



Evaluación de la toxicidad aguda y la actividad diurética de la especie *Lachemilla pinnata* en animales de experimentación

AYCA, DARIO¹
 FLORES, ESTHER¹
 GONZALES, EDUARDO¹
 ARIAS, JUAN¹

CORRESPONDENCIA: JUAN LUÍS ARIAS MIRANDA
 JANLUIAR@HOTMAIL.COM.

FECHA DE RECEPCIÓN: 16 DE ABRIL DE 2014

FECHA DE ACEPTACIÓN 30 DE JULIO DE 2014

Resumen

El efecto diurético y la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de *Lachemilla pinnata* (sillu, sillu) planta medicinal utilizada tradicionalmente en Bolivia, fue investigado en ratones y ratas.

El extracto hidroalcohólico de *Lachemilla pinnata* (EHA-Lp) en dosis de 100, 500 y 1000 mg/kg de peso corporal fue administrado por vía oral a ratones machos, hembras y ratas hembras para la determinación de la toxicidad aguda (DL50), efectos sobre el comportamiento general de ratones y evaluación de la influencia del extracto sobre el volumen de excreción urinaria según el método descrito por Wiebelhaus (1965).

Los resultados revelaron que el extracto no provoca toxicidad aguda (DL50 mayor a 3000 mg/kg) hasta la dosis máxima ensayada. No se evidenciaron efectos signifi-

Abstract

The diuretic effect and acute toxicity of the hydroalcoholic extract *Lachemilla pinnata* (Sillu Sillu) medicinal plant traditionally used in Bolivia, was investigated in mice and rats.

The hydroalcoholic extract of *Lachemilla pinnata* (EHA-Lp) at doses of 100, 500 and 1000 mg / kg body weight was orally administered to male mice, female and female rats to determine the acute toxicity (LD50), effects on the general behavior of mice and assessment of the influence of the extract on the volume of urinary excretion by the method described by Wiebelhaus (1965).

The results revealed that the extract does not cause acute toxicity (LD50 greater than 3000 mg / kg) up to the maximum dose tested. No significant effects on the

¹ Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra N° 2224, Miraflores, La Paz-Bolivia

cativos sobre el comportamiento general en los ratones excepto la presencia de inhibición al estímulo doloroso así conducta pasiva y temerosa.

El efecto diurético generado por el EHA-Lp con dosis 100 y 1000 mg/kg, tanto en ratones como ratas mostraron niveles de significancia $p < 0.01$ en comparación al grupo control (suero fisiológico) produciendo un efecto similar al ejercido por el fármaco patrón Furosemida.

En conclusión el extracto hidroalcohólico de *Lachemilla pinnata* presenta efecto diurético comparable al fármaco patrón Furosemida con un perfil toxicológico favorable.

overall behavior in mice except the presence of painful stimuli and inhibition passive and fearful behavior were evident.

The diuretic effect generated by the EHA -Lp at doses 100 to 1000 mg / kg, both in mice and rats showed significance levels $p < 0.01$ compared to control group (physiological saline) were produced similar to that exerted by the standard drug Furosemide effect.

In conclusion the hydroalcoholic extract *Lachemilla pinnata* has diuretic effect comparable to standard drug Furosemide with a favorable toxicity profile.

PALABRAS CLAVE

Lachemilla pinnata, diurético, toxicidad aguda, plantas medicinales, hipertensión arterial.

KEY WORDS

Lachemilla pinnata, diuretic, acute toxicity, medicinal plants, hypertension .

INTRODUCCION

La hipertensión arterial es una enfermedad de alta prevalencia en todo el mundo y es la más sobresaliente entre las enfermedades cardiovasculares (Varela., 2007). Esta patología está presente en el 35% de todos los eventos cardiovasculares ateroscleróticos y en el 49% de todos los casos de falla cardíaca e incrementa el riesgo de eventos cerebro-vasculares (Padwal y col., 2001)

En Bolivia la hipertensión arterial tiene una prevalencia importante, que alcanza aproximadamente a un 23 % de la población general. (Mercado., 2005; Renjel., 2006).

