



*Universidad Central "Martha Abreu" De Las Villas  
Facultad de Química y Farmacia*

*Departamento de Farmacia*

*Tesis para optar por el Título de  
Licenciada en Ciencias Farmacéuticas*

*Comprobación de la actividad diurética de  
una flavona aislada del extracto acuoso  
de *Boldoa Purpurascens* (Nitro Blanco).*

*Diplomante: Yudeisy Martín Bernal*

*Tutores: Msc. Dulce M<sup>a</sup> González Mosquera*

*Lic. Yannaris Hernández Ortega*

*Asesora: Lic. Geydis Lorenzo Monteagudo*

*"Año de la Revolución Energética en Cuba"*

*Santa Clara, 2006*

*“Es cierto que muchas veces los grandes descubrimientos se han realizado sin buscarlos directamente, pero también es cierto que un espíritu no preparado es incapaz de detectar esa sorpresa de la naturaleza.”*

*Luís Franco Vera.*

---

---

**Dedicatoria.**

---

---

**Tantos han sido los momentos en que se han puesto a prueba natural estas personas, tantas las horas que me han dedicado y los sueños que de ellos herede que no puedo hoy, corresponderle con menos, sea para ustedes mi pedestal. Especialmente:**

**A mi madre,** que con su frase de “no pude” despertó en mi un deseo inquebrantable de ser lo que soñó, que con su esfuerzo, entereza, dedicación y entrega hizo que fuese menos difícil para mi llegar hasta este hermoso momento.

**A mi padre,** que ya no está, por hacerme entender lo importante de cultivarme como profesional y como ser humano, por demostrarme que mis sueños serían mis metas si me las proponía, por partir confiado de que iba a poder.

**A mi hermana,** por el orgullo con que habla de mi y por darle el ser a dos niños maravillosos que con su inocencia traviesa y su imaginación hacen mágicos mis fines de semana.

---

---

## **Agradecimientos.**

---

---

**Culmina aquí una etapa de mi vida en la que me forjo como algo más que profesional, a todos los que pusieron sus manos, muchas gracias:**

- A 'mima' por ser lo más grande que tengo, por darme tanto amor y cariño.
- A mi hermana, Jorge y Armando por su ayuda sin límites.
- A Lourdes y Guillermo por quererme como mis padres.
- A Alain por hacerme reír en los momentos de más tensión, por quererme.
- A mis tutoras Dulce y Yannarys quienes supieron combinar interés, constante apoyo y ternura durante la realización de este trabajo.
- A la Lcda. Geidis Lorenzo por su colaboración.
- Al Lic. Dany Siverio por dedicarme su tiempo, por ayudarme tanto.
- A la UTEX como unidad, a los trabajadores por las orientaciones y conocimientos brindados y en especial a mis amigos Belquis, Freisman y Luis.
- Al técnico del laboratorio clínico del Hospital Pediátrico José Luis Miranda, Nohema Viltre por su desinteresada ayuda.
- A Félix Iglesias trabajador de Higiene Provincial por su cooperación.
- A mi primo Xuri y a toda la familia que estuvo cuando la necesité.
- A Alejandro, Martha, Luis y Yenisel quienes me ofrecieron su ayuda de corazón.
- A Jorge Luis Calero, Marielys y Yudhit por escucharme, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por ser esos amigos grandes e incondicionales que recordare siempre.
- A mis amigos del barrio, mis compañeros de aula y profesores por ayudarme a crecer, por formar parte de esta historia que tantas veces contaré.

---

---

## Resumen:

---

---

***Boldoa purpurascens Cav.*** es una especie silvestre que crece en Latinoamérica y el Caribe; utilizada en varios países como diurética y para combatir las afecciones del tracto urinario, no existen estudios que validen sus usos tradicionales. Los compuestos fenólicos están en mayor proporción en la fracción bioactiva la cual presenta actividad diurética comparable con medicamentos de comprobada eficacia según trabajos anteriores. Del extracto acuoso de las hojas se logró aislar un flavonoide con grupo benzodioxalano el que pudiera estar relacionado con el efecto atribuido, en la investigación se comprobó su acción diurética, para ello se utilizaron ratas machos, Sprague Dawley con peso entre 160 y 220 gramos. La fase experimental se llevó a cabo

empleando la metodología descrita en el Drug Discover Pharmacological Assay, constituyéndose los grupos de prueba los cuales recibieron las dosis 100, 50, 25 12, 6, 3 mg/Kg de peso del producto y los controles, se determinó diuresis en 6 horas y la excreción de sodio, potasio y cloruro en orina y suero.

Los valores obtenidos en cada parámetro se procesaron por los test de Kruskal Wallis y Mann-Whitney U evidenciándose que el flavonoide tiene efecto diurético de elevada eficacia, al igual que el extracto acuoso de donde proviene. Se determinó que el producto evaluado provoca mayor volemia que la furosemida sin modificar la excreción de los iones, lo que permitió sugerir que pertenezca a un grupo de sustancias diuréticas llamadas acuaréticas descubiertas en el 2003, actuando por apertura de los canales de agua (**acuoporin**). La dosis (50mg/kg) del producto resultó ser menos expoliador de potasio que la furosemida lo que permitió concluir que pudiera ser más recomendable para pacientes con patologías renales y cardíacas a esta dosis.

---

---

# Índice

---

---

	Pág.
ÍNDICE	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
<b>I- REVISION BIBLIOGRAFICA</b>	<b>3</b>
1.1 - Nictagináceas. Generalidades botánicas de la familia.	3
1.2 Boldoa purpurascens Cav.ex Lag (Nitro Blanco).Generalidades botánicas de la especie.	3
1.3 Descripción botánica de la planta.	3
1.4 Aspectos relacionados con la planta.	4
1.4.1 Hábitat y distribución.	4
1.4.2 Partes de la planta empleadas.	4
1.4.3 Aplicaciones.	4
1.5 Composición química de la planta. Metabolitos. Actividad biológica.	4
1.6 Fitoterapia diurética.	5
1.6.1 Clasificación de las plantas con propiedades diuréticas.	7
1.6.2 Clasificación del Nitro como planta diurética	8
1.6.3 Posibles metabolitos responsables del efecto diurético.	8
1.7 Actividad biológica de la familia <i>Nyctaginaceae</i>	8
1.8 Flavonoides .Generalidades.	9
1.8.1 Interés terapéutico de los flavonoides.	9
1.8.2 Aspectos estructurales.	10
1.9 Aspectos relacionados con la determinación de iones.	11
1.10 Modelos farmacológicos.	13
1.11 Canales moleculares a través de la pared de la célula.	13
1.11.1 Canales de agua.	14
1.11.2 Osmosis.	14
1.11.3 Funcionamiento del canal de agua.	15
1.11.4 Importancia médica del canal.	15
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>17</b>
2.1 Fase experimental 1.	17
2.2 Fase experimental 2	22
2.3 Resumen de las fases experimentales.	22
<b>III. RESULTADOS Y DISCVUCION</b>	<b>24</b>
3.1 Análisis de los resultados obtenidos en orina.	25
3.2 Análisis de los resultados obtenidos en suero.	33
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>V. RECOMENDACIONES</b>	<b>38</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>39</b>
<b>VII. ANEXOS</b>	<b>43</b>

---

---

## Introducción.

---

En los últimos años el estudio de las plantas medicinales en nuestro país se ha incrementado, todo con el fin de ganar en conocimientos, lograr incluirlas en el Registro de Plantas Medicinales de Cuba así como ser utilizada en virtud de sus propiedades medicinales para tratar diversas afecciones.

La Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas específicamente el Departamento de Farmacia las incluye dentro de sus principales líneas de investigación, estudiándose en este momento tres plantas entre las cuales figura el Nitro Blanco o *Boldoa Purpurascens*.

El Nitro Blanco es una de las plantas reconocida por su efecto diurético y su utilidad en las enfermedades de las vías urinarias. Se ha determinado que su actividad diurética es producto de las sales inorgánicas, las saponinas y los flavonoides que contiene.<sup>[1]</sup>

En investigaciones anteriores se ha determinado de forma preliminar la presencia de taninos como metabolito de esta planta, se ha realizado la extracción de saponinas a partir de la droga cruda y del extracto liofilizado y se han analizado las fracciones obtenidas por diferentes métodos analíticos. En el año 1997 se comprobó la actividad diurética del extracto acuoso obtenido de las hojas comparándose con la furosemida, un diurético de alta eficacia y más tarde en el 2000 se le realizó un estudio fotoquímico y genotóxico al propio extracto. Posteriormente se avanzó en la investigación hasta aislar del mismo por cromatografía en columna y purificar por cristalización en metanol, un flavonoide, el 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosida, quien pudiera atribuirle a la planta su efecto diurético, partiendo de este producto la realización del siguiente trabajo se propone los siguientes objetivos:



**Objetivo General: -**

Evaluar la actividad diurética de una flavona aislada del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens Cav.*

**Objetivos Específicos: -**

1. Evaluar farmacológicamente el efecto diurético de 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-3-O-(1→2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosida a las dosis (100, 50, 25, 12, 6, y 3 mg/kg de peso) determinando los volúmenes de orina excretados en 6 horas.
2. Determinar las concentraciones de sodio, potasio y cloruro presentes en suero y orina en todos los grupos evaluados en el ensayo.

---

# CAPÍTULO 1.

---

## REVISION BIBLIOGRAFICA

### 1.1- Nyctaginaceae. Generalidades botánicas de la familia.

Nyctaginaceae: Familia de plantas dicotiledóneas, del orden de las centrospermales, herbáceas o leñosas, por lo común con hojas opuestas, flores en cimas umbeliformes o corimbiformes, brácteas en la base de las flores, libres o soldadas, a veces pétalo ideas, con frecuencia en involucreo caliciforme, cinco sépalos corolinos, soldados, con base persistente en la madurez, formando, alrededor del agujero, un antocarpo envolvente. La mayoría son americanas. El nombre de la familia es derivado de nyctago que denominó al hoy llamado Mirabilis.

### 1.2- *Boldoa purpurascens* Cav.ex Lag (nitro). Generalidades botánicas de la especie.

*Boldoa purpurascens* Cavanilles, es conocida vulgarmente en Cuba como Nitro blanco, Tostón o Rompe cálculos <sup>[2]</sup>. Fue descubierta por Cavanilles en América y depositada en el jardín botánico de Madrid en 1816 por Lagasca, un discípulo de Cavanilles, introducida en Cuba en 1842. A esta planta se le conocen tres sinonimias *Boldoa ovatifolia* Lag; *Cryptocarpus globosus* HBK y *Salpianthus purpurascens* Hook.& Arn. Es la única especie de su género.

### 1.3-Descripción botánica de la planta.

Nitro Blanco conocido científicamente como *Boldoa purpurascens* pertenece a la familia de las Nictagenaceas. Esta es una planta de uno a dos metros de altura, con tallo erecto, ramosa y las ramas delgadas, angulosas, lampiñas; las hojas son alternas, pecioladas, anchamente ovales, agudas, enteras, con la base subtruncada y decurrente en el peciolo, de color verde claro. Sus flores son verdosas, pequeñas sésiles, conglomeradas-racimosas. Cáliz fructífero, pubescente, cuatro dentados en el ápice. Estambres cuatro; hipoginos, libres.

