

CATEDRA DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

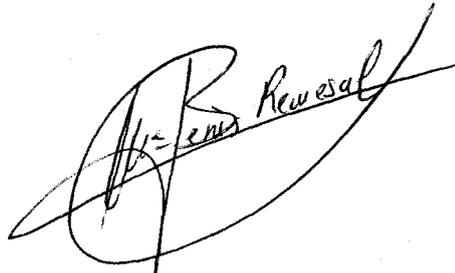
FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

"ESTUDIO COMPARATIVO DE DIVERSAS ESPECIES DEL
GENERO ONONIS".

Trabajo para aspirar al grado
de licenciatura que presenta

M^a JESUS REMESAL SANCHEZ

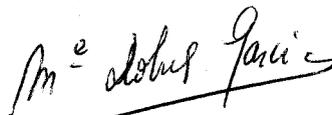
A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jesus Remesal", written over a large, stylized circular flourish.

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 -
las Dras. M^a José Martín Calero y M^a Dolores García Giménez.

Las directoras del trabajo:

Handwritten signature of M.ª José Martín Calero, written in black ink. The signature is enclosed in a large, hand-drawn oval shape.

Dra. M^a José Martín Calero

Handwritten signature of M.ª Dolores García Giménez, written in black ink. The signature is enclosed in a large, hand-drawn oval shape.

Dra. M^a Dolores García Giménez



CATEDRA DE FARMACOGNOSIA - FARMACODINAMIA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FELIPE ALCUDIA GONZALEZ, Catedrático-Director del Departamento de Química Orgánica-Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA: Que el presente trabajo, "Estudio comparativo de diversas especies del genero Ononis", ha sido realizado en dicho Departamento, bajo la dirección de las Dras. M^a José Martín Calero y M^a Dolores García Giménez, durante el tiempo exigido y reuniendo los requisitos necesarios para este tipo de trabajos.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación en Sevilla a ventitres de Junio de mil novecientos ochenta y seis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Felipe', written over a horizontal line.

Fdo:Prof. Dr. Felipe Alcudia González

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Elisa Marhuenda Requena, por haberme permitido realizar este trabajo en la Cátedra de Farmacognosia Y Farmacodinamia.

A mis directoras las Dras. M^a José Martín Calero y M^a Dolores García Giménez por su dedicación y estímulo en todo momento.

A mis compañeros de Departamento por su colaboración desinteresada.

Al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de Sevilla, especialmente a la Dra. M^a Isabel Serrano y a D. Antonio Guillén.

A mi familia

A mi hijo

	Pág
I - <u>OBJETO</u>	1
II - <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	3
II.1.- ESTUDIO MONOGRAFICO DEL GENERO ONONIS	6
II.1.1.- <u>Situación Taxonómica</u>	6
II.1.2.- <u>Micromorfología</u>	7
II.1.3.- <u>Fitoquímica</u>	7
II.1.4.- <u>Acción farmacodinámica y usos terapéuticos..</u>	10
II.1.5.- <u>O.speciosa Lag.</u>	11
II.1.6.- <u>O.mitissima L.</u>	13
III - <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	15
III.1.- MUESTRAS EMPLEADAS	16
III.1.1.- <u>Recolección</u>	16
III.1.2.- <u>Desecación y conservación</u>	16

	Pág.
III.2.- MICROMORFOLOGIA.....	17
III.2.1.- <u>Técnicas y reactivos</u>	17
III.2.2.- <u>Resultados</u>	17
III.2.3.- <u>Discusión de resultados</u>	26
III.3.- ENSAYOS GENERALES CUANTITATIVOS.....	27
III.3.1.- <u>Determinación de humedad</u>	27
III.3.1.1.- Resultados	27
III.3.2.- <u>Determinación de cenizas</u>	29
III.3.2.1.- Resultados.....	29
III.3.3.- <u>Determinación de esencias</u>	31
III.3.3.1.- Resultados	31
III.3.4.- <u>Discusión de resultados</u>	32

	Pág.
III.4.- ENSAYOS GENERALES CUALITATIVOS.....	33
III.4.1.- <u>Resultados</u>	41
III.4.2.- <u>Discusión de resultados</u>	44
III.5.- EXTRACCION E IDENTIFICACION DE ACIDOS FENOLES.....	45
III.5.1.- <u>Cromatografía capa fina</u>	47
III.5.2.- <u>Cromatografía preparativa</u>	53
III.5.3.- <u>Espectroscopia U.V.</u>	53
III.5.4.- <u>Discusión de resultados</u>	60
III.6.- EXPERIENCIAS FARMACODINAMICAS	60
III.6.1.- <u>Generalidades</u>	60
III.6.1.1.- Extractos utilizados	60
III.6.1.2.- Reactivo animal	61
III.6.1.3.- Interpretación de resultados	61
III.6.2.- <u>Toxicidad aguda</u>	63
III.6.2.1.- Descripción de la técnica	63

	Pág.
III.6.2.2.- Desarrollo de la experiencia.....	53
III.6.2.3.- Resultados	64
III.6.2.4.- Discusión de resultados	66
III.6.3.- <u>Actividad diurética</u>	67
III.6.3.1.- Descripción de la técnica	67
III.6.3.2.- Desarrollo de la experiencia	68
III.6.3.3.- Resultados	69
III.6.3.4.- Discusión de resultados	82
III.6.4.- <u>Actividad antihipertensiva</u>	83
III.6.4.1.- Descripción de la técnica	84
III.6.4.2.- Desarrollo de la experiencia	84
III.6.4.3.- Resultados	85
III.6.4.4.- Discusión de resultados	93
IV - <u>CONCLUSIONES</u>	94
V - <u>BIBLIOGRAFIA</u>	97

I- OBJETO

II - REVISION

BIBLIOGRAFICA

ONONIS SPECIOSA LAG.



ONONIS MITISSIMA L.



II.1.-ESTUDIO MONOGRAFICO DEL GENERO ONONIS

II.1.1.-Situación Taxonómica

División:	Spermatophyta
Subdivisión:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliatae
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Papilionaceae
Subfamilia:	Papilioideae
Tribu:	Trifoliae
Género:	Ononis
Especie:	O.speciosa Lag.
Especie:	O.mitissima L.

La división Spermatophyta, en la subdivisión Magnoliophyta, antes llamada Angiospermae, comprende la clase Magnoliatae, que era conocida antiguamente como Dicotyledoneae. Esta clase comprende a su vez la subclase Rosidae, con 17 órdenes, uno de ellos es el Fabales.

Aunque hasta esta categoría los autores están parcialmente de acuerdo, en los límites de cada uno de los taxones a nivel de familia existen una gran disparidad de opiniones. Por este motivo los límites de Fabales, Leguminosae y Papilionaceae son variables dependiendo de la fuente histórica consultada.

En nuestro caso utilizamos el término de Papilionaceae en sentido amplio incluyendo a tres subfamilias de las cuales la familia típica (Papilionaceae) comprende diez tribus.

La tribu Trifoliae está caracterizada por presentar hojas pinnadas ó trifoliadas, estambres normalmente diadelfos -- (9+A), pero ocasionalmente monodelfos con anteras todas --- ellas normales.

Vegetativamente son plantas herbáceas y muy excepcionalmente hierbas.

El género *Ononis* fué descrito por Linneo en el *Species Plantarum*, presentando en Europa 49 especies. (1)

II.1.2.-Micromorfología

Poco hay en bibliografía descrito sobre el aspecto micromorfológico del género; tan solo hemos encontrado alusión a la raíz de la especie *O.spinosa* que se caracteriza por presentar fibras cristalíferas, cristales sueltos de 2 a 15 μ . y vasos reticulados (2) (3) ; al tallo y hoja de *O.natrix* especie rica en pelos tanto glandulosos como sencillos, fibras cristalíferas ; cristales y vasos espiralados y punteados (4).

II.1.3.-Fitoquímica

En el presente esquema ofrecemos una visión general de la química de las diferentes especies del género *Ononis*, como son:

ESPECIE

COMPOSICION QUIMICA

	-alcoholes: onocerina u onocol (5)
	-ácidos: cítrico y tánico (5)
	-saponinas: onona, ononina, pseudo- nina, ononida, onocerin. (5) (6) (7)
	-heterósidos: ononósidos (8) (9)
<u>O. spinosa</u>	-flavónoides (7)
	-esteroles (10)
	-antocianos (11)
	-taninos (12)
	-gomas (5)
	-sustancias resinosas (5)
	-aceites esenciales (13) (14) (12) (15)
	-carotenos (16)
<u>O. antiquorum</u>	-saponinas (17)
	-flavonoides (geninas): populina quercitina, kaenferol (18)
	-antocianos y leucoantocianos: cianidina, leucocianidina (19)
<u>O. natrix</u>	-esteroles y triterpenos: beta-si- toesterol y sigmasterol (20)
	-ácidos fenoles (4) (21)
	-mucílagos (22)
<u>O. arvensis</u>	-heterósidos: diglucosil-3,7-kaem- ferol, glucosil-3-kaenferol (23) (24)

<u>O.arvensis</u>	-esteroles y triterpenos (10) -taninos (12) -aceites esenciales (13) (14) (15) (16)
<u>O.columnae</u>	-heterósidos (18) -antocianos y leucoantocia- nos:cianidina,delfinina (19)
<u>O.pusilla</u>	-heterósidos (19)
<u>O.repens</u>	-heterósidos (19) -antocianos y leucoantocia- nos (19) -esteroles y triterpenos (10)
<u>O.rotundifolia</u>	-heterósidos (18) -antocianos y leucoantocia- nos (19)
<u>O.cistato</u>	
<u>O.pubescens</u>	
<u>O.subpriata</u>	-esteroles y triterpenos
<u>O.alopercunoides</u>	(10)
<u>O.viscosa</u>	
<u>O.minutissima</u>	

II.1.4.-Acción farmacodinámica y usos terapéuticos

Las especies del género *Ononis* se han utilizado en medicina popular como diuréticos y antisépticos urinarios -- sobre todo *O.spinosa* (6) (17) (25) (27), *O.aragonensis* (5), *O.repens* (26), *O.natrix* (28) contra la retención de orina, cistitis, nefritis y cálculos biliares ó renales.

Los flavonoides de *O.arvensis* han mostrado actividad colagoga (29) y los ácidos fenoles del *O.natrix* presentan una acción antibacteriana (21) (30), utilizándose como antiséptico en el caso de caries dental.

II.1.5.- O. speciosa Lag.

Fruticosa de hasta un metro de altura, ramosa, con tallos rectos o ascendentes de color verdoso en las ramas del año, pubescente-viscoso (31) (32); hojas trifoliadas, brevemente pecioladas, de color verde claro, subcoriáceas, muy glutinosas viscosas por ambas caras, con foliolos elípticos u oval-obtusos; los bordes son aserrados, foliolo terminal truncado, redondeado o subacorazonado en la base; estípulas membráceas estriadas, largamente soldadas al peciolo, con la parte libre lanceolada aguda y algo glandulosas; pedúnculos reducidos a un corto muñón o giba; 1-3 flores pediceladas en la axila de la bractea y formando largos racimos-oblongos; pedicelos de 2-4 mm, glandulosos viscosos.

Hojas florales bracteoformes subescariosas, caedizas, oval-acuminadas, estriadas, grandes, más largas que el tubo del cáliz, peloso-glanduloso.

Cáliz de 9 mm de largo, glutinoso, recubierto de denso tomento glanduloso-peloso tres veces más corto que la corola, con las lacinias agudas triangulares-lanceoladas, casi igual de largas que el tubo, con 7-9 nervios.

Corola amarillo-dorada de 15 mm de largo, lampiña con el estandarte oval-apiculado estriado en púrpura estrechamente adelgazado en la base, más largo que la quilla y las alas; quilla casi sin pico, igual a las alas; ovario peloso, con 5 óvulos; legumbres de 6x5 mm (31) (32), con una o dos semillas y más cortas que el cáliz. Semillas ovoideas, negruzcas y lisas de 3x2,5 mm.

Esta planta es un endemismo hispánico que se encuentra en Andalucía en colinas secas y pedregosas y en las faldas de diversas montañas. También penetra en Portugal y en Marruecos (32)

Entre otros puntos se ha citado en Sierra de Carrascoy (Murcia), Porta y Rigo (Sierra de la Espuña, Murcia); Valledel Darro (Granada); Genalgualcil (Málaga); Guacin (Málaga) Ceballos; Canillas de Albaida (Málaga) ;Sierra Tejada (Málaga) ;La Herradura (Granada) (31).

II.1.6.- O.mitissima L.

Planta anual, con tallos de color verde claro redondos levantados o acostados y extendidos en todas direcciones, de hasta 60 cm de largo ramosos desde la base, con las ramas delgadas finalmente fusiformes. (1) (32)

Hojas todas trifoliadas, con foliolos elípticos u oval-oblongos redondeados en el ápice, con el margen agudamente aserrado, casi siempre de 20 X 9-10 mm, algunas con pelos sencillos mezclados (31) (32); hojas florales inferiores trifoliadas, con los foliolos iguales a la caulinares, pero más pequeños; las medias unifoliales y las superiores bractiformes, ovales, concavas membranáceas, muy blanquecinas, imbricadas con muchos nervios, cubriendo el cáliz, agudas, glandulosas, iguales en longitud a las estípulas. Estas son oblongo-lanceoladas, abrazadoras casi enteras, glandulosas, con muchos nervios y están soldadas al peciolo.

Cáliz de 8 mm con el tubo estriado blanquecino, lampiño, más corto que la corola, con las lacinias triangulares-lanceoladas-agudas, con 11 nervios igual de largos que en el tubo, y pelos glandulosos en el margen.

Corola de 12 mm, rosada, con el estandarte aovado, con el ápice redondo, ensanchado bruscamente en la base poco más largo que las alas y la quilla. Legumbre oval-oblonga, redonda en el ápice y poco glandulosa, brillante, de 5-6 x 3 mm, igual ó más corta que el cáliz, con semillas parduzcas o pardo-claras, ovales, granuladas, de 1,75 mm de diámetro (31) (32).

Vive en España en la región mediterránea y en el centro, aunque no es muy abundante. Fuera de la Península se ha localizado en varios países europeos y africanos (33). Se encuentra --

por casi todas las islas del Mediterráneo y también en Canarias, Madeira, etc .

En España se ha citado entre otras localidades en --
Cartagena (Murcia); Barranco de Polop (Alicante);Cubo de ---
Bureba (Burgos); Gandía (Valencia); Cerro del Hinojal (Jerez-
y Cádiz) ; Dehesa de Gigonza (Jerez , Cádiz) ; Sevilla , Este--
pona al Tesorillo (Málaga); Ronda (Málaga); Logroño (34).

III- PARTE

EXPERIMENTAL

III.1.-MUESTRAS EMPLEADAS

Hemos utilizado para nuestros trabajos las sumidades floridas de dos especies del género *Ononis*: *O.speciosa* Lag. y *O.mitissima* L. , las cuales han sido determinadas en el departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia de Sevilla, en cuyo herbario se encuentra un ejemplar de cada una de las especies.

O.speciosa Lag.

Leg: Silvestre-Aparicio

Lugar: Grazalema (Cádiz)

Fecha de recolección: Mayo, 1984

Nº pliego: SEVF

O.mitissima L.

Leg : G.Rowe-Aparicio

Lugar : El Bosque-Ubrique (Cádiz)

Fecha de recolección: Mayo, 1984

Nº pliego: SEVF

III.1.1.- Recolección

O.speciosa Lag. se ha recolectado en Grazalema (Cádiz) y *O.mitissima* L. en El Bosque-Ubrique (Cádiz).

III.1.2.- Desecación y conservación

Una vez recolectadas se desecaron en el propio laboratorio sobre superficie seca y a una temperatura media de 25°C. Finalizado el proceso se guardaron en recipiente cerrado y al abrigo de la luz y humedad.

III.2.- MICROMORFOLOGIA

III.2.1.- Técnica y reactivos

La hoja y el tallo de las dos especies ,se pulverizaron en un molino CULATTI DFH-48;posteriormente se pasaron por un tamiz de 0,25 mm de diámetro de malla,se homogenizaron con mortero y pistilo y se volvieron a tamizar (tamiz Nº 1, 0,100-0,150 mm) según Farmacopea Española IX edición (35). Con la droga asi pulverizada se efectuó un análisis micromorfológico.

Los reactivos utilizados fueron:

-R.aclarantes: agua destilada,glicerina,hidrato de cloral (36)
(37).

-R.de coloración:agua de iodo,Sudán III,cloroyoduro de zinc, ---
floroglucina clorhídrica ,reactivo universal de-
Steinmentz. (36) (37)

III.2.2.- Resultados

O.speciosa Lag.:En esta especie se observaron los siguientes elementos:

-Tallo: fibras cristalíferas
fibras no cristalíferas
traqueidas
vasos espiralados
vasos reticulados
pelos unicelulares tectores
pelos glandulosos

-Hoja: fibras cristalíferas
vasos espiralados
pelos glandulosos pluricelulares
estomas en la epidermis del tipo paracítico

O.mitissima L.: Pudimos comprobar la presencia de:

-Tallo: fibras cristalíferas

fibras no cristalíferas

traqueidas

vasos espiralados

-Hoja: fibras cristalíferas

fibras no cristalíferas

vasos espiralados

pelos unicelulares tectores

estomas paracíticos y glándulas con células poliédricas en la epidermis.

Los datos microscópicos más interesantes se encuentran expuestos en las siguientes fotografías y esquemas:

-Tallo de O.speciosa Lag. Figs. 3,4,5,6,8.

-Hoja de O.speciosa Lag. Figs. 3,5,6,9.

-Tallo de O.mitissima L. Figs. 3,4,5,10.

-Hoja de O.mitissima L. Figs. 3,5,7,11.

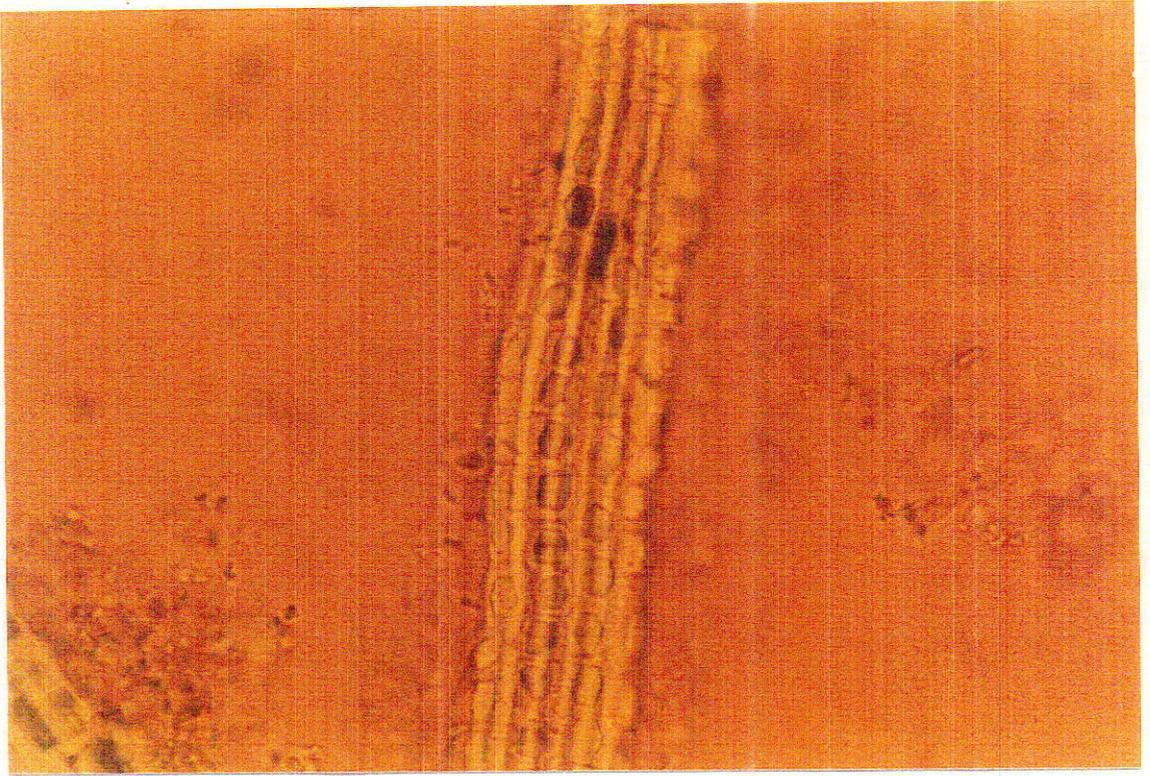


Fig. 3 - Fibras cristalíferas (40x10)

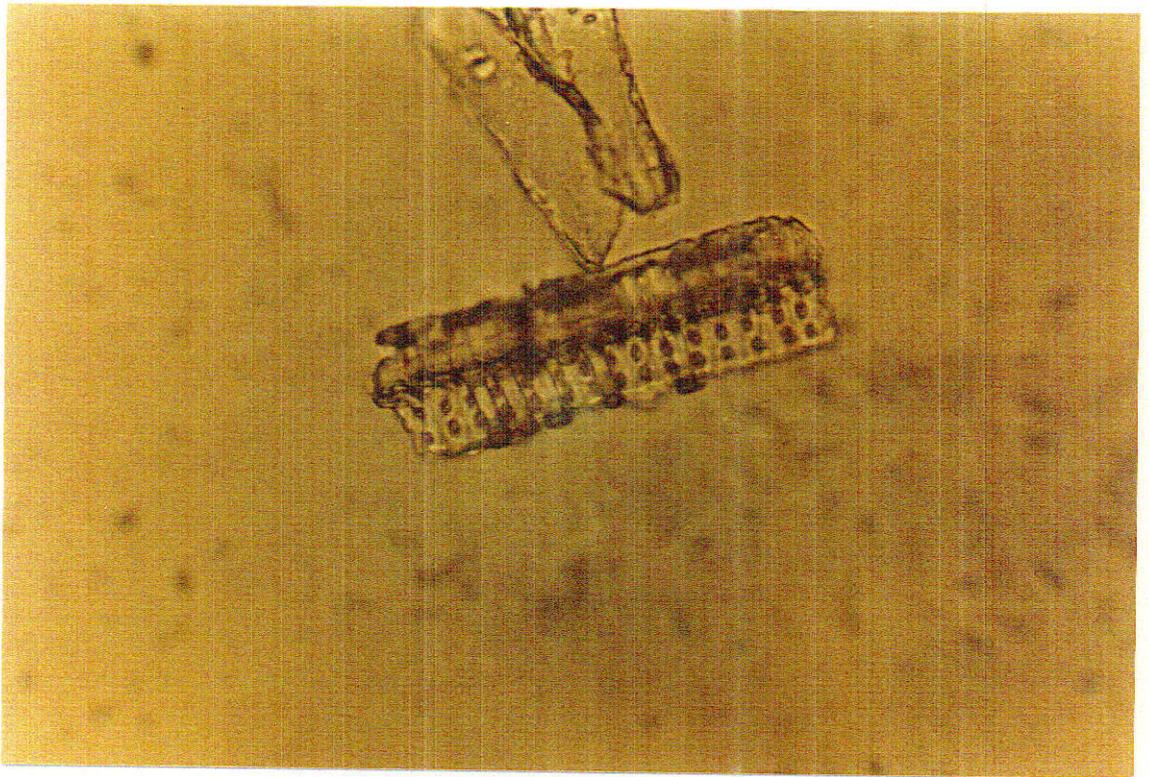


Fig. 4 - Traqueidas (40x10)