Dentro del amplio grupo de fármacos utilizados en el tratamiento de la hipertensión arterial, se encuentran los diuréticos entre ellos la furosemida un diurético de alta eficacia natriurética indicada para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), cirrosis hepática, enfermedad renal y manejo de pacientes con hipertensión arterial (Florez., 1998). Sin embargo su utilización puede generar en muchos casos efectos adversos asociados con este diurético como la reducción de los flujos sanguíneos renal, cerebral y cardíaco; la pérdida de potasio con alteraciones cardíacas y neuromusculares, aumento del nivel sérico de ácido úrico y el nivel sanguíneo de glucosa; reacciones alérgicas; dermatitis exfoliativa en raros casos; prurito, trombocitopenia y leucopenia. Incluso se puede observar: parestesias, visión borro-

sa, hipotensión postural, nauseas, vómitos o diarrea. Además se han reportado efectos ototoxicos, (Gennaro, 2003).

Algunas especies vegetales como el *Equisetum Bogotense*, *Costus pictus*, *Rosmarinus officinalis L* son utilizadas tradicionalmente por su efecto diurético (Lemus et.al. 1996;; Melendez-Carmargo et. al. 2006; Martinez Martín et. al. 2004).

La especie vegetal *Lachemilla pinnata* planta autóctona de Bolivia de crecimiento endémico en las regiones andinas es comúnmente llamada Sillu sillu, Yurak, chchapi, churitika (Quechua), pichi pichi (Aymara) (Girault, 1987). Pertenece a la familia Rosaceae y es utilizada en la medicina tradicional boliviana para el tratamiento de diferentes enfermedades, entre ellas: afecciones renales, enfermedad de la vejiga, hígado, contra cólicos hepáticos, además de presentar actividad antiinflamatoria, analgésica, antiinfecciosa y antiséptica, (Girault, 1987).

Las partes más usadas de la planta son la fruta, hoja, tallo y raíz utilizadas en forma de baños de infusión, decocción, cataplasma y cocimiento de la hoja, (Girault 1987; De Lucca 1992).

El análisis fitoquímico de la especie pinnata realizada revela los siguientes componentes: fenólicos: Acido para –hidroxibenzoico, acido cafeico, Acido Cumárico, Acido ferúlico Acido siríngico. Flavonoides: Diarabinósido de quercetol, Glucósido de camferol. Acidos orgánicos como: ácido acético, málico, cítrico,oxálico, succínico. Triterpenos como la alfa y beta amirina y esteroides como el beta-sitosterol. (Yamagishi, 1988).

El presente estudio se realizo para determinar la toxicidad aguda y la actividad diurética en ratas y ratones de la especie *Lachemilla pinnata*, planta medicinal utilizada tradicionalmente en Bolivia para afecciones cardiovasculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La recolección de la especie *Lachemilla pinnata* se realizó en la población de Huatajata, Provincia Omasuyos del Departamento de La Paz a una altura aproximada de 4000m/snm en el mes de mayo de 2011. Un espécimen de la planta fue depositado en el Herbario Nacional de Bolivia para su autenticación.

Una cantidad de 4000 g del polvo obtenido de las partes aéreas de la planta se sometió a extracción hidroalcoholica (30:70) por maceración por un periodo de 96 horas. El macerado se filtro en papel filtro whatman N° 1, y el filtrado se concentró a presión reducida en un rotaevaporador para su posterior liofilización. El rendimiento obtenido fue de 12,2 % p/p

Animales

Se emplearon ratones albinos suizos cepa Swiss, adultos, hembras y machos con un peso promedio entre 20-30 g y ratas hembras albinas con peso promedio entre 250 y 300 g. Todos los animales fueron criados y mantenidos adecuadamente en el bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, con ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, con alimento y agua ad libitum. El número de animales utilizados para cada ensayo fue de 10 y se realizaron de acuerdo a las Normas de Ética de la Comunidades Europeas. (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1998).

