

U N I V E R S I D A D N A C I O N A L D E L A P L A T A

F A C U L T A D D E C I E N C I A S V E T E R I N A R I A S

ESTUDIO QUIMICO - TOXICOLOGICO

DE

ASTRAGALUS DISTINENS MACLOSKIE

Y

ASTRAGALUS BERGII HIERONIMUS

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

presentado por el

MEDICO VETERINARIO RICARDO LUIS SAGER

para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TRABAJO REALIZADO EN:

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL

ESTACION EXPERIMENTAL AGROPECUARIA SAN LUIS (INTA)

VILLA MERCEDES (SAN LUIS)

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA

FACULTAD DE QUIMICA, BIOQUIMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

ASESOR CIENTIFICO

Prof. Dr. MATIAS NIETO

Departamento de Química Orgánica

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional de San Luis

DEDICADO A

MI ESPOSA E HIJOS

MI MADRE

LA MEMORIA DE MI PADRE

El autor de este trabajo

expresa su agradecimiento a:

- Personal Docente y Auxiliar del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis

- Integrantes del Laboratorio de Diagnóstico en Sanidad Animal del INTA, Villa Mercedes

- y a todos aquellos que me han sabido escuchar y apoyar durante el desarrollo de este trabajo

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Rector: Ing. Qco. RAUL ADOLFO PESSACQ

Secretario General: Ing. Qco. PABLO OSCAR LUCHESSI

Secretario de Asuntos Legales: Abog. MARCELO MIGUEL VAMPA

Secretario de Asuntos Económico-Financieros: Cont. ALDO ROSSI

Guardasellos: Ing. Agr. ANDRES RINGUELET

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Decano Normalizador: Méd. Vet. ALBERTO RICARDO DIBBERN

Vicedecano: Méd. Vet. HORACIO NORBERTO GARCIA VALENTI

Secretario de Asuntos Académicos: Méd. Vet. ESTEBAN URANGA

Secretario Administrativo: Sr. OMAR HUGO RAMIREZ

Directora de Enseñanza: Sra HAYDEE C.R. DE PERETTO

Directora de Biblioteca: Sra. MARTA BERARDI

Director Económico-Financiero: Sr. HECTOR S. MOREIRA

NOMINA DE PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS

Profesor Titular "Dedicación Exclusiva"

ANGULO, Eusebia	Investigadora	Titular
CARROZA, Jesús S.W.	Int. a la Biofísica	Titular
GALLO, Guillermo G.	Clín. Grandes Animales	Titular
MARTIN, Alcides A.	Anát. y Fisiol. Patológic.	Titular
MENENDEZ, Néstor A.	Patolog. Aves y Pilíf.	Titular
PRACCA, Lydia C.	Clín. Pequeños Animales	Titular
QUINTEROS, Indalecio R.	Genética y Biometría	Titular
ZACCARDI, Eduardo M.	Fisiología	Titular

Profesor Titular "Dedicación Tiempo Parcial"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiolog. Especial	Titular
ALBERDI, Cecilio	Tec. y Sanid. Alimentos	Titular
ANDREATTA, Jorge N.	Semiología y Propedeút.	Titular
BERTOLINI, José M.	Anatomía Comparada	Interino
DELPRATO, Ismael O.	Anat. Descript. y Topog.	EMERITO
JENSEN, Alicia D.	Bioestadística	Titular
LED, Jorge Eugenio	Parsit. y Enf. Parsit.	Interino-Lic.
MANZULLO, Alfredo	Inmunología I y II	EMERITO
MAROTTA, Eduardo G.	Zotec. Esp. I (OSC)	Titular
OCHOA, Mario E.	Director-Inst. S. Catalina	Interino
OTTINO, Julio F.	Histología y Embriología	Interino
PENNIMPEDE, Enrique F.F.	Inmunología Gral. Y Aplic.	Titular
PIOVANO, Nicolás M.	Int. a la Bioquímica	Titular
RODRIGUEZ, Benjamín	Zotec. Especial II (b. ye.))	Titular

Profesor Titular "Dedicación Simple"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiología Aplicada	Titular
ARGERI, Nelson J.	Análisis Clínicos I	Interino
ARGERI, Nelson J.	Análisis Clínicos II	Titular
BOCCIA, Francisco O.	Patolog. Q. y Podología	Interino
CARROZZA, Jesús S.W.	Física y Quím. Aplicada	Interino
de ANTONI, Graciela A.	Genética Microbiana	Titular
GIMENO, Emilio Juan	Higiene-Epid. y S. Pública	Titular
ISEAS, Fortunato B.	Patología Médica	Interino
MARTIN, Alcides A.	Patología General	Titular

Profesor Titular- "Dedicación Simple"

MARTINO, Otindó A.L.	Salud Pública	Titular
OSTROWSKI, Jorge E.B.	Patología D.1. Reprod.	Titular
PANZONI, Erico E.	Economía Agraria	Titular
PEROTTI, Rodolfo M.	Zootec.Eso,III(a. y p.)	EMERITO
SCIAMMARELLA, Alfredo M.	Medicina Operatoria	Interino

Profesor Adjunto "Dedicación Exclusiva"

BOCCIA, Francisco O.	Clín. Pequeños Animales	Reemplaz.
BRANDETTI, Eugenio	Patolog. de Aves y Pilíf.	Reemplaz.
ERRECALDE, Jorge O.	Farmacolog.F; y Terapéutic.	Interino
IDLART, Julio R.	Anat. y Fisiolog. Patológ.	Titular
LAGRECA, Liliana	Zootec.General y Agrost.	Titular
MONNINA, Marta I.	Clínica Grandes Animales	Interino

Profesor Adjunto "Dedicación Tiempo Parcial"

DIBBERN, Alberto R.	Zootec. Especial II (B y E)	Interino-Lic.
DURANTE, Eduardo J.	Servicio C. de Cirugía	Interino
FELDMAN, Raquel E.	Parasitología Comparada	Titular
FERNANDEZ DE LIGER, José H.	Clínica Grandes Animales	Titular-Lic.
FERNANDEZ, Enrique J.	Enfermedades Infecciosas	Interino
GIMENO, Eduardo J.	Patología General	Titular
GOMEZ, Carlos M.	Inmunología Gral. y Aplic.	Interino
GRILLO, Virginia E.	Zootec.Especial III(A y P)	Interino
MAGGI, Nilda B.	Servicio C. de Cirugía	Reemplaz.
MARTINO, Juan J.	Microbiología	Titular
NOIA, Miguel A.	Int. a la Biofísica	Titular
NOVARINI, Miguel A.	Farmacología F. y Terap.	Interino
ORTEGA, César F.	Semiología y Propedeút.	Titular
PENNIMPEDE, María T. del A.	Tecnología y S. Aliment.	Titular
REINOSO, Enso H.	Micología Médica e Ind.	Interino
RUAGER, Jorge	Anatomía y Fisiolog. Pat.	Titular
REPETTO SANCHEZ, Olindo	Medicina Operatoria	Reemplaz.

Profesor Adjunto "Dedicación Simple"

BACIGALUPO, Néstor F.	Tec.y Sanidad de los Alim.	Titular
BRAVO BARDALES, Tomás	Economía Agraria	Reemplaz.
ETCHEVERRIGARAY, María E.	Virología	Titular

Profesor Adjunto "Dedicación Simple"

FINOCHIETTO, Héctor D.	Patología Médica	Interino
GOMEZ, Carlos M.	Inmunología II	Interino
MAGGI, Nilda B.	Patología Quirúrg. y Pod.	Interino
MALIANDI, Florestán S.(h)	Higiene, Epid. y S. Pública	Titular
MOISO, Alejandro	Microbiología	Titular
OLIVA, Graciela A.	Virología	Interino
PRILO LOFEUDO, Graciela E.	Zootecnia Esp.III(A y P)	Interino
RADMAN, Nilda E.	Parasit. y Enferm. Parasit.	Reemplaz.
RENNER, Juan F.	Clínica Grandes Animales	Interino
ROJAS, Edmundo R.	Fisiología	Titular
RUTTER, Bruno	Patolog. d.1.Rep. y Obst.	Titular
TARSIA, Elba E.	Int. a la Biofísica	Titular
TESORIERO, Catalina	Microbiología Especial	Interino
VENTURINI, Licila M.	Parasit. y Enfermed. Paras.	Interino
VILLAR, Martha E.	Análisis Clínicos I Pte.	Interino
VILLAR, Martha E.	Análisis Clínicos II Pte.	Interino
YANNARELLA, Francisco G.	Parasitología y Enferm Paras.	Interino

" Falsas pistas llevaban a engañosos prados
donde el garbancillo envenenaba a las bes
tias..."

Pasaje de "La Guerra Gaucha" de Leopoldo Lugo
nes, su hijo anota "Garbancillo: pasto regio-
nal, aunque también abunda en otras zonas del
país...."

INDICE GENERAL

I. <u>INTRODUCCION</u>	1
I.A. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	
I.A.I. <u>DESCRIPCION BOTANICA</u>	2
I.A.II. <u>PRINCIPIOS TOXICOS DEL GENERO ASTRAGALUS</u>	6
1- <u>Saponinas</u>	7
2- <u>Acido cianhídrico</u>	8
3- <u>Selenio</u>	9
4- <u>Nitrocompuestos orgánicos</u>	12
5- <u>Otros</u>	24
II. <u>OBJETIVOS</u>	26
III. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	29
III.A. <u>ESTUDIO DE ASTRAGALUS DISTINENS MACLOSIE</u>	
III.A.I. <u>Acondicionamiento del material vegetal</u>	30
III.A.II. <u>Ensayo de toxicidad del extracto acuoso total</u>	32
1) <u>Preparación de la solución acuosa total</u>	32
2) <u>Dosificación de la solución acuosa total</u>	32
III.A.III. <u>Ensayo de ácido cianhídrico</u>	33
1) <u>Ensayo cualitativo</u>	33
a- <u>Técnica de papel picrosódico</u>	33
- <u>Reactivos utilizados</u>	33
- <u>Desarrollo de la técnica</u>	33
b- <u>Técnica del Azul de Prusia</u>	33
- <u>Extracción de ácido cianhídrico por destilación simple</u> ,.....	33
2) <u>Determinación cuantitativa</u>	34
- <u>Preparación de Reactivos</u>	34
- <u>Extracción de ácido cianhídrico por digestión y destilación</u>	35
3) <u>Obtención de ácido cianhídrico para determinación de Dosis Tóxica 50 y Dosis Letal 50</u>	35

III.A.IV. <u>Ensayo de saponinas</u>	36
1) <u>Ensayo cualitativo</u>	36
a- Índice de espuma	36
Preparación del extracto vegetal	36
Preparación de las diluciones	36
b- Índice hemolítico	36
Preparación de la suspensión de glóbulos rojos.....	36
Preparación de la solución fisiológica isotónica	37
Preparación del extracto vegetal.....	37
2) <u>Determinación cuantitativa</u>	37
3) Obtención de saponinas para la determinación de Dosis Tóxica y Dosis Letal 50	38
III.A.V. <u>Ensayo de Selenio</u>	39
1) <u>Determinación cuantitativa</u>	39
a- Preparación de reactivos	39
b- Desarrollo de la técnica	40
2) <u>Obtención de Selenio para determinación de Dosis Tóxica y Dosis Letal 50.</u>	41
III.A.VI. <u>Ensayo de nitrocompuestos orgánicos</u>	42
1) <u>Ensayo cualitativo</u>	42
a- Determinación por Reactivo de Griess-Ilosvay	42
b- Determinación por cromatografía en capa fina	43
2) <u>Determinación cuantitativa</u>	44
3) <u>Extracción, aislamiento y purificación de nitrocompues- tos orgánicos con fines de identificación y determina- ción de Dosis Tóxica y Dosis Letal 50</u>	50
a- Acondicionamiento de la muestra previo a la extracción	50
b- Extracción de nitroderivados totales.....	50
c- Cromatografía en capa fina	52
- Descripción de reactivos y equipos	52
d- Reveladores para cromatografía en capa fina.....	53
e- Cromatografía en columna	53
- Descripción de reactivos y equipos	53
1- Solventes a utilizar	54

2- Montaje de columnas cromatográficas	55
3- Purificación y estudio de fracciones obtenidas ...	56
III.A.VII. <u>Ensayos extractivos de productos de baja polaridad</u> <u>(terpenos-esteroles) y alcaloides</u>	58
a- <u>Acondicionamiento de la muestra previo a la extracción</u>	58
b- <u>Extracción de terpenos-esteroles y de alcaloides</u>	58
c- <u>Cromatografía en capa fina, Reveladores</u>	58
d- <u>Cromatografía en columna</u>	59
e- <u>Purificación de las fracciones obtenidas</u>	60
III.B. <u>ESTUDIO DE ASTRAGALUS BERGII HIERONIMUS</u>	
III.B.I. <u>Acondicionamiento del material vegetal</u>	62
III.B.II. <u>Ensayo de Toxicidad del extracto acuoso total</u>	62
III.B.III. <u>Ensayo de ácido cianhídrico</u>	62
III.B.IV. <u>Ensayo de saponinas</u>	62
III.B.V. <u>Ensayo de selenio</u>	62
III.B.VI. <u>Ensayo de nitrocompuestos orgánicos</u>	62
III.B.VII. <u>Ensayo sobre productos de baja polaridad</u> <u>(terpenos-esteroles) y alcaloides</u>	62
III.C. <u>DETERMINACION DE DOSIS TOXICA 50 Y DOSIS LETAL 50</u>	
III.C.I. <u>Determinación de Dosis Tóxica 50 (DT-50)</u>	63
III.C.II. <u>Determinación de Dosis Letal 50 (DL-50)</u>	63
IV. <u>RESULTADOS OBTENIDOS</u>	
IV.A. <u>RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ASTRAGALUS DISTINENS MACLOSIE</u>	66
IV.A.I. <u>Ensayo de toxicidad del extracto acuoso total</u>	66
IV.A.II. <u>Ensayo de ácido cianhídrico</u>	68
1- <u>Ensayo cualitativo</u>	68
2- <u>Ensayo cuantitativo</u>	68
3- <u>Obtención de ácido cianhídrico para determinación</u> <u>de dosis</u>	68
IV.A.III. <u>Ensayo de saponinas</u>	69
1- <u>Ensayo cualitativo</u>	69

a- Índice de espuma	69
b- Índice hemolítico	69
2- <u>Determinación cuantitativa</u>	69
3- <u>Obtención de saponinas para determinación de dosis</u>	69
IV.A.IV. <u>Ensayo de Selenio</u>	70
1- <u>Determinación cuantitativa</u>	70
2- <u>Obtención de Selenio para determinación de dosis</u>	70
IV.A.V. <u>Ensayos de nitrocompuestos orgánicos</u>	71
1- <u>Ensayo cualitativo</u>	71
a- Análisis por reactivo de Griess-Ilosvay	71
b- Cromatografía en capa fina.....	71
2- <u>Determinación cuantitativa</u>	72
3- <u>Extracción, aislamiento y purificación de nitrocompuestos orgánicos</u>	73
a- Acondicionamiento de la muestra previo a la extracción.....	73
b- Extracción de nitroderivados totales.....	74
c- Cromatografía en columna de sílicagel H del residuo de nitroderivados.....	74
d- Fracciones obtenidas y su purificación	75
4- <u>Estudio de las fracciones obtenidas. Identificaciones</u>	
a- Estudio de fracciones 58-72. Identificación de Miserotoxina.....	77
b- Estudio de fracciones 4-8. Identificación de 3-nitro-1-propanol.....	81
5- <u>Aporte de nuevos sistemas de solventes para cromatografía en capa fina</u>	85
6- <u>Extracción e identificación de 3-nitro-1-propanol y Miserotoxina en Astragalus miser</u>	87
a- Acondicionamiento del material vegetal.....	87
b- Procesamiento del material vegetal.....	87
c- Fracciones obtenidas. Identificaciones.....	88

IV.A.VI. <u>Ensayos de productos de baja polaridad (terpenos-esteroles) y alcaloides</u>	91
1- <u>Procesamiento del extracto clorofórmico</u>	91
a- Cromatografía en columna	91
b- Fracciones obtenidas.....	92
2- <u>Procesamiento del extracto metanólico</u>	92
a- Purificación del residuo obtenido.....	92
b- Cromatografía en columna del residuo obtenido en 2-a-!....	93
c- Fracciones obtenidas, Identificaciones.....	93
IV.B. <u>RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ASTRAGALUS BERGII HIERONIMUS</u>	95
IV.B.I. <u>Ensayo de toxicidad del extracto acuoso total</u>	95
IV.B.II. Ensayo de ácido cianhídrico	96
IV.B.III. Ensayo de saponinas.....	96
IV.B.IV. Ensayo de Selenio.....	97
IV.B.V. Ensayo de nitrocompuestos-orgánicos.....	98
1- <u>Ensayo cualitativo</u>	98
a- Técnica del reactivo de Griess-Ilosvay.....	98
b- Cromatografía en capa fina.....	98
2- <u>Determinación cuantitativa</u>	99
3- <u>Extracción, aislamiento y purificación de nitrocompuestos orgánicos</u>	100
a- Acondicionamiento de la muestra previo a la extracción...	100
b- Extracción de nitroderivados totales.....	100
c- Cromatografía en columna de sílicagel H del residuo de nitroderivados totales.....	100
d- Fracciones obtenidas y su purificación. Identificaciones..	101
IV.B.VI. <u>Ensayo de productos de baja polaridad (terpenos-esteroles)-y alcaloides</u>	102
1- <u>Procesamiento del extracto clorofórmico</u>	102
a- Cromatografía en columna	102
b- Fracciones obtenidas. Identificaciones.....	102
2- <u>Procesamiento del extracto metanólico</u>	103
a- Cromatografía en columna del residuo obtenido.....	103

b- Fracciones obtenidas y su purificación. Identificaciones.....	104
IV.C. <u>RESULTADOS DE LOS ENSAYOS PARA DETERMINAR DOSIS TOXICA 50 Y DOSIS LETAL 50</u>	105
IV.C.I. <u>Determinación de Dosis Tóxica 50 (DT-50)</u>	106
IV.C.II. <u>Determinación de Dosis Letal 50 (DL-50)</u>	108
V. <u>DISCUSION DE RESULTADOS</u>	110
V.A. <u>Ensayo de toxicidad del extracto acuoso total</u>	111
V.B. <u>Ensayo de ácido cianhídrico</u>	113
V.C. <u>Ensayo de saponinas</u>	114
V.D. <u>Ensayo de Selenio</u>	115
V.E. <u>Ensayo de nitrocompuestos orgánicos</u>	116
V.F. <u>Ensayos sobre productos de baja polaridad (terpenos- esteroles) y alcaloides</u>	118
V.G. <u>Ensayos de determinación de Dosis Tóxica 50 y Dosis Letal 50</u>	119
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	121
VII. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	122
VIII. <u>INDICE DE TABLAS</u>	128
IX. <u>INDICE DE FIGURAS</u>	129

ESTUDIO QUIMICO TOXICOLOGICO DE ASTRAGALUS DISTINENS MACLOSKIE
Y ASTRAGALUS BERGII HIERONIMUS.

RESUMEN.

El estudio de Astragalus distinens Macloskie y Astragalus bergii Hieronimus surge de la necesidad de aportar soluciones a problemas de intoxicación de bovinos y ovinos que se producen anualmente en el sur de la Provincia de San Luis.

La especie identificada como causante de estas intoxicaciones es A. distinens M. incluyéndose también en este estudio a A. bergii por compartir el área de distribución y por que ambas especies son muy similares.

La búsqueda de compuestos tóxicos se realizó en base a la información bibliográfica consultada y que indica la presencia de ácido cianhídrico, saponinas y selenio. Paralelamente se incluyen nitrocompuestos orgánicos alifáticos que han sido identificados en especies extranjeras de Astragalus.

Los resultados obtenidos a través de técnicas cualitativas, cuantitativas, extractivas y espectrométricas indican sólo la presencia de Miserotoxina (β -D glucósido de 3-nitro-1-propanol) en ambas especies.

Los ensayos del producto confirmaron la toxicidad de estos compuestos y la determinación de dosis indican 33,63 mg/kg de peso de 3-nitro-1-propanol como Dosis Tóxica 50 y 169,17 mg/kg de peso de 3-nitro-1-propanol como Dosis Letal 50.

CHEMICAL TOXICOLOGICAL STUDY OF ASTRAGALUS DISTINENS MACLOSKIE
AND ASTRAGALUS BERGII HIERONIMUS.

ABSTRACT.

The study on Astragalus distinens Macloskie and Astragalus bergii Hieronimus arises from the necessity of giving a solution to the problems of poisoning in bovine and ovine that are produced yearly in the southern part of the San Luis Province.

The species that was identified as the cause of these problems is A. distihens, but A. bergii has been included because both species share the same distribution area and also because both of them are quite similar.

The search for its toxic compounds was done on the basis of the information reviewed, that says that they have hydrocyanic acid, saponins and selenium. Also aliphatic nitrocompounds, that were identified in various Astragalus species from abroad, were included.

The results obtained in both species, through qualitative quantitative, extractive and spectrometric technics, only show the presence of a nitrocompound named Miserotoxin (3-nitro-1-propyl -D-glucopyranoside).

Toxicological studies confirmed the toxicity of this compound and dosis determination indicates, 33.63 mg/kg of body weight of 3-nitro-1-propanol as Toxic Dose 50 and 169.17 mg/kg of body weight of 3-nitro-1-propanol as Letal Dose 50.

I.- INTRODUCCION

I.A. REVISION BIBLIOGRAFICA

I.A.I. DESCRIPCION BOTANICA

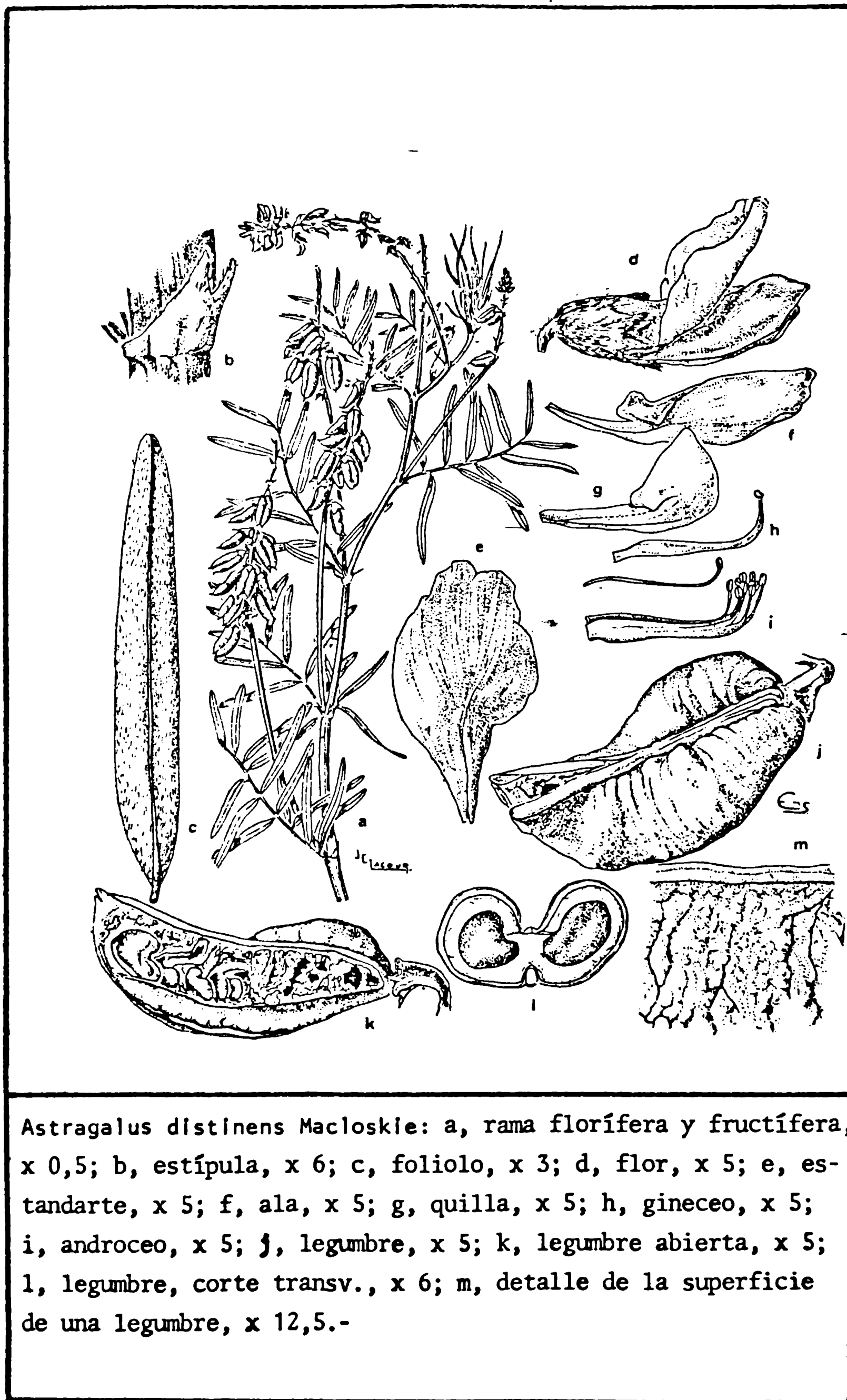
El género Astragalus: subfamilia Papilonoidea, tribu de las Galegeas es el más rico dentro de la familia de las Leguminosas; consta de más de mil quinientas especies (1).

Etimológicamente el término Astragalus deriva del griego y significa "hueso del anca", probablemente debido a la forma de algunas semillas de especies que crecen en zonas aledañas al mar Mediterráneo (2).

En nuestro país el género se extiende desde Jujuy a Tierra del Fuego, desplazándose al este hacia Córdoba, La Pampa y Buenos Aires (1).

El Astragalus distinens M., Fig. N° 1(1), es una hierba perenne, leñosa, de tallos decumbentes de 20 a 50 cm de longitud, suavemente estriados, rala y finamente blanco estrigosos con entrenudos de 2 a 7 cm de longitud, hojas de 4 a 8 cm de longitud incluyendo el pecíolo de 0,25 a 2 cm de largo; estípulas pequeñas de 2 a 4 mm de longitud, aplexicaules; profundamente bidentadas, subuladas, membranáceas, ciliadas y raramente estrigosas; folíolos con 5 a 8 yugos impares de 13 a 23 mm de longitud por 1,5 a 2,5 mm de ancho, oblongolineares, obtusos membranosos, de superficie adaxial raramente estrigosa o glabrescente y la abaxial glabrescente, planos cuando jóvenes con el margen involuto. Pedúnculos de 3 a 7 cm de longitud, mayores que las hojas, con racimos densos, de 15 a 30 flores en la mitad o tercio superior, de 4 a 6 cm de longitud, brácteas lanceoladas de 1 a 2 mm de longitud; bractéolas de 0,2 a 0,5 cm de longitud. Flores azul violáceas, brevipediceladas: cáliz campanulado, estrigoso de 3 a 3,5 mm de longitud, con dientes agudos un poco menores que el tubo, de 2 mm de longitud; estandarte oblongo-oval, de bordes reflejos de 6,5 a 8 mm de largo por 4 a 5 mm de ancho; alas de 6,5 a 8 mm de longitud por 1 a 2 mm de latitud; elípticas con ápice aguzado y generalmente enrollado; quilla truncada de 4,5 a 5,5 mm de longitud, pedúnculos adosados al raquis, ovario lineal pubescente a glabro, estambres y estilos incurvos en el ápice. Frutos aglomerados en la base del raquis, distanciados entre sí por 2 a 5 mm con pedicelos de 2 mm, pedúnculos adosados al raquis. El fruto o legumbre, subilocular de 10 a 12 mm de lon-

Figura N° 1: *Astragalus distinens* Macloskie.



Astragalus distinens Macloskie: a, rama florífera y fructífera, x 0,5; b, estípula, x 6; c, foliolo, x 3; d, flor, x 5; e, estandarte, x 5; f, ala, x 5; g, quilla, x 5; h, gineceo, x 5; i, androceo, x 5; j, legumbre, x 5; k, legumbre abierta, x 5; l, legumbre, corte transv., x 6; m, detalle de la superficie de una legumbre, x 12,5.-

gitud por 2,5 a 3 mm de latitud, ovoide, oblonga, coriácea turgente, glabrescente o glabra, de base ancha redondeada visiblemente convexa a ambos lados de la sutura dorsal y ventral en la mitad basal, ápice aguzado; en vista lateral falcada, sutura dorsal invaginada, con reborde membranoso de 0,2 a 0,5 mm de ancho, superficie interna del fruto recubierta con un tejido de aspecto telareñoso. Cantidad de semillas doce, reniformes (1).

