

CATEDRA DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

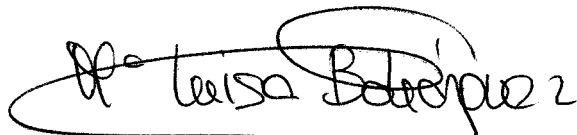
FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

"ESTUDIO FARMACOQUIMICO-FARMACODINAMICO DE
DIVERSAS ESPECIES DEL GENERO FUMARIA L."

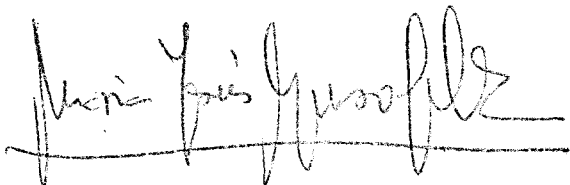
Trabajo para aspirar al grado
de licenciatura que presenta

Ma LUISA BOHORQUEZ GARCIA.

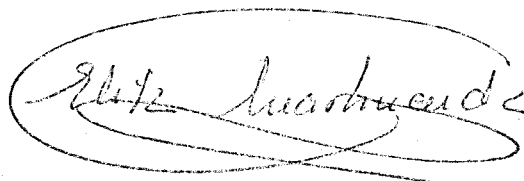


El presente trabajo, ha sido realizado en la Cátedra de FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA de la FACULTAD DE FARMACIA de la Universidad de SEVILLA, bajo la dirección de la Dra. Ma Jesús Ayuso Gonzalez y de la Dra. Elisa Marhuenda Requena.

Los directores del trabajo:



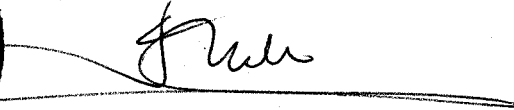
Dra. Ma Jesús Ayuso Glez.



Dra. Elisa Marhuenda Requena



CONFORME
EL DECANO



Quiero expresar mi agradecimiento a las Dras. Elisa Marhuenda Requena y Ma Jesús Ayuso Gonzalez que con dedicación e interés han hecho posible la realización de este trabajo.

Así mismo, agradezco a la Dra. Ma Victoria Toro Sainz y Dr. Santiago Silvestre Domingo, su colaboración.

A todos los que de alguna forma han contribuido al presente trabajo.

S U M A R I O

I. OBJETO

II. PARTE TEORICA.....1

II.1. Descripción botánica de las especies estudiadas....2

II.1.1. Situación taxonómica del género Fumaria L...2

II.1.2. Fumaria agraria Lag.....5

II.1.3. Fumaria capreolata L.....7

II.1.4. Fumaria reuteri Boiss.....9

III. PARTE EXPERIMENTAL.....12

III.1. Muestras.....13

III.2. Determinación de humedad y cenizas.....15

III.2.1. De humedad.....15

III.2.2. De cenizas totales.....16

III.3. Ensayos farmacocquímicos.....18

III.3.1. Extracción.....18

III.3.2. Estudio comparativo de los diferentes

extractos obtenidos en cada una de las

especies a estudiar.....22

III.3.2.1.	Determinación de cuerpos grasos...	24
III.3.2.2.	" pigmentos carotenoides...	25
III.3.2.3.	" esteroles y triterpenos..	26
III.3.2.4.	" derivados quinónicos.....	29
III.3.2.4.a.	Quinonas libres.....	29
III.3.2.4.b.	Quinonas combinadas.....	30
III.3.2.5.	Determinación de lactonas pentag nales insaturadas.....	31
III.3.2.6.	Determinación de pigmentos anto- ciánicos.....	31
III.3.2.7.	Determinación de pigmentos leuco antociánicos.....	32
III.3.2.8.	Determinación de flavonoides.....	33
III.3.2.9.	" taninos.....	34
III.3.2.9.a.	Compuestos polifenólicos.....	34
III.3.2.9.b.	Taninos catéquicos.....	35
III.3.2.9.c.	Taninos pirogálicos.....	37
III.3.2.10.	Determinación de glúcidos.....	38
III.3.2.11.	" saponinas.....	40
III.3.2.12.	" alcaloides.....	44

III.3.2.13.Discusión de resultados.....	47
III.3.3.Determinación de aceites esenciales...	51
III.4.Ensayos farmacodinámicos.....	52
III.4.1.Extractos utilizados.....	52
III.4.2.Descripción general de técnicas.....	53
III.4.2.1.Diuresis.....	53
III.4.2.2.Coleresis.....	56
III.4.3.Actividad diurética.....	60
III.4.3.1.Discusión de resultados.....	68
III.4.4.Actividad colecistocinética.....	69
III.4.4.1.Discusión de resultados.....	75
IV.CONCLUSIONES.....	76
V.BIBLIOGRAFIA.....	79

I.- OBJETO

En el presente trabajo, intentamos abrir un camino para estudios mas profundos que puedan justificar el empleo en terapéutica de ciertas especies del género Fumeria L., usadas hoy dia en medicina popular.

Al mismo tiempo, aporta una serie de datos farmacognósticos y farmacodinámicos que pueden servir de taxones para una mejor diferenciación de las especies botánicas en estudio.

II.- PARTE TEORICA

II.1. DESCRIPCION BOTANICA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.

II.1.1. Situación taxonómica del género Fumaria L.

Engler (1964) engloba el género Fumaria L. dentro de la familia Papaveraceae, subfamilia Fumariodeae, tribu Fumariceae.(1)

Cronquist (1968), Hutchinson(1969) y Takhtajan (1969) lo incluyen en la familia Fumariaceae, independientemente de la familia Papaveraceae por las flores zigomorfas y la presencia de diversos grupos de sustancias relacionadas con los alcaloides.(2) (3) (4)

Estas familias ó subfamilias (según el autor consultado) se incluyen dentro del orden Papaverales, si bien, Hutchinson(3) habla de un orden de mayor amplitud denominado orden Rhoeadales.

Por su parte, Takhtajan(4) enclava el orden Papaverales dentro del superorden Ranunculanae, clase Magnoliatae (que corresponde a la clase Dicotiledoneae de Engler), subclase Ranunculidae.

La posición sistemática del género Fumaria L. según Takhtajan, es la siguiente:

- Tipo. Phanerógamas
- Subtipo Angiospermas
- Clase Dicotyledoneae (Magnoliatae)
- Subclase. Ranunculidae
- Superorden. Ranunculanae
- Orden Papaverales
- Familia Fumariaceae
- Género. Fumaria

El género Fumaria L. se divide en dos secciones, seis subsecciones y siete series. Las especies estudiadas se encuentran localizadas en la sección Grandiflorae Pugsley caracterizada por láminas foliares planas y relativamente anchas, generalmente ovales, oblongas ó lanceoladas; flores grandes, que superan los 9 mm de longitud; las alas de los pétalos superiores curvadas, pétalo inferior nada ó poco espatulado.(5)

Comprende hierbas anuales, mas ó menos glaucas,

42

con tallos alargados, erguidos ó extendidos, mas ó menos ramosos, muchas veces trepadores. Hojas todas caulinas; las inferiores largamente pecioladas; las superiores brevemente pecioladas ó subsésiles; todas 2-4-pinnadas. Flores en racimos opuestos a las hojas. Brácteas casi tan largas como los pedúnculos florales que no se alargan después de la antesis. Sépalos 2, generalmente muy caducos, a veces nulos. Pétalos 2 + 2, los externos con limbo cóncavo interiormente; pétalo superior casi semicilíndrico, provisto de un espolón que lleva en el vértice una carena obtusa, corta ó mas ó menos alargada; pétalo inferior estrecho, mas ó menos acanalado, sin espolón ni saco en la base, carenado en el vértice, con márgenes extendidos ó enderezados. Pétalos internos oblongos-cuneiformes, coherentes en el ápice, un poco carenado en el vértice. Falanges estaminales 2, formadas cada una de un filamento común, trífidio, de una antera en el medio bilocular y dos anteras laterales uniloculares; falange estaminal superior prolongada en su base en un espolón granuloso (nectáreo), alojado en el espolón del pétalo superior. Granos de polen papilosos. Ovario bicarpelar, unilocular, con un solo primordio seminal lateral, campí-

lótropo y apótropo, estilo con estigma 2-3-fido. Fruto formando un aquenio monospermo, mas ó menos globuloso, liso ó mas ó menos rugoso, nada ó poco mucronado, bifoveolado en el extremo distal. Endocarpo separado del mesocarpo por debajo del estilo y formando una depresión hemisférica. Semillas no ariladas, escavadas en crater en el vértice, llevando un largo surco por debajo del micrópilo; embrión muy pequeño, dicotiledóneo, con un albumen abundante. (5)

II.1.2. Fumaria agraria Lag.

Subsección Agrariae Hammar, serie Eu-Agrariae
Pugsley.