Anteras biloculares, dídimas. Ovario ovoideo, sésil; estilo simple que se adelgaza insensiblemente hasta terminar el estigma aleznado, agudo. Aquenio comprimido, apiculado; embrión subanular, endospermo, carnosofarináceo. [2], [3]

#### **1.4- Aspectos relacionados con la planta.**

##### **1.4.1- Hábitat y distribución.**

El Nitro es una hierba o arbustillo silvestre que crece en terrenos de serpentina y calcáreos. Es abundante en las cercanías de La Habana, por Guanabacoa y también cerca de la costa de Marianao y Jaimanitas, se encuentra también en otros lugares del país, entre ellos la parte norte de Villa Clara. [4]. Se le puede encontrar en México, Venezuela, Nicaragua y Guatemala. [2], [3]

##### **1.4.2- Partes empleadas.**

Son empleadas las hojas y los renuevos con fines terapéuticos.

##### **1.4.3- Aplicaciones.**

El Nitro es considerado como un poderoso diurético, útil en las enfermedades de las vías urinarias. Se conoce que la actividad diurética del Nitro es similar a la furosemida. [5] Su eficacia es comparable con el Mastuerzo y la sal de nitro, a la que probablemente debe su nombre. [6] Es capaz de eliminar una orina abundante, diluida, y tiende a conservar los niveles normales de agua y sales en el medio interno. [7]

#### **1.5-Composición química de la planta. Metabolitos. Actividad biológica.**

Entre los metales presentes en la planta se encuentran el plomo, cadmio, hierro, cobre, cromo, magnesio, níquel, sodio, manganeso; estando en mayor proporción el potasio, aunque el sodio, magnesio y cadmio se hallan también en cantidades importantes. [8]

Según resultados obtenidos en el tamizaje fotoquímico podemos señalar que la planta presenta los siguientes metabolitos:

**-Flavonoides:** Posen potentes propiedades diuréticas semejantes a la furosemida, además tienen propiedades hipotensoras y son protectoras de la fragilidad capilar. <sup>[9]</sup>

**-Saponinas:** Tienen actividad tensoactiva, laxante, antibacteriana, hemolítica; dentro de sus propiedades más importantes se describe la actividad anticancerígena, inmunoestimulante y hepatoprotectora. <sup>[10] [11]</sup> Son detergentes naturales.

**-Triterpenos y Esteroides:** Presentan actividad antiespasmódica, antipirética, antitumoral y narcótica.

**-Mucílagos:** Son reguladores del tránsito intestinal, antidiarreicos, laxantes, anticoagulantes y antiinflamatorios.

**-Acidos grasos:** Son hipoglucemiantes fundamentalmente. <sup>[9] [12] [13] [14]</sup>

**-Fenoles y Taninos:** Astringentes, cicatrizantes y antisépticas. <sup>[15]</sup>

### **1.6-Terapia diurética**

Los diuréticos son drogas de gran utilidad en la terapéutica actual, se utilizan en varias enfermedades cardiovasculares, principalmente la hipertensión arterial, afecciones renales como en el síndrome nefrótico, en las alteraciones hepáticas que presentan ascitis, las hipercalemias y el glaucoma y otras que producen alteraciones en los compartimentos líquidos del organismo. <sup>[16]. [17]. [18]. [19]</sup>

Son fármacos que aumentan la tasa de flujo urinario, aun así, los que son útiles en clínica también incrementan la tasa de excreción de sodio (diuréticos

natriuréticos) y de un anión acompañante, por lo general el cloruro. En el organismo, el cloruro de sodio es el principal determinante del volumen de líquido extracelular, y casi todas las aplicaciones clínicas de los diuréticos se dirigen a reducir dicho volumen al disminuir el contenido corporal total de cloruro de sodio<sup>[16]</sup>.

Su objetivo fundamental es conseguir un balance negativo de agua; pero los diuréticos no actúan directamente sobre el agua sino a través del sodio o de la osmolaridad (diuréticos osmóticos).

Los diuréticos no sólo alteran la eliminación de sodio, sino que modifican la manipulación renal de otros cationes como el potasio, hidronio y magnesio y aniones como el cloruro, hidrogeno carbonato y ácido úrico; además, pueden alterar de manera indirecta la hemodinámica renal.<sup>[20]</sup>

La furosemida actúa en los segmentos diluyentes y provoca un rápido e intenso incremento en la eliminación urinaria de cloruro y sodio. Aumenta además, la eliminación de potasio porque incrementa la carga de sodio que llega al túbulo distal y el intercambio de potasio. La estimulación de renina produce también aumento de la actividad de la aldosterona, lo cual facilita la eliminación de potasio.<sup>[18], [21]</sup> Su biodisponibilidad es de un 50% por vía intravenosa y el comienzo de la acción es a los dos minutos. Esta ventaja es útil sólo en circunstancias muy urgentes.

Los diuréticos son capaces de provocar dilatación venosa y reducen la precarga. En tratamientos crónicos producen una ligera reducción de la presión arterial y pueden aumentar los niveles de ácido úrico y glucosa en sangre<sup>[18]</sup> Estos compuestos se absorben bien por vía oral y sus reacciones adversas se derivan de su propia acción diurética. Su incidencia y gravedad depende de la intensidad del tratamiento y de la enfermedad base del paciente<sup>[19]</sup>. Estos medicamentos se consideran de gran importancia por su amplia actividad terapéutica, son empleados como tratamiento de primera línea en pacientes con fallo cardíaco, excepto para aquellos con diabetes o gota. En la insuficiencia cardíaca, estos reducen la presión y el volumen diastólico ventricular, disminuyendo la ingestión.

Los compuestos potásicos son muy eficaces como diuréticos, incluso el efecto diurético de muchas plantas es atribuido a las sales de potásicas presentes en ellas <sup>[22]</sup>. Cuando la sangre tiene un nivel normal de potasio, este junto con el cloruro y el agua se filtra desde el plasma sanguíneo hasta el agua glomerular y luego se reabsorbe en los túbulos junto a la cantidad equivalente de cloruro y de agua, pero si los niveles de potasio en sangre son elevados, no ocurre la reabsorción de todos los iones presentes. El exceso de estos iones con el agua y la cantidad necesaria de iones cloruro del riñón aumentan el flujo urinario <sup>[23]</sup>.

Las sales potásicas se encuentran junto con otras sales como el cloruro amónico, nitrato de amónico y el cloruro de calcio dentro de los diuréticos catalogados como sales productoras de ácido o diuréticos acidificantes <sup>[23]</sup>. Los cationes de estas sales se absorben o metabolizan poco dejando un exceso de anion cloruro que se excreta junto con una cantidad equivalente de sodio y volumen de agua.

Los diuréticos de origen vegetal, se consideran como acuaréticos, diferenciándose en este sentido de la mayor parte de los quimiosintéticos, que sobretodo afectan la reabsorción de agua y cloruro de sodio a nivel de los túbulos y asa de Henle en la neurona <sup>[24]</sup>.

Son muchas las plantas con propiedades diuréticas, sin embargo, su mecanismo de acción no está bien definido como el de los diuréticos sintéticos. La evaluación del efecto diurético de drogas aún no se ha extendido. <sup>[25], [26], [27]</sup>.

### **1.6.1-Clasificación de las plantas con propiedades diuréticas**

De forma general, algunas plantas con propiedades diuréticas se clasifican desde el punto de vista químico en <sup>[28]</sup>:

- Drogas con saponósidos: Que poseen propiedades tensoactivas que conllevan a un aumento de la permeabilidad de la membrana filtrante glomerular acompañado de una congestión local.

- Drogas con flavonoides: Que afectan la permeabilidad de la membrana celular, al tiempo que inhiben a la fosfatasa renal, todo ello complementado por el efecto vasoprotector capilarotropo que mejora la microcirculación a nivel de todo el organismo.
- Drogas con bases xánticas: Son de especial interés en el edema cardíaco.
- Drogas con glúcidos: Algunos aumentan la diuresis por mecanismos osmóticos (manitol) y otros inhiben la reabsorción activa de  $\text{Na}^+$  en el túbulo proximal, actuando como natriurético.

### **1.6.2 Clasificación del Nitro como planta diurética.**

El Nitro Blanco se clasifica como una planta **Natriuréticas o diurética sódica** pues facilita principalmente la eliminación de iones sodio como  $\text{NaCl}$ . Es rica en iones potasio y se recomiendan en casos de hipertensión arterial, edemas y ataques cardíacos.

### **1.6.3 Posibles metabolitos responsables del efecto diurético.**

Haciendo un análisis de las monografías que aparecen en el Vademécum de Prescripción de Fitoterapia, de las 151 plantas reportadas con efecto diurético, los metabolitos que mas frecuentemente se consideran como responsables de este efecto son: flavonoides<sup>[22]</sup>, ácido chicorisico, ácidos y derivados fenólicos, sales de potasio<sup>[22]</sup>, alcaloides, mucílagos, cardenólidos, heterósidos y triterpenos.

De ellos, los flavonoides representan un 53%, las sales de potasio un 30.6%, las saponinas un 10.2%, los ácidos fenólicos un 8.2% y los esteroidales y taninos un 2%. Estos son los mismos metabolitos que se reportan como responsables de la acción diurética del Nitro.<sup>[15]</sup>

## **1.7 Actividad biológica de la familia *Nyctaginaceae*.**

La familia *Nyctaginaceae* posee alrededor de 30 géneros los cuales han sido poco estudiados desde el punto de vista químico, pero se conoce que dentro de los componentes más comunes están los flavonoides, saponinas, sales de potasio, taninos y otros <sup>[21]</sup>. La capacidad para provocar diuresis y disminuir edemas se informa para los flavonoides. <sup>[29]</sup>, <sup>[30]</sup> y sales de potasio en varias especies de *Nyctaginaceae*, se han referido los informes de la familia por ser *Boldoa purpurascens*, única especie dentro del género. Existen otros compuestos dentro de la familia que pueden ejercer diferentes acciones farmacológicas a continuación se describen algunos: triterpenos y esteroides, antiespasmódicos, antipiréticos, antitumorales, narcóticos y eméticos, fenoles y taninos, son astringentes, cicatrizantes y antisépticos, las saponinas se caracterizan por ser tensoactivas, laxantes, detergentes naturales, hemolíticas, anticancerígenas e inmunoestimulantes, ácidos grasos, hipolipimiantes. .

### **1.8 Flavonoides. Generalidades.**

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal y pueden estar presentes en todas las partes de la planta, tanto en los frutos y polen, las raíces e incluso hasta en el propio corazón de la madera <sup>[31]</sup>. Estos metabolitos junto a otros pigmentos han sido responsables de la explosión otoñal, del espectro del amarillo, rojo y naranja en el florecimiento de las plantas <sup>[32]</sup> y en general de la coloración, función que favorece la participación de estos compuestos como señales químicas. También juegan un valioso papel en la defensa de la planta frente a las radiaciones UV, bacterias, virus y animales herbívoros, además de participar en el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas <sup>[33]</sup>. Los flavonoides son el grupo más amplio de los fenoles naturales, conociéndose en la actualidad más de 2000 compuestos <sup>[34]</sup>.