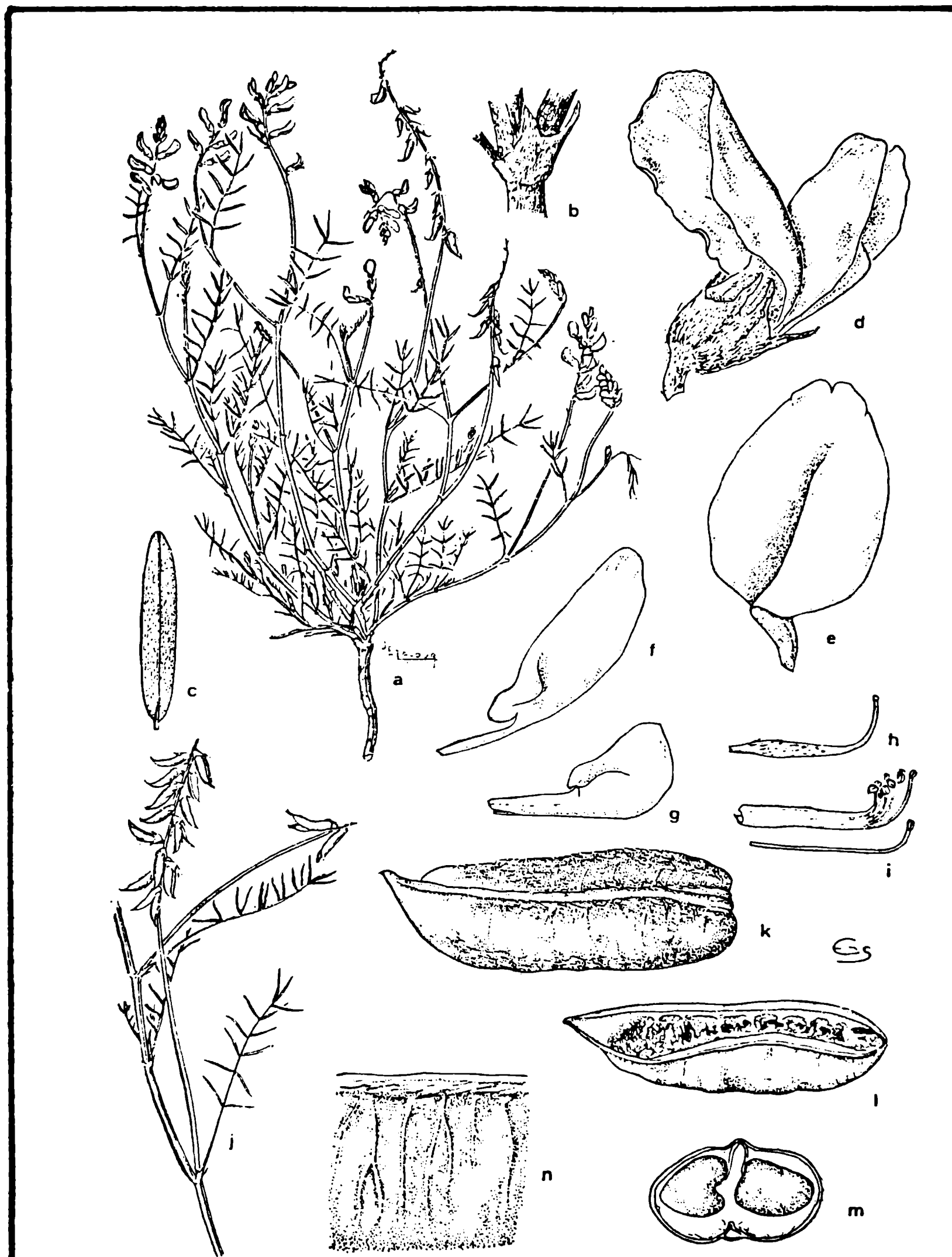
Sus habitats son lugares secos, arenosos, estepas gramíneas altoserranas y barrancas calcáreas y arcillosas. Florece y fructifica desde Octubre a Enero. Se lo encuentra en las Provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, San Luis, Catamarca, Córdoba, San Juan, Mendoza, La Pampa y Buenos Aires (1).

El Astragalus bergii H.; Fig. N° 2(1), fue considerado por mucho tiempo y por diversos autores como una especie idéntica al A. distinens, pero últimamente la mayoría de éstos coinciden en clasificarla como una especie muy afín pero diferente, criterio éste que se adopta debido a que existen diferencias estables a nivel carpológico y floral (1).

Estas diferencias son: la base de la vaina del A. bergii es redondeada, con la sutura placentar o ventral engrosada en forma de cordón, la que se mantiene sobresaliente, sin estar / nunca en el fondo de un surco como en el A. distinens, por otra parte la vaina es más pequeña y en vista lateral más o menos recta con el ápice suavemente incurvo. Estos caracteres están reforzados por los folíolos más pequeños que nunca se observaron con la lámina totalmente abierta, como ocurre generalmente con el A. distinens, el menor tamaño de los ejemplares y el menor número de flores y frutos (1).

En nuestro país estas especies reciben los nombres vulgares de Garbancillo, Yerba Loca (1,3) y Pasto Asma.

Figura N° 2: *Astragalus bergii* Hieronimus.



Astragalus bergii Hieron: a, planta florífera y fructífera, x 0,5; b, estípula, x 6; c, folíolo, x 3; d, flor, x 5; e, estandarte, x 5; f, ala, x 5; g, quilla, x 5; h, gineceo, x 5; i; androceo, x 5; j, rama fructífera, x 0,5; k, legumbre, x 5; l, legumbre abierta, x 5; m, legumbre, corte transv., x 5; n, idem, detalle de la superficie, x 12,5.

I.A.II. PRINCIPIOS TOXICOS DEL GENERO ASTRAGALUS

La toxicidad de los Garbancillos es señalada por primera vez en nuestro país en 1879 por Grisebach (3) quien manifiesta que el A. garbancillo Cav., es una planta tóxica para el ganado.

Hieronimus en 1882 (3) corrobora esta opinión diciendo que esta especie es conceptuada tóxica, que hace enfurecer y temblar a los animales que la ingieren.

Giusti en 1932 (4) informa de una enfermedad en bovinos producida en la provincia de San Luis, cuya sintomatología hacía suponer una intoxicación: la misma fue atribuída a la ingestión de A. bergii, muy difundido en la zona de Travesía (Departamento Gobernador Dupuy, S.L.)

Este autor realiza experiencias con material proveniente de esos lugares y determina que por lo general los animales rehusan comerla y cuando lo hacían, a desgano, se producían alteraciones orgánicas pasajeras, nunca letales. Los cocimientos de frutos al 10% inyectados por vía venosa fueron más tóxicos que los preparados con hojas a igual concentración (4).

En 1934 el mismo autor informa los resultados de una serie de ensayos que muestran que los equinos y porcinos comen la planta espontáneamente sin alteraciones orgánicas aparentes, / mientras que los ovinos la consumen a desgano presentando convulsiones intensas falleciendo a los veinticinco días de tratamiento. Las lesiones encontradas en las necropsias fueron congestión de pulmón e hígado, enrojecimiento de la mucosa gástrica con edema de las tónicas y extravasaciones sanguíneas. Los caprinos fueron los más sensibles y murieron a las cuarenta y ocho horas de la ingestión. Como conclusión determinó que sobresalen alteraciones de tipo nervioso, pero que no pueden generalizarse debido a que su acción ha sido heteróloga, variando el efecto según las muestras empleadas y las especies animales estudiadas (5).

1.- Saponinas

Awschalon en 1928 (3) realiza investigaciones sobre los principios tóxicos del *Astragalus garbancillo*, llegando a la conclusión que posee dos saponinas de carácter glicosídico.

Gallo (6) menciona que las saponinas se encuentran dentro de los compuestos tóxicos del *A. bergii* y determina que pueden ser mortales a dosis de 1 mg por kg. de peso.

- - Las saponinas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y han sido identificadas en más de mil especies botánicas pertenecientes a ochenta familias diferentes, de éstas la más importante es Leguminosae y sus principales géneros y especies son *Medicago sativa*, *M. hispida*, *Trifolium repens*, *T. fragiferum* y *Lotus corniculatus* (7).

Químicamente las saponinas son glicósidos que por hidrólisis dan azúcares (pentosas, hexosas y ácido urónico) y agliconas, que derivan de anillos policíclicos y son llamadas geninas. Las saponinas halladas en las leguminosas son triterpenos pentacíclicos que derivan del oleanano (7).

Las saponinas se caracterizan sobre la base de su propiedad común, actividad de superficie (batótona); que se expresa en la disminución de la tensión superficial; su capacidad de formar espuma estable y producir lisis de los glóbulos rojos (7).

Según las condiciones experimentales las saponinas pueden presentar una amplia variación en su actividad biológica; por ejemplo, en ensayos de laboratorio realizados con saponinas puras, se puede evidenciar un alto grado de toxicidad, mientras que en el campo la ingestión directa de plantas que poseen saponinas, no llega a producir tales efectos en razón de factores limitantes tales como baja tasa de absorción, inactivación por combinación con otras sustancias o por acción de microorganismos intestinales que transforman la saponina en derivados inactivos y asimismo al desarrollo de tolerancia por parte del animal (7).

2.- Acido cianhídrico

El ácido cianhídrico fue aislado por primera vez por Scradner en 1802 (8). Actualmente se conocen diecisiete glicósidos y lípidos cianogenéticos, todos derivados del alfa-hidroxi nitrilo. Los glicósidos se encuentran en más de mil especies / de las familias Rosaceae, Passifloraceae, Graminae y Leguminosae (7).

La primera mención que existe sobre los principios / tóxicos del *A. bergii* se debe a Giusti (9), quien atribuye su toxicidad a la presencia de un glicósido cianogenético, lo que parece confirmarse por los excelentes resultados obtenidos al tratar a los animales intoxicados con nitrito e hiposulfito de sodio.

Gallo (6) hace referencia a la variación en el contenido de ácido cianhídrico en esta especie de acuerdo a las variaciones climáticas de la región y a las distintas partes del vegetal, siendo los frutos lo que presentan una mayor concentración de los mismos.

Los glicósidos cianogenéticos son productos naturales que por hidrólisis liberan azúcar y ácido cianhídrico y son considerados metabolitos secundarios de la planta ya que no se han demostrado sus funciones metabólicas y debido a que pocas variedades de plantas lo contienen (7).

La posibilidad de producir intoxicación depende de su concentración en la planta y de la velocidad con que es ingerido (7). La dosis letal mínima de ácido cianhídrico para ovinos dada por Coop y Blakely es de 2 a 4 mg por kg de peso por día (7). En pastoreo normal, donde la ingestión es lenta, los ovinos pueden soportar hasta 20 mg por kg de peso por día (7).

3. - Selenio

El Selenio es otro de los tóxicos que se han identificado en especies del género *Astragalus*. Algunas de estas especies se conocen como indicadoras de Selenio de Beath, debido a que crecen en suelos seleníferos. Su capacidad de producir intoxicación se debería a la cantidad de Selenio disuelto en el suelo, la concentración del mismo en el vegetal y la fase de crecimiento de éste (6,10). Algunos autores consideran que no son indicadoras sino convertidoras, ya que tendrían la capacidad de transformar el selenio del suelo no disponible para otras especies y convertirlo en disponible, pero no se sabe si esta capacidad se debe a algún proceso metabólico especial o a la acción de transporte que realizan sus raíces que alcanzan grandes profundidades (2).

En nuestro país Catáneo (11) ha efectuado estudios sobre la presencia de este tóxico en especies de *Astragalus* argentinos obteniendo resultados negativos.

En la Tabla N° 1 se presentan las especies que poseen Selenio en concentraciones que pueden resultar tóxicas. Este grupo puede acumular Selenio en concentraciones superiores a mil partes por millón.

TABLA N° 1: Especies de Astragalus que poseen Selenio.

N°	Especies de Astragalus	Ref.
1	asper Jacq.	14
2	bisulcatus (H) Gray	2,12,14
3	boeticus (L)	14
4	corrugatus Bert.	14
5	camporum Benth ex. B.	14
6	crotalariae (B) Gray	12
7	cymbaecarpus Brot.	14
8	demetrii Charad.	14
9	edulis Dur. ex Coss	14
10	falcatus Lam.	14
11	filicaulis F & M	14
12	galegiformis (L)	14
13	glycyphyllos (L)	14
14	hamosus (L)	14
15	incanus (L)	14
16	katschyanus [*] Boiss	14
17	longiflorus Pall	14
18	onobrychis (L)	14
19	osterhouti Jones	12
20	pattersoni	2
21	pectinatus Dougl.	2,12
22	padocarpus Meyer	14
23	ponticus Pall	14
24	praelongus	11
25	prensii Gray	12
26	racemosus Pursh	2,12
27	sabulosus Jones	12
28	siliquosus Boiss	14
29	sinicus (L)	14
30	stipulatus Don.	14
31	striatus Nutt.	14
32	tephrosoides Boiss	14
33	toanus	11
34	tribuloides Delil	14

Se describen tres tipos de intoxicaciones producidas por plantas acumuladoras de selenio: Aguda, Crónica (Tipo de Enfermedad Alcalina) y Crónica (Blind stagger) (2).

-Aguda: poco frecuente debido a la baja palatabilidad y al olor desagradable que presentan las plantas que contienen altas concentraciones de tóxico. La sintomatología incluye movimientos y posturas anormales, diarrea acuosa, hiportemia, / frecuencia cardíaca aumentada, disnea, postración y muerte. Las lesiones patológicas están limitadas a los pulmones que se encuentran congestionados y edematosos.

-Crónica:(del tipo de la Enfermedad Alcalina), se debe a la ingestión prolongada de plantas que contienen entre 5 y 40 ppm de selenio. La sintomatología y lesiones que se encuentran en bovinos, equinos y porcinos son: pelo hirsuto, pérdida de vitalidad, laminitis debida a erosión de las articulaciones de los huesos largos de los miembros, pérdida del apetito, emaciación, los pelos largos de la cola y crin pueden caer, la disminución de la capacidad reproductiva es el principal efecto.

-Crónica:(denominada Blind stagger por los americanos) que resulta de la ingestión prolongada de bajo contenido de selenio. El ganado intoxicado se muestra vacilante, con incoordinación motora, capacidad visual disminuída y pérdida del apetito. La parálisis y los disturbios respiratorios preceden a la muerte. Varios autores coinciden en que habría otro tóxico involucrado en la producción de este síndrome, lo que etiológicamente lo diferenciaría del anterior (2;12;13).

En Leguminosas tales como *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Lolium perenne*, el selenio se encuentra formando aminoácidos, siendo el más frecuente la selenometionina, sin embargo estas especies no constituyen fuente de intoxicación en razón del bajo contenido de selenio que poseen. El *Astragalus bisulcatus* presenta Se-metilselenocisteína como aminoácido (7).

4.- Nitrocompuestos orgánicos

Los nitrocompuestos orgánicos alifáticos naturales tóxicos son conocidos desde hace poco tiempo y el número de ellos aislados e identificados hasta el presente es aún escaso.

Entre los derivados nitrados alifáticos que con mayor frecuencia han sido aislados de la naturaleza está el ácido 3-nitropropanoico.

Las agudas intoxicaciones causadas en el ganado y otros animales por la ingestión de leguminosas avivó el interés por el estudio de sus componentes tóxicos (15).

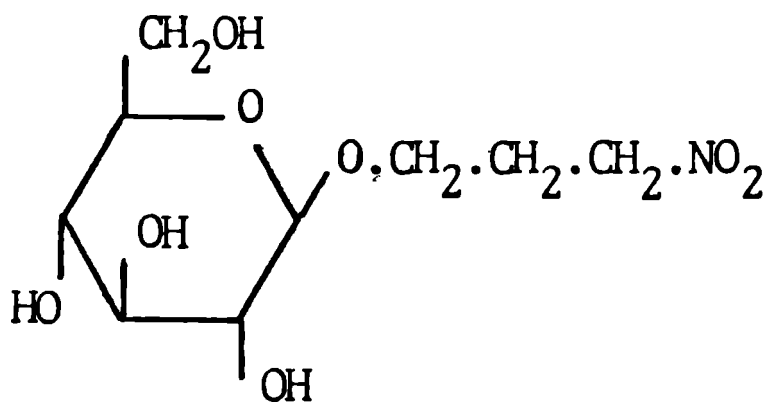
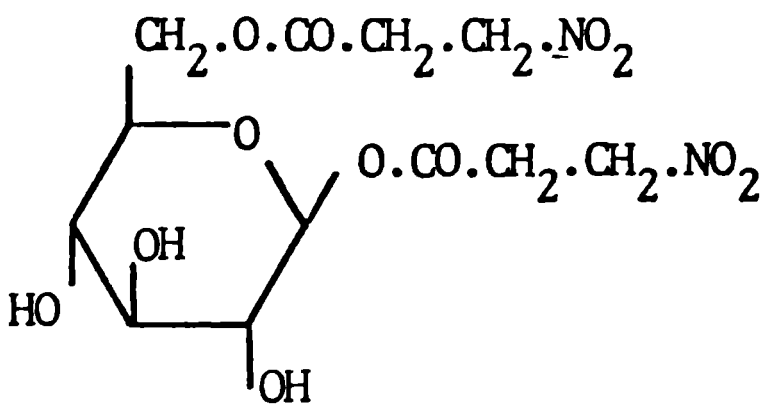
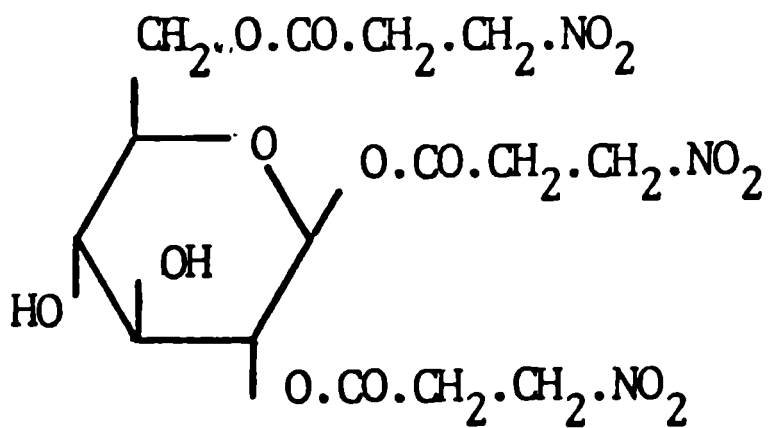
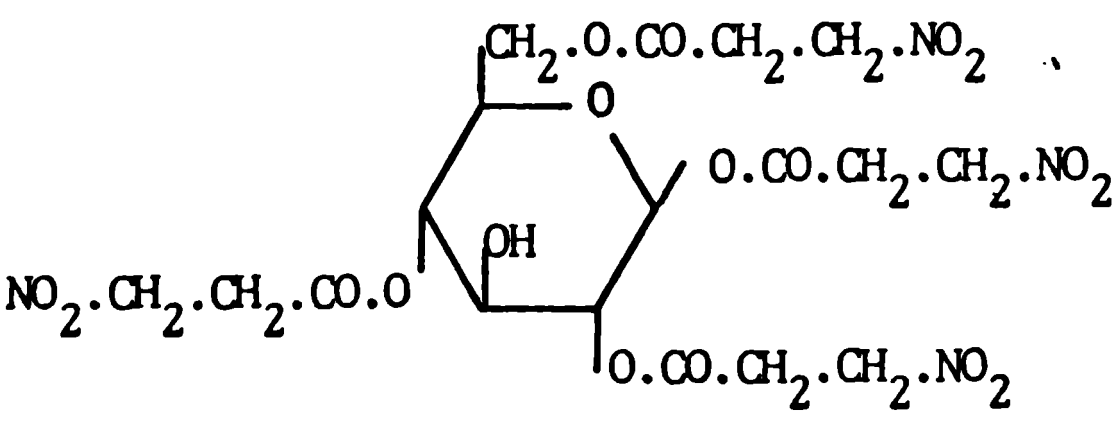
En 1969 Stermitz y Col. (16) aislaron a partir del *Astragalus miser* Dougl. var. *oblongifolius* (Rydb) Cronq., un nitrocompuesto al que denominaron Miserotoxina (β -D-glucósido de 3-nitro-1-propanol).

En especies de este género se aislaron posteriormente otros nitrocompuestos orgánicos alifáticos como el ácido 3-nitropropanoico, Karakina, Cibarian e Hiptagina (17,18). En la Tabla N° 2 se incluyen las fórmulas de los nitrocompuestos aislados de plantas del género *Astragalus*.

En nuestro país Coussio y Col. (19) investigaron especies autóctonas de *Astragalus* habiendo obtenido resultados positivos en sólo tres de ellas: *A. arnottianus* (Gill) Reiche, *A. bellus* (OK) Fries y *A. diminutinus* Johnst., no habiendo obtenido resultados positivos en *A. bergii* y *A. distinctus*. Posteriormente Williams (20) informa que estas dos especies en realidad contienen nitrocompuestos, como asimismo otras especies argentinas que habían resultado negativas anteriormente. Estas diferencias pueden deberse a que los trabajos se realizaron sobre material de herbario, que pertenecen a ejemplares individuales de la especie y a un ecosistema determinado, lo que puede dar lugar a resultados negativos por problemas de conservación, diferencias genéticas no específicas y diferentes estados fenológicos no determinados (21).

La biogénesis y el rol de estos compuestos en las plantas han sido varias veces supuesto, pero hasta el momento no ha podido aclararse satisfactoriamente. Los taxonomistas botánicos han encontrado cierta correlación positiva con respecto a los distintos nitrocompuestos que se aislaron de las diferentes especies de *Astragalus*.

Tabla N° 2: Nitrocompuestos aislados de especies del Género Astragalus

$\text{NO}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH}$	3-nitro-1-propanol	
$\text{NO}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$	ácido 3-nitropropanoico	
	Miserotoxina	
	Cibarian	
	Karakina	
	Hiptagina	

Hasta el momento se sabe que todos los nitrocompuestos orgánicos alifáticos al hidrolizarse liberan ácido 3-nitropropanoico o 3-nitro-1-propanol, pero nunca ambos, por lo que se está usando esta propiedad de biogénesis excluyente para clasificar las distintas especies de Astragalus según sus correspondientes secciones taxonómicas (46).

Las especies que contienen nitrocompuestos orgánicos son tipificadas en base a la intoxicación producida por A. miser (2, 12, 17, 22, 23) Los primeros informes de esta intoxicación datan de 1920, pero su tóxico, denominado Miserotoxina, como ya se mencionó, fue aislado y determinada su estructura en el año 1969 (16).

Con el objeto de conocer cuál era el comportamiento de estos tóxicos dentro del organismo animal se realizaron estudios que permitieron interpretar las intoxicaciones producidas por los nitrocompuestos orgánicos alifáticos. En la Tabla N° 3 (17, 24, 25, 26, 32) se esquematiza su metabolismo en rumiantes y monogástricos.

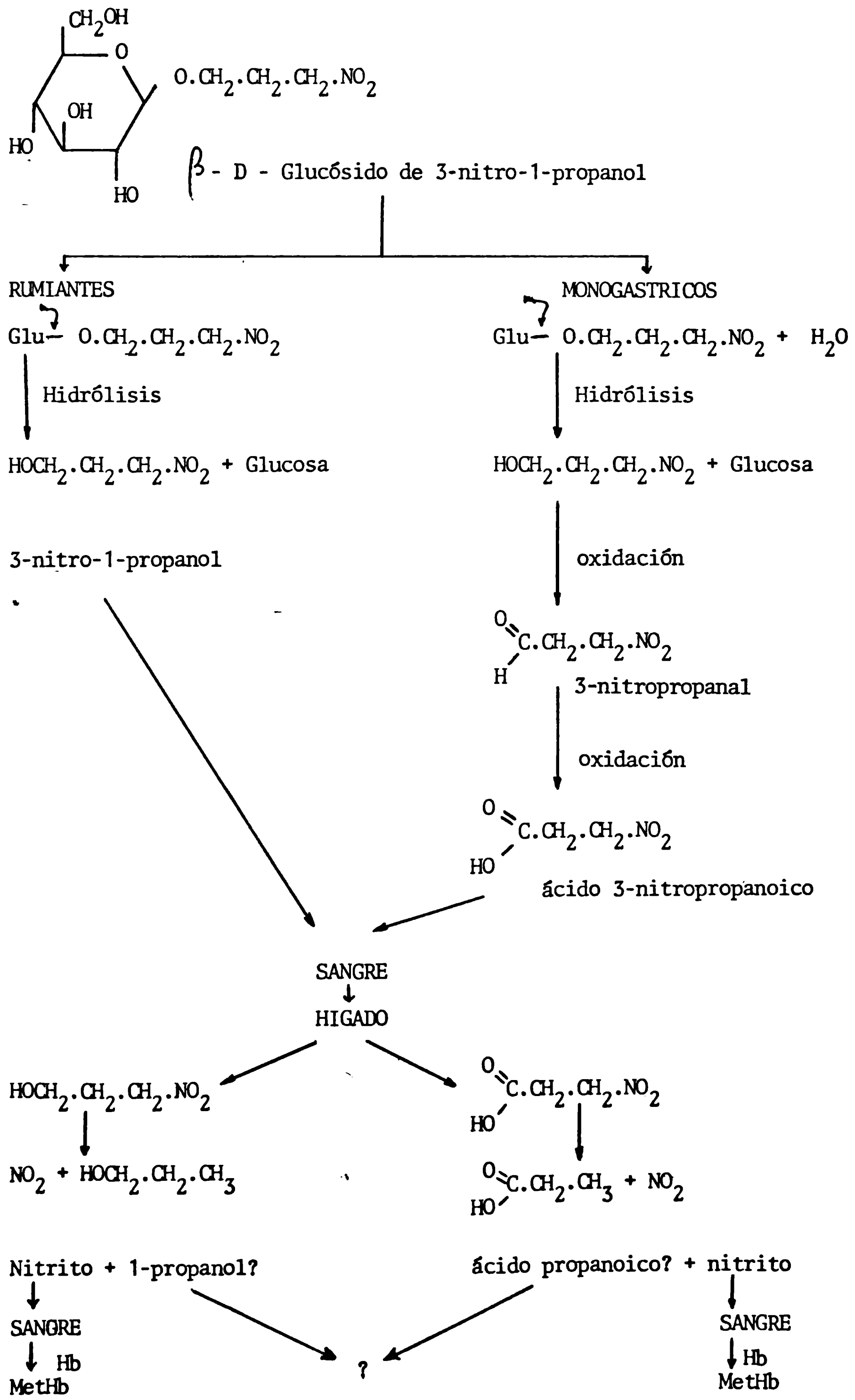
Se pudo determinar, a través de ensayos de digestibilidad in vitro que la Miserotoxina era hidrolizada a 3-nitro-1-propanol y glucosa (17, 24, 25, 26). Esto mismo pudo observarse cuando el tóxico era tratado con una solución ácida diluída (17).

El 3-nitro-1-propanol que se producía en la digestión ruminal no era degradado dentro de un plazo de 4 horas, por lo que se infirió que debía absorberse directamente. Se continuaron los estudios inoculando el alcohol nitrado por vía endovenosa, pudiéndose comprobar que el mismo desaparecía de la sangre en la misma proporción en que aumentaba la cantidad de metahemoglobina y nitritos (32). El elemento causante de este fenómeno era el grupo nitro que era separado del 3-nitro-1-propanol en un lugar distinto a la sangre (32).

Actualmente se sabe que el hígado, en un intento de destruir el compuesto tóxico, separa el grupo nitro del 3-nitro-1-propanol, desconociéndose hasta el momento qué camino sigue el resto de la molécula, al que se considera el verdadero causante de la intoxicación.

Llamaba la atención la diferente susceptibilidad que tenían las distintas especies animales a la intoxicación producida por la ingestión de plantas que poseen Miserotoxina (25) por lo cual se desarrollaron trabajos para comprobar estas diferen-

Tabla N° 3: Metabolismo de la Miserotoxina.



cias entre rumiantes y monogástricos y si esa diferencia se debía a distintos caminos metabólicos del tóxico (25). Estos estudios permitieron aclarar estos puntos, encontrándose que los monogástricos hidrolizan la Miserotoxina en glucosa y ácido 3-nitropropanoico.

El 3-nitro-1-propanol manifiesta mayor toxicidad que el ácido 3-nitropropanoico y ello se debe a su mayor velocidad de absorción en el tracto intestinal de los rumiantes y asimismo a la diferente velocidad con que la flora bacteriana de rumen transforma estos compuestos nitrados en sustancias no tóxicas: así por ejemplo está demostrado que el ácido 3-nitropropanoico es detoxificado más rápidamente que el 3-nitro-1-propanol (2, 24, 27, 26, 28).