Hierba erguida, difusa ó trepadora, glaucescente. Tallo ramoso, flexible, anguloso, que puede alcanzar 1.20 m de longitud. Hojas inferiores largamente pecioladas, las superiores brevemente pecioladas y además subsésiles; peciolo anguloso, generalmente triangular; limbo 2-3-pinnado, con lacínias oblongas, ovales-oblongas ó abovales-oblongas, subagudas ó obtusas, mucronadas, a veces subaristadas, pecio-

los derechos ó flexibles, con frecuencia enrollados en zarcillos en los individuos trepadores; nervaduras no aparentes, ramosas y anastomasadas en las láminas foliares, visibles solamente por transparencia. Racimos mas ó menos brevemente pedunculados, mas ó menos flojos, generalmente multiformes (12-40 flores). Brácteas blanquecinas con nerviación verde, lanceoladas ó lineares, agudas, menores ó iguales que los pedúnculos fructíferos. Pedúnculos fructíferos bastante gruesos, casi igual que el cáliz, un poco engrosados y dilatados en el extremo en la fructificación, siempre erecto-patentes. Flores grandes (12-16 mm de longitud), blancas con el ápice mas ó menos purpúreo ó totalmente purpúreo. Sépalos oval-lanceoladas ó estrechamente lanceolados, blanquecinos, con nerviación verde, peltados, mas ó menos acuminados, dentados por lo menos en la base, iguales a $1/3-1/2$ de la corola, mas anchos que el extremo dilatado del pedúnculo y un poco mas estrechos que la corola, frecuentemente mas ó menos persistentes después de la caída de aquella. Pétalo superior provisto hacia el extremo de una carena en forma de giba verde, alargada con márgenes mas ó menos ampliamente dilatados hacia el extremo, mas ó menos doblados has-

ta el ápice obtuso, purpúreas. Pétalo inferior lineal espatulado, carenado con carena que forma una giba verde por debajo del extremo, con los bordes patentes y mas ó menos ensanchados hacia el extremo obtuso, el cual sobrepasan; espolón alargado, mas ó menos ampliamente abovado, ligeramente arqueado. Pétalos internos mas ó menos arqueados en la mitad superior, blanquecinos ó amarillentos con el extremo negro-purpúreo, con tres carenas longitudinales, mas cortos que los pétalos externos. Fruto mas ó menos grande pudiendo alcanzar 3,5 x 3 mm, redondeado, mas ó menos comprimido, carenado, obtuso, mútico ó mas ó menos mucronado, generalmente un poco mas estrecho en la base que en el extremo dilatado en su pedúnculo, mas ó menos densamente y groseramente tuberculado-rugoso. n=28.

Floración: diciembre-julio.(6)

II.1.3. Fumaria capreolata L.

Subsección Capreolatae Hammar, serie Eu-Capreolatae Pugsley.

Hierba extendida ó trepadora, verde, poco glau-

cescente, alcanzando 1m de altura, con raiz delgada, pivote, tallo anguloso, flexible. Hojas con peciolo triquetro, 2-3-pinnadas, láminas planas ovales, oblongas ó abovales-oblongas, obtusas ó mas ó menos puntiagudas, mucronadas, plurinerviadas con nerviaciones ramosas y anastomadas en red laxa, visible por transparencia. Racimos largamente pedunculados, multiflores (15-30 flores), mas ó menos densos en la antesis, mas ó menos poco apretadas en la fructificación. Brácteas blanquecinas, a veces purpurescentes en el ápice, con nervadura verde, lanceoladas ó lanceoladas-lineares, acuminadas, generalmente menores que el pedúnculo fructífero; éste mas ó menos arqueado-encorvado. Sépalos grandes (3,5-6 × 2-3 mm), blanquecinos, con nerviación verde, ovales, peltados, agudos ó mas ó menos obtusos y mucronados, mas ó menos dentados, =c. 1/2 de la corola y mas largos que el tubo de ella. Corola blanca ó mas ó menos purpurina, 9-14 mm de longitud. Pétalo superior mas ó menos agudo, con alas mas ó menos derechas, reflejas, no alcanzando el extremo y no rebasando la carena; espolón corto, generalmente ovoide-redondeado. Pétalo inferior estrechamente lineal, con márgenes estrechos, erguidos ó extendidos, sin alcanzar

el extremo agudo. Pétalos internos mas ó menos arqueados en el ápice generalmente negro-púrpura. Espolón glanduloso, en la zona estaminal superior verde, un poco engrosado en el centro, arqueado, =1/2 del espolón de la corola. Estigmas bilobados, con lóbulos cortos, mas ó menos extendidos. Frutos redondeados, algo comprimidos, mas ó menos obtusos, no mucronados, no ó casi nada carenados, lisos ó poco rugosos, mas ó menos contraídos-subestipitados, con la base mas estrecha que el vértice engrosado del pedúnculo fructífero, pequeños (2-2,5 x 1,75-2,5 mm).n=28.

Floración: enero-junio y todo el verano en los lugares húmedos(7).

II.1.4. Fumaria reuteri Boiss.

Subsección Murales Hausskn, serie Sublatisepalae Pugsley.

Hierba bastante delgada, muy ramosa, mas ó menos erecta ó difusa, no trepadora, glauca, lampiña. Tallos angulosos, flexibles, alcanzando 25 cm de longitud. Hojas

irregularmente 3-pinnadas, con láminas pequeñas, mas ó menos aserradas, lineares-oblongas ó estrechamente oblongas, puntiagudas ó mas ó menos obtusas, mucronadas, planas ó ligeramente canaliculadas, 1-3-nerviadas, con nerviaciones mas ó menos anastomasadas, visibles por transparencia. Racimos bastante laxos, 10-18 flores, mas ó menos alargadas después de la antesis, subsésiles ó brevemente pedunculadas. Brácteas lineares-oblongas ó lineares-lanceoladas, mas ó menos acuminadas ó bruscamente en forma de cúspide, enteras ó un poco dentadas hacia el extremo, blanco-verduzas, con nerviación verde, un poco mas cortas que los pedúnculos fructíferos, éstos derechos ó ligeramente arqueados, erecto-patentes ó patentes, poco engrosados en el ápice. Sépalos ampliamente oblongos, peltados, obtusos y mucronados ó brevemente acuminados, generalmente subtruncados en la base, casi enteros ó débil e irregularmente denticulados, blanquecinos, con nerviación verde, tan largos como el tubo de la corola. Corola 9-10 mm de longitud, rosa claro. Pétalo superior subagudo, con alas negro-púrpura, reflejos alcanzando el extremo y rebasando un poco la carena; espolón 2-2,5 mm de longitud, no ó poco arquea-

do, redondeado en el ápice, con cuello poco estrechado, bastante largo. Pétalo inferior subagudo, con márgenes casi erectos, a menudo un poco dilatados en el ápice. Pétalos internos casi derechos, negro-púrpura en el vértice. Espolón glanduloso en la zona estaminal superior, poco arqueado, filiforme, =c. 2/3 del espolón de la corola. Frutos muy pequeños c. $2 \times 1,5$ mm, ovoides, con anchura máxima en el centro, progresivamente estrechados hacia el vértice, ligeramente obtuso, no apiculado, poco comprimidos, nitidamente carenados, un poco rugosos, con foveolas muy pequeñas. Area geográfica: Península Ibérica.

Floración: abril-junio (8).

III.- PARTE EXPERIMENTAL

III.1. MUESTRAS.

Las muestras pertenecen a tres especies correspondientes al género Fumaria L., cuyas características botánicas han sido descritas en el apartado II.1. (pag.4). Las zonas de recolección y otros datos relacionados, los exponemos a continuación.

Un ejemplar testigo de cada una de las especies estudiadas ha sido depositado en el herbario de la Universidad de (SEV) y especificamos junto al apellido del recolector, el número del pliego testigo.

- Fumaria agraria Lag.; leg.: Bohórquez (SEV 39954)

Localidad. Jerez de la Fra. (Cádiz).

Fecha de recolección 27-Mayo-1979.

Parte utilizada. sumidad florida.

Tª de desecación 25°C.

- Fumaria capreolata L.; leg.: Silvestre (SEV 39953)

Localidad. Gines (Sevilla).

Fecha de recolección 3-Junio-1979.

Parte utilizada. sumidad florida.

Tª de desecación 25°C.

- Fumaria reuteri Boiss.; leg.: Diez, Pastor y Silvestre
(SEV 39955)

Localidad. Montefurado-Villaster (Lugo).

Fecha de recolección 7-Junio-1979.

Parte utilizada. Sumidad florida.

Tª de desecación 27°C.

III.2. DETERMINACION DE HUMEDAD Y CENIZAS TOTALES.

III.2.1. De humedad.

Para la determinación del grado de humedad hemos seguido el método por deshidratación a 100-105°C (método gravimétrico) (9).

Técnica.

Se toman de 1 a 2 g de droga en polvo y se pesa al 0,001 en pesa-sustancia, previamente desecado y tarado, que se mantiene cerrado durante la pesada. Se lleva a estufa de desecación a 100-105°C, destapado el pesa-sustancia y se mantiene a dicha temperatura dos ó tres horas.

Se tapa y enfria en desecador y se pesa nuevamente, repitiendo con intervalos de una hora aproximadamente, el calentamiento en estufa y enfriamiento sucesivo, hasta consecución de dos pesadas concordantes.

Se consideran pesadas concordantes las que difieren entre sí, en un peso no superior a 0,001 g. Se calcula el tanto por ciento y se expresa: "humedad y sustancias volátiles entre 100-105°C"

Resultados.

<u>Especies botánicas.</u>	<u>% humedad.</u>
<u>F. aoraria</u> Lag.13,7818
<u>F. capreolata</u> L..11,4090
<u>F. reuteri</u> Boiss.11,8237

III.2.2. De cenizas totales.Técnica.

En crisol de porcelana se pesan de 1 a 2g ($\pm 0,001$) de droga seca. Se calienta primero suavemente para ir quemando los gases que se desprenden, y se eleva después gradualmente hasta llegar al rojo sombra (500-550°C) (10).

Si las cenizas conservan partículas carbonosas, se adicionan unos mililitros de agua destilada, ó mejor agua oxigenada. Se lleva a estufa a unos 100°C, para eliminar totalmente el agua y se calcina de nuevo. Las cenizas así obtenidas deben tener coloración blanco-grisácea, se enfría en desecador y se pesa. Se repite la operación (calcificación,

enfriamiento, pesada), varias veces, hasta conseguir dos pesadas concordantes, siguiendo el criterio establecido para la determinación de humedad.

Resultados.

<u>Especies botánicas.</u>	<u>% cenizas totales.</u>
<u>F. agraria</u> Lag.10,3039
<u>F. capreolata</u> L.14,2094
<u>F. reuteri</u> Boiss.13,6520

III.3. ENSAYOS FARMACQUIMICOS.

III.3.1. Extracción.