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA EN RATONES

La determinación de la toxicidad por vía oral se realizó, con pequeñas modificaciones, según las recomendaciones del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) y la Organization for Economic Cooperation and Development, (Lapa, 2002; OECD, 2001).

Ensayo de DL50

Se utilizaron grupos de 10 ratones (5 hembras y 5 machos) de peso promedio entre 20-30g, en ayunas de 6 horas, a los que se administró por vía oral el extracto hidroalcohólico de *Lachemilla pinnata* a dosis de: 1000; 2000; y 3000 mg/kg de peso corporal y a continuación se observaron cuidadosamente los efectos y la mortalidad durante un periodo de 24 horas. Se utilizó suero fisiológico (SF) para disolver los extractos y como solvente control.

Efecto sobre el comportamiento general de ratones

Grupos de 10 ratones machos y hembras en ayunas de 6 horas recibieron dosis de 1000; 2000 y 3000 mg/kg de EHA-Lp por vía oral. Los ratones del grupo control recibieron el solvente (suero fisiológico) en una relación de 0,1 mL/10g de peso corporal.

Tras la administración del extracto se observaron diferentes parámetros comportamentales a los 30, 60, 120, 240, 480 minutos y 24 horas. Los parámetros biológicos de regulación y control central (depresión o estimulación), de regulación autonómica y parámetros subjetivos fueron tabulados individualmente.

Determinación de la toxicidad subaguda aguda a dosis multiple

Se utilizaron grupos de ratones machos y hembras (N= 10; 20-30 g de peso corporal) en ayunas de 6 horas. Cada animal recibió 1000 mg/kg de EHA-Lp por vía oral una vez al día durante 14 días y el grupo control recibió suero fisiológico.

Se realizaron observaciones de los signos y síntomas de toxicidad hasta los 14 días. Se determinó el peso corporal de cada animal antes y durante el ensayo (1, 7 y 14 días) y el día 15 todos los animales fueron sacrificados en secuencia individual para realizar el estudio macroscópico de los principales órganos y se evaluó la influencia del extracto sobre el peso del corazón, riñón, bazo, pulmones, hígado, estómago e intestinos.

Evaluación de la actividad diurética

La determinación de la actividad diurética se realizó según el método descrito por Wiebelhaus (1965). Se formaron 5 grupos de 10 ratones albinos suizos y ratas albinos. Al grupo I (Control) se administró solución fisiológica 0,1mL/10g de peso corporal. Los grupos II, III y IV recibieron por vía oral dosis de 100, 500 y 1000 mg/kg, del EHA-Lp y el grupo V recibió por vía intraperitoneal 20 mg/kg de Furosemida.

Luego de la administración, los animales fueron colocados de forma individual en jaulas metabólicas y se registró el volumen de orina acumulado a los 90 min y 24 horas. Se determinó luego el porcentaje de carga salina excretada y la acción diurética.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar y el análisis estadístico de los datos fue realizado por la prueba paramétrica ANOVA de una cola a través del programa estadístico MINITAB 15 para Windows XP.

Niveles de probabilidad menores a $p < 0,05$ y $p < 0,01$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Toxicidad aguda (DL50)

La administración oral de dosis de 1000, 2000 y 3000 mg/kg de EHA-Lp no provocó mortalidad ni síntomas de toxicidad en los animales, lo que indica que DL50 es superior a la dosis máxima empleada (3000 mg/Kg).

Efecto sobre el comportamiento general de ratones.

En general no se observó marcados efectos sobre el comportamiento de ratones hembras y machos. Sin embargo el extracto indujo inhibición al estímulo doloroso, conducta pasiva y conducta temerosa, hasta los 60 minutos post administración con dosis de 2000 y 3000 mg/kg. Estos efectos fueron disminuyendo y la inhibición al estímulo doloroso con dosis de 3000 mg/kg se observó únicamente hasta los 240 minutos.