En la práctica esta diferencia de toxicidad no se observa, debido a que de acuerdo a la información bibliográfica, la distinta potencia tóxica del ácido y alcohol nitrados, individualmente comparados, es en cierta manera compensada por el diferente número de moles de ellos que en cada caso (éster o éter) se libera al medio.

Al observar en la Tabla N° 2 las fórmulas de los nitrocompuestos orgánicos aislados, se verá que aquellos derivados del ácido 3-nitropropanoico contienen y por lo tanto liberan por hidrólisis entre dos y cuatro moles de ácido nitrado, mientras que los derivados del 3-nitro-1-propanol sólo poseen un mol de alcohol nitrado.

La intoxicación que producen los nitrocompuestos puede ser Aguda o Crónica:

-Aguda: presenta debilidad general, incoordinación motora, trastornos respiratorios con salivación espumosa, cianosis y caídas súbitas con dificultad para levantarse. Al ingerir la dosis letal el animal puede morir entre 4 y 25 horas (2, 29). Las dosis tóxicas son de 57 mg de 3-nitro-1-propanol por kg de peso y de 25 mg de nitrito inorgánico por kg de peso (12).

La diferencia entre dosis tóxica y dosis letal de Miserotoxina es pequeña y un leve aumento en la dosis en un animal intoxicado crónicamente produce una agudización del proceso (30). La dosis tóxica de ácido 3-nitropropanoico es considerablemente mayor que la dosis de 3-nitro-1-propanol (30).

Las lesiones macroscópicas son congestión y edema pulmonar, hemorragias petequiales en pericardio y microhemorragias en sistema nervioso central (2, 31).

La frecuencia cardíaca y respiratoria aumenta, los animales se encuentran obnubilados (32).

-Crónica: la sintomatología está relacionada con trastornos respiratorios y nerviosos y los primeros signos son depresión general e incoordinación. Los animales presentan una forma típica de caminar, denominada "paso de ganso". A medida que la intoxicación progresa presenta parálisis de los cuartos posteriores, los que muchas veces son arrastrados; los trastornos respiratorios producen ronquidos y si la intoxicación progresa el animal muere. No se observan lesiones espectaculares, sólo congestión hepática, edema, enfisema pulmonar y aumento de líquido cefalorraquídeo, (2, 33, 34).

En la Tabla N° 4 (1, 35, 36) se incluyen las especies de *Astragalus* identificados en nuestro país y en la Tabla N°5 se enumeran las especies de *Astragalus* para los que se informó presencia de nitrocompuestos, de acuerdo a la información bibliográfica reunida que se considera exhaustiva. En el caso de los *Astragalus* argentinos positivos a nitrocompuestos orgánicos nunca se hicieron aislaciones ni identificaciones y siempre se trabajó con material de herbario.

TABLA N° 4: Especies de *Astragalus* identificados en n/país

1- Ast. ameghinoi Speg.	23- Ast. hypsogenus Johnst.
2- " anni novi Burk	24- " illini Johnst
3- " arequipensis *	25- " magellanicus G.S.
4- " arnottianus (G) Reiche*	26- " micranthelus Wed *
5- " asplundii Johnst	27- " minimus Vog.
6- " austroargentinus G-S	28- " moyanoi Speg.
7- " bellus (OK) Fries*	29- " neoburkatianus G-S
8- " bergii H.*	30- " neuquenensis G-S
9- " bonaerensis G-S	31- " nicorae G-S.
10- " bustillosii Clos.	32- " nivicola G-S
11- " carinatus Reiche*	33- " palenae Reiche *
12- " colhuensis G-S	34- " parodi Johnst.
13- " cruckshankii (H & A)*	35- " patagonicus Speg.
14- " cuyanus G-S	36- " pauranthus Johnst.
15- " chamissonis Reiche	37- " pehuenches Niedert
16- " diminutinus Johnst	38- " peruvianus Vog.
17- " distinens M. *	39- " sanctae crucis Speg.
18- " domeykoanus Reiche *	40- " spegazzini Johnst.
19- " fabrissi G-S	41- " tehuelches Speg.
20- " famatinae Johnst	42- " uniflorus D.C.
21- " garbancillo Cav.	43- " vesiculosus Clos.
22- " gilliesii Phill	44- " wedelianus Johnst.

Tabla N°5. Especies de Astragalus que contienen nitrocompuestos.

N°	Especies de Astragalus	Ref.	N°	Especies de Astragalus	Ref.
1	aboriginun Richard	44,46	52	bubaloceras Maire	37,47
2	accidens Wats	13,44,46	53	bustillosii Clos.	47
3	var. hendersonii (Wats) M.E. Jones	13,44	54	cachinalensis Phil.	47
4	ackerbergensis Freyn.	47	55	californicus Greene	44
5	acmonotrichus Frenzl	47	56	callithrix Barneby	44
6	adanus Nels	13,46	57	calycosus Torr.	13
7	aegacanthoides Parker	46,47	58	" var. calycosus	44
8	aequalis Clokey	13,44	59	" var. mancus Bonn	13,44
9	agrestis Dougl.	44	60	" var. scaposus Jones	13,44
10	agnicidus Barneby	44	61	camporum Benth	47
11	ajubensis Bunge	47	62	camptopus Barneby	13,44,46
12	alaschanus Bunge	46,47	63	canadensis Barneby	2,13,44,46
13	albens Greene	44	64	" var. brevidens Barneby	12,13,20,44,46
14	alberjilla Steud.	47	65	canadensis var. morttoni Wats	12,13,18,44,46
15	albicans Bong	47	66	cariensis Boiss	47
16	algarbiensis Coss.	47	67	cariocarpus Ker.	44,46,47
17	alopecias Pall	47	68	caricinus Barneby	44
18	alvordensis Jones	13,44,46	69	carminis Barneby	44
19	altus Woot & Standl	44,46	70	casei Gray	44
20	amasiensis (F) Bormm	47	71	castaneiformis S.W. var. castaneiformis	44
21	amphioxys Gray	44	72	castaneiformis var. consobrinus Barneby	44
22	" var. amphioxys	44	73	castetteri Barneby	44,46
23	" var. vespertinus	44	74	cedreti Boiss	47
24	ancistrocarpus B & H	47	75	ceramicus Sheld	44,46,47
25	aquilonuis Barneby	44	76	cerussatus Sheld	44
26	arakaweniis Takeda	47	77	chamaeleuce Gray	44
27	argophyllus Nutt.	47	78	chamaemeniscus Barneby	13,44,46
28	argyrostachys Boiss	47	79	chorinensis Bunge	47
29	arizonicus Gray	13,44	80	chrysoterus Bunge	47
30	arkalycensis Bunge	47	81	chrysophyllus Boiss	47
31	arrectus Gray	44,46	82	clevelandii Greene	13,44,46
32	arthuri Jones	44	83	cibarius Sheld	12,13,17,44,46,39
33	atratus Wats	44	84	coahuilae Jones	44
34	atropubescens C & F	13,44,46	85	cobrensis Gray var. cobrensis	44,46
35	australis Bunge	37,47	86	" var. maguirei Keaney	44
36	bakaliensis Bunge	47,46	87	coccineus Brand	44
37	berteri Colla.	47	88	coltoni Jones var. Coltoni	44
38	bhotanensis Baker	46,47	89	coltoni var. moabensis Jones	44
39	bicristatus Gray	44	90	colutoides Wills	47
40	bidentatus HBK	37,47	91	collinus Don.	44,46
41	bifidus Turcz	46,47	92	" var. laurentii Barneby	13,44,46
42	biovulatus Bunge	47	93	compositus Pavlov	37,47
43	bodeanus Fisch	46,47	94	congdoni Wats	44
44	bodini Sheld	13,44,46	95	confertus Benth	47
45	bolanderi Gray	13,44	96	conjunctus Wats	13,44
46	bourgaeanus Coss.	46,47	97	convallarius Greene	12,13,20,44,46
47	bourgovii Gray	13,44			
48	brachitropis C.A.M.	47			
49	bracteosus Boiss	47			
50	breweri Gray	44			
51	bryantii Barneby	44			

(Tabla N°5, cont.)

N°	Especies de Astragalus	Ref.	N°	Especies de Astragalus	Ref.
98	convallarius var. finitimus Barneby	13,44,46	147	ermineus Matth.	47
99	" var. scopulorum Barneby	13,44	148	ervoides H & A var. ervoides	44
100	coronilla Bunge	47	149	" var. maysillesii Barn.	44
101	coriaceus Hemsl	44,46	150	esperanzae Jones	44,46
102	cracca D.C.	47	150	eucosmus Robins	13,44,46
103	craibrianus Simpson	47	152	eurekensis Jones	44
104	crassicaarpus Nutt	44	153	falcatus Lam.	12,13,20 29,37,46
105	" var. crassicaarpus	44			
106	" var. berlandieri Bar.	44	154	fialae Degen	47
107	" var. trichocalix Bar	44	155	filicaulis F & M	46,47
108	crassicaarpus var. paysonii Barneby	13,44	156	filifolius Clos.	47
109	crassicaarpus var. cavus Barneby	44,46	157	filipides Torr.	44
110	cretaceus Boiss & K	47	158	flexuosus var. flexuosus (Hook) Don	12,13,18, 44
111	crinitus Boiss	47			
112	crispocarpus Nabelek	47,46	159	" var. diehlii Barn.	13,44,46
113	cronquistii Barneby	44,46	160	" var. greenei Barn	13,44,46
114	cottoni Jones	44,46	161	fodinarum B & N	47
115	curvicarpus var. curvicarpus	12,13,17, 44	162	fragrans Willd	47
116	" var. subglaber Barn.	13,44	163	francisquitensis Jones	44,46
117	cusikii	13,44	164	fucatus Barneby	13,44,46
118	cyaneus Gray	44	165	funereus Jones	44
119	cymbicarpus Brot.	46,47	166	fuliginosis Beck	47
120	cymboides Jones	44	167	galegiformis L.	12,20,47
121	czorachensis Charadze	47	168	geminiflorus H & B	47
122	dactylocarpus Boiss	47	169	gentryi Standl.	44
123	decurrens Boiss	47	170	genuflexus Freyn	47
124	demavendicus B & B	47	171	germainii Phil	47
125	densiflorus Kar & Kir	37,47	172	gibbsii Kell	13,44,46
126	densifolius Lam.	47	173	giganteus Wats	44
127	depressus L.	46,47	174	glaberrimus S & R	47
128	desperatus Jones var. desperatus	44	175	globiceps Bunge	47
129	" var. compectus Barn.	44	176	globosus Vahl.	47
130	detritalis Jones	44	177	glycyphylos L.	46,47
131	dictiocarpus Boiss	37,46,47	178	goldmani Jones	44
132	diplacus Wats	44	179	gombo Coss & ur	47
133	dipsaceus Bunge	47	180	gracilis Nutt	13,44,46
134	diversifolius Gray	12,13,20, 44,46	181	gregii Wats	44,46
135	dorcoceras Bunge	47	182	griffithii Benth	46,47
136	douglasii Gray	44	183	grisebachianus A & B	47
137	drummondii Dougl.	44	184	groetzbachii Podlech	47
138	duchesnensus Jones	44	185	gruinus Barneby	44
139	duseni Mackl.	47	186	guatemalensis Hemsl var. brevidenta- tus Barneby	44
140	earli	44,46,47	187	gymnolobus Fisch	46,47
141	echinops Aucher & Boiss	47	188	gypsodes Barneby	44
142	edulis C & D	47	189	halli Gray	13,44,46
143	elatus Boiss	47	190	" var. fallax Barn	44,46
144	emoryanus Cory	2,12,13, 22,44,46	191	hamadaus Boiss	47
145	ensiformis Jones	44	192	hamosus L.	46,47
146	episcopus Wats	44,46,47	193	" var. ancistrum Batt.	47
			194	" var. brachyceras Ledeb	47

(Tabla N°5, cont.)

N°	Especies de Astragalus	Ref.	N°	Especies de Astragalus	Ref.
195	hartwegi Benth	44	246	leucophaeus Sm.	47
196	harrisonii Barneby	13,44	247	leudolobus Wats	44
197	hausknechtii Bunge	47	248	lindheimeri Engelm	44
198	helgurdensis Towns	47	249	listoniae Boiss	47
199	hemiphaca Kar & Kir	47	250	loanus Barneby	44
200	hermoneus Boiss	37,47	251	longissimus Barneby	44,46
201	heterodonthus Boriss	37,46,47	252	looseri Johnst.	47
202	hidalgensis Barn, var.hidalgensis	44,46	253	llalli Gray	44
203	" var. protensus Barn.	44	254	llonnetti Barneby	44,46
204	himalayanus Kloyzsch	37,47	255	macrocephalus Willd	47
205	hirsutissimus D.C.	47	256	macronyx Bunge	37,47
206	hirsutus Vahl.	47	257	macropterus	37,47,46
207	hoodianus Howell	13,44	258	macropus Bunge	37,47
208	hosackioides Benth	46,47	259	macrorrhizus Gav.	47
209	howelli Gray	44	260	malacoides Barneby	13,44
210	hypsoleucus Schau.	44	261	malacus Gray	44
211	idaea Sirj	47	262	mandoni Rusby	47
212	idaeus Bunge	47	263	marianus Barneby	44
213	ignarius Popov.	37,47	264	massiliensis Lam.	37,47
214	inflexus Dougl.	44	265	megalotropis Meyer	47
215	iodopetalus Barneby	44	266	melanostachys Benth	47
216	incanus L.	47	267	melilotoides Pall	37,46,47
217	incurvus Desf.	47	268	melinus Boiss	47
218	inversus Jones	44	269	meridionalis Bunge	47
219	inyoensis Sheld	44	270	meskianus A & B	47
220	isfahanicus Boiss	46,47	271	michauxii Herman	12,44,40
221	agnobicus Lipsky	47	272	michauxianus Boiss	47
222	jaegerianus Muns	44	273	micracme Boiss	47
223	jesdianus Boiss & Buhse	46,47	274	micranthus Desv. var. micranthus	44,40
224	jejunos Wats	44	275	" var. scatoni Jones	44
225	johannis howellii Barneby	44	276	minthorniae Jepson	44
226	kaufmannii Krylov	47	277	misellus var. misellus	13,44
227	kertrophyta Nutt var.douglasii Barn.	44	278	microcymbus Barneby	44,46
228	jessiae Barneby	44	279	miser Rydb	16,17
229	" ungulatus Jones	44	280	" var. hylophilus Barn.	2,13,38,44,46
230	" neomexicanus Barneby	44	281	" var.oblongifolius Cronq.	2,12,13,22,38,44,46
231	kirrindicus Boiss	47	282	" var.serotinus Barn.	2,13,38,44,46
232	kulabensis Lipsky	37,47	283	miseriflorus S & R	46,47
233	lalesarensis Bornm,	47	284	missouriensis Nutt. var. missouriensis	44
234	lanatus Labill	47	285	" var.amphibolus Barn	44
235	lancearius Gray	13,44	286	" var.mimetes Barneby	44
236	laricus Boiss	47	287	mohavensis Wats var. mohavensis	44
237	latifolius Lam.	46,47	288	" var.hemigyris Barn.	44
238	laucearius Gray	44,46,47	289	molydenum Barneby	44,46
239	layneae Greene	44	290	mollissimus Torr. var.marcidus Barn.	44
240	leibergii Jones	13,44	291	" var.mattewsii Wats	44
241	lenmoni Gray	44	292	monoensis Barneby	13,44
242	lentiformis Gray	44	293	monspessulanus L.	47
243	lentiginosus Dougl.	44,42			
244	leptaleus Gray	13,44,46			
245	leptocarpus T & G	44			

(Tabla N°5, cont.)

N°	Especies de Astragalus	Ref.	N°	Especies de Astragalus	Ref.
294	montis aqualis Grossh	47	345	pinonis Jones	44
295	monumentalis Barneby	44	346	pithusarum Borrm	47
296	nuliensis H & M	47	347	placens Clos.	47
297	multicaulis Ledeb.	47	348	plattensis Nutt	44
298	murinus Boiss	37,47	349	polaris Beth.	44
299	musiniesis Jones	44	350	politowii Krylov	37,47
300	naturitensis Payson	44	351	polycladus B & F	37,47
301	neglectus Sheld	44	352	ponticus Pall	47
302	neomexicanus W & S	44	353	poterium Vahl	47
303	newberryi Gray var. newberryi	44	354	pseudobrachytropics G.	47
304	" var. blyae Barneby	44	355	pseudomacropterus K.	46,47
305	nidulatus Barn.	44,46	356	pseudoszovitsii S & R	47
306	nishapurensis S & R	47	357	pterocarpus Wats	2,12,13, 20,44,46
307	norvegicus Graver	47	358	pubentissimus	44,46,47
308	nothoxys Gray	44	359	puberulus Ledeb.	47
309	noziensis S & R	47	360	pullus N.D.S.	47
310	nubigenus Taub.	47	361	puniceus Ostech.	44,46
311	nudilisiquus Nels	44	362	" var. gertrudis G.	13
312	nuttalianus D.C.	44,46,47	363	punctatus Bunge	46,47
313	nutzotinensis Rouss	44	364	purshii Dougl. var. purshii	44
314	obcordatus Ell.	44	365	" var. tinctus Jones	44
315	obtusifolius D.C.	47	366	" var. glareosus Barn.	44
316	ochroleucus Gray	47	367	" var. punilio Barn.	44
317	odoratus Lam.	37,47,46	368	" var. ophiogenes Barn.	44
318	oliganthus Reiche	47	369	" var. concinnus Barn.	44
319	ophiocarpus Benth	47	370	" var. lectulus Jones	44
320	orcuttianus Wats	46	371	" var. lagopinus Barn.	44
321	oreganus Nutt	13,44,46	372	quinqueflorus Wats	44,46
322	oroboides Hornein	37,47	373	quinquejuyus S-& R	47
323	ovczinnikovii Boris	47	374	radicans Humb.	44,46
324	oxyglotis Stev.	46,47	375	raswendicus H & B	74
325	oxyodon Baker	47	376	reduncus Pall	47
326	oxyrrhynchus Hemsl	44	377	refractus C.A.M.	46,47
327	oxytropifolius Boiss	47	378	regelii Traut	47
328	pachypus Greene	44,46	379	remotiflorus Boiss	47
329	palmeri Gray	44	380	reticulatus M.B.	46,47
330	pannosus Fenzl	47	381	reventhus Gray	44,46
331	parvus Hemsl	44	382	reventiformis Barneby	40
332	parryi Gray	44	383	rigidulus Benth	47
333	patagonicus Speg.	46,47	384	ripauruis Barneby	13,41
334	pauperculus Greene	44	385	ripleyi Barneby	44
335	paysonii Barneby	44	386	robbinsii var. alpiniformis Barneby	13,44,46
336	peduncularis Royle	37,46,47	387	robbinsii var. minor Barn.	44
337	peckii Piper	44	388	" var. occidentalis Wats	44
338	pencanus Phil	46,47	389	" var. harringtonii Barn.	44
339	pennellianus Barneby	46,47	390	rudbaricus Bunge	46,47
340	peterae Tsai y Yu	47	391	sabzakensis Agerer-Kirch	47
341	petropolitanus Sheld	47	392	sanguineus Rybd	44
342	physocarpus Ldb.	46,47	393	saxifractor Rach & G	47
343	physodes L.	46,47	394	scalaris Wats	44
344	pictiformis Barneby	44,46			

(Tabla N°5, cont.)

N°	Especies de Astragalus	Ref.	N°	Especies de Astragalus	Ref.
395	scopulorum Port	44,46,47	445	tennesseensis Gray	44
396	schachdarinus Lipsky	47	446	tenuis Turcz	47
397	schahrudensis Bunge	47	447	tephosioides Boiss	47
398	schelichovii Turcz	46,47	448	tephrodes Gray var. tephrodes	44
399	scheremetevianus B.F.	46,47	449	" var. brachylobus Barn	44
400	schinetorum Barneby	47	450	" var. chloridae Barn	44
401	schmalhauseni Bunge	47	451	teresianus S & E	46,47
402	schomallae Porter	13,44	452	terminalis Wats	13,44,46
403	serenoi Sheld	13,44,46	453	tetragonocarpus Boiss	46,47
404	sclerocarpus Gray	44,46	454	tetrapterus Gray	2,12,13,20 44,46
405	sericoleucus Gray	44,46,47	455	thlaspi Lipsky	47
406	sesameus L.	44,46,47	456	thurberi Gray	44
407	sheldoni Barneby	44,46	457	tidestromii Clokey	44
408	shelkovnikovii Grossh	47	458	tigridis Boiss	47
409	shortinaus Nutt	44	459	toanus Jones	12,13,20 44,46
410	shugnanicus B.F.	47,46	460	tolucanus R & S	44
411	sieberi D.C.	47	461	tortuosus D.C.	47
412	sikkimensis Benth	47	462	tribuloides Delile	37,47
413	siliquosus Boiss	12,20,29, 46,47	463	tugonus D.C.	47
414	simplicifolius Gray	44	464	trimestris L.	46,47
415	sinaloae Barneby	44,46	465	tschujensis Bunge	47
416	sinicus L.	47	466	tweedy Camby	13,44,46
417	sinuatus Piper	44,46	467	tyghensis Peck	44
418	sirinicus Tenore	37,47	468	uliginosus L.	13,47,46
419	solandri Lowe	47	469	umbraticus Sheld	44
420	solitarius Peck	44	470	uncialis Barneby	44
421	soxmaniarum Lundell	44	471	utahensis T & G	44
422	spaldingii Gray	44	472	vaccarum Gray	44,46,47
423	spatulatus Sheld	44,46,47	473	vanillae Boiss	47
424	speciosus B & H	47	474	versicolor Pall	46,47
425	speirocarpus Gray	13,44,46	475	vicarius Lipsky	46,47
426	sphaerocystis Bunge	47	476	villosus Michx	44
427	sprucei Johnst	37,46,47	477	vulpinus Willd.	47
428	stenophyllus T & G	13	478	vesiculosus Clos.	46,47
429	stramineus B.K.	46,47	479	wardi Gray	44
430	straturensis Jones	44	480	waterfallii Barneby	44
431	strigulosus Hunth	44	481	weberhaueri Ulbr.	46,47
432	subcinereus Gray	13,44,46	482	webberi Gray	13,44,46
433	submitis B & H	47	483	whitneyi var. confusus Barn.	13,44,46
434	subscaposus Popov.	47	484	" var. siskiyouensis Barn.	13,44,46
435	subvestitus Barneby	44	485	" var. sonneanus Jeps	13,44,46
436	succumbens Dougl.	44	486	" var. whitneyi	13,44
437	sulfureus Bunge	46,47	487	williamsii Rydb	44,46
438	sungpanensis Pet. Stib.	47	488	wootoni	44,46,47
439	sykesiac Simpson	47	489	wipholdes Barneby	44,46
440	syringus Chamb.	47	490	wylochadus R & G	47
441	szovitsii Fisch y May	47	491	zacatecanus Barneby	44,46
442	taschkendicus Bunge	47	492	zerdanus Boiss	47
443	tawilicus Towns	47	493	zionis Jones	44
444	tenellus Pursh	33			

5.- Otros

Otro tipo de intoxicación consignada en bibliografía producida por especies del género *Astragalus* (agrupados bajo el nombre genérico de Yerba Loca, Locoweed, particularmente en los Estados Unidos) se caracteriza por hiperexcitabilidad que lleva al animal a un estado de locura (2,12,27,23,41,43).

En la Tabla N°6 se incluyen las especies productoras de este síndrome.

Tabla N° 6: Especies de *Astragalus* que producen el síndrome de locura.

N°de Orden	Especie botánica	Referencia Bibliográfica
1	Ast. lentiginosus	2,12,23,50
2	" mollissimus	2,23
3	" wootoni	2,12,50
4	" thurberi	2
5	" nothoxys	2
6	" pubentissimus	23

El principio tóxico de estas especies no ha sido identificado; se ha supuesto que podría ser boro, selenio o un producto denominado "locoína", que luego se comprobó que estaba formado por colina y betaína; la sugerencia más reciente es que se trataría de un latirógeno, productos aislados de especies del género *Latirium* (23).

Los trastornos producidos por esta intoxicación incluyen efectos neurológicos, reproductivos, pérdida de peso y hábito (23). Las lesiones macroscópicas son escasas, se observa erosión de la región pilórica del abomaso, hipertrofia tiroidea y zonas pálidas en corteza renal y hepática (2,48).

En ovinos se observó faringitis necrótica, probablemente debido a los cambios en las células del sistema retículo endotelial (49).

Los trastornos reproductivos se manifiestan por aborto (50) y malformaciones fetales (35), los que dependen de la dosis ingerida (50).

La lesión microscópica principal es la vacuolización ce-

lular, que según pudo comprobarse por microscopía electrónica, se debe a la hinchazón de las mitocondrias (48,50). Los órganos afectados por esta lesión son cerebro, cerebelo, glándulas tiroideas, paratiroides, corteza adrenal, células beta y acinos exócrinos pancreáticos, células primordiales ováricas, hígado, riñón (principalmente tubos contorneados proximales), pelvis, uréteres y vejiga, debido a que el tóxico se concentra en orina (48,50,51) y las células del sistema retículo endotelial, principalmente las ubicadas en los linfonódulos intestinales (50).

Otros parámetros que muestran el grado de lesión son el aumento de la actividad enzimática de la transaminasa glutámico pirúvica, glutámico oxalacética y fosfatasa alcalina (2,23,52), el aumento del nitrógeno proteico indica lesión renal (52), las iodoproteínas se encuentran disminuidas debido a la lesión de glándulas tiroideas (49). También se observa disminución del calcio sérico y fósforo (49). No se observan alteraciones en la glucemia, colinesterasa, hemoglobina, hematocrito y en el conteo de glóbulos rojos y blancos (52).

Resumiendo podemos decir que los tóxicos informados hasta el momento en especies del género *Astragalus* son: ácido cianhídrico, saponinas, selenio y nitrocompuestos orgánicos.

II.- OBJETIVOS

II.- OBJETIVOS

Debido a reiteradas consultas realizadas por productores ganaderos de la zona sur de la Provincia de San Luis respecto a la muerte de ganado ovino y bovino causada por la presunta ingestión de una pastura natural comunmente denominada "Pasto asma", se decidió realizar un estudio químico-toxicológico de dicha pastura para intentar determinar qué especie botánica era la causante de las graves intoxicaciones observadas y de qué manera podrían realizarse aportes para la solución del problema.

El estudio botánico del material vegetal permitió identificar la especie como Astragalus distinens Macloskie, familia Leguminose, por lo que se inició, como primer paso, una exhaustiva revisión bibliográfica para indagar la posible causa de las intoxicaciones.

De esta revisión bibliográfica surgió como evidencia el escaso número de trabajos de investigación realizados en nuestro país sobre componentes del género Astragalus y asimismo la similitud de A. distinens con Astragalus bergii Hieronimus que hizo que hasta hace pocos años fuesen considerados como especies idénticas, lo que actualmente está descartado. Ambos Astragalus suelen tener habitats comunes (caso de la Provincia de San Luis) y este hecho unido a la marcada afinidad botánica de ambas especies, motivó la inclusión del estudio de Astragalus bergii en el presente trabajo.

Asimismo, del análisis de la bibliografía reunida surgió que el o los tóxicos que pudieran tener estas especies no estaban definidos concretamente lo que indicó la necesidad de aclarar este punto por ser el inicial de cualquier solución posible al problema planteado.

De esta revisión surgen como posibles tóxicos los glicósidos cianogénéticos, las saponinas y el selenio y aún cuando se habían informado resultados negativos para nitrocompuestos orgánicos alifáticos, éstos se incluyen en el presente trabajo. También se incluyen productos de baja polaridad como terpenos-esteroles y alcaloides por ser elementos de interés en toxicología veterinaria y por contar con muy pocos datos al respecto.

Por lo tanto el objetivo primordial de este trabajo es tratar de identificar concretamente cuál es el o los tóxicos pre-

sentos en estas especies y determinar cuáles son las dosis necesarias para que produzcan intoxicación.

De esta manera se intenta realizar una primera contribución para solucionar el problema de intoxicaciones de ganado que no sólo tiene incidencia en campos de la Provincia de San Luis, sino en gran parte del territorio argentino en razón de la amplia distribución geográfica de estas especies.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.A. ESTUDIO DE ASTRAGALUS DISTINENS MACLOSKE

III.A.I. Acondicionamiento del material vegetal.

El material de *A. distinens* fue recolectado en el establecimiento "La Aurora Puntana" ubicado en el Departamento Gobernador Dupuy, al suroeste de la Provincia de San Luis, en el límite con la Provincia de Mendoza. El potrero es de pastizal natural con isletas de chañar y la planta de encuentra formando manchones casi puros. Fue recolectado en Marzo de 1982, cuando las plantas estaban en diseminación de semillas. Se eligió este estado fenológico debido a comprobaciones personales y de los lugares que indicaban que este momento era cuando la planta resultaba más tóxica. Este establecimiento tiene antecedentes de mortandades debido a intoxicaciones producidas por la presunta ingestión de esta especie.