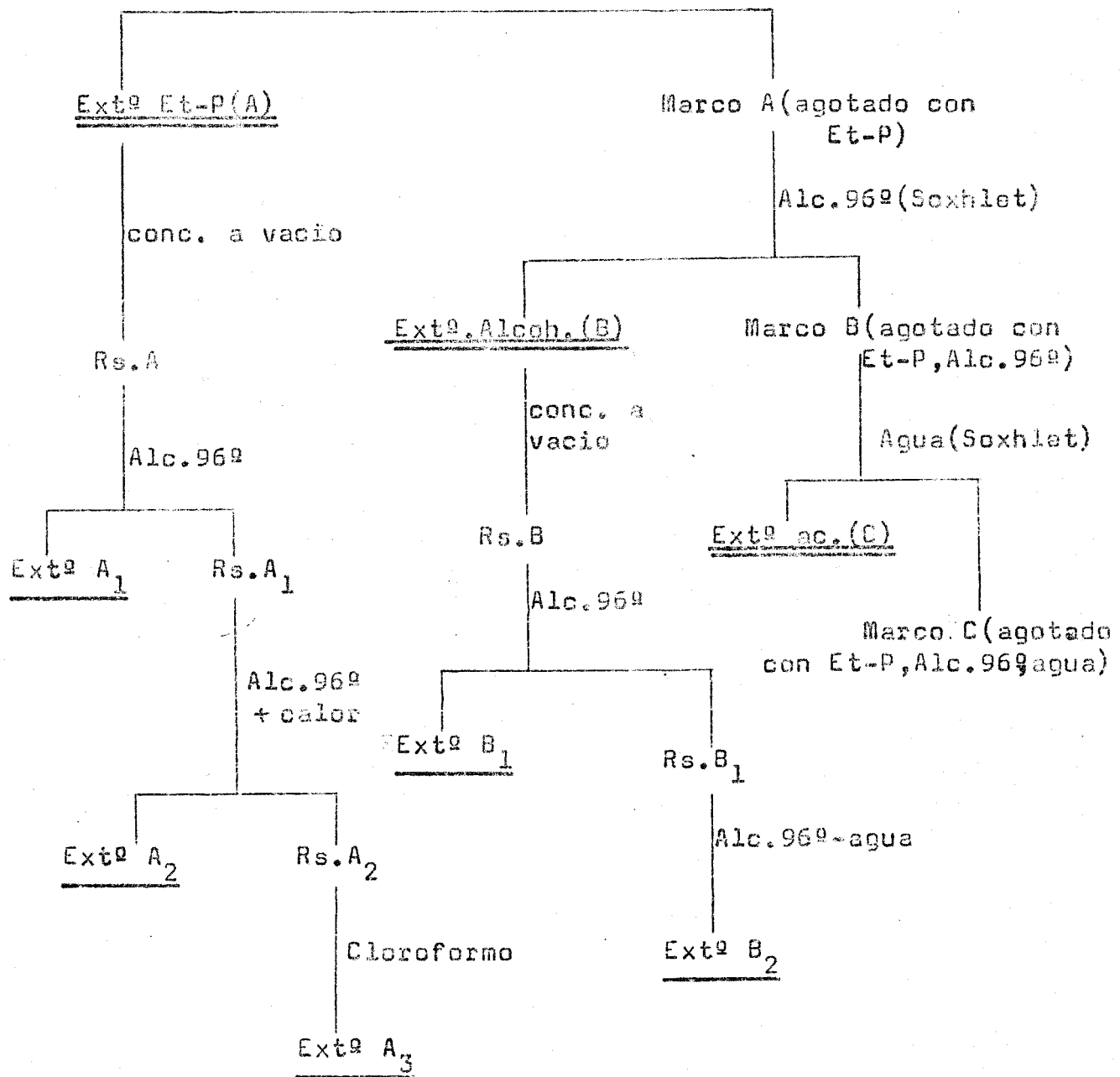
Previamente a la realización de los ensayos químicos, obtenemos los extractos correspondientes de las plantas a estudiar (sumidades floridas). Llevamos a cabo éstas extracciones en sistema Soxhlet, operando con tres disolventes de polaridad creciente: eter de petróleo, alcohol y agua. El método seguido es el de I.T.E.S.M.A. (Instituto Tecnológico de Estudios Superiores 85 Monterrey, México)(11) modificado(12).

Un esquema de lo realizado figura en la pag.19.

-ESQUEMA DEL PROCESO EXTRACTIVO-

DRUGA (P=5g)

Et-P(Soxhlet)



Partimos de 5g de droga (sumidad florida de cada una de las especies) y la mantuvimos en maceración durante 12 horas; pasado dicho tiempo, realizamos la extracción hasta agotamiento, utilizando como disolvente en primer lugar, el éter de petróleo.

El extracto stéreo obtenido (Ext^a. A) de color amarillo (en todas las especies estudiadas), fue concentrado a sequedad en "Rotavapor" (Rs. A).

<u>Residuo Et-P (Rs.A)</u>	<u>Peso</u>
<u>F. agraria</u> Lag.....	0,2068
<u>F. capreolata</u> L.....	0,3413
<u>F. reuteri</u> Boiss.....	0,0683

Este residuo que quedó al concentrar el extracto Et-P, fué lavado con alcohol 96^a, obteniéndose un extracto al que denominamos Extracto A₁, y una fracción insoluble (Rs.A₁).

A continuación, forzamos las condiciones de la extracción utilizando el mismo disolvente, ésta vez, con ayuda de calor, con lo que obtuvimos el Extracto A₂'; que-

dando nuevamente un residuo insoluble (Rs.A₂) que fué disuelto en cloroformo constituyendo el Extracto A₃.

El marco de la droga agotado con éter de petróleo se sometió, posteriormente, a una extracción con alcohol 96º, siguiendo la técnica citada para la extracción con éter de petróleo.

El extracto alcohólico obtenido (Extº.B), de color verde (En todas las especies estudiadas), se concentró en "Rotavapor" hasta consistencia siruposa (Rs.B).

<u>Residuo alcohol 96º (Rs.B)</u>	<u>Peso (g)</u>
<u>F. agraria</u> Lag.....	0,9153
<u>F. capreolata</u> L.....	1,1217
<u>F. reuteri</u> Boiss.....	1,2306

A continuación, éste residuo se redisolvió en alcohol 96º, (Extracto B₁), quedando una fracción insoluble en dicho disolvente (Rs.B₁) que fué disuelta en mezcla hidroalcohólica (2:3), constituyendo el Extracto B₂.

Finalmente, el marco resultante de la extracción con Et-P y alcohol 96º, fué agotado con agua, previa ma-

ceración, obteniendo el correspondiente Extracto C.

III.3.2. Estudio comparativo de los diferentes extractos obtenidos en cada una de las especies a estudiar.

En cada uno de los extractos obtenidos (A_1 , A_2 , A_3 , B_1 , B_2 , C) de cada especie a estudiar, se han investigado la presencia de los siguientes grupos de compuestos:

Extractos A (obtenidos a partir de la extracción con éter de petróleo).

- cuerpos grasos
- pigmentos carotenoides
- esteroides y triterpenos
- lactonas pentagonales insaturadas
- pigmentos antocianínicos
- pigmentos leucoantocianínicos
- derivados quinónicos

Extractos B (obtenidos a partir de la extracción con

alcohol 96%).

- flavonoides
- taninos
- alcaloides
- derivados quinónicos
- lactonas pentagonales insaturadas
- pigmentos antocianínicos
- pigmentos leucocianínicos

Extracto C (obtenido a partir de la extracción con agua).

- saponinas
- lactonas pentagonales insaturadas
- taninos
- glúcidos
- alcaloides
- flavonoides
- derivados quinónicos

III.3.2.1. Cuerpos grasos.

Reactivo: R. de Serger (molibdato sódico finamente pulverizado en 10 ml de ácido sulfúrico concentrado) (13).

Técnica: se añade 1 ml del reactivo a los extractos, apareciendo en la capa inferior una coloración gris-azulada en caso de existir grasas de origen vegetal.

Resultados:

TABLA I

Especies botánicas	Extractos etéreos		
	A ₁	A ₂	A ₃
<u>F. aoraria</u> Lag.	+++	+++	-
<u>F. capreaolata</u> L.	++	++	-
<u>F. reuteri</u> Boies.	+++	+++	-

Actividad máxima: (+++)
 " media: (++)
 " débil: (+)
 " nula: (-)

III.3.2.2. Pigmentos carotenoides.

Hemos ensayado la presencia de éstos principios en las muestras en estudio con:

- ácido sulfúrico concentrado.
- sol. clorofórmica saturada de tricloruro de antimonio.

Por acción del ácido sulfúrico concentrado, los carotenoides originan coloración azul(14).

Resultados:

TABLA II

Especies botánicas	Extractos etéreos		
	A ₁	A ₂	A ₃
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—	—
<u>F. capreolata</u> L.	—	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—	—

Con solución clorofórmica saturada de tricloruro de antimonio, los compuestos en estudio dan lugar a una coloración azul-violeta, bastante fugaz (14).

Resultados:

TABLA III

Especies botánicas	Extractos etéreos		
	A ₁	A ₂	A ₃
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—	—
<u>F. capreolata</u> L.	—	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—	—

III.3.2.3. Esteroles y triterpenos.

Pusimos de manifiesto éstos compuestos mediante las reacciones:

- R. de Liebermann-Burchard: "A la solución clorofórmica de la sustancia se añade 1/5 del volumen de anhídrido acético, después, gota a gota ácido sulfúrico concentrado: se obtiene una coloración violeta, después azul y por último verde"(15).

Hemos ensayado las modificaciones hechas a ésta técnica por diversos autores.(16)(17).

Modificación(a) (16): se mezcla 1 ml de anhídrido acético con 1 ml de cloroformo, se enfría a 0°C y se añade una gota de ácido sulfúrico concentrado. El reactivo así preparado es adicionado a los extractos.