#### **1.8.1 Interés terapéutico de los flavonoides.**

Los flavonoides se señalan como metabolitos capaces de disminuir la fragilidad capilar de los vasos sanguíneos ayudando y favoreciendo los procesos circulatorios del plasma a partir de una edad relativamente avanzada del



hombre. Otras estructuras se informan con propiedades hepatoprotectoras, preservando la función hepática frente a agentes tóxicos.

Por el carácter fenólico de sus estructuras, los flavonoides se han referido con un interesante efecto antimicrobiano de forma semejante a los antibióticos. Además, disminuyen la infiltración de leucocitos, inhiben la exudación proteica y tienen efecto sobre el sistema cardiovascular mostrando acciones antihipertensivas e hipolipidémicas, disminución del colesterol sérico, triglicéridos y B lipoproteínas acciones reportadas por investigadores como Syrov (1985), Swees (1985) y Andreeva (1987).

Otros efectos farmacológicos de los flavonoides son: la inhibición de la actividad plaquetaria y actividad antitrombótica en general, actividad antiinflamatoria y capacidad para inhibir fosfolipasas A<sub>2</sub>, inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo cual tiene importantes implicaciones en una potencial terapia de la aterosclerosis y de los trastornos cardiovasculares derivados de ella <sup>[31] [35]</sup>.

### **1.8.2 Aspectos estructurales.**

El término flavonoide se aplica a un grupo de compuestos que presentan un esqueleto carbonado C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, donde los agrupamientos de 6 carbonos corresponden a un anillo aromático. Estos anillos están unidos por una porción de tres miembros carbonados que pueden o no formar un tercer anillo; que de existir es llamado C <sup>[31] [36]</sup>.

En el núcleo general se pueden presentar sustituciones hidroxílicas en las posiciones 5, 7, 3' y 4'. Son precisamente estas sustituciones las que definen los diferentes grupos de flavonoides conocidos. Así tenemos antocianidinas, auronas, calconas, catequinas, dehidocalconas, flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, leucoantocianidina y neoflavonas. Siendo las flavonas y los flavonoles unos de los grupos más abundantes en el mundo vegetal <sup>[33]</sup>.

Cada unas de las clases pueden encontrarse en forma de glicósidos con uno o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos tres y/o siete. Esto le

confiere solubilidad en los compuestos polares o medianamente polares. Los azúcares más comunes son: glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa. Es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos [36].

### **1.9- Aspectos relacionados con la determinación de sodio, potasio y cloruro en fluidos biológicos.**

El espécimen para realizar el análisis de estos iones puede ser suero, plasma, sangre total, orina y otros líquidos corporales. En caso de utilizar plasma el anticoagulante a usar debe ser Heparina de litio, puesto que la Heparina sódica invalida la valoración del sodio. Con el objeto de evitar la salida de potasio de las células, éstas deben separarse del suero o plasma en las tres primeras horas de la extracción del espécimen. Las muestras hemolizadas deben rechazarse o cuando es imposible obtener otro se anota esta observación en el informe. El sodio y potasio son estables en por lo menos durante una semana en a temperatura ambiente o en refrigerador, y durante por lo menos un año en el congelador. El sodio y el potasio suelen cuantificarse simultáneamente por espectrometría de emisión o de llama o potenciometría con electrodos selectivos. Existen dos tipos generales de medidas con electrodos selectivos. Los sistemas potenciométricos directos miden la actividad iónica en un espécimen sin diluir, mientras que los sistemas indirectos miden la actividad iónica en un espécimen diluido. Dado que el sodio está disuelto predominantemente en el agua de la sangre y las medidas con electrodos selectivos determinan la actividad de un ion en la fracción de volumen de agua en la cual esta disuelto, las medidas directas no se afectan en situaciones de hiperproteinemia o hiperlipemia, que alteran dicha fracción del suero o plasma. Sin embargo las medidas indirectas son sensibles a las situaciones ya dichas dado que la dilución esta basada en volúmenes totales y, posteriormente ala dilución, el volumen acupado por las moléculas solubles del suero se vuelve insignificación con respecto al volumen total de diluyente. [37]

Para la determinación de sodio en muestras biológicas se han utilizado diferentes técnicas como: técnicas químicas, activación de neutrones, fotometría de llama, espectrofotometría de absorción atómica y electrodos con selectividad iónica. Los progresos obtenidos en la instrumentación de los fotómetros de llama han hecho que las técnicas químicas se hayan abandonado totalmente. [38]

La excreción normal en 24h de sodio por la orina es muy variable, dependiendo fundamentalmente de la dieta. Hay grandes variaciones diurnas, siendo por regla general la excreción mas baja durante el sueño, incluso del orden de 1/5 de la excreción máxima durante el día. [38]

En el caso del potasio algunas de las técnicas que se utilizan para su determinación son: procedimientos químicos, procedimiento de activación de neutrones, fotometría de llama. En general el potasio se determina juntamente con el sodio por fotometría de llama. [38] [39]

La excreción normal de este ion a lo largo de 24h depende en gran medida de la dieta, y puede variar desde aproximadamente 1 a 5 gramos (26-123mEq). [39]

La inmensa mayoría de las técnicas habitualmente utilizadas para la determinación de cloro recurren a una conjugación previa de este elemento con plata o mercurio para formar cloruro de plata o cloruro de mercurio no disociado.

La técnica más popular para la determinación de cloro en los líquidos orgánicos es la mercurimetría. En ella se titula el cloruro con una solución patrón de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$ , no disociado pero soluble. El punto final de la titulación viene detectado por la aparición de un color azul – violeta estable que reproduce cuando un exceso de  $\text{Hg}^{2+}$  forma un complejo con la difenilcarbazona o difenilcarbazida, que actúan como indicadores. [39]

Se ha efectuado también la determinación de cloro mediante electrometría, conductimetría y polarografía. Estos métodos utilizan los principios, bien establecidos, de la generación coulométrica de un titulante y de la indicación amperométrica del punto final. El procedimiento es en general simple, rápido, sensible y exacto. [39]

Por ultimo podemos mencionar otras técnicas, que aunque menos utilizadas, nos permiten determinar la concentración de este ion como son: técnicas de dilución isotópicas, que utilizan  $Cl_{36}$ ; fonometría de llama, para la determinación indirecta y absorción atómica. <sup>[38]</sup> <sup>[39]</sup>

### **1.10-Modelos farmacológicos.**

En la literatura se recomienda como método fundamental para corroborar la actividad diurética, el estudio de animales no anestesiados, en jaulas metabólicas (conejos, ratas, gatos, perros) determinándose en orina la concentración de electrolitos (sodio, potasio, cloruro y bicarbonato) y controlando la ingestión de líquido. Como métodos opcionales se recomiendan el estudio de diuresis en animales anestesiados, la perfusión renal en perros y la micropunción renal en ratas. <sup>[40]</sup>

### **1.11-Canales moleculares a través de la pared de la célula.**

Para mantener una presión constante en la célula es importante que el agua pase a través de la pared celular. La apariencia y la función de estos poros fue durante mucho tiempo uno de esos clásicos problemas de la Bioquímica sin resolver, hasta que en 1990, Peter Agre descubrió el primer canal de agua. Como todos los demás en la célula viva, este canal era todo proteína y las moléculas de agua no son sólo entidades que entran y salen de la célula. Para que miles de millones de células puedan funcionar como algo más que una masa, hace falta coordinación, de modo que la comunicación entre las células es necesaria. Las señales enviadas entre células se componen de iones o pequeñas moléculas que controlan todas nuestras funciones corporales. En 1998 Roderick MacKinnon mostró por primera vez qué canales de iones son parecidos al nivel atómico, un logro que junto con el descubrimiento de los canales de agua abrió nuevas áreas de estudio en bioquímica y biología. Las consecuencias médicas de los descubrimientos de Agre y MacKinnon son

también importantes pues un número de enfermedades pueden ser atribuidas al pobre funcionamiento del agua y de los canales de iones del cuerpo humano. Con la ayuda del conocimiento primordial sobre cómo son y cómo funcionan, ahora hay nuevas posibilidades para desarrollar nuevos fármacos más efectivos. [41].

### **1.11.1-Canales de agua.**

A mediados del siglo diecinueve se entendía que debían haber aberturas en la membrana de la célula que permitiese un flujo de agua y sales y ya hacia la mitad de 1950 se descubrió que se podía transportar rápidamente agua dentro y fuera de la célula a través de unos poros que sólo admiten moléculas de agua. Estas aperturas actúan como un tipo de filtro selectivo que previene que los iones pasen a través de la membrana mientras que las moléculas de agua, que no están cargadas, flotan libremente. Miles de millones de moléculas de agua por segundo pasan por un solo canal mecanismo molecular identificado en 1992. Se identificó qué proteína o proteínas formaban el canal real. A mediados de 1980 Peter Agre estudió varias proteínas de la membrana de las células de la sangre y descubrió una de éstas en un riñón. [41].

Se determinó tanto su secuencia peptídica como su correspondiente secuencia de DNA y se comprobó la hipótesis de Agre en un experimento sencillo donde se comparó las células que contenían la proteína en cuestión con las células que no la tenían. Cuando se colocaron las células en una solución con agua, las que tenían la proteína en sus membranas absorbían el agua por osmosis y se hinchaban mientras que las que no tenían la proteína no se veían afectadas en absoluto. También se hicieron pruebas con células artificiales, llamadas liposomas y se descubrió que estas se volvían permeables al agua si la proteína plantaba en sus membranas. [41].

### **1.11.2-Osmosis**

La presión líquida en las células de las plantas o animales se mantiene por osmosis. En la osmosis, las moléculas pequeñas (como el agua) pasan a través de una membrana semipermeable. Si la membrana no admite macromoléculas o sales que están en mayores concentraciones en un lado de la membrana, las moléculas pequeñas (agua) cruzan este lado, intentando “diluir” la sustancia que no puede pasar a través de la membrana. De manera que la subida en la presión osmótica es la razón por la que las células a menudo están hinchadas ó rígidas. Los iones de mercurio evitan que las células tomen o suelten agua con lo cual se demuestra que el transporte de agua a través de la nueva proteína descubierta por Agre, el canal de agua, era evitado de la misma manera por el mercurio. A la proteína que forma el canal de agua se le llamó aquaporin, “poro de agua”.<sup>[41]</sup>.

### **1.11.3-Funcionamiento del canal de agua.**

El aquaporin solo admite moléculas de agua y no otras moléculas ó iones, la membrana, por ejemplo, no tiene permitido filtrar protones. Esto es crucial porque la diferencia en la concentración de protones entre el interior y el exterior de la célula es la base del sistema de almacenamiento de energía celular. La selección es una propiedad central del canal.

Las moléculas de agua hacen su camino arrastrándose por el estrecho canal orientándose en el campo eléctrico local formado por los átomos de la pared del canal. Los protones (o mejor los iones de oxoniun,  $H_3O^+$ ) son parados por el camino y rechazados debido a su carga positiva.<sup>[41]</sup>.

### **1.11.4-Importancia médica del canal**

Durante los últimos diez años, los canales de agua han sido un campo de estudio muy común. Los aquaporines han demostrado ser una gran familia de proteínas y existen en bacterias, plantas y animales. En el cuerpo humano se han encontrado al menos once variantes diferentes. La función de estas

proteínas se ha trazado ahora en bacterias, animales y plantas, con un enfoque en su papel fisiológico.

