas que, en una forma u otra, contribuyeron a la realización y feliz término de mi labor:

Al Profesor José F. Molfino, por su ayuda y constante estímulo, que hizo posible salvar los obstáculos que ofreció la realización de esta investigación:

Al Profesor Orfeo O. Orazi, por las valiosas orientaciones dadas en la ejecución de la parte experimental:

Al Dr. José Paladini, que en sus funciones de investigador en la Fundación Sauberán, puso a mi disposición todos sus conocimientos y el material científico necesario para poder lizar las determinaciones especiales de este trabajo:

Por último, debo expresar mi gratitud y constancia de sincero reconocimiento a los señores profesores que durante el transcurso de mi carrera universitaria supieron brindarme la valiosa ayuda de sus conocimientos y el estímulo para su culminación:-

PLAN DESARROLLADO

Parte General

- Capítulo I
Introducción:-
- Capítulo II
Descripción macrográfica de la especie vegetal estudiada:-
- Capítulo III
Descripción del principio activo a investigar:-
- Capítulo IV
Consideración general de los métodos descriptos para su
extracción e identificación:-

-----0000000-----

Parte Experimental

- Capítulo V
Extracción del principio activo:-
- Capítulo VI
Identificación del mismo:-
- Capítulo VII
Conclusiones generales:-
- Capítulo VIII
Bibliografía:-

-----0000000-----

P A R T E

G E N E R A L -

C A P I T U L O : I . -

Introducción:-

La realización de este trabajo de tesis tiene como objeto la investigación de la existencia de la rutina en las inflorescencias de la especie vegetal Hydrangea macrophylla (hortensia).

Si bien el conocimiento de este compuesto se remonta al año 1842, fecha en que fué aislada por A. Weiss (Pharmaceutische Centralblatt, 13 . 903 (1842), solo recientemente se tuvo la primera evidencia de que posee una propiedad terapéutica de mucha importancia, la de su favorable acción en la reducción de la fragilidad anormal de los capilares sanguíneos del ser humano y de cuyos alcances y verdadero significado en la terapéutica moderna, se hará mención en la parte descriptiva de este trabajo.

En virtud de estos antecedentes, fué nuestro propósito emprender esta labor con el fin de poder llegar a comprobar la posible existencia y posterior identificación del citado compuesto en una especie vegetal muy difundida en nuestro país. Con ello, creemos colaborar en la medida de nuestro modesto esfuerzo con el propósito legítimo de poseer un conocimiento lo más completo posible de nuestra riqueza vegetal y de las posibilidades que pueda brindarnos como fuente de materias primas para la in-

industria farmacéutica nacional:-

-----0000000-----

C A P I T U L O . II.-

DESCRIPCION MACROGRAFICA DE LA ESPECIE VEGETAL ESTUDIADA.

La planta motivo de esta investigación corresponde a la especie *Hydrangea macrophylla* (Tunberg) De Candolle (1) de la familia de las Saxifragáceas (orden Rosales):

En realidad, se trata de un clon de esta especie, muy cultivada por la belleza de sus inflorescencias, de color generalmente rosado pero que puede variar hacia el azulado según la naturaleza físico-química de los suelos donde se cultivaba (2):

Planta herbácea o sub-leñosa, perenne, con las hojas opuestas, simples, enteras o raramente lobuladas; el limbo de forma oval-oblonga, acuminada, glabra y con el borde gruesamente serrado (3):

Flores en corimbos umbeliformes; en su origen, las de la periferia neutras, de relativo gran tamaño, las restantes hermafroditas, pequeñas; El perianto es doble, tetrámero, con ocho estambros y el ovario infero, de cuatro carpelos concrecentes con los estilos libres; Fruto capsular (4):

El material utilizado en las experiencias fué determinado por el Profesor José F. Molfino y del que

se acompaña una reproducción fotográfica en forma de ejemplar de herbario, procede de un cultivo existente en la localidad de Ensenada (Pcia. de Bs. As.) y fué coleccionado en Enero de este año.

Las inflorescencias constituidas en su totalidad por flores neutras, con perianto petaloide de color blanco-azulado, unguiculado algo asimétrico, de extremidad obtusa, y escasa prolongación en el lugar de inserción; tiene término medio 23-25 milímetros de ancho por 20 de largo, con el borde ligeramente ondulado y las nervaduras manifiestas (in sicco).

En esta especie se han definido alrededor de 50 variedades hortensos (5) que deben referirse a clones de aquella, cuyo origen es oriental: (China, Japón, etc):

-----0000000-----

C A P I T U L O . III.-

DESCRIPCION DEL PRINCIPIO ACTIVO A INVESTIGAR (RUTINA).-

En el año 1940, en el Departamento de Agricultura de los Estado Unidos (sección laboratorio de Investigaciones Regionales del Este), Couch y colaboradores dirigieron su atención hacia un tipo de tabaco que se producía allí, de calidad inferior para ser empleado como tal, y que, fuera de la nicotina que se le extraía, prácticamente no tenía aplicación.

Como resultado de esos trabajos, obtuvo Couch de este tabaco un nuevo producto, la rutina.

En un principio no se le encontró mayor aplicación a esta substancia, conocida, por otra parte y como ya dijimos, desde hacía unos 100 años; pero al desarrollar su fórmula de estructura, llamó la atención del autor su extrema similitud con la de vitamina P.

Esta vitamina, llamada así por su influencia sobre la permeabilidad capilar y conocida también como Citrina, por encontrarse en las ~~frutas~~ cítricas, o Hesperidina, por ser ésta uno de los principales componentes, fué aislada por Szont-Gyorgyi en el pimiento rojo de Hungría y más tarde de la cáscara de limón. Posee la vitamina P la propiedad de normalizar la fragilidad capilar cuando se encuentra aumentada, proviniendo así las

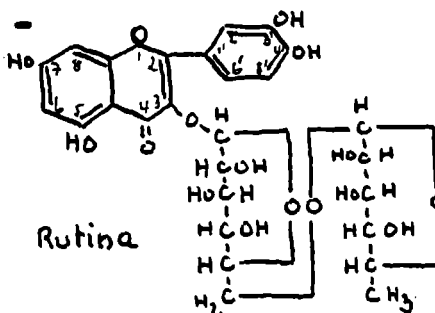
hemorragias que tienen este origen. Pero esta virtud de la vitamina P no puede ser fácilmente utilizada en la práctica debido a la escasa proporción que se encuentra en sus fuentes de origen, a lo difícil de su extracción y a su débil poder terapéutico.

La rutina, en cambio, que además de hallarse en la hoja del tabaco, se encuentra como se detallará más adelante, en 50 especies de más de 20 familias botánicas, resulta de más fácil extracción, y posee un poder terapéutico ampliamente utilizable en clínica médica.

Fórmula:.- La rutina ($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$) es desde el punto de vista químico, un heterósido cuyo aglucon pertenece al grupo de los flavonoles (quercetina) y se presenta al estado de un polvo microcristalino, color amarillo pálido. Aunque Ter Meulen (6) estableció que la rutina tiene por fórmula bruta $C_{33}H_{42}O_{20} \cdot 4H_2O$ y que es un derivado de la quercetina y de un trisacárido, ramosa, Charaux (7) encuentra posteriormente que la fórmula correcta es en realidad: $C_{27}H_{30}O_{16}$ y que el grupo azúcar componente de la molécula es un sacárido (rutinosa).

Cuando se hidroliza con ácidos diluidos, el éster pentametilico de la rutina da 5,7,3',4' tetrametoxi-flavonol, la identidad del cual fué confirmada por comparación con un derivado de la quercetina.

La rutina posee entonces la siguiente fórmula de estructura:



Penta-hidroxi-3,5,7,3',4'-flavona-3-rutinosido.

Lo establecido por Tasaki sobre que el azúcar, núcleo del glucósido, se une al resto de la molécula por la posición 7, es por esto incorrecta:

Aunque es usualmente posible determinar la posición de los grupos metoxilos de los derivados metoxi-flavonas y flavonoles, por medio de la potasa alcohólica en caliente, el 5,7,3',4' tetrametoxi-flavonol es muy poco atacado por ese método, debido sobre todo a la poca solubilidad de las sales de potasio obtenidas. Después de algunas horas y trabajando a 200° muy pequeña cantidad floroglucinol monometil éter y ácido verátrico se producen, pero la presencia del floroglucinol dimetil éter no pudo ser señalada.

Es por lo tanto probable que a elevadas temperaturas, se produzca una conversión preliminar del 5,7,3',4' tetrametoxi-flavonol en el 5-hidroxi-7,3',4' - trimetoxi, que posteriormente sufre la hidrólisis antes mencionada. (8).

Propiedades físicas y químicas: La rutina se presenta al estado puro en forma de un polvo denso, color amarillo pálido, formado por cristales microscópicos en forma de agujas rounidas en haces, de lustro poco pronunciado y de reacción neutra (9).

Desecada al aire ambiente contiene 3 molé-

culas de agua de cristalización, pierde parte de una en el aire seco y acaba de perderla conservada en el desecador sulfúrico o calentando a la estufa. Las otras dos moléculas solo las pierde cuando se calienta entre 110 y 115°C. (10).

Desecando rutina hasta peso constante en un desecador a vacío, y colocándola nuevamente al aire ambiente, absorbe fácilmente la humedad atmosférica, retornando al estado inicial de hidratación, en muy poco tiempo. La rutina es soluble (9,10,11,12) en agua fría, en la proporción de 0,913 %; la solubilidad aumenta rápidamente con la temperatura, llegando a ser de 0,5% calentando a 100°C. Es también soluble en alcohol metílico y etílico, en los que se disuelve en la proporción del 20%; la solubilidad en estas condiciones aumenta también con la temperatura. Se disuelve también en piridina y alcohol amílico, en soluciones alcalinas diluidas especialmente de hidróxidos alcalinos y alcalinos-térreos, comunicando a las soluciones un color amarillo pálido característico. Finalmente, es completamente insoluble en bencol sulfuro de carbono, cloroformo y éter de petróleo.

Cristaliza fácilmente a partir de sus soluciones acuosas, alcohólicas e hidroalcohólicas, saturadas en caliente. Los autores (9,13) dan varios lapsos para obtener una completa cristalización, variable entre 24 horas y varios días de reposo.

Cristaliza perfectamente a partir de una solución de 1 m 180 partes de agua hirviendo por enfriamiento (9,11,14) también a partir de una solución de 1 m 5 partes de alcohol metílico caliente. Puede ser también cristalizada por disolución en alcohol etílico caliente, diluyendo posteriormente para evitar que las aguas madres retengan al glucósido en solución. (15).

En medio ácido diluido (16,17,18) la rutina es hidrolizada por los ácidos minerales, resultando una mezcla de quercetina, glucosa y rannosa en proporciones equimoleculares. Practicando la ebullición con H_2SO_4 (20%) o HCl (1%) las soluciones de rutina se hidrolizan en forma cuantitativa.

Las soluciones alcalinas de rutina ($NaOH$, KOH , NH_4OH) son inestables si no se las protege del oxígeno atmosférico, que descomponen al glucósido con formación de un compuesto amorfo color marrón rojizo obscuro.