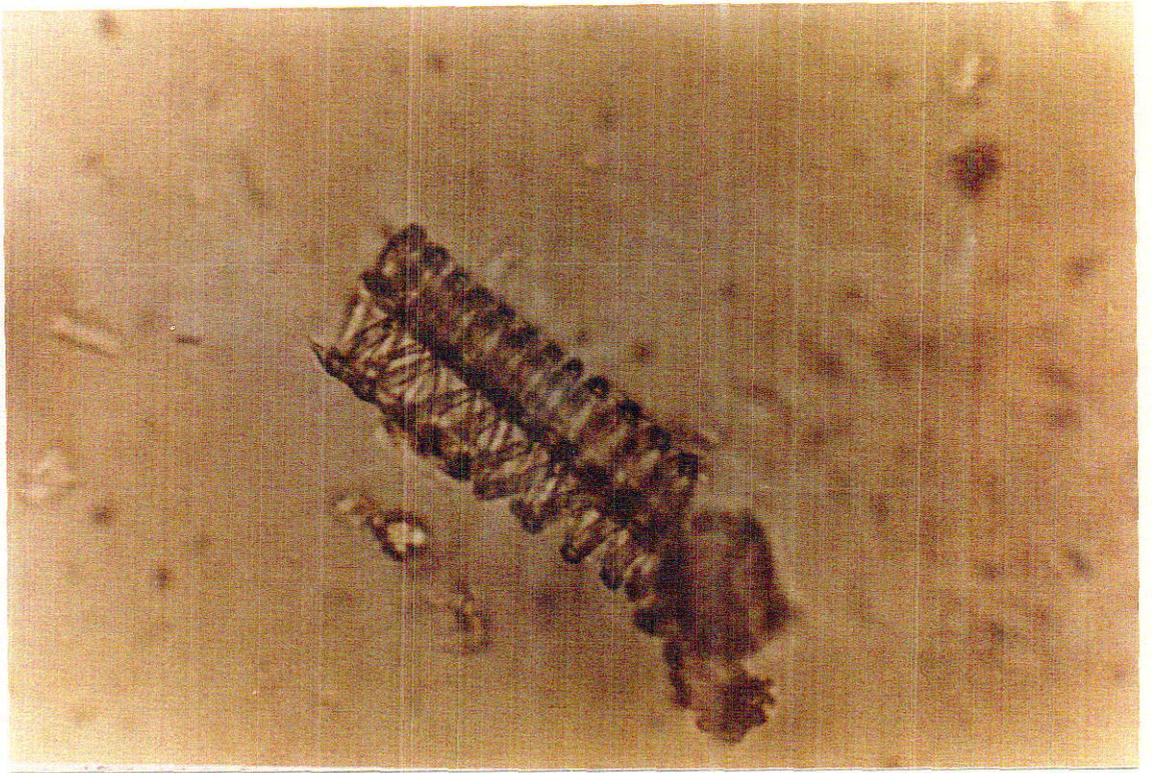


Fig. 5 - Vaso espiralado (40x10)

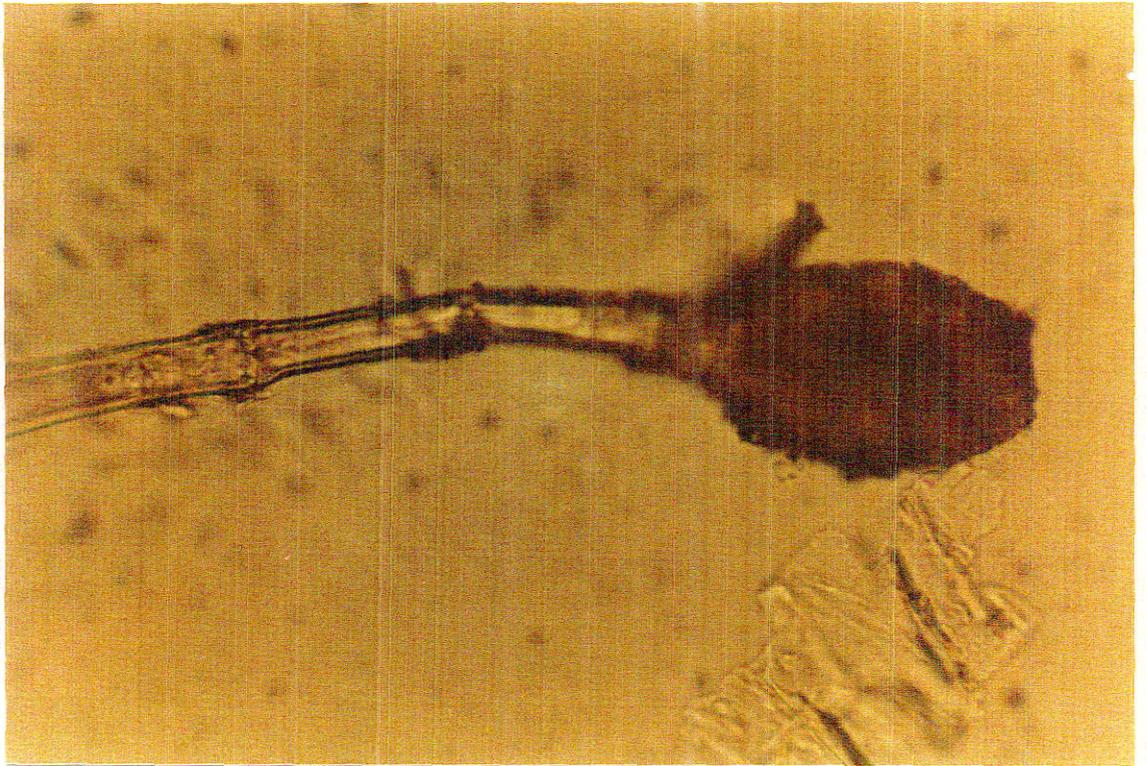


Fig. 6 - Pelo glanduloso (40x10)

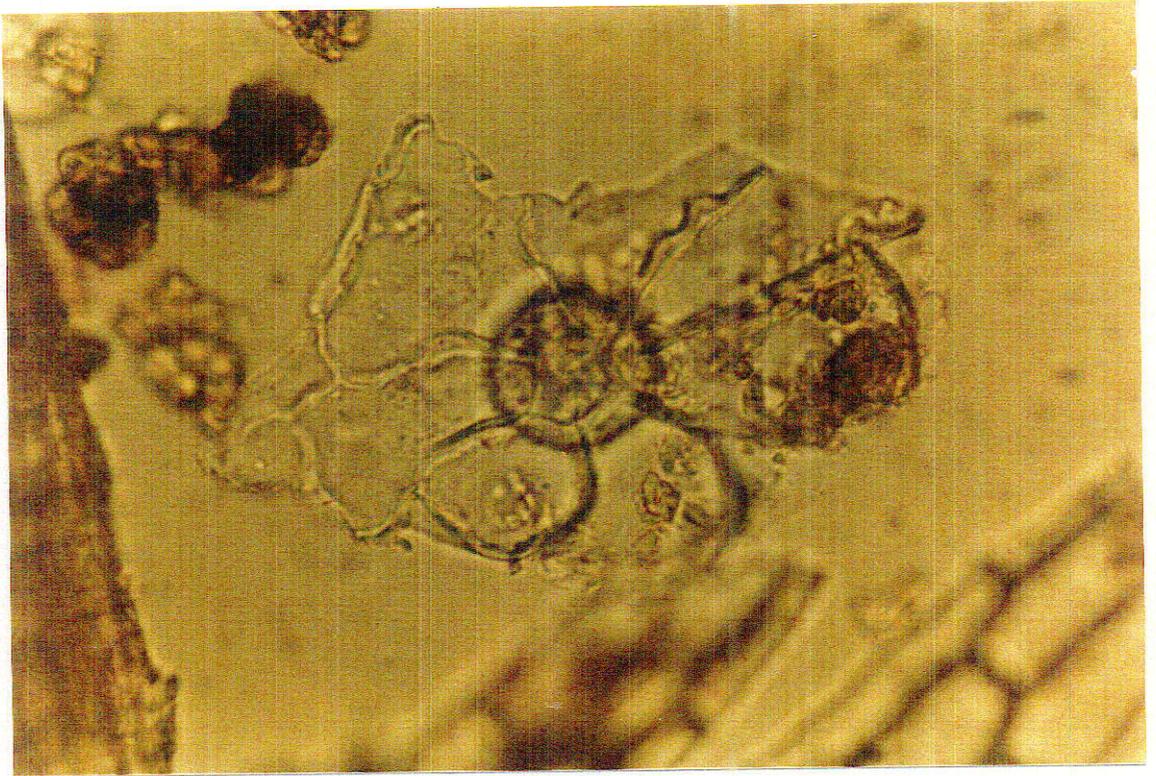
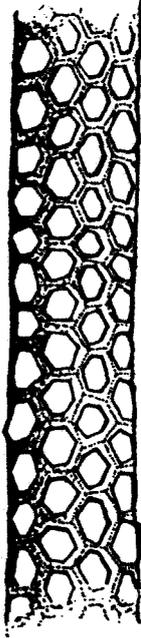


Fig. 7 - Glándula con células poliédricas
(40x10)

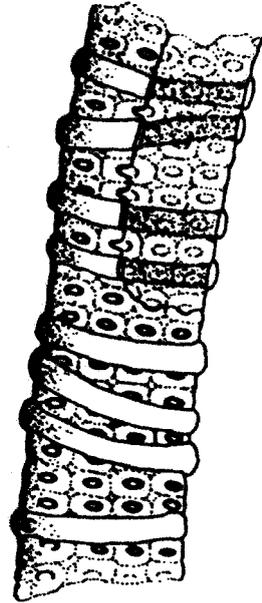
Microscopía del tallo de
O. speciosa Lag .



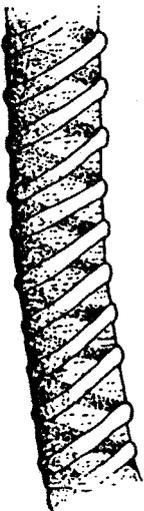
Fibras cristalíferas



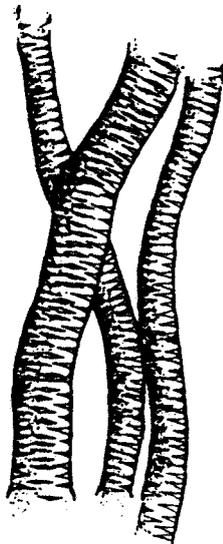
Fibras no cristalíferas



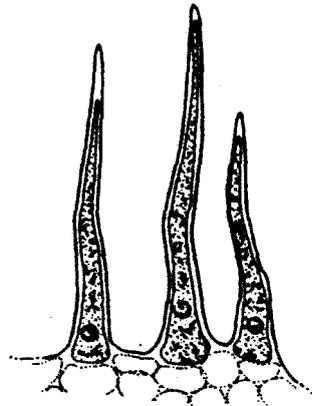
Traqueidas



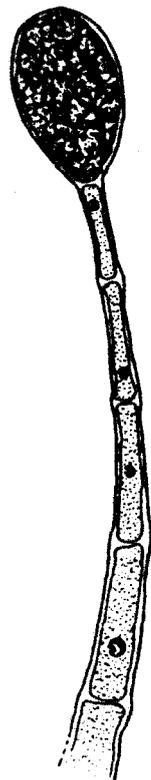
Vasos
espiralados



Vasos
reticulados



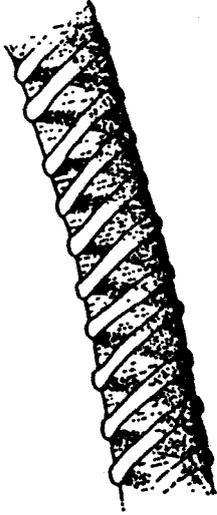
Pelos unicelulares



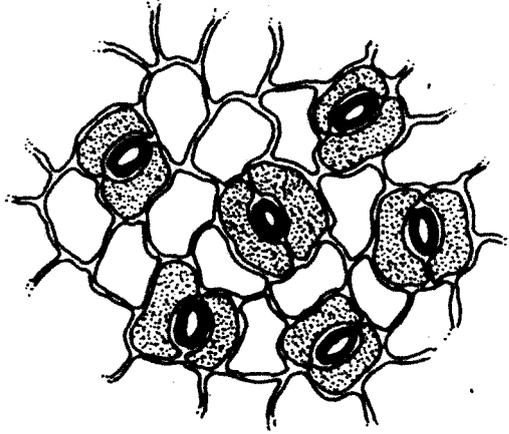
Pelo glanduloso
pluriceelular

Fig. 8

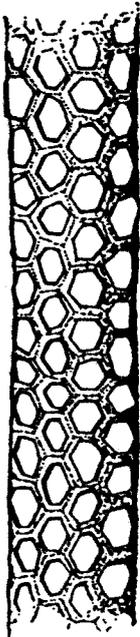
Microscopía de la hoja de
O. speciosa Lag.



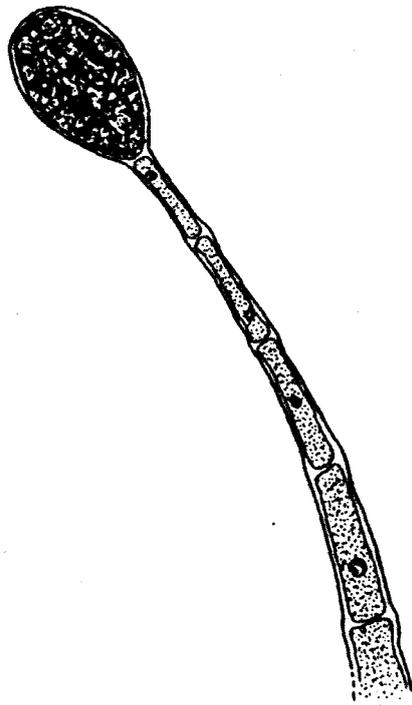
Vaso
espiralado



Estomas
paracíticos



Fibras cristalíferas

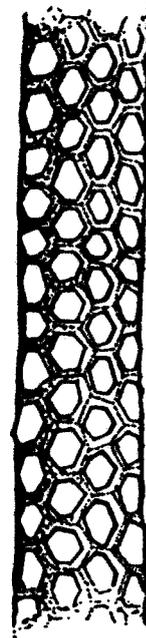


Pelo glanduloso
pluricelular

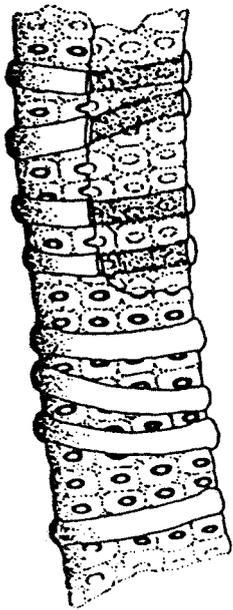
Microscopía del tallo de
O.mitissima L.



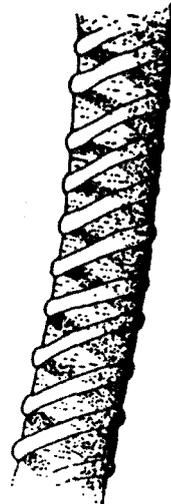
Fibras no cristalíferas



Fibras cristalíferas

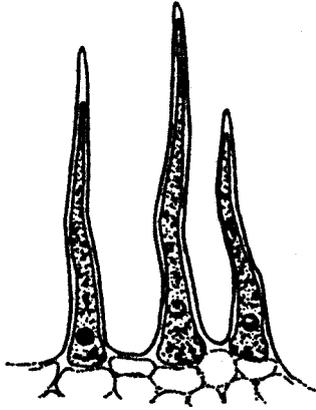


Traqueidas

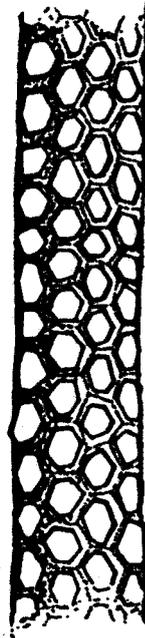


Vasos espiralados

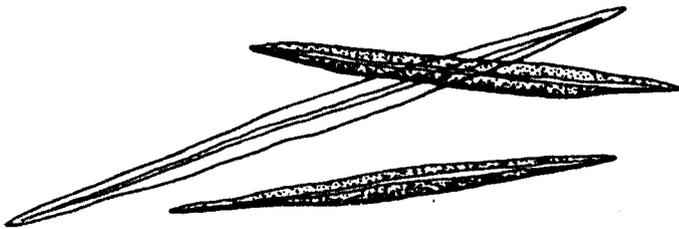
Microscopía de la hoja de
O.mitissima L.



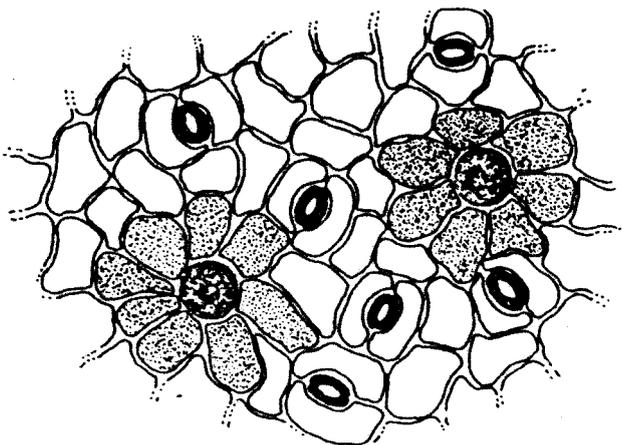
Pelos unicelulares



Fibras cristalíferas



Fibras no cristalíferas



Glándulas y estomas paracíticos



Vasos espiralados

III.2.3.- Discusión de resultados

En el tallo pulverizado de O.speciosa Lag. y O.mitissima L. se puede apreciar la presencia de una serie de elementos - comunes : fibras lignificadas, algunas de ellas con cristales, traqueidas y vasos espiralados. En la segunda especie no hemos observado vasos reticulados ni pelos.

Fibras cristalíferas, vasos espiralados y estomas de tipo paracítico, son comunes en la hoja de las dos especies estudiadas. Sin embargo se aprecia una diferencia en el tipo de pelos, ya que en O.speciosa Lag. son pluricelulares glandulosos y en O.mitissima L. unicelulares tectores, observándose así mismo glándulas en la epidermis de dicha especie.

III.3.- ENSAYOS GENERALES CUANTITATIVOS

III.3.1.- Determinación de humedad

El contenido en agua de una droga, nos permite saber si el tratamiento posterior a la recolección ha sido o no adecuado.

Hemos seguido el método gravimétrico que está basado en la pérdida de peso de la droga mediante desecación en estufa a 105°C (35) (38).

Se parte de aproximadamente 2g de droga perfectamente pesada en un pesasustancias tarado, que se lleva a estufa (105°C) hasta pesada constante.

Después de calentar y antes de cada pesada se enfría en desecador que contiene CaCl_2 .

III.3.1.1.- Resultados

Los valores obtenidos con las dos especies fueron los siguientes:

<u>Muestras</u>	<u>% humedad</u>
A ₁	5,4%
A ₂	5,5%
A ₃	5,7%
\bar{A}	5,5%

<u>Muestras</u>	<u>% humedad</u>
B ₁	11,7%
B ₂	8,2%
B ₃	10,9%
\bar{B}	10,4%

A₁ , A₂ , A₃ , corresponden a O.speciosa Lag.

B₁ , B₂ , B₃ , corresponden a O.mitissima L.

\bar{A} . y \bar{B} son los valores medios respectivos.

III.3.2.- Determinación de cenizas

La finalidad de esta determinación es conocer los componentes minerales que tiene la droga, que pueden influir tanto en la acción farmacológica como ayudarnos a investigar posibles adulteraciones, ya que el porcentaje de estos componentes es constante para cada droga. (35) (38)

En un crisol de porcelana calentado al rojo y enfriado en desecador, se coloca una cantidad exactamente pesada de la droga perfectamente desecada. Se efectúa la calcinación con llama oxidante durante 5-6 horas.

Una vez enfriada, se le añade agua oxigenada que favorece la calcinación, repitiéndose esta operación cuantas veces sea necesario. Se evapora a sequedad y se efectúan nuevas calcinaciones hasta desaparición total de partículas negras.

Tras enfriar se pesa y se vuelve a calcinar hasta obtener dos pesadas sensiblemente concordantes.

III.3.2.1.- Resultados

<u>Residuos</u>	<u>% cenizas</u>
A ₁	4,2
A ₂	6,4
A ₃	6,8
\bar{A}	5,8

<u>Residuos</u>	<u>% cenizas</u>
B ₁	5,3
B ₂	4,5
B ₃	5,6
\bar{B}	5,1

A₁ , A₂ , A₃ , corresponden a O.speciosa Lag

B₁ , B₂ , B₃ , corresponden a O.mitissima L.

\bar{A} y \bar{B} son las medias respectivas de ambas especies.

III.3.3.- Determinación de esencias

El método utilizado para esta determinación es el de Clevenger modificado (37) (39).

Partimos de 10 g de droga fresca, se introduce en un matraz de fondo redondo, se le añade agua saturada de ClNa y se calienta a la llama. Cada 30 minutos se mide el volumen de esencia - destilada (mm³), dando por terminada la operación cuando coincidan dos lecturas consecutivas.