En los humanos, los canales de agua tienen un papel importante en los riñones, entre otros órganos. El riñón es un aparato ingenioso para eliminar las sustancias de las que el cuerpo quiere deshacerse. Los llamados glomérulos, funcionan como un colador que permite que los iones y otras pequeñas moléculas dejen la sangre como orina “primaria”. En 24 horas se producen unos 170 litros de orina primaria, de la que la mayoría es reabsorbida con una serie de mecanismos artificiosos para que finalmente alrededor de un litro de orina al día abandone el cuerpo. De los glomérulos, la orina primaria pasa por un tubo donde el 70% del agua es reabsorbida de la sangre por el aquaporin AQP1. Al final del tubo, otro 10% del agua es reabsorbido con un aquaporin similar, AQP2. A partir de aquí, el sodio, potasio y los iones de cloruro también son reabsorbidos por la sangre. La hormona antidiurética (vasopresina) estimula el transporte del AQP2 a las membranas de las células en el tubo de las paredes y desde allí aumenta la reabsorción del agua de la orina. Las personas con deficiencia de esta hormona podrían ser afectadas por la enfermedad de la diabetes insípida con una producción diaria de orina de 10-15 litros.<sup>[41]</sup>

---

## CAPÍTULO 2.

---

### MATERIALES Y MÉTODOS

Para comprobar el efecto diurético de uno de los flavonoides aislados del extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens*, se desarrolla el test farmacológico descrito en el Drug Discover Pharmacological Assay <sup>[43]</sup>

El test de diuresis y la cuantificación de iones en orina y suero fue realizado de febrero a marzo del 2006. El test se desarrolló en la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX) perteneciente al Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara (ISCM) específicamente en el cubículo de experimentación animal del área Biológica del centro. Dicho cubículo presenta cobertura lavable (pintura epóxica) en las paredes, con rodapiés sanitarios, condiciones climatizadas por aire acondicionado centralizado con filtro HEPA, controles de humedad y controles para los ciclos luz-oscuridad. Fueron utilizados ratas machos de la línea Spray Dawly de 10 -12 semanas de edad, con un rango de peso promedio entre 160 y 220g procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Todas las ratas tenían un certificado de calidad que garantizaba la salud de las mismas así como que se encontraban aptas para efectuar este tipo de ensayo. Las mismas se aclimataron 5 días antes de iniciar el ensayo, para adaptarlas a las condiciones del laboratorio suministrándose el agua y comida *ad libitum*.

#### 2.1 Fase experimental 1

En la primera etapa experimental partiendo de estudios previos realizados al extracto acuoso de la planta *Boldoa purpuracens*, fueron aplicadas diferentes dosis del flavonoide aislado, según lo descrito en la técnica, para ello se utilizó un total de 34 animales los cuales se dividieron en 5 grupos, dos grupos de 8 animales y tres de 6 animales cada uno, los cuales permanecieron en ayuno (agua y comida) 18 horas antes de la administración en cajas T-4(Techniplast) con fondo de rejilla. A un primer grupo considerado grupo control negativo se le



administró cloruro de sodio al 0.9% según el Método de Lipzhiac y Col, a un segundo grupo o control positivo se le administró la Furosemida (20 mg/Kg de peso), mientras que los 3 grupos restantes recibieron el producto de estudio en dosis únicas de 100, 50, y 25 mg/kg de peso respectivamente (vía oral) en un volumen de 40 mL/Kg. de peso y valiéndose de una cánula intragástrica.

A continuación se detallan:

Grupo tratamiento:

**I** Control (-) Se administró cloruro de sodio 0,9 % por vía oral, en un volumen de 40 mL/Kg de peso.

**II** Control (+) Se administró la Furosemida (20 mg/Kg de peso) por vía oral, en un volumen de 40 mL/kg de peso.

**III** (100 mg/Kg de peso) se administró la solución de flavona obtenida en un volumen de 40 mL/Kg. de peso.

**IV** (50 mg/Kg de peso) Se administró solución de flavona obtenida en un volumen de 40mL/Kg. de peso

**V** (25 mg/Kg de peso) Se administró solución de flavona obtenida en un volumen de 40mL/Kg. de peso

Luego de cada administración las ratas fueron colocadas en cajas metabólicas individuales y se fue anotando el volumen de orina cada una hora durante seis horas, se colectó la orina en tubos graduados que contenían 2 gotas de parafina líquida para prevenir la evaporación. No fue necesario seguir la excreción durante 24 horas como en estudios previos pues el tiempo de vida media de la furosemida es de 6 horas,

El volumen total de orina fue colectado en frascos de 10 mL y congelados para su mejor conservación y posterior cuantificación de los iones sodio, potasio y cloruro en dicho espécimen. Una vez registrado el volumen total de orina los animales fueron sedados con éter dietílico, se canalizó la aorta abdominal y se extrajo 5 mL de sangre la cual fue centrifugada durante 10 minutos a 3000 rpm en centrífuga Tehnica modelo LC-500C, y se separó el suero con el objetivo de

cuantificar estos iones en dicho fluido. La cristalería empleada (tubos para centrífuga y frascos de envase de 10 mL) fue lavada con detergente y abundante agua común, descontaminada con ácido nítrico concentrado y posteriormente lavada diez veces con agua destilada y luego con agua desionizada asegurando con ello que no se obtuvieran datos alterados en los ionogramas, una vez terminado el proceso de lavado fue secada y esterilizada en estufa (MLW WSU 100 GDR) a una temperatura de 115 °C con aire recirculado. El producto de prueba fue preparado diariamente aprovechando su solubilidad en agua a 40°C, reposando 30 minutos antes de cada administración.

La determinación de las concentraciones de iones sodio y potasio en orina se realizó en el laboratorio clínico del Departamento de Pruebas Renales en el Hospital Pediátrico José Luis Miranda en la ciudad de Santa Clara, utilizando un fotómetro de llama (Corning 400) y la determinación de cloruro se realizó en el Laboratorio Clínico de Higiene Provincial de Villa Clara, para ello se emplearon pipetas Espendorf de diferentes longitudes de honda ( $\lambda$ ), tubos de ensayos y matraces volumétricos de 25 mL. En todos los casos se siguieron las técnicas empleadas por estos laboratorios y que a continuación se describen:

#### Determinación de sodio.

- Homogenizar y medir diuresis.
- Centrifugar 10 mL de orina.
- Realizar dilución 1:10

Tomar 5 mL de agua para inyección, sacar 50  $\mu$ L y agregar 50  $\mu$ L de orina.

- Leer en el fotómetro de llama con el filtro correspondiente al sodio.

Cálculos:

$$1. \quad Diuresis(L) = \frac{Diuresis(mL)}{1000}$$

Multiplicar el resultado de las lecturas del equipo por la diuresis en litro para obtener cantidad de sodio en mili equivalentes por litro (mEq/L).

Determinación de potasio.

- Homogeneizar y medir diuresis.
- Centrifugar 10cc de orina.
- Realizar dilución 1:10.

Se toman 9cc de agua para inyección y 1cc de orina.

- Realizar dilución 1:100

Tomar 5cc de agua para inyección, extraer 50 µL de la dilución anterior

- Leer en el fotómetro de llama con el filtro para potasio y buscar en la curva de calibración.

Cálculos.

Se calcula la diuresis en litro de igual forma que para sodio, la cual se debe multiplicar por la lectura del equipo y obtenemos la concentración de iones potasio presentes en orina en mili equivalentes por litro (mEq/L).

Antes de comenzar las lecturas de las muestras se calibró el equipo utilizando agua destilada y una solución estándar.

Preparación de la solución estándar:

1. Preparación de la Matriz de Sodio (43.48 meq/L).

Cloruro de Sodio anhidro desecado.....2.5 g  
Agua desionizada esp.....1000 ml

2. Preparación de la matriz de potasio (25.6 meq/L)

Sulfato de Potasio, anhidro desecado.....2.23g  
Agua desionizada esp.....1000 ml.

### 3. Solución estándar Sodio y Potasio

Concentración de Sodio (1.74 meq/L)

Concentración de Potasio (0.256 meq/L)

Matriz de sodio.....40 mL

Matriz de potasio.....10mL

Agua desionizada..... 1000 mL

#### Determinación de cloruro

Con el objetivo de determinar las concentraciones de cloruro en orina, se aplicó el método de Shales, O.and Charles, S.S. El cual plantea que el cloruro presente en el espécimen se titula con una solución de nitrato de mercurio en presencia de difenilcarbazona como indicador. El punto final de la valoración se aprecia por la aparición de una coloración azul- violeta estable. La técnica de análisis es la siguiente:

- Pipetear en tubos de ensayo o en frascos de fondo plano 0.2 mL de orina y 0.8mLde agua desionizada.
- Añadir 1mL de ácido nítrico 0.01 mol/L normal.
- Adicionar 4 ó 5 gotas de difenilcarbazona y agitar durante 2 minutos.
- Titular con el Nitrato de Mercurio 0.3% hasta la aparición de una coloración azul-violeta estable.
- Repetir estos pasos pero usando 2 mL de solución de cloruro de sodio al 0.058% y agua desionizada. Este paso debe efectuarse diariamente y cuando cambie el analista.

El análisis de este resultado se realizó en mEq/6h. Para esto fue preciso determinar mEq/L.

$$mEq / L = decC \cdot factor$$

decC: décimas consumidas de agente valorante.

$$mEq/6h = \frac{mEq/L \cdot Diuresis}{1000}$$

Para las determinaciones de los iones en suero, se procedió según se describe:

Se coloca la muestra en un capilar y esta se inyecta al gasómetro (OMNI C) para realizar las lecturas de sodio, potasio y cloruro. Las muestras fueron trasladadas diariamente al laboratorio clínico donde se hicieron dichas determinaciones. La duración de esta primera etapa experimental fue de 16 días (5 de aclimatación, 5 de prueba y 6 días de determinaciones).

## **2.2. Fase experimental 2**

En esta etapa fueron utilizados 18 animales con los cuales se probó tres nuevas dosis (12, 6, 3 mg/kg) del producto en estudio con vistas a cubrir un rango más amplio de dosis, encontrar dosis mínima efectiva así como obtener la relación dosis-efecto. Previo a la administración los animales se mantuvieron de igual forma 18 horas en ayuno en cajas T-4 (Techniplast). Para esta prueba se crearon tres grupos de tratamiento con 6 ratas cada uno según se describe:

### Grupos de tratamientos

- I. (12 mg/Kg) se le administró solución de flavona obtenida, en un volumen de 40mL/Kg. de peso.
- II. (6 mg/Kg) se le administró solución de flavona obtenida, volumen de 40mL/Kg. de peso.
- III. (3 mg/Kg) Se administró solución de flavona obtenida, volumen de 40mL/Kg. de peso.

De igual forma que en la primera fase, las ratas fueron colocadas en cajas metabólicas individuales, la orina fue colectada cada una hora durante las seis horas de duración del estudio, almacenadas en frascos de 10mL y refrigeradas a -20 °C. Posteriormente las ratas fueron sedadas y 5 mL de sangre fueron extraídos para la obtención del suero. Las concentraciones de los electrolitos en suero y orina fueron determinadas utilizando las técnicas descritas anteriormente.