Resultados:

TABLA IV

Especies botánicas	Extractos etéreos		
	A ₁	A ₂	A ₃
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—	—
<u>F. capreolata</u> L.	—	—	—
<u>F. reuteri</u> Boies.	—	—	—

Modificación(b) (17): se evapora en vidrio de reloj 1 ml de cada extracto, disolviendo el residuo en 11gotas de anhídrido acético; la adición de ácido sulfúrico concentrado, desarrolla en presencia de compuestos esterólicios ó terpénicos una coloración malva virando a verde.

Resultados:

TABLA V

Especies botánicas	Extractos etéreos		
	A ₁	A ₂	A ₃
<u>F. agraria</u> Lag.	+	+	-
<u>F. capreolata</u> L.	+	+	-
<u>f. reuteri</u> Boiss.	+	+	-

- R. de Salkowski: "La muestra en un mililitro de cloroformo se pone en contacto con un mililitro de ácido sulfúrico, originando colores amarillo ó rojo" (18).

Al igual que en el caso anterior (R. de Liebermann-Burchard), realizamos ésta reacción en vidrio de reloj.

Resultados:

TABLA VI

Especies botánicas	Extractos etéreos		
	A ₁	A ₂	A ₃
<u>F. agraria</u> Lag.	+	+	-
<u>F. capreolata</u> L.	-	-	-
<u>F. reuteri</u> Boiss.	+	-	-

III.3.2.4. Derivados quinónicos.

III.3.2.4.a. Quinonas libres

Reactivo: hidróxido amónico . . . 40%

Técnica: Se adiciona el reactivo a los extractos; tras agitación y posterior reposo, debe aparecer una coloración rosa, roja ó violeta en caso de existir quinonas libres (19).

Resultados:

TABLA VII

Especies botánicas	Exts ^o . etéreos			Exts ^o .alcoh ^o		Ext ^o ac.
	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂	C
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—	—	—	—	—
<u>F. capreolata</u> L.	—	—	—	—	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—	—	—	—	—

III.3.2.4.b. Quinonas combinadas

Reactivos: ácido sulfúrico 0,1N

hidróxido amónico al 40%

benceno

Técnica: tratados los extractos con ácido sulfúrico 0,1N, se llevan a ebullición, agitándolos con benceno, una vez enfriados. Separada la capa orgánica, debe dar coloración roja al tratarla con amoniaco (19).

Resultados:

TABLA VIII

Especies botánicas	Exts ^o . etéreos			Exts ^o .alcoh. ^o		Ext ^o .ac.
	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂	C
<u>F. aoraria</u> Lag.	—	—	—	+	—	—
<u>F. capreolata</u> L.	—	—	—	+	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—	—	++	—	—

III.3.2.5. Lactonas pentagonales insaturadas

Hemos ensayado la reacción de Baljet, específica de ésta estructura.

Reactivo: ácido pícrico (sol. acuosa al 1%)95ml

hidróxido sódico al 10%.....5 ml

Técnica: al añadir a los extractos III-IV gotas del reactivo debe aparecer coloración naranja a rojo oscuro(20).

Resultados:

TABLA IX

Especies botánicas	Exts ^o . estéreos			Exts ^o .alcoh.		Ext ^o ac.
	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂	C
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—	—	—	—	—
<u>F. capresleta</u> L.	—	—	—	—	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—	—	—	—	—

III.3.2.6. Pigmentos antociánicos.

Reactivo: ácido clorhídrico

alcohol isoamílico

Técnica: se adiciona ácido clorhídrico a los extractos y se agita con alcohol isosmílico, apareciendo una coloración rose-naranjada en caso de resultado positivo(19).

Resultados:

TABLA X

Especies botánicas	Extractos etéreos			Exts ^o . alcoh.(%)	
	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—	—	—	—
<u>F. capreolata</u> L.	—	—	—	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—	—	—	—

III.3.2.7. Pigmentos leucoantociánicos.

Reactivo: alcohol 96%
ácido clorhídrico

Técnica: los extractos, adicionados de la mezcla alcohol/clorhídrico, se llevan a B.M. Los pigmentos leucoantociánicos, compuestos incoloros, pasan a

antociánicos coloreados (rojo ó violeta) en contacto con el aire, por acción de los ácidos fuertes(19).

Resultados:

TABLA XI

Especies botánicas	Extractos etéreos			Extr.º. alcoh.º%	
	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—	—	—	—
<u>F. capreolata</u> L.	—	—	—	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—	—	—	—

III.3.2.8. Flavonoides.

Para la investigación de flavonoides ensayamos la reacción de la cianidina, característica de estos compuestos.

Reactivo: ácido clorhídrico al 10%

cinta de magnesio

Técnica: se adiciona a los extractos unas gotas de ácido clorhídrico al 10% y cinta de magnesio. En caso

de resultado positivo, aparece una coloración rosa que lentamente pasa a roja, naranja ó violeta según la naturaleza del compuesto flavonoide(21).

Resultados:

TABLA XII

Especies botánicas	Exts ^a .alcohólicos%		Exts ^a .ac.
	B ₁	B ₂	C
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—	—
<u>F. apiculata</u> L.	—	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—	—

III.3.2.9. Taninos.

III.3.2.9.a. Compuestos polifenólicos.

Reactivo: solución de tricloruro férrico al 10%

Técnica: se adiciona gota a gota el reactivo a los extractos originandose coloración verde ó azul(22). El color nos va a orientar sobre el tipo de tanino existente en la muestra.

Resultados:

TABLA XIII

Especies botánicas	Exts ^o .alcohólicos%		Ext ^o .ac.
	B ₁	B ₂	C
<u>F. agraria</u> Lag.	+++	+++	+++
<u>F. capreolata</u> L.	+++	+	+
<u>F. reuteri</u> Boiss.	+++	+++	+++

III.3.2.9.b. Taninos catéquicos.

La investigación de la posible naturaleza caté-
quica la hemos realizado:

- R. con agua de bromo

Reactivo: agua de bromo

ácido acético glacial

Técnica: al añadir a los extractos unas gotas de ácido acé-
tico y gota a gota, agua de bromo, los taninos ca-
téquicos predipiten rápidamente(23).

Resultados:

TABLA XIV

Especies botánicas	Exts ^o .alcohólicos ^o		Ext ^o .ac.
	B ₁	B ₂	C
<u>F. agraria</u> Lag.	++	+	+
<u>F. caeruleata</u> L.	+	-	-
<u>F. reuteri</u> Boiss.	++	+	+++

- R. de Stiasny

Reactivo: ácido clorhídrico concentrado

sol. acuosa al 40% de formaldehido

Técnica: se añade a los extractos unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y alrededor de 1 ml de sol. de formaldehido, hirviéndose durante varios minutos. En caliente, precipitan los taninos catéquicos(23).

Resultados:

TABLA XV

Especies botánicas	Exts ^o .alcohólicos ^o		Ext ^o .ac.
	B ₁	B ₂	C
<u>F. agraria</u> Lag.	+++	+	++
<u>F. capreolata</u> L.	++	+	+
<u>F. reuteri</u> Boiss.	+++	+	++

III.3.2.9.c. Taninos pirogálicos.

Reactivo: cloruro férrico al 10%

Técnica: los extractos utilizados en las reacciones de investigación de taninos catéquicos, se filtran y en el filtrado se ensaya la reacción del Cl_3Fe .

Resultados:

TABLA XVI

Especies botánicas	Exts ^o .alcohólicos ^o		Ext ^o .ac.
	B ₁	B ₂	C
<u>F. agraria</u> Lag.	-	+	-
<u>F. capreolata</u> L.	-	-	-
<u>F. reuteri</u> Boiss.	+	+	-

III.3.2.10. Glúcidos.

Hemos utilizado tres tipos de reacciones:

- R. de Keller-Killiani modificada por Ew-Reichstein(24)

Reactivo: consta de dos soluciones:

Sol. I	sulfato férrico(sol. acuosa al 5%)....1 ml
	ácido acético glacial.....99 ml
Sol. II	sulfato férrico(sol. acuosa al 5%)....1 ml
	ácido sulfúrico concentrado.....99 ml

Técnica: se añade a los extractos unas gotas de la sol.I,y se agita.A continuación se añaden otras tantas gotas de la sol.II. La solución se colorea de azul ó azul verdoso al cabo de 5-10 minutos.(24)

Resultados:

TABLA XVII

Especies botánicas	Extracto acuoso
	C
<u>F.gararia</u> Lag.	—
<u>F.cappreolata</u> L.	—
<u>F.reuteri</u> Boiss.	—

- R. de Molisch.

Reactivo: α -naftol (sol. etanólica al 1%)

ácido sulfúrico concentrado

Técnica: se adiciona a los extractos, solución de α -naftol y después se deja resbalar por las paredes, 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Si la reacción es positiva aparece un anillo de interfase(25).

Resultados:

TABLA XVIII

Especies botánicas	Extracto acuoso
	C
<u>F. agraria</u> Lag.	—
<u>F. capreolata</u> L.	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—

* R. de Fehling.

Reactivo: está formado por dos soluciones:

Sol. A	sulfato de cobre cristalizado.....35g
	agua c.s.p.....1000 ml
Sol. B	tartrato de potasio 150g
	agua c.s.p.....1000 ml

Técnica: se adiciona el reactivo, calentando a B.M. durante dos minutos. La aparición de un precipitado rojo, indica resultado positivo(26).

Resultados:

TABLA XIX

Especies botánicas	Extracto acuoso
	C
<u>F. agraria</u> Lag.	—
<u>F. capreolata</u> L.	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—

III.3.2.11. Saponinas.

Basandonos en las propiedades características de estos compuestos, hemos puesto de manifiesto su presencia en las muestras por:

- Índice afrométrico.

Técnica: hacemos 2 partes de cada extracto; a la fracción I se adicionan unas gotas de ácido clorhídrico y se hierve durante 15 minutos. Ambas fracciones(I y II)

se agitan por separado, observando la cantidad de espuma persistente(27).

Resultados:

TABLA XX

Especies botánicas	Extracto acuoso (C)	
	I	II
<u>F. auraria</u> Lag.	—	—
<u>F. capreolata</u> L.	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	+

Extracto hidrolizado: (I)
 " no " : (II)

- R. de Rosenthaler.