La quercetina reacciona en forma similar en soluciones alcalinas y esta forma de descomposición es típica de los compuestos orgánicos que contienen dos oxihidrilos fenólicos en posición orto.

Expuesta a la acción de la luz solar, experimenta una descomposición semejante. (19).

Por acción del calor, Janderlich (16) ha establecido que la rutina sufre una descomposición, que comienza alrededor de los 125° y se hace completa cerca de los $150^\circ C$, en muy corto

tiempo. Desechada a 150°C , no puede ser obtenida nuevamente por re-cristalización, lo que ha sido comprobado por otros autores (20), los que encontraron que la rutina desechada a 110°C , no retorna a su estado de hidratación original, cuando se la expone a la acción de la humedad ambiente, lo que indicaría la realización de un proceso de descomposición en el seno de la estructura molecular.

Por otra parte, otros autores han establecido que la rutina, secada a temperaturas hasta de 160°C , parece ser perfectamente estable. En contraste con lo dicho mas arriba, se ha informado tambien que la rutina desechada a temperaturas por debajo de 160°C , vuelve a su estado original de hidratación cuando se la expone nuevamente a la acción de la humedad ambiente, pero no es seguro en estos casos que el procedimiento de desecación no haya sido realizado al vacío, (10,12,21):

La rutina presenta una serie de reacciones de coloración, que harían posible su identificación por este procedimiento. Sin embargo, se debe tener en cuenta para ello que muchas flavonas, flavononas, flavonoles y sus respectivos glucósidos dan resultados similares, lo que hace aleatorio su uso.

Por otra parte, es muy posible que algunas de las reacciones que se dan como específicas para la rutina, se deban principalmente a impurezas en el seno de las mismas:

1.- En soluciones alcalinas diluídas, principalmente de hidróxidos alcalinos y alcalinos-térreos, la rutina desarrolla una

intensa coloración amarilla. (22):

2.- Las soluciones de rutina, en medio ácido débil y por agregado de Cl_2Mg en solución, producen una coloración rojiza (23):

3.- La rutina en solución desarrolla una intensa coloración verde, por agregado de unas gotas de Cl_3Fe en solución acuosa o alcohólica. (22):

4.- Reduce rápidamente la solución de nitrato de plata amoniacal, dando el espejo de plata característico:

5.- No reduce el licor de Fehling:

Propiedades farmacológicas:.- La primera referencia que encontramos con respecto a las propiedades farmacológicas de la rutina, se debe a Garino y colab (24) quienes demuestran la existencia de una ligera toxicidad en el compuesto. Lo comprobaron inyectando por vía endovenosa a un perro, 1 gramo del glucósido en solución débilmente alcalinizada por carbonato de sodio y utilizando como testigo otro perro al que le administraron una dosis mayor (dos gramos) por vía oral del mismo compuesto:

En ambos casos, comprobaron la rápida eliminación de la droga por vía urinaria y la presencia de más del 70% de la dosis administrada al cabo de seis horas del comienzo de la experimentación:

Fakuda (25) encuentra en la rutina una fuerte acción diurética cuando se administra por vía oral, y endovenosa

en conejos. Tambien efectuaron la insuflación endovenosa de rutina en los mismos animales de experiencia, en solución Ringer, y comprobaron que la supervivencia del 100% de los animales de prueba se conseguía cuando la concentración máxima de la solución no era mayor de 70 miligramos %.

Un porcentaje de muertes del 100% obtuvieron con animales a los que se les administró rutina sin el medio de Ringer como vehiculo del compuesto activo.

Realizadas otras experiencias en corazón de ranas mantenidas en vida por circulación artificial, nota el autor citado una ligera estimulación de las contracciones cardíacas por inyecciones de rutina; asimismo comprobó una vasodilatación general con la consiguiente disminución de la presión sanguínea en los vasos afectados.

Masoré y Paris (15) prepararon una solución de rutina en alcohol al 30% y piridina al 10% y la inyectaron en perros por vía endovenosa, comprobando los efectos de una ligera toxicidad. La solución de piridina por si sola produce hipotensión con una disminución del volumen sanguíneo sin actuar sobre el corazón.

Con una solución conteniendo 1,5 por Kilo-gramo de peso, comprobaron en perros una disminución de la presión sanguínea de 3 a 5 cms. por debajo de lo normal, con una persistencia del efecto de 3 a 5 minutos. No comprobaron diuresis y por in-

yeción intraperitoneal en conejos de 250 a 500 mg. por Kilogramo de peso, no encontraron ningún efecto tóxico posterior. No fué posible aumentar las dosis de experimentación, por la toxicidad propia de la piridina.

Fundándose en que sobre los animales ácido-ascórbicos deficientes es posible demostrar la actividad de varios flavonoles, Sewin (26) inyectó en un conejo una dosis de 150 miligramos de ramnebol-ramnósido, durante 30 días seguidos y a razón de una dosis diaria variable entre 2 y 5 miligramos.

La resistencia capilar, establecida al comienzo de la experiencia, fué observada al cabo de la misma aumentada en un 40%.

El tratamiento fué suspendido, para dar lugar a la administración de ácido ascórbico (2 miligramos por día) y sucesivamente fueron formando los valores de la resistencia capilar, para concluir comprobando que el ácido ascórbico no tiene la propiedad de mantener la resistencia capilar al mismo nivel que el ramnebol-ramnósido. Además, realizando observaciones diarias con la administración de rutina y ramnebol-ramnósido en conejos con fines comparativos, comprobaron que ambos compuestos presentan aproximadamente la misma actividad, como lo demuestran en la tabla que se transcribe a continuación, y en la que también se consignan los resultados de las mismas experiencias con otros glucósidos.

<u>Ejemplos de aumento de la R.C.^o, para</u>		
<u>1 mgr. de subst. y expresada en cms de Hg</u>		
Rutina:.....	8,50	(de 13,5 a 22 cms.):
Quercetina:.....	3	(de 8,75 a 11,75 cms.):
Ramnetol-ramnósido	10	(de 15,50 a 25,50 cms.):
Extracto Orange N ^o 1	3,50	(de 16 a 19,50 cms.):
" " N ^o 2	2	(de 14,50 a 16,50 cms.):
Hesperidina:.....	1	(de 15 a 16 cms.):

^oR.C.: resistencia capilar.

Consideración de los ensayos clínicos realizados:.- El empleo de la rutina en la terapéutica del ser humano constituye, como afirma J. D. Ratcliff (27) el importante y nuevo uso de una vieja droga, descubierta por Weis en 1842 y que promete quitar a la vejez uno de sus peores peligros, el ataque casi siempre mortal de la apoplejía o derrame cerebral:

"El hombre es tan sano como lo son sus arterias", afirma un viejo adagio en los anales de la medicina. A través de los años ha conservado su valor, aunque es muy probable que esa verdad conocida de antaño, haya hoy en día experimentado ciertas modificaciones:

Una de ellas, es que en la actualidad, en lugar de aceptar como irremediable e inevitable el ataque cerebral por ruptura de los capilares sanguíneos en la edad avanzada, pode-

mos al menos intentar su eficaz remedio, es decir, conservar y preservar la salud del ser humano, no obstante padecer una afección arterial de esa naturaleza.

Muchas investigaciones médicas se dedican hoy a los problemas y achaques de la vejez, especialmente relacionadas con la hipertensión y todas sus complicaciones. En el caso de la apoplejía nos encontramos, al parecer, mejor colocados, al fin.

Dicha enfermedad es, como dijimos, uno de los peligros más serios de la edad avanzada, como a veces también de la madurez. Resulta de la ruptura de un vaso sanguíneo en el cerebro y puede hacer sucumbir en un ataque o puede también convertir a sus víctimas en paralíticos, total o parcialmente, hasta que se repite el ataque, en que entonces es con seguridad, mortal. Todo ello, consecuencia fundamental de la ruptura de la línea vital arterial.

De por sí, la estructura anatómica de los capilares sanguíneos es sumamente frágil y cuando está aumentada, nos encontramos ante un estado patológico denominado "fragilidad capilar anormal" y cuyo origen no ha sido posible dilucidarlo todavía.

Y lo que se ha logrado hasta hoy en día, es comprobar que la rutina actúa como un agente terapéutico eficaz en el tratamiento de ese estado patológico.

Como se sabe, los vasos sanguíneos del cuerpo

forman un sistema continuo que puede dividirse en tres partes principales: a) el sistema arterial que lleva la sangre desde el corazón; b) el sistema venoso que recoge la sangre de los tejidos y la lleva al corazón; c) los capilares, que forman una vasta red de pequeños vasos que penetran en todos los tejidos y sirven para unir el sistema arterial con el venoso. Es en los capilares donde tiene lugar el intercambio de oxígeno y substancias nutritivas por el CO_2 y demás productos de desecho de las células. La pared de un capilar consiste en una capa endotelial delgada y transparente, formada por células unidas estrechamente por un cemento intersticial, llamado ácido hialurónico. Esta delgada capa de células endoteliales que recubre las arterias y venas. El diámetro de los capilares varía de 2 a 15 micrones y su longitud de 0,25 a 0,75 mm. Los más pequeños se encuentran en el cerebro y en la mucosa intestinal y los mayores en la piel y la médula ósea. Un intercambio continuo de líquidos tiene lugar entre los tejidos y el torrente circulatorio. Cuando las paredes capilares adquieren una fragilidad anormal, bajo ciertas condiciones pueden romperse y permitir el paso de la sangre a los tejidos. Cuando ello ocurre en las vías visuales, se produce la ceguera, total o parcial; cuando se produce en el cerebro, queda abierto el camino a la ruptura de vasos más grandes y a la apoplejía.

Los cálculos indican que una de cada cinco personas con alta presión arterial también tienen capilares frágiles; esas personas son diez veces más propensas a los ataques apo-

pléticos que las personas con vasos sanguíneos normales:

Una ruptura de los capilares da lugar a la formación de pequeñas Petequias cuyo número varía con la intensidad del trauma y el grado de fragilidad capilar del sujeto en observación. Este fenómeno permite medir la resistencia capilar, utilizándose para ello diversos procedimientos, basados todos en el aumento de la presión intracapilar o bien provocando en ellos una presión negativa, por succión en las zonas correspondientes:

El procedimiento más conocido entre los primeros es el de Rumpel-Leede, que consiste en la aplicación de un torniquete, generalmente un manguito de aparato de presión, el que se infla algo por encima de la presión diastólica, manteniéndolo así durante unos cinco minutos. Si la prueba es positiva aparecen a los pocos minutos de aflojado el torniquete, por debajo del sitio de la compresión, una cantidad de Petequias, en número groseramente proporcional a la tendencia a las hemorragias del enfermo. Normalmente no deben aparecer más de 10 a 20 Petequias.

Este procedimiento, si bien da una idea aproximada del estado de los capilares en lo que a su resistencia se refiere, no proporciona datos cuantitativos que permitan hablar de grados de anormalidad, o comparar las variaciones que puede sufrir bajo la acción de distintas causas.