Todo el material fue limpiado, clasificado e inmediatamente conservado verde en bolsas de polietileno en congelador a -18°C hasta su procesamiento.

El material vegetal recolectado se procesó por separado, tallos, hojas y frutos; parte de cada una de ellas fueron secadas a 40°C en estufa eléctrica con circulación forzada de aire hasta peso constante y molidas para que pasen un tamiz de 250 micrones y se las conservó en frascos de vidrio color caramelo con tapa hermética hasta su procesado. Una parte de este material se usará para la extracción de los tóxicos para determinación de dosis tóxica y letal.

El resto del material vegetal verde fue picado con picadora manual y recibido en recipiente refrigerado. Se conservó en bolsas de polietileno en congelador a -18°C , estas muestras se utilizaron para determinación de ácido cianhídrico.

En el mes de Diciembre de 1982 se recolectó material de *Sorghum graniferum* (Sorgo granífero) de 30 cm de altura y de *Kochia scoparia* (Morenita) para utilizarlos como patrones positivos para las determinaciones de ácido cianhídrico y saponinas respectivamente (3,6).

Con el material así acondicionado se realizaron ensayos de toxicidad del extracto acuoso total y ensayos de identificación y/o aislación de ácido cianhídrico, saponinas, selenio, nitrocompuestos orgánicos, alcaloides y terpenos en base a los mé-

todos que a continuación se describen. Los análisis cuantitativos para cada uno de los tóxicos se realizaron cuando los análisis cualitativos dieron resultados positivos.

III.A.II. Ensayo de toxicidad del extracto acuoso total.

1) Preparación de la solución acuosa total

Se toman 20 g de planta seca y molida que se extraen con 200 ml de etanol 95% en equipo soxhlet por 24 hs. Se enfría por 2 horas a temperatura ambiente, se filtra y descarta el material vegetal y el residuo del filtrado. Posteriormente se mantiene 8 hs. a 5°C repitiéndose el filtrado. La solución alcohólica filtrada es evaporada a seco.

El residuo se retoma con agua destilada (4 x 10 ml), se filtra y descarta el material insoluble.

La solución acuosa se extrae con cloroformo (5 x 10 ml) en ampolla de decantación, se descarta la fase clorofórmica y se reduce el volumen de la solución acuosa para eliminar restos de cloroformo y etanol y se ajusta el volumen final a 10 ml. De esta forma 1 ml de extracto acuoso corresponde a 2 g de planta seca (39).

2) Dosificación de la solución acuosa total.

La solución acuosa total obtenida de la forma antes descrita es inoculada por vía subcutánea en dosis de 0,5 cc a 4 lauchas albinas con un peso promedio de 23 g.

Se observa la aparición de síntomas y los animales muertos se disecan para ver posibles lesiones macroscópicas y para tomar los siguientes órganos: hígado, riñón, cerebro, cerebelo y ojos, para análisis histopatológicos. La técnica empleada es fijación con formol neutro 10%, inclusión en para fina y tinción con hematoxilina y eosina (53).

III.A.III: Ensayo de Acido cianhídrico

1) Ensayo cualitativo

a- Técnica de papel picrosódico.

Se utiliza material vegetal verde y molido. Se analizan por separado tallos, hojas y frutos. Paralelamente se desarrolla toda la técnica con material vegetal de sorgo.

- Reactivos utilizados:

- Solución de ácido pícrico-carbonato de sodio.

Acido pícrico p.a.....0,5 g

Carbonato de sodio p.a. 5 g

Agua destilada c.s.p.....100 ml

- Papel de filtro cortado en cintas de 0,5 cm de ancho.

Se sumergen las tiras de papel en la solución de ácido pícrico-carbonato de sodio y luego se dejan secar protegidas de la luz. Las cintas reactivas, de color amarillo, se guardan en frascos color caramelo para su conservación.

- Desarrollo de la técnica

En un tubo de ensayo se coloca aproximadamente 1 g de planta verde molida y se agrega agua destilada hasta alcanzar el límite superior ocupado por el material y se introduce la cinta reactiva sujeta al tapón de goma sin tocar el líquido (4,6).

Con el objeto de facilitar el desprendimiento y volatilización del ácido cianhídrico, se agrega al macerado unas gotas de cloroformo y se sumergen los tubos en baño maría a 60°C por 5 minutos, se los retira y deja reposar a temperatura ambiente por 8 hs.; se sumergen nuevamente a baño maría a 60°C por 5 minutos y dejan reposar a temperatura ambiente hasta completar las 24 hs. de incubación (6,54). La positividad del ensayo está dada por el cambio de color de la cinta de amarillo a rojo.

b- Técnica del Azul de Prusia

- Extracción de ácido cianhídrico por destilación simple.

- Se pone 1 g de muestra en un tubo de ensayo para microkjeldahl, de 15 x 2 cm, se agrega agua destilada hasta cubrir el material vegetal, se acidifica con 1 o 2 gotas de ácido clorhídrico.

co concentrado y luego se ubica en un equipo de destilación por arrastre con vapor de agua y se hace circular vapor por 7 minutos, recogiendo el destilado sobre 2 ml de hidróxido de potasio al 10% (55).

- Desarrollo de la técnica

Se toman 2 ml del destilado obtenido anteriormente y se agrega:

- 1 gota de fenolftaleína al 0,1% en alcohol 80%, la solución toma color rosado.
- 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico 0,1 N hasta decolorar.
- 1 o 2 gotas de carbonato de sodio al 20%, retoma el color rosado.
- 3 gotas de sulfato ferroso al 2%, preparada antes de usar, se agita y acidifica con ácido clorhídrico.

Las muestras positivas muestran una coloración azul más o menos intensa según la cantidad de cianuro presente.

En los tubos donde la reacción da color celeste muy pálido o no es posible identificar el color, se agregan 1 o 2 gotas de cloruro de bario al 10% el que, al precipitar concentra el color y hace factible diferenciarlos (56).

Con esta misma técnica se hace un patrón coloreado partiendo de una solución de 0,1 mg de ión cianuro por ml. El rango del patrón es de 0,01 mg/ml a 1 mg/ml con intervalos de clase de 0,01 mg/ml.

Este patrón se usa para estimar la cantidad de ión cianuro presente en las muestras analizadas.

2) Determinación cuantitativa

- Preparación de reactivos
 - carbonato de sodio 1%
 - Acido pícrico 1%
 - Hidróxido de sodio 10%

-Solución estandar de cianuro: se toman 250,4 mg de cianuro de potasio que contienen 100 mg de ión cianuro. Se disuelven en 100 ml de agua destilada para obtener una solución patrón de cianuro de potasio que contiene 1 mg/ml de ión cianuro.

- Extracción de ácido cianhídrico por digestión y destilación.

En dos tubos de ensayo se pone 1 g de material vegetal verde y molido, se tapan y se dejan reposar 1 h a temperatura ambiente. Agregar 5 ml de licor ruminal recién extraído y filtrado por tela, se tapa e incuba a 37°C por 4 horas (57).

Luego de la incubación se los pasa a heladera para interrumpir la digestión y evitar que la manipulación posterior afecte la concentración de cianuro.

Se agregan 4 o 5 perlas de vidrio para disminuir la formación de espuma y se pone en equipo de arrastre con vapor de agua. Se hace pasar vapor por 5 a 7 minutos y el destilado se recoge en matraces de 100 ml conteniendo 5 ml de solución de ácido pícrico al 1% y 10 ml de solución de carbonato de sodio.

Pasado el tiempo necesario de destilación los matraces se sumergen en un baño maría en ebullición durante 5 minutos. En este momento se desarrolla el color. Se retiran del baño y se les agrega agua destilada, se deja enfriar a temperatura ambiente y enrasa a 100 ml.

La lectura se hace en espectrofotómetro a 520 nm frente a un blanco de reactivos (58).

La cantidad de cianuro en las muestras se determina por la fórmula $y = a + bx$; donde y es la cantidad de cianuro presente en la muestra; a es el origen de la ordenada; b el valor de la pendiente y x la absorbancia leída en el espectrofotómetro. Esta fórmula se obtiene de la regresión lineal que se realiza sobre una curva patrón preparada siguiendo la técnica descrita con un rango de 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml, con intervalos de clase de 0,01 mg/ml (58).

3) Obtención de ácido cianhídrico para determinación de Dosis Tóxica -50 y Dosis Letal -50

El ácido cianhídrico se prepara a partir de cianuro de potasio comercial a una concentración de 1 mg de ión cianuro por mililitro.

III.A.IV. Ensayo de Saponinas

1) Ensayo cualitativo

a- Índice de espuma

Para la determinación de este índice se usa material vegetal seco y molido de Astragalus distinsens y de Kochia scoparia como patrón positivo. Se analizan por separado hojas, tallos y frutos.

- Preparación del extracto vegetal.

- Se coloca 1 g de planta en un erlenmeyer de 250 ml, se agregan 100 ml de agua destilada y se hierve durante 30 minutos neutralizando con carbonato de sodio al 1%. Se deja enfriar, se filtra por algodón y se enrasa el volumen a 100 ml con agua destilada.

- Preparación de las diluciones.

Se utilizan 10 tubos de ensayo de 16 x 1,6 cm para cada muestra que se analiza de A. distinsens y 10 para K. scoparia.

TUBO N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AGUA	9 ml	8 ml	7 ml	6 ml	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	-
EXTRACTO	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	7 ml	8 ml	9 ml	10ml

Se agitan los tubos en sentido longitudinal, se deja reposar por 15 minutos y se observa la altura de la espuma. La presencia de saponinas se determina por la presencia de espuma persistente a los 15 minutos de finalizada la agitación y de por lo menos 1 cm de alto en un tubo con dilución. El patrón sirve para comparar la acción de las saponinas de una planta conocida (K. scoparia) con otra desconocida (6).

b- Índice hemolítico

- Preparación de la suspensión de glóbulos rojos al 2%.

Se usan glóbulos rojos de bovino que son tratados de la siguiente forma:

se extrae sangre con anticoagulante en base a ácido etilendiaminotetracético (EDTA), se centrifuga a 1.500 rpm por 10 minutos, retirar el suero y agregar solución fisiológica isotónica, mezclar y volver a centrifugar. Esta operación se repite tantas veces como sea necesario para obtener un sobrenadante totalmente límpido. Una vez que se tienen los glóbulos rojos lavados se prepara la suspensión al 2% (v:v) en solución fisiológica isotónica (6,59).

-Preparación de la solución fisiológica isotónica.

Fosfato de potasio (PO_4H_2K).....	1,52 g
Fosfato de sodio ($PO_4HNa_2 \cdot 12H_2O$).....	7,94 g
Cloruro de sodio	7,2 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

- Preparación del extracto vegetal

En un erlenmeyer de 250 ml se coloca 1 g de planta molida y se agregan 100 ml de solución fisiológica isotónica dejando en contacto por 3 horas con agitación frecuente, luego se filtra por algodón y se preparan las siguientes diluciones (6,59).

TUBO N°	1	2	3	4	5
GLOB. ROJOS 2%	1ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
EXTRACTO	1 ml	0,75 ml	0,5 ml	0,25 ml	-
SOL. FISIOL.	-	0,25 ml	0,5 ml	0,75 ml	1 ml

Mediante esta diluciones se compara la conocida acción hemolítica de la *K. scoparia* con la de *A. distinens*.

2- Determinación cuantitativa

Para determinar cuantitativamente las saponinas se usa la combinación de dos métodos: la extracción se hace con el método de Pedersen y la purificación con el método de Wang (60,61).

- 50 g de material vegetal seco y molido se extrae con etanol 70% por 24 hs. en equipo soxhlet:

- se evapora el extracto alcohólico a seco y se retoma con 75 ml de agua, la solución resultante se extrae en ampolla de decantación con benceno (2 x 75 ml) y se descarta el extracto ben-

cénico.

- se reduce el volumen acuoso a 50 ml para eliminar restos de benceno y para que 1 ml de solución corresponda a 1 g de planta seca.

- se siembra en bandas sobre papel cromatográfico y el cromatograma se desarrolla con una mezcla solvente de 1-butanol-hidróxido de amonio 1 M- etanol 95% (60:30,5:13); luego del desarrollo y evaporado el solvente el cromatograma se observa bajo luz ultravioleta de onda corta y las distintas bandas separadas se cortan, eluyendo con metanol 60% los productos fijados en cada tira de papel.

- se evapora el metanol resultante de la elución de las distintas fracciones y se pesa el residuo. Para el cálculo hay que tener presente que se partió de una cantidad de 50 g de planta seca.

3- Obtención de saponinas para la determinación de Dosis Tóxica -50 y Dosis Letal -50

Se procede de la misma forma que la descripta anteriormente. El producto final obtenido es preparado en solución acuosa al 10%.

III.A.V. Ensayo de Selenio

Debido a la complejidad de los métodos necesarios para hacer una buena determinación de Selenio en productos naturales y a la necesidad de contar con equipos especiales, las muestras fueron enviadas al Institute of Food and Agricultural Sciences-Animal Science Department- Livestock pavilion, University of Florida, Gainesville, Florida 32611, donde fueron procesadas por L.R. Mc Dowell. No obstante se describen aquí los materiales necesarios y la técnica usada.

1) Determinación cuantitativa

a- Preparación de reactivos.

- ácido etilendiaminotetracético (EDTA), se disuelven 4,2 g de EDTA en agua y se diluye a 1 litro.

- indicador de rojo cresol, disolver 0,1 g de o-cresolsulfo-naftaleno en 1 ml de agua, más una gota de hidróxido de amonio (1:1) y se diluye en 50 ml de agua.

- solución estandar de Selenio: agregar 2 ml de ácido nítrico concentrado a 25 mg de Selenio (pureza mayor o igual al 99%) y entibiar para disolver. Diluir a 1 litro con agua y la solución resultante se diluye a 1:250 con ácido clorhídrico 0,1 N. De esta forma se obtiene una solución patrón de 0,1 mg de selenio por ml. Estable varios meses.

- solución de 2,3-diaminonaftaleno (DAN); para evitar alteraciones se debe preparar en semioscuridad o con luz amarilla inmediatamente antes de usar. Se ponen 5 mg de DAN en un erlenmeyer y se agregan 5 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, agitar por 5 minutos a velocidad máxima, agregar 5 ml de ciclohexano y repetir la agitación. Llevar a ampolla de decantación, drenar sobre lana de vidrio y descartar la fase orgánica. Las cantidades indicadas son para una muestra, por lo que deberán aumentarse las mismas de acuerdo a las muestras a analizar (62).

- Preparación de blancos y estandar: se incluyen dos blancos conteniendo los reactivos y dos estandar en duplicado para cada nivel de determinaciones. Se lee un blanco y un estandar antes de leer las muestras y el otro par al final de las lecturas.

Para los patrones se ponen 1,2 y 3 ml de solución patrón

de Selenio que corresponde a 0,1;0,2 y 0,3 mg de Selenio en tres erlenmeyers, agregar el ácido nítrico y el ácido perclórico 70% y desarrollar la técnica que luego se describe.

Para los blancos se usan los mismos volúmenes de ácido nítrico y perclórico 70% usado para los análisis, con los que se desarrolla todo el proceso.

b) Desarrollo de la técnica

En un matraz de 100 ml se ponen 5 g de planta seca y molida, se agregan 30 ml de ácido nítrico concentrado y se cubre, dejando bajo campana toda la noche para que se realice la pre-digestión.

Al día siguiente se agita y calienta a 50-70°C para acelerar la descomposición del material vegetal, se enfría y enrasa a 100 ml.

Se transfieren 10 ml de muestra por duplicado en un erlenmeyer de 125 ml para digerir. Agregar 5-7 ml de ácido nítrico concentrado y 4 ml de ácido perclórico al 70% y 1 o 2 perlas de vidrio.

Se ubican los erlenmeyers sobre una plancha de aluminio y se calienta gradualmente hasta ebullición y se mantiene a esa temperatura hasta que se observen vapores blancos producidos por el ácido perclórico, luego se retiran de la plancha y se agregan unas gotas de ácido nítrico. Las muestras que presentan una coloración anaranjada se calientan nuevamente hasta que desprendan vapores.

Luego de estos pasos se reponen los tubos en la plancha y se los vuelve a calentar y a partir de la ebullición de todos ellos se dejan 20 minutos más. Luego de este tiempo se agitan y se reduce la temperatura de la plancha para que no hiervan y se dejan otros 10 minutos.

Al final de la digestión todas las soluciones son claras, incoloras. Si apareciera algún color debe seguirse con la digestión para eliminar los restos de ácido nítrico y si aún así no desaparece debe eliminarse agregando un complejante (EDTA) para eliminar restos de metales.

Posteriormente se agregan 3 ml de ácido clorhídrico (1:9) y se reponen en la plancha caliente. Cuando los frascos muestren reflujos de vapores se dejan 20 minutos más, retirar y dejar enfriar.

Agregar 10 ml de solución de EDTA en cada frasco y mezclar, adicionar 1,2 ml de hidróxido de amonio concentrado y mezclar. Agregar una gota de indicador de rojo cresol, seguido de algunas gotas de hidróxido de amonio hasta un color anaranjado-rosado. A partir de este momento todas las operaciones se hacen en semioscuridad o con luz amarilla para evitar alteraciones de los reactivos.

Se agregan 5 ml de 2,3-diaminonaftaleno (DAN), se agita y se deja 30 minutos sobre la plancha caliente a 50°C. Agregar 6 ml de ciclohexano a cada tubo, cubrirlos y agitar (agitador orbital) por 5 minutos a 100-140 rpm. Introducir una pipeta hasta el fondo de los tubos y agregar agua lentamente. De esta forma el ciclohexano se mantiene en la fase superior y es de fácil recuperación.

Transferir el volumen necesario de ciclohexano a los tubos del fluorómetro, irradiar a 376 nm y medir la fluorescencia a 518 nm dentro de los 15 minutos.

Los cálculos se hacen partiendo de la fórmula $y = a + b \cdot x$, relacionando la cantidad de Selenio de los patrones con el porcentaje de emisión (62).

2) Obtención de Selenio para determinación de Dosis Tóxica -50 y Dosis Letal -50

Debido a las dificultades que presenta la extracción de Selenio del vegetal se usa un preparado comercial de selenio que se solubilizará en agua y se prepara en las concentraciones que eventualmente presente la planta.

III.A.VI. Ensayo de nitrocompuestos orgánicos

La determinación cualitativa como cuantitativa de nitro compuestos orgánicos se basa en el método de Cook para ácido nítroso, modificado sucesivamente por Williams y Norris (38), Williams y Parker (13) y Williams y Barneby (44). También se usa como técnica cualitativa muy específica la cromatografía en capa fina.

Para el desarrollo de estos análisis se usa como patrón positivo al A. miser var. oblongifolius (r). C., cedido por M.C. Williams de la Universidad de Logan, Utah, USA, y como patrones para cromatografía en capa fina, ácido 3 nitropropanoico, 3-nitro-1-propanol y Cibarian, cedidos por el Prof. Stermitz de la Universidad de Fort Collins, Colorado, U.S.A.

1.- Ensayo cualitativo de nitrocompuestos orgánicos

a- Determinación por reactivo de Griess-Ilosvay

Para esta determinación es necesario contar con ácido clorhídrico 1N, hidróxido de potasio al 20% y reactivo de Griess-Ilosvay que se prepara de la siguiente manera.

Solución A.

ácido sulfanílico p.a.....0,5 g
ácido acético glacial 2N.....150 ml

Solución B.

alfa-naftilamina p.a.....0,1 g
agua destilada.....20 ml
ácido acético glacial 2N.....150 ml

Para el desarrollo de la técnica se toman 10 mg de material vegetal seco y molido y se colocan en dos tubos de ensayo, se agrega 1 ml de ácido clorhídrico 1N, se mezcla y mantiene a temperatura ambiente por 2 horas con agitación frecuente. Posteriormente se agrega 1 ml de hidróxido de potasio al 20% en cada tubo y se deja a temperatura ambiente por dos horas con agitación frecuente. Transcurrido este tiempo se agregan 2 ml de ácido acético glacial puro a uno de los tubos y al otro 1 ml de ácido acético glacial y 1 ml de reactivo de Griess-Ilosvay. Este reactivo se prepara mezclando partes iguales de solución A y B en el momento de usar.

La reacción positiva se manifiesta a los pocos minutos (10-15) por una coloración rosada a rojo según la cantidad de nitrocompuestos presentes (13,25,26,42,46).

b- Determinación por cromatografía en capa fina.

La inclusión de esta técnica en la determinación cualitativa de nitrocompuestos orgánicos se debe a su gran sensibilidad y debido a que como el reactivo de Griess-Ilosvay reacciona con el grupo nitro de este tipo de compuestos orgánicos podría haber algún tipo de interferencia si las plantas poseen nitritos inorgánicos.

Para realizarla es necesario obtener un extracto de las plantas tal como se describe a continuación:

Se toman 2 o 3 g de planta seca y molida y se extrae con acetona a temperatura ambiente. Se realizan dos o tres cambios de solvente y los extractos reunidos se filtran. Se evapora la acetona dejando un residuo oscuro del cual se toma una parte al que se le practica una hidrólisis ácida para separar del glicósido la porción de aglicona.

La hidrólisis se realiza agregando, al residuo disuelto en un pequeño volumen de etanol, 10 ml de ácido clorhídrico 3N, se lleva a baño maría hirviendo por 3 o 4 horas, con refrigerante a reflujo luego de lo cual se retira el refrigerante y se evapora a seco (58).

De esta forma se obtiene un primer residuo no hidrolizado que contiene el glicósido nitrado mientras que el segundo posee sólo el resultado de esa hidrólisis.

Estas muestras se siembran en placas de cromatografía en capa fina de 0,25 mm de espesor junto con patrones conocidos de ácido 3-nitropropanoico, 3-nitro-1-propanol y cibarian. El desarrollo del cromatograma se realiza en un sistema de solvente compuesto por benceno-metanol (5:3) (46).

Una vez desarrollado el cromatograma se retira de la cuba, se deja secar y se lo revela con p-nitroanilina diazotada de Majak y Bose (63) preparado de la siguiente forma:

nitrito de sodio 5%0,3 ml
p-nitroanilina 0,3% en C1H 1N 10 ml

Se debe preparar antes de usar y el revelado se hace de la forma siguiente:

La placa seca, se lleva a campana de revelado y se rocía con una mezcla de hidróxido de sodio 2M-etanol (1:1) y seguidamente con p-nitroanilina diazotada. La presencia de nitroderivados se manifiesta por la formación de manchas nítidas de color rojo de intensidad variable y que devienen a amarillo pálido a medida que se secan (63).

2.- Determinación cuantitativa

En la determinación cuantitativa se utilizan los mismos reactivos que para la determinación cualitativa sólo que se suma un espectrofotómetro, en este caso se usa un espectrofotómetro Perkin Elmer, Coleman 55.

En un tubo de ensayo se colocan 500 mg de planta seca y molida, al que se agregan 10 ml de ácido clorhídrico 1N y se deja a temperatura ambiente por dos horas con agitación frecuente. Luego se filtra por papel y distribuyen alícuotas de 1 ml en tres tubos de ensayo. A éstos se les agrega 1 ml de hidróxido de potasio, se tapan y se deja a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente se agregan 5 ml de agua destilada a todos los tubos, 2 ml de ácido acético glacial a uno de los tubos que servirá como blanco y a los dos tubos restantes 1 ml de ácido acético glacial y 1 ml de reactivo de Griess-Ilosvay. Se llevan a heladera por 15 minutos, se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos y se leen en espectrofotómetro a 530 nm. La cantidad de nitritos presentes se determina según los valores de absorbancia obtenidos en la curva patrón hecha en base a 500 mg de planta seca (58). En la Tabla N° 7, se dan los valores de absorbancia obtenidos en la realización de la curva patrón.

TABLA N° 7: Valores de Nitrito sobre Absorbancia, hecha en base a ác. 3-nitropropanoico (expresado como mg de NO_2^- por gramo de planta seca).

ABS.	mg	ABS.	mg.	ABS.	mg.	ABS.	mg.
.021	2.00	.057	4.25	.093	5.23	.129	6.14
.022	2.07	.058	4.28	.094	5.25	.130	6.16
.023	2.13	.059	4.30	.095	5.28	.131	6.18
.024	2.20	.060	4.33	.096	5.30	.132	6.20
.025	2.30	.061	4.35	.097	5.33	.133	6.22
.026	2.40	.062	4.37	.098	5.35	.134	6.24
.027	2.48	.063	4.40	.099	5.38	.135	6.26
.028	2.53	.064	4.43	.100	5.40	.136	6.28
.029	2.60	.065	4.46	.101	5.43	.137	6.30
.030	2.67	.066	4.48	.102	5.45	.138	6.32
.031	2.73	.067	4.51	.103	5.48	.139	6.34
.032	2.80	.068	4.54	.104	5.51	.140	6.36
.033	2.87	.069	4.57	.105	5.54	.141	6.38
.034	2.93	.070	4.60	.106	5.57	.142	6.40
.035	3.00	.071	4.63	.107	5.60	.143	6.42
.036	3.10	.072	4.65	.108	5.63	.144	6.44
.037	3.20	.073	4.68	.109	5.66	.145	6.47
.038	3.27	.074	4.70	.110	5.68	.146	6.49
.039	3.33	.075	4.73	.111	5.71	.147	6.51
.040	3.40	.076	4.75	.112	5.74	.148	6.53
.041	3.47	.077	4.78	.113	5.77	.149	6.55
.042	3.53	.078	4.80	.114	5.80	.150	6.58
.043	3.60	.079	4.83	.115	5.83	.151	6.60
.044	3.70	.080	4.85	.116	5.86	.152	6.62
.045	3.80	.081	4.88	.117	5.88	.153	6.64
.046	3.87	.082	4.91	.118	5.90	.154	6.66
.047	3.93	.083	4.94	.119	5.93	.155	6.68
.048	4.00	.084	4.97	.120	5.95	.156	6.70
.049	4.03	.085	5.00	.121	5.98	.157	6.72
.050	4.06	.086	5.03	.122	6.00	.158	6.74
.051	4.08	.087	5.06	.123	6.02	.159	6.76
.052	4.11	.088	5.08	.124	6.04	.160	6.78
.053	4.14	.089	5.11	.125	6.06	.161	6.80
.054	4.17	.090	5.14	.126	6.08	.162	6.82
.055	4.20	.091	5.17	.127	6.10	.163	6.84
.056	4.23	.092	5.20	.128	6.12	.164	6.86

(Tabla N° 7; cont.)

ABS.	mg.	ABS.	mg.	ABS.	mg.	ABS.	mg.
.165	6.88	.204	7.68	.243	8.33	.283	8.89
.166	6.90	.205	7.70	.244	8.34	.284	8.90
.167	6.92	.206	7.72	.245	8.35	.285	8.91
.168	6.94	.207	7.74	.246	8.37	.286	8.93
.169	6.96	.208	7.76	.247	8.38	.287	8.94
.170	6.98	.209	7.78	.248	8.40	.288	8.96
.171	7.00	.210	7.80	.249	8.41	.289	8.97
.172	7.02	.211	7.82	.250	8.43	.290	8.98
.173	7.04	.212	7.84	.251	8.44	.291	9.00
.174	7.06	.213	7.86	.252	8.46	.292	9.01
.175	7.08	.214	7.88	.253	8.47	.293	9.03
.176	7.10	.215	7.90	.254	8.48	.294	9.04
.177	7.12	.216	7.92	.255	8.50	.295	9.06
.178	7.14	.217	7.94	.256	8.51	.296	9.07
.179	7.16	.218	7.96	.257	8.53	.297	9.08
.180	7.18	.219	7.98	.258	8.54	.298	9.10
.181	7.20	.220	8.00	.259	8.55	.299	9.11
.182	7.22	.221	8.01	.260	8.57	.300	9.13
.183	7.24	.222	8.03	.261	8.58	.301	9.14
.184	7.26	.223	8.04	.262	8.60	.302	9.15
.185	7.28	.224	8.06	.263	8.61	.303	9.17
.186	7.30	.225	8.07	.264	8.63	.304	9.18
.187	7.32	.226	8.08	.265	8.64	.305	9.20
.188	7.34	.227	8.10	.267	8.66	.306	9.21
.189	7.36	.228	8.11	.268	8.67	.307	9.23
.190	7.38	.229	8.13	.269	8.68	.308	9.24
.191	7.40	.230	8.14	.270	8.70	.309	9.26
.192	7.42	.231	8.15	.271	8.71	.310	9.27
.193	7.44	.232	8.17	.272	8.73	.311	9.28
.194	7.47	.233	8.18	.273	8.74	.312	9.30
.195	7.49	.234	8.20	.274	8.75	.313	9.31
.196	7.51	.235	8.21	.275	8.77	.314	9.33
.197	7.53	.236	8.23	.276	8.80	.315	9.34
.198	7.55	.237	8.24	.277	8.81	.316	9.35
.199	7.58	.238	8.26	.278	8.83	.317	9.37
.200	7.60	.239	8.27	.279	8.84	.318	9.38
.201	7.62	.240	8.28	.280	8.85		
.202	7.64	.241	8.30	.281	8.87		
.203	7.66	.242	8.31	.282	8.88		

(Tabla N° 7; cont.)