### **2.3. Resumen de las fases experimentales**

1. Ayuno de agua y comida en cajas T-4(Techniplast) con fondo de rejilla, durante 18 horas antes de cada administración.
2. Pesar en balanza técnica (OWA Labor) los animales antes de cada administración para garantizar una correcta dosificación.
3. Administración por vía oral, empleando cánula intragástrica, evitando alteración de las ratas que pudiera ocasionar broncoaspiración.
4. Colocar cada animal en cajas metabólicas individuales al finalizar la administración.
5. Colectar el volumen de orina cada una hora durante 6 horas en tubos graduados.
6. Anotar el volumen de orina colectado en cada hora y el volumen final (diuresis 6 horas).
7. Almacenar la orina en frascos de envase de 10 mL y refrigerar.
8. Sedar las ratas, canalizar la aorta abdominal y extraer 5 mL de sangre.
9. Centrifugar la sangre 10 minutos a 3000 rpm, obtener el suero y almacenar.
10. Determinar concentración de sodio y potasio en el fotómetro de llama (Corning 400).
11. Determinar concentración de cloruro por titulación con nitrato de mercurio.
12. Determinar concentración de estos electrólitos en suero por gasometría.

Todos los datos obtenidos fueron procesados en el paquete estadístico SPSS, donde se le aplicaron los test de Kruskal – Wallis y Mann Whitney U. Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para cada uno de los parámetros medidos.

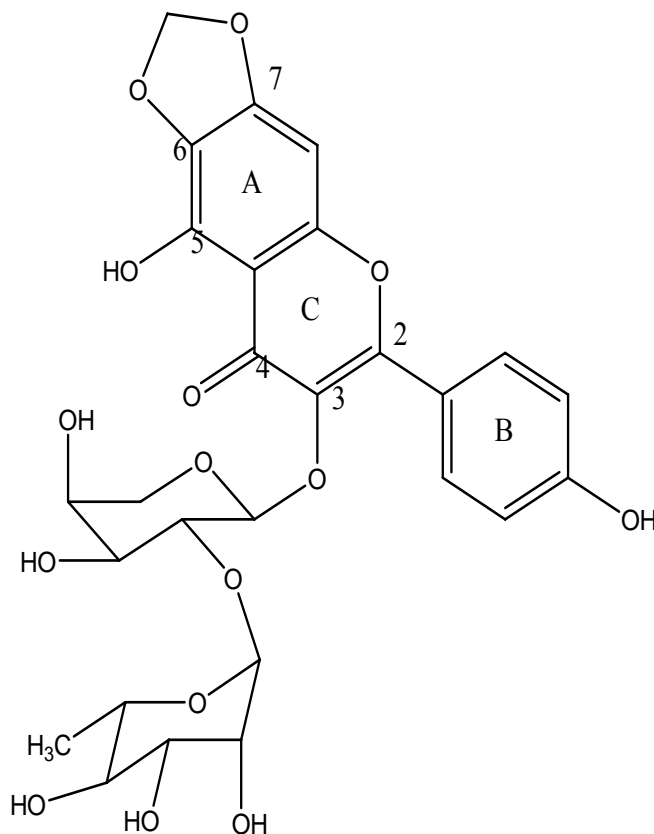
---

## CAPÍTULO 3.

---

### RESULTADOS Y DISCUCION

En la investigación se desarrolló un estudio farmacológico con vistas a comprobar la posible contribución del 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosida al efecto diurético del extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascen*, Cav atribuido por la medicina tradicional. El producto evaluado fue un flavonoide nunca antes conocido, con grupo metilendioxi, de color amarillo, aislado por cromatografía en columna y purificado por cristalización en metanol, se caracterizó espectroscópicamente y se propuso la estructura química siguiente:



**4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosida** <sup>[42]</sup>

Una vez preparadas las soluciones del control positivo, control negativo y el producto a evaluar, se procedió a la administración vía oral de estas en un volumen de 40 mL/Kg de peso como se describe en el epígrafe 2.1. Las ratas se colocaron en cajas metabólicas individuales y el volumen de orina excretada fue medido cada 1h durante las 6 h de estudio. El volumen total de orina excretado durante este tiempo y el suero fueron almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la posterior cuantificación de los electrolitos, sodio, potasio y cloruro en estos especímenes.

Los datos obtenidos para el control negativo, furosemida y todas las dosis del producto evaluadas en cuanto a volumen de orina, mEq de sodio, potasio y cloruro en orina excretada y suero aparecen informadas en el anexo 1.

### **3.1. Análisis de los resultados obtenidos en orina.**

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico SPSS. Del mismo se aplicaron técnicas no paramétricas pues los valores obtenidos no permitían emplear modelos de clasificación simple. Se calcularon además las medias y las desviaciones estándar para cada uno de los parámetros medidos durante el estudio.

Como resultado de la aplicación del test de Kruskal Wallis se obtuvieron los datos que se exponen en el anexo 2. Se pudo conocer que existían diferencias altamente significativas para los valores de, volumen de orina, excreción de potasio y cloruro en este espécimen así como significativa para la concentración de sodio entre todos los grupos analizados (control negativo, control positivo y las dosis del producto en estudio).

Para conocer entre que grupos, específicamente estuvieron dadas las diferencias, se aplicó el Test de Mann-Whitney U. Se trabajó con un nivel de confianza de 95 % cuya probabilidad es  $P < 0,05$  y los grupos para comparar son:

Grupo 1 D= (100 mg/Kg. de peso)

Grupo 2 D= (50 mg/Kg. de peso)



Grupo 3 D= (25 mg/Kg. de peso)

Grupo 4 D= (12 mg/Kg. de peso)

Grupo 5 D= (6 mg/Kg. de peso)

Grupo 6 D= (3 mg/Kg. de peso)

Grupo 7 Control negativo (cloruro de sodio al 0.9%)

Grupo 8 Control positivo o Furosemida (20mg/Kg. de peso).

Los resultados de este test para las determinaciones en orina comparando control negativo con las diferentes dosis del producto ensayado, se muestran en la tabla 3.1 La interpretación de esta tabla permite determinar entre que grupos estuvieron dadas las diferencias en los parámetros evaluados.

**Tabla 3.1: Valores de probabilidad (p) de los diferentes parámetros en orina para el control negativo y las diferentes dosis del flavonoide.**

<b>Grupos</b>	<b>V. orina mL</b>	<b>Na<sup>+</sup> (meq/6h)</b>	<b>K<sup>+</sup> (meq/6h)</b>	<b>Cl<sup>-</sup> (meq/6h)</b>
	<b>(p)</b>	<b>(p)</b>	<b>(p)</b>	<b>(p)</b>
7 y 1	0,001	0,001	0,020	0,001
7 y 2	0,001	0,001	<b>0,081</b>	0,001
7 y 3	0,001	0,008	0,043	0,001
7 y 4	0,001	0,003	0,0005	0,001
7 y 5	0,001	0,001	0,003	0,001
7 y 6	0,001	0,001	0,043	0,001

Entre el grupo control negativo (7) y los diferentes grupos donde se probaron las dosis del producto en estudio (1, 2, 3, 4, 5, y 6), referidas en el epígrafe 2.1, se encontraron diferencias significativas en cuanto a todos los parámetros medidos, volumen de orina, excreción de sodio, cloruro y potasio puesto que la probabilidad fue menor que 0,05, excepto en el grupo 2 (dosis 50 mg/Kg. de peso) donde no hay diferencia en la excreción urinaria del potasio de este grupo comparado con el control negativo, lo cual permitió valorar la posibilidad de

utilizar este producto a esta dosis, como una alternativa para aquellos pacientes con insuficiencia cardíaca que presentan tratamiento con digitálicos, lo que evitaría la intoxicación digitálica.

Cuando se analizaron los valores de las medias y desviaciones estándar para cada uno de los parámetros analizados en los diferentes grupos sometidos a estudio (tabla 3.2 y figura 3.1) se observó que los mayores valores corresponden a los grupos donde se administró el flavonoide, en cuanto a la diuresis en las 6 horas lo que permitió demostrar la acción diurética que provoca este producto en los animales de experimentación, pues uno de los efectos de los fármacos diuréticos es el aumento del volumen de orina excretado como ocurre en este caso.

**Tabla 3.2: Relación de los valores de media ( $\bar{X}$ ) y desviación estándar (SD) de cada parámetro, para los diferentes grupos.**

Grupos	V. orina ml	Na <sup>+</sup> (meq/6h)	K <sup>+</sup> (meq/6h)	Cl <sup>-</sup> (meq/6h)
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
<b>Control (-)</b>	2,90± 0,65	0,08 ± 0,017	0,02 ± 0,009	0,33 ± 0,083
<b>Furosemida</b>	6,42 ± 1,715	0,52± 0,256	0,04 ± 0,017	0,92 ± 0,265
<b>D1=100mg/kg</b>	7,66 ± 1,517	0,13 ± 0,019	0,03 ± 0,009	0,06 ± 0,024
<b>D2=50mg/kg</b>	8,58 ± 0,744	0,13 ± 0,016	0,02 ± 0,002	0,05 ± 0,013
<b>D3=25mg/kg</b>	7,73± 0,688	0,11 ± 0,022	0,03 ± 0,009	0,08 ± 0,041
<b>D4=12mg/kg</b>	8,90 ± 0,529	0,12 ± 0,012	0,03± 0,002	0,08 ± 0,035
<b>D5=6mg/kg</b>	9,65 ± 0,861	0,14 ± 0,021	0,03 ± 0,004	0,10 ± 0,043
<b>D6=3mg/kg</b>	9,03 ±0,776	0,14 ± 0,028	0,04 ± 0,017	0,05 ± 0,009

La figura 3.1 muestra el comportamiento de la diuresis durante el tiempo al que fueron sometidos los animales de experimentación en este ensayo, en la misma se aprecia el incremento del volumen de orina a medida que se avanza en el tiempo para todos los grupos, alcanzándose en todos los casos la mayor excreción a las seis horas para el producto en estudio.

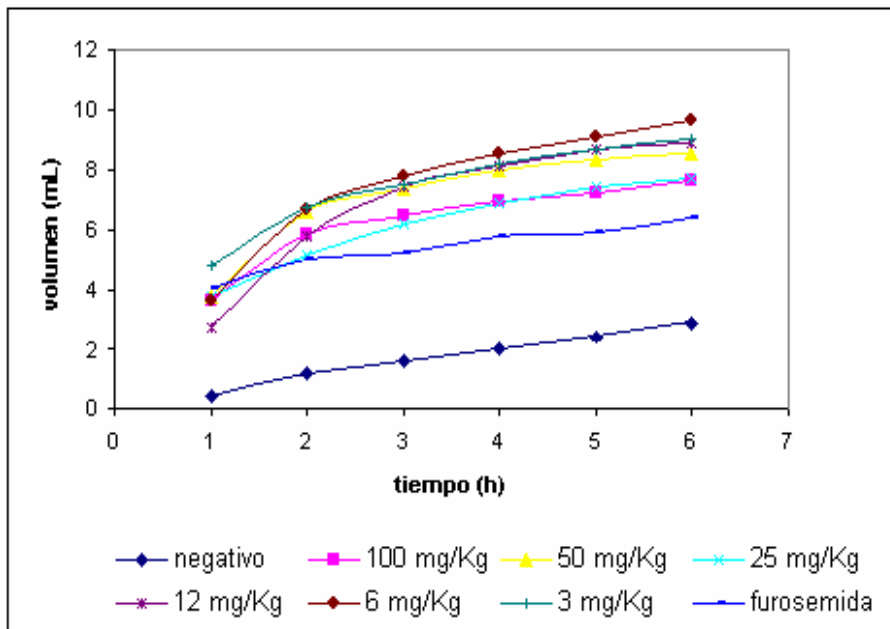


Figura 3.1: Relación del volumen de orina excretado en el tiempo.