El método de Gothlin, permite, en cambio hacer a la vez apreciaciones cualitativas y cuantitativas, por lo que ha sido empleado por casi todos los autores que se ocuparon

de este tema: A continuación describiremos su técnica:

1º :- Marcar una zona circular de 6 cm. de diámetro en la cara anterior de ambos antebrazos. Individualizar todos los puntos o manchas que se encuentran dentro de esa zona y que puedan ser confundidos con petequias;

2º :- Presionar cada brazo con un manguito de un esigmomanoómetro común, manteniendo durante 15 minutos una presión de 35 mm. de Hg., aflojar el manguito, marcar y contar las petequias en cada una de las zonas circulares, empleando para ello una buena luz y una lupa de 5 D o su equivalente;

3º :- Después de una hora o más, repetir la operación, pero elevando esta vez la presión hasta 50 mm de Hg.

El índice petequeal se calcula de la siguiente manera: Al número de petequias encontradas a los 35 mm. de mercurio, multiplicado por ~~1000~~ agregar el número que se encuentra después de comprimir a 50 mm. En base al resultado obtenido se considera que la fragilidad capilar es normal si el índice es igual o inferior a 8; está aumentado o es anormal si su valor alcanza a 13 y está en el límite, pero probablemente es anormal, si el índice oscila entre 9 y 12.

Para ganar tiempo, la segunda parte del procedimiento puede omitirse en las siguientes circunstancias: 1º) cuando el número de petequias después del primer tiempo del examen

os de 2 o menos. En estos casos se puede considerar que se trata de un individuo con fragilidad capilar normal. Cuando el número de petequias no sobrepasa de tres, casi siempre se trata de sujetos normales. 2º) Si en el primer recuento se encuentran 6 o más petequias, puede considerarse como anormal; 3º) si la prueba ya fué hecha en otra oportunidad, se puede comparar el resultado obtenido en el primer tiempo en ambas ocasiones. Esto, siempre que hayan transcurrido por lo menos tres semanas entre una y otra prueba. La segunda parte de la prueba debe realizarse en todos los casos en que se practique por primera vez, y que en el primer tiempo hayan aparecido cuatro o cinco petequias. Debe realizarse también en la mayor parte de los casos en que se han encontrado 3 petequias en el primer tiempo.

El primer informe clínico sobre este nuevo uso de la rutina se debe a Griffith, Couch y Lindanor (28), publicado en el año 1944. En este estudio cooperativo, la rutina fué administrada a cuarenta pacientes con hipertensión arterial maligna y que a su vez mostraban un incremento anormal de la fragilidad capilar, medido por el índice Petoquial de Gothlin.

Una descripción completa del método seguido es transcripta a continuación: la rutina fué administrada por vía oral en cápsulas cuyo peso era de treinta miligramos cada una, una vez al día, aumentando la administración a tres veces por día durante varias semanas. El índice de Gothlin fué determinado cada tres o cuatro horas y por último se fué estudiando los posibles defectos

tóxicos del medicamento, sin encontrar ninguna evidencia posible.

Un paciente murió de apoplejía después de dos semanas del comienzo de la medicación. Once más fueron objeto de una experiencia más duradera, que se prolongó por un espacio de tiempo comprendido entre doce y diez y ocho meses.

La fragilidad capilar medida por el índice de Gothlin volvió a ser normal en ocho casos de los tratados al cabo de dos meses del comienzo de la experiencia. En los tres restantes, permaneció aumentada la fragilidad anormal y en uno de ellos, se produjo un ataque de hipoestesia con hemiplejía persistente, cuatro meses después del comienzo de la medicación.

Ninguna complicación fue observada durante el período completo de la observación en diez de los pacientes, como así también ninguna modificación de importancia en los valores de la presión arterial.

En dos pacientes que se suspendió la medicación con rutina después de haberse logrado el restablecimiento normal de la fragilidad capilar, ésta volvió a ser anormal al cabo de seis semanas.

Como conclusión final, establecen los autores que al menos en ciertos casos la rutina parece tener la propiedad de disminuir la fragilidad capilar en pacientes cuya fragilidad se encuentra aumentada (29).

Scarborough (30) afirma que ha establecido de manera incuestionable por ensayos clínicos la actividad de la

rutina. Su potencia es alrededor de 5.000 unidades provisionales por 100 gramos, definiéndose la unidad provisional como la actividad de un miligramo de W.S.P.I. cuando es ensayada en conejos para la determinación de la presión crítica potequial como describe Bacharach (31) y colaboradores W.S.P.I. es una preparación hecha a partir de harina de corteza de naranja siguiendo el procedimiento de Szent-Gyorgy con algunas modificaciones y empleada en solución acuosa con 19% de calcio soluble.

En Abril de 1946, ante la Conferencia de la American Chemical Society, Couch y Griffith (32) presentaron un informe titulado "Clinical Studies on Rutin therapy in Increased Capillary Fragility".

En un total de 1219 pacientes, estudiados durante un lapso que osciló dentro de los dos años y medio, 21% o sea 255 de los mismos padecían de fragilidad capilar aumentada. Todos ellos fueron tratados con rutina, 60 - 120 mgrs. por día y por vía oral; la fragilidad capilar retornó a lo normal en el 80% de los casos y se mantuvo constante. Algunos de estos casos, continuaron bajo observación largo tiempo, y en veinte de ellos se tuvo conocimiento de ataques apopléticos. En todos los casos, la fragilidad capilar volvió a la normalidad y no se tuvo conocimiento de nuevos ataques.

También se estableció que en veinte casos de hemorragia retiniana, fué observada una notable mejoría y que en cuatro de ellos ocurrieron posteriormente nuevas hemorragias.

Por último, establecieron dichos autores que la rutina no aparenta tener efectos tóxicos en las dosis utilizadas, a lo sumo se notaron síntomas alérgicos hacia el trigo sarraceno, fuente de la cual fué extraída la droga para las experimentaciones.

En una serie de 32 casos divididos en seis grupos, Shanno (33) demuestra que la rutina no es tóxica para el ser humano en las dosis empleadas. Trece de estos pacientes tenían fragilidad capilar aumentada y todos fueron tratados con rutina. Otro grupo de once personas fueron tratadas con bio-cianato de potasio y rutina al mismo tiempo. De estos, siete tenían la fragilidad capilar normal, mantenida con dosis convenientes de rutina, mientras dos de los tratados con bio-cianato solamente presentaron un incremento en el Índice de Gothlin, que finalmente volvió a ser normal con la administración de rutina.

En un paciente con el Índice de Gothlin incrementado, la rutina fué administrada en primer lugar, a continuación se le administró bio-cianato después que el índice volvió a ser normal y así fué mantenido el nivel normal por la medicación combinada.

En dos casos de hemorragia pulmonar de origen desconocido, la rutina fué administrada con cese total de la hemorragia y retornó a la normalidad del Índice de Gothlin.

Concluye su informe estableciendo que la ru-

tina tiene una acción en la fragilidad capilar que parece ser igual o posiblemente superior a la que muestran los compuestos del grupo de la hoesperidina:

Griffith, Lindauer, Shanno y Couch (31) describen sus experiencias clínicas en el estudio de la rutina. Fue utilizada una dosis diaria de 60 mgr. en el 72% de los pacientes, en forma oral y dividida en tres administraciones diarias:

En 0,5% de los casos, la dosis fué muy superior, de 180 mgrs. por día, y conclusión definitiva, establecieron que el Índice de Gethlin volvió a la normalidad en el 75% de los casos, con variaciones de poca importancia, en el resto de los pacientes tratados. Por último, que la rutina puede ser administrada con buenos resultados al comienzo del tratamiento, y continuar éste con la terapéutica clásica de los bicocianatos:

Recientemente, el "Council on Pharmacy and Chemistry" de E. E. U. U. (34) publicó un informe oficial respecto de los numerosos artículos aparecidos en la prensa americana anunciando a la rutina como una droga maravillosa en el tratamiento de la hipertensión arterial:

Manifiesta que en realidad todavía no es posible dar a esta nueva droga una importancia mayor que la que las experiencias realizadas demuestran y que por lo tanto son infundados y hasta perjudiciales los informes que se han publicado. Antea sobre la hipertensión arterial como efecto secundario de su acción terapéutica en la disminución de la fragilidad capilar aumentada.

y en consecuencia - concluye el informe - es de esperar que solo los estudios clínicos del futuro confirmen lo que ahora se vaticina:

-----000000-----

C A P I T U L O IV

CONSIDERACION DE LOS METODOS DESCRIPTOS PARA LA EXTRACCION E

IDENTIFICACION DE LA RUTINA: -

Numerosas son las fuentes de origen que se han establecido para la rutina, al punto que se ha comprobado que es uno de los glucósidos más distribuidos en el reino vegetal.

Fuó aislado e identificado por primera vez a partir de la Ruta graveolens (WEISS, 1842) y desde ese entonces han sido señaladas numerosas especies: Charaux (18) estableció que se halla distribuido tanto en las flores como en las hojas de más de veinte familias de Dicotiledóneas, como también lo señala Gollán (17), al comunicar en un resumen que a continuación se transcribe, todas las especies vegetales en que había sido hallado:

<u>Familia</u>	<u>Especie</u>	<u>Organo</u>
	I. <u>Dialipótalas</u>	
Rutáceas	Ruta graveolens	H Hojas
Caparidáceas	Capparis spinosa	
Papaveráceas	Escholtzia californica	
Violáceas	Viola tricolor	"

<u>Familia</u>	<u>Especie</u>	<u>Organo</u>
I: <u>Dialipétalas</u>		
Leguminosas	Sophora japónica (L)	Botón floral
"	Tephrosia purpúrea	Hojas
"	Daviesia latifolia	"
Mirtáceas	Eucalyptus macrorryhchia (L)	"
Araloáceas	Hedera helix (L)	"

<u>Familia</u>	<u>Especie</u>	<u>Organo</u>
II: <u>Gamopétalas</u>		
Globuláceas	Globularia alypum	Hojas
Borragináceas	Lithospermum officinale (L)	"
Solanáceas	Solanum tuberosum	Flores
"	Solanum lycopersicum	Hojas
"	Nicotiana glauca	"
Oloáceas	Forsythia pendula	Flores
Caprifoloáceas	Sambucus nigra	"
Rubiáceas	Galium cruciata	"

III: <u>Apétalas</u>		
Poligonáceas	Polygonum fagopyrum	Flores y hojas
Salicáceas	Salix triandra	Hojas
Santaláceas	Osyris compressa	"
"	Osyris abyssinica	"

aislaron rutina en una variedad de hortensia de jardín, Hydrangea paniculata, var. grandiflora:

Se comprobó también la presencia de rutina en el tabaco curado al humo. Inicialmente fué esta fuente la indicada para la extracción en escala industrial del glucósido en los "Laboratorios de Investigaciones Regionales del Este", dependientes del Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (19).

Sin embargo el rendimiento era muy bajo, alrededor de un 0,4%, por lo que fueron estudiados otros tipos de tabacos, especialmente los curados al aire, pero se encontró también que contenían poquenísimas cantidades de rutina. Debido a ello, y al costo elevado de la materia prima, la droga tenía un precio considerable, por lo que J. Couch, J. Naghski y Krowson (14) iniciaron ensayos con el fin de hallar una fuente más económica de rutina.