Las drogas se sometieron a ebullición controlada durante 3 horas. El contenido en esencias se determinó en ambas especies aplicando la siguiente expresión:

$$V = \pi r^2 h$$

V=volumen del cilindro

r=radio (mm)

h=altura (mm)

III.3.3.1.- Resultados

<u>Especie</u>	<u>Volumen de esencia (μl)</u>
<u>O.speciosa</u> Lag.	339
<u>O.mitissima</u> L.	280

III.3.4.- Discusión de resultados

Al determinar el grado de humedad de las dos especies en estudio observamos una diferencia marcada entre ambas. Esto puede ser debido a que O.speciosa Lag. es una planta leñosa, --- mientras que O.mitissima L. se muestra como planta herbácea.

Por el contrario, existe analogía entre ellas en el contenido de cenizas y aceite esencial.

III.4.- ENSAYOS GENERALES CUALITATIVOS

A fin de tener una idea de la naturaleza de los principios activos que constituyen la química de O.speciosa Lag. y - O.mitissima L. realizamos un " screening " fitoquímico según la técnica de I. T. E. S. M. A. (40) (41)

Las sumidades floridas de O.speciosa Lag.y O.mitissima L. se sometieron a un sistema de extracción continua en Soxhlet operando con disolventes de polaridad creciente.

El proceso seguido se encuentra esquematizado en la figura 12.

Extractos obtenidos

O.speciosa Lag.

A	0,42 % en droga
B ₁	17,04% en droga
B ₂	9,24% en droga
C	12,24% en droga

O.mitissima L.

A'	1,75% en droga
B' ₁	8,26% en droga
B' ₂	0,92% en droga
C'	9,26% en droga

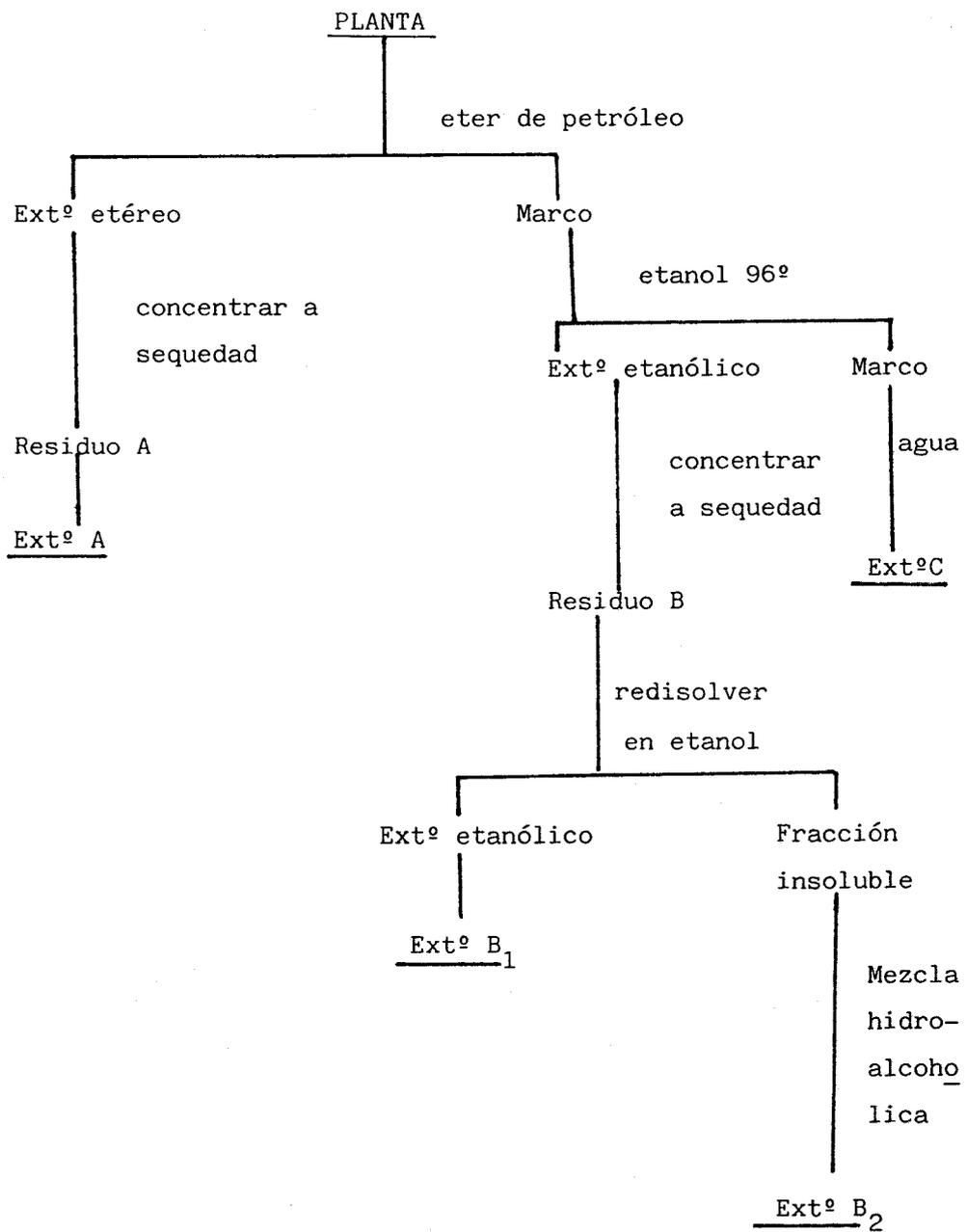


Fig. 12

En dichos extractos se han realizado las siguientes--
determinaciones:

Cuerpos grasos
=====

Se le adiciona 1 ml de reactivo a los extractos A y -
A' apareciendo coloración gris-azulada en la capa inferior en el
caso de que existan grasas de origen vegetal. (Reactivo de Se -
ger). (42)

Pigmentos carotenoides
=====

Los carotenoides por adicción de sulfúrico concentrado
originan coloración azul . (Reactivo de Carr y Price) (43)

La solución clorofórmica saturada de tricloruro de --
antimonio con los principios activos en estudio dan lugar a una -
coloración azul-violeta fugaz. (Reactivo:solución clorofórmica
saturada de tricloruro de antimonio) (44).

Esteroles y triterpenos
=====

A la solución clorofórmica de la muestra se añade
1/5 del volumen de anhídrido acético y después, ácido sulfúri-
co concentrado, gota a gota. Se obtiene coloración violeta que pa-
sa a azul y por último a verde si el ensayo es positivo (Reac-
tivo de Lieberman-Buschard) (45)

Se mezcla 1 ml de anhídrido acético con 1 ml de cloro-
formo, se enfria a 0°C y se añade 1 gota de ácido sulfúrico con-
centrado. El reactivo preparado se adiciona a los extractos apa-
reciendo coloración azul que pasa por distintas tonalidades --

verde-rojo y anaranjado si es positiva la prueba.(Modificación A de la reacción de Lieberman-Buschard) (46)

Se evapora en vidrio de reloj 1 ml de cada extracto, disolviendo el residuo en II gotas de anhídrido acético; la adición de sulfúrico concentrado, desarrolla en presencia de compuestos esterólicios o terpénicos una coloración malva virando a verde.(Modificación B de la reacción de Lieberman-Buschard) (46)

La muestra contenida en 1 ml de cloroformo se pone en contacto con 1 ml de ácido sulfúrico, originando colores amarillo o rojo (46)

Derivados quinónicos

=====

En el caso de quinonas libres, adicionamos el reactivo a los extractos, agitamos y dejamos reposar; si aparece coloración rosa, roja o violeta implica que se encuentran quinonas libres.-- (Reactivo hidróxido amónico al 40 %) (47) (48)

Para comprobar la presencia de quinonas combinadas, se le añade a los extractos ácido sulfúrico 0,1 N y se lleva a ebullición agitando con benceno. Al enfriar se separa la capa orgánica, si esta se colorea de rojo al tratarla con amoníaco -- es indicativo de que el ensayo es positivo (47) (48).

Lactonas pentagonales insaturadas

=====

Se adiciona a los extractos varias gotas del reactivo de Baljet. Una coloración naranja que pasa a rojo oscuro, - indica presencia de lactonas pentagonales. (40)

Pigmentos antocianos

La aparición de una coloración rosa anaranjada al agitar con alcohol isoamílico en medio ácido, indica la presencia en la solución ensayada de pigmentos antocianos (40) (48).

Pigmentos leucoantocianos

Los pigmentos leucoantocianos (compuestos incoloros), pasan a antocianos coloreados (rojo o violeta), por acción de los ácidos fuertes. Si se produce una coloración rojo-violeta cuando se calienta a baño maria una solución alcohólica de los extractos en presencia de ácido clorhídrico, se puede afirmar la presencia de dichos pigmentos (40) (48).

Flavonoides

Las sustancias flavónicas se ponen de manifiesto con la reacción de la cianidina (46) (49). Consiste en añadir a la solución en estudio, 1 gota de ácido clorhídrico al 10% y un trocito de cinta de magnesio. Aparece un color rosa, que lentamente pasa a rojo, naranja o violeta, según la naturaleza del flavonoide.

Taninos

Al tratar gota a gota con una solución de tricloruro de hierro al 10%, los extractos obtenidos, se producirá un precipitado verde oscuro en presencia de taninos catéquicos (36).

A continuación adicionamos a otra muestra unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y aproximadamente 1 ml de solución de formaldehído al 40%. Se calienta a ebullición unos 10-15 min. produciéndose la precipitación de dichos taninos. Se filtra y al filtrado obtenido, se le añaden unas gotas de tricloruro de

hierro. Aparecerá un precipitado azul si existen en él taninos - pirogálicos (R. de Styasni) (36).

Glúcidos

Para determinar la presencia de principios glucícos hemos ensayado las siguientes reacciones:

R. de Keller-Kelliani modificada por Euw-Reichstein (36).

Los extractos se agitan con unas gotas de solución-A (1 ml de sulfato férrico al 5% en agua y 9,9 ml de ácido acético glacial), después añadimos varias gotas de la solución B (1 ml de sulfato férrico al 5% en agua y 9,9 ml de sulfúrico concentrado). Si aparece coloración azul-verdosa o azul en 5-10 min., se debe a las sustancias glucídicas.

R. de Molisch (46): A las muestras se les adiccionan una solución de α -naftol y por las paredes se deja resbalar 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo en la interfase indica reacción positiva.

R. de Fheling (46): Se calientan a baño maría durante 2 minutos las soluciones a ensayar junto con el reactivo. En caso de resultado positivo, aparecerá un precipitado rojo característico.

Saponinas

Cada una de las muestras se divide en dos fracciones. Una de ellas no sufren ningún tratamiento, a la otra se le adiciona unas gotas de ácido clorhídrico. Se someten a ebullición durante 15 min se agitan por separado, y se observa la canti

dad de espuma persistente en cada una de ellas (36).

Alcaloides

Se hacen tres fracciones con cada uno de los extractos a ensayar y se le añade a cada una de ellos los reactivos de Mayer, Bouchardat y Dragendorff (36). En presencia de sustancias alcaloídicas se formará un precipitado blanco, pardo o rojizo, respectivamente

Mediante un tubo de vidrio cuya punta termina en capilar, que se utiliza a modo de pipeta, se depositan en distintos lugares de una tira de papel cantidades crecientes de los extractos, se deja evaporar el disolvente y se sumerge dicha tira en el reactivo de Dragendorff modificado para cromatografía. Si la droga contiene alcaloides aparecerán en los lugares en que se aplicaron los extractos unas manchas rojizas sobre fondo amarillo claro (36).

Resinas

Al extracto alcohólico concentrado de la droga, añadimos agua, si aparece un precipitado turbio blanquecino indica --- prueba positiva (38).

Otra fracción similar, se trata con solución de acetato de cobre, produciéndose una coloración verde-esmeralda característica si existen resinas (R. de Unverhoiben-Franchimont) (38).

Acidos-fenoles

=====

A partir de los extractos alcohólicos de las drogas, realizamos una cromatografía en capa fina, utilizando como soporte celulosa y como fase móvil ClH 0,1 N.

Procedemos a revelar con lámpara U.V. Si aparece fluorescencia azul la prueba es positiva (49,50)

III.4.1.- Resultados

Reacción fuertemente positiva	+++
Reacción positiva	++
Reacción débilmente positiva	+
Reacción negativa	-

Los resultados obtenidos en las dos especies que son objeto de nuestro trabajo quedan recogidos en las tablas: I y II

<u>O. speciosa Lag.</u>				
<u>Grupos químicos</u>	<u>Extº etéreo</u>	<u>Extº alcoh.</u>		<u>Extº acuoso</u>
	A	B ₁	B ₂	C
Cuerpos grasos	-			
Pig. carotenoides	-			
Esterol. y Triterp.	+			
Quinonas libres	-	-	-	-
Quinonas comb.	-	-	-	-
Lactonas pent. insat.	+++	+++	++	+++
Pig. antocianos	-	-	++	
Pig. leucoant.	-	-	++	
Flavonoides		+++	+	+
T. catéquicos		+++	++	+++
T. pirogálicos		-	-	-
Glúcidos				+
Saponinas				+
Alcaloides		-	-	-
Resinas		+++	+	
Ac. fenoles		+++	+++	

Tabla I

<u>O.mitissima L.</u>				
<u>Grupos químicos</u>	<u>Extº etéreo</u>	<u>Extº alcoh.</u>		<u>Extº acuoso</u>
	A'	B' ₁	B' ₂	C'
Cuerpos grasos	-			
Pig.carotenoides	-			
Esterol.y Tritep.	+			
Quinonas libres	-	-	-	-
Quinonas comb.	-	-	-	-
Lactonas pent insat.	++	++	++	++
Pig.antocianos	-	-	++	
Pig.leucoant.	-	-	++	
Flavonoides		+++	+	+
T.catéquicos		+++	++	+++
T.pirogálicos		-	-	-
Glúcidos				+
Saponinas				+
Alcaloides		-	-	-
Resinas		-	-	
Ac.fenoles		++	++	

Tabla II

III.4.2.- Discusión de resultados

Con respecto al análisis cualitativo que nos pone de manifiesto los principales grupos fitoquímicos, podemos deducir: Un mayor contenido en lactonas pentagonales insaturadas y ácidos fenólicos de O.speciosa Lag . con respecto a O.mitissima L., así como presencia de resinas en la primera que no se han detectado en la segunda.

Pigmentos antocianos, flavonoides y taninos catéquicos se encuentran presentes en ambas en la misma proporción.

Compuestos similares se han encontrado en otras especies del mismo género, tal como se indica en el apartado II.1.3., lo que nos hace suponer que son comunes en ellas.

III.5.- EXTRACCION E IDENTIFICACION DE ACIDOS FENOLES

Debido a que en el " screening " general detectamos una serie de principios con fluorescencia azul a la luz U.V. , típica de los ácidos fenoles ,orientamos nuestras experiencias hacia el estudio de dichos compuestos ,identificados ya en especies afines.

Para la extracción se siguió la técnica de Lescao y cols. (49) modificada en nuestro departamento (21).

Partimos de un cocimiento al 10% ácido,de las sumidades floridas de O.speciosa Lag. y O.mitissima L. El extracto acuoso se llevó hasta residuo seco,el cual se recuperó con agua ácida y se trató con eter etílico.El extracto etéreo se alcalinizó con bicarbonato sódico al 2% y la solución bicarbonatada obtenida se acidificó con ácido clorhídrico,volviendose a extraer con éter etílico.

El extracto etéreo lo concentramos hasta sequedad y-- lo recuperamos con etanol de 96° .

El proceso seguido se especifica en el esquema de la figura 13.

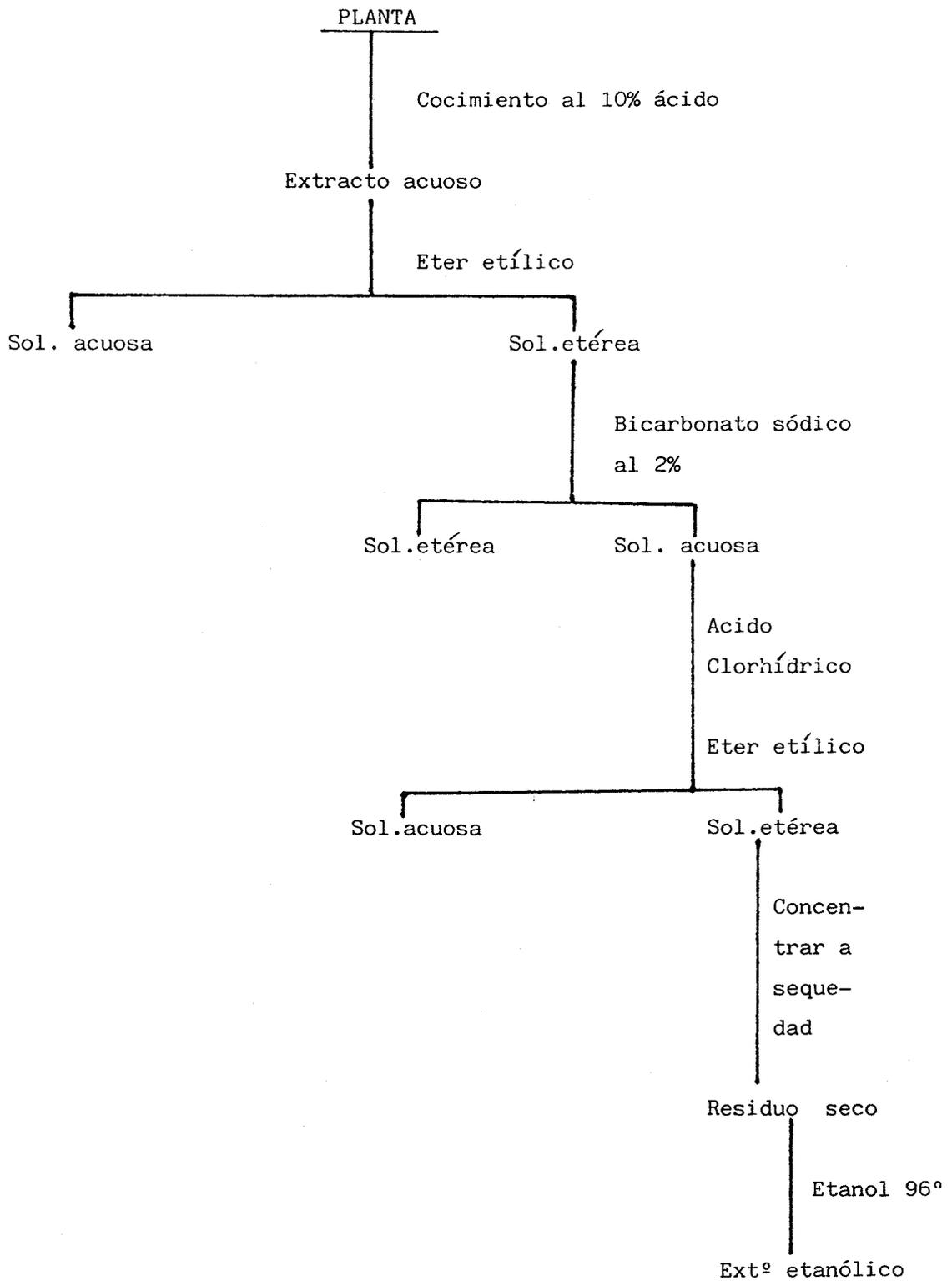


Fig. 13

III.5.1.- Cromatografía en capa fina

El residuo procedente de la extracción de ácidos -fe-
noles fué sometido al estudio por cromatografía en capa fina.

Condiciones de la experiencia

=====
Fases móviles : ácido clorhídrico 0.1 N (52) (53)
" fórmico al 2% (50)
" acético al 2% (52) (54)

Soporte: celulosa Merck

Grosor de la capa : 0,25 mm

Patrones : ácidos ferúlico, p-cumárico , vanílicico ,
p-hidroxi-benzoico.

Reveladores : U.V.

p-nitroanilina diazotada

p-nitroanilina diazotada + carbonato
sódico al 15%

Resultados

=====
Los Rf y la coloraciones que aparecen con los distin-
tos reveladores estan recogido en las tablas III y IV.
Las figs. 14 y 15 muestran los esquemas de las cromatografías

Coloraciones

Compuestos p-nitroanilina p-nitroanilina + carbonato sódico al 15%

A Ac.ferúlico	rosa rosa	verde-azulado verde-azulado
B Ac. p-cu- márico	naranja naranja	azul azul
C Ac.vanillico	naranja naranja	morado morado
D Ac. p-hidro xi-benzoico	amarillo amarillo	rosa rosa
A' Ac.ferúlico	rosa rosa	verde-azulado verde-azulado
B' Ac. p-cu- márico	naranja naranja	azul azul
C' Ac.vanillico	naranja naranja	morado morado
D' Ac. p-hidro xi-benzoico	amarillo amarillo	rosa rosa

A, B, C, D, corresponden a O.speciosa Lag.

A', B', C', D', corresponden a O.mitissima L.