Determinación de la toxicidad subaguda aguda a dosis multiple

Los ratones hembras y machos tratados diariamente con dosis de 1000 mg/kg de EHA-Lp hasta los 14 días no mostraron ningún signo o síntoma de toxicidad. El peso corporal se mantuvo dentro los parámetros normales y si bien el peso del corazón, estomago, hígado en ratones hembras y del intestino e hígado en ratones machos aumentó significativamente respecto al grupo control. Sin embargo esta diferencia no ha generado los signos y síntomas característicos de un efecto toxico.

Evaluación de la actividad diurética

Respecto de esta actividad el EHA-Lp aumentó significativamente el porcentaje de carga salina con dosis de 500 y 1000 mg/kg ($p < 0.05$; $p < 0.01$ respectivamente) en ratones hembras y con 100 mg/kg en ratones machos en comparación al grupo control. El incremento de la acción diurética fue significativa ($p < 0.01$) con dosis de 100, 500 y 1000 mg/kg tanto en ratones hembras y machos hasta las 24 horas. Estos resultados se muestran en la tabla N° 1.

Tabla N° 1
Efecto del EHA-Lp sobre la excreción de la carga salina en ratones hembras y machos hasta las 24 horas.

| Tratamiento | Dosis (mg/kg) | % de Carga salina excretada | Acción diurética |
|---------------------------|---------------|-----------------------------|------------------|
| Ratones hembras: | | | |
| Solución Salina (Control) | | 34,3±0,3 | 1 |
| Furosemida | 20mg/kg | 68,8±0,1** | 2,1±0,4** |
| EHA-Lp | 100mg/kg | 28,3±0,1 | 8,1±0,2** |
| EHA-Lp | 500mg/kg | 41,9±0,1* | 1,4±0,5** |
| EHA-Lp | 1000mg/kg | 41,4±0,4** | 9,6±0,2** |
| Ratones machos: | | | |
| Solución Salina (Control) | | 41,1±0,8 | 1 |
| Furosemida | 20mg/kg | 72,6,±0,2** | 1,8±0,3** |
| EHA-Lp | 100mg/kg | 56,8±0,8* | 1,4±0,2** |
| EHA-Lp | 500mg/kg | 54,9±0,1 | 1,2±0,3** |
| EHA-Lp | 1000mg/kg | 41,3±46,7 | 9,64±2,3** |

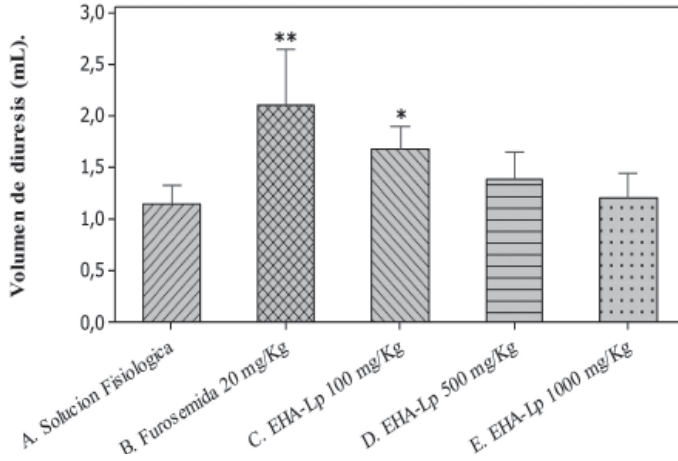
Cada valor representa la Media + S.E.M., N=10 (ANOVA de un factor). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

El EHA-Lp con dosis de 100 mg/kg produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) del volumen de excreción urinaria en ratones machos hasta las 24 horas post administración del extracto en comparación al grupo control (solución fisiológica). Estos resultados se muestran en el grafico N° 1

Gráfico N° 1

Efecto del extracto hidroalcohólico de *Lachemilla pinnata* sobre el volumen de excreción urinaria en ratones machos (N=10)

EFFECTO DIURÉTICO DEL EHA-Lp A DOSIS DE 100, 500 Y 1000mg/kg EN RATONES MACHOS HASTA LAS 24 HORAS.