De todas las numerosas especies vegetales estudiadas, la más promisoras fué el alforfón, o trigo sarraceno (Polygonum fagopyrum).

Las investigaciones de J. Couch y colaboradores consistieron en estudiar el contenido en rutina de las plantas en diferentes etapas de su crecimiento y en los diferentes órganos de las mismas, tallo, hojas y flores. Obtuvieron un rendimiento del 3-5%, reduciendo considerablemente el costo de la droga. Comprobaron también que el contenido de rutina es más elevado cuando la planta tiene de 3 a 5 capullos y decrece con su maduración. Cuando la planta ha dado semillas, contiene muy poca rutina. Si se deseca lon-

tamente, se pierde un gran porcentaje de rutina, por lo tanto la desecación rápida es esencial para la extracción de rutina.

Ya Schunck (11) había hallado en esta especie y en sus flores, rutina en la proporción del 6,11% y Wundorlich (16) un rendimiento superior, calculado en un 2%, a partir de las flores secas de la planta.

Brandl y Schartle (36), hallaron un rendimiento de 1,78% en las hojas frescas, 0,71% en las flores frescas, 0,09 % en los tallos y 1,02 % en la planta total seca:

Métodos de extracción

Los métodos que se han descripto para la extracción de rutina a partir de varias especies vegetales, utilizan alcohol etílico, agua caliente y ácido acético también caliente, como solventes; sin embargo, en general, se utiliza el primero de los mencionados, por no presentar los demás, ventajas que hagan de utilidad su empleo:

Schunck (11) obtiene rutina a partir del alforfón o trigo sarraceno, ya sea empleando la planta verde o la planta especialmente desecada. Para extraerla del alforfón verde, la planta entera es macerada en alcohol etílico durante 24 horas, la solución se reemplaza por alcohol nuevo y se deja otras 24 horas en maceración. Por concentración del extracto alcohólico mediante destilación, se obtiene una mezcla de rutina, materias grasas y pigmentos; se toma la mezcla con benceno para separar las grasas y demás impure

zas y el extracto así purificado se toma con agua caliente, se filtra y por reposo cristaliza la rutina; por último, se recrystaliza dos veces en agua para obtener la rutina pura.

Han sido descriptos también métodos para la extracción de rutina partiendo de las hojas y flores secas del alforfón (19). Uno de ellos, utiliza agua caliente como solvente.

Las hojas y flores son separadas del tallo y molidas; se hacen tres extracciones de treinta minutos cada una, que separan el 97% del glucósido. El extracto se filtra y se concentra al vacío, las sustancias protéicas y coloides se coagulan con alcohol al 95% y se separan por filtración; el filtrado se evapora hasta separar casi todo el alcohol, resultando la cristalización de rutina, que se purifica finalmente por recrystalización.

Otro de los métodos descriptos emplea alcohol de 70° como solvente. Se prepara, como en el método anterior, un polvo fino de las hojas que se trata con tres extracciones de 12 horas cada una; el extracto se concentra al vacío, las grasas y otras sustancias que se extraen también con alcohol, diluido, se eliminan por filtración en caliente y extracción con benceno. La rutina cruda es recrystalizada dos veces en agua para obtener el producto puro.

Charaux (13) describe el siguiente método para la extracción de rutina a partir de varios vegetales. La planta seca y pulverizada es agotada por alcohol hirviendo, el extracto

alcohólico es adicionado de agua caliente y filtrado. Después de un enfriamiento conveniente, se lava la solución acuosa con dos veces su volumen, de éter; se decanta y por enfriamiento comienzan a depositarse los cristales de rutina. En especies vegetales con escaso contenido de este glucósido, el depósito se produce a partir de varios días. Ocasionalmente es necesario efectuar una concentración para obtener la separación del glucósido.

Otro método empleado para la extracción de rutina propuesto por Bridel y Beguin (37), utilizado en las hojas del Salix triandra (salicáceas), se basa en los lineamientos generales de los métodos ya descritos. Utiliza, por una parte, hojas recogidas en pleno desarrollo y por otra, hojas y flores jóvenes; todo es tratado por digestión en alcohol hirviendo, se elimina el alcohol por destilación en baño de agua y el residuo se toma con éter para eliminar las materias grasas; se toma el marco con agua caliente y por reposo, la solución acuosa deja depositar los cristales en forma de agujas amarillentas características.

J. Collán (17) extrae la rutina utilizando como solvente alcohol de 80° calentando a ebullición, filtra y elimina el alcohol del filtrado por destilación, el líquido acuoso es lavado con éter para eliminar las impurezas y la rutina cristaliza finalmente por reposo; la purificación se obtiene por recristalización usando alcohol etílico diluido como solvente.

J. Couch y J. Naghski (35) extraen la rutina a partir de una variedad común de hortensia de jardín Hydrangea paniculata, var. grandiflora, utilizando las flores jóvenes recién extraídas, que son digeridas en alcohol durante varias horas. El solvente es eliminado por destilación y el residuo es liberado de grasas y resinas con benzol; por último, es extraído con agua calentada a ebullición filtrada; por reposo y enfriamiento, cristaliza la rutina que luego es recristalizada por disolución en agua hirviendo.

Finalmente, J. Naghski, J. L. Porter y J. Couch (13) extraen rutina a partir de dos variedades de la Forsythia pendula (Oleácea). Se basa, como los otros métodos anteriormente descritos, en la extracción por alcohol y posterior concentración del extracto alcohólico por destilación a presión reducida, dilución con agua y nueva concentración para eliminar totalmente el alcohol.

El extracto es filtrado rápidamente por papel y el líquido obtenido tomado con éter para eliminar las materias grasas emulsionadas. Finalmente, por reposo y a temperatura ambiente, durante dos días, se separa la rutina cristalizada (rendimiento: 2%).

La purificación de los cristales se efectúa por recristalización a partir de agua hirviendo.

Métodos de identificación: Entre los métodos que se han indicado

para la identificación de la rutina, si bien no muy numerosos, encontramos en ellos los que tienen verdadero valor y los que, si bien se recomiendan, no poseen un valor decisivo para el fin buscado. Aquí encontramos entre los primeros, aquellos que se basan en los principios generales que se utilizan para la caracterización y análisis de las sustancias orgánicas aisladas o sintetizadas, como son: determinación de carbono e hidrógeno, determinación del punto de fusión, de la forma amorfa o cristalina en que se presenta, solubilidad, poder rotatorio específico, espectro de absorción y en este caso especial, por tratarse de un glucósido la hidrólisis química y enzimática, con posterior reconocimiento de los productos provenientes de la misma.

En cuanto a los correspondientes al otro grupo de medios de caracterización, de escaso valor práctico, se tienen las reacciones colorimétricas y la obtención de derivados:

1. Determinación de carbono e hidrógeno.

No hemos encontrado en revisión bibliográfica del tema, mayores datos al respecto, existiendo una publicación de J. Couch y M. Naghski (35) que hemos tomado, como guía para nuestras experiencias.

Sin embargo y por considerarlo suficiente, hemos seguido los procedimientos generales establecidos para la investigación cualitativa y cuantitativa de los elementos que pueden existir en una especie química de naturaleza orgánica, que

en nuestro trabajo se limitan a la determinación de carbono e hidrógeno. El primer elemento que tratamos de comprobar, es el carbono, ya que sin él no habría sustancia orgánica. Cuando en un ensayo preliminar, la sustancia bajo la acción del calor se carboniza o arde con llama fuliginosa, es evidente que contiene carbono, para confirmarlo se usa el método de oxidación por el óxido de cobre y posterior identificación de los productos de reacción.

De esta manera se comprueba la presencia de carbono; el hidrógeno se determina por la formación de gotitas de agua en las partes más frías del aparato, por condensación del vapor de agua formado y por último se debe determinar la existencia de oxígeno, aunque no existe hasta el presente ningún procedimiento práctico que ponga en evidencia a tan importante elemento de una combinación orgánica. Se dosa siempre cuantitativamente, por diferencia con el carbono e hidrógeno.

Una vez establecida la presencia de estos elementos, se determina a los mismos en forma cuantitativa, para ello se pesa una determinada cantidad de la sustancia problema, se quema a continuación por medio del óxido de cobre calentado al rojo y se hacen pasar los gases de combustión a través de aparatos de absorción, cuyo aumento de peso determina la cantidad de anhídrido carbónico y agua formados. A partir de los pesos obtenidos y en base a la relación $C:CO_2$ y $H_2:H_2O$, se hallan los porcentajes de carbono e hidrógeno que existen en la sustancia problema. (38).

2. Determinación del punto de fusión:-

Esta determinación nos permite el medio de establecer no solo un importantísimo criterio sobre la pureza de la sustancia que hemos aislado, sino también para caracterizarla e identificarla: (39).

Sin embargo, nos hemos encontrado con la dificultad de no existir para la rutina, un completo acuerdo entre todos los valores que se han publicado con respecto al punto de fusión de esta sustancia. Además este glucósido pertenece al tipo de sustancias orgánicas que no funden de una manera neta, sino que se aglomera, ablanda y finalmente entra en descomposición, que se observa macroscópicamente por un ennegrecimiento de toda la masa. De aquí que los autores americanos denominen a esta propiedad "the plastic range molting point" (13).

Por estos antecedentes hemos creído conveniente practicar todas las determinaciones, que, si bien no encontramos en la bibliografía consultada, nos darán un dato lo más aproximado posible, siguiendo el orden general establecido para estos casos en química orgánica. Así se practicó la determinación del punto de fusión ordinario, corregido, punto de fusión instantáneo (block de Fisher) y finalmente el punto de fusión mezcla.

Entre los autores que hemos consultado J. Collán (17), señala que el punto de fusión instantáneo es difícil de determinar y que es alrededor de 196°C .

Charaux (18) da un valor que oscila entre

182° y 192°C. y establece que el pasaje al estado líquido es incompleto.

Sando y Bartell (40) dan un resumen de los valores recopilados, que ofrecen también divergencia con los ya citados.

J. Couch y J. Maghski (35) establecen que en sus determinaciones han encontrado para la rutina un punto de fusión de 190°-192°C. Finalmente, J. Maghski, W.L. Porter y J. Couch (13) indican un punto de fusión de 189°-193°C. -

3. Determinación del estado en que se presenta:-

Es esta una determinación que si bien no tiene una importancia fundamental, la hemos practicado teniendo en cuenta una regla química general que tilda de sospechosas en cuanto a su pureza, a aquellas sustancias que no es posible obtener en forma cristalina, sin que por ello implique afirmar que las sustancias amorfas no puedan ser verdaderas especies químicas. Por otra parte quisimos comparar la forma cristalina de la sustancia aislada, con la publicada en diversos trabajos; por observación microscópica y comparación fotomicrográfica y tener de esta manera un dato más en la identificación de la sustancia aislada.

4. Pruebas de solubilidad:-

Fueron realizadas partiendo de una muestra de sustancia recristalizada varias veces para tener la mayor

seguridad de su pureza, y de acuerdo a las diversas temperaturas y solventes fijados por los autores, como se describe en la parte correspondiente de este trabajo.