Tabla III

Valores de Rf medios obtenidos con las distintas fases móviles

Compuestos	ClH 0,1 N	fases móviles	
		Fórmico 2%	Acético 2%
A	0,19	0,18	0,20
Ac. ferúlico	0,18	0,18	0,21
B	0,30	0,26	0,28
Ac. p-cumárico	0,31	0,27	0,27
C	0,46	0,47	0,45
Ac. vaníllico	0,47	0,47	0,47
D	0,56	0,56	0,53
Ac. p-hidro_xi-benzoico	0,57	0,57	0,55
A'	0,19	0,18	0,19
Ac. ferúlico	0,20	0,18	0,20
B'	0,30	0,25	0,27
Ac. p-cumárico	0,32	0,25	0,27
C'	0,45	0,47	0,46
Ac. vaníllico	0,45	0,48	0,47
D'	0,57	0,56	0,54
Ac. p-hidro_xi-benzoico	0,57	0,57	0,55

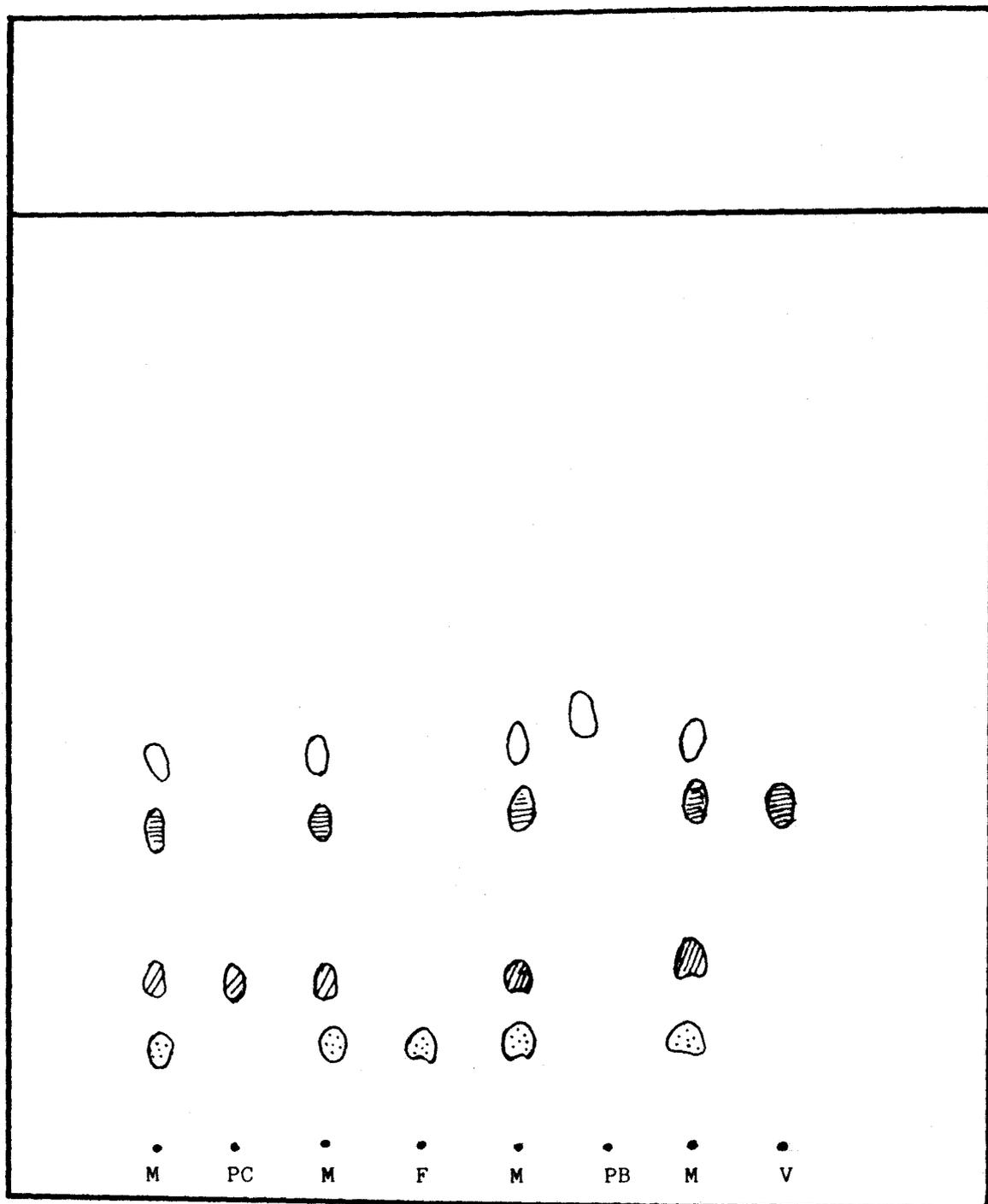
A, B, C, D, corresponden a O.speciosa Lag

A', B', C', D', corresponden a O.mitissima L.

Tabla IV

Esquema del cromatograma de ácidos-fenoles obtenido de O.speciosa Lag.

Fase móvil: ác. acético 2%



M = Muestra

PC= p-cumárico

V = vanílico

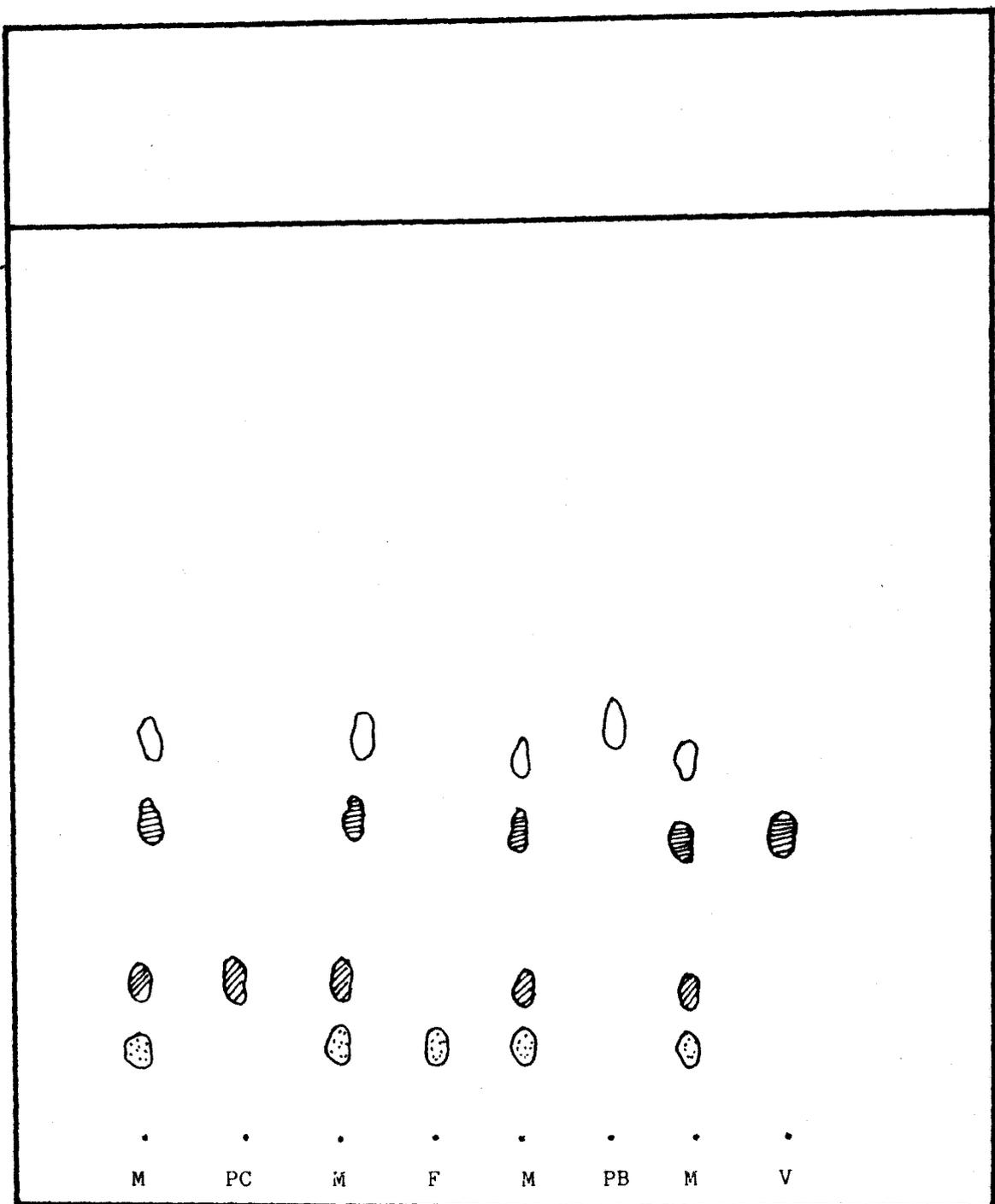
F = ferúlico

PB= p-hidroxi-benzoico

Fig. 14

Esquema del cromatograma de ácidos-fenoles obtenido de O.mitissima L.

Fase móvil: ác. acético 2%



M = Muestra

PC = p-cumárico

V = vanílico

F = ferúlico

PB= p-hidroxi-benzoico

Fig. 15

III.5.2.- Cromatografía preparativa

Para proceder al aislamiento de los ácidos fenóles, -
previamente efectuamos una cromatografía en papel manteniendo --
las siguientes condiciones de trabajo:

-Soporte: papel Whatman N° 3

-Fase móvil:acético al 2%

-Reveladores: U.V.

p-nitroanilina diazotada

p-nitroanilina diazotada + carbonato s_o
dico al 15 %.

Las bandas obtenidas las eluimos en etanol 96°procedi-
mos a hacerles un estudio en cromatografía en capa fina a fin de
observar si correspondian o no a compuestos puros.

III.5.3.- Espectroscopia U.V.

A los compuestos aislados se les realizó un espectro
U.V. para confirmar los datos obtenidos en los ensayos cromato-
gráficos.El espectrofotómetro utilizado fué Perkin-Elmer Lambda
3 UV / VIS (54) (55) (56)

Las condiciones operativas fueron:

-velocidad de la carta: 60 mm / min

-sensibilidad: 1

- λ máx: 500 nm

- λ min: 200 nm

-disolvente : etanol 96° (no absorbe en las regiones
ensayadas)

Resultados

La tabla V refleja los valores de $\lambda_{\text{máx}}$. tanto de los ácidos fenólicos aislados de ambas especies como de los patrones utilizados.

Los espectros UV obtenidos aparecen en las figuras: 16,17,18, y 19.

Espectros U. V. en etanol 96°

Compuestos aislados de *O.speciosa* Lag. y *O.mitissima* L.

<u>Compuestos</u>	<u>λ máx (nm)</u>	<u>Problema</u>	<u>Patrón</u>
Ac ferúlico	227	sobrehombro	sobrehombro
	290	"	"
	310	máximo	máximo
Ac.p-cumárico	218	sobrehombro	sobrehombro
	287	máximo	máximo
	306	sobrehombro	sobrehombro
Ac.vanillico	256		máximo
	257	máximo	
	290		
Ac.p-hidroxi- benzoico	252		máximo
	251	máximo	

Tabla V

Espectro del ác. ferúlico

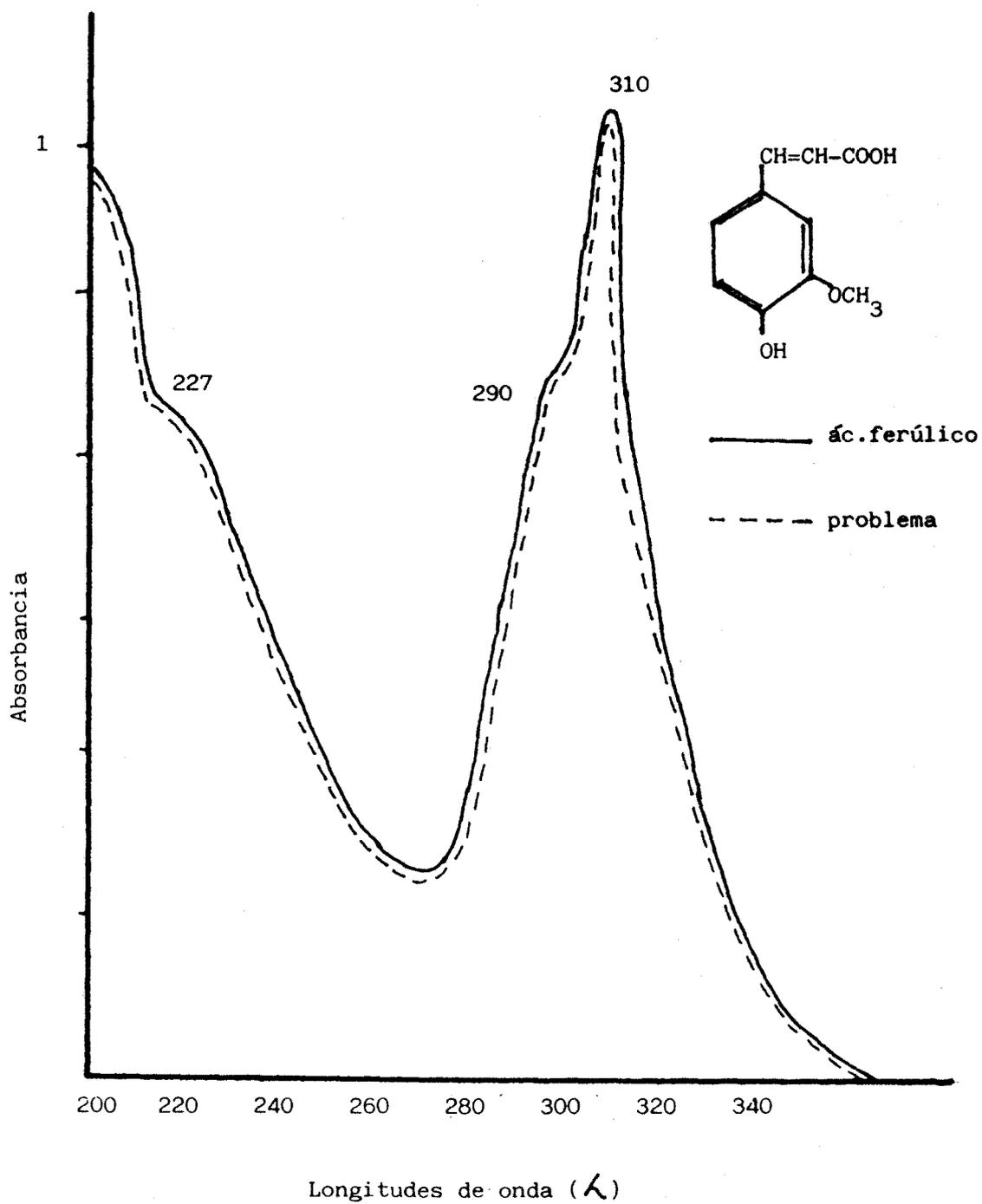


Fig. 16

Espectro del ác.p-cumárico

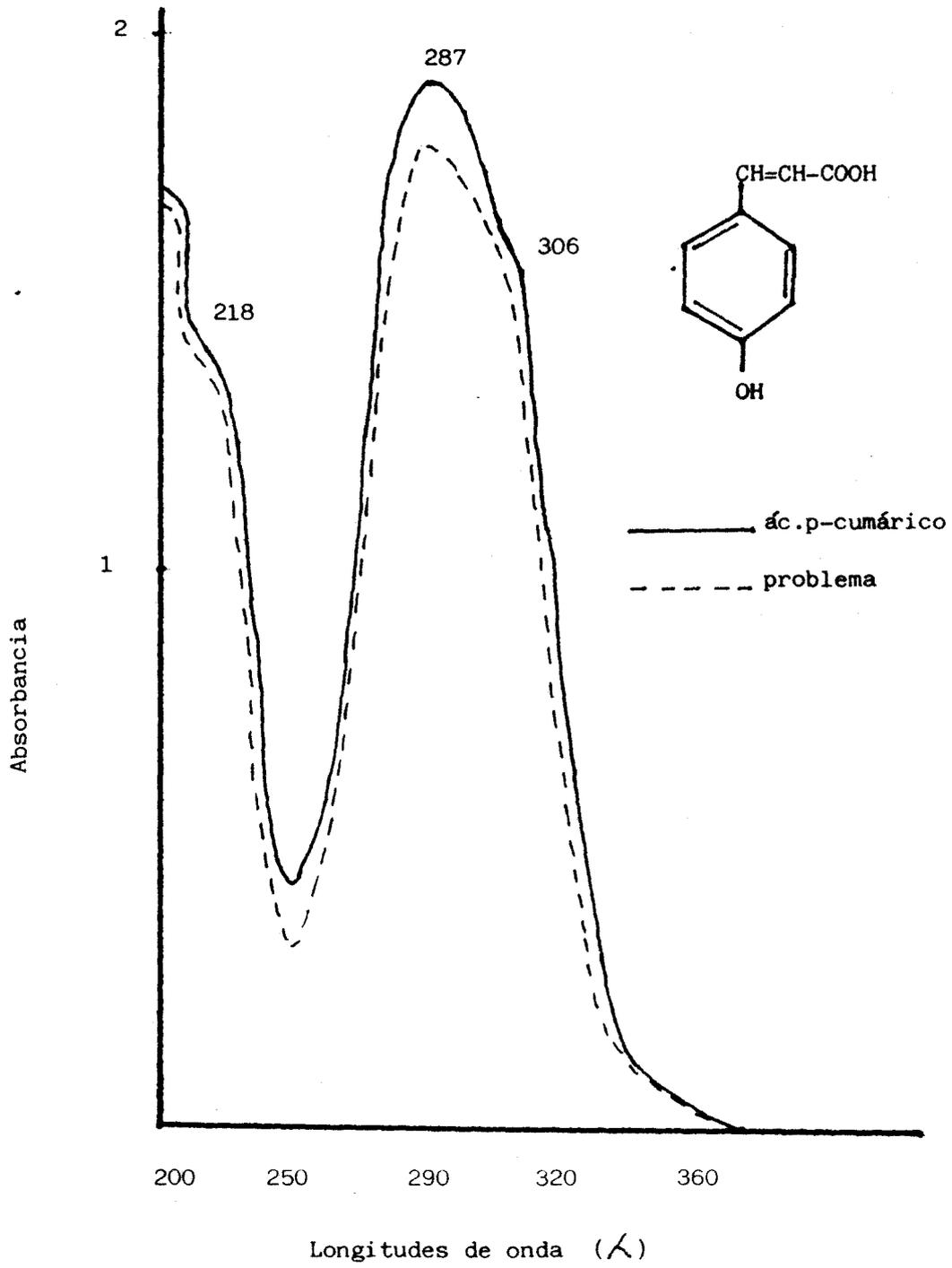


Fig. 17

Espectro del ác. vanílico

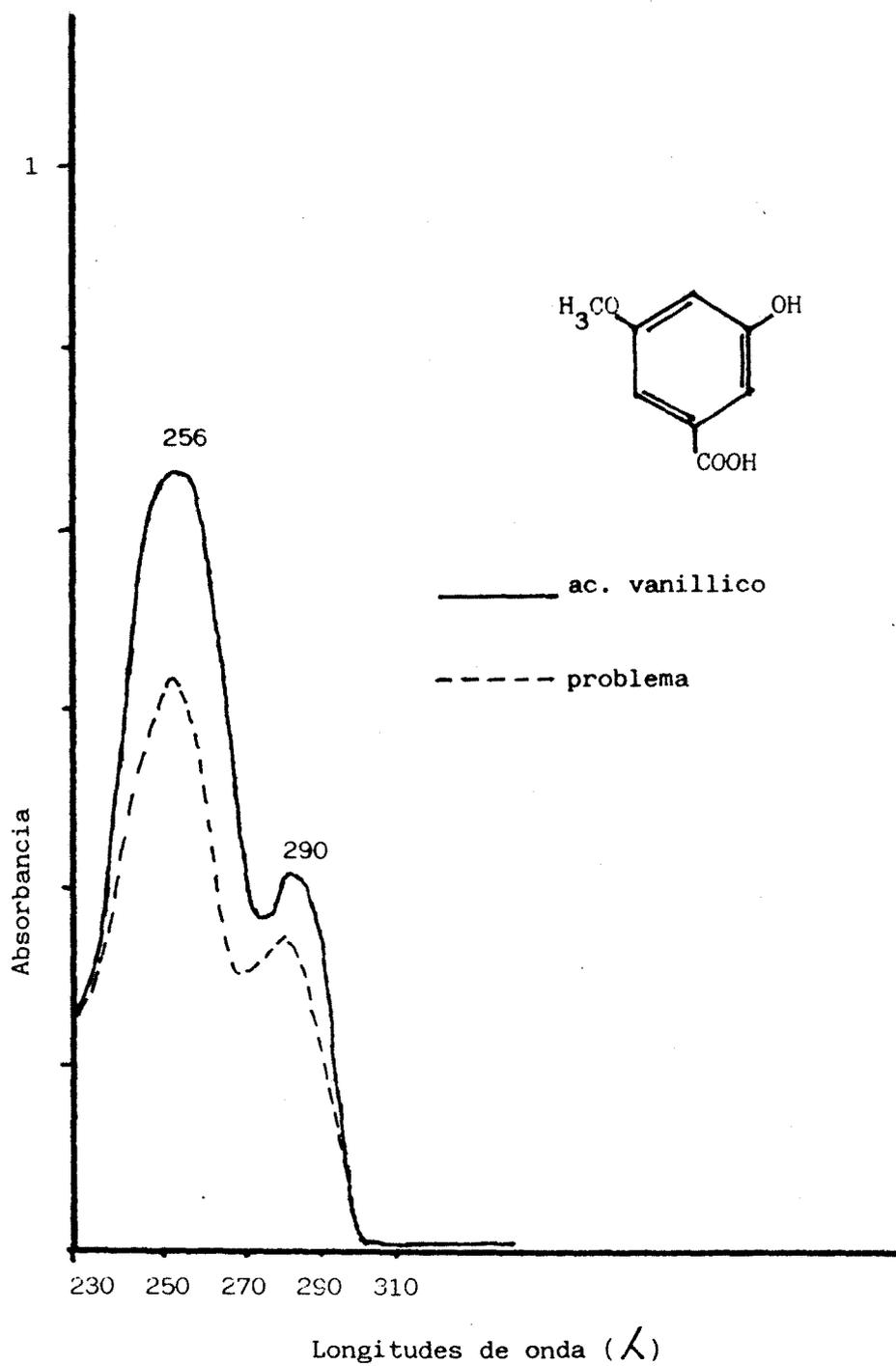


Fig. 18

Espectro del ác. p-hidroxi-benzoico

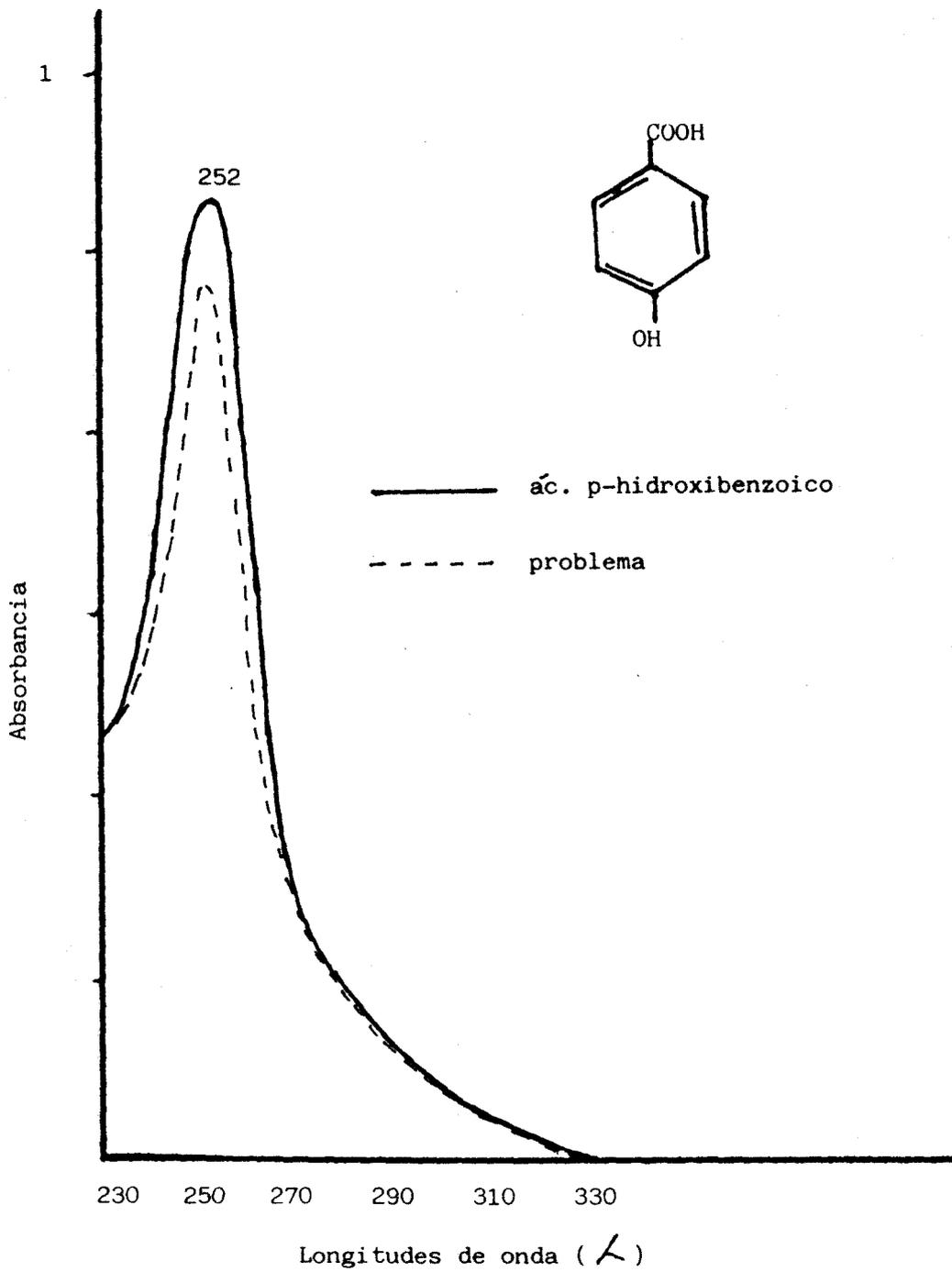


Fig. 19

III.5.4.- Discusión de resultados

Para la extracción de ácidos fenoles hemos seguido -- la técnica de Lescao modificada en nuestro laboratorio ya que estudios previos en otra especie del mismo género nos permitieron deducir que era la más adecuada .