Al analizar las concentraciones de los electrolitos (tabla 3.2) se observó que los mayores valores de sodio y potasio corresponden a los grupos prueba (excepto en el grupo 2 dosis de 50 mg/kg de peso para el cual se reportó la menor excreción de potasio) con lo cual se demostraba también la acción diurética del producto, capaz de modificar algunos iones en el organismo de estos animales. En el caso del cloruro la menor excreción le correspondió a las diferentes dosis del producto siendo este mayor para el control negativo, lo cual estuvo dado por la administración de solución salina al 0,9 %. Este resultado fue coincidente con

el obtenido al evaluar como diurético en estudios anteriores, el extracto acuoso de las hojas de la planta del cual se aisló el producto en estudio.<sup>[14]</sup>

**Tabla 3.3: Valores de probabilidad (p) de los diferentes parámetros en orina para el control positivo y las diferentes dosis del producto de ensayo.**

<b>Grupos</b>	<b>V. orina mL (p)</b>	<b>Na<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>K<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>Cl<sup>-</sup> (meq/6h) (p)</b>
8 y 1	<b>0,181</b>	0,001	0,345	0,001
8 y 2	0,013	0,001	<b>0,029</b>	0,001
8 y 3	0,014	0,001	0,181	0,001
8 y 4	0,008	0,001	0,142	0,001
8 y 5	0,003	0,001	0,142	0,001
8 y 6	0,008	0,001	0,755	0,001

La tabla 3.3 muestra los resultados de la comparación de las diferentes dosis de la flavona administrada con la furosemida (8) se observó que no existen diferencias en el volumen de orina excretado para la dosis de 100 mg/Kg. de peso (1), esto demuestra que la eficacia del producto aparece a valores menores que esta dosis, significativa para dosis de 50 mg/Kg. de peso(2) y 25 mg/Kg. de peso (3) y muy significativas para las restantes dosis, siendo mayores los volúmenes de orina en el producto evaluado (tabla 3.2), por tanto se puede afirmar la eficacia del 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosida como diurético. A partir de la dosis 12 mg/kg de peso se aprecian las mayores volemias con lo cual se demuestra la potencia de este flavonoide a dosis pequeñas.

Se analizó el comportamiento del sodio y cloruro y se encontraron diferencias muy significativas. Se pudo observar que la menor excreción de estos

electrolitos (figura 3.2 y 3.3) fue para las dosis ensayadas de la flavona de forma contradictoria al volumen de orina excretado, por cuanto sugerimos que el compuesto pueda pertenecer a un nuevo grupo de sustancias diuréticas llamadas acuaréticas, las cuales actúan por la apertura de los canales de agua, mecanismo descubierto en 2003 (**acuoporin**) <sup>[41]</sup>. Aunque no se descarta la utilización de otro mecanismo de acción al unísono.

Para la excreción de potasio no existen diferencias con significación desde el punto de vista estadístico excepto en la dosis 50 mg/Kg. de peso (2) para la cual se obtuvieron las menores concentraciones de este electrolito en todos los grupos comparados con la furosemida (figura 3.4).

El hecho de que al menos una dosis de la flavona logró ser menos expoliador de potasio que el diurético de elevada eficacia permitió concluir que pudiera ser más recomendable a esta dosis para pacientes con insuficiencia cardíaca que presenten tratamientos con digitálicos, sin temor a una intoxicación de este tipo cuya causa principal es la pérdida del ion por la administración concomitante de diuréticos en el tratamiento de dicha patología. Se considera que puede valorarse el uso de este producto en las restantes dosis en la terapia de Hiperpotasemia en pacientes con insuficiencia renal donde el diurético más empleado es la furosemida.

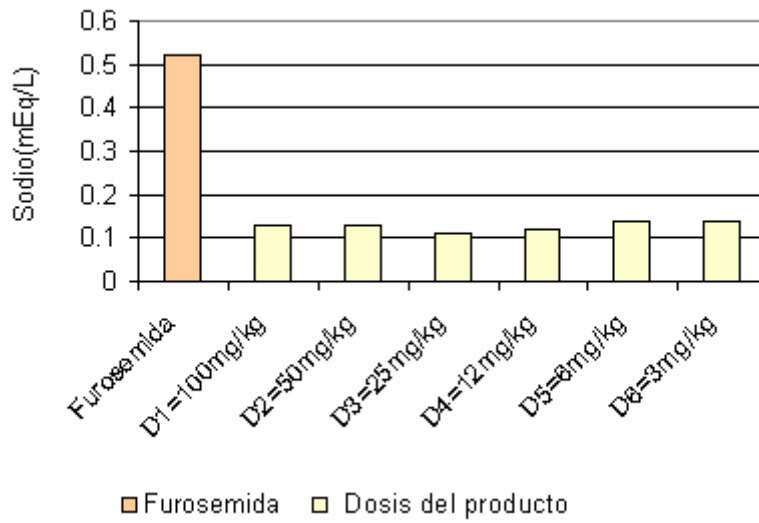


Figura 3.2 Relación de mEq /L de sodio en seis horas.

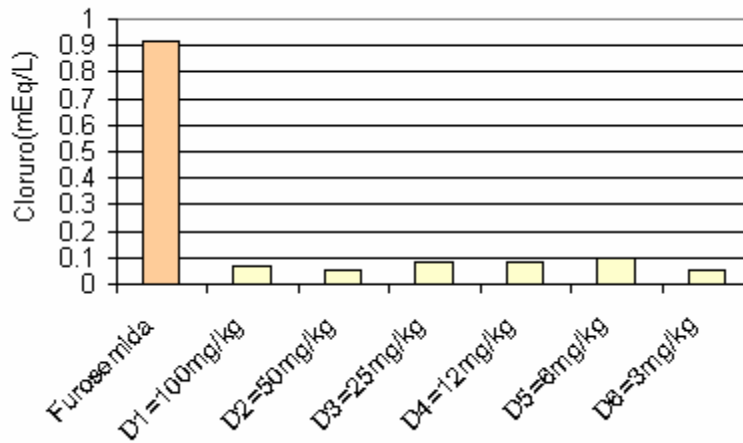


Figura 3.3 Relación de mEq /L de cloruro en seis horas.

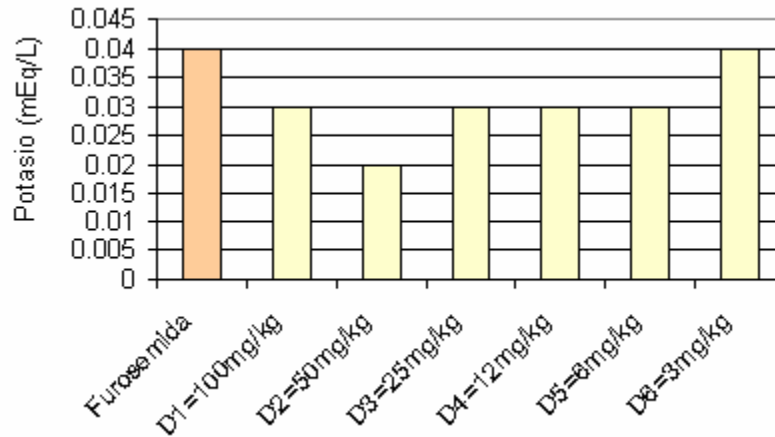


Figura 3.4 Relación de mEq /L de potasio en seis horas.

El comportamiento de la furosemida nos permitió garantizar de cierta forma un control de la calidad del estudio ya que el comportamiento de este fármaco se corresponde con lo reportado en la literatura <sup>[44], [45], [46]</sup>.

Al comparar la dosis de 100 mg/kg.de peso (1) con las restantes dosis utilizando el mismo test se obtuvieron los resultados que se exponen en la tabla 3.4

**Tabla 3.4 Valores de probabilidad (p) de los diferentes parámetros en orina para la dosis de 100 mg/kg y las restantes dosis ensayadas.**

<b>Grupos</b>	<b>V. orina mL (p)</b>	<b>Na<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>K<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>Cl<sup>-</sup> (meq/6h) (p)</b>
1 y 2	0,180	0,818	<b>0,002</b>	0,394
1 y 3	0,818	0,180	0,589	0,589
1 y 4	0,065	0,394	0,937	0,394
1 y 5	<b>0,026</b>	0,589	1,00	0,310
1 y 6	<b>0,035</b>	0,818	0,310	0,132

Los valores de probabilidad muestran que al comparar la primera dosis ensayada (D=100 mg/ Kg. de peso) con las restantes no hay diferencias significativas en los parámetros medidos dígase volumen de orina y las concentraciones de los electrolitos en este espécimen, excepto cuando se comparó con la dosis 6 mg/kg. de peso (5) y 3 mg/Kg. de peso (6) donde se obtuvo una diferencia significativa en el volumen de orina. Se vio que las mayores diuresis se corresponden con las dosis más pequeñas lo cual sugiere que el producto evaluado presentó elevada potencia a esta dosis con respecto a las demás pudiendo estar actuando como un posible acuarético<sup>[41]</sup>.

Resultados muy similares se obtuvieron en las restantes comparaciones para los diferentes grupos (anexo 3), o sea no hay diferencias significativas para las concentraciones de sodio y cloruro excretadas en la administración de las dosis propuestas en el estudio, de igual forma ocurrió para los volúmenes de orina excepto para las dosis más pequeñas donde se observaron las mayores volemias.

### **3.2 Análisis de los resultados obtenidos en suero.**

Como resultado de la aplicación del test de Kruskal Wallis para los datos obtenidos en suero (anexo 2) se obtuvo que hay diferencias muy significativas en todos los grupos analizados para los valores de sodio cuantificado, significativo para el cloruro y no significativo para el potasio.

Al analizar la tabla 3.5 podemos observar que para los valores del potasio en los grupos analizados en el estudio se obtienen resultados de medias muy similares entre sí. Estos resultados son diferente a los obtenidos en orina, lo cual pueden explicarse por el hecho de que el potasio es un ion fundamentalmente intracelular y al producirse una pérdida masiva de este ion extracelular, el potasio intracelular puede salir normalmente de las células para mantener su concentración sérica.<sup>[47]</sup>



**Tabla 3.5. Relación de los valores de media ( $\bar{X}$ ) y desviación estándar (SD) de cada parámetro, para los diferentes grupos**

<i>Grupos</i>	$\text{Na}^+$ (meq/6h)	$\text{K}^+$ (meq/6h)	$\text{Cl}^-$ (meq/6h)
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$
<b>Control (-)</b>	141,7± 3,22	7,45 ± 0,92	103,5 ± 1,57
<b>Furosemid a</b>	147,2 ± 2,03	6,71 ± 0,71	101,8± 0,83
<b>D1=100mg /kg.</b>	141,1 ± 0,3	7,00 ± 0,29	103,7 ± 0,15
<b>D2=50mg/ kg.</b>	140,4 ± 1,42	7,21 ± 0,65	103,7 ± 0,15
<b>D3=25mg/ kg.</b>	139,0 ± 0,92	6,95 ± 0,32	103,0 ± 0,85
<b>D4=12mg/ kg.</b>	140,0 ± 1,41	7,20 ± 1,04	104,4 ± 0,85
<b>D5=6mg/k g.</b>	139,0 ± 1,23	7,60 ± 0,95	103,5 ± 1,08
<b>D6=3mg/k g.</b>	143,4 ± 3,63	6,83 ± 0,88	102,8 ± 2, 4

conocer entre que grupos, específicamente estuvieron dadas las diferencias, se aplicó al igual que para orina el Test de Mann-Whitney. Los resultados de este test comparando el control negativo con las dosis ensayadas aparecen reportados en la tabla 3.6. En ella se muestra que no existen diferencias significativas al comparar las concentraciones de sodio y cloruro en suero.