El método general empleado (41) consiste en calcular la solubilidad saturando el disolvente por agitación con un exceso de la sustancia, finamente dividida, durante un cierto tiempo y a una temperatura fija, t° . luego se deja reposar y tomando un peso dado de la solución límpida, se evapora a sequedad, pesando el residuo remanente. Con las cifras halladas se calculan los resultados que se expresan ordinariamente de la siguiente manera: 100 g. del disolvente disuelven xg de sustancia a temperatura t°

5. Hidrólisis química.-

Charaux (18) identifica la rutina efectuando la hidrólisis del glucósido y posterior identificación de los productos de desdoblamiento. La hidrólisis la realiza calentando al baño-maria durante cuatro horas al glucósido con 100 veces su peso de H_2SO_4 al 4%.

El depósito insoluble de quercetina lo separa por filtración de la solución ácida y la identificación la realiza por el método de Liebermann. Obtiene primero el derivado bromado y para ello agrega 2 partes de bromo a 3 partes de quercetina en suspensión en ácido acético y alcohol etílico. Obtiene un precipitado compuesto por finas agujas de color amarillo pálido y cuya composición calcula de la siguiente manera:

$C_{15} H_8 O_7 Br_2$.-

La solución ácida proveniente de la hidrólisis anterior, la neutraliza con carbonato de calcio, filtra y evapora la solución a sequedad. El residuo seco, tratado por alcohol de 95°C . calentado a ebullición , cede la mezcla de los dos azúcares, cuya separación final se efectúa basándose en las solubilidades respectivas en agua y alcohol.

Para la separación de la ramnosa, después de haber filtrado, evapora a seco y toma el residuo por agua destilada. Es suficiente concentrar la solución hasta consistencia de jarabe, para obtener, al cabo de un día, un depósito cristalino de ramnosa, mientras que la glucosa queda en las aguas madres.

En cuanto a la glucosa, para obtener su cristalización a partir de las aguas madres, agrega alcohol absoluto, concentra y en estas condiciones la glucosa poco soluble en el alcohol absoluto se deposita, mientras que la ramnosa queda soluble. Finalmente, identifica los azúcares aislados por sus constantes físicas y por la formación de osazonas.

Naghski, Porter y Couch, (13) pesan 0,324 g. del glucósido e hidrolizan con $H_2 SO_4$ dil., posteriormente, caracterizan los productos de la hidrólisis resultante. El aglucon quercetina, por su punto de fusión (314°-315°C) y el de su derivado acetilado (195°-196°C) en la misma forma.

El punto de fusión mezcla, realizado con pentaacetato de quercetina, de P. de F. 195°-196°C. dió un valor

idéntico, 195°-196°C.

Las fenil osazonas de los azúcares las preparan y fraccionan con acetona y la fracción soluble, después de ser recristalizada a partir de una solución de piridina y etanol en caliente, funde a 180°-183°C. siendo el punto de fusión mezcla, realizado con ramosazona (P. de F. : 179°-180°C.) de 179°-180°C.-

La parte insoluble en acetona, también recristalizada a partir de una solución de piridina y etanol, funde, a 202°C., siendo el punto de fusión mezcla, realizado con glucosazona (P. de F.: 207°-208°C.) de 204°-205°C.-

J. Collón (17) efectúa la hidrólisis sulfúrica haciendo hervir 1 g del glucósido secado al aire en 100 cc. de H_2SO_4 al 4% , durante dos horas. El insoluble producido (quer cetina es recogido lavado y secado, para determinar el rendimiento obtenido con respecto al peso total del glucósido seco utilizado.

El líquido filtrado de la operación anterior fué llevado a un volumen de 200 cc., dando 0,5466 g de azúcar reductor. Presentó una rotación de 10° para l=2 y $[\alpha]_D^{20} = 30,49^\circ$, y resultado positivo a la reacción del metilfurfuro.

Ch. Sando y Bartlett (40) realizan la hidrólisis de la rutina, calentando el glucósido a ebullición con H_2SO_4 al 5% y recogen el insoluble de quercetina, cuyos cristales son lavados en caliente y secados a 140°C. Una identifica-

ción a juicio de los autores satisfactoria, del compuesto la obtiene por acetilación con anhídrido acético, obteniendo un pentaacetil derivado, que funde a 189°-191°C.

Para la posterior identificación de los azúcares resultantes, los autores siguen el método de Perkin (42) por el cual se separa glucosazona y ramosazona puras de las dos osazonas mezcladas, utilizando sus diferentes solubilidades en acetona para la primera separación, siguiendo con la recristalización a partir de una solución de piridina al 5% en agua y luego purificando el producto final en alcohol al 20%.

El punto de fusión de la ramosazona es de 181°-182°C y el de la glucosazona de 205°-207°C. Los autores observan que no pudieron distinguir exactamente los tipos de cristales característicos en la mezcla de las dos osazonas antes del fraccionamiento por acetona, pero que después de la purificación la glucosazona y ramosazona cristalizaron en la forma típica conocida.

Bridel y Beguin (37) al efectuar la hidrólisis de la rutina obtuvieron 51% de insoluble y 51,7% de azúcar reductor expresado en glucosa. Esta última fué obtenida cristalizada y caracterizada por la forma de los cristales y el poder rotatorio de su solución.

Para identificar la quercetina, efectúan la hidrólisis enzimática y purificaron el producto por recristalizaciones repetidas en alcohol de 60°C. Efectuada la de-

terminación del punto de fusión, se comprobó - agregan los autores- de igual modo que el producto puro, con una fusión pastosa poco neta hacia los 290°C. Siguieron la técnica de Charaux (18) para obtener el derivado acetilado y el producto obtenido, purificado en una mezcla de partes iguales de ácido acético y alcohol de 95°, cristalizó en largas agujas, muy finas, de punto de fusión 236°-237°C.

E. Schuck (11) obtiene un compuesto acetilado, por acción del anhídrido acético y acetato de sodio, que cristaliza en finas agujas blancas con la misma apariencia y con las mismas propiedades que el que obtiene a partir de la quercetina pura. Considera que el producto soluble obtenido por acción del H_2SO_4 sobre la rutina y quercetina, es la ramnosa:

Es obtenida a partir del líquido de filtración de la hidrólisis previa, después de eliminar el ácido por evaporación hasta consistencia siruposa, disolviendo el residuo en alcohol absoluto. Agrega a continuación éter de petróleo y deja en reposo para permitir el depósito cristalino lentamente. Finalmente comprueba que la substancia así obtenida, presenta las mismas características físicas y químicas que la ramnosa de la quercetina.

6. Determinación del poder rotatorio específico:-

Es muy dificultoso el estudio de las soluciones de rutina con el polarímetro, como lo ha establecido J. Collán (17), pues debido al color amarillo de las soluciones es

muy dificultoso usar como longitud de onda de referencia la correspondiente a la luz de sodio (línea D del espectro).

Además, en la literatura consultada encontramos divergencia en cuanto a los valores dados por los autores, la mayoría trabajando en distintas condiciones, por lo que no hemos hallado un dato de suficiente valor al cual referir nuestras determinaciones.

J. Collán (17), trabajando con un polarímetro común y utilizando como longitud de onda de referencia, la correspondiente a la luz de mercurio (raya verde) de $\lambda = 5461 \text{ \AA}$, un poder rotatorio específico de

$$[\alpha]_{5461}^{20} = -36^{\circ}; \text{ para } p = 0,0999; v = 20; l = 2; \alpha = 0,363^{\circ}$$

Rebaté y Dassy (43), trabajan solubilizando la rutina en alcohol de 50° , y obtienen los siguientes valores $[\alpha]_{D}^{20} = -30^{\circ}$; para $p = 0,05$; $v = 20$; $l = 4$; $\alpha = -18'$

Rebaté (44), efectúa también las determinaciones del poder rotatorio, utilizando la luz de mercurio, en solución de alcohol de 50° y con un tubo de 2 decímetros. Obtiene así los siguientes valores: $[\alpha]_{5461}^{20} = -34,18^{\circ}$; para $p = 0,0942$; $v = 20$; $l = 2$; $\alpha = -0,32^{\circ}$

Eridel y Beguin (37), determinan el poder rotatorio específico, en solución alcohólica de 50° y utilizando directamente la luz de sodio: $[\alpha]_{D}^{20} = -34,06^{\circ}$; $p = 0,1541$; $v = 15$; $l = 20$
 $\alpha = -0,7^{\circ}$

Estos mismos autores y en otro trabajo publicado (45), sin mayores detalles comunican que para la rutina

anhídra, el poder rotatorio específico hallado es el siguiente:

$$[\alpha] = -36,22$$

7. Determinación del espectro de absorción:

Tomando como única guía hallada en la revisión bibliográfica del tema, en trabajo de Naghaky, Porter y Couch (13), efectuamos la determinación espectrofotométrica de la substancia aislada, con los inconvenientes propios de la falta de información necesaria, por lo que nos limitamos en la parte experimental a describir la labor realizada de acuerdo a lo establecido por los autores mencionados:

No obstante ser el espectro de absorción de la rutina muy semejante al de la quercetina y otros derivados de las flavonas, es el método de más valor para su caracterización y análisis; por ello, hemos tratado de realizarlo salvando las dificultades antes mencionadas.

P A R T E

E X P E R I M E N T A L

C A P I T U L O V

EXTRACCION DE LA RUTINA:-

a) Preparación del material:

Se efectuó la recolección de las inflorescencias de *Hydrangea macrophylla* (hortensia) eligiendo las más recientes, es decir, aquellas que no mostraban un período de crecimiento avanzado; Asimismo, se tuvo preferencia por las que no presentaban alteraciones y que crecían al abrigo de la radiación solar directa.

Se cortaron a nivel de las primeras ramificaciones del pedúnculo floral y de inmediato se transportaron al laboratorio, donde se las despojó de hojas y pedúnculos y se pesó el total de la muestra: 3,250 Kgrs.

Fueron fraccionadas hasta conseguir un producto groseramente dividido y se pesaron 5 fracciones de 400 gramos que se dejaron en maceración con dos litros de alcohol de 95° cada una, o sea la proporción de una parte de muestra por cinco de solvente.

b) Determinación de humedad:

En cápsula de porcelana previamente tarada, se pesaron 10 gramos de la muestra recién recolectada y se llevaron a estufa a 105° hasta peso constante; realizado el cálculo correspondiente, se obtuvo el siguiente resultado: 69,0% de humedad, que pierde a 105°C.

c) Extracción:

El método adoptado se basa en el descrito por J. Couch y J. Naghski (33) utilizado por los autores para la extracción de la rutina de la *Hydrangea paniculata*, var. *grandiflora*.

Se efectuó la extracción colocando la muestra preparada como se señaló en un balón de 3 litros de capacidad, provisto de refrigerante a reflujo y baño de agua. Se agitó energicamente la mezcla y se dió comienzo al calentamiento, manteniéndose un suave reflujo durante las 7 horas que demandó la operación.