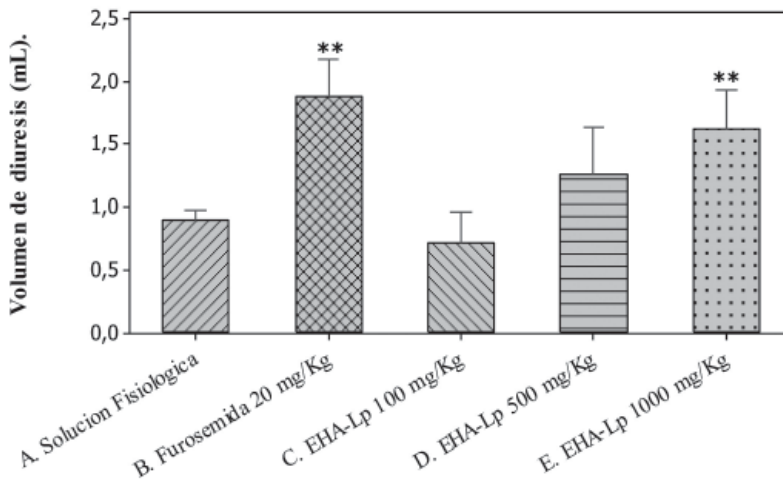
Cada valor representa la media + S.E.M., N=10 . * P<0,05, ** P<0,01

En ratones hembras el EHA-Lp con dosis de 1000 mg/kg aumentó significativamente ($p < 0,01$) el volumen de excreción urinaria hasta las 24 horas respecto al grupo control (SF). Estos resultados se muestran en el gráfico N° 2.

Gráfico N° 2

Efecto del extracto hidroalcohólico de *Lachemilla pinnata* sobre el volumen de excreción urinaria en ratones hembras (N=10)

EFFECTO DIURÉTICO DEL EHA-Lp A DOSIS DE 100, 500 Y 1000mg/kg EN RATONES HEMBRAS HASTA LAS 24 HORAS.



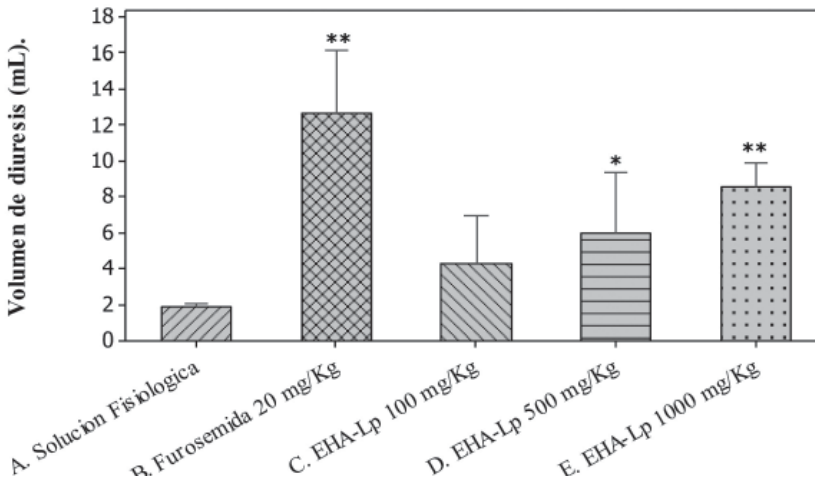
Cada valor representa la media + S.E.M., N=10; * P<0,05; ** P<0,01

En gráfico N°3 se muestra la influencia de la administración del EHA-Lp en ratas hembras. Se puede observar que hasta las 24 horas post administración, el extracto produjo un aumento significativo del volumen de excreción urinaria con dosis de 500 y 1000 mg/kg ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente) en comparación al grupo control.

GRÁFICO N° 3

Efecto del extracto hidroalcohólico de *Lachemilla pinnata* sobre el volumen de excreción urinaria en ratas hembras (N=10)

EFFECTO DIURÉTICO DEL EHA-Lp A DOSIS DE 100, 500 Y 1000mg/kg



Cada valor representa la media + S.E.M., N=10; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

DISCUSIONES

Se realizó el estudio toxicológico y farmacológico de la especie *Lachemilla pinnata* a fin de determinar el efecto diurético y evaluar su toxicidad. Las referencias de uso popular indican que la especie *Lachemilla pinnata* es utilizada en la medicina tradicional boliviana para el tratamiento de diferentes enfermedades, entre ellas: afecciones renales (Girault, 1987).