En la identificación y aislamiento hemos utilizado técnicas cromatográficas que nos pusieron de relieve la pureza de los compuestos y técnicas espectrofotométricas para ratificar los resultados.

En el análisis por cromatografía en capa fina dispusimos de los correspondientes patrones cuyos Rf y coloraciones nos indicaron la presencia de 4 ácidos fenoles : ácido ferúlico , -- p-cumárico, vanillico y p-hidroxi-benzoico, presentes también en -- *Ononis natrix* (21) (30).

Los espectros U.V. efectuado en etanol 96° de los productos aislados por cromatografía preparativa muestran una total concordancia con los obtenidos con los patrones.

Estos resultados, que coinciden con los obtenidos en el estudio de otra especie afin, *O.natrix* (21) (30), nos permiten suponer que podría establecerse una relación quimiotaxonómica entre ellas.

III.6.- EXPERIENCIAS FARMACODINAMICAS

III.6.1.- Generalidades

A fin de ratificar las acciones atribuidas a otras -- especies del género *Ononis* con una base científica e investigar-- otras nuevas, procedimos a analizar en primer lugar sus posibles efectos tóxicos en terminos de toxicidad aguda y a continuación su acción sobre la diuresis y sobre la presión arterial.

III.6.1.1.- Extractos utilizados

En todas las experiencias se han utilizado los siguientes preparados:

-Cocimiento al 10% obtenido según técnica de F.E. IX ed. (35).Se partió de 50 g de droga seca que se mantuvieron en -- maceración durante 15 min. con 500 ml de agua y a continuación se sometió a ebullición durante el mismo espacio de tiempo.El extracto acuoso obtenido se concentró a presión reducida hasta residuo seco (r.s.).El rendimiento por este procedimiento fué 7,52 % en el caso de *O.speciosa* Lag. y 10,89% en *O.mitissima* L.

-Extracto metanólico al 10% preparado siguiendo el -- método de Dominguez (40).Se partió de 10 g de droga seca,a la que se adicionan 100 ml de metanol,sometiendose a ebullición durante 30 min .Se obtiene un extracto metanólico que se concentra hasta residuo seco.Este se reedisuelve en la mínima cantidad de agua -- y la solución acuosa resultante se concentra de nuevo hasta -- sequedad ,consiguiendose un rendimiento de 3,42% y 3,92% para cada especie en estudio .

Con los residuos secos obtenidos tanto a partir del--
cocimiento como del extracto metanólico, se prepararon diferentes-
dosis para ser ensayadas en las distintas experiencias.

III.6.1.2.- Reactivo animal

Como animales de experimentación se han empleado:

- Ratones Swis de ambos sexos con peso comprendido entre 25-30 g .
- Ratas Wistar machos de un peso aproximado entre 220-250 g .

III.6.1.3.- Interpretación de los resultados

Los parámetros que se determinaron a los datos obtenidos en las distintas experiencias fueron los siguientes:

$$\text{Media: } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$\text{Desviación standard: } \sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\text{Error típico : } E = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Para determinar el nivel de significación de los datos obtenidos se aplicó el test de Student . (57)

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1)\sigma_1^2 + (n_2-1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Donde σ_1^2 y σ_2^2 son las varianzas obtenidas para cada una de las muestras a comparar.

La relación entre dos variables se ha determinado mediante el cálculo de la recta de regresión obtenida por el método de ajuste de los mínimos cuadrados. (58)

III.6.2.- Toxicidad aguda

Las pruebas de toxicidad tienen grandes limitaciones por las diferencias observadas según especie animal, vía de administración, etc. No obstante, la determinación de la DL_{50} se hace imprescindible ya que aporta una información muy valiosa.

Son numerosos los métodos propuestos para realizar este ensayo, algunos más exactos que otros, pero complejidad y fiabilidad suelen ir parejas.

III.6.2.1.- Descripción de la técnica

En nuestro caso, para determinar la toxicidad aguda -- hemos utilizado la técnica de Miller y Tainter (59). Consiste en experimentar sobre varios lotes de 10-20 animales a los que se administran dosis crecientes de las sustancias a ensayar, de tal manera que el porcentaje de mortalidad varíe entre 0-100 %. Transcurrido el tiempo según la vía de administración elegida, se hace el recuento por dosis, de animales vivos y muertos.

Con los resultados obtenidos se construye una gráfica, representando el porcentaje de mortalidad transformado en probits en función del logaritmo de la dosis (60).

De esta forma la representación obtenida es una línea recta.

III.6.2.2.- Desarrollo de la experiencia

El ensayo se realizó con grupos de 10 ratones (Swiss de ambos sexos) que se mantuvieron en ayunas total (agua y comida), 16-18 h. antes de la experiencia.

Las dosis administradas fueron las siguientes:

Lote I	-----	500	mg	r.s.	cocimiento	/	Kg	animal
Lote II	-----	1000	"	"	"	/	"	"
Lote III	-----	1500	"	"	"	/	"	"
Lote IV	-----	2000	"	"	"	/	"	"

Estas dosis se administraron en un volumen constante de 0,1 ml de solución fisiológica / 10 g de peso animal, via intraperitoneal, por lo que el cocimiento fué previamente desproteínizado con ácido perclórico 3 M (41) .

Los animales fueron sometidos a observación directa - durante las primeras 48 horas para detectar cualquier tipo de -- sintomatología durante dicho periodo.

III.6.2.3.- Resultados

En las Tablas VI y VII se indican los resultados obtenidos .

Toxicidad aguda: Cocimiento al 10% O.speciosa Lag.

<u>Dosis (mg r.s. / Kg)</u>	<u>eq. droga (%)</u>	<u>% mortalidad</u>
500	7,1	0
1000	14,2	0
1500	21,3	0
2000	28,4	0

Tabla VI

Toxicidad aguda: Cocimiento al 10% O.mitissima L.

<u>Dosis (mg r.s. / Kg)</u>	<u>eq. droga (%)</u>	<u>% mortalidad</u>
500	4,7	0
1000	9,4	0
1500	14,1	0
2000	18,8	0

Tabla VII

III.6.2.4.- Discusión de resultados

Las dosis administradas a ratones machos y hembras no solo no ocasionaron la muerte de ninguno de ellos, sino que tampoco llegaron a producir alteraciones del comportamiento normal, teniendo en cuenta que se han administrado hasta 50 mg de r.s. / 25 g animal, se puede hablar de ausencia de toxicidad aguda ya que dichas dosis están muy por encima de las utilizadas habitualmente en terapéutica.

III.6.3.- Actividad diurética

Las técnicas que suelen emplearse en esta determinación son muy variadas. Desde las que precisan una intervención en el animal, utilizándose normalmente perros y conejos, a la -- más sencillas que no precisan cirugía y en las que se suele utilizar el perro, (su sistema renal se asemeja al del hombre más que el de otras especies) y también la rata por la facilidad -- de su manejo. (61), (62), (63).

El aumento del volumen hídrico urinario, no es más que el primer elemento que caracteriza el poder diurético. La orina -- recogida debe ser analizada:

-desde el punto de vista físico: densidad, osmolaridad, pH, (64).

-especialmente, desde el punto de vista químico: determinación de los principales cationes y aniones, así como de algunos constituyentes orgánicos (65) (66)

III.6.3.1.- Descripción de la técnica

La técnica seleccionada para nuestra experiencia es -- la de Lipschitz y col. (67)

Los animales ratas machos se mantienen en ayunas total de comida y agua 18h antes de la experiencia. Las sustancias a estudiar se administran via oral mediante sonda intragástrica, recibiendo por la misma vía una sobrecarga hídrica de 50 ml/ Kg animal de solución salina fisiológica. El grupo control solo recibe dicha solución .

Se introducen los animales en jaulas de metabolismo(Fig.20) y se mide cada hora,durante 6 horas la cantidad de orina excretada,expresando los resultados en excreción volumétrica urinaria - según la fórmula:

$$E.U.V. = \frac{\text{Volumen recogido}}{\text{Volumen administrado}} \times 100 \quad (68)$$

III.6.3.2.- Desarrollo de la experiencia

Los animales ,ratas Wistar macho,agrupados en lotes de 10 ,fueron tratados con las siguientes dosis:

- Lote I : 50 ml solución fisiológica / Kg animal
- Lote II: 20 mg de furosemida / Kg animal
- Lote III:250 mg r.s. coc. O.speciosa Lag / Kg animal
- Lote IV :125 mg r.s. coc. O.speciosa Lag / Kg animal
- Lote V :20 mg r.s. ext^o met. O.speciosa Lag/ Kg animal
- Lote VI :21 mg de cenizas O.speciosa Lag/ Kg animal
- Lote VII:250 mg r.s. coc. O.mitissima L. / Kg animal
- Lote VIII:125 mg r.s. coc. O.mitissima L./ Kg animal
- Lote IX :35 mg r.s. ext^o met. O.mitissima L./Kg animal
- Lote X :26 mg de cenizas O.mitissima L./ Kg animal

A las muestras de orina recogidas se les determinó la densidad y el pH mediante un densímetro Sil-Berbrand-Voguel,-- calibrado para t=20°C y un pHmetro Crisson 501 respectivamente.

El balance de Na⁺ y K⁺ se realizó en un espectrofotómetro de llama Elvi-655. Las soluciones patrones se prepararon con agua desionizada a concentraciones de 25-100 ppm para el Na⁺ y 10-50 ppm para el K⁺

Las lecturas se obtuvieron directamente en ppm y posteriormente se transformaron en meq / Kg de animal / 6 h

III.6.3.3.- Resultados

Las Tablas VIII-XII reflejan los valores medios de los datos obtenidos.

El volumen total de orina, E.U.V. y concentraciones de Na^+ y K^+ , se exponen en forma de diagramas de barra en las figs. 21,24,25 y 26.

Las rectas de regresión correspondientes al volumen de orina excretada respecto al tiempo aparecen en las figs. 22 y 23.

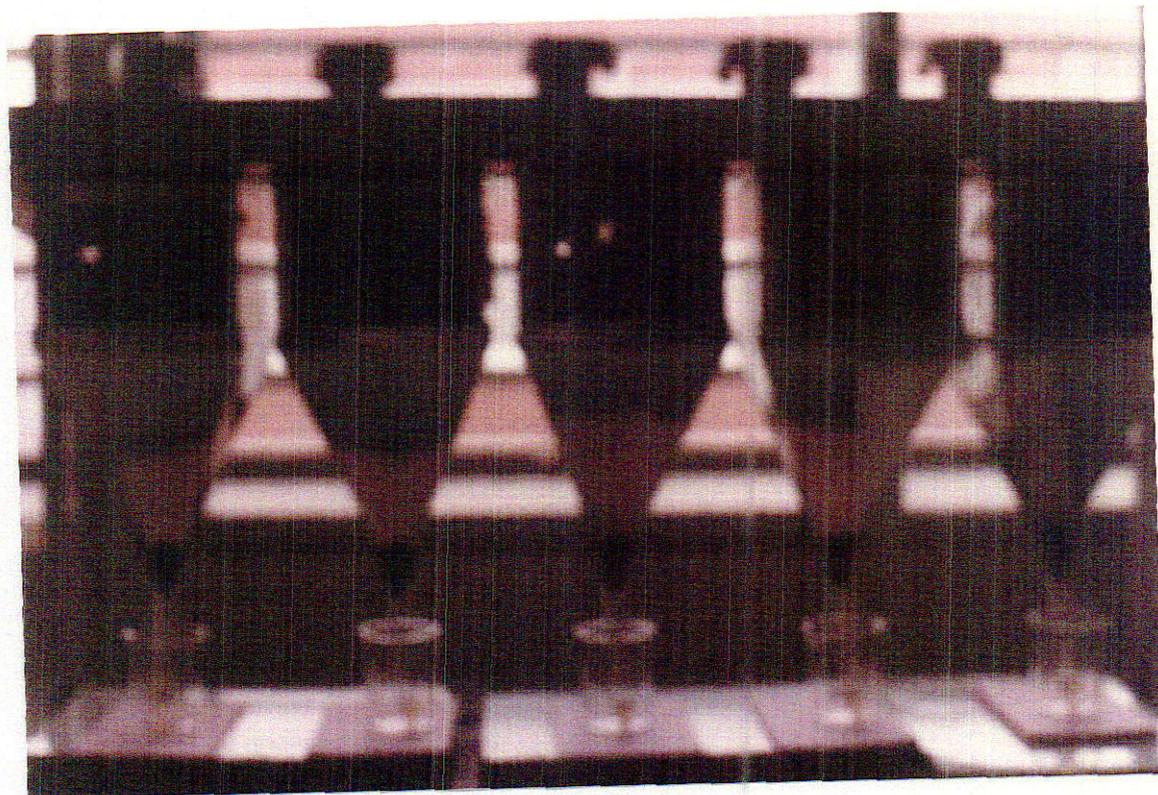


Fig. 20.- Jaulas de metabolismo

Volumen de orina (ml) O.speciosa Lag.

	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Lote Control 50 ml sol.fis./ Kg	0,20 [±] 0,13	1,38 [±] 0,28	1,75 [±] 0,31	2,47 [±] 0,31	2,67 [±] 0,30	2,93 [±] 0,33
Lote Patrón (furosemina) 20 mg / Kg	3,16 [±] 0,20	8,35 [±] 0,57	10,83 [±] 0,57	13,10 [±] 0,66	14,88 [±] 0,69	16,06 [±] 0,70 ***
Lote Problema (cocimiento) 250 mg r.s. / Kg	1,01 [±] 0,30	4,20 [±] 0,39	6,18 [±] 0,37	7,17 [±] 0,34	8,07 [±] 0,37	9,28 [±] 0,39 ***
Lote Problema (cocimiento) 125 mg r.s. / Kg	0,72 [±] 0,25	2,69 [±] 0,40	3,58 [±] 0,44	3,88 [±] 0,48	4,56 [±] 0,47	5,16 [±] 0,55 **
Lote Problema (extº metanólico)	0,67 [±] 0,17	1,80 [±] 0,21	2,30 [±] 0,40	2,86 [±] 0,47	3,19 [±] 0,46	3,22 [±] 0,44 n.s.
Lote Problema (cenizas)	0,13 [±] 0,06	0,56 [±] 0,11	0,90 [±] 0,19	1,01 [±] 0,16	1,21 [±] 0,15	1,34 [±] 0,13 n.s.

*** P < 0,001

** P < 0,005

n.s. : no significativo

Tabla VIII

Volumen de orina (ml) O.mitissimal.

	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Lote Control 50 ml sol. fis./Kg	0,20 [±] 0,13	1,38 [±] 0,28	1,75 [±] 0,31	2,47 [±] 0,31	2,67 [±] 0,30	2,93 [±] 0,33
Lote Patrón (furosemda) 20 mg / Kg	3,16 ⁺ 0,20	8,35 [±] 0,57	10,83 [±] 0,57	13,10 [±] 0,66	14,88 [±] 0,69	16,06 [±] 0,70 ***
Lote Problema (cocimiento) 250 mg r.s./ Kg	0,39 [±] 0,14	1,61 [±] 0,17	2,22 [±] 0,26	2,46 [±] 0,24	2,65 [±] 0,28	3,05 [±] 0,34 n.s.
Lote Problema (cocimiento) 125 mg r.s. /Kg	0,34 [±] 0,14	1,13 [±] 0,13	1,34 [±] 0,15	1,62 [±] 0,16	1,75 [±] 0,15	2,02 [±] 0,16 n.s.
Lote Problema (ext ^o metanólico)	0,22 [±] 0,15	1,20 [±] 0,28	1,78 [±] 0,36	2,10 [±] 0,38	2,17 [±] 0,37	2,53 [±] 0,37 n.s.
Lote problema (cenizas)	0,41 [±] 0,15	1,14 [±] 0,15	1,41 [±] 0,15	1,51 [±] 0,14	1,64 [±] 0,17	1,89 [±] 0,16 n.s.

*** p < 0,001

n.s. : no significativo

Tabla IX

VOLUMEN DE ORINA, TECNICA DE LIPSCHITZ (ml)

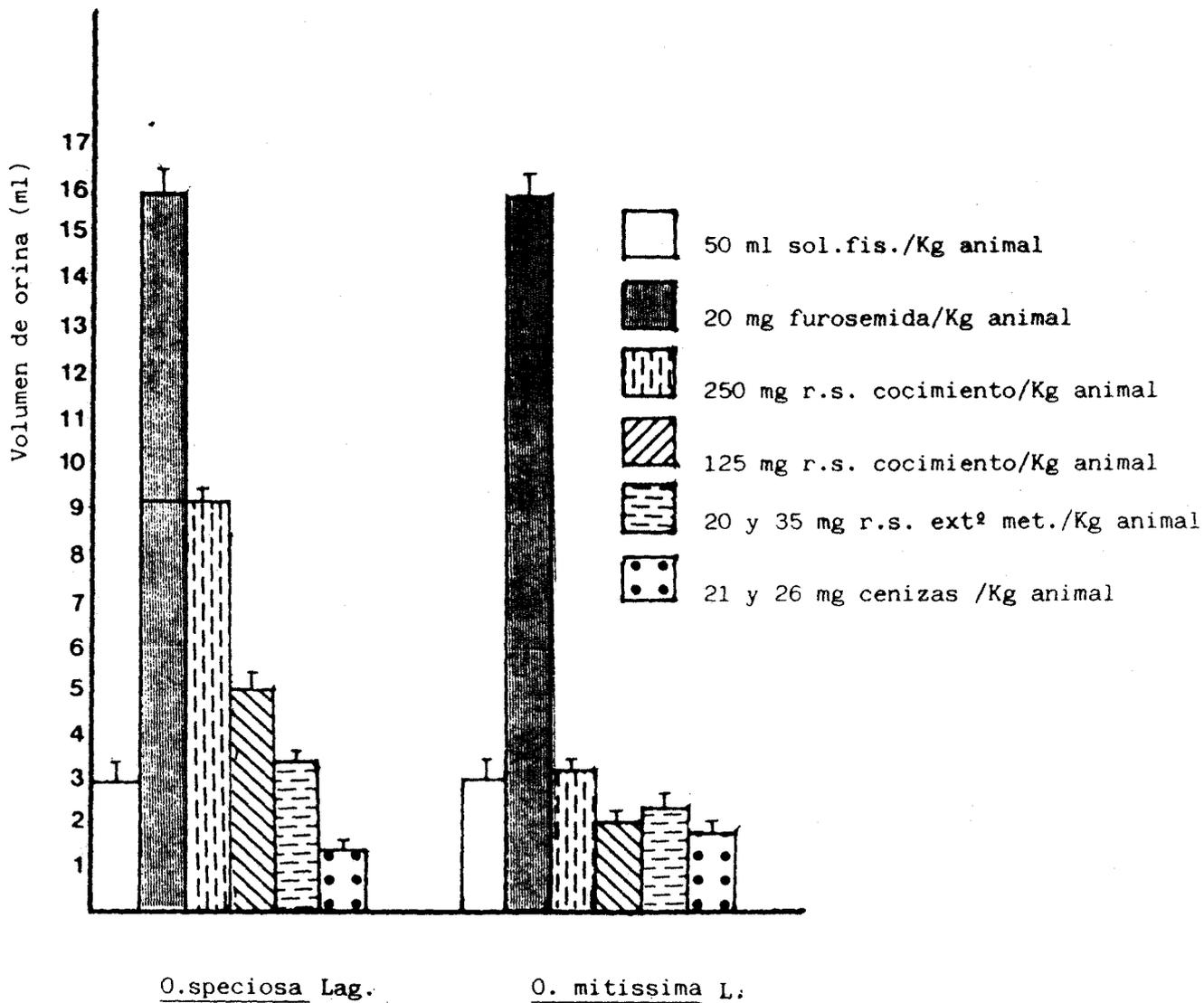


Fig. 21

RECTAS DE REGRESION DE ONONIS SPECIOSA LAG.