Una vez finalizada, se filtró en caliente el extracto alcohólico obtenido, a través de filtro papel plegado, utilizando por encima de éste una tela de filtración, con el objeto de separar las partes más gruesas, del extracto. El marco resultante fué extraído con una nueva porción de alcohol de 95% (1.500 cc.) operando como anteriormente y adjuntando el extracto alcohólico obtenido al anterior.

El líquido total de extracción (3.300) de color amarillo rojizo y reacción neutra al tornasol, contenía abundante sustancia en suspensión.

Fuó concentrado a presión reducida hasta obtener un volumen aproximado de 100 cc., se agregó entonces 50 cc. de agua y se continuó la destilación a vacío hasta obtener un extracto de consistencia siruposa, que fué lavado con dos porciones sucesivas de benceno de 10 cc. cada una con el objeto de eliminar sustancias grasas, resinas y demás impurezas extraídas por el al-

cohol:

El residuo así lavado, fué extraído con tres porciones sucesivas de 30 cc. de agua destilada calentada a ebullición y que posteriormente fueron filtradas en caliente por papel previamente humedecido. La solución acuosa, 90 cc., de color amarillo obscuro, se dejó durante cuatro días en reposo en refrigerador.

Al cabo de este tiempo, se notó el depósito de un precipitado color amarillo pálido, ténue y muy abundante. Se filtró por Buchner y se recogió aparte el precipitado, que fué posteriormente desecado a temperatura ambiente. Se pesó y se determinó el rendimiento con respecto a la muestra utilizada (89% de humedad), con el siguiente resultado:

peso obtenido 0.70 g.
Rendimiento calculado sobre materia seca 0,31%

La substancia fué recristalizada a partir de una solución hidroalcohólica de la siguiente forma: fué disuelta en 2,5 cc. de alcohol absoluto, calentando suavemente para favorecer la disolución; se agregaron 65 cc. de agua calentada a ebullición y se filtró en caliente. El líquido filtrado, de color amarillo claro, se mantuvo en refrigerador durante dos días, separándose la rutina como un polvo amarillo-limón.

Se filtró, secó a temperatura ambiente y se pesó nuevamente, con el siguiente resultado:

Peso obtenido: 0,66 g.
Rendimiento calculado sobre materia seca: 0,30%

Una vez que se tuvo la seguridad de que la sustancia aislada en la experiencia anterior era rutina -como se demuestra más adelante- fué nuestro propósito estudiar el rendimiento de la planta en relación a su diferente distribución geográfica y distintos períodos de crecimiento. Utilizamos la misma técnica de extracción y se modificó únicamente la cantidad de muestra utilizada, en el sentido de obtener la mayor cantidad posible de sustancia y poder trabajar con comodidad en las distintas técnicas utilizadas para la identificación de la sustancia aislada.

En el cuadro siguiente, están descriptas las condiciones de trabajo y los resultados obtenidos.

Determinación del rendimiento de la planta en relación a su distribución geográfica.-

Ensayo N.º 1.-

Ejemplares de *Hydrangea macrophylla* (hortensia) recolectados en las riberas de San Fernando (Pcia de Bs.As.) en Enero de 1948.-

Planta en completo desarrollo, con suelo húmedo y desprovistas de protección a la acción de los rayos solares y a los vientos generalmente húmedos de la zona.

Inflorescencias bien desarrolladas con el perianto petaloide uniformemente coloreado en azul claro y los bordes en su mayor parte irregulares y levemente quemados por la radiación solar intensa.

Cantidad de muestra utilizada: 3,250 Kgs.

Humedad (que pierde a 105°C) 91%.

Proporción de solvente (alcohol de 95°) a droga utilizada: 5 a 1.

Peso de rutina obtenido: 1,07 g.

Rendimiento calculado sobre materia seca: 0,36 %.-

Ensayo N° 2.-

Ejemplares de hortensia de jardín (invernadero) recolectados en Mar del Plata en marzo de 1948.

Planta con buen desarrollo, con suelo húmedo constante por riego artificial, completamente protegida de la radiación solar directa y de los vientos de la región.

Inflorescencias bien desarrolladas, con el perianto petaloide mostrando una coloración azulada y blanca, irregularmente distribuida, con los bordes lisos y perfectamente conservados.

Cantidad de muestra utilizada: 3.180 Kgs.

Humedad (que pierde a 105°C) 87%.

Proporción de solvente (alcohol de 95°) a droga empleado: 5 a 1.

Peso de rutina obtenido: 0,92 g.

Rendimiento calculado sobre materia seca 0,21%.-

Ensayo N° 3.-

Ejemplares recolectados en la zona de Punta Lara (La Plata), en Enero de 1948.

Plantas en óptimo desarrollo, sin alteraciones en las inflorescencias y con el perianto petaloide de co-

lor azulado uniforme:

Cantidad de muestra utilizada: 2 Kgs.

Humedad (que pierde a 105°C) 89%.

Proporción de solvente (alcohol de 95°) a droga utilizada: 5 a 1.

Peso de rutina pbtonido: 0,68 g.

Rendimiento calculado sobre materia seca: 0,30%.-

Determinación del rendimiento de la planta en relación a distintas etapas de su desarrollo vegetativo.-

Con ejemplares provenientes de la zona de S. Fernando (Pcia. de Bs.As.) se practicó un estudio comparativo del rendimiento en rutina, en relación a dos etapas del proceso de desarrollo vegetativo de la planta:

Ensayo N° 4.-

Ejemplares en completo desarrollo vegetativo. Inflorescencias bien desarrolladas y perianto petaloide mostrando una coloración azulada viva, con bordes lisos bien conservados.

Cantidad de muestra utilizada: 3,420 Kgs.

Humedad (que pierde a 105°C) 91%.

Peso de Rutina obtenido: 1,01 g.

Rendimiento calculado sobre materia seca: 0,32%.-

Ensayo N° 5.-

Ejemplares recolectados en el período posterior a la maduración completa, con los corimbos umbeliformes mostrando el perianto petaloide semi-destruido, de bordes muy irro

gulares y de coloración parduzca atenuada:

Cantidad de muestra utilizada: 3,400 Kgs.

Humedad (que pierde a 105°C) 65,--

Poso de rutina obtenido: 0,48 g.

Rendimiento calculado sobre materia seca 0,040 %.-

De lo que antecede, hemos sacado en conclusión que, en general, la distribución geográfica de la especie, dentro de las mismas condiciones para el desarrollo vegetativo, no influye sobre el rendimiento que en rutina se puede obtener; en cambio es notoria la diferencia que hemos encontrado en el estudio del rendimiento con relación a dos etapas del desarrollo de la planta.

En el caso del ensayo N° 5 , se comprueba que el principio activo tiende a desaparecer- posiblemente por acción enzimática- cuando la planta comienza a perder su óptimo desarrollo:-

-----000000-----

C A P I T U L O VI

Identificación de la sustancia aislada (rutina)

a) Determinación de carbono e hidrógeno:

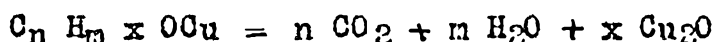
Hemos practicado esta determinación siguiendo el camino establecido en general para la determinación de la naturaleza de las sustancias aisladas, realizando por lo tanto en primer lugar la prueba de la existencia de carbono, para tener así la seguridad de hallarnos ante una sustancia orgánica, en segundo lugar y en la misma reacción anterior, la determinación de la existencia de hidrógeno, para determinar por último estos elementos cuantitativamente.

Para ello, hemos seguido las técnicas descritas en Zappi, Tratado de Química Orgánica, Bs. As., El Ateneo, Irs. Ed. tomo I, 2da. parte, pág. 47. 1944. ya que en el trabajo que citamos con anterioridad, no se dan los detalles al respecto.

Para el ensayo cualitativo del carbono, se pesa 0,1 gr. de la sustancia aislada y se mezcla con aproximadamente 0,50 grs. de óxido de cobre. Se introduce la mezcla en un tubo de ensayo Pyrex, para que sea resistente al calor y se recubre la mezcla con un exceso de óxido de cobre, 2 gramos en total. Se adapta un tubito de desprendimiento cuyo extremo pesca en una solu

ción de hidróxido de bario y se calienta fuertemente comenzando por la parte superior:

La sustancia se volatiliza por acción del calor y sus vapores, en contacto con el óxido de cobre caliente, se descomponen dando dióxido de carbono y agua, de acuerdo con la reacción siguiente:

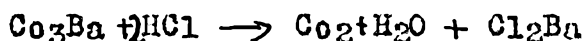


El dióxido de carbono burbujea en la solución de hidróxido de bario, dando se observó un enturbiamiento por precipitación del carbonato de bario, y cuya formación comprobó que la sustancia que analizábamos tiene carbono en su molécula.

En la determinación de la presencia de hidrógeno, la formación de globitos de agua en las partes más frías del aparato, nos demostró la existencia del otro elemento investigado.

Previamente a la iniciación de la reacción calcinamos el óxido de cobre a emplear para tener la seguridad de su pureza, ya que cualquier impureza de naturaleza orgánica, nos hubiera dado resultado positivo en el ensayo.

Por último y para tener la certeza de que el precipitado blanco obtenido era de carbonato de bario, lo tratamos con unas gotas de HCl, notando una pequeña efervescencia, debido a la descomposición del carbonato en anhídrido carbónico y agua, según la siguiente reacción:



La presencia de oxígeno no fué determinada en este ensayo cualitativo, pues no existe hasta ahora ningún procedimiento práctico que demuestre la presencia de este importante elemento de una combinación orgánica.

En la determinación cuantitativa de carbono e hidrógeno, (°) se utilizó la técnica conocida como semimicro-método o método al centigramo.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Substancia quemada.....	0,1574 g.
CO ₂ producido.....	0,3030 "
H ₂ O "	0,077 "

De acuerdo a estos valores hallados, es posible determinar un tanto por ciento la composición de la substancia analizada, es decir, conocer lo que se llama la fórmula centesimal.

El cálculo lo realizamos tomando en consideración las relaciones ponderales que existen entre el peso atómico del elemento y el de la combinación bajo cuya forma se ha pesado. La relación entre ambas cifras constituye el factor analítico F , que para el caso del C ó H tiene el siguiente valor:

$$F. \text{ de } \frac{C}{CO_2} = \frac{12}{44} = 0,2727$$

$$F. \text{ de } \frac{H_2}{H_2O} = \frac{2,016}{18,016} = 0,1119$$

Para el cálculo final de los respectivos por (°) Por gentileza del Dr. Mancini (Fundación Campomar).

centajes, se aplica una fórmula en la que se multiplica el valor del factor F por el peso de la combinación que se obtuvo y por 100; dividiendo por el peso total de la sustancia analizada:

En nuestro caso:

$$\% \text{ de C } \frac{0,2727 \times 0,3030 \times 100}{0,1574} = 52,4\% \text{ de Carbono}$$

$$\% \text{ de H}_2 \frac{0,1119 \times 0,077 \times 100}{0,1574} = 5,47\% \text{ de Hidrógeno}$$

Para la rutina ($C_{27} H_{30} O_{16}$) los datos en porcentaje calculados son los siguientes:

$$\% \text{ de C } = 53,10\%$$

$$\% \text{ de H } = 4,95\%$$

-----0000000-----

b) Determinación del punto de fusión:

Teniendo en cuenta lo establecido en la parte general, hemos practicado la determinación del punto de fusión de la rutina siguiendo las normas generales que rigen para estos casos en la práctica, es decir, hemos trabajado aplicando los métodos de más valor hasta ahora establecidos y siguiendo un orden basado en los mismos principios:

Comenzamos por determinar primero, el punto de fusión ordinario. Para ello, utilizamos el método del tubo capilar (F.A. 3ra. Ed.), utilizando un baño de aceite vegetal. Alrededor de los 189° - 191° se pudo notar un ligero cambio de la masa ensayada, con un débil obscurecimiento y modificaciones en la forma pero sin ser muy evidentes. Se continuó el calentamiento hasta llegar cerca de los 200° , y no se pudo observar ningún cambio fundamental en el estado de la sustancia que ensayamos.