Al comparar la furosemida con las dosis del producto ensayadas, encontramos que existen diferencias significativas para los valores de sodio y cloruro (tabla 3.7)

**Tabla 3.6: Valores de probabilidad (p) de los parámetros en suero para el control negativo y las diferentes dosis del flavonoide.**

<b>Grupos</b>	<b>Na<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>Cl<sup>-</sup> (meq/6h) (p)</b>
7 y 1	0,517	0,833
7 y 2	0,628	0,833
7 y 3	0,514	0,234
7 y 4	0,445	0,234
7 y 5	0,055	0,945
7 y 6	0,295	0,366

**Tabla 3.7. Valores de probabilidad (p) de los parámetros en suero para el control positivo y las diferentes dosis del flavonoide.**

<b>Grupos</b>	<b>Na<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>Cl<sup>-</sup> (meq/6h) (p)</b>
8 y 1	0,011	0,017
8 y 2	0,029	0,017
8 y 3	0,018	0,022
8 y 4	0,024	0,001
8 y 5	0,015	0,022
8 y 6	0,023	0,023

Las elevadas concentraciones de sodio en el suero de los animales tratados con furosemida, por encima de los valores encontrados para el resto de los animales tratados y considerando que también este ion es el excretado en mayores concentraciones en la orina, puede estar dado por el hecho de que ocurra una deshidratación isotónica con poco cambio relativo en la concentración del electrolito. También puede ocurrir que al excretarse altas concentraciones de este ion en la diuresis, aparece una disminución en la concentración extracelular de este ion y ocurre una salida desde el nivel intracelular para mantener el equilibrio electrolítico. Esta salida puede llegar a proporcionar concentraciones séricas mayores de este ion que las que existen en condiciones normales. La menor concentración de cloruro en suero en el grupo tratado con furosemida respecto al resto de los grupos tratados puede explicarse porque la salida de sodio en la diuresis arrastra este anión consigo.

---

---

## Conclusiones:

---

---

1. En la evaluación farmacológica de diuresis aplicada al 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosida, flavonoide aislado del extracto acuoso obtenido de las hojas de la *Boldoa Purpurascens*, se comprobó su contribución al efecto diurético que posee la fracción bioactiva.
2. Las determinaciones de sodio, potasio y cloruro en suero y orina permitieron sugerir que el producto de ensayo pertenece y actúa por el mecanismo de los diuréticos acuaréticos.

---

---

## Recomendaciones:

---

---

- Determinar dosis mínima efectiva del producto evaluado que provoca el efecto diurético.
  
- Seleccionar en estudios próximos un grupo control para las determinaciones de sodio, potasio y cloruro en suero.

---

## Bibliografía:

---

1. Harbone J, Williams C. The flavonoids-Advances in Research. Chapman and Hall. London; 1982
2. Roig y Mesa JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Edición científica –técnica. 1988.
3. León, Alain. Flora de Cuba. Contribuciones ocasionales del Museo de Historia Natural del Colegio La Salle 1957; tomo II: 24-26
4. Roig y Mesa JT. Diccionario Botánico de nombres vulgares cubanos. La Habana. 1974.
5. Revista cubana de investigaciones Biomédicas. 1993.
6. Colectivo de autores. Farmacología. Editorial Ciencias Médicas. 2001.
7. Martínez Y. Estudio farmacológico y toxicológico de la Boldoa Purpurascen. Trabajo Diploma. UCLV.1998.
8. Gonzáles Mosquera DM. Estudio fotoquímico y farmacológico del extracto acuoso de la Boldoa Purpurascen. Tesis para optar por el título de Master en ciencias. Especialidad: Química farmacia. UCLV. 1998.
9. Disponible en <http://216.239.51.100/Search?q=cache:TqJ3yy21> Fly J: www. Plantasmedicin.
10. Disponible en <http://www.Yuca.com.mx/sapos>. Html.
11. Lock de Ugas O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. Asociación de Publicaciones Educativas: Universidad Católica del Perú; 1998

12. Rodríguez E. Avances en el estudio fotoquímico de dos especies vegetales P: Boldoa Purpurascens y Portucala oleracea. Trabajo de diploma. UCLV.2001.
13. Peña L. Desarrollo de una forma terminada, tabletas, a partir de la Boldoa purpurascens. UCLV. 2003.
14. Cabrera. K. Comprobación de la actividad diurética del extracto acuoso de la Boldoa purpurascen. Trabajo de Diploma. UCLV.1997.
15. Jackson K, Edwin. Diuréticos. En: Goodman G. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9na ed. México: Médica Panamericana.1996:735-763.
16. Katzung G, Bertram. Farmacología Básica y Clínica. México: Manual moderno. 1994.
17. Flores. J. Farmacología Humana. 2nd Edición. 1992:721
18. Ramsay LE. Metabolic effects of diuretics. Cardiology 1994; 84 supl 2: 48-56.
19. Hernández Mosquera Y. Extracción y caracterización preliminar de taninos a partir de la Boldoa purpurascen Trabajo de diploma. UCLV. 2003.
20. Tratado de Medicina Interna de Cecil. Décimo Quinta. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1994
21. Vademécum 1993
22. Discher AC. Química inorgánico farmacéutica. España: Alhambra, C. A; 1996.
23. Disponible en <http://www.plantas medicinales.usosplantas.html>.
24. Morón F, Sierra P, Villan J, Martínez MJ. Programa de medicina tradicional herbolaria en Cuba. Las plantas medicinales en la terapéutica. Rev Cub Med Gen Integr 1991; 7(3): 276-84
25. Castillo. M, Roza, Martínez. M, Migdalia, Rodríguez M, Francisco. Fitomed II. Plantas Medicinales. Cuba: Editorial Ciencias Médicas.1993.

26. .Rodríguez M, Francisco. Plantas medicinales y medicamentos herbarios. En: Morón-Levy. Farmacología General.1ra edición. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas.2002:195-205
27. Rodríguez M, Francisco. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1996; 1(3): 25-30
28. JM. Gonzáles de Buitrago, E. Anilla Ferreiro, M. Rodríguez Segade, A. Sánchez Pozo. Bioquímica clínica. 1ra ed en español por J M. Gonzáles de Buitrago. 1998: 526 y 527.
29. Harbone JB. Plants flavonoids in biology and medicinal properties. Inc. New York: Ed. Alan R. Liss; 1988.
30. Brandi M. Flavonoids: Biochemical effects and therapeutic applications. Bone Mineral. 1992; 19: 53-514.
31. Chan P, Wallae Ho A F. Acute toxicity and eye irritancy. En: Raven press. Principles and methods of toxicology. III Edición, New York; 1994.
32. Durand E, Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia. Cuba: Ed. Pueblo y Educación; 1986:23-26.
33. Chandan BK, Col. Boerhaavia difusa: a study of its hepatoprotective activity. J. Ethnopharmacol 1991; 31(3): 229-307.
34. CETESB. Mutación genética reversa en Salmonella typhimurium. Ensayo de AMES; 1993.
35. Chang WS, Chang YH, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase; 1999.
36. Evans WC. Farmacognosia. Editorial Interamericana S.A; 1991.



37. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. La Habana: 7ma Ed. Científico Técnica; 1986 Tomo 2: 42.
38. HenrrJ.D.C: CannonJ.W. Química clínica. Tomo 1. Bases y Técnicas.2da ed.
39. Burtis C.A: Edwuar R.Ashwood. Fundamentals of clinical chemistry. 4ta ed .1996.
40. MINSAP. Farmacología preclínica. Guía Metodológica. Plan nacional de investigaciones de plantas medicinales. Ciudad de la Habana, 1993:5
41. Agre P, Mackinnon R. Canales Moleculares a través de las paredes de la célula. Premio Nobel de Química. Real academia Sueca de las ciencias. 2003. Información al público octubre 8, 2003.
42. González D y col. New flavonoids isolation of Boldoa purpurascen. Phytocmestry 2005
43. Vogel H.G. and Vogel W, Drug Discovery and evaluation. Pharmacological Assays. Ed Springer Verlag. 1997: 168
44. Carvajal A, Casacó, Gonzáles R. Rev. CENIC Ciencias Biológicas. Volumen 17 1986:1 -2.
45. Catálogo de especialidades farmacéuticas , Pág. 583
46. Cogan MG. Renal effects of atrial natriuretic factor. Ann Rev Physiol 52.1990:699-708.
47. Widmann F. Interpretación Clínica de las pruebas de Laboratorio.2da ed. España. 1981:319-321.
48. [http//www. Civer.com](http://www.Civer.com) [febrero del 2006.o Hepatología basal y valores de hepatología clínica de ratas Charles River CD (CrI: CD (SD) BR) en función del sexo y edad. Charles River teechn. Bull., Vol. 3 .No.2, 1984.

49. Griev. Plantas medicinales con acción diurética. Abstract [en línea] 2000 jun 7 [17 febrero 2002]; 34.URL disponible en [http:// WWW.plantas\\_medicinales.org/abstract/ 2000](http://WWW.plantas_medicinales.org/abstract/2000).
50. Bojase G, Majinda R, Wanjala C. Antimicrobial flavonoids from *Bolusanthus speciosus*. *Planta med* 2002; 68(7): 615-620.
51. Claus E P. *Farmacognosia*. Segunda edición. Ciudad de la Habana: Edición Revolucionaria; Editorial Ciencia y técnica 1985: 1, 2, 28, 110,118.
52. Cuellar C A. *Química de los fármacos naturales*. Ciudad de la Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1983. p. 11-27, 75-77, 234.
53. Cáceres A. *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Ed. Universitaria. Universidad San Carlos de Guatemala; 1999.
54. Gómez F. Clasificación de los diuréticos: de lo anatómico a lo funcional. 1997; 62 (1416): 43 – 48.
55. Goodman and Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Editores S.A de C.V. México 1996; Volumen 2.
50. Markham K. Flavones, Flavonols and their glycosides. Inc: *Methods in plant Biochemistry*. Academic Press Lim 1989; Vol 1:197-235.