ABS.	mg.	ABS.	mg	ABS.	mg.	ABS.	mg.
.319	9.40	.357	9.94	.395	10.45	.434	10.96
.320	9.41	.358	9.95	.396	10.47	.435	10.97
.321	9.43	.359	9.97	.397	10.48	.436	10.98
.322	9.44	.360	9.98	.398	10.49	.437	11.00
.323	9.46	.361	10.00	.399	10.50	.438	11.01
.324	9.47	.362	10.01	.400	10.52	.439	11.03
.325	9.48	.363	10.03	.401	10.53	.440	11.04
.326	9.50	.364	10.04	.402	10.54	.441	11.05
.327	9.51	.365	10.05	.403	10.56	.442	11.07
.328	9.53	.366	10.07	.404	10.57	.443	11.08
.329	9.54	.367	10.08	.405	10.58	.444	11.09
.330	9.55	.368	10.09	.406	10.60	.445	11.10
.331	9.57	.369	10.10	.407	10.61	.446	11.12
.332	9.58	.370	10.12	.408	10.63	.447	11.13
.333	9.60	.371	10.13	.409	10.64	.448	11.14
.334	9.61	.372	10.14	.410	10.65	.449	11.16
.335	9.63	.373	10.16	.411	10.67	.450	11.17
.336	9.64	.374	10.17	.412	10.68	.451	11.18
.337	9.66	.375	10.18	.413	10.69	.452	11.20
.338	9.67	.376	10.20	.415	10.70	.453	11.21
.339	9.68	.377	10.21	.416	10.72	.454	11.23
.340	9.70	.378	10.23	.417	10.73	.455	11.24
.341	9.71	.379	10.24	.418	10.74	.456	11.25
.342	9.73	.380	10.25	.419	10.76	.457	11.28
.343	9.74	.381	10.27	.420	10.77	.458	11.29
.344	9.76	.382	10.28	.421	10.78	.459	11.30
.345	9.77	.383	10.29	.422	10.80	.460	11.32
.346	9.78	.384	10.30	.423	10.81	.461	11.33
.347	9.80	.385	10.32	.424	10.83	.462	11.34
.348	9.81	.386	10.33	.425	10.84	.463	11.36
.349	9.83	.387	10.34	.426	10.85	.464	11.37
.350	9.84	.388	10.36	.427	10.87	.465	11.38
.351	9.86	.389	10.37	.428	10.88	.466	11.40
.352	9.87	.390	10.38	.429	10.89	.467	11.41
.353	9.88	.391	10.40	.430	10.90	.468	11.43
.354	9.90	.392	10.41	.431	10.91	.469	11.44
.355	9.91	.393	10.43	.432	10.93	.470	11.45
.356	9.93	.394	10.44	.433	10.94	.471	11.47

(Tabla N° 7; cont.)

ABS.	mg.	ABS.	mg.	ABS.	mg.	ABS.	mg.
.472	11.48	.510	11.98	.548	12.46	.586	12.92
.473	11.49	.511	12.00	.549	12.47	.587	12.93
.474	11.50	.512	12.01	.550	12.48	.588	12.94
.475	11.52	.513	12.02	.551	12.50	.589	12.95
.476	11.53	.514	12.04	.552	12.51	.590	12.97
.477	11.54	.515	12.05	.553	12.53	.591	12.98
.478	11.56	.516	12.06	.554	12.54	.592	13.00
.479	11.57	.517	12.07	.555	12.56	.593	13.01
.480	11.58	.518	12.08	.556	12.57	.594	13.02
.481	11.60	.519	12.10	.557	12.58	.595	13.04
.482	11.61	.520	12.11	.558	12.58	.596	13.05
.483	11.63	.521	12.12	.559	12.60	.597	13.06
.484	11.64	.522	12.13	.560	12.61	.598	13.07
.485	11.65	.523	12.14	.561	12.62	.599	13.08
.486	11.67	.524	12.16	.562	12.64	.600	13.10
.487	11.68	.525	12.17	.563	12.65	.601	13.11
.488	11.69	.526	12.18	.564	12.66	.602	13.12
.489	11.70	.527	12.20	.565	12.67	.603	13.13
.490	11.72	.528	12.21	.566	12.68	.604	13.14
.491	11.73	.529	12.22	.567	12.70	.605	13.16
.492	11.74	.530	12.24	.568	12.71	.606	13.17
.493	11.76	.531	12.25	.569	12.72	.607	13.18
.494	11.77	.532	12.26	.570	12.73	.608	13.20
.495	11.78	.533	12.27	.571	12.74	.609	13.21
.496	11.80	.534	12.28	.572	12.76	.610	13.22
.497	11.81	.535	12.30	.573	12.77	.611	13.24
.498	11.83	.536	12.31	.574	12.78	.612	13.25
.499	11.84	.537	12.32	.575	12.80	.613	13.26
.500	11.85	.538	12.33	.576	12.81	.614	13.27
.501	11.87	.539	12.34	.577	12.82	.615	13.28
.502	11.88	.540	12.36	.578	12.83	.616	13.30
.503	11.89	.541	12.37	.579	12.84	.617	13.31
.504	11.90	.542	12.38	.580	12.86	.618	13.32
.505	11.92	.543	12.40	.581	12.87	.619	13.33
.506	11.93	.544	12.41	.582	12.88	.620	13.34
.507	11.94	.545	12.42	.583	12.89	.621	13.36
.508	11.96	.546	12.43	.584	12.90	.622	13.37
.509	11.97	.547	12.45	.585	12.91	.623	13.38

(Tabla N° 7, cont.)

ABS.	mg	ABS.	mg.	ABS.	mg.
.624	13.40	.662	13.87	.700	14.31
.625	13.41	.663	13.88	.701	14.32
.626	13.42	.664	13.90	.702	14.33
.627	13.44	.665	13.91	.703	14.34
.628	13.45	.666	13.92	.704	14.35
.629	13.46	.667	13.93	.705	14.37
.630	13.47	.668	13.94	.706	14.38
.631	13.48	.669	13.96	.707	14.39
.632	13.50	.670	13.97	.708	14.40
.633	13.51	.671	13.98	.709	14.41
.634	13.52	.672	14.00	.710	14.42
.635	13.53	.673	14.01	.711	14.43
.636	13.54	.674	14.02	.712	14.44
.637	13.56	.675	14.03	.713	14.46
.638	13.57	.676	14.04	.714	14.47
.639	13.58	.677	14.06	.715	14.48
.640	13.60	.678	14.07	.716	14.49
.641	13.61	.679	14.08	.717	14.50
.642	13.62	.680	14.09	.718	14.51
.643	13.64	.681	14.10	.719	14.52
.644	13.65	.682	14.11	.720	14.53
.645	13.66	.683	14.12	.721	14.54
.646	13.67	.684	14.13	.722	14.55
.647	13.68	.685	14.14	.723	14.57
.648	13.70	.686	14.15	.724	14.58
.649	13.71	.687	14.17	.725	14.59
.650	13.72	.688	14.18	.726	14.60
.651	13.73	.689	14.19		
.652	13.74	.690	14.20		
.653	13.76	.691	14.21		
.654	13.77	.692	14.22		
.655	13.78	.693	14.23		
.656	13.80	.694	14.24		
.657	13.81	.695	14.26		
.658	13.82	.696	14.27		
.659	13.84	.697	14.28		
.660	13.85	.698	14.29		
.661	13.86	.699	14.30		

3- Extracción, aislamiento y purificación de nitrocompuestos orgánicos con fines de identificación y determinación de Dosis Tóxica -50 y Dosis Letal 450

Los materiales y técnicas de laboratorio empleados en la realización de los ensayos definitivos que se describen en el presente trabajo fueron precedidos por ensayos en menor escala que orientaron su realización.

Salvo indicación en contrario, los diferentes ensayos se realizaron sobre planta total previamente acondicionada tal como se ha descrito en el capítulo correspondiente.

a- Acondicionamiento de la muestra previo a la extracción,

Antes de proceder a la extracción de nitroderivados orgánicos el material vegetal recolectado fresco, seleccionado, fue secado a temperatura de 40-50°C, consignándose la disminución de peso sufrida como correspondiente a humedad contenida.

Para utilizar paralelamente con estos ensayos se recibieron muestras puras de ácido 3-nitropropanoico, 3-nitro-1-propanol, y Cibarian cedidos por el Prof. Stermitz de la Universidad de Fort-Collins, Colorado, USA, que se usaron como patrones auténticos.

b- Extracción de nitroderivados totales.

- Solventes y equipos usados en la extracción
- Acetona pura
- Balones de vidrio de 500 ml.
- Agitador orbital
- Evaporador rotativo Büchi.

En base a la información bibliográfica reunida sobre extracción de nitroderivados orgánicos en especies del género Astragalus, se decidió la utilización de acetona a temperatura ambiente como solvente extractivo en lugar de etanol en caliente, que si bien permite una extracción a fondo en un lapso relativamente breve, favorece procesos hidrolíticos parciales de los productos a extraer.

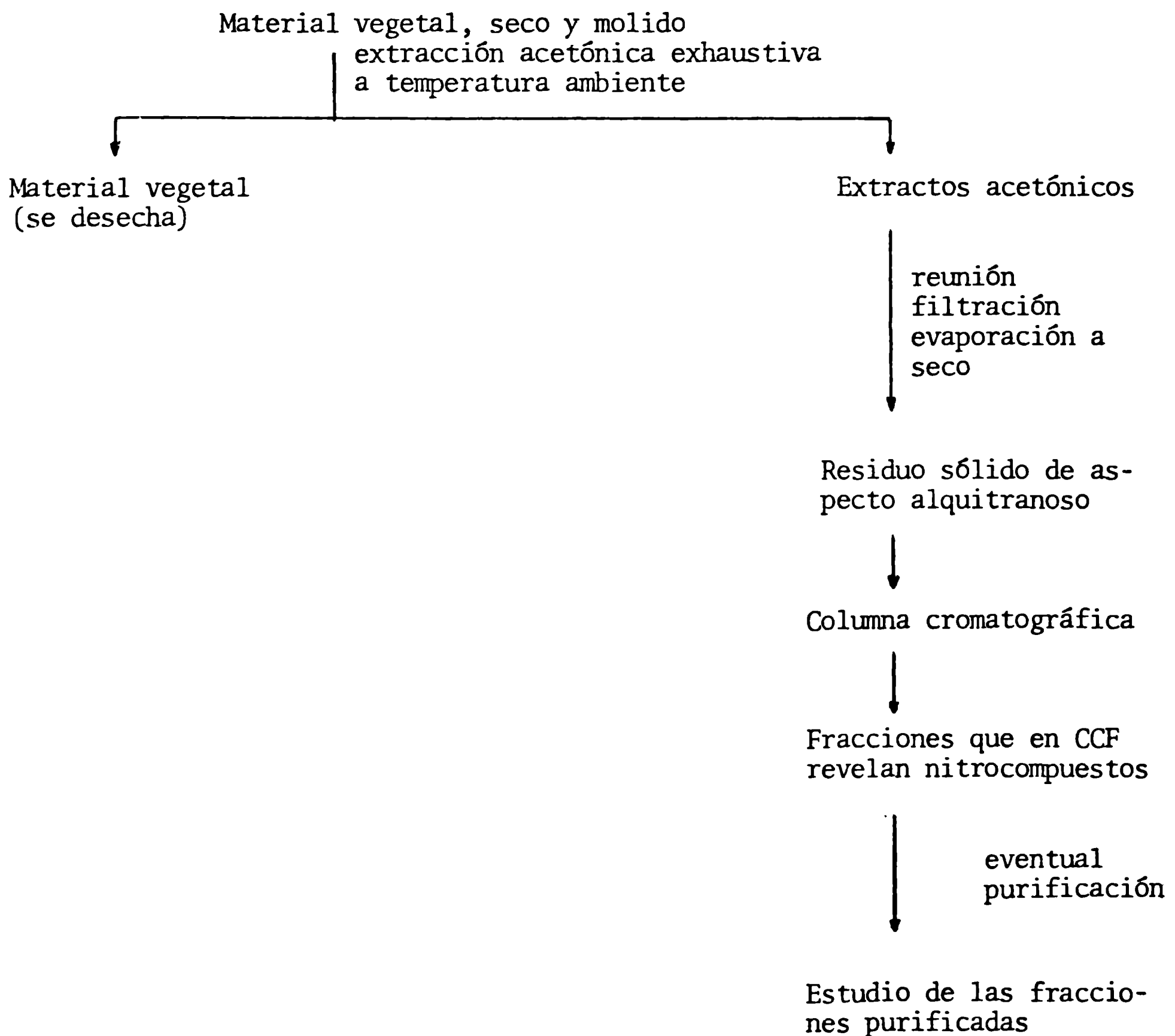
En consecuencia el material vegetal previamente secado y molido se somete a sucesivas extracciones en balón de capacidad adecuada cubriéndolo con acetona destilada y dejando en

contacto a temperatura ambiente, en cada ocasión, un mínimo de seis a ocho horas con agitación frecuente.

La extracción se da por terminada cuando el test de Griess-Ilosvay, practicado en el extracto acetónico, da resultados negativos o débilmente positivos.

Los extractos acetónicos reunidos, filtrados y evaporados a sequedad en rotavapor al vacío, dejan un residuo sólido de aspecto alquitranoso sobre el que, a título orientativo puede repetirse el test de Griess-Ilosvay para estimar su intensidad y es conveniente realizar pruebas de cromatografía en capa fina para inferir el número de productos (manchas) presentes en el extracto total. Los pasos precedentemente descriptos se resumen en Tabla N° 8.

Tabla N° 8. Astragalus distinsens, A. bergii y A. miser. Extracción, aislamiento y purificación de nitrocompuestos orgánicos.



c- Cromatografía en capa fina.

Reactivos y equipos

- Sílica gel G
- Revelador de p-nitroanilina (63)
 - nitrito de sodio 5%.....0,3 ml
 - p-nitroanilina 0,3% en ClH 1N...10 ml
- Revelador para glicósidos (64)
 - etanol 95% 9 ml
 - Ac. sulfúrico conc..... 0,5 ml
 - Anisaldehido 0,5 ml
- Solvente para nitrocompuestos
 - Benceno-metanol 5:3
- Solvente para glicósidos
 - Cloroformo-Metanol-Agua 65 30 10
- Equipos: placas de vidrio 20 x 20 cm
- placas de vidrio 15 x 6,6 cm
- cuba cromatográfica de tamaño apropiado
- extensor Desaga para C.C.F

Esta técnica auxiliar de laboratorio, de amplia difusión y aplicación en la actualidad, se practicó exclusivamente sobre capas de sílicagel G, de 0,25 mm de espesor, extendidas según la técnica habitual sobre placas de vidrio y activadas durante 1 hora en estufa a 120°C. Luego de activadas y una vez a temperatura ambiente, las placas se guardan en ambiente anhidro hasta su utilización.

En cuanto a las cubas para el desarrollo de cromatogramas, en el primer caso se utilizaron las que habitualmente provee el comercio y en el segundo (15 x 6,6 cm) fueron construídas en el Taller de Vitroplastía de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis con tubos cilíndricos de 7 cm de diámetro asegurando cierre hermético mediante esmerilado de boca y tapa.

En lo que hace a solventes para el desarrollo de cromatogramas de nitrocompuestos orgánicos, la gran mayoría de los trabajos previos dan como solvente de elección la mezcla benceno-metanol, 5:3 (63), por lo que se encaró un pequeño estudio de nuevos solventes cuyas características se describen posteriormente (Resultados) en este trabajo.

Para comprobar la naturaleza glicosídica de los nitro-compuestos orgánicos se usa el desarrollo de cromatogramas con solventes apropiados que se revelan con el sistema antes indicado.

d- Reveladores para cromatografía en capa fina.

Una vez desarrollado el cromatograma y evaporado el solvente que impregna la capa de sílicagel, las placas son pulverizadas con una mezcla de Hidróxido de sodio 2M-Etanol 1:1 y seguidamente con revelador de p-nitroanilina diazotada, de preparación reciente.

En el caso de presencia de nitroderivados orgánicos, éstos revelan en forma inmediata con coloraciones que van del rojo ladrillo al rojo vivo, con pérdida paulatina de intensidad y pasaje a color beige luego de una hora para finalmente, al cabo de aproximadamente 24 horas, devenir amarillo pálido estable.

Para la búsqueda de glicósidos, el cromatograma, luego de desarrollado y evaporado el solvente se pulveriza con el revelador apropiado y se lleva a estufa 15 minutos a 120°C. Las manchas positivas se revelan por color azul de distinta intensidad sobre fondo verde pálido.

e- Cromatografía en columna

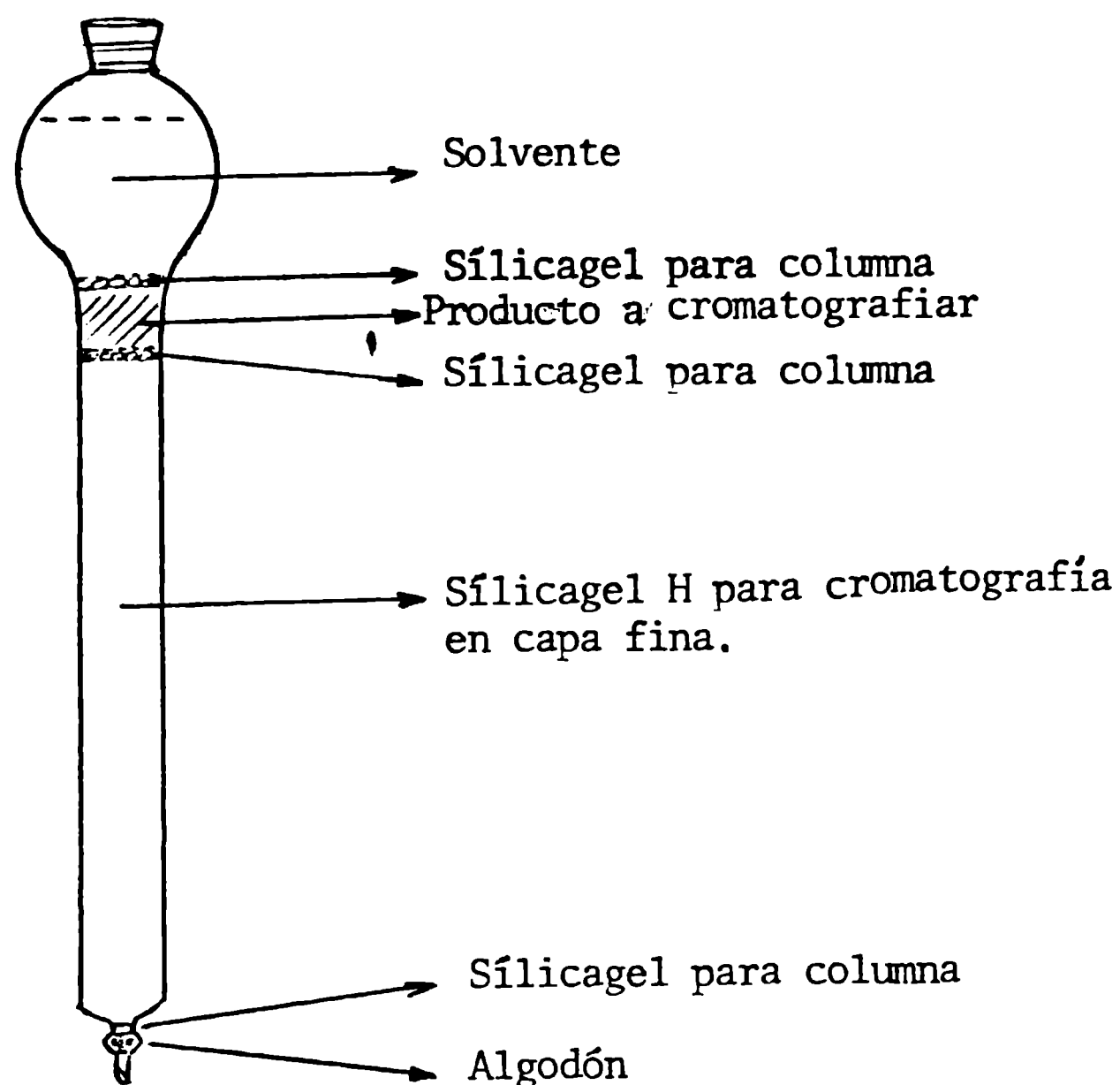
Descripción de reactivos y equipos usados.

- Reactivos: Sílicagel 60, 70-270 mesh, 0, 05-0,2 mm de partícula
Sílicagel 60 H
Solventes: benceno, metanol, cloroformo.

- Equipos

Columna cromatográfica de vidrio de 3,4 x 32 cm con depósito superior de solventes (Figura N° 3).

Figura N° 3: Columna cromatográfica usada.



1- Solventes a utilizar

Para el caso de ensayos separativos sobre sílicagel para cromatografía en columna se sigue el esquema clásico de montaje de la columna con un solvente (o mezcla de solventes) poco polar, para luego durante el desarrollo de la misma, aumentar paulatinamente la polaridad. Por el contrario, en el caso de ensayos en que se usa sílicagel para cromatografía en capa fina como lecho adsorbente, la columna debe montarse y desarrollarse con la mezcla de solventes que en cromatografía en capa fina permite una adecuada separación de los productos. Ello no obstante, pueden realizarse ensayos separativos con sílicagel para cromatografía en capa fina como adsorbente de columna en los que se va incrementando la polaridad del solvente obteniéndose excelentes resultados. En los distintos ensayos se usan diferentes mezclas solventes: benceno-metanol, 5:3 y cloroformo-etanol 90:10 como solventes de montaje para luego, durante la elución, pasar a cloroformo-etanol 90:10, 85:15; 80:20 y finalmente 70:30.

2- Montaje de columnas cromatográficas

El montaje de columnas cromatográficas es ya tarea rutinaria de laboratorio. Seleccionado el tubo de vidrio que permita trabajar en la relación producto-adsorbente y diámetro-altura necesarias, se conecta una llave de paso al extremo inferior aguzado, se fija la columna a un parante y se vierte en su interior un pequeño volumen de solvente de montaje. Se introduce luego un pequeño trozo de algodón al que se compacta en el pico de la columna para que retenga el lecho adsorbente y finalmente se vierte en ella la sílica gel suspendida en el solvente de montaje dejando sedimentar lentamente (para acelerar la sedimentación puede abrirse la llave inferior cuidando que quede siempre solvente sobrenadante). Una vez compactado el lecho adsorbente se procede a agregar el residuo a cromatografiar: si este residuo es soluble en el solvente de partida, se utiliza para ello el mínimo volumen que permita disolución total y se aplica al tope de la columna. Si por el contrario el residuo no se solubiliza totalmente en el solvente inicial se procede de la siguiente manera: el producto a cromatografiar se disuelve totalmente en un solvente orgánico de bajo punto de ebullición (cloroformo, cloruro de metileno, etanol, metanol o mezclas de éstos en distintas proporciones) y a la solución obtenida se agregan lentamente entre 4 a 6 gramos de adsorbente (sílicagel) por cada gramo de residuo, se agita y deja en heladera durante varias horas, agitando periódicamente. Se logra así la fijación del residuo en la superficie del adsorbente, proceso que es favorecido por una baja concentración de soluto y asimismo por la disminución de la temperatura.

Posteriormente se evapora el solvente en rotavapor al vacío, llevando a sequedad, obteniéndose lo que comunmente se denomina "cabeza" (residuo fijado al adsorbente) y que antes de ser aplicada al tope de la columna, debe ser suavemente disgregada en mortero.

En cuanto al volumen de las fracciones a recolectar, la práctica usual es la siguiente: para columnas de sílica gel 60, 70-270 mesh o de alúmina se toman fracciones de aproximadamente 50% del volumen del lecho adsorbente y en columnas de sílicagel H para cromatografía en capa fina aproximadamente 10% del lecho.

En el desarrollo de cada columna cromatográfica las distintas fracciones obtenidas son evaporadas a seco y los residuos resultantes cromatografiados en capa fina para visualizar número y tipo de productos eluidos. Las fracciones de idénticas características son reunidas.

3- Purificación e identificación de las fracciones obtenidas.

Reactivos y equipos necesarios.

Lecho filtrante: Sephadex LH-20

- Equipos: Columnas de vidrio de diámetro y altura apropiados.

Espectrómetro infrarrojo Beckman IR 10.

Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, Varian EM 360 A de 60 MHz.

Espectrómetro de Masas, Variant Mat 112 S.

Polarímetro digital, Perkin Elmer 141

En el caso de fracciones (o reunión de éstas) que dejen residuo apreciable y para las que la cromatografía en capa fina revela presencia de nitrocompuestos acompañados de impurezas, se hace necesario eliminarlas a efectos de facilitar la identificación del producto y asimismo evitar errores considerables en la determinación de Dosis Tóxica 50 y Dosis Letal 50.

Con esta finalidad, los residuos a purificar pueden ser recromatografiados en columna de silicagel incrementando sustancialmente la relación adsorbente-producto y en menor medida altura-diámetro y además efectuar los cambios de polaridad del solvente en forma muy gradual y para el caso de montar y desarrollar la columna con un único solvente, disminuir ligeramente su polaridad.

Esta purificación por recromatografiado en columna suele ser efectiva pero demanda considerable tiempo.

Otro método para eliminar impurezas y que se aplica con excelentes resultados consiste en la filtración a través de gels: en nuestro caso se utiliza Sephadex LH-20 acondicionado en columnas comunes de vidrio de 150 ml de capacidad.

Con este tipo de gel filtrante pueden usarse diferentes solventes orgánicos obteniéndose los mejores resultados con aquellos que permiten un óptimo hinchamiento de sus partículas

como por ejemplo metanol. Sin embargo en diversos ensayos se reemplaza metanol por mezclas de cloroformo-etanol 1:1, 40:60 y 30:70 lográndose una mejor resolución de bandas y en consecuencia, productos más puros. Asimismo estas columnas de Sephadex LH-20 se pueden operar con aplicación de presión moderada con lo que se aumenta la velocidad de goteo y reduce el tiempo, sin afectar la resolución.

Los residuos obtenidos y purificados de la manera precedentemente descrita que se evidencian homogéneos en cromatografía en capa fina revelando un solo producto con características de nitrocompuestos orgánicos fueron analizados por co-cromatografía en placa frente a muestras auténticas (cuando de ellas se disponía) y muy especialmente por espectroscopía Infrarroja (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectroscopía de Masa (EM) a efectos de lograr su identificación.

Finalmente los compuestos puros identificados se usan para la determinación de Dosis Tóxica 50 y Dosis-Letal 50.

III.A.VII. Ensayos extractivos de productos de baja polaridad (terpenos, esteroides) y de alcaloides.

Si bien en la revisión bibliográfica realizada no se han encontrado trabajos que informen de la presencia de terpenos, esteroides o alcaloides en especies del género Astragalus se consideró de interés realizar ensayos tendientes a su detección.

Algunos procedimientos y técnicas de laboratorio aplicados en este procesamiento son idénticos a los descritos para nitrocompuestos orgánicos, por lo que de ser necesario, sólo se explicitarán aquí las diferencias que existan.

a) Acondicionamiento de la muestra previo a la extracción

El material vegetal fue acondicionado de la manera ya descripta.

b) Extracción de terpenos-esteroides y de alcaloides.

1- Para la extracción de terpenos y esteroides, el material vegetal seco y molido se extrae en equipo Soxhlet con cloroformo durante 4-6- horas dando por concluido el proceso cuando el solvente que impregna la muestra deviene prácticamente incoloro. El extracto clorofórmico filtrado y evaporado a sequedad deja un residuo sólido oscuro que es posteriormente procesado. Ante la posibilidad de que la extracción clorofórmica pueda extraer alcaloides débilmente polares, es conveniente realizar con este extracto ensayos de cromatografía en capa fina usando solventes y reveladores específicos de alcaloides.