Reactivo: vainillina alcohólica al 1%

ácido sulfúrico concentrado

Técnica: se añade a las fracciones (I) y (II) de los extractos unas gotas de vainillina alcohólica y 2 ó 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado; aparece una coloración característica en caso de resultado positivo(28).

Resultados:

TABLA XXI

Especies botánicas	Extracto acuoso (C)	
	I	II
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—
<u>F. caproclata</u> L.	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—

- Acción hemolítica.

Las saponinas destruyen las paredes celulares de los glóbulos rojos, liberándose la hemoglobina.

Reactivos: sol. fisiológica (sol. acuosa de CLNa al 9%)

sol. acuosa de CLNa al 1,8%

suspensión de G.R. al 3%

Técnicas: hemos tomado 3 ml de sangre humana, lavamos con sol. salina fisiológica; la suspensión obtenida se centrifuga durante 5 minutos aproximadamente, y el sobrenadante se desecha cuantas veces sea

necesario hasta que quede claro. Posteriormente diluimos al 3% en sol. salina fisiológica, el sedimento de G.R.. A continuación se coloca 1 ml de los extractos a ensayar en tubos de hemolisis; siguiendo la técnica, se adiciona 1 ml de sol. salina al 1,8% a cada muestra, para obtener una solución isotónica con la sangre. Sobre esta mezcla se añaden 3 ml de suspensión isotónica de G.R. al 3% y se deja reposar durante 12 horas; así mismo hemos preparado un patrón que nos permita llegar a unos resultados precisos.

En la reacción negativa aparece un sedimento rojo y el líquido conserva su color inicial; en la fuertemente positiva no hay sedimento y el líquido es rojo y transparente; entre ambos extremos aparece una gama de coloraciones(29).

Resultados:

TABLA XXII

Especies botánicas	Extracto acuoso (C)	Infusión al 10%	Maceración al 10%
<u>F. agraria</u> Lag.	—	+	—
<u>F. caprea</u> L.	—	—	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	+	+

III.3.2.12. Alcaloides.

Nuestros ensayos consisten en una serie de reacciones de precipitación, específicas de alcaloides.

Reactivos:

- R. de Mayer : cloruro mercúrico.....3,71g
- yoduro potásico.....10g
- agua c.s.p.....200ml

Precipitado blanco amarillento(30).

- R. de Bouchardat : yodo.....2g
- yoduro potásico.....2g
- agua.....100ml

Precipitado castaño oscuro(30).

- R. de Dragendorff : subnitrato de bismuto.....8g
 yoduro potásico.....22,8g
 ácido nítrico al 30%.....20ml
 agua destilada,c.s.p.....100ml

Precipitado de color anaranjado(30).

- R. de Hager : sol. saturada de ácido pícrico

Precipitado de color amarillo(31).

Técnica: se añaden los reactivos sobre distintas fracciones

que hacemos de cada uno de los extractos.

a = fracción del extracto en la que se ha ensaya-
do el reactivo de Mayer.

b = fracción del extracto en la que se ha ensaya-
do el reactivo de Bouchardat.

c = fracción del extracto en la que se ha ensaya-
do el reactivo de Dragendorff.

d = fracción del extracto en la que se ha ensaya-
do el reactivo de Hager.

Resultados:

TABLA XXIII

Especies botánicas	Extracto B ₁ (alcohol 96%)			
	a	b	c	d
<u>F. acroaria</u> Lag.	—	+	+	+
<u>F. cepreolata</u> L.	—	—	+	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	—	—	++	—

TABLA XXIV

Especies botánicas	Extracto B ₂ (alcohol 96°)			
	a	b	c	d
<u>F. agraria</u> Lag.	++	+	+++	+
<u>F. capreolata</u> L.	+	+	++	+
<u>F. reuteri</u> Boiss.	+	+	++	+

TABLA XXV

Especies botánicas	Extracto C (acuoso)			
	a	b	c	d
<u>F. agraria</u> Lag.	—	—	+++	—
<u>F. capreolata</u> L.	—	—	+++	—
<u>F. reuteri</u> Boiss.	+	++	+++	—

III.3.2.13. Discusión de resultados.

Las tablas XXVI, XXVII y XXVIII que a continuación exponemos, recogen los resultados obtenidos en el "screening" farmacoc químico realizado para cada una de las muestras estudiadas.

Estos datos, ponen de manifiesto la similitud que presentan las tres especies botánicas en relación a su contenido en principios activos, mostrando, al parecer, una mayor diferenciación desde el punto de vista cuantitativo que cualitativo.

TABLA XXVI

Grupos químicos	Extractos etéreos			Extos alc. 96°		Ext ^{ac.}
	Ext ^{ra} ₁	Ext ^{ra} ₂	Ext ^{ra} ₃	Ext ^{ab} ₁	Ext ^{ab} ₂	Ext ^{ac}
Cuerpos grasos	+++	+++	-			
Pigmentos carotenoides	-	-	-			
Esteroles y triterpenos	+	+	-			
Quinonas libres	-	-	-	-	-	-
Quinonas combinadas	-	-	-	+	-	-
Lactonas pent. insaturadas	-	-	-	-	-	-
Pigmentos antociánicos	-	-	-	-	-	
Pigmentos leucoantocián.	-	-	-	-	-	
Flavonoides				-	-	-
Taninos				+++	+++	+++
Glúcidos						-
Saponinas						+
Alcaloides				+	+++	+++

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL "SCREENING" FARMACOQUIMICO

DE F. AGRARIA LAG.

TABLA XXVII

Grupos químicos	Extractos etéreos			Extos alc.96º		Extºec.
	ExtºA ₁	ExtºA ₂	ExtºA ₃	ExtºB ₁	ExtºB ₂	ExtºC
Cuerpos grasos	++	++	-			
Pigmentos carotenoides	-	-	-			
Esteroles y triterpenos	+	+	-			
Quinonas libres	-	-	-	-	-	-
Quinonas combinadas	-	-	-	+	-	-
Lactonas pent. insaturadas	-	-	-	-	-	-
Pigmentos antociánicos	-	-	-	-	-	
Pigmentos leucoantocián.	-	-	-	-	-	
Flavonoides				-	-	-
Taninos				+++	+	+
Glúcidos						-
Saponinas						-
Alcaloides				+	++	+++

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL "SCREENING" FARMACOQUIMICO

DE F. CAPREOLATA L.

TABLA XXVIII

Grupos químicos	Extractos etéreos			Ext ^o s alc. 95%		Ext ^o ac.
	Ext ^o A ₁	Ext ^o A ₂	Ext ^o A ₃	Ext ^o B ₁	Ext ^o B ₂	Ext ^o C
Cuerpos grasos	+++	+++	-			
Pigmentos carotenoides	-	-	-			
Esteroles y triterpenos	+	+	-			
Quinonas libres	-	-	-	-	-	-
Quinonas combinadas	-	-	-	++	-	-
Lactonas pent. insaturadas	-	-	-	-	-	-
Pigmentos antociánicos	-	-	-	-	-	
Pigmentos leucoantocián.	-	-	-	-	-	
Flavonoides				-	-	-
Taninos				+++	+++	+++
Glúcidos						-
Saponinas						+
Alcaloides				++	++	+++

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL "SCREENING" FARMACOQUIMICO

DE F. REUTERI BOISS.

III.3.3. Determinación de aceites esenciales.

Hemos seguido el método de Clevenger modificado, que consiste en la obtención de la esencia y medición directa del volumen obtenido(32).

Partimos aproximadamente de 10 g de droga desecada, que se introduce en un matraz de fondo redondo; se añade 1 litro de agua saturada de sal y se calienta a la llama.

Cada media hora se lee el volumen de esencia, finalizando la operación cuando las lecturas coincidan.

Resultados:

F. agraria Lag.....negativo

F. capreolata L.....negativo

F. rauteri Boiss.....negativo

III.4. ENSAYOS FARMACODINAMICOS.

El empleo en medicina popular de la Fumaria officinalis como depurativa(33), nos hace en principio sospechar que las especies de Fumaria L. estudiadas por nosotros puedan tambien ser portadoras de esta acción farmacodinámica. Por ello iniciamos el estudio de la actividad diurética y colerética.

III.4.1. Extractos utilizados.

Administramos a los animales una maceración acuosa de cada una de las especies del género Fumaria L. estudiadas ya fitoquímicamente.

La maceración la hemos llevado a cabo según el método habitual(34) y la dosis es la utilizada en medicina popular para la Fumaria officinalis, ya que en la bibliografía consultada, no hemos encontrado referencias de las fumarías: agraria, capreolata y reuteri.

III.4.2. Descripción general de técnicas.

III.4.2.1. Diuresis.

Los diuréticos son fármacos que provocan primariamente la excrección del ión sodio, produciendo un balance negativo de dicho catión; la excrección de sodio va acompañada de la de cloruro, por lo que los términos diurético y salinurético se consideran sinónimos(35).

Actualmente son muy utilizados, siendo su principal aplicación el conseguir la eliminación de los líquidos extracelulares que se encuentran en exceso(36); en estos procesos edematosos, no solo interesa la eliminación de líquido, siendo de gran importancia la eliminación de sodio(37).

Para el estudio en el laboratorio de fármacos con posible actividad diurética, existen, diversas técnicas que van desde las mas sencillas a las ya claramente especializadas. A continuación exponemos un resumen de las técnicas mas empleadas:

A. Método de Taylor y Toppliss(38)

Este test se utiliza para comparar actividades. Se realiza con seis lotes de ratas, a tres de los cuales

se administra via oral hidroclortiazida; a los otros tres se administra el problema a dosis tanteadas para producir efectos similares.