Se practicaron varias determinaciones más con un resultado semejante, un ligero cambio de estado (sin llegar a la fusión) a una temperatura entre 189° y 191° C.

Con estos antecedentes, no consideramos necesario la determinación del punto de fusión corregido, ya que no podríamos corregir con este método la principal dificultad hallada y que consiste en no poder observar nítidamente ningún cambio en el estado de la sustancia analizada.

Practicamos a continuación la determinación del punto de fusión en el aparato de Fisher, basado en el mismo principio que el block de Maquenne, muy útil en nuestro caso pues permite la obtención de la fusión instantánea, al mismo tiempo que con la pequeña lente de aumento permite observar nítidamente los cambios que se van operando en la sustancia, en relación con el aumento gradual de la temperatura.

Con una pequeña cantidad de sustancia, comenzamos la operación y se observó que comenzó a presentar ligo-

ras modificaciones en el estado que se presenta, a una temperatura cercana a 189°C y que a partir de esta temperatura se pudo observar nítidamente la fusión pastosa característica -sin llegar a licuar completamente- hasta llegar a 193°C , en que por un mayor calentamiento no se observó cambio alguno.

De ello deducimos que la rutina aislada en nuestra experiencia, presenta un punto de fusión de 189° - 193°C y que concuerda con los valores publicados y ya citados con anterioridad.

Basado en el principio que una pequeña cantidad de impurezas determina un fuerte descenso del P.F. de una sustancia pura, se utiliza en la identificación de las sustancias orgánicas el llamado punto de fusión mezcla.

Esta propiedad sirve para demostrar la identidad de dos sustancias que se suponen iguales por tener el mismo punto de fusión, o, como en nuestro caso, la identificación de la rutina aislada por comparación con una muestra pura de P.F. ya conocido.

Para hacer el ensayo, se prepararon tres partes diferentes: una con rutina extraída, otra con la droga pura y por último una parte formada por la mezcla de las dos sustancias.

Se realizó la experiencia con el aparato de Fisher y no se observó diferencia alguna en el punto de fusión de las tres muestras preparadas, por lo que concluimos estableción

de que la rutina que hemos aislado se comporta en esta determinación de igual manera que la extraída por los autores ya citados (13,35):-

c) Determinación de la forma cristalina:

Con una pequeña cantidad de precipitado obtenido en la extracción de la rutina, preparamos varios "frotis" sobre porta-objetos. A continuación se observaron con una lupa común y luego al microscopio con diversos aumentos, notándose en todas las determinaciones el aspecto característico de los cristales. Aparecen estos como agujas muy finas, de color amarillo pálido, unas veces sueltas y otras reunidas en haces más o menos compactos, en forma de pequeños plumeros.

Se compararon con los cristales fotomicrografiados en un trabajo publicado (19) y se pudo observar que son completamente semejantes, como se podrá comprobar en la reproducción fotográfica adjunta en este trabajo:

d) Determinación de la solubilidad:

Para la determinación de la solubilidad de la rutina en agua calentada a ebullición, colocamos en un Erlenmeyer de 100 cc. , 0,40 g. de la sustancia en 50 cc. de agua, con el objeto de saturar el disolvente:

Llevamos el matraz a un baño de agua, calentando a la temperatura de ebullición durante dos horas , para dejar la solución luego en reposo durante 24 horas, agitando a intervalos regulares con una varilla de vidrio de extremo afilado, preferentemente rozando las paredes del recipiente, con el objeto de evitar la sobresaturación de la solución:

Filtramos por papel de filtro bien seco, sobre cápsula de porcelana tarada previamente y pesamos el líquido filtrado. Llevamos a seco por evaporación sobre baño de arena y pesamos el residuo obtenido. Nos dió un peso de 0,16 g., que indica que los 50 cc de agua empleados, han disuelto a 100°C., 0,24 g. de rutina; o lo que es lo mismo, que la rutina es soluble en la proporción de 0,46% en agua hirviendo, dato que concuerda con el publicado por los autores:

e) Determinación del poder rotatorio específico:

Para esta determinación, utilizamos un polarímetro "Laurent", iluminado con luz de sodio (línea D del espectro), con un tubo de 94,7 mm. de longitud. (0,947 dm):

Preparamos una solución de rutina aislada en alcohol de 50°, disolviendo 0,25 g. en 10 cc. del solvente, calentando suavemente para favorecer la solubilidad del compuesto. Filtramos por papel y del líquido filtrado tomamos 10 cc. para la experiencia:

Comenzamos la operación por hacer coincidir, en el aparato, el cero del nonius con el, cero de la escala, y a continuación giramos el tornillo adhoc hasta conseguir que los dos campos aparecieran igualmente iluminados. Una vez listo el aparato para su uso, colocamos en el tubo correspondiente la solución preparada y que se mantuvo a una temperatura constante de 50°-60°, hasta el momento de la determinación:

Se determinó el ángulo α de rotación, con el siguiente valor promedio de tres determinaciones:

$$\alpha = -0,87^\circ$$

Con este valor hallado y aplicando la fórmula respectiva, para el caso de una sustancia activa en solución determinamos el poder rotatorio específico, con el siguiente resultado:

$$[\alpha]_D^{20} = -36,7^\circ$$

para las siguientes condiciones de trabajo:

$$\alpha = -0,87^\circ ; \quad c = 2,5\% ; \quad \ell = 0,947 , \quad \ell^\circ = 20^\circ$$

Como se puede observar, el dato que hemos hallado concuerda con las publicadas por los autores (17,43,45); con una diferencia que relacionamos con el error propio de la experimentación:-

f) Determinación espectrofotométrica ($^\circ$).

Tomando como base el trabajo de J. Naghski Porter y Couch (13) se efectuó la determinación espectrofotométrica utilizando para ello un Espectrofotómetro Universal Coleman Mod. 11 que es un fotómetro objetivo, con espectro continuo, sin filtro y con red de difracción y célula fotovoltaica.

Son aparatos, los de este tipo, que tienen sobre los demás la ventaja de poseer un sistema de funcionamiento teóricamente superior, principalmente por la dispersión homogénea que causa la red de difracción para todas las regiones del espectro:

La falta de material bibliográfico al respecto, nos impide una descripción detallada del método utilizado, limitándonos a describir la labor realizada tomando como guía a la ($^\circ$) cartilaza del Dr. Mancini (Fundación Saubermann).

publicada brevemente por los autores. Estos establecen que: para la rutina aislada en sus experiencias, los valores hallados son los siguientes:

$$K_{362,7} = 32,38$$

$$\frac{K_{375,2}}{K_{362,7}} = 0,888$$

Esto demuestra- concluyen los autores- que la rutina aislada estaba impurificada por quercetina y una substancia indeterminada perteneciente al grupo de los esteroides.

En cambio, la rutina pura dió los siguientes valores:

$$K_{362,7} = 31,90$$

$$\frac{K_{375,2}}{K_{362,7}} = 0,875$$

En nuestra determinación, hemos entendido que K representa el coeficiente de absorción para una longitud de onda de luz de 362,7 m μ y que está dado por la fórmula $K = \frac{\ln \frac{I_0}{I_t}}{l}$ donde $\frac{I_0}{I_t}$ representa la relación entre la intensidad de la luz incidente (I_0) y la intensidad de haz luminoso después de atravesar el medio interpuesto (I_t), todo referido a la unidad de concentración (g/l) y a la unidad de espesor (cm). Efectuamos la experiencia disolviendo 0,1 g. de rutina aislada en 100 cc. de A. D. calentada a ebullición. Colocamos la solución en la cubeta del aparato (1 cm.) y determinamos el coeficiente de absorción para una longitud de onda de luz

de 362,7 $m\mu$ y 375,2 $m\mu$ con el siguiente resultado:

$$K_{362,7} = 30,25$$

$$K_{375,2} = 26,71$$

Por lo tanto:

$$\frac{K_{375,2}}{K_{362,7}} = \frac{26,71}{30,25} = 0,884$$

Comparando este dato con el publicado por los autores citados, se puede comprobar que la rutina aislada en nuestro trabajo cumple con las condiciones de pureza establecidas por los autores:

g) Hidrólisis química:

La rutina, por hidrólisis ácida, se descompone como los glucósidos en general, en las dos partes fundamentales que constituyen la molécula: el aglucón (quercetina) y el azúcar que en este caso está formado por la combinación, en proporciones equimoleculares de glucosa y ramosa:

Para la identificación de la rutina por este procedimiento, hemos utilizado una combinación de los métodos propuestos por Naghski, Porter y Bouch (13) y Conson, Gordon y Martín (46):

Utilizando la técnica de los autores

primeramente nombrados, realizamos la hidrólisis ácida de la rutina y separación del insoluble, para su caracterización por el punto de fusión de los cristales obtenidos; con la técnica propuesta por los autores citados en segundo término, procedimos a la separación e identificación cromatográfica de los azúcares presentes en el líquido proveniente de la hidrólisis efectuada:

Se pesaron 0,50 g. de rutina, bien seca y se colocó la substancia en un Erlonmeyer de 250 cc., con 50 cc. de H_2SO_4 al 5%, calentando a ebullición y a reflujo durante 3,30 hs.

Se dejó enfriar, se midió el líquido obtenido (42 cc.) de color amarillo claro, con abundante precipitado y se filtró por gooch:

Se recogió aparte el precipitado, se secó a la estufa a $120^{\circ}C$ y se pesó: 0,20 g., lo que representa un 40 % del total de glucósido desecado utilizado.

Se determinó el punto de fusión ordinario y el punto de fusión mezcla con una muestra de quercetina pura, con los siguientes resultados:

P. de F: $313^{\circ}-316^{\circ}C$

P. de F. mezcla: $313^{\circ}-315^{\circ}C$

Valores que coinciden con los publicados por los autores (13).

Determinación de glucosa y ramosa.-

El empleo de este método, propuesto por Consden, Gordon y Martín (1944), tiene la ventaja sobre el método químico, de ser muy útil en los casos de que no se dispone de una concentración en general grande en el líquido proveniente de la hidrólisis ácida.

Por otra parte, posee una perfecta especificidad en la que concierne a los glúcidos en particular y sobre todo en los casos en que, como la glucosa y ramosa poseen sus coeficientes de partición bien alejados.