2- El material vegetal extraído con cloroformo se retira del equipo extractor, se esparce en un recipiente adecuado y se elimina, bajo campana, el solvente de impregnación. Luego se vuelve al Soxhlet y se extrae exhaustivamente con metanol (3-4 horas) hasta que el extracto que sifona sea incoloro o débilmente coloreado. El extracto metanólico filtrado y evaporado a sequedad deja un residuo sólido, de coloración marrón oscura que contiene alcaloides totales.

c) Cromatografía en capa fina (CCF). Reveladores

1- Para terpenos y esteroides los ensayos de cromatografía

en capa fina se realizan usando n-hexano-acetato de etilo 90:10 como solvente de desarrollo y ácido sulfúrico concentrado-ácido acético glacial-agua, 1:20:4 como revelador (este revelador es habitualmente denominado "Oleum"). Para que se desarrolle color es necesario introducir las placas pulverizadas con oleum en estufa a 100°C durante 10'; los esteroides revelan como manchas oscuras y terpenos generalmente dan inicialmente manchas rojizas, moradas que lentamente devienen grisáceas.

2- Los ensayos de cromatografía en capa fina para alcaloides se realizan utilizando distintos sistemas solventes para el desarrollo de los cromatogramas: cloroformo-metanol 90:10, 85:15, y 80:20; etanol-ácido clorhídrico 2N 9:1 y cloroformo-etanol-ácido acético glacial 1:9:1.

En cuanto a reveladores de capa fina se utiliza Reactivo de Dragendorff de la siguiente composición:

- Solución madre

Subnitrate de bismuto	30 g
Iodo sublimado	38 g
Ioduro de potasio	225 g
Agua c.s.p.....	500 ml

Se disuelve el subnitrate de bismuto en aproximadamente 300 ml de agua mediante agitación agregando luego el resto de los componentes. Como solución reveladora se prepara la siguiente dilución:

Solución madre.....	20 ml
Acido acético glacial	20 ml
Agua	60 ml

Según concentración y tipo de alcaloide, las manchas revelan de color rojo ladrillo a marrón rojizo sin sufrir decoloración paulatina.

d) Cromatografía en columna

1- El procesamiento por cromatografía en columna del residuo que presuntamente contenga terpenos y esteroides se realiza utilizando sílica gel H para cromatografía en capa fina como lecho adsorbente, acondicionada de la manera anteriormente descrita y utilizando n-hexano-acetato de etilo 90:10 como solvente de montaje y desarrollo.

2- El residuo de alcaloides totales obtenido se cromatografía en columna de alúmina, actividad II-III según Bröckman, cuyo montaje presenta ligeras variantes con las columnas de sílica gel ya que el adsorbente se deja caer lenta y progresivamente sobre el solvente de montaje usando con éste fin un embudo de vástago aguzado; de esta manera las partículas de alúmina sedimentan suavemente a través del solvente formando un lecho compacto y homogéneo. Como solvente de montaje se usa cloroformo eluyendo con mezcla de cloroformo-metanol en proporciones crecientes de este último.

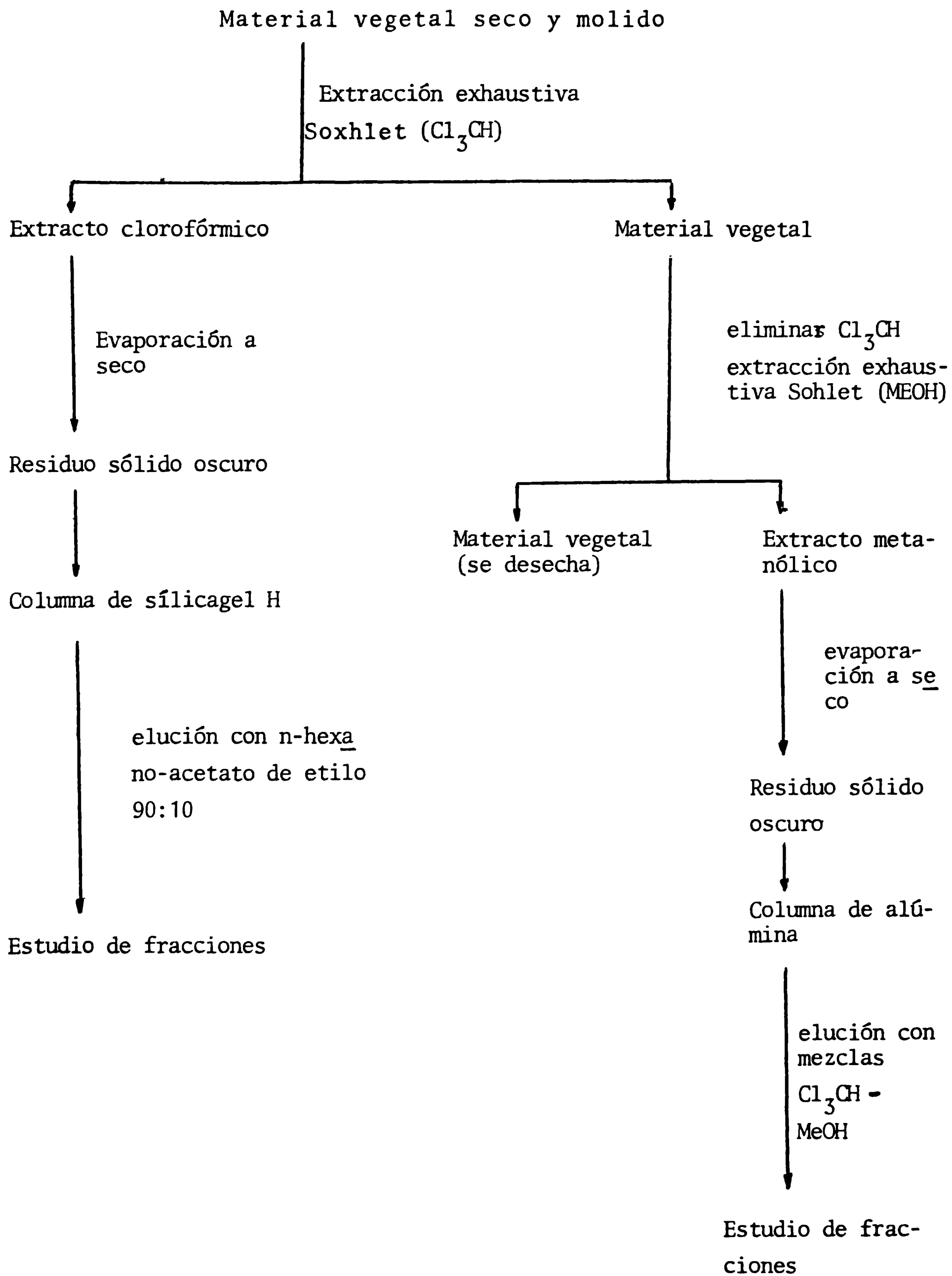
Las distintas fracciones eluidas de columna son cromatografiadas en capa fina previa evaporación a seco o reducción de volumen, a fin de visualizar número y tipo de productos eluidos

e) Purificación de las fracciones obtenidas

Se utilizan los mismos procedimientos que para el caso de nitrocompuestos y asimismo, ensayos de cristalización en distintos solventes orgánicos.

Las etapas principales del procedimiento precedentemente descrito se esquematizan en Tabla N° 9.

Tabla N° 9: Astragalus distinsens y A. bergii
Ensayos sobre productos de baja polaridad (terpenos,
esteroles) y alcaloides.



III.B. ESTUDIO DEL ASTRAGALUS BERGII HIERONIMUS

III.B.I. Acondicionamiento del material vegetal

El material vegetal de *A. bergii* fue recolectado en el establecimiento "El Talita", ubicado en el Departamento Pedertera, provincia de San Luis sobre el camino que une la ruta provincial N° 1 y la población de El Morro. El potrero es de pastizal natural ubicado sobre la ladera este de las sierras del Portezuelo. El mismo había sido quemado en el mes de agosto de 1982 y tiene antecedentes de mortandades de años anteriores sin haberse podido determinar la causa. El vegetal se recolectó el 20 de diciembre de 1982 cuando las plantas se encontraban en floración.;

El material reunido se clasificó y trató de la misma forma que el material de *A. distinens*.

III.B.II. Ensayo de toxicidad del extracto acuoso total.

Se procede de la misma forma que para *A. distinens*.

III.B.III. Ensayo de ácido cianhídrico

Se procede de la misma forma que para *A. distinens*.

III.B.IV. Ensayo de saponinas

Se procede de la misma forma que para *A. distinens*.

III.B.V. Ensayo de selenio

Se procede de la misma forma que para *A. distinens*.

III.B.VI. Ensayo de nitrocompuestos orgánicos

Se procede de la misma forma que para *A. distinens*.

III.B.VII. Ensayo sobre productos de baja polaridad (terpenos-esteroles) y alcaloides.

Se procede de la misma forma que para *A. distinens*.

III.C. DETERMINACION DE DOSIS TOXICA 50 Y DOSIS LETAL 50.

III.C.I. Determinación de Dosis Tóxica 50 (DT-50)

Para la determinación de la dosis y luego de realizar los análisis previstos, se toma el compuesto tóxico presente en cada una de la especies de Astragalus estudiadas cuya concentración en el material vegetal posibilite ocasionar las intoxicaciones observadas ante ingestas diarias habituales en rumiantes.

La técnica que se usa es la descrita por Weil (65) y se usan lauchas albinas de dos meses de edad con un peso promedio de 25 g.

Se prueban 4 dosis, con una progresión geométrica de 2 y con 4 animales por dosis. Las mismas se inoculan por vía subcutánea y de una sola vez.

Para el cálculo final de la dosis se usa la siguiente fórmula:

$$\text{Log. DT-50} = D + d \quad (f+1) \quad \text{donde}$$

D = logaritmo de la menor dosis usada

d = logaritmo del factor geométrico

f = valor de tabla (tabla N°10) para n = 4 y k = 3

luego

$$\text{DT-50} = \text{antilog. del Log. DT-50.}$$

Para encontrar el valor de "f" en la tabla (Tabla N°10), se consideran los animales que muestren alguna sintomatología.

III.C.II. Determinación de Dosis Letal 50 (DL-50)

Se utiliza la misma técnica descrita anteriormente, sólo que para buscar el valor de "f" se toman en cuenta los animales muertos.

TABLA N° 10: Tabla para el cálculo de dosis media efectiva para niveles de 4 dosis y con 4 animales por dosis (65).

Animales afectados por dosis	Valor de f	Animales afectados por dosis	Valor de f
0,0,2,4	1,00000	1,0,3,3	1,00000
0,0,3,4	0,75000	1,0,4,3	0,50000
0,0,4,4	0,50000	1,1,2,3	1,00000
0,1,1,4	1,00000	1,1,3,3	0,50000
0,1,2,4	0,75000	1,1,4,3	0,00000
0,1,3,4	0,50000	1,2,2,3	0,50000
0,1,4,4	0,25000	1,2,3,3	0,00000
0,2,2,4	0,50000	2,0,3,3	1,00000
0,2,3,4	0,25000	2,0,4,3	0,00000
0,2,4,4	0,00000	2,1,2,3	1,00000
0,3,3,4	0,00000	2,1,3,3	0,00000
1,0,2,4	1,00000	2,2,2,3	0,00000
1,0,3,4	0,66667	0,0,4,2	1,00000
1,0,4,4	0,33333	0,1,3,2	1,00000
1,1,1,4	1,00000	0,1,4,2	0,50000
1,1,2,4	0,66667	0,2,2,2	1,00000
1,1,3,4	0,33333	0,2,3,2	0,50000
1,1,4,4	0,00000	0,2,4,2	0,00000
1,2,2,4	0,33333	0,3,3,2	0,00000
1,2,3,4	0,00000	1,0,4,2	1,00000
2,0,2,4	1,00000	1,1,3,2	1,00000
2,0,3,4	0,50000	1,1,4,2	0,00000
2,0,4,4	0,00000	1,2,2,2	1,00000
2,1,1,4	1,00000	1,2,3,2	0,00000
2,1,2,4	0,50000	0,2,3,1	1,00000
2,1,3,4	0,00000	0,2,4,1	0,00000
2,2,2,4	0,00000	0,3,3,1	0,00000
3,0,2,4	1,00000	0,1,4,1	1,00000
3,0,3,4	0,00000	0,1,4,3	0,33333
3,1,1,4	1,00000	0,2,2,3	0,66667
3,1,2,4	0,00000	0,2,3,3	0,33333
0,0,3,3	1,00000	0,2,4,3	0,00000
0,0,4,3	0,66667	0,3,3,3	0,00000
0,1,2,3	1,00000	0,1,3,3	0,66667

Nota: Es decir 0,0,2,4 indica, no muerte en el grupo I y II, dos muertes en el grupo III y cuatro muertes en el grupo IV.

IV .- RESULTADOS

IV. RESULTADOS OBTENIDOS

IV.A. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ASTRAGALUS DISTINENS MACLOSIE

IV.A.I. Ensayo de toxicidad del extracto acuoso total.

El producto obtenido según se describe en el capítulo de Materiales y Métodos era de color ocre oscuro, viscoso y con olor medicamentoso.

El residuo total obtenido por evaporación del extracto alcohólico filtrado fue del 10% del material vegetal extraído, mientras que el residuo de evaporación de la solución acuosa pesó el 50% del residuo alcohólico.

La dosificación de la solución acuosa total se hizo en lauchas albinas en dosis de 0,5 cc, inyectándose en dos puntos diferentes en el mismo momento, para evitar pérdida del inóculo cuando se inyectaba en un solo punto. En todos los casos la absorción de la solución acuosa fue rápida.

En Tabla N°11 se consignan los resultados individuales obtenidos con las inoculaciones.

TABLA N° 11: Resultados de la inoculación de extracto acuoso total de A. distinens.

Animales Inoculados	Dosis (ml)	Vía de Inoculación	N° de animales	Peso (g)	Lapso Inoc. Muerte (minutos)	g/planta/kg de peso
lauchas albinas	0,5	subcutánea	1	20	80	50
			1	23	75	43,47
			1	21	120	47,61
			1	25	105	40

A los pocos minutos de la inoculación las lauchas mostraron alteración en su comportamiento, y en particular atontamiento e indiferencia. Unos minutos antes de morir, los animales quedaron postrados con movimientos espasmódicos intermitentes.

Lo más llamativo y que indicaba la proximidad de la muerte, era la gran protrusión del globo ocular, el que perdía el característico color rojo tornándose blanco con midriasis muy exagerada.

Como se observa en la Tabla N° 11, la muerte se produjo en forma rápida, por lo que la disección de las lauchas muertas no mostró alteraciones orgánicas macroscópicas.

El estudio histopatológico del hígado, riñón, cerebro y cerebelo no mostró lesiones tisulares que pudieran ser causantes de la muerte. La única lesión observada fue edema de córnea.

IV.A.II. Ensayo de ácido cianhídrico

1- Ensayo cualitativo

La determinación cualitativa del ácido cianhídrico con papel de picrato sódico, arrojó resultados negativos para todas las muestras de *A. distinens* analizadas, mientras que resultó fuertemente positivo para el análisis llevado a cabo con material de sorgo granífero y con patrón de cianuro de potasio.

El ensayo cualitativo por el método del Azul de Prusia también dió resultados negativos para cada parte de la planta de *A. distinens*, mientras que fue positivo para los ensayos realizados con sorgo granífero y con solución de cianuro de potasio aún en concentraciones de 0,01 mg de ión cianuro por ml, lo que evidencia la sensibilidad del método.

A los efectos de evitar pérdidas, la destilación del ácido cianhídrico por arrastre con vapor de agua es de suma importancia. Además del perfecto ensamble de las partes del equipo deben cuidarse los tiempos de destilación. Así, en el equipo usado se ensayaron tiempos de arrastre desde 3 minutos hasta 20 minutos, habiéndose encontrado que en los primeros 5 minutos se arrastró el 80% del cianuro presente en la muestra y que tiempos de arrastre superiores a 10 minutos producían una pérdida considerable del mismo al elevarse la temperatura de la solución donde se recogía el destilado. Debido a ésto es que se hace necesario que los equipos de arrastre por vapor que se usen deben ser probados en este sentido y que la solución receptora sea refrigerada.

2- Ensayo cuantitativo

Según estaba previsto al obtenerse resultados negativos en los análisis cualitativos no se realizó la determinación cuantitativa prevista.

3- Obtención de ácido cianhídrico para determinación de Dosis

Al no obtener resultados positivos para ácido cianhídrico, no se aplicó la técnica prevista.

IV.A.III. Ensayo de saponinas

1- Ensayo cualitativo

a- Indice de espuma

Los resultados obtenidos por este método fueron negativos para el material de A. distinens y positivo para Kochia scoparia. La K. scoparia resultó fuertemente positiva a la misma concentración que A. distinens mostrando en el tubo más diluido (N°1) 1,2 cm de espuma estable luego de 15 minutos de reposo y que aumentaba progresivamente según la concentración del extracto.

El material de Astragalus analizado no alcanzó a 1 cm de espuma estable en el tubo sin dilución (N°10), aún cuando se aumentó al doble la concentración del extracto.

b- Indice hemolítico

Los resultados obtenidos de los análisis realizados por el índice hemolítico confirmaron la ausencia de saponinas en el material vegetal de A. distinens.

La ausencia de hemólisis en los tubos que contenían extracto de Astragalus al 1%, indica que las saponinas no se encuentran entre los productos tóxicos de esta planta.

En las baterías de tubos de K. scoparia la hemólisis tuvo lugar aún en el tubo más diluido, pero sólo el que tenía una dilución de 1:1 mostró hemólisis total.

2- Determinación cuantitativa

No se consideró necesario hacerla debido a que los ensayos cualitativos fueron negativos.-

3- Obtención de saponinas para determinación de Dosis Tóxica 50 y Dosis Letal 50

Al no obtenerse resultados positivos para saponinas, no se consideró necesario obtener material de éstas para determinación de Dosis Tóxica 50 y Dosis Letal 50.

IV.A.IV. Ensayo de Selenio

1- Determinación cuantitativa

Los análisis realizados por el Prof. J.R. Dowell según la técnica descrita fueron repetidos en tres oportunidades con series de reactivos recientemente preparados con valores medios de 0,169 microgramos/g de planta seca, lo que corresponde a 0,169 ppm de selenio.

Tabla N° 12: Resultados obtenidos en tres diferentes determinaciones de Selenio.

N° de Análisis	microgramos/g de planta seca
1°	0,21
2°	0,19
3°	0,10 g
valor medio	0,169

2- Obtención de Selenio para determinación de Dosis Tóxica 50 y Dosis Letal 50.

Debido a la poca cantidad de selenio encontrada en esta especie, considerada como vestigios, no se lo toma en / cuenta como tóxico de importancia en esta especie y en este estado fenológico, por lo que no se lo tuvo en cuenta para determinaciones de Dosis Tóxica y Letal 50.

IV.A.V. Ensayos de nitrocompuestos orgánicos.

1- Ensayo cualitativo

a- Análisis por reactivo de Griess-Ilosvay.

Los análisis de nitrocompuestos según el método propuesto arrojó resultados positivos tal como se detalla en la Tabla N° 13.

Tabla N° 13: Resultados de los análisis cualitativos de nitrocompuestos.

Parte analizada de la planta	A. distinens	A. miser
Hoja	+++	
Tallo	++	
Fruto	+	
Planta Total	++	++

+: indica intensidad de la reacción.

b- Cromatografía en capa fina.

Este ensayo confirma lo obtenido anteriormente con el reactivo de Griess-Ilosvay en cuanto a la presencia de nitrocompuestos orgánicos alifáticos en A. distinens.

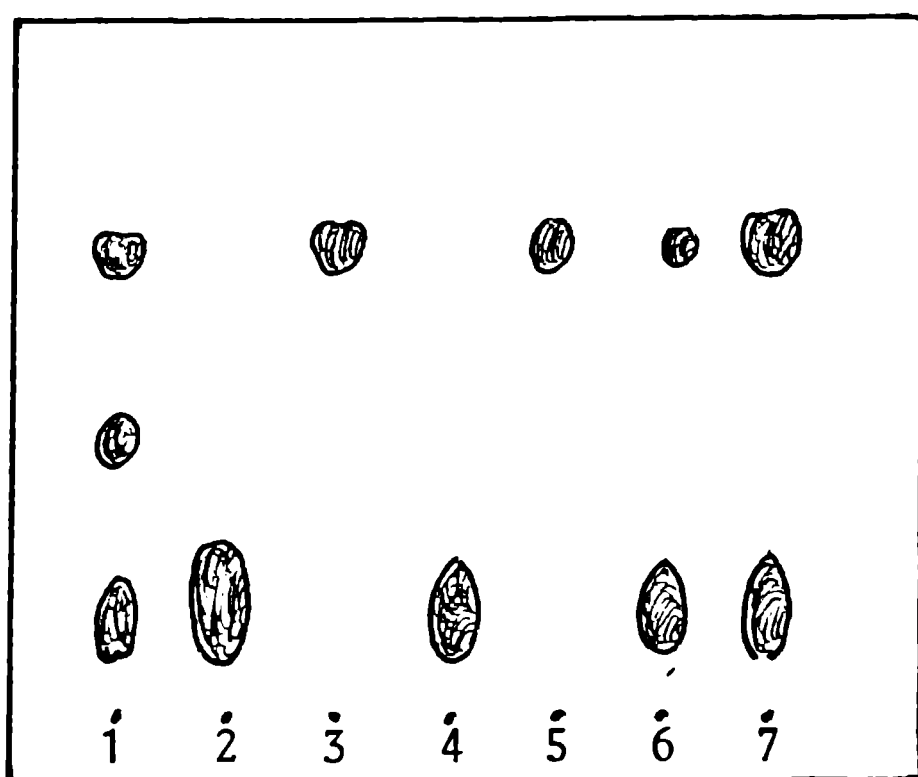
A pesar que esta técnica es algo más complicada que el test de Griess-Ilosvay, ya que se requieren otros materiales y debe realizarse una extracción del material vegetal, su sensibilidad y su utilización como criterio de identificación, lo convierte en técnica de elección para determinar cualitativamente la presencia de nitrocompuestos orgánicos alifáticos en extractos vegetales.

La comparación de los patrones usados con los extractos de A. distinens mostró que la cantidad de nitrocompuestos presentes es apreciable y el comportamiento de éstos fue el mismo en cuanto al color desarrollado (con su variación posterior a amarillo pálido) y a los valores de Rf coincidentes con el patrón de 3-nitro-1-propanol.

En Figura N° 4, se esquematiza la placa cromatográfica obtenida, notándose los diferentes valores de Rf de los patrones que hace que se diferencien muy bien entre ellos.

Es de notar también que la hidrólisis del residuo efectuada para obtener la porción aglicona no fue total por lo que aparecen dos manchas, igual que para el residuo no hidrolizado y además que la muestra patrón de cibarian no se encontraba pura (tres manchas).

Figura N°4: Reproducción de la placa cromatográfica de las fracciones de *A. distinens* frente a patrones conocidos.



1= cibarian; 2= ácido 3-nitropropanoico; 3= 3-nitro-1-propanol; 4= *A. miser*, residuo total; 5 = *A. miser* residuo hidrolizado; 6 = *A. distinens*, residuo total; 7= *A. distinens*, residuo hidrolizado.

2- Determinación cuantitativa

La modificación realizada de la técnica original, que consiste en refrigerar antes y después de agregarles el reactivo de Griess-Ilosvay, mejoró la visualización de la reacción coloreada, debido a que el rango óptimo de temperatura para que se produzca la diazotación es de 0 - 5°C.

En Tabla N°14, se presentan los resultados de los ensayos realizados, repetidos siete veces cada uno, dando valores similares, por lo que se resumen en un solo valor de media.

Tabla N° 14: Resultados del análisis cuantitativo de nitrocompuestos.

Parte de la Planta analizada	A. distinens mg NO ₂ /g	A. miser mg NO ₂ /g
Hoja	8,26	
Tallo	7,79	
Fruto	5,35	
Planta Total	9,30	8,37

3- Extracción, aislamiento y purificación de nitrocompuestos orgánicos.

Con la finalidad arriba enunciada, se aplicaron aquí las técnicas descritas en el capítulo "Materiales y Métodos" y en consecuencia sólo se explicitarán las condiciones experimentales particulares de los ensayos realizados.

El ensayo definitivo que a continuación se describe, tendiente a demostrar la presencia de nitrocompuestos orgánicos en *Astragalus distinens* e intentar su aislamiento e identificación fue precedido de diversos ensayos menores orientativos.

Se realizó el procesamiento de planta total recolectada el mes de Marzo de 1982 en el establecimiento La Aurora Puntana y mantenida en congelador a -18°C.

a- Acondicionamiento de la muestra previo a la extracción.

Antes de proceder a la extracción, el material vegetal fresco fue desecado a temperatura de 45.- 50°C hasta peso constante. De esta manera el material presentó una pérdida de peso del 53%.

Seguidamente, la muestra a procesar fue reducida a polvo fino. Por otra parte, determinaciones de humedad en *A. distinens*, realizadas de igual manera pero a temperatura de 100-105°C hasta peso constante arrojaron valores del 65%.

b- Extracción de nitroderivados totales.

El material vegetal secado a 45 - 50°C (250 g; correspondientes a 532 g de planta fresca y 187 g seco) fue sometido a extracción acetónica a temperatura ambiente. Se presentó aquí el problema de que aún después de cinco extracciones consecutivas el material vegetal extraído seguía dando positivo el test para nitrocompuestos orgánicos, aunque con menor intensidad. Para acelerar el proceso extractivo se decidió extraer en equipo Soxhlet durante dos horas; al cabo de este lapso el material residual dió resultados negativos al test de Griess-Ilosvay.

Los extractos acetónicos reunidos, filtrados y evaporados a sequedad dejaron un residuo sólido, de aspecto alquitranoso (24,5 g, correspondiente a 13,1% sobre material vegetal seco) del cual y con fines de procesamiento se tomó una parte (14 g, correspondientes a 304 g de planta fresca y 106 g de planta seca) que luego fue cromatografiada en columna tal como se describe a continuación.

c- Cromatografía en columna de sílica gel H del residuo de nitroderivados.

La fracción de residuo destinada a procesamiento (14 g) fue cromatografiada en columna sobre 70 g de sílica gel Merck 60 H en una relación producto-adsorbente de 1:5 y relación diámetro-altura de 1:9.

La columna se montó en cloroformo y el residuo de nitrocompuestos totales, incorporado a sílica gel, se puso como cabeza de la misma iniciándose la elución con mezcla de cloroformo-etanol en concentraciones crecientes de etanol, en porcentajes y volúmenes de solventes que se indican a continuación:

Cl ₃ CH	-	EtOH	2,5% (97,5:2,5)	200 ml
"	"	"	5% (95:5)	300 ml
"	"	"	10% (90:10)	400 ml
"	"	"	15% (85:15)	400 ml
"	"	"	20% (80:20)	400 ml
"	"	"	30% (70:30)	400 ml
"	"	"	40% (60:40)	200 ml

Se recolectaron fracciones de aproximadamente 10 ml y para el seguimiento de la columna por cromatografía en capa fina se utilizaron sistemas de solventes y reveladores que han sido precedentemente descriptos para nitrocompuestos orgánicos.

d- Fracciones obtenidas y su purificación.

De fracciones N° 4 a 8, eluidas con cloroformo-etanol 95:5, reunidas y evaporadas a sequedad, se obtuvo un residuo siruposo, verde negruzco, que se mostró homogéneo en capa fina revelando un solo producto, que en distintos sistemas de solventes mostró alineamiento con muestra auténtica de 3-nitro-1-propanol.

Con fines de purificación adicional, el residuo obtenido fue sometido a un doble pasaje por columna de Sephadex LH-20, montada y eluida con cloroformo-etanol 1:1. Durante el desarrollo de estas columnas, a las que se aplicó presión moderada, eluyeron rápidamente clorofilas y otros materiales impurificantes mientras que una zona débilmente amarillenta descendió lentamente a lo largo del lecho filtrante constituyendo las últimas fracciones de las que, por evaporación a seco se obtuvo un residuo siruposo que pesó 0,041 g, no cristizable, homogéneo en cromatografía en capa fina y que frente al revelador de p-nitroanilina diazotada, reveló con el característico color rojo.

A partir de fracciones 30 a 53, eluidas con la mezcla cloroformo-etanol 95:5, reunidas y evaporadas a sequedad se obtuvo un residuo oscuro (0,492 g) que en cromatografía en capa fina reveló mezcla de productos entre los que predominaba uno caracterizado por no revelar dentro de la gama del rojo, sino con manchas color morado fuerte.

Con la finalidad de eliminar impurezas y eventualmente aislar el producto señalado, el residuo obtenido se sometió a cuatro pasajes sucesivos por columna de Sephadex LH-20, montada y eluida con cloroformo-etanol 1:1, sin resultados positivos ya que las distintas fracciones obtenidas dejaron escasos residuos cuya cromatografía en capa fina evidenció mezcla de varios productos que revelaban con diferentes coloraciones.

Finalmente, no se consiguieron aislaciones ni identificaciones a partir de estas fracciones por lo que fueron definitivamente descartadas.