B. Test de Cummins y cols. (39)

Es satisfactorio para la detección de la actividad diurética. Se dispone de dos ratas por cada sustancia en estudio y ocho ratas que sirven de control. Si la sustancia problema produce una excrección de orina, como mínimo, triple que la control, es aceptada; si es dos veces menor que la control es rechazada; si no se puede tomar una decisión sobre su actividad, se repite la prueba.

C. Método de Iraverso y cols. (40)

Se hace con perros anestesiados a los que previamente se les ha administrado el problema en una cápsula; se cateteriza la vejiga.

Utilizando el método introducido por Malvin (stop-glow), la recolección de orina puede hacerse con mas seguridad; consiste en pinzar el ureter de forma que al aumentar la presión en el nefrón se detiene la filtración glomerular y el flujo tubular; luego de unos minutos se libera

la obstrucción y se recogen varias muestras de pelvis renal (41).

Estas técnicas se utilizan para realizar un "screening" y son relativamente sencillas, no así, las técnicas que permiten localizar el lugar de acción de los diuréticos: utilización de isótopos radiactivos...

En cuanto a la elección del animal, el perro y el conejo son idóneos para técnicas que precisan intervención quirúrgica, dado su tamaño; en algunas técnicas en las que la cirugía no es necesaria, la rata es el animal más útil, por su tamaño menor y fácil manejo.

Según algunos farmacólogos(42) el perro es el animal ideal, ya que su sistema renal se asemeja al del hombre más estrechamente que el de otras especies, por lo cual han sido usados extensivamente en estudios renales, aunque parece ser la rata, al menos tan útil como el perro para la predicción cualitativa de la actividad diurética en el hombre(43); las ratas machos son preferibles para evitar la posible influencia de la variación hormonal en la excrección de electrolitos, lo que no es óbice para que el uso de ratas hembras haya dado satisfactorios resultados en muchos

laboratorios.

La preparación del animal elegido, varia de unos autores a otros, sobre todo en lo concerniente al ayuno del animal; unos retiran la comida la noche anterior a la experiencia pero dejando agua "ad libitum" y otros administran horas antes de la prueba agua mediante sonda gástrica.

III.4.2.1. Coleresis.

Los coleréticos son fármacos que actúan sobre la secreción biliar.

La bilis se produce en el hígado en forma continua y se almacena y concentra en la vesícula biliar. Tiene acción digestiva relacionada principalmente con la digestión y absorción de las grasas y vitaminas liposolubles.

El proceso de secreción de la bilis por el hígado se denomina coleresis, a diferencia del proceso de expulsión de la vesícula que es un proceso intermitente denominado colagogía(44).

Dentro de los fármacos que actúan sobre la secreción biliar se incluyen tres grupos de sustancias(45):

1. Colagogos ó colecistocinéticos: provocan la evacuación de la bilis vesicular por simple acción mecánica.
2. Coleréticos ó hidrocoleréticos: estimulan la función biliar por acción sobre la misma célula hepática.
3. Hipocoleréticos: reducen la coleresis.

En cuanto a métodos de estudio, los directos son los mas utilizados para el estudio experimental de la actividad colerética, estando mas indicados los indirectos para una exploración mas general de la función hepática.

Por tratarse nuestro trabajo de realizar un "screening" hemos preferido la técnica de la fístula temporal, ya que la fístula permanente está mas indicada en el estudio de un mecanismo de acción. La fístula temporal, como su nombre indica, está limitada a un lapsus de tiempo relativamente corto (3 ó 4 horas), lo que permite operar fácil y rápidamente sobre un número grande de animales; presenta el inconveniente de que la anestesia y el traumatismo operatorio no dejan de ejercer cierta influencia sobre el ritmo de secreción(46); se observa una disminución ligera de la secreción biliar con el tiempo, atribuida en gran parte a la ruptura del ciclo entero-hepático de la bilis(47).

La fístula permanente por el contrario, evita la influencia perturbadora del shock operatorio(48).

Podemos hablar de dos técnicas generales, que a continuación describimos de forma resumida.

A. Técnica bajo anestesia.

El animal es anestesiado con etil-uretano al 50% (0,25ml/100g de peso)(49) y fijado sobre una mesa soporte; una vez canulado el colédoco, se procede a recoger la bilis.

B. Técnica de contención.

Solo se realiza en perro. El animal se anestesia ligeramente y se canula el colédoco. Se coloca en una red metálica con cuatro orificios en posición conveniente para la introducción de las patas que inmovilizamos; cuando el animal sale de la anestesia procedemos al ensayo(50). En esta técnica es especialmente importante la regulación de la temperatura durante la experiencia.

La elección del animal es fundamental hacerla convenientemente si se quiere realizar una experimentación con vistas a la posible transposición de datos en clínica. Pueden ser utilizados el perro, cobaya, gato, rata y conejo.

El gato y el cobaya han sido muy poco utilizados por los investigadores, los mas usados son el conejo, la rata y el perro.

Se reprocha al cobaya el ser herbívoro y tener un flujo biliar demasiado elevado; al contrario que el gato que tiene un flujo biliar débil, por lo que algunos autores proponen aumentarlo con dehidrocolato de sodio; esta práctica puede falsear los resultados, pero aún así es utilizado(51).

Por su parte el conejo tiene muchos inconvenientes: herbívoro, flujo biliar elevado, suministra respuestas irregulares.

El perro es el animal mas utilizado, su flujo biliar es el mas similar al hombre, sin embargo, algunos autores dicen que no responde de manera uniforme a sustancias activas; La Barre señala que la administración intravenosa de diuréticos sintéticos produce en el perro una disminución de la secreción biliar(45).

No hay duda de que la rata después del perro ha sido el animal mas utilizado y todos los autores que han trabajado con ella, reconocen que es un animal excelente por su conformación anatómica favorable, flujo estable en

el tiempo, respuesta parecida a la acción de agentes colé-
réticos en el hombre; por otra parte su precio no es muy
elevado y son fáciles de conseguir.

III.4.3. Actividad diurética.

Reactivo: el animal: ratas blancas wistar, machos de un pe-
so aproximado de 150-200g.

Hemos elegido la rata por razones económicas, fa-
cilidad de manejo y ser uno de los animales que
aconsejó la bibliografía.

Dosis: 2 ml de extracto/100g de peso del animal(52).

Técnica: "Animal no anestesiado".

Se dispone de dos lotes de animales, que se dejan
en ayunas (agua y comida) durante las 18 horas
que preceden al ensayo(53). Un lote es utilizado
como testigo y el otro como problema.

Las ratas se colocan en jaulas especiales
de metabolismo, donde permanecen durante la expe-
riencia. Estas jaulas tienen un piso de alambre y
debajo un embudo por donde pasa la orina que va a

ser recogida en una probeta. (Fig. 1 y 2).

Transcurridas las 18 horas de ayuna, los animales testigos reciben mediante sonda gástrica una solución de cloruro de sodio al 9%; del mismo modo al lete problema administramos igual volumen del extracto preparado de cada una de las plantas estudiadas por nosotros. Pasadas 5 horas desde la administración, se procede a la lectura del volumen de orina recogido en las probetas.

La experiencia se ha realizado a una temperatura media de 23-24°C.

Resultados:

PRUEBA EN BLANCO

<u>Animal</u>	<u>Cantidad de orina en ml</u>
1	1,4
2	1,2
3	1,3
4	1,7
5	1,2
6	1,4

TOTAL : 8,20

MEDIA : 1,36

 δ : $\pm 0,115$ $\% \delta$: 8,507Fórmula utilizada:

$$\delta = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}}{N - 1}}$$

MACERACION DE FUMARIA AGRARIA LAG.

<u>Animal</u>	<u>Cantidad de orina en ml</u>
1	3,5
2	1,0
3	2,1
4	3,3
5	3,5
6	3,9

TOTAL : 17,30

MEDIA : 2,88

 δ : $\pm 0,524$ $\% \delta$: 18,211

MACERACION DE FUMARIA CAPREOLATA L.

<u>Animal</u>	<u>Cantidad de orina en ml</u>
1	3,5
2	4,6
3	3,9
4	3,3
5	3,0
6	5,4

TOTAL : 23,70

MEDIA : 3,95

 δ : \pm 0,472 $\% \delta$: 11,949

MACERACION DE FUMARIA REUTERI BOISS.