El fundamento del método es el siguiente. Sobre tiras rectangulares "Standard" de papel de filtro Whatman[®] y sobre una línea de partida, se colocan varias gotas del líquido que se ensaya. A continuación y por el extremo de la tira de papel tomada como base, se hace pasar por capilaridad un solvente como el butanol y se deja el sistema en estas condiciones durante 24 hs.

En estas condiciones, la partición del soluto tiene lugar entre el agua que de por sí lleva la celulosa del papel y el solvente que se moviliza sobre la superficie de las fibras de celulosa del papel de filtro.

Ahora bien, la distancia a que el soluto es movilizado por el solvente a través del papel, es una función directa de (1) el coeficiente de partición del soluto entre el agua y el solvente usado, (2) el volumen de agua limitada por unidad de superficie del papel de filtro después de la irrigación.

y (3) el volumen del solvente utilizado, medido por unidad de superficie del papel. En las experiencias, los factores (2) y (3) se suponen constantes debido a la uniformidad de la textura del papel utilizado, espesor y contenido en agua; por lo tanto, en condiciones ideales la distancia relativa (R_F) a que se ha desplazado el soluto depende únicamente de su coeficiente de partición que está dado por la expresión:

$$R_F = \frac{\text{distancia que se ha movilizado el soluto}}{\text{distancia que se ha movilizado el solvente.}}$$

Por lo tanto, midiendo las respectivas distancias a que se han desplazado tanto el soluto (movilizado por el solvente) y el solvente puro, se halla el coeficiente para cada uno de los componentes del líquido que se ensaya; se compara con la tabla y de acuerdo al dato obtenido se identifica la presencia de cada uno de los glúcidos que se investiga.

El reactivo utilizado para determinar la posición final de cada uno de los glúcidos que se determinan, es el NO_3Ag amoniacal. De esta manera, la Ag metálica es precipitada únicamente en los lugares que ocupen los azúcares, dando unas manchas parduzcas características.

Para la realización de la experiencia, en el líquido proveniente de la hidrólisis ácida (42 cc): se eliminó el ac. sulfúrico por precipitación con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y el líquido de filtración así neutralizado, se redujo por evaporación a un volumen de 10 cc.

Se utilizó papel de filtro Whatman N° 1

que se cortó en tiras longitudinales de 43x12 cms., en dos de ellas se trazó una línea perpendicular al largo del papel y se trazó con dos pequeños círculos el lugar dónde se colocaron las dos gotas del líquido a ensayar:

A continuación, cada extremo del papel, próximo a la línea perpendicular descrita, se hizo humedecer en una cubeta con butanol, permanentemente por un tiempo de 24 hs. A su vez, la extremidad libre de la tira de papel se resguardó en un tubo simple de metal, para impedir la evaporación rápida del solvente:

Al cabo del tiempo indicado, se sumergieron cada una de las tiras de papel de la solución de $\text{NO}_3 \text{ Ag}$ amoniacal, hasta que comenzaron a hacerse visibles dos pequeñas manchas color parduzco-rojizo. Se esperó hasta que se consideró que la reducción era ya completa (1 hora) y se procedió a medir las distancias respectivas a que llegaron cada una de la manchas y el solvente puro utilizado:

Ensayo	{ Mancha N° 1.:::	0,021 mts.	T = 19°
	{ Mancha N° 2.:::	0,068 mts.	
N° 1.-	{ Solvente puro:::	0,30 mts.	

Ensayo { Mancha N° 1::: 0,022 mts:
N° 2:- { Mancha N° 2::: 0,071 mts: T = 19°
{ Solvente puro:: 0,32 mts:

En estos valores hallados, calculamos los R_F respectivos para cada ensayo, con el siguiente resultado:

Ensayo N° 1:-

$$\text{Mancha N° 1 : } R_F = \frac{0,021}{0,30} = 0,07$$

$$\text{Mancha N° 2 : } R_F = \frac{0,068}{0,30} = 0,226$$

Ensayo N° 2:-

$$\text{Mancha N° 1: } R_F = \frac{0,022}{0,32} = 0,068$$

$$\text{Mancha N° 2: } R_F = \frac{0,071}{0,32} = 0,229$$

Los valores de R_F de varios azúcares neutros, utilizando butanol como solvente, y el papel de filtro Whatman N° 1, para 20°C de temperatura, son los siguientes:

<u>Glúcido</u>	<u>Solvente</u>	<u>Temperatura</u>	<u>R_F</u>
d- glucosa	butanol	20°C	0,070
d- galactosa	"	"	0,060
d- manosa	"	"	0,100

<u>Glicido</u>	<u>Solvente</u>	<u>Temperatura</u>	<u>R_F</u>
d- fructosa	butanol	20°C	0,100
L- ramosa	"	"	0,220
Lactosa	"	"	0,0
Maltosa	"	"	0,01

Como se puede comprobar, los valores de R_F hallados en nuestras determinaciones coinciden casi exactamente con los que corresponden a la glucosa y ramosa en el cuadro inserto; por lo que concluimos estableciendo que la rutina aislada se ha comportado en esta determinación como lo establecen los diversos autores consultados.†

-----000000-----

C A P I T U L O V I I

CONCLUSIONES GENERALES.-

De las inflorescencias de la *Hydrangea macrophylla* (Tunberg) De Candolle, se ha aislado rutina, glucósido flavonólico, con α , con un rendimiento máximo de 0,36% calculado sobre materia seca.

Se realizó un estudio del rendimiento en relación a la distribución geográfica y diversas etapas en el desarrollo de la planta; en el primer caso, se ha comprobado que, la situación geográfica no influye sobre el rendimiento, ya que los ejemplares han sido recolectados de zonas con una topografía y condiciones de crecimiento muy semejantes; con respecto a la influencia del período de crecimiento vegetativo, se ha comprobado una relación estrecha de dependencia, en el sentido de ser máximo el rendimiento únicamente cuando la planta se halla en pleno desarrollo (0,36%), para disminuir y hacerse casi nulo, cuando la planta entra en declinación: (0,04%).

Fue identificada como rutina por determinación de C é H, punto de fusión, poder rotatorio, solubilidad, hidrólisis química y espectrofotometría. En todos los casos, la substancia ha satisfecho las condiciones de pureza y especificidad publicados por los autores consultados:-

-----0000000-----

Boalade

C A P I T U L O VIII.-

B I B L I O G R A F I A :-

- (1):- DE CANZOLLE; Prodomus Systematis Naturalis; pág 15, ed. 1830
- (2):- G. A. STEVENS; Garden Flowers in Color, pág: 127, ed: 1939:
- (3):- L. H. BAILY; The Standard Cyclopedia of Horticulture,
tomo II, pág: 1619, ed: 1928:-
- (4):- E. STRASBURGER; Tratado de Botánica, pág: 588, ed: 1943:-
- (5):- STANDARDIZED PLANT NAMES; ed: 1942:-
- (6):- Ter Meulen; Rec: Trav: chim, 42, 380 (1923):-
- (7):- CHARAUX; Comp: rendus, 178, 1312 (1924):-
- (8):- ATTREE, PERKIN; J: Chem: Soc:, 1, 234 (1927):-
- (9):- SANZO, LLOYD; Journ: Biol: Chem:, 58, 737 (1924):-
- (10):- CLARKE, BANERJEE; Journ: Chem:, Soc:, 97, 1833 (1910):-
- (11):- E. SCHUNCK; Journ: Chem: Soc:, 53, 262 (1888):-
- (12):- H. SMITH; Journ: Chem:, Soc:, 73, 697 (1898):-
- (13):- NAGHSKI, PORTER, COUCH; Journ: Am: Chem: Soc:, 69, 572
(1947):-
- (14):- COUCH, KREWSON; Science, 103, 197 (1946):-
- (15):- MASCRE, PARIS; Bull: Sci: Pharm:, 43, 279 (1936) :-
- (16):- WUNDERLICH; Archiv: Pharm:, 246, 224 (1908):-
- (17):- GOLLAN; Bull: Soc: Chem:, Biol:, 11, 1164 (1929):-

- (18).- CHARAUX: Bull. Soc. Chem. Biol. . 6 . 641 (1924).-
- (19).- JOHNSON: Am. Journ. Pharm., 110, 134 (1944).-
- (20).- BRAUNS: Archiv Pharm., 242, 547 (1904).-
- (21).- PERKIN: Journ. Chem. Soc., 81, 473 (1902).-
- (22).- MURIEL ORLOW: Practical Plant Biochemistry, pág. 111 (1939)
- (23).- SHIBATA, KASIMAGI: Journ. Am. Chem. Soc., 41, 217 (1919).-
- (24).- GABINE y cols: Z. physiol. Chem., 58, 3 (1913).-
- (25).- FAKUDA: Archiv. exp. Path. Pharm., 164, 695 (1932)
- (26).- SEVIN: Compt. rendus, 216, 605 (1943).-
- (27).- RATCLIFF; COLLIER; HOSLEY, pág. 20, Marzo de 1947.-
- (28).- GRIFFITH, COUCH, LINDAVER; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.,
55 . 223 (1944).-
- (29).- GRIFFITH, LINDAVER; Am. Heart Journ., 28, 753 (1944).-
- (30).- SHARBSBOUGH; Biochem. Journ., 39, 271 (1946).-
- (31).- BACHARACH, COATES, MIDDLETON; Biochem. Journ., 36, 407 (1942).
- (32).- COUCH; GRIFFITH; "Clinical studies on Rutin therapy in in-
creased capillary fragility, foliote.
Abril de 1946.-
- (33).- SHANHO; Am. Journ. Med. Sciences; 221, 539 (1946).-
- (34).- GRIFFITH, LINDAVER; Informe presentado ante la asamblea
anual de la American Medical Association, (1946)
- (35).- COUCH; NAGHSKI; Journ. Am. Chem. Soc., 67, 1419 (1945).-
- (36).- BRANDE, SCHARTLE; Archiv Pharm., 250, 414 (1912).-
- (37).- BRIDEL, BEGUIN; Bull. Soc. Chem. Biol., 8, 908 (1926).-
- (38).- ZAPPI; Tratado de Química Orgánica, tomo Iro.

- parte, pág.: 48, (1944):-
- (39):- ZAPPI; Tratado de Química Orgánica, tomo Iro: Ira:
parte, pág.: 202 (1944):-
- (40):- SANDO, BARTLELL; Journ: Biol: Chem:, 41, 495 (1920):-
- (41):- ZAPPI; Tratado de Química Orgánica, tomo Iro:, Ira:
parte, pág.: 201: (1944):-
- (42):- PERKIN; Journ: Chem: Soc., 1925 (1896):-
- (43):- REBATE, IUSSY; Bull: Soc: Chim: Bio:, 20, 459 (1938):-
- (44):- REBATE; Bull: Soc: Chim: Biol: 12: 974 (1930):-
- (45):- BRIDEL, BEGUIN; Compt: rends, 183, 231 (1926):-
- (46):- CONSDEN, GORDON, MARTIN; Biochem: Journ:, 42, N° 2, 238,
(1948):-

-----0000000000-----

-----0000000000-----