De fracciones N° 58 a 72, eluídas con la mezcla cloroformo-etanol 90:10 a 80:20, reunidas y evaporadas a seco, se obtuvo un residuo amarillo verdoso de consistencia siruposa, homogéneo en cromatografía en capa fina y que reveló como nitrocompuesto frente a p-nitroanilina diazotada dando una fuerte coloración rojo ladrillo.

Distintos ensayos de cristalización practicados en diferentes solventes orgánicos y mezclas de ellos resultaron infructuosos para el producto aislado.

Con fines de purificación adicional el residuo obtenido fue sometido a simple pasaje por columna de Sephadex LH-20, montada y eluída con metanol, recolectándose treinta fracciones de aproximadamente 5 ml cada una, de las que sólo cuatro evidenciaron en cromatografía en capa fina al producto. Reunidas y evaporadas estas fracciones, se obtuvo un residuo amarillo verdoso, de consistencia siruposa, no cristalizable, homogéneo en cromatografía en capa fina y aparentemente puro.

El producto obtenido, mantenido en desecador al vacío durante 72 h. pesó 1,402 g (0,26% sobre planta fresca y 0,74% sobre planta seca).

De fracciones N° 73 en adelante sólo se obtuvieron residuos escasos e impuros que no evidenciaron productos de interés en cromatografía en capa fina, por lo que fueron definitivamente descartados.

4-Estudio de las fracciones obtenidas-Identificaciones

a-Estudio de fracciones 58-72. Identificación de Miso- rotoxina.

Tal como ha sido consignado, el producto resultante de la reunión de fracciones N°58-72 y purificado por columna de Sephadex LH-20, se presenta como una sustancia viscosa de color amarillo verdoso, resultando infructuosos todos los intentos realizados para lograr su cristalización.

La positividad del test de Griess-Ilosvay como asimismo su inmediata reacción al revelado en cromatografía en capa fina frente a p-nitroanilina diazotada dando una típica coloración (dentro de la gama de tonalidades del rojo) descrita en bibliografía para nitroderivados orgánicos alifáticos hizo suponer que se estaba en presencia de un nitro-compuesto.

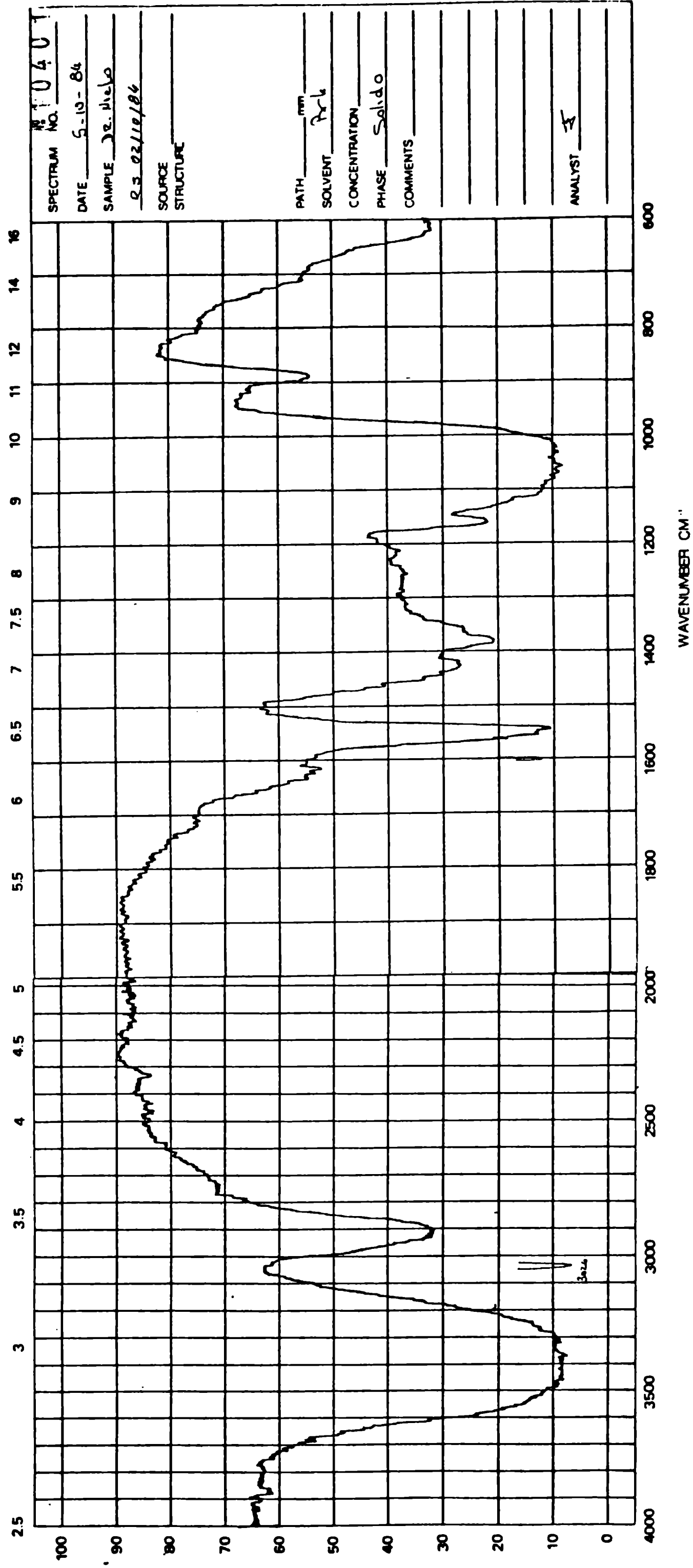
La naturaleza glicosídica del producto en estudio fue evidenciada en cromatografía en capa fina desarrollada en el sistema cloroformo-metanol-agua (65:35:10) revelando el cromatograma con la mezcla etanol-anisaldehído-ácido sulfúrico concentrado (18:1:1) introduciendo luego la placa en estufa a 120°C durante 10 minutos. De esta manera el producto reveló con el típico color verde-azulado característico de moléculas con restos azúcar.

Por otra parte, al pulverizar placas cromatográficas, del producto con la mezcla ácido sulfúrico concentrado-ácido acético glacial-agua (1:20:4) ("Oleum") y posterior calentamiento en estufa durante 10 minutos a 120°C, se produjo la típica mancha oscura derivada de la carbonización del compuesto; esto dió lugar a una primera suposición sobre la naturaleza no benzenoide del compuesto en estudio.

El espectro Infrarrojo, Figura N°5, realizado en pastilla de bromuro de potasio mostró una intensa y ancha banda en la zona de 3500-3300 cm^{-1} correspondiente a estiramiento O-H fuertemente interaccionado por uniones tipo puente hidrógeno intra e intermoleculares.

Asimismo, la naturaleza alifática del compuesto se manifiesta por las bandas de estiramiento C-H en la zona de 2940 cm^{-1} y de flexión en 1430 y 1350 cm^{-1} y por otra parte se descarta el carácter aromático por cuanto no aparece el típico conjunto de señales en la zona de 1650-1450 cm^{-1} y 850-700 cm^{-1} .

Figura N° 5: Espectro Infrarrojo de Miserotoxina

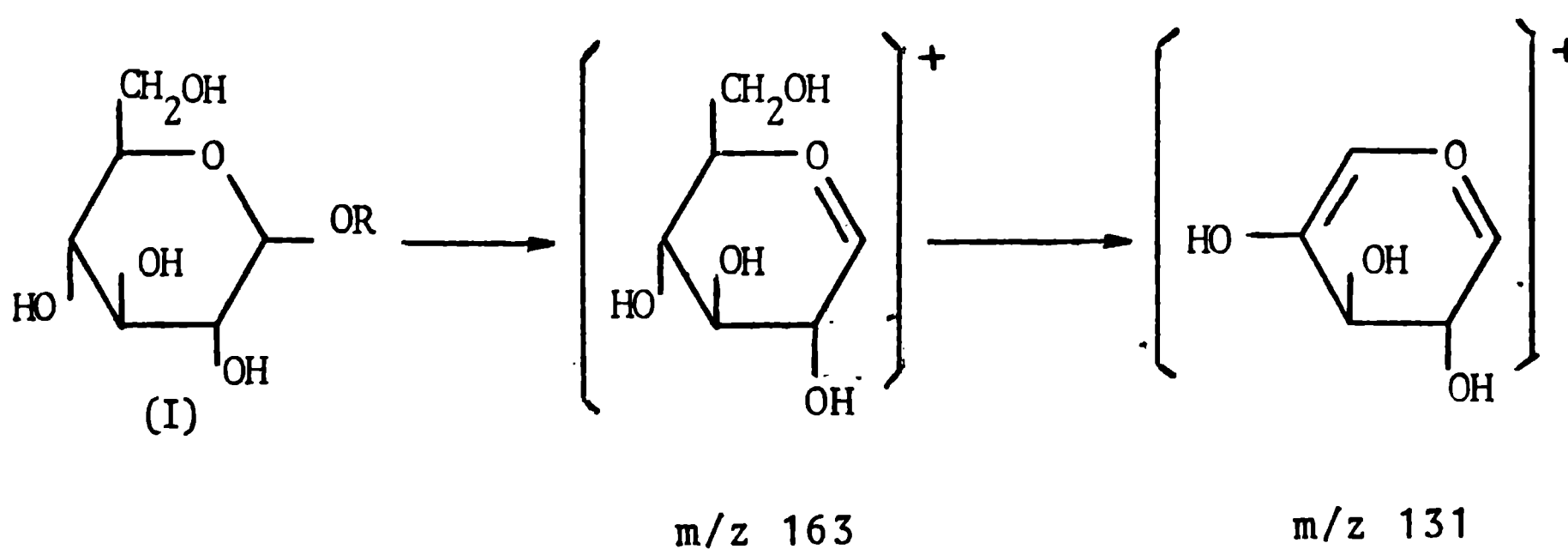


Además, cabe destacar la presencia de bandas prominentes a 1550 y 1380 cm^{-1} típicas de nitrogrupo ($-\text{NO}_2$) de compuesto orgánico alifático y la ausencia de absorción atribuible a grupo carbonilo ($>\text{C}=\text{O}$), en la zona de $1750 - 1735\text{ cm}^{-1}$, lo que descarta la posibilidad de existencia de una función éster ($\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OR}}{\text{C}}}=\text{O}$) en el compuesto en estudio.

Los datos hasta aquí reunidos permitieron inferir que se estaba en presencia de un nitrocompuesto orgánico de naturaleza alifática presuntamente unido a una parte azúcar o glicosídica que podría ser la responsable de la absorción debida a grupos hidroxilos.

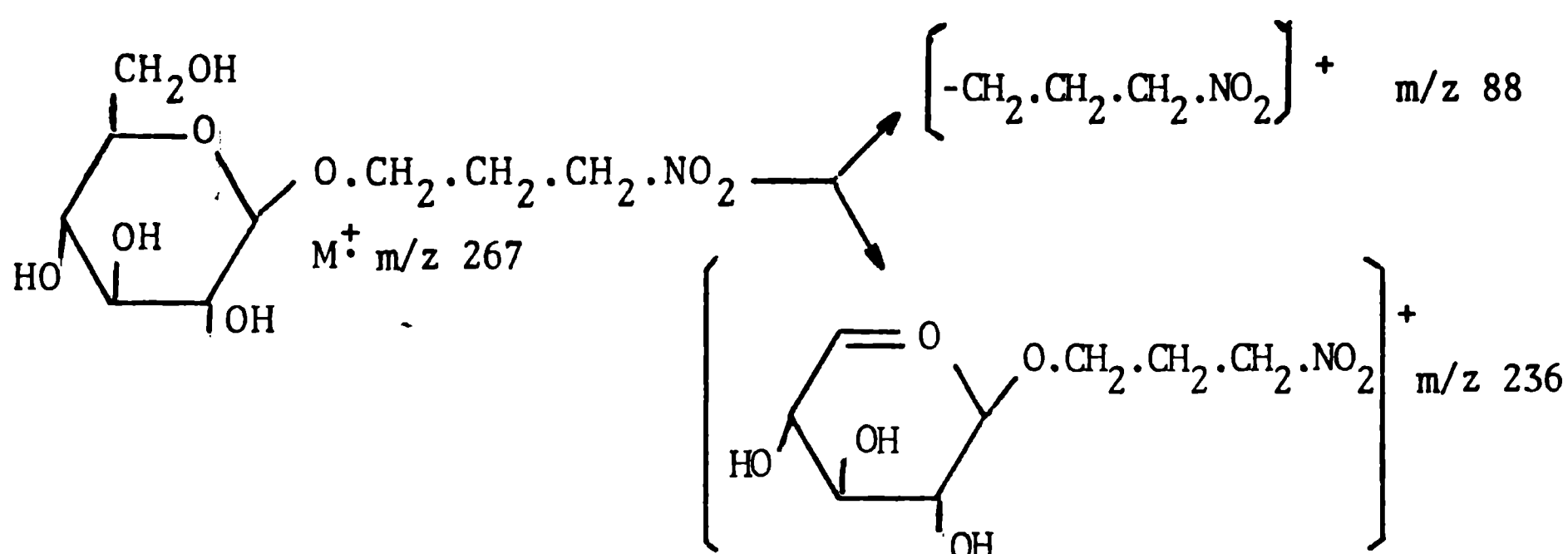
En cuanto al espectro de Masas, no permite identificar el ión molecular (M^+) lo que estaría corroborando las características de compuesto alifático hidroxilado deducidas hasta el momento. Sin embargo algunos picos, por ejemplo a m/z 163 y 131, presentes en el espectro, son perfectamente compatibles con los modos de fragmentación de derivados de glucopiranososa tal como se indica en la Figura N° 6.

Figura N° 6: Algunos modos de fragmentación de glucopiranososa.



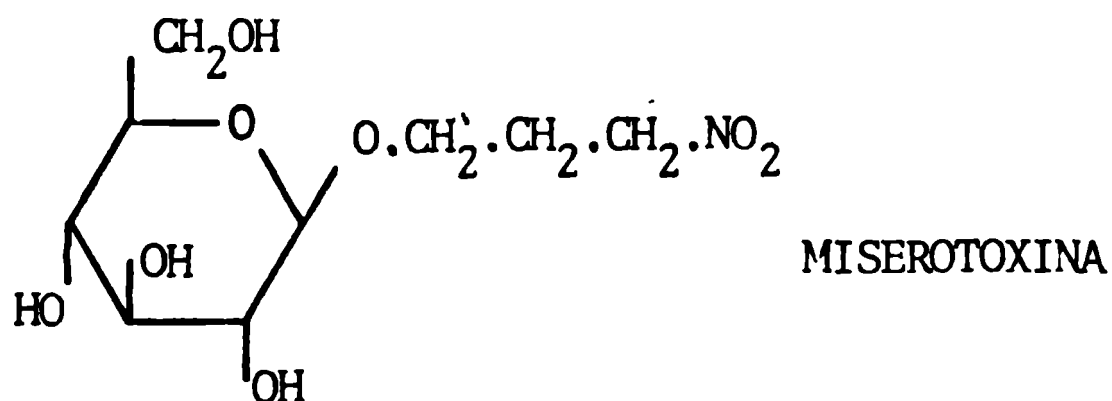
En consecuencia, puede inferirse que la naturaleza glicosídica del compuesto en estudio se debe a la presencia de una molécula de monosacárido, posiblemente glucosa.

Asimismo, el espectro de Masas muestra un pico importante a m/z 88 compatible con $(\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{NO}_2)^+$ que indudablemente debe corresponder al grupo "R" de la estructura (I) de la Figura N° 6 y ésto a su vez justificaría el pico a m/z 236, también presente en el espectro.



Esta hipótesis implica que la unión entre la parte alifática nitrada y el resto de glucopiranososa sería una unión / "éter" y no una unión "éster" y efectivamente, se descarta la posibilidad de estar en presencia de un éster de glucosa con ácido 3-nitropropanoico ($\text{NO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) ya que en tal caso el espectro Infrarrojo del compuesto mostraría la banda atribuible a grupo carbonilo ($\text{>C}=\text{O}$) de función éster $\text{R}-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$ y por otra parte este ácido alifático nitrado no puede originar el fragmento $(\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{NO}_2)^+$ a m/z 88 presente en el espectro de Masas.

Las evidencias hasta aquí reunidas hicieron suponer que se estaba en presencia de Miserotoxina, nombre común asignado al β -D-glucósido de 3-nitro-1-propanol, compuesto aislado por primera vez por Stermitz et al (16) quienes determinaron su estructura en forma indubitable.



Por su parte el espectro de Resonancia Magnética Nuclear del compuesto (Figura N° 7) realizado en agua deuterada (D_2O) con D.S.S. como referencia interna aportó pruebas concluyentes que avalaron la precitada suposición permitiendo confirmar su identidad con Miserotoxina ya que resultó totalmente / coincidente con el consignado en bibliografía y del cual sólo destacamos aquí la ausencia de señales entre 6 a 8 ppm, que permite excluir carácter aromático en forma categórica y reasegura la naturaleza glicosídica del compuesto en razón del conjunto de señales entre 3 a 5 ppm, y muy especialmente el quinteto, centrado a 2,30 ppm, que integra para dos hidrógenos, correspondientes al C_2 del resto nitrohidrocarbonado ($-CH_2-\underline{CH}_2-CH_2-NO_2$), zona del espectro de Resonancia Magnética Nuclear que carece de señales en derivados glucosídicos del ácido / 3-nitropropanoico (4) permitiendo diferenciarlos en forma categórica de los derivados del 3-nitro-propanol.

Por otra parte, la determinación del valor de rotación específica $[\alpha]_D^{25} -22,42$ (Metanol, c 8,56) resultó coincidente con el consignado en bibliografía (16).

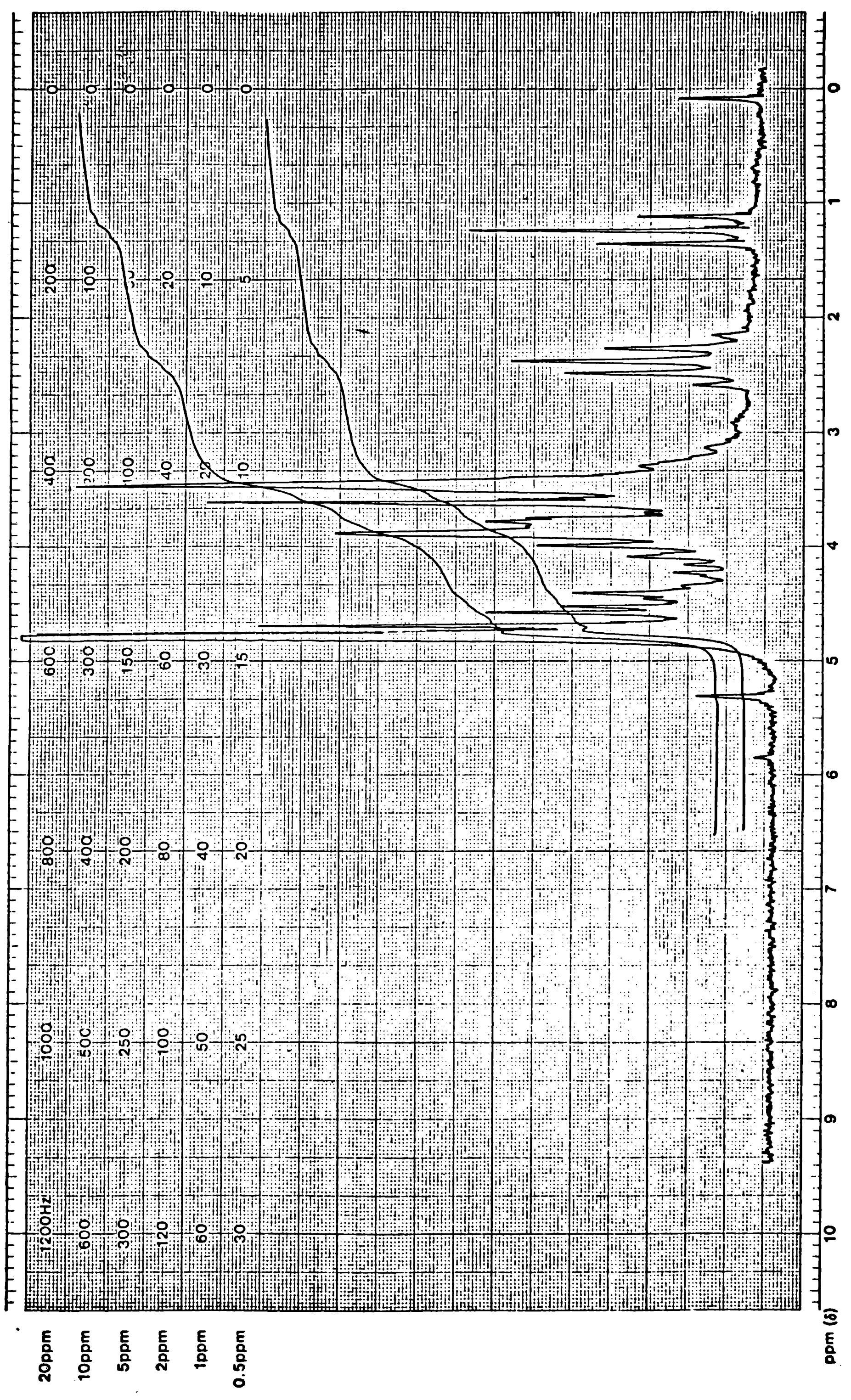
En consecuencia, se concluye que la estructura del compuesto aislado se corresponde con la del 3-nitro-1-propil-D- glucopiranosido, comunmente designado como Miserotoxina.

La obtención de este nitroderivado de naturaleza glucosídica a partir de una muestra de Astragalus miser tal como se describe más adelante en este trabajo permitió obtener muestra auténtica del compuesto y así establecer la absoluta identidad de ambos.

b- Estudio de fracciones 4-8: Identificación de 3-nitro-1-propanol

Tal como ha sido precedentemente descripto, luego de la purificación por Sephadex LH-20 de las fracciones 4-8, se obtuvieron 0,041 g de un producto viscoso, ligeramente amarillento, no cristalizable y que en cromatografía en capa fina en diversos solventes mostró alineamiento con muestra auténtica de 3-nitro-1-propanol y además, frente a la solución de / p-nitroanilina diazotada, tanto el producto en estudio como la droga patrón, revelaron siempre con la misma coloración. Asimismo ensayos de co-cromatografía en capa fina con muestra auténtica del alcohol nitrado proporcionado por F.R. Steemitz de la

Figura N° 7: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{H RMN}$) de Miserotoxina



Universidad de Fort Collins, revelaron en todos los sistemas de solventes ensayados como una única mancha, lo que hizo suponer estar en presencia de 3-nitro-1-propanol.

Por otra parte, fue descartada la posible naturaleza glicosídica del producto ya que en cromatografía en capa fina, utilizando el solvente y revelador indicados para miserotoxina se verificó ausencia total de revelado.

Además, cabe consignar que de acuerdo a la información bibliográfica reunida (4) no han sido informadas especies que simultáneamente contengan miserotoxina y ácido 3-nitropropanoico libre o alguno de sus derivados yá que aparentemente, las vías biosintéticas del ácido y alcohol nitrado no pueden co-existir en una misma especie botánica.

Es de señalar también que en cromatografía en capa fina, es sencillo distinguir entre 3-nitro-1-propanol y ácido 3-nitropropanoico ya que éste en razón de su mayor polaridad, es apreciablemente retenido por la capa adsorbente y en consecuencia sus valores Rf son sensiblemente menores que los del alcohol nitrado.

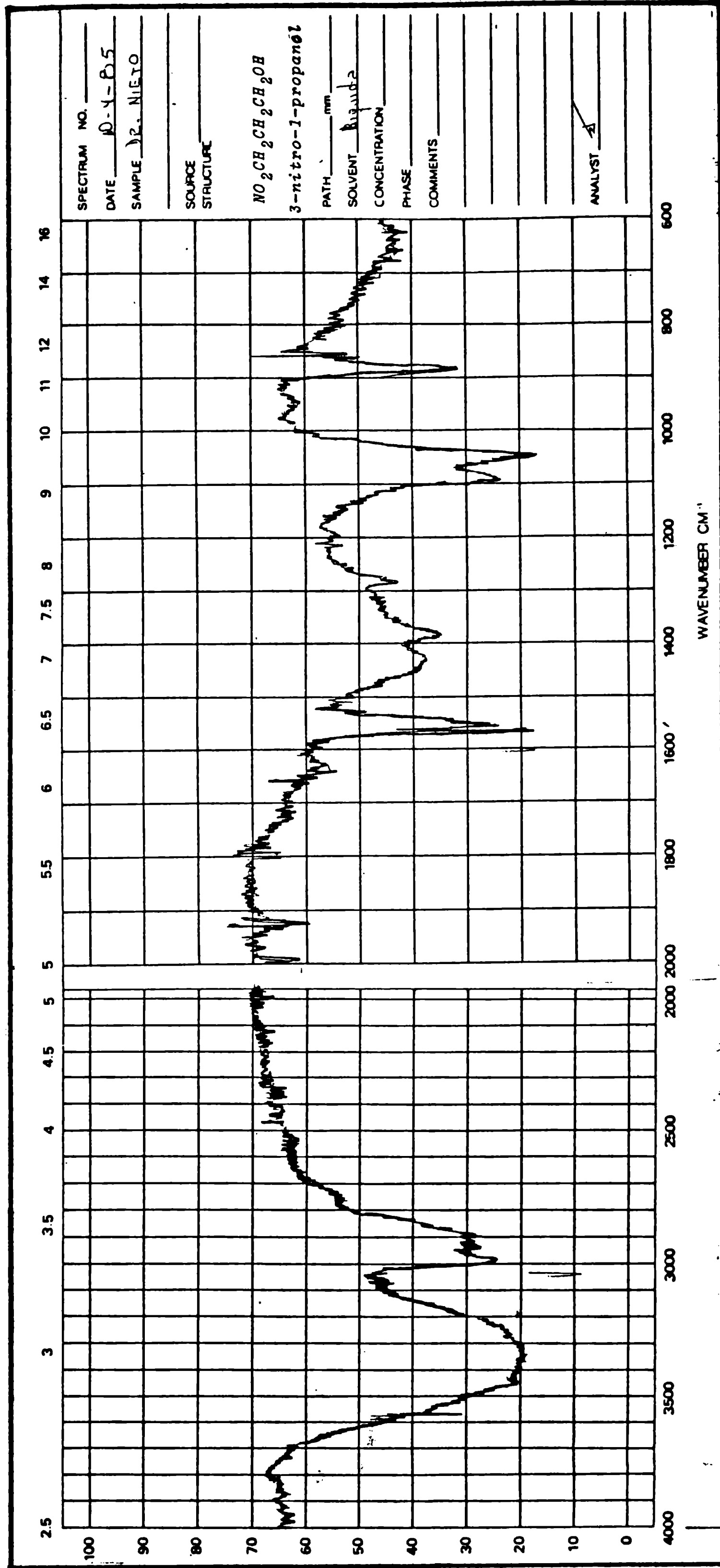
Las evidencias cromatográficas reunidas y los datos bibliográficos disponibles hicieron suponer que el compuesto en estudio era efectivamente el alcohol nitrado, o sea el 3-nitro-1-propanol.

No obstante las evidencias señaladas, se realizó el espectro Infrarrojo (Figura N° 8) del compuesto en estudio y se verificó su total coincidencia con el correspondiente a muestra auténtica del alcohol nitrado.

En conclusión, la estructura del nitrocompuesto alifático aislado en estas fracciones se corresponde con la del 3-nitro-1-propanol, también informado previamente por Stermitz et al. como componente del *Astragalus miser*.

En consecuencia, a partir de *A. distinens* han sido aislados e identificados 3-nitro-1-propanol y Miserotoxina, ambos nitrocompuestos de probada toxicidad.

Figura N°8. Espectro Infrarrojo de 3-nitro-1-propanol



5- Aporte de nuevos sistemas de solventes para cromatografía en capa fina.

Con el objeto de comprobar si el comportamiento de los productos aislados era el mismo frente a distintos sistemas de solventes, como otra prueba de su identidad, se estudiaron varios sistemas de solventes, con resultados satisfactorios en la mayoría de ellos, lo que permite usarlos alternativamente junto a los ya propuestos por la bibliografía, como es el benceno-metanol, 5:3 (63).

De los numerosos sistemas ensayados sólo se consignan en Tabla N° 15, aquellos que lograron una buena separación de productos, indicándolos los valores de Rf de Miserotoxina y 3-nitro-1-propanol.