<u>Animal</u>	<u>Cantidad de orina en ml</u>
1	4,0
2	3,8
3	3,3
4	2,5
5	2,3
6	3,8

TOTAL : 19,70

MEDIA : 3,28

 δ : $\pm 0,328$ $\% \delta$: 10,010

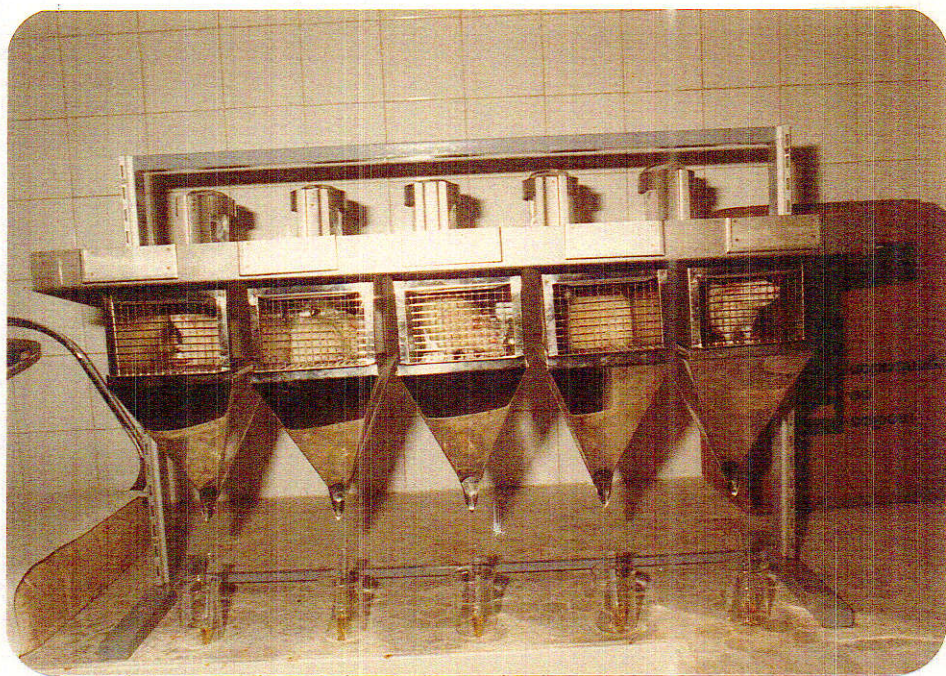


Fig. 1

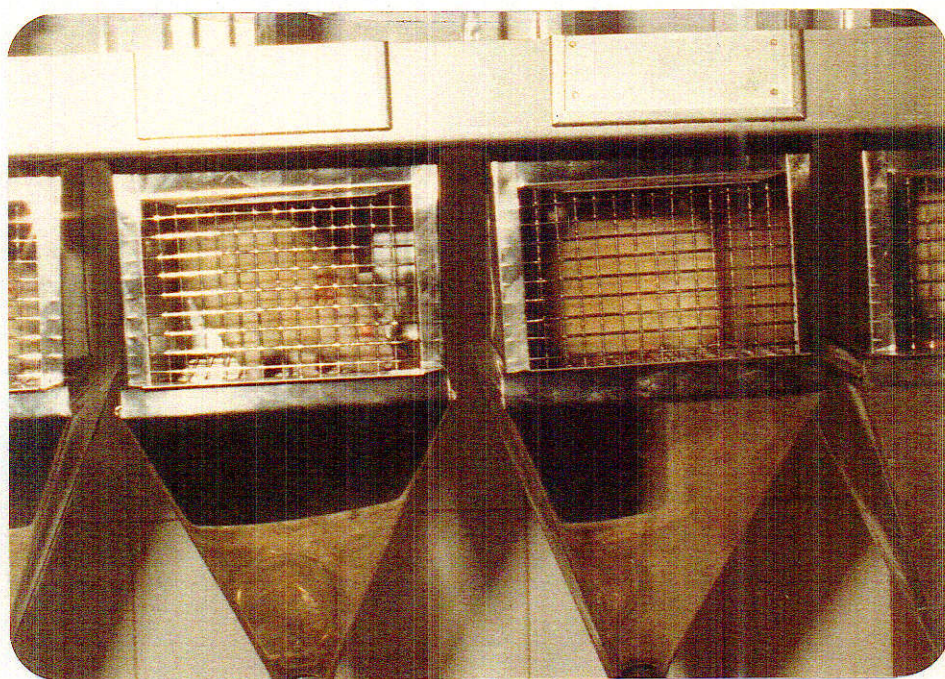


Fig. 2

III.4.3.1. Discusión de resultados.

La administración a los animales (ratas Wistar de peso medio 150-200g) de las maceraciones acuosas de las sumidades floridas de las Fumarias agraria, capreolata y reuteri, modifican positivamente la actividad diurética durante el periodo que dura la experiencia, incrementando el volumen de orina en un 111,76%, 190,44% y 141,17% tras la administración del extracto de F. agraria Lag., F. capreolata L. y F. reuteri Boiss. respectivamente, oscilando entre 8,507 y 18,211 los % de δ , cifras admitidas en los ensayos farmacodinámicos.

III.4.4. Actividad colecistocinética.

Reactivo: el animal: ratas blancas ,wistar, machos, de un peso aproximado de 150-200g.

Hemos elegido las ratas por las razones indicadas en el apartado (III.4.2.1).

Dosis: 2 ml de extracto/100g de peso del animal(52).

Técnica: "Fístula biliar temporal en ratas anestesiadas".

El animal es anestesiado con etil-uretano al 50% a razón de 0,25 ml/100g de peso por via intraperitoneal y fijado en la mesa soporte. Se hace una incisión de 3 ó 4 cm debajo del esternón; se extrae el duodeno suavemente fuera de la cavidad, se aísla el colédoco y se cateteriza mediante un tubo de polietileno de pared fina. La rata no tiene vesícula pero el colédoco está englobado en los 2/3 de su recorrido por el pancreas. Por ello, hay que cateterizar antes de su unión con el pancreas, pues si la cánula se coloca a nivel del duodeno lo que se recoge es una mezcla de jugo pancreático y bilis.(Fig. 3 y 4).

La bilis es recogida en un tubo de ensayo graduado al centésimo; los volúmenes se miden cada 30 minutos durante tres horas.

Cada maceración se ha estudiado sobre un lote de 3 ratas; la administración de estas maceraciones se hizo 30 minutos antes de comenzar la experiencia mediante sonda gástrica a dosis de 2 ml/100g. Un lote de animales que sirven de control reciben la misma cantidad de agua destilada, según la técnica seguida por Ciareci y cols.(54).

Al igual que en la prueba de diuresis, los animales están en ayunas durante las 18 horas que preceden al ensayo(50:).

La experiencia se ha realizado a una temperatura media de 21-22°C.

Resultados:

PRUEBA EN BLANCO

<u>Animal</u>	<u>Cantidad de bilis en ml</u>						
	<u>30min.</u>	<u>60min.</u>	<u>90min.</u>	<u>120min.</u>	<u>150min.</u>	<u>180min.</u>	<u>210min.</u>
1	0,8	1,1	1,4	1,8	2,1	2,4	2,6
2	0,4	0,7	1,9	2,1	2,3	2,6	2,8
3	0,6	0,9	1,1	1,3	1,5	1,7	2,0
TOTAL :	1,80	2,70	4,40	5,20	5,90	6,70	7,40
MEDIA :	0,60	0,90	1,46	1,73	1,96	2,23	2,46

MACERACION DE FUMARIA AGRARIA LAG.

<u>Animal</u>	<u>Cantidad de bilis en ml</u>						
	<u>30min.</u>	<u>60min.</u>	<u>90min.</u>	<u>120min.</u>	<u>150min.</u>	<u>180min.</u>	<u>210min.</u>
1	0,4	0,5	0,7	0,8	1,0	1,1	1,5
2	0,5	0,8	1,2	1,4	1,6	1,9	2,1
3	0,8	1,3	1,5	1,9	2,1	2,5	2,7
TOTAL :	1,70	2,60	3,40	4,10	4,70	5,50	6,30
MEDIA :	0,56	0,86	1,13	1,36	1,56	1,83	2,10

MACERACION DE FUMARIA CAPREOLATA L.

Animal	<u>Cantidad de bilis en ml</u>						
	30min.	60min.	90min.	120min.	150min.	180min.	210min.
1	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
2	0,7	0,9	1,0	1,2	1,6	1,8	2,0
3	0,1	0,3	0,4	0,6	0,7	1,0	1,4
TOTAL:	1,20	1,80	2,20	2,80	3,50	4,20	5,00
MEDIA :	0,40	0,60	0,73	0,93	1,16	1,40	1,66

MACERACION DE FUMARIA REUTERI BOISS.

Animal	<u>Cantidad de bilis en ml</u>						
	30min.	60min.	90min.	120min.	150min.	180min.	210min.
1	0,4	0,6	0,9	1,2	1,4	1,8	2,0
2	0,3	0,6	0,8	1,0	1,1	1,2	1,4
3	0,7	1,0	1,2	1,5	1,6	2,0	2,2
TOTAL :	1,40	2,20	2,90	3,70	4,10	5,00	5,60
MEDIA :	0,46	0,73	0,96	1,23	1,36	1,66	1,86