---

---

## Anexos:

---

---

### ANEXO I

#### Grupo prueba. Dosis 100 mg/kg (I)

# de Ratona	Peso en (g)	Volúmenes de orina (mL)						C(x) de iones en orina (mEq / L)			C(x) de iones en suero (mEq/L)		
		1	2	3	4	5	6	Na+	K+	Cl-	Na+	K+	Cl-
2	183	4,1	6,5	7,4	7,5	8,0	8,2	0,13	0,04	0,06	-	-	-
19	180	5,6	7,3	8,1	9,2	9,5	10,2	0,16	0,04	0,10	-	-	-
7	175	3,2	5,4	5,8	6,1	6,6	6,7	0,12	0,02	0,07	-	-	-
8	195	2,1	4,4	4,7	5,0	5,2	5,7	0,10	0,03	0,05	141,1	6,68	103,8
14	195	3,5	6,1	6,5	7,0	7,2	7,6	0,14	0,04	0,06	141,4	7,26	103,6
18	195	3,5	5,5	6,5	6,9	7,1	7,6	0,15	0,02	0,02	140,8	7,08	103,9

#### Grupo prueba. Dosis 50 mg/Kg. (II).

# de Ratona	Peso en (g)	Volúmenes de orina (mL)						C(x) de iones en orina (mEq / L)			C(x) de iones en suero (mEq/L)		
		1	2	3	4	5	6	Na+	K+	Cl-	Na+	K+	Cl-
23	189	4,1	6,2	7,3	7,7	7,8	8,0	0,12	0,02	0,04	142,1	9,27	105,4
22	184	3,1	7,1	7,8	9,0	9,1	9,8	0,15	0,02	0,05	141,5	7,24	104,9
16	183	4,2	6,8	7,8	8,2	8,9	9,1	0,15	0,03	0,08	140,4	6,80	103,9
15	195	3,8	6,5	6,9	7,6	8,0	8,0	0,15	0,02	0,05	139,4	6,88	103,5
26	193	5,1	6,5	7,3	7,5	7,9	8,0	0,12	0,02	0,05	140,7	6,44	103,7
27	194	2,4	6,5	7,1	8,1	8,4	8,6	0,12	0,02	0,06	138,0	7,63	103,5

Grupo prueba. Dosis 25 mg/kg (III).

# de Rat a	Peso en (g)	Volúmenes de orina (mL)						C(x) de iones en orina (mEq / L)			C(x) de iones en suero (mEq/L)		
		1	2	3	4	5	6	Na+	K+	Cl-	Na+	K+	Cl-
10	190	3,3	5,8	6,4	6,6	6,9	7,2	0,11	0,02	0,03	138,3	7,31	102,9
12	190	0	0	3,0	4,8	7,0	7,1	0,09	0,02	0,07	138,7	6,58	103,4
9	190	3,2	6,9	7,0	7,5	8,0	8,2	0,15	0,05	0,06	140,5	6,52	103,1
1	190	4,7	6,4	6,7	7,9	8,0	8,7	0,12	0,03	0,07	138,9	7,04	103,7
29	194	5,2	5,5	6,3	6,6	6,9	7,1	0,09	0,02	0,06	138,2	7,3	101,5
5	195	6,5	6,5	7,8	7,8	7,9	8,1	0,12	0,03	0,16	139,9	7,22	103,9

Grupo prueba. Dosis 12 mg/kg (IV).

# de Rat a	Peso en (g)	Volúmenes de orina (mL)						C(x) de iones en orina (mEq / L)			C(x) de iones en suero (mEq/L)		
		1	2	3	4	5	6	Na+	K+	Cl-	Na+	K+	Cl-
31	190	2,2	6,1	7,4	7,9	8,5	8,8	0,12	0,03	0,05	141,5	5,94	104,2
35	190	0	2,0	6,0	7,1	8,7	9,4	0,13	0,03	0,12	139,6	6,43	104,3
34	186	4,5	6,3	8,0	8,8	8,9	9,1	0,13	0,03	0,07	140,9	7,75	105,9
33	187	1,6	5,8	7,3	7,9	8,1	8,2	0,13	0,03	0,03	141,5	6,51	104,4
38	204	4,1	7,3	8,2	9,0	9,5	9,5	0,13	0,03	0,09	138,7	8,52	104,8
39	204	4,0	7,3	7,9	8,2	8,3	8,4	0,10	0,03	0,11	138,3	9,09	103,3

**Grupo prueba. Dosis 6 mg/kg (V).**

# de Rat a	Peso en (g)	Volúmenes de orina (mL)						C(x) de iones en orina (mEq / L)			C(x) de iones en suero (mEq/L)		
		1	2	3	4	5	6	Na+	K+	Cl-	Na+	K+	Cl-
37	202	3,8	6,5	8,1	8,5	9,3	9,5	0,15	0,03	0,05	138,5	8,5	103,5
36	201	3,6	7,0	8,0	8,2	8,8	7,5	0,15	0,03	0,05	137,8	8,10	104,0
42	200	2,7	6,6	7,9	9,2	10,2	10,8	0,17	0,04	0,15	138,5	7,12	104,3
43	203	3,9	7,5	8,6	9,0	9,8	10,5	0,14	0,04	0,12	139,1	6,35	103,3
44	204	3,6	6,0	6,6	7,5	7,8	8,5	0,11	0,03	0,09	135,7	9,00	104,5
45	199	4,5	6,6	7,6	8,7	8,9	9,1	0,12	0,03	0,13	138,5	6,98	101,5

**Grupo prueba. Dosis 3 mg/kg (VI).**

# de Rat a	Peso en (g)	Volúmenes de orina (mL)						C(x) de iones en orina (mEq / L)			C(x) de iones en suero (mEq/L)		
		1	2	3	4	5	6	Na+	K+	Cl-	Na+	K+	Cl-
47	217	6,4	7,3	7,3	8,4	8,5	8,7	0,13	0,02	0,06	148,7	6,10	99,4
48	209	2,9	3,3	3,3	5,9	7,1	7,8	0,10	0,06	0,06	145,6	5,71	101,9
49	212	6,1	7,5	7,5	8,7	9,1	9,0	0,12	0,02	0,04	143,8	6,67	102,7
40	209	5,8	7,9	7,9	9,4	9,6	10,0	0,19	0,05	0,04	138,2	7,90	104,0
51	205	3,3	6,6	6,6	8,2	8,5	9,0	0,16	0,05	0,04	141,0	7,79	106,5
52	211	4,3	7,9	7,9	8,7	9,4	9,7	0,15	0,05	0,05	143,1	6,86	102,7

**Control negativo. Cloruro de sodio al 0.9%.( VII)**

# de Rat a	Peso en (g)	Volúmenes de orina (mL)						C(x) de iones en orina (mEq / L)			C(x) de iones en suero (mEq/L)		
		1	2	3	4	5	6	Na+	K+	Cl-	Na+	K+	Cl-
25	180	0,2	0,3	0,5	0,9	1,2	1,9	0,07	0,01	0,34	-	-	-
13	190	0,2	1,2	1,7	2,4	2,5	3,0	0,10	0,01	0,45	142,4	8,17	105,4
30	195	0	1,3	1,7	2,0	2,5	3,1	0,08	0,02	0,23	138,7	8,49	103,4
4	198	0,2	1,0	1,2	2,0	2,0	2,2	0,08	0,02	0,20	140,1	6,81	104,1
21	188	0,2	0,9	1,2	1,5	2,2	2,4	0,05	0,01	0,37	141,1	6,04	103,9
3	182	0,5	1,8	1,8	1,9	3,2	3,7	0,11	0,03	0,37	140,6	7,68	104,5
41	199	1,3	1,4	2,4	2,4	2,7	3,5	0,07	0,02	0,38	140,6	6,76	103,1
46	220	0,9	1,3	2,3	2,9	3,0	3,4	0,08	0,03	0,30	148,6	8,20	100,4

**Control positivo. Furosemida 20 mg. (VII)**

# de Rat a	Peso en (g)	Volúmenes de orina (mL)						C(x) de iones en orina (mEq / L)			C(x) de iones en suero (mEq/L)		
		1	2	3	4	5	6	Na+	K+	Cl-	Na+	K+	Cl-
25	180	0,2	0,3	0,5	0,9	1,2	1,9	0,07	0,01	0,34	-	-	-
13	190	0,2	1,2	1,7	2,4	2,5	3,0	0,10	0,01	0,45	142,4	8,17	105,4
30	195	0	1,3	1,7	2,0	2,5	3,1	0,08	0,02	0,23	138,7	8,49	103,4
4	198	0,2	1,0	1,2	2,0	2,0	2,2	0,08	0,02	0,20	140,1	6,81	104,1
21	188	0,2	0,9	1,2	1,5	2,2	2,4	0,05	0,01	0,37	141,1	6,04	103,9
3	182	0,5	1,8	1,8	1,9	3,2	3,7	0,11	0,03	0,37	140,6	7,68	104,5
41	199	1,3	1,4	2,4	2,4	2,7	3,5	0,07	0,02	0,38	140,6	6,76	103,1
46	220	0,9	1,3	2,3	2,9	3,0	3,4	0,08	0,03	0,30	148,6	8,20	100,4

## ANEXO II

Tabla A: Valores de  $\chi^2$  y probabilidad (P) para cada uno de los parámetros.

<b>Parámetro</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>	<b><i>P &lt; 0.05 signif.</i></b> <b><i>P &lt; 0.01 muy signif.</i></b> <b><i>P &lt; 0.001 altamente signif.</i></b>
<b>Volumen de Orina</b>	35.561	0.000	
Na <sup>+</sup>	35.006	0.009	
K <sup>+</sup>	18.682	0.000	
Cl <sup>-</sup>	37.525	0.000	
<b>Suero</b>			
Na <sup>+</sup>	18.615	0.009	
K <sup>+</sup>	18.682	0.585	
Cl <sup>-</sup>	37.525	0.014	

### ANEXO III

Valores de probabilidad (p) de los diferentes parámetros en orina para la dosis de 50 mg/kg y las restantes dosis ensayadas.

<b>Grupos</b>	<b>V. orina mL (p)</b>	<b>Na<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>K<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>Cl<sup>-</sup> (meq/6h) (p)</b>
2 y 1	0,180	0,818	0,002	0,394
2 y 3	0,240	0,180	0,005	0,240
2 y 4	0,310	0,485	0,004	0,240
2 y 5	0,065	0,937	0,006	0,132
2 y 6	0,485	0,699	0,003	0,589

Valores de probabilidad (p) de los diferentes parámetros en orina entre la dosis de 25 mg/kg y las restantes dosis ensayadas.

<b>Grupos</b>	<b>V. orina mL (p)</b>	<b>Na<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>K<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>Cl<sup>-</sup> (meq/6h) (p)</b>
3 y 1	0,818	0,180	0,589	0,589
3 y 2	0,240	0,180	0,005	0,240
3 y 4	0,291	0,240	0,240	0,937
3 y 5	0,004	0,180	0,240	0,589
3 y 6	0,015	0,132	0,310	0,065



**Valores de probabilidad (p) de los diferentes parámetros en orina entre la dosis de 12 mg/kg y las restantes dosis ensayadas.**

<b>Grupos</b>	<b>V. orina mL (p)</b>	<b>Na<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>K<sup>+</sup> (meq/6h) (p)</b>	<b>Cl<sup>-</sup> (meq/6h) (p)</b>
4 y 1	0,065	0,394	0,937	0,394
4 y 2	0,310	0,485	0,004	0,240
4 y 3	0,092	0,240	0,240	0,937
4 y 5	0,084	0,180	0,485	0,589
4 y 6	0,008	0,180	0,394	0,132
5 y 6	0,003	0,937	0,394	0,310