Los resultados revelaron que el extracto no manifiesta toxicidad aguda, pues no se evidenció mortalidad hasta 24 horas de observación, por lo tanto se considera que la DL50 corresponde a un nivel de dosis superior a 3000 mg/kg de peso corporal (dosis máxima ensayada). No se evidenciaron efectos significativos sobre el comportamiento general en los ratones, excepto la presencia de inhibición al estímulo doloroso, conducta pasiva y temerosa en una fase inicial del estudio, los cuales desaparecieron en el transcurso del experimento.

La inhibición al estímulo doloroso observado en los ratones puede estar asociado a un posible efecto a nivel del sistema nervioso central, que en repuesta a la exposición de condiciones de estrés en los animales de experimentación

se podría producir la liberación en la adenohipófisis, de la hormona CRH la que estimula la secreción de la β -endorfina, un péptido opiáceo responsable de la analgesia asociada al estrés, (Kofman 2002; Teague y cols., 2007).

La presencia de conducta pasiva y temerosa observada en los ratones hasta los 60 minutos podría deberse a las condiciones experimentales de manipulación en el laboratorio que podría influir en conducta, fisiología y sistema inmune (Ottenweller, 2000).

Según el ensayo de toxicidad a dosis continua por 14 días, no se observó cambios significativos sobre la actividad autonómica, refleja o central. Tampoco se observaron diferencias significativas del peso corporal hasta el final del tratamiento (14 días) y no se registraron cambios significativos en el peso de los órganos así como en la apariencia general de los mismos

La furosemida un diurético de asa de alta eficacia natriurética es ampliamente utilizado como fármaco patrón en modelos biológicos para la determinación de la actividad diurética de extractos vegetales medicinales, motivo por el cual se utilizó en este estudio como control positivo, (Camargo y col., 2004; Maghrani y col., 2005)

El efecto diurético producido por el EHA-Lp a dosis de 100 y 1000 mg/kg tanto en ratones hembras y machos así como ratas hembras es similar al efecto producido por la furosemida a dosis de 20 mg/kg, lo cual demuestra su actividad diurética. Estos resultados se correlacionan con el aumento significativo del porcentaje de carga salina excretada y acción diurética tanto para el fármaco patrón furosemida ($p < 0.01$) y el EHA-Lp con dosis de 500 y 1000 mg/kg ($p < 0.05$; $p < 0.01$ respectivamente) en comparación al grupo control (solución fisiológica).

Al parecer el inicio del efecto diurético de EHA-Lp es más lento comparado con la furosemida, lo que puede atribuirse a factores farmacocinéticos o farmacodinámicos de los principios activos de la planta (Hernán y col., 2006)

Probablemente el efecto diurético producido por el EHA-Lp podría atribuirse a la presencia de metabolitos secundarios como: aceites esenciales, flavonoides, saponósidos y sales de potasio, (Arteche y col., 1998). Con referencia al probable mecanismo de acción, algunos aceites esenciales, saponósidos y flavonoides podrían actuar a nivel glomerular (más que en el túbulo), provocando un aumento de la circulación renal e incrementando así la tasa de filtración glomerular y la formación de orina primaria, (Arteche y col., 1998; Cañigueral y col., 1998).

En conclusión, el extracto hidroalcohólico de *Lachemilla pinnata* presenta actividad diurética comparable a la furosemida, con un perfil toxicológico favorable.

AGRADECIMIENTOS

Al Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, por la dotación de los reactivos biológicos.