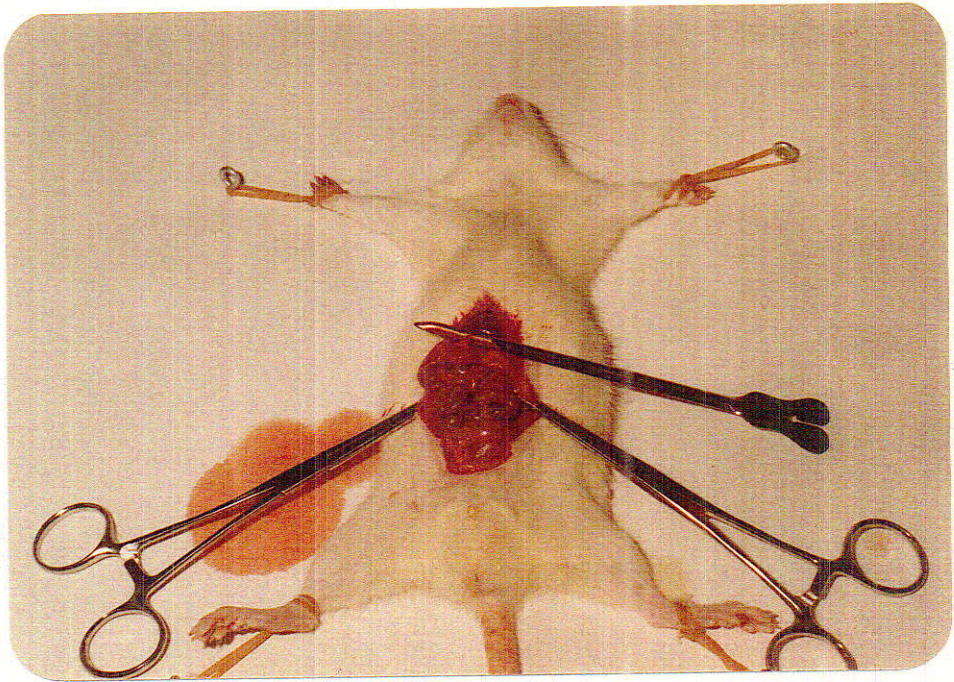


Fig. 3

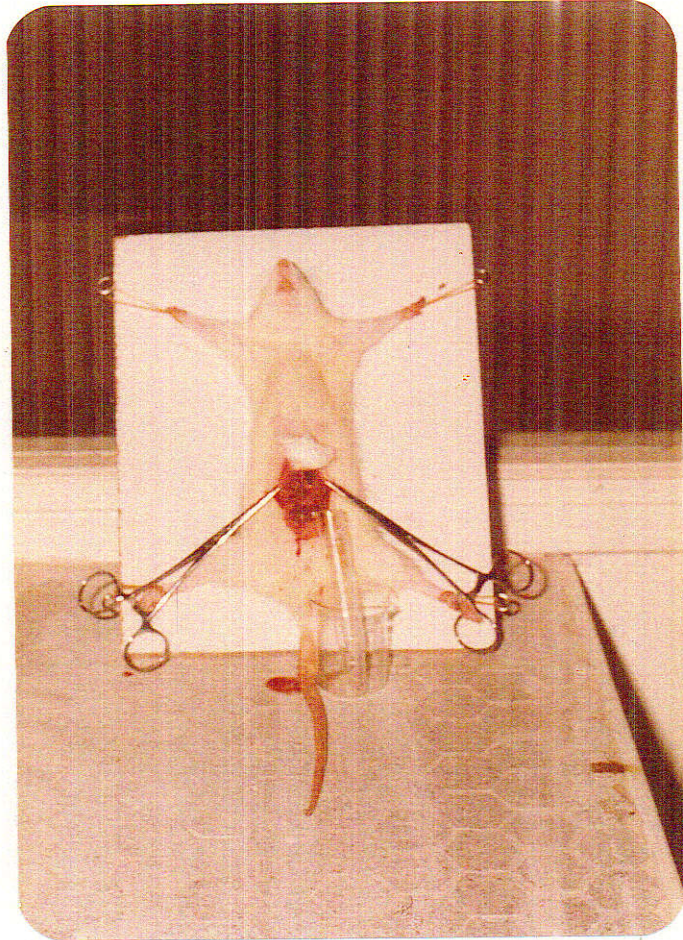


Fig. 4

III.4.4.1. Discusión de resultados.

Los resultados obtenidos tras la administración de las maceraciones acuosas de las sumidades floridas de las *Fumarias agraria*, *capreolata* y *reuteri*, nos ponen en evidencia la inactividad colecistocinética de dichos extractos, ya que el volumen de bilis recolectado en la prueba en blanco (animales sin tratar) a las tres horas y media de la administración de la solución fisiológica es de 2,46 ml, siendo de 2,10 , 1,66 y 1,86 ml los recolectados tras la administración de los extractos problemas, en el mismo tiempo. Podemos deducir, que no sólo no aumentan el flujo biliar sino que se encuentra inhibido al administrar los de F. capreolata L. y F. reuteri Boiss..

Ante los resultados negativos de la experiencia, sólo la hemos llevado a cabo en lotes de tres animales ya que después del ensayo el animal no sobrevive y encontramos bastantes dificultades en su adquisición. Pero sí que son suficientes para poder afirmar el carácter negativo de la experiencia.

IV.- CONCLUSIONES

1. Las muestras en estudio presentaron un alto contenido en cenizas, destacando la correspondiente a la F.ca-preolata L.
2. Los ensayos de cuerpos grasos, taninos catéquicos y alcaloides son claramente positivos en las tres especies, manifestando ciertas diferencias cuantitativas.
3. Las determinaciones de pigmentos carotenoides, quinonas libres, lactonas pentagonales insaturadas, antociánicos, leucoantociánicos, flavonoides, glúcidos, así como aceites esenciales, se mostraron negativas.
4. Los resultados obtenidos tras el ensayo de la actividad diurética, nos permiten afirmar que la maceración acuosa de las tres especies del género Fumaria L. en estudio, aumenta notablemente el volumen de orina excretada, mostrando una mayor actividad el extracto de F. capreo-lata L..
5. Por el contrario, la administración de estos extractos a los animales no modifica la actividad colecistociné-

tica de forma positiva, incluso podemos observar que
trás la administración de los extractos de F. capreo-
lata L. y F. reuteri Boiss., la secreción biliar se
encuentra ligeramente inhibida; hecho en el que pro-
fundizaremos en estudios posteriores.

V.- BIBLIOGRAFIA

- (1).- ENGLER, A. (1964) Syllabus der Pflanzenfamilien,
2:178-182. Gebrüder Borntraeger, Berlin-Nikolassee.
- (2).- CRONQUIST, A. (1968) The evolution and classification
of flowering plants, 154-156. Hazell Watson y Viney
Ltd., Aylesbury, Bucks.
- (3).- HUTCHINSON, J. (1969) Evolution and Phylogeny of flo-
wering plants, 511. Academic Press, London y New York.
- (4).- TAKHTAJAN, A. (1969) Flowering plants. Origin and dis-
persal, 208. Oliver y Boyd, Edinburgh.
- (5).- MAIRE, R. (1965) Flore de l'Afrique du Nord, XII:5-115.
Le Chevalier, Paris.
- (6).- Ibid, pags. 60-63.
- (7).- Ibid, pags. 78-79.
- (8).- Ibid, pags. 98-99.
- (9).- CABO TORRES, J., PARDO GARCIA, P. (1974) Prácticas de
Farmacognosia y Farmacodinamia, 215. Granada.

- (10).- Ibid, pag. 225.
- (11).- DOMINGUEZ, A. (1961) Analisis Fitoquímico. Ciencia 21:126.
- (12).- DIAZ CASADO, V. (1977) Estudio sobre el Rosmarinus Eriocalix. Tesina, Granada.
- (13).- DTERO AENLLE, E. (1946) Enálisis de grasas, ceras y sus mezclas comerciales, 10. Dossat S.A., Madrid.
- (14).- PARIS, R., MOYSE, H. (1965) Matière médicale, I:97. Masson, Paris.
- (15).- Ibid, pag. 94.
- (16).- DOMINGUEZ, X.A. (1973) Métodos de investigación Fitoquímica, 147. Limusa S.A., México.
- (17).- BOUQUET, A., FOURET, A. (1975) Recherches chimiques préliminaires sur les plantes medicinales du Congo-Brazzaville, Fit., 46:175.

(18).- Loc. cit. (16), pag. 141.

(19).- TORRENT MARTI, M.T. (1976) Algunos aspectos farmacog-
nosticos y farmacodinámicos de Lippia citriodora
H.B.K.. Rev. B. Acad. de Barcelona, 14:39.

(20).- Loc. cit. (12), pag. 256.

(21).- SHINODA, J. (1928) J. Pharm. Soc. 48:214. Japan. Loc.
cit. VENKATARAMAN, K. (1962) The chemistry of flavo-
noids compounds.

(22).- Loc. cit. (9), pag. 91.

(23).- Loc. cit. (9), pag. 92.

(24).- Loc. cit. (16), pag. 199.

(25).- Loc. cit. (16), pag. 204.

(26).- Loc. cit. (14), pag. 116.

(27).- Loc. cit. (9), pag. 95.

(28).- Loc. cit. (16), pag. 153.

- (29).- Loc. cit. (9), pag. 98.
- (30).- MARTIN CASAMADA, R. (1977) Tratado de Farmacognosia, 612. Ed. Científico-Médica, Barcelona.
- (31).- TREASE, G.E., EVANS, W.C. (1976) Farmacognosia, 166. Continental S.A., Barcelona.
- (32).- Loc. cit. (9), pag. 245.
- (33).- SELLES MARTI, E. (1976) Farmacia Galénica General, 111. Universidad de Granada, Dpto. de Farmacia Galénica Gral., Granada.
- (34).- FONT QUR, P. (1976) Plantas medicinales, 249. Labor S.A., Barcelona.
- (35).- LITTER, M. (1973) Manual de Farmacología, 807. 4ª ed., El Ateneo, Buenos Aires.
- (36).- BOWMAN, W.C., RAND, M.J., WEST, G.B. (1970) Farmacología, 839. Jims, Barcelona.
- (37).- LORENZO VELAZQUEZ, B. (1976) Farmacología y proyección a la clínica, 730. 13ª ed., Oteo, Madrid.

- (38).- TAYLOR, R.M., TOPLISS, J.G. (1962) J. med. Pharm. chem.
4: 312.
- (39).- CUMMINGS, J.R. y cols. (1960) J. Pharmacol., exper.
Therap., 128:414.
- (40).- TRAVERSO, J.J. y cols. (1962) J. med. Pharm. chem.
5:808.
- (41).- Loc. cit. (35), pag. 804.
- (42).- TURNER, R.A. (1965) Screening methodes in Farmacology,
251. Acad. Press, N. York.
- (43).- NODINE, J. y cols. (1964) Animal and clinical pharmaco-
logic Thecniques in drugs evaluations, 231. Year book
medical publishers inc., Chicago.
- (44).- Loc. cit (35), pag. 948.
- (45).- GIROUX, M.M.J., BOUCARD, M. (1964) Le problème de l'étude
experimentale des cholerétiques. Extrait du Lyon Phar-
maceutique, 2:51-90.

- (46).- VALETTE,G.(1966) Manual de Farmacología, 401.
Toray-Masson, Barcelona.
- (47).- BOUCARD,M.M.,ABELA,R.(1963) La fistule biliare
chez le rat. Bull. Soc. Pharm., 102 :99.Bordeaux.
- (48).- WRIGHT,S.(1965) Fisiología aplicada, 488. Marin,
Barcelona.
- (49).- VAILLE,Ch.(1966) Ann. Pharm. fr., 24,7-8,515.
- (50).- CORREIRA DA SILVA, Estudo de medicamentos prepara-
dos a partir de Galium mollugo, com a tecnica de
fistula biliar do rato. Centro de Estudos Farmacoló-
gicos do Instituto de Alta Cultura. Laboratorio de
Farmacodinamia. Portugal.
- (51).- Loc. cit. (46),pag. 420.
- (52).- Loc. cit. (46),pag. 401.
- (53).- BARASTEGUI ALMAGRO,C.(1976) Esquemas y prácticas de
Farmacología, 217. Espaxs, Barcelona.

(54).- CIARECI, G. y cols. (1970) Fitoterapia, 3.