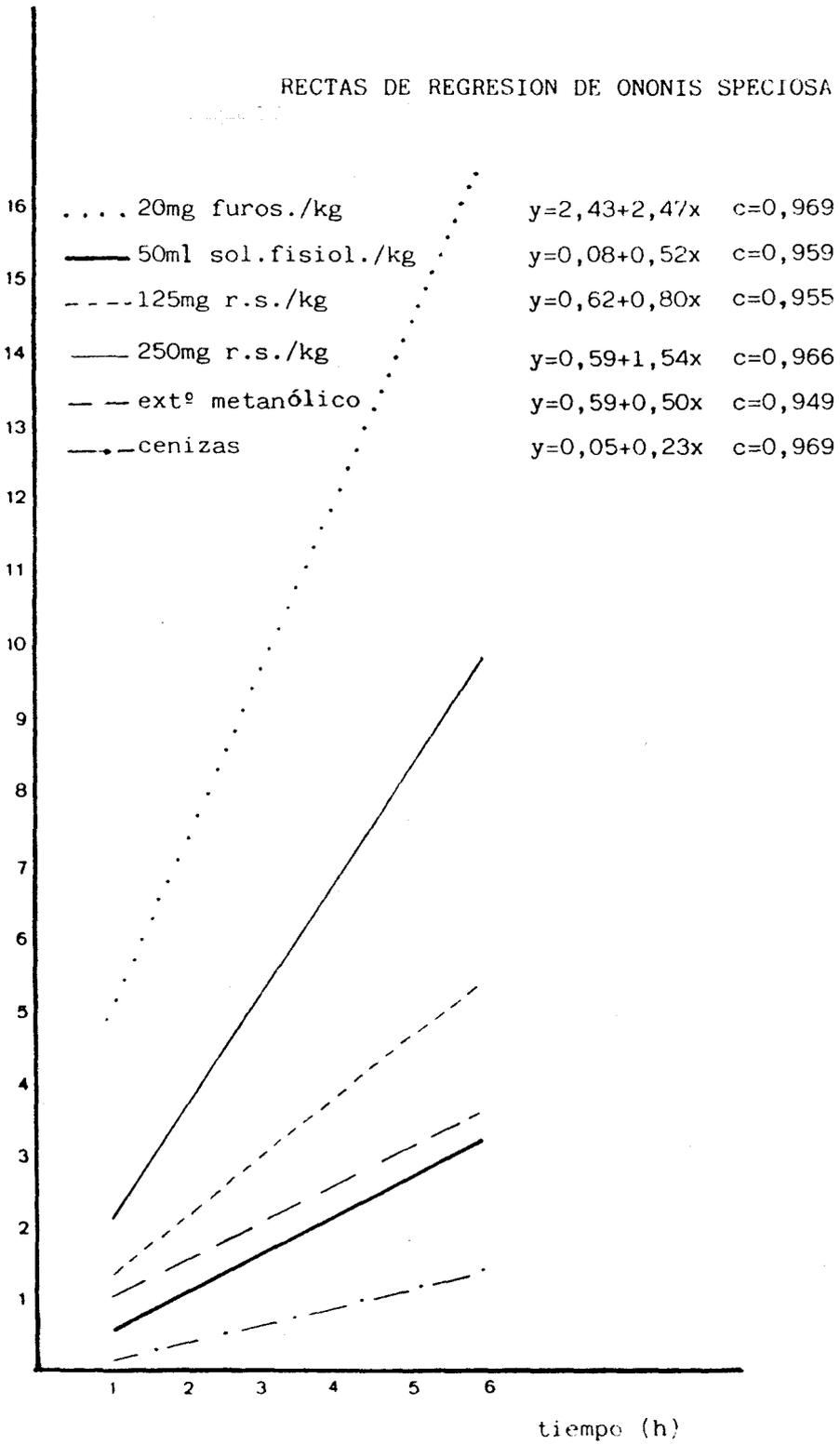


Fig. 22

RECTAS DE REGRESION ONONIS MITISSIMA L.

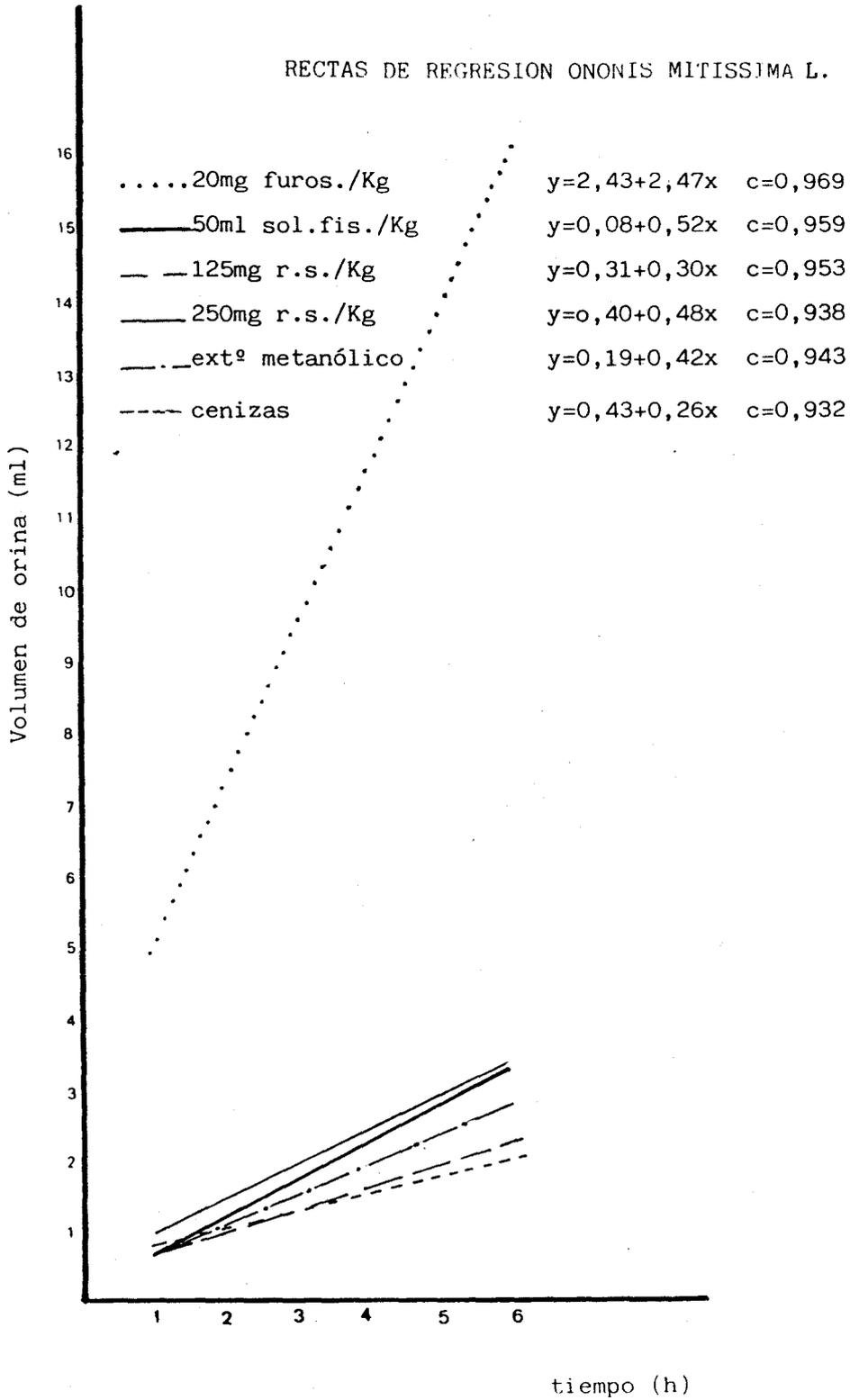


Fig. 23

Valores de E.U.V., Densidad, pH de O.speciosa Lag.

	E.U.V.	Densidad	pH
Lote Control 50 ml sol.fis./Kg	21,31%	1,030	5,98 \pm 0,07
Lote Patrón (furosemida) 20 mg / Kg	146,06%	1,026	5,57 \pm 0,04
Lote Problema (cocimiento) 250 mg r.s.	85,92%	1,023	6,10 \pm 0,08
Lote Problema (cocimiento) 125 mg r,s./Kg	43,73%	1,026	5,43 \pm 0,07
Lote Problema (ext ^o metanólico)	28,87%	1,023	5,91 \pm 0,10
Lote Problema (cenizas)	16,96%	1,030	5,73 \pm 0,09

Tabla X

Valores de E.U.V., Densidad ,pH de O.mitissima L.

	E.U.V.	Densidad	pH
Lote Control 50 ml sol.fis./ Kg	21,31%	1,030	5,98 \pm 0,07
Lote patrón (furosemida) 250 mg r.s./Kg	146,06%	1,026	5,57 \pm 0,04
Lote problema (cocimiento) 250 mg r.s./Kg	44,20%	1,027	5,64 \pm 0,08
Lote problema (cocimiento) 125 mg r.s./Kg	24,48%	1,030	5,56 \pm 0,04
Lote Problema (ext ^o metanólico)	28,91%	1,044	5,78 \pm 0,10
Lote problema (cenizas)	32,68%	1,023	5,69 \pm 0,20

Tabla XI

EXCRECION URINARIA VOLUMETRICA (E.U.V.)

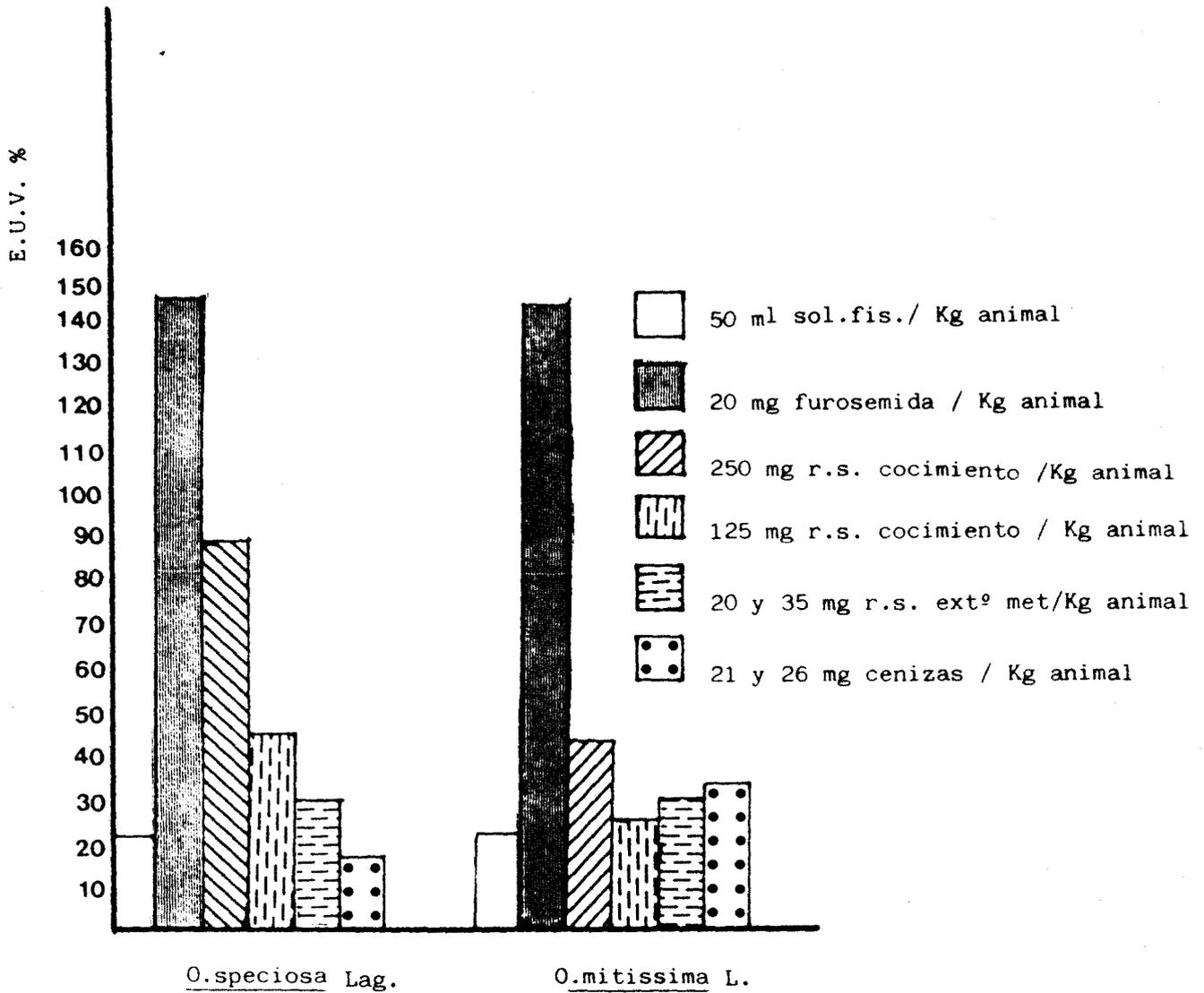


Fig. 24

Valores de Na⁺ y K⁺

O.speciosa Lag.

O.mitissima L.

meq Na⁺/6h / Kg

meq K⁺/ 6h / Kg

meq Na⁺ / 6h / Kg

meq K⁺/6h / Kg

Lote Control 20 ml agua destilada/ Kg	2,16 ± 0,48	1,49 ± 0,33	2,16 ± 0,48	1,49 ± 0,33
Lote Patrón (furosemida) 20 mg / Kg	10,09 ± 0,99 ***	3,25 ± 0,28 **	10,09 ± 0,99 ***	3,25 ± 0,28 **
Lote Problema (cocimiento) 250 mg r,s./ Kg	10,37 ± 0,96 ***	3,32 ± 0,33 **	7,97 ± 1,50 **	3,56 ± 0,72 *
Lote Problema (cocimiento) 125 mg r.s./ Kg	9,28 ± 1,21 ***	2,74 ± 0,36 *	3,12 ± 0,53 n.s.	1,71 ± 0,34 n.s.
Lote problema (Extº metanólico)	5,00 ± 0,65 **	1,80 ± 0,30 n.s.	4,47 ± 0,84 *	1,56 ± 0,24 n.s.
Lote Problema (Cenizas)	2,40 ± 0,38 n.s.	1,39 ± 0,19 n.s.	2,82 ± 0,41 n.s.	3,71 ± 0,50 n.s.

*** P < 0,001

** P < 0,005

* P < 0,025

n.s. : no significativo

Tabla XII

BALANCE DE Na⁺

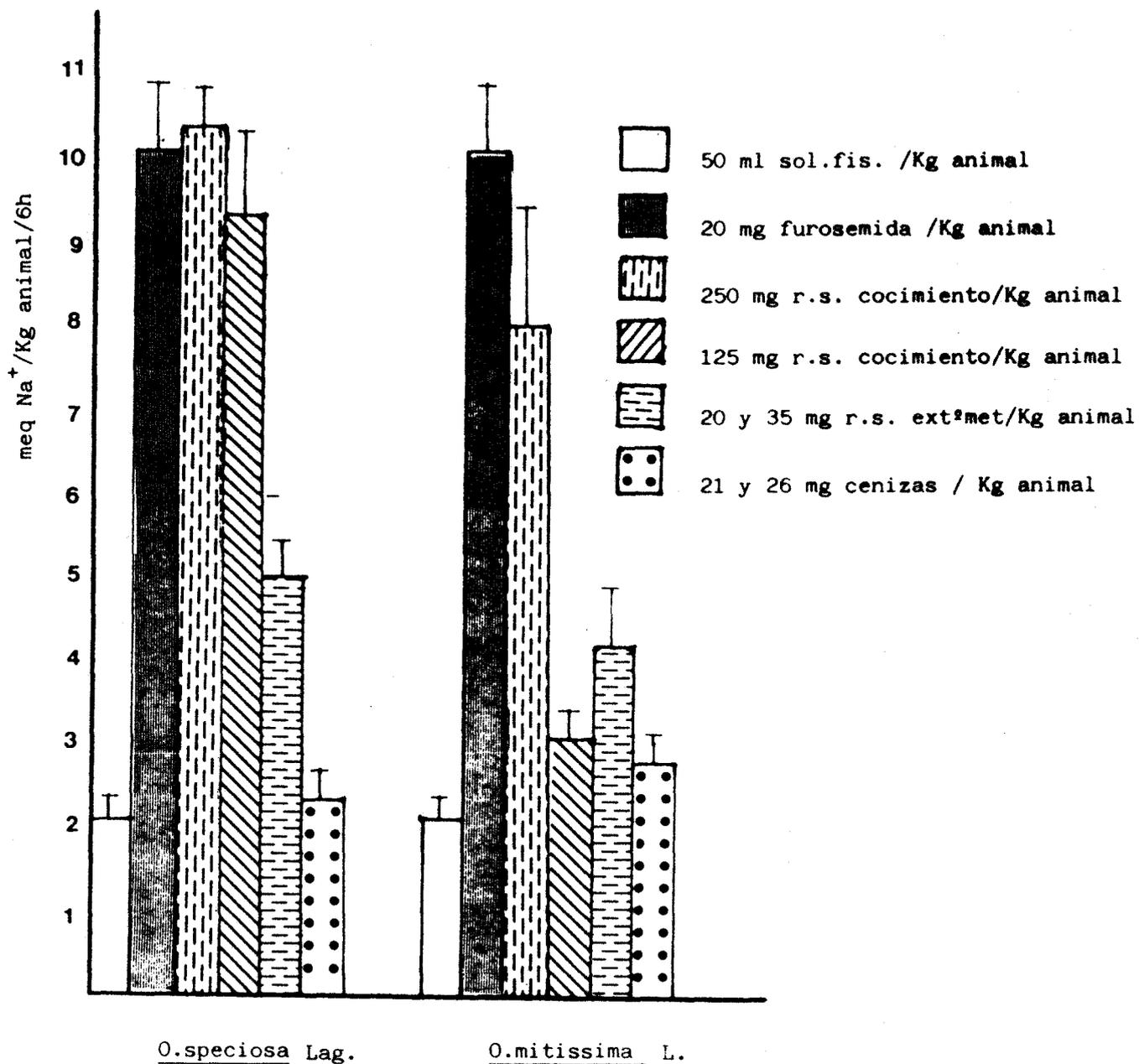


Fig. 25

BALANCE DE K⁺

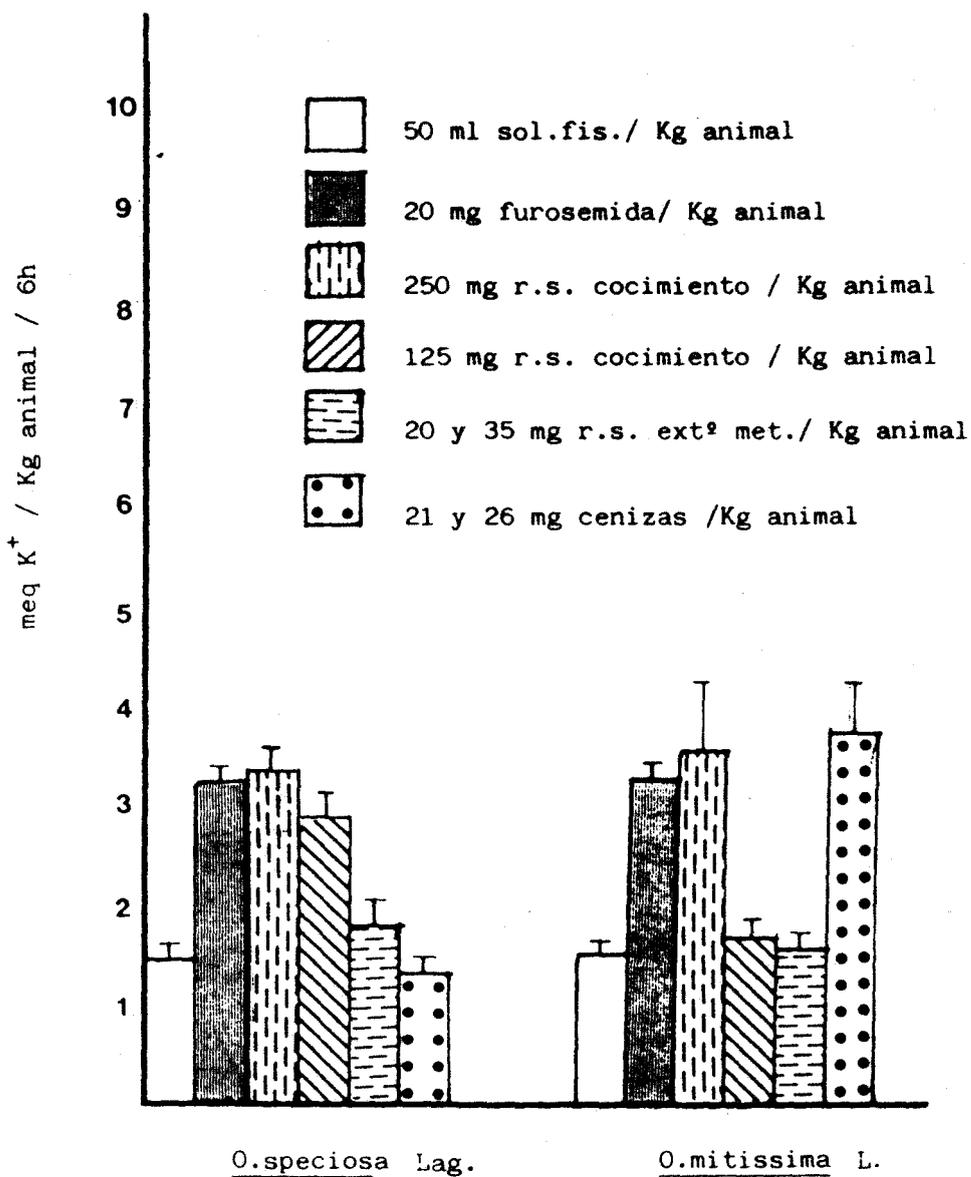


Fig. 26

III.6.3.4.- Discusión de resultados

El estudio comparativo de las dos especies nos da -- idea de que las distintas preparaciones procedentes de las sumidades floridas de O.speciosa Lag. presentan una marcada actividad diurética, más moderada en el caso de O.mitissima L.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos observar: un aumento apreciable del volumen de orina, E.U.V. y eliminación de Na^+ y K^+ en el caso de la dosis de 250 mg r.s. procedente del cocimiento al 10% de O.speciosa Lag. Paralelamente se obtuvieron resultados más interesantes al reducir la dosis a la mitad -- ya que disminuye aproximadamente en la misma proporción el volumen de orina y E.U.V. , en cambio la eliminación de Na^+ y K^+ se -- mantuvieron prácticamente del mismo orden , lo cual nos indica que esta especie cumple las premisas establecidas para ser considerado un buen diurético.