REFERENCIAS

- Varela, E. (2007). Aspectos epidemiológicos, Guías colombianas para el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista Colombiana de Cardiología* 13:189 – 193.
- Padwal,R., Straus, S., & Mcalister, F.(2001). Cardiovascular risk factors and their effects on the decision to treat hypertension: evidence based review. *BMJ* 322: 977 – 980.
- Mercado, L. (2005). Tratamiento de la Hipertension Arterial. *Rev.Colegio Medico Cochabamba* 1: 1 – 3.
- Renjel, F. (2006). Prevalencia y manejo de la hipertensión arterial en pacientes mayores de 25 años que acudieron a la consulta del Hospital Univalle, entre enero y noviembre del 2006 1: 1 – 5.
- Florez, J. (1998). *Farmacología Humana*, 3º edición, Ed Masson S.A. Barcelona-España, Pgs 815-831
- Gennaro, A.R. (2003). *Remington Farmacia*, 20ª edición, Editorial Medica Panamericana, Bs Aires, v.2,pg 1589
- Lemus, I., Garcia, R., Erazo, S., Pena, R., Parada, M., & Fuenzalida, M. (1996). Diuretic activity of an *Equisetum bogotense* tea (Platero herb): evaluation in healthy volunteers. *Journal of ethnopharmacology*, 54(1), 55-58.
- Meléndez-Camargo, M. E., Castillo-Nájera, R., Silva-Torres, R., & Campos-Aldrete, M. E. (2006). Evaluation of the diuretic effect of the aqueous extract of *Costus pictus* D. Don in rat. *Western Pharmacology Society Vol. 49*, p. 187.
- Martínez Martín, S. M., Paz Naranjo, J. D. L., Corral Salvadó, A., & Martínez Ruiz, C. (2004). Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(1), 0-0.
- Giroult, L. (1987). *Kallawaya. Curanderos itinerantes de los andes*. La Paz, Ed. UNICEF-OPS-OMS. Impresiones Quipus, p.670.
- De Lucca,M.& J.Zalles.(1992). *Flora medicinal boliviana*. Diccionario Enciclopédico. SEAPAS/Editorial Los Amigos del Libro, La Paz-Cochabamba.
- Yamagishi . (1989). *Química*. 1ra ed. Barcelona. P.520
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Consejo de las Comunidades Europeas. Recomendaciones del Consejo relativa a las pruebas para la comercialización de las especialidades farmacéuticas. 87/176/CEE. Real Decreto N°363/1995, Modificado por Orden del 30 Junio de 1998. Editorial Aranzadi S.A. Madrid-España. (Supl. 1998)
- Lapa, A.J., Caden, S., Riggio Lima, M.T., & De Lima, T.C.M. (2002). Métodos de Evaluación de la Actividad Farmacológica de Plantas Medicinales, CYTED/CNPq, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, RIVAPLA-MED, Pg-72-86.
- OECD. (2001). *Guideline for testing of chemical*. Organization for Economic Cooperation and Development. Guide 404,425.p.
- Kofman, O. (2002). The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 457 – 470.
- Teague,C.R., Dhabhar, F.S., Barton, R. H., Beckwith-Hall, B., Powell, J., Cobain, M., et al.(2007). Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in Sprague-Dawley rats. *Journal of Proteome Research* 6: 2080 – 2093.
- Ottenweller, J. E. (2000). *Animal Models (Nonprimate) for Human Stress*. Encyclopedia of Stress. Academic Press. Fink. San Diego, sp.
- Camargo, M. F., Berdeja, B., & Miranda, G. (2004). Diuretic effect of the aqueous extract of *Bidens odorata* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* 95: 363 – 366.
- Maghrani, M., Zeggwagh, N., Halqui, M., & Eddouks, M. (2005). Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 31 – 35.
- Hernan, J., Palacios, M., & Gutierrez, O. (2006). Efecto diurético de la especie *Salvia scutellarioides* en ratas. *Biomédica* 26 (1): 145 – 149.
- Arteche, A., Vanaclocha, B., & Guenechea, J. (1998). *Vademécum de prescripción. Plantas medicinales*. 3ª ed. Barcelona, Masson. sp.
- Cañigueral, S., Vila, R., & Wichtl, M. (1998). *Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y tisanas*. Milano: OEMF, 606 págs. ISBN: 0-8493-7192-9.