Por el contrario , con las cenizas y el extracto metanólico no hay aumento significativo , tan solo en caso de la excreción de Na^+ provocada por el segundo.

En las preparaciones obtenidas a partir de O.mitissima L. se observa que los resultados a la dosis de 250 mg de r.s. -- son equivalente a las de 125 mg r.s. de O.speciosa Lag.

Tan solo sufre modificación el Na^+ tras la administración del extracto metanólico y el K^+ con las cenizas.

III.6.4.- Actividad antihipertensiva

El registro de la presión arterial puede realizarse empleando técnicas directas e indirectas.

La medida directa, mediante un catéter introducido en una arteria, se utiliza rutinariamente en animal normotenso anestesiado o consciente, aunque en este último sea necesario tomar precauciones. En la rata la técnica más empleada es la medida de la presión arterial por cateterización de la aorta abdominal o la arteria carótida que permite el registro continuo (69) (70) (71) (72).

Sin embargo el método indirecto es también muy utilizado. Cuando el animal empleado es la rata se suele determinar en la cola colocando un manguito que está directamente conectado al medidor consistente en una célula sensible que permite detectar el paso del flujo sanguíneo después de haber realizado una oclusión. (71) (73) (74)

De entre los muchos modelos de hipertensión inducida experimentalmente, destacan los descritos por Page y Grollman (71) que la obtienen por compresión renal: la reducción del flujo sanguíneo a este nivel genera el estado hipertensivo, con lo cual puede realizarse de igual forma el modelo de "2-riñones", altamente dependiente de los niveles plasmáticos de renina y de "1 riñón" dependiente de un desequilibrio en el balance de Na^+ principalmente. (75) y (76).

Así mismo puede provocarse un aumento de la presión arterial, por administración en la dieta de NaCl y acetato de desoxicortocosterona (DOCA). En este caso, el mecanismo por el cual se eleva la presión parece ser debido básicamente a la retención de sodio y agua. (75) (76)

III.6.4.1.- Descripción de la técnica

Hemos conseguido ratas hipertensas mediante una combinación de los métodos mencionados .

A los animales, anestesiados superficialmente con éter , se les practica una laparotomía lateral que permite abordar el riñón correspondiente. Tras la liberación y exposición del mismo, se realiza una doble ligadura del pedículo renal y uréter procediéndose a la ablación del órgano. Seguidamente, se efectúa el cierre de la pared abdominal por planos. Figs. 27-29.

En el animal nefrectomizado, se produce una elevación transitoria de la presión arterial, que perdura durante los 5-7 días que siguen a la intervención.

A partir de este periodo, coadyuvamos al mantenimiento del estado hipertensivo mediante la administración reiterada, cada 5 días, de 20 mg de deoxicorticosterona, enantato / Kg animal , vía intramuscular. De esta forma se produce un incremento de la reabsorción renal de sodio, aniones y agua, favoreciendo por tanto la hipernatremia, retención de líquidos e hipertensión , entre otros efectos.

III.6.4.2.- Desarrollo de la experiencia

Los animales , ratas Wistar macho de unos 220-250 g de peso, una vez realizada la exéresis renal , se sometieron al tratamiento indicado con mineralocorticoides a los 7 días de haber sido nefrectomizados.

Se les practicaron controles periódicos de la presión arterial y una vez conseguido el estado hipertensivo constante,-

en relación a los valores basales primitivos ,los animales se distribuyeron en grupos de 10 que recibieron el siguiente tratamiento:

Lote I : 250 mg r.s. Coc. O.speciosa Lag./ Kg animal

Lote II: 110 mg r.s. ext^o metanólico O.speciosa Lag/ Kg animal

Lote III:250 mg r.s. Coc. O.mitissima L. / Kg animal

Lote IV : 89 mg r.s. ext^o metanólico O.mitissima L./ Kg animal

Estas dosis se administraron,vía oral mediante sonda intragástrica en un volumen constante de 20 ml agua destilada/ Kg animal, repitiendose cada 24 h, durante 3 dias.

A las 2 h de la administración se efectuaron los registros con un Digital Pressure Meter Letica 5000,al que va conectado un manguito que se aplica directamente sobre la cola del animal que previamente hemos sometido a un foco de calor a fin de provocar una vasodilatación que permite detectar el flujo sanguíneo.

En cada determinación hemos obtenido simultáneamente los valores de la presión sistólica,diastólica y frecuencia cardiaca.

Las experiencias se realizaron en un recinto acondicionado con luz artificial y t^a constante (25-30°C)

III.6.4.3.- Resultados

Los resultados que reflejan los valores medios obtenidos correspondientes a la presión sistólica,diastólica y frecuencia cardiaca de las dos especies en estudio figuran en las tablas XII y XIV.

Los diagrama de barras aparecen en las figs 30,31 y 32.

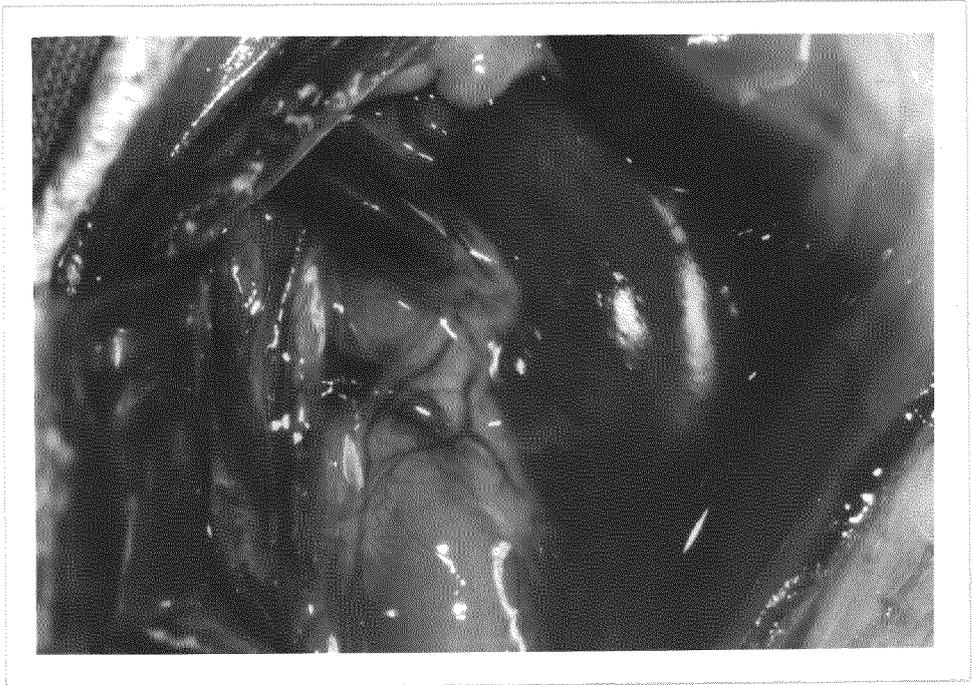


Fig. 27.- Exposición del riñón

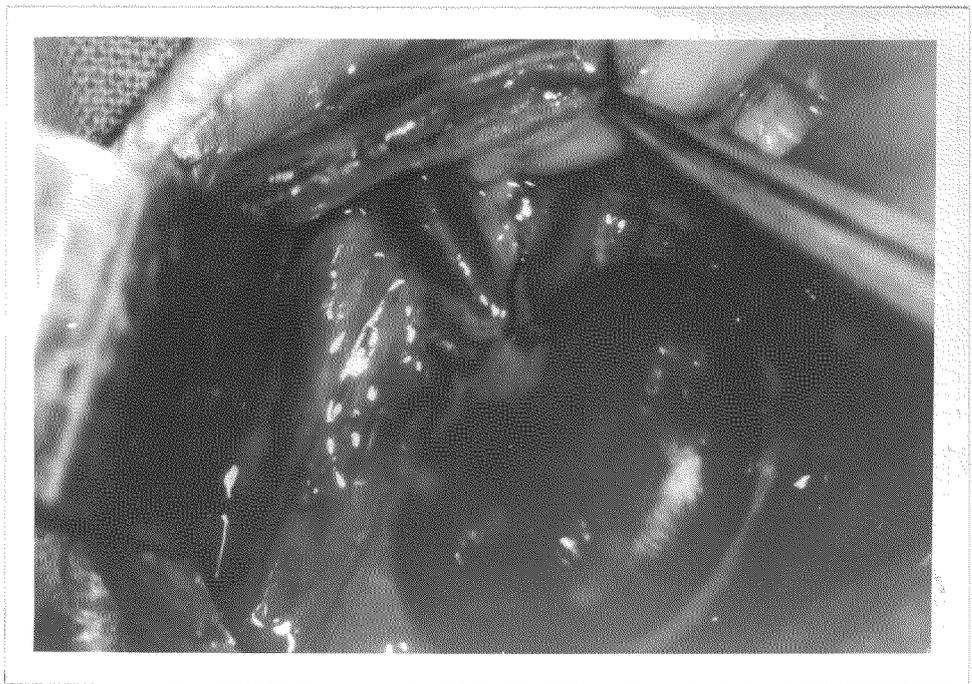


Fig. 28.- Ligadura del pedículo renal

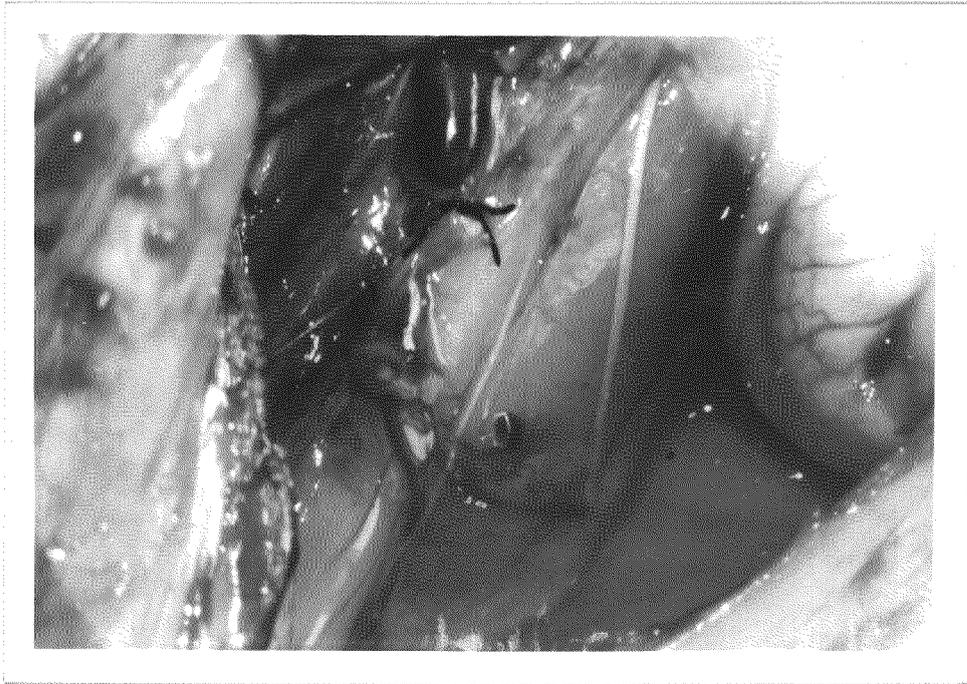


Fig. 29.- Cavidad renal donde se aprecia la ligadura del pedículo.

Variaciones de la P.arterial y Frecuencia cardiaca ($\bar{x} \pm \epsilon$) obtenidas con diversos preparados de O.speciosa Lag .

Animales no tratados

Animales tratados

	Animales no tratados		Animales tratados					
	<u>Normotensos</u>	<u>Hipertensos</u>	250 mg r.s. coc. al 10% /Kg			110 mg r.s. ext ^a met./ Kg		
			1 ^a dosis	2 ^a dosis	3 ^a dosis	1 ^a dosis	2 ^a dosis	3 ^a dosis
Pr. art. sistólica (mmHg)	14,57 \pm 0,69	24,51 \pm 0,77 +	21,72 [±] 1,04 n.s. +	20,02 [±] 1,11 *** +	16,28 [±] 0,97 * ++++	19,53 [±] 0,35 * +	16,76 [±] 0,30 * ++++	15,89 [±] 0,30 * n.s.
Pr. art. diastólica (mmHg)	9,14 \pm 0,26	12,45 \pm 0,82 ++	12,00 [±] 1,20 n.s. ++++	12,29 [±] 1,22 n.s. ++++	9,81 [±] 0,72 *** n.s.	12,47 [±] 0,39 n.s. ++	12,41 [±] 0,43 n.s. +	11,34 [±] 0,53 n.s. n.s.
Frecuencia Cardiaca	289 \pm 6,36	389 \pm 7,43 +	368 \pm 5,10 n.s. +	360 \pm 8,50 n.s. +	306 [±] 10,20 * n.s.	369 [±] 1,22 n.s. +	341 [±] 9,10 ** ++++	312 [±] 4,20 * n.s.

* Niveles de significación estadística respecto a los valores de hipertensión

+ Niveles de significación estadística respecto a los valores de presión basal

* y + p < 0.001

*** y +++ p < 0,010

** y ++ p < 0.005

**** y ++++ p < 0,050

n.s.- no significativo

TABLA XIII

Variaciones de la P.arterial y Frecuencia cardiaca ($\bar{x} \pm \epsilon$) obtenidas con diversos preparados de O.mitissima L.

	Animales no tratados		Animales tratados					
	<u>Normotensos</u>	<u>Hipertensos</u>	250 mg r.s. coc. al 10% / Kg			110 mg r.s. ext ^o met./ Kg		
			1 ^a dosis	2 ^a dosis	3 ^a dosis	1 ^a dosis	2 ^a dosis	3 ^a dosis
Pr.art. sistólica (mmHg)	14,57 \pm 0,69	24,51 \pm 0,77 +	19,2 [±] 0,29 * +	16,79 [±] 0,68 * +++	14,17 [±] 0,82 * n.s.	20,55 [±] 0,56 ** +	18,83 [±] 0,39 * ++	15,97 [±] 0,59 * ++++f
Pr.art. diastólica (mmHg)	9,14 \pm 0,26	12,45 \pm 0,82 +	11,90 [±] 0,54 n.s. +++	10,02 [±] 0,36 **** n.s.	9,05 [±] 0,44 ** n.s.	12,77 [±] 0,43 n.s. +	11,78 [±] 0,36 n.s. +++	10,57 [±] 0,20 *** n.s.
Frecuencia Cardiaca	289 [±] 6,36	389 \pm 7,43 +	356 \pm 6,80 n.s. +	315 \pm 8,30 ** n.s.	295 [±] 6,50 * n.s.	345 \pm 8,20 ** +	320 [±] 13,8 *** ++++	308 \pm 10,60 * n.s.

* Niveles de significación estadística respecto a los valores de hipertensión
+ Niveles de significación estadística respecto a los valores de presión basal

* y + p<0,001 *** y +++ p<0,010
** y ++p<0,005 **** y ++++p<0,050

n.s.: no significativo

TABLA XIV

Variaciones de la Presión arterial sistólica y diastólica con 250 mg r.s. Coc./Kg de O. speciosa Lag y O. mitissima L.

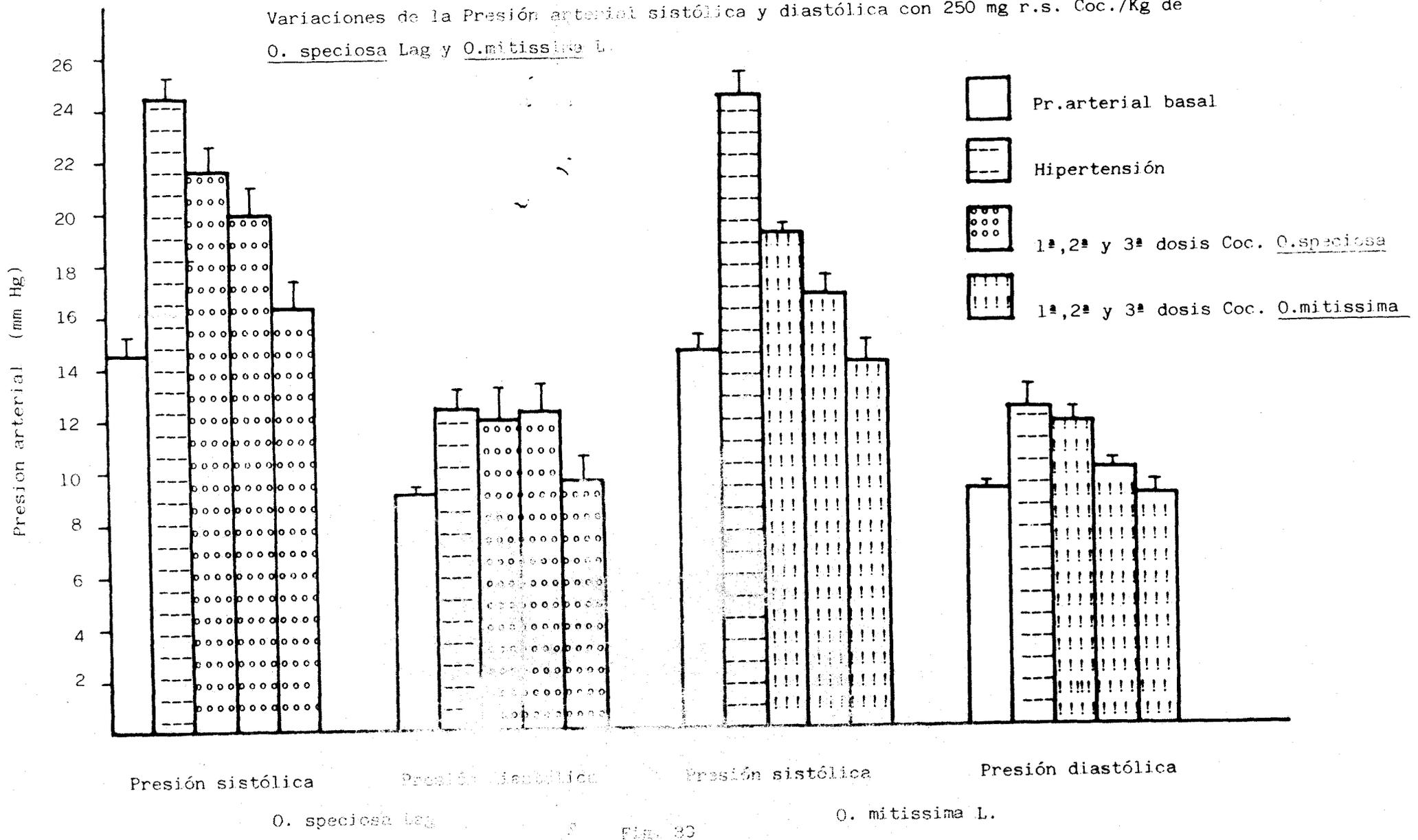


Fig. 30

Variaciones de la Presión arterial sistólica y diastólica con Ext^o metanólico de O. speciosa Lag. y O. mitissima L.

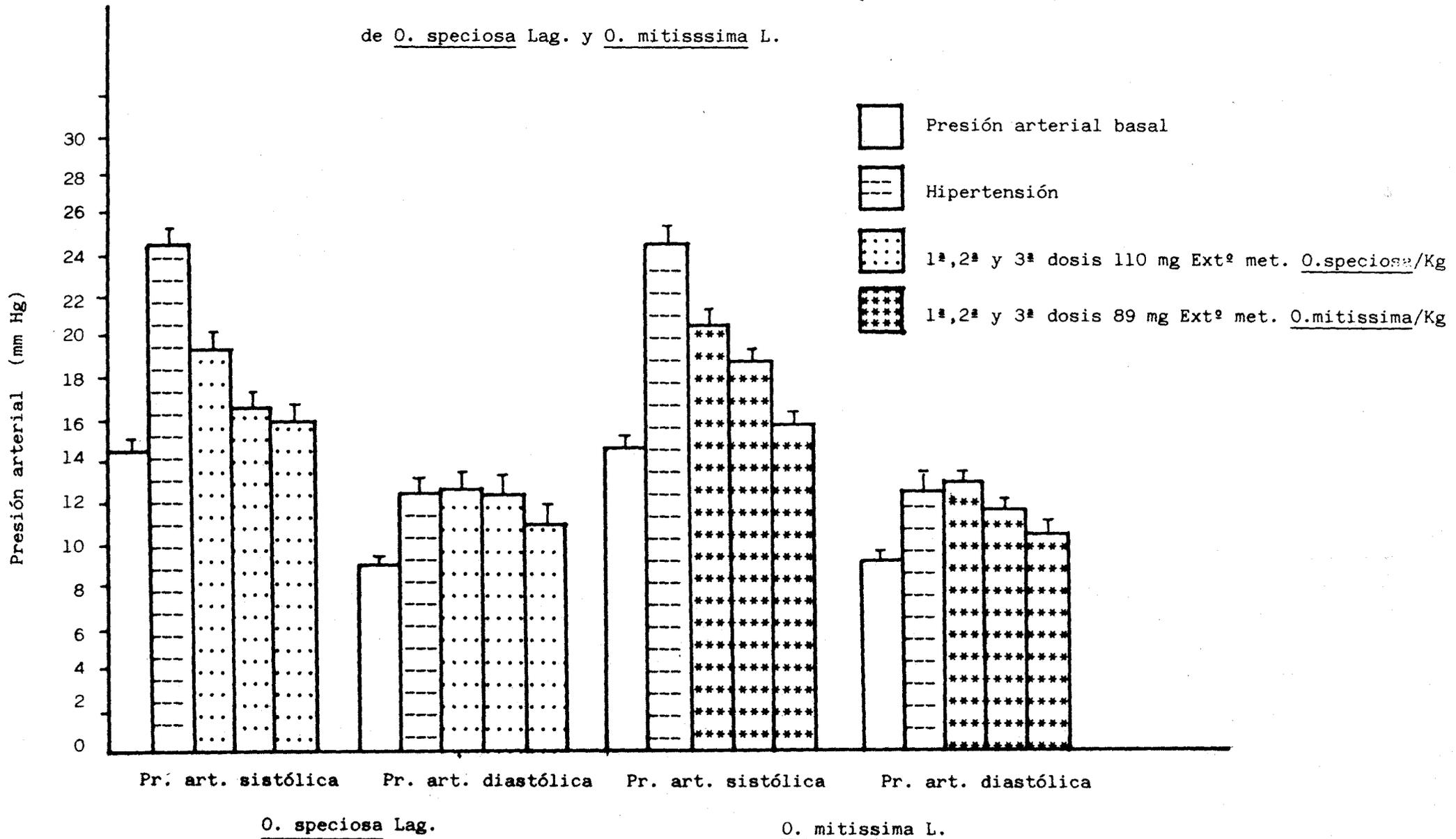


Fig. 31

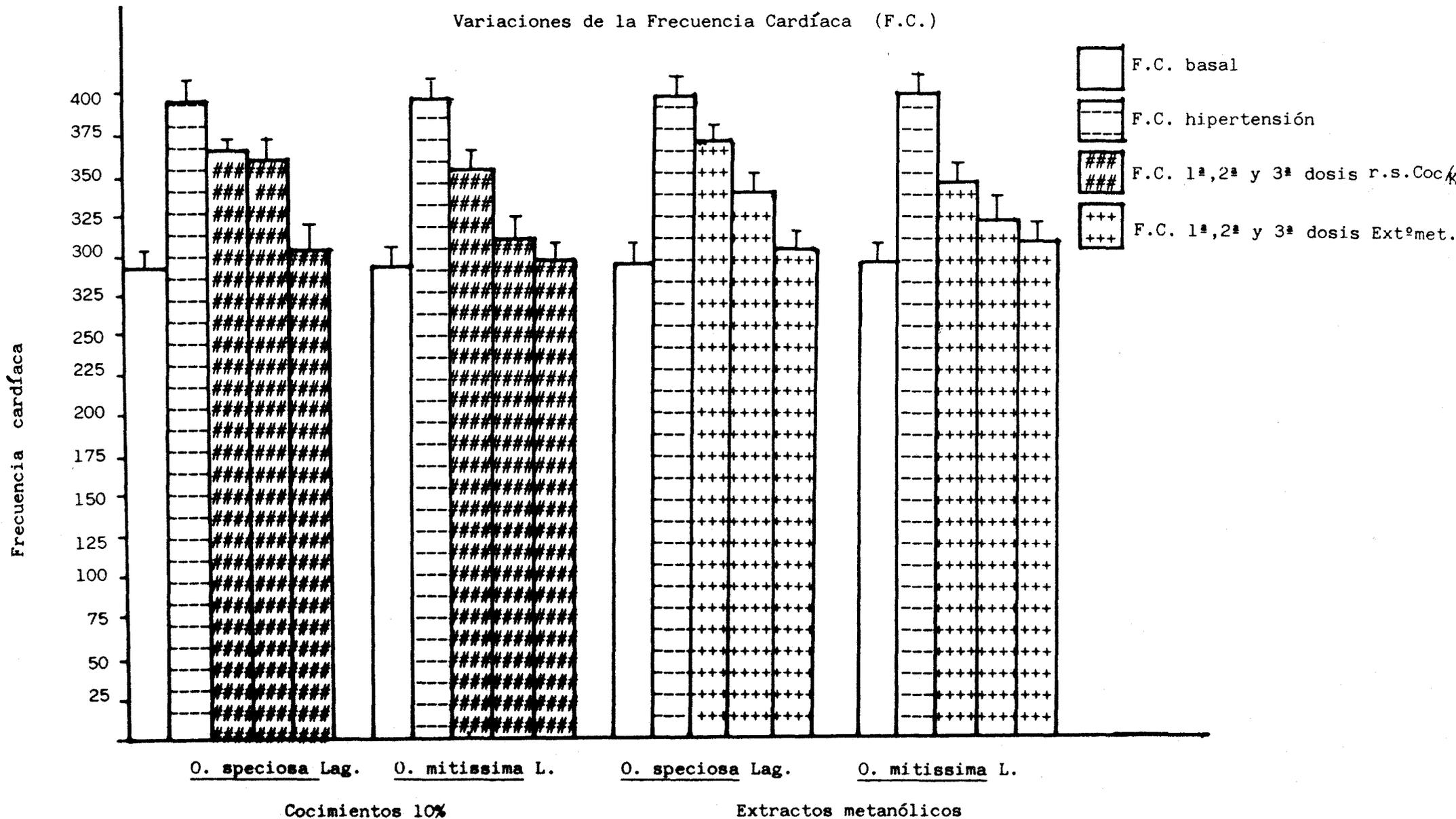


Fig. 32

III.6.4.4.- Discusión de resultados

El modelo experimental de animal hipertenso lo hemos conseguido mediante extirpación de un riñón y posterior tratamiento con enantato de desoxicorticosterona. Los valores máximos de presión arterial sistólica han sido de $24,51 \pm 0,77$ ($p < 0,001$) logrando un incremento del 62% con respecto al valor basal ($14,57 \pm 0,69$) .

La administración de la 3ª dosis del extº metanólico de O.speciosa Lag. reduce la presión sistólica practicamente hasta los valores normales, sin lograr este efecto sobre la diastólica. El cocimiento reduce con menor intensidad los valores sistólicos, llevando los diastólicos hasta los basales.

Los animales tratados con O.mitissima L. muestran distinto comportamiento, ya que es el cocimiento el que reduce las cifras de presión tanto sistólica como diastólica hasta la normalidad, -- sin llegar a alcanzarla con el extº metanólico.

En todos los casos se consigue rebajar considerablemente los valores de hipertensión.

Estos datos son coherentes con los resultados que nos proporciona el estudio de la actividad natriurética, ya que la hipertensión creada con este modelo experimental es debido fundamentalmente a un desequilibrio en el balance de Na^+ y las muestras estudiadas originan un incremento en la excreción de este catión.

IV - CONCLUSIONES

- 1ª - Desde el punto de vista micromorfológico existen claramente diferencias entre las dos especies estudiadas. En el tallo de O.mitissima L. no se aprecian vasos reticulados ni pelos. Con respecto a la hoja las diferencias radican en el tipo de pelos pluricelulares glandulosos en O.speciosa Lag. y unicelulares tectores así como glandulas epidermicas en O.mitissima L.
- 2ª - Las determinaciones cuantitativas han puesto de manifiesto aproximadamente el mismo contenido en cenizas y aceite esencial, mientras que se observa distinto grado de humedad debido logicamente al ser una especie leñosa y la otra herbácea
- 3ª - El " screening " fitoquimico no revela grandes diferencias cualitativas entre O.speciosa Lag. y O.mitissima L. salvo la presencia de resinas en la primera. Hasta donde nos permite concluir - este tipo de ensayos si podemos hablar de diferencias desde el punto de vista cuantitativo.
- 4ª - Mediante la tecnica de Lescao se han extraido cuatro acidos fenoles aislados e identificados por cromatografía en capa fina - y espectroscopia U.V. comunes a las especies analizadas: Ac. ferúlico, p-cumárico, vanillico y p-hidroxi-benzoico.
- 5ª - Las sumidades floridas de O.speciosa Lag. y O.mitissima L. a las dosis ensayadas se muestran totalmente atóxicas.
- 6ª - Los resultados obtenidos en el estudio del efecto diurético nos permite concluir: Intensa actividad de la dosis de 250 mg de cocimiento de O.speciosa Lag. con paralela excreción de Na^+ y K^+ y más moderada con la misma dosis de O.mitissima L.

7ª - Con respecto a los valores de presión arterial ambas especies muestran una significativa actividad antihipertensiva probablemente debida a la marcada actividad natriurética de las dosis - ensayadas.

V- BIBLIOGRAFIA

- (1) LINNEO , C. (1753) .- " Species Plantarum " , pág. 717
- (2) ESCHRICH , W. (1983) .- "Pulver-atlas der drogen ". Semper Bonis Artibus, Stuttgart-New York, pág. 40.
- (3) SUTHERLAND ,J.M. ; SPRENT, J.I. (1984) .- " Calcium -oxalate crystals and crystal cells en determinate root nodules of legumes " ,Planta 161 ,193.
- (4) GARCIA GIMENEZ, D. (1984) .- " Ononis natrix L.:Estudio farmacológico y determinación de su actividad antibacteriana " .Facultad de Farmacia , Universidad de Sevilla .
- (5) FONT - QUER , P. (1976) .-"Plantas medicinales ". Ed. Labor Barcelona.
- (6) SCHAUERE, P.; PARIS, F. (1977).- "Guide des plantes medicinales " . Delachaux, Niestlé ed., Paris .
- (7) BOHINC, P.; BEUC , S.; PRISPEUEK , H. (1979) .- " Kemizmu radix ononidis ". Farmaceutki Vestruik 6 , 30.
- (8) HAZNAGY, A.; TOTH , G.; TOMAS, J.(1978) .- "Uber die inhaltstoffe des wäbrigen extraktes von O.spinosa L. " .Arch Pharm - Weinheim 311, 318.

- (9) BEZANGER-BEAUQUESNE ,L.; PINKAS, M.; TORCK, M. (1975).- " Les plantes dans la therapeutique moderne". Harbone S.A. ed., - Paris.
- (10) ROWAN, M.G.; DEAN, P.D.G. (1972) .- " α -onocerin and sterol content of twelve species of Ononis ". Phytochemistry 11, - 3263.
- (11) HARBONE, J.B. (1967).- " In comparative Biochemistry of the flavonoids ". Cuadernic Press., London- New York.
- (12) DEDIO,J.; KOZLOWSKI,J. (1977) .- "Comparative morphological - and phytochemical studies of Ononis spinosa and O.arvensis.I Biometric and chromatographic investigation of metanolic extracts ". Acta Pol. Pharm. 34 (1), 97.
- (13) PAMPLOW, M. (1979) .- " El gran libro de las plantas medicinales ". 2ª Ed..Ed. Everest, León.
- (14) HILP, K.; KATING, H.; SHADERM, G. (1975).- "Das ätherische -- öl der radix ononidis " . Archiv.der Pharmazie 308 ,Bland - Heft G Seite,429.
- (15) HESSE,C.; HIPL,K.; KATING,H.; SCHADEM,G. (1975).- "Aromatische kohlenwasserstoffe ans den ätherischeim olen der radix und Herba ononidis " .Archiv.Pharmazie Bland 310 ,Heft 10 Seite,792 .

- (16) FALKWSKI, M.; KUKULKA, I.; (1977).- "Zawartosc Karotenius - Saku Cecha Charakterystyczna roslin lakowych". Rucznikinauk Rolniczych serie Fi t, 79.
- (17) GLADKIKH, A.S.; GUBANOV, I.A.; MESHCHERYAKOV, A.A. (1965).- "Content of saponius in plants of Turkmenia" Izv. Akad Nauk. Turkm. SSR, Ser. Biol. Nauk (1), 22. A través de C.A. 63, - 923 d, (1965).
- (18) GORUNOVIC, M.; RAYNAUD, J.; PRUM, N. (1971).- "Les glycosi- des flavoniques de la fleur d'Ononis natrix L. (Papilionaceae)" Plant. Méd. Phytothér 5 (4), 272.
- (19) GHODSI, M.; RAYNAUD, J.; GORUNOVIC, M.; PRUM. N. .- "Distri- bution de anthocyanes et des flavonoides dans les fleurs de divers Ononis (Papilionaceae)". Bull. Soc. Ph. Lyon 14 (4),- 129.
- (20) GORUNOVIC, M.; ABDEL-GAWAD, M.; RAYNAUD, J. (1974) .- "Unsa- ponificable part of de root of Ononis natrix (Papilionaceae)" Plant. Méd. Phytothér. 8 (1) 44.
- (21) MARHUENDA, E.; GARCIA, M.D. (1985).- "Mise en évidence des- propriétés antimicrobiennes des sommités fleuries d'Ononis- natrix L. Identification de l'acide férulique". Plant. Méd. Phytothér. 19 (3), 163.

- (22) STOECK, A.; MEINHARD, G. (1978).- "Untersuchungen über die endospermschleime der same von *Cercis siliquastrum* L. und *Ononis natrix* L. "Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd 91, 5, 369.
- (23) KOVALEV, V.M. (1975).- "Flavonoids of *Ononis arvensis*" Farm. Zh 30 (2), 93. A través de C.A. 83, 128662 y (1975).
- (24) TORCK, M.; BEZANGER-BEAUQUESNE, L.; PINKAS, M. (1971).- "Recherches sur les flavonoides des Legumineus". Annales Pharmaceutiques Français 29 (3), 201.
- (25) REBUELTA, M.; SAN ROMAN, L.; SERRANILLOS, M.G. (1981).- -- "Etude de l'effect diuretique de differentes preparations - de *O. spinosa* L." Plantes medicinales et phytoterapie 15,99.
- (26) MANTA, D.; SEMOLLI, D. (1978).- "Nuestras amigas las plantas" Vol. III, Ed. Fermi. Génova.
- (27) POLETTI, A. (1979).- "Plantas y flores medicinales". Instituto Parraman Ediciones, Barcelona.
- (28) MARHUENDA,E.;GARCIA,M.D.(1985)"Estudio de la actividad diurética de *Ononis natrix* L." Il farmaco 40 (9), 302.
- (29) KOVALEV, V.N ; BORISOV, M.I.; SPIRIDONOV; V.N... (1976) -- "Sums of flavonoids possessing cholagoge activity by extracting the vegetable raw material with alcohol, purifications

of inspissated solution with a mixture of organic solvents"
From Otkrytiya, Isobut, Prom Ohaztsy, Tovarny Znaki 53 --
(48), 15. A través de C.A. 86, 95986p (1976).

- (30) GARCIA, M.D.; MARHUENDA, E. (1985).- "Isolement et activité antimicrobienne de l'acide vanillique et de l'acide p-hydroxy-benzoïque, constituants d'Ononis natrix". Fitoterapia 56 (6) 349.
- (31) CAVANILLES, A.J. (1958).- " El Género Ononis L. y los Ononis españoles" Ann.I.Bot. A.J. Cavanilles, 16.
- (32) BALL, P.N.; TUTIN, T. G. (1968).- "Flora europea" vol. 2,-- Cambridge University, Cambridge.
- (33) BONKEF, K.; SOVISSI, H.R.; BALANSARD, D. (1982).- "Contribution a l'etude des plants utilisies en medicine traditionnelle tunisienne". Plant. Méd. Phytothér. 16 (4), 273.
- (34) SIRJAEV. (1932).- "Ononis L. revisio critico". Bech.Bot. -- Centr. 49, 381.
- (35) FARMACOPEA ESPAÑOLA (1954). IX Ed., Ed.Estades, II, Madrid.
- (36) CABO, J.; PARDO, P. (1974).- "Prácticas de Farmacognosia". - 4ª ed. Ed Gráficas del Sur, Granada.
- (37) STAHL, E. (1975).- "Analyse chromatographique et microscopique des drogues". Ed. Entreprisise Moderne d'edition Technique et Documentation, Paris.

- (38) PARIS, R.R.; MOYSE, H. (1971).- "Precis de Matière médicale" Vol. I, Ed. Masson et Cie, Paris.
- (39) FALCHI DELITALA, L.; SOLINAS, V.; GESSA, C. (1983).- "Variazioni stagionali quantitative et qualitative di olio essenziale e die suoi fenoli in *Thymus capitatus* ed. in T. Herbarona". Fitoterapia 2, 87.
- (40) DOMINGUEZ, X.A. (1961).- "Análisis fitoquímico". Ciencia 21, 126.
- (41) DIAZ CASADO, V. (1977).- "Estudio sobre el *Rosmarinus ericalix*". Tesina de Licenciatura, Granada.
- (42) OTERO AENLLE, E. (1946).- "Análisis de grasas, ceras y sus mezclas comerciales". Ed. Dossat S.A., Madrid.
- (43) GATHERCOAL, E.N., WIRTH, E.H. (1948).- "Pharmacognosy" Ed. - Lea-Febriger. Filadelfia.
- (44) WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. .- Plant. Drug Analysis (1984). Springer-Verlag. Berlin.
- (45) PINDER, A.R. (1960).- "The Chemistry of terpenes" Chapman et Hall. Londres.
- (46) DOMINGUEZ, X.A. (1973).- "Métodos de investigación fitoquímica" Ed. Limusa, México.

- (47) BOUQUET, A.; FOURET, A. (1975).- "Recherches chimiques preli-
minares sur les plantes medicinales du Congo-Brazzairlle" Fi-
toterapia 46, 175.
- (48) TORRENT MARTI, M.T. (1976).- "Algunos aspectos farmacognósti-
cos y farmacodinámicos de Lippia citriodora" Rev. B. Acad. de
Barcelona 14, 39.
- (49) LESCAO, F.; FAUGERAS, G.; PARIS, R. (1972).- "Sur divers cons-
tituant phénoliques (ácides phénols, flavonoids) de l'Osyris-
alba". Plantes medicinales et phytotherapie 16 (3), 216.
- (50) TORCK, M.; PINKAS, M. (1980).- "Sur quelques polyphenols de -
Medicago arborea L." Plantes medicinales et phytotherapie 14(1)
20.
- (51) DIDRY, N.; PINKAS, M.; TORCK, M. (1980).- "Recherches sur les
polyphenols du Tussilage". Annales pharmaceutiques françaises
38 (3), 237.
- (52) PARIS, R.R.; JACQUEMIN, H. (1975).- "Sur les feuilles de deux
quinquinas de Madagascar (Cinchona Ledgeriana Moens et C. Suc-
cirubra Pavon). Etude particulière des polyphénols (ácides---
phénols, anthocyanes et flavonoides)" Annales pharmaceutiques
françaises 33 (2), 73.
- (53) SALAS, M.C.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, E. (1973).- "Estudio Bio-
lógico y químico de Erica umbellata L." Annales de Edafología
y Agrobiología 32 (9-10) 807.

- (54) RIBERAU-GAYON, P. (1968).- "Les ácidos-phénols et leurs dérivés", Ed Dunod, Paris.
- (55) RAO, C.N. (1970).- "Espectroscopia ultravioleta y visible", Ed. Alhambra, Madrid.
- (56) WILLARD, M.H.; MERRITT, L.L.; JEAN J.A. (1974).- "Métodos instrumentales de análisis", 6ª ed.; Ed. C.E.C.S.A., Barcelona.
- (57) PASCUA, M. (1974).- "Metodología bioestadística" 2ª edic.; Ed. Paz Montalvo, Madrid.
- (58) ABAD IGLESIAS, R. (1977).- "Manual de estadística médica". Ed. Sección Científica de C.E.P.A., Madrid.
- (59) MILLER, LL.C.; TAINTER, M.L. (1944).- Stimulation of the DL_{50} -- and its error by means of logarithmic probit graph-paper". -- Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 57, 261.
- (60) WEPIERRE, J. (1977).- "Abrégé de pharmacodynamie générale". Ed. Masson, Paris.
- (61) TAYLOR, R.M.; TOPLISS, J.G. (1962).- "Essay of diuretics" J.-- Med. Pharm. Chem. 4, 312.
- (62) BURN, J. (1957).- "Prácticas de Farmacología" Ed. Acribia, Zaragoza.

- (63) TRAVERSO, J.J. (1962).- "Bioassay of diuretics in dog". J. Med Pharm. Chem. 5, 808.
- (64) FAUCON, J.G.M. (1980).- "Pharmacologie cardiovasculaire, pulmonaire et rénale". Ed. Doin, Paris.
- (65) MONTASTRUC, P.; MONTASTRUC, J.L. (1979).- "Comparative effects of isoprenaline, dopamine and angiotensin on drinking, diuresis and natriuresis in normal and diabetic insipidus dog". Arch. de Pharmacol. y Toxicol. 5, 73.
- (66) STREETEN, D.H.P. (1961).- "Symposium on the experimental pharmacology and clinical use of antidiuretics. Part. VII the -- spiro-lactones". Clin. Pharmacol. and Therap. 2, 359.
- (67) LIPSCHITZ, W.L.; HADIDIAN, Z.; KERACSAR, A. (1943).- "Bioassay of diuretics". J. Pharmacol. Exper. Therap. 79, 97.
- (68) BARESTEGUI ALMAGRO, C. (1976).- "Esquemas y prácticas de Farmacología". Ed. Espaxc, Barcelona.
- (69) ESPLUGUES, J.; MORCILLO, E. (1982).- "Desarrollo de nuevos fármacos II. Evolución en el laboratorio de ESPLUGUES, J. Farmacología General" Ed. Fundación Garcia Muñoz, Secc. Saber. Valencia.
- (70) ALCARAZ, M.J.; ESPLUGUES, J.; VILLAR, A. (1982).- "Activité -- pharmacodynamique de Sideritis mugronensis II. Action sur la -- pression artérielle: Etude sur organo isolé". Plant. Med. Phytother. 16 (2), 147.

- (71) LLENAS, J. (1985).- "Métodos experimentales utilizados en el farmacológico de la hipertensión". Rev. Farmacol Clin. - Ex. 2 (3), 157.
- (72) FOLKOW, B.U.G.; HALLBACK, M.I.L. (1977).- "Physiopathology of Spontaneous hipertensión in rats". En Genest J. Koiw, E. y Kuchel. O. (Eds) Hipertensión. Mc Graw-Hill. New York.
- (73) NEILL, J.R. (1983).- "Role of vasopressin in the control of arterial pressure". J. Physiol. Pharmacol 61, 1226.
- (74) YADEN, S.; PALMER, R.T.; ELKO, E.E.; LAL, H. (1985).- "Comparative activity of antihypertensive drugs as determined by the indirec measurement of blood pressure" Drug Develop. Res. 5,129.
- (75) PAGE, I.H.; MCCUBBIN, J.W. (1968).- "Renal Hypertension". - Year Book med. Publish. Inc., New York.
- (76) RUSHMER, R.F. (1976).- "Cardiovascular Dynamics". W.B. Saunders Co., London.
- (77) CARRETERO, O.A.; ROMERO, J.C. (1977).- "Production and characteristics of experimental hypertension in animals". En GENEST, J.; KOIW, E. y KUCHEL, O. (Eds). "Hypertension", -- McGraw-Hill, New York.