Tabla N° 15: Nuevos sistemas de solventes

solventes	valores de Rf	
	Miserotoxina	3-nitro-1-propanol
1-Cl ₃ CH-EtOH (85:15)	0,13	0,59
2-Cl ₃ CH-EtOH (80:20)	0,15	0,62
3-Cl ₃ CH-MeOH (88:12)	0,10	0,55
4-Cl ₃ CH-MeOH (80:20)	0,25	0,69
5-Cl ₃ CH-C ₆ H ₆ -H ₂ O(2:2:1)	0,10	0,50
6-Cl ₂ CH-C ₆ H ₆ -MeOH(3:1:1)	0,22	0,65
7-Cl ₃ CH-MeOH -H ₂ O(85:14:1)	0,21	0,52
8-C ₆ H ₆ - EtOH(2:1)	0,17	0,54

El comportamiento de ambos productos en los distintos sistemas de solventes desarrollados es semejante, ya que en todos ellos se logró una buena separación entre Miserotoxina y 3-nitro-1-propanol, tanto en sistemas acuosos como carentes de agua.

Si bien en todos los casos el desarrollo de los cromatogramas fue razonablemente rápido (10-20 minutos) cabe consignar que los menores tiempos de corrida se registraron para

los sistemas no acuosos.

De estos sistemas se considera que los no acuosos (tales como N° 6 y 8) son más apropiados para ensayos de cromatografía en capa fina sobre extractos totales muy impurificados que los de mayor polaridad (como N° 2 y 4); éstos a su vez son de aplicación tanto en columna como en cromatografía en capa fina aunando buena separación y rapidez en la elución (columna).

Por su parte solventes como el N° 3 y 5 si bien sólo producen un moderado desplazamiento de Miserotoxina son asimismo adecuados para extractos brutos (muy impuros) ya que junto con el frente de solvente corren clorofilas y otras impurezas.

Ensayos realizados con mezclas de los productos aislados y patrones disponibles, mostraron asimismo adecuada separación.

La Figura N° 9, muestra la fotografía de dos placas cromatográficas reveladas con p-nitroanilina diazotada y desarrollada en diferentes sistemas de solventes.

Figura N° 9: Placas de CCF desarrolladas en distintos sistemas de solventes (los mismos productos en ambas)



6- Extracción e identificación de 3-nitro-1-propanol y Miserotoxina del Astragalus miser.

El *Astragalus miser* var. *oblongifolius* es una especie botánica ya estudiada por Stermitz et al (16), quienes informaron que contiene 3-nitro-1-propanol y Miserotoxina, nitro compuestos orgánicos alifáticos de probada toxicidad y responsables, en consecuencia, de las intoxicaciones causadas en el ganado por la ingestión de esta planta.

El objetivo del procesamiento aquí descrito fue obtener muestra auténtica de miserotoxina a fin de verificar su comportamiento cromatográfico en capa fina y la coincidencia de sus datos espectroscópicos con los del producto aislado a partir de *A. distinens*.

a- Acondicionamiento del material vegetal

El ensayo se llevó a cabo sobre una pequeña cantidad de planta total, ya desecada y molida que fue enviada por M.C. Williams, Universidad de Logan, Utah, U.S.A. y que fuera recolectada en 1968.

b- Procesamiento del material vegetal.

El material vegetal seco y molido (25 g) fue sometido a extracción acetónica exhaustiva a temperatura ambiente en balón de capacidad adecuada y agitación manual frecuente.

El residuo obtenido (1,855 g) por evaporación de los extractos acetónicos reunidos y filtrados, fue incorporado a 7 g de sílica gel para cromatografía en columna (0,05-0,02 mm; 70-270 mesh) y puesto al tope de una columna cromatográfica de 50 g de sílica gel H para cromatografía en capa fina en una relación producto-adsorbente de 1:27 y relación diámetro altura de 1:15.

La columna se montó en cloroformo y eluyó con mezclas de cloroformo-etanol 95:5; 90:10 y finalmente 80:20. Se recolectaron fracciones de aproximadamente 10 ml, cada una de las cuales fue testada por cromatografía en capa fina en solvente benceno-metanol 5:3 y reveladas por pulverización con p-nitroanilina diazotada previa impregnación de la placa con etanol-

hidróxido de sodio 2M 1:1.

c- Fracciones obtenidas. Identificaciones

En fracciones N° 8 a 10, eluidas con la mezcla cloroformo-etanol 95:5, se evidenció la presencia de un solo producto, homogéneo en cromatografía en capa fina, de Rf 0,63, que revela inmediatamente de color púrpura pasando lentamente a beige, para devenir finalmente amarillo pálido. Estas fracciones fueron reunidas y evaporadas a seco, obteniéndose un escaso residuo oscuro, aceitoso, no cristalizable en distintos solventes y cuyo comportamiento cromatográfico y datos espectroscópicos fueron absolutamente coincidentes con los de 3-nitro-1-propanol.

De esta manera se aisló e identificó uno de los metabolitos secundarios informados en esta planta por los autores antes citados.

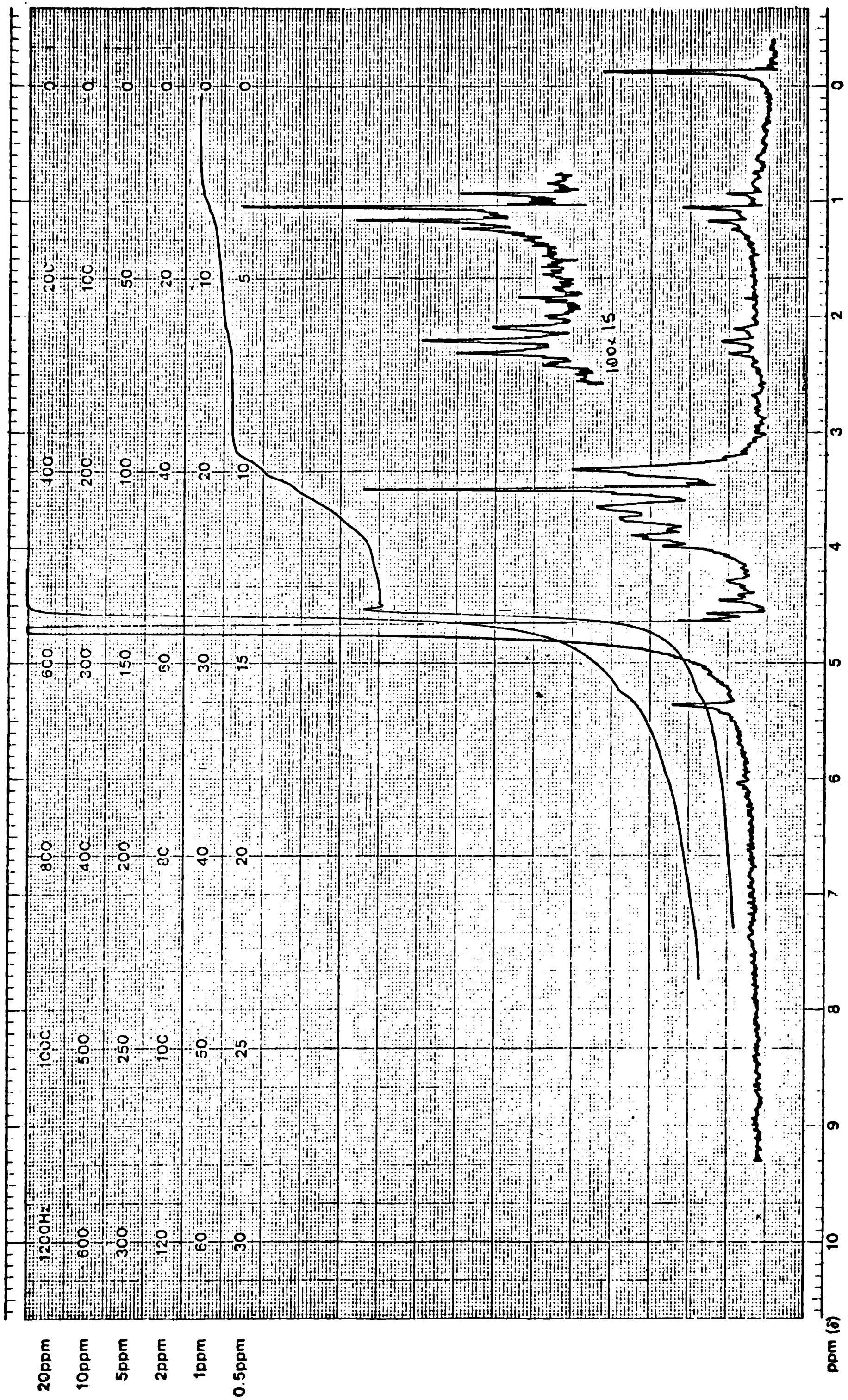
En fracciones N° 41 a 65, eluidas con la mezcla cloroformo-etanol 80:20, se evidenció la presencia de un único producto, homogéneo en cromatografía en capa fina, Rf 0,33, que reveló color rojo brillante, pasando lentamente a beige y finalmente a amarillo tenue. Con fines de purificación adicional, el residuo proveniente de la reunión y evaporación a seco de estas fracciones fue disuelto en mínimo volumen de metanol a ebullición y luego de enfriar, el precipitado formado fue separado por filtración; la solución remanente fue reducida de volumen hasta casi siruposo y sometida a dos pasajes sucesivos por columna de Sephadex LH-20 montada y eluída con metanol. Reunidas y evaporadas a seco las fracciones que en cromatografía en capa fina mostraron al producto casi totalmente purificado, el residuo resultante (0,137 g), de color amarillo verdoso y consistencia oleosa, se mostró homogéneo en cromatografía en capa fina en distintos sistemas de solventes.

Los espectros Infrarrojo y de Resonancia Magnética Nuclear de este producto resultaron totalmente coincidentes con los consignados en bibliografía para Miserotoxina (Figura N°10)

Fue así aislado e identificado el restante metabolito secundario informado previamente en esta planta.

En consecuencia, a partir de *Astragalus miser* fueron aislado e identificados 3-nitro-1-propanol y Miserotoxina, sirviendo esta última como muestra auténtica para otros ensayos y confirmando los resultados informados anteriormente por /

Figura N° 10: Espectro de R.M.N. de Miserotoxina aislada de A. miser.



Stermitz y colaboradores (16).

IV.A.VI. Ensayos de productos de baja polaridad (terpenos-esteroles) y alcaloides.

El material vegetal de *A. distinens*, secado a 45-50° en la manera anteriormente indicada, fue sometido al procesamiento descrito en Materiales y Métodos para ensayo de terpenos-esteroles y alcaloides.

Con esta finalidad el material vegetal (70 g; correspondiente a 149 g de planta fresca y 52 g de material seco) fue sucesivamente extraída en forma exhaustiva en equipo Soxhlet con cloroformo y posteriormente con metanol.

Por evaporación del extracto clorofórmico se obtuvo un residuo oscuro (2,5 g, correspondiente a 4,8% sobre material vegetal seco) que cromatografiado en capa fina en solvente benceno-dioxano-ácido acético 30:5:1 y revelado con "oleum" no evidenció manchas definidas con características de los productos buscados sino simplemente surcos difusos de color negrozco.

Por su parte la evaporación del extracto metanólico dejó un residuo de 10,266 g (correspondiente a 19,7% sobre material vegetal seco) que cromatografiado en capa fina en solvente etanol-ácido clorhídrico 2N 9:1 evidenció, además de considerables surcos de impurezas, una única mancha de bordes nítidos y Rf 0,35 de coloración marrón rojiza que hizo suponer estar en presencia de material alcaloídico.

1- Procesamiento del extracto clorofórmico.

a- Cromatografía en columna.

El residuo (2,5 g) proveniente de la evaporación del extracto clorofórmico conteniendo productos de baja polaridad fue cromatografiado en columna de 75 g de sílica gel Merck, 60 H, para cromatografía en capa fina, en una relación producto-adsorbente de 1:30 y relación diámetro-altura de 1:18. La columna se montó en n-hexano-acetato de etilo 9:1 y el residuo, incorporado a 7,5 g de sílica gel Merck 60, para cromatografía en columna, se puso al tope de la misma eluyendo siempre con el solvente de montaje y aplicando presión moderada para aumentar la velocidad de goteo.

Se recolectaron fracciones de aproximadamente 10 ml que fueron examinadas en cromatografía en capa fina utilizando la mezcla solvente y revelador antes mencionada.

b- Fracciones obtenidas

A diferencia de lo que es habitual en el procesamiento cromatográfico de extractos vegetales de baja polaridad, esta columna no mostró separación de zonas o bandas coloreadas en todo su desarrollo.

En fracciones N°1 a 29 se observó la elución de un producto blanco, que solidificaba en el pico de la columna, color blanco, amorfo, untuoso al tacto y penetrante olor rancio. La cromatografía en capa fina de estas fracciones no evidenció manchas definidas sino surcos oscuros, suponiéndose que se trata de una mezcla de hidrocarburos saturados de alto peso molecular.

Las fracciones N°30 a 32, evidenciaron en cromatografía en capa fina, además de surcos menores de impurezas, una única mancha que reveló de color púrpura que deviene rápidamente a gris-verdoso. Reunidas y evaporadas a seco se obtuvo un escaso residuo (0,012 g) que no permitió ni alentó ensayos de identificación. Por la coloración de revelado puede suponerse que se trata de vestigios de esteroides o bien triterpenos.

Finalmente no se realizaron identificaciones a partir de las fracciones eluidas.

2- Procesamiento del extracto metanólico.

a- Purificación del residuo obtenido.

Del residuo proveniente de la evaporación del extracto metanólico (10,266 g) se tomaron 2,176 g (correspondientes a 31,58 g de material vegetal fresco y 11,02 g de material seco) que fueron disueltos en mínimo volumen de etanol-cloroforno 65:35 a ebullición y luego de enfriar, el material insolubilizado fue separado por filtración. La solución resultante, previa reducción de volumen, fue purificada por pasaje a través de una columna de Sephadex LH-20 montada y eluida en mezcla solvente de igual composición.

Reunidas y evaporadas a seco las fracciones eluídas que en cromatografía en capa fina evidenciaron el producto inicialmente detectado, se obtuvo un residuo (0,732 g) sólido, de coloración oscura que luego fue procesado por cromatografía en columna.

b- Cromatografía en columna del residuo obtenido en 2-a

El residuo (0,732 g) que presuntamente contenía los alcaloides totales fue cromatografiado sobre 15 g de sílica gel Merck 60 H para cromatografía en capa fina en una relación producto-adsorbente de 1:20 y relación diámetro altura 1:5.

La columna se montó en etanol y el residuo disuelto en mínimo volumen de etanol se aplicó al tope de la columna cuya elución se realizó con el mismo solvente usado en capa fina (etanol-ácido clorhídrico 2N 9:1) debiendo aplicarse presión moderada para acelerar la velocidad de goteo.

Se recolectaron fracciones de aproximadamente 3 ml y el desarrollo de esta columna resultó comparable a una cromatografía en capa fina en el mismo solvente ya que las impurezas (clorofila entre ellas) avanzan con el frente del solvente quedando el lecho de sílica sólo ligeramente coloreado de amarillo pálido.

Como solventes y revelador de cromatografía en capa fina se utilizaron los antes consignados.

c- Fracciones obtenidas. Identificaciones

Las fracciones N° 6 a 15 revelaron la presencia de un único producto que reveló como alcaloide acompañado de pequeña cantidad de impurezas, por lo que luego de reunidas y evaporadas a seco se realizó su purificación por simple pasaje a través de columna de Sephadex LH-20 montada y eluída con etanol-cloroforno 65:35.

Reunidas y evaporadas a seco las fracciones que evidenciaron al producto supuestamente alcaloidal se obtuvo un residuo blanco, sumamente higroscópico que pesó 0,128 g (correspondiente a 0,405% sobre material vegetal fresco y 1,16% sobre material seco) y que en base a su comportamiento cromatográfico, datos espectroscópicos y comparación con muestra auténtica fue

identificado como Colina $\text{HOCH}_2\text{-CH}_2\overset{\uparrow}{\text{N}}\cdot(\text{Me})_3 \text{ } ^-\text{OH}$ base nitrogenada atóxica de amplia difusión en la naturaleza que ha sido aislada de numerosas especies botánicas.

En consecuencia puede descartarse la presencia de alcaloides en *Astragalus distans* ya que la positividad de las reacciones orientativas practicadas se debe a la presencia de esta base nitrogenada de naturaleza no alcaloídica.

IV.B. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ASTRAGALUS BERGII HIERONIMUS

Debido a que los resultados obtenidos en el estudio de *A. bergii* son coincidentes en su mayoría con los de *A. distinens*, sólo se presentan en esta sección aquellos que pudieran mostrar diferencias cualitativas o cuantitativas.

IV.B.I. Ensayos de toxicidad del extracto acuoso total

Para el caso de *A. bergii* fue necesario duplicar la dosis de extracto acuoso para producir la muerte de las lauchas, lo que indicaría una menor potencia tóxica del *A. bergii* en / floración frente al *A. distinens* en fructificación.

En Tabla N°16, se presentan los resultados obtenidos con la inoculación de 1 ml de extracto acuoso total.

Tabla N° 16: Resultados de la inoculación del extracto acuoso total de *A. bergii*.

Animales Inoculados	Dosis ml	Vía de inoculación	N° de animales	Peso (g)	Lapso inoc. muerte (min.)	g/planta/kg. de peso
Lauchas albinas	1	subcutánea	1	24,3	120	82,30
			1	25,5	135	78,40
			1	21,6	105	92,59
			1	23,0	120	86,90

Los síntomas observados en este caso son similares a los producidos por la inoculación de extracto acuoso total de *A. distinens*, tampoco se han observado lesiones macroscópicas ni microscópicas.-

IV.B.II. Ensayo de ácido cianhídrico

Como se ha expresado en la presentación de Resultados de *A. distans* tampoco se han encontrado resultados positivos a este compuesto tóxico con ninguna de las técnicas previstas.

En este caso también debe recalcar la positividad de los testigos usados, como el sorgo granífero y una solución patrón de cianuro de potasio, por lo que la negatividad del *A. bergii* no se debe a problemas de técnica, ni a bajo contenido de tóxico ya que con la técnica del Azul de Prusia se han detectado hasta 0,01 mg de ión cianuro por ml de solución patrón.,

IV.B.III. Ensayo de saponinas

Los ensayos realizados con el objeto de determinar la presencia de saponinas en *A. bergii* también resultaron negativos, aún cuando el patrón usado, *Kochia scoparia*, demostró poseer una cantidad considerable de estos compuestos al indicar positividad en el tubo que tenía una mayor dilución del extracto, y por producir hemólisis en todos los tubos de la batería utilizada.

IV.B.IV. Ensayo de Selenio

Al igual de lo que se observó en *A. distinens*, el *A. bergii* posee sólo vestigios de selenio, incluso en tenores más bajos de lo que es de esperar en cualquier especie vegetal.

En Tabla N° 17, se muestran los resultados obtenidos en 5 determinaciones de selenio, para comprobar la realidad de los valores hallados.

Tabla N° 17: Resultados obtenidos en cinco diferentes determinaciones de selenio.

Análisis N°	microgramos / g de planta seca
1	0,183
2	0,192
3	0,105
4 -	0,107
5	0,110

Valor medio

0,139

IV,B.V. Ensayo de nitrocompuestos orgánicos

Para el caso de los procesamientos realizados con respecto a presencia de nitrocompuestos orgánicos alifáticos en *A. bergii*, los resultados en cuanto a identidad química son los mismos que para *A. distinens*, pero es necesario hacer un comentario un poco más amplio de lo hecho anteriormente como consecuencia de las diferencias cuantitativas encontradas.

1- Ensayo cualitativo

a- Técnica del Reactivo de Griess-Ilosvay.

Según se puede observar en la Tabla N° 18, la intensidad de la reacción positiva a nitrocompuestos es menor o igual que para *A. miser*, usado como se anunció anteriormente, como patrón positivo.

Tabla N° 18: Resultados de los análisis cualitativos de nitrocompuestos orgánicos en *A. bergii* y *A. miser*.

Parte de la planta	<i>A. bergii</i>	<i>A. miser</i>
Hoja	++	
Tallo	+	
Flor	+	
Planta Total	+	++

+: indica intensidad de la reacción.

b- Cromatografía en capa fina.

Este análisis corrobora la existencia de nitrocompuestos orgánicos en *A. bergii*. Los productos demostrados a través de la placa realizada se alinearon con el patrón de 3-nitro-1-propanol y con el extracto de *A. miser*.

Hubo también una coincidencia en cuanto a los valores de R_f con los obtenidos con el *A. distinens*, por lo que hizo pensar que se estaba en presencia de los mismos compuestos.

2- Determinación cuantitativa

Los valores presentados en la Tabla N° 19 corresponden al valor medio de siete repeticiones realizadas con el mismo material vegetal y con diferentes baterías de reactivos.

Tabla N° 19: Resultados cuantitativos de nitrocompuestos orgánicos de *A. bergii* y *A. miser*.

Parte de la planta	A. bergii	A. miser
	mg NO ₂ ⁻ / g de mat. veg.	
Hoja	7,35	
Tallo	8,19	
Flor	6,00	
Planta total	7,00	8,37

Para este caso los valores de nitrocompuestos hallados son menores que los que corresponden a *A. miser* y a *A. distiensis*.

3- Extracción, aislamiento y purificación de nitrocompuestos orgánicos.

El material vegetal de *Astragalus bergii* fue procesado de forma idéntica a lo descrito para *A. distans*, por lo que sólo serán explicitados aquí los datos específicos de este ensayo.

El ensayo que a continuación se describe fue llevado a cabo sobre planta total recolectada en el mes de Agosto de 1982 en el centro-este de la Provincia de San Luis y mantenida en congelador hasta su procesamiento.

a- Acondicionamiento de la muestra previo a la extracción.

Antes de realizar la extracción de nitroderivados orgánicos, el material vegetal seleccionado fue secado a una temperatura de 45-50°C en estufa eléctrica con circulación forzada de aire hasta peso constante. En estas condiciones, las muestras acusaron una pérdida de peso del 50%.

Posteriormente, el material vegetal fue reducido a polvo fino.

Determinaciones de humedad de *A. bergii*, realizadas de igual manera pero a una temperatura de 100-105°C y hasta peso constante, arrojaron valores del 67%.

b- Extracción de nitroderivados totales.

El material vegetal secado a 45-50°C (360 g, correspondientes a 720 g de planta fresca y 237,6 g de planta seca) fue extraída con acetona a temperatura ambiente y los extractos reunidos y evaporados a seco dejaron un residuo de 10,3 g (4,33% sobre material vegetal seco) cuya cromatografía en capa fina reveló productos con las características de nitrocompuestos orgánicos.

c- Cromatografía en columna de sílica gel H del residuo de nitroderivados.

El residuo de nitroderivados totales (10,3 g) fue cromatografiado sobre 123 g de sílica gel Merck 60 H, para cromatografía en capa fina en una relación producto adsorbente

de 1:12 y relación diámetro-altura de 1:23.

La columna se montó en cloroformo-etanol absoluto 95:5 y el residuo de nitrocompuestos, incorporado a 12 g de sílica gel Merck 60 para cromatografía en columna, se puso como cabeza de la misma iniciándose la elución con el solvente de montaje y continuándola con mezclas de cloroformo-etanol absoluto 90:10; 80:20 y finalmente 70:30.

Se recolectaron fracciones de aproximadamente 15 ml y los cambios en la composición del solvente se decidieron en base a la información suministrada por la cromatografía en capa fina de los residuos de evaporación de cada fracción habiéndose tenido asimismo en cuenta el aspecto y volumen de los mencionados residuos.

Como solventes y revelador de capa fina se utilizaron los precedentemente descriptos.

d- Fracciones obtenidas y su purificación. Identificaciones.

De fracciones N° 17 a 21, eluidas con cloroformo-etanol 95:5, reunidas, evaporadas a seco y el residuo obtenido sometido a purificación adicional por pasaje en columna de Sephadex LH-20, se obtuvieron 0,057 g (0,007% sobre planta fresca y 0,02% sobre material vegetal seco) de 3-nitro-1-propanol.

En fracciones N° 31 a 53, eluidas con cloroformo etanol 95:5 se detectó por cromatografía en capa fina una mezcla de productos, con predominio de uno que revelaba morado frente a la p-nitroanilina diazotada, de características semejantes a los presentes en *A. distinens*. Los ensayos de purificación y aislamiento resultaron infructuosos también aquí y no se lograron identificaciones.

A partir de fracciones N° 75 a 102, eluidas con cloroformo-etanol 90:10 a 80:20, reunidas, evaporadas a sequedad y purificadas por doble pasaje por columna de Sephadex LH-20, montada y eluida con cloroformo-etanol 1:1. se obtuvieron 0,663 g de miserotoxina (0,09% sobre forraje fresco y 0,27% sobre material vegetal seco).

En consecuencia, puede concluirse que respecto de nitroderivados orgánicos alifáticos, *A. bergii* contiene los mismos metabolitos secundarios que *A. distinens*, aunque en tenor apreciablemente menor.

IV.B.VI. Ensayo de productos de baja polaridad (terpenos-esteroides) y alcaloides.

Con la finalidad arriba indicada, el material vegetal de *A. bergii* (70 g) fue sometido a idéntico procesamiento que en el caso de *A. distinsens*, extrayendo sucesivamente y en forma separada en equipo soxhlet con cloroformo y metanol.

Por evaporación del extracto clorofórmico se obtuvo un residuo oscuro (1,394 g: 1,99% sobre material vegetal seco) que cromatografiado en cromatografía en capa fina reveló surcos de coloración oscura con aparente diferenciación de zonas o manchas que revelan inicialmente con tonalidad violeta para devenir rápidamente a tonalidad gris-verdosa.

Por otra parte, la evaporación del extracto metanólico dejó un residuo oscuro, de consistencia siruposa, que cromatografiado en capa fina reveló además de surcos de impurezas, una única mancha, de bordes nítidos y R_f 0,30, color marrón rojiza, que hizo suponer la presencia de productos de tipo alcaloidal.

1- Procesamiento del extracto clorofórmico

a- Cromatografía en columna.

El residuo (1,394 g) proveniente de la evaporación del extracto clorofórmico fue incorporado a 7 g de sílica gel Merck 60 H, para cromatografía en capa fina en una relación producto-adsorbente de 1:70 y relación diámetro-altura 1:13.

La columna se montó en n-hexano-acetato de etilo 9:1 y se recolectaron fracciones de aproximadamente 10 ml eluyendo hasta el final con la mezcla de solventes en que se armó la columna.

Las distintas fracciones eluidas fueron testeadas en cromatografía en capa fina utilizando la mezcla de solventes y revelador anteriormente indicados.

b- Fracciones obtenidas. Identificaciones

De fracciones N° 7 y 8 reunidas y evaporadas a seco, se obtuvo un producto sólido (0,085 g) cristalino, color blanco, homogéneo en cromatografía en capa fina revelando una sola

mancha.

Determinaciones de punto de fusión de este producto realizadas por el micrométodo del tubo capilar, arrojó valores de 135-136°C.

La bibliografía consultada y particularmente el espectro de Masas de los cristales obtenidos permitieron identificar al producto como una mezcla de estigmasterol y beta-sitosterol, de muy frecuente aparición en extractos vegetales de baja polaridad en muy diversas especies botánicas. La comparación con muestras auténticas disponibles en el laboratorio confirmaron la identidad de los componentes del producto aislado.

De las restantes fracciones sólo se obtuvieron escasos residuos de aspecto céreo y untuoso, sin manchas definidas en cromatografía en capa fina y que resistieron todo intento de cristalización.

No se detectaron terpenos ni presencia de alcaloides en ninguna de las fracciones restantes.

2- Procesamiento del extracto metanólico

a- Cromatografía en columna del residuo obtenido.

El residuo (6.171 g) proveniente de la evaporación del extracto metanólico se incorporó a 30 g de alúmina Merck, actividad II-III según Brockmann y la "cabeza" resultante fue puesta al tope de una columna de 85 g de alúmina de idénticas especificaciones en una relación producto-adsorbente de 1:14 y relación diámetro-altura de 1:19.

La columna se montó en cloroformo y se recolectaron fracciones de aproximadamente 50 ml eluyendo con mezclas de cloroformo-metanol, en proporciones crecientes de este último.

Cada una de las fracciones eluidas previa evaporación a seco fue testeada en cromatografía en capa fina con el solvente y revelador usado para el extracto metanólico indicado para *A. distinens*.

b - Fracciones obtenidas y su purificación. Identificaciones.

De fracciones N° 39-77, eluídas con la mezcla cloroformo-metanol (1:1), reunidas y evaporadas a sequedad se obtuvo un residuo (0,650 g) siruposo, oscuro, que cromatografiado en capa fina reveló, además de considerables surcos de impurezas, una mancha única de bordes definidos y color morado (Rf 0,28).

Con fines de purificación adicional, el residuo de estas fracciones fue sometido a un doble pasaje por columna de Sephadex LH-20 montada y eluída con metanol lo que permitió obtener 0,122 g (correspondiente a 0,26% sobre material vegetal seco) de un producto blanco, sumamente higroscópico que en base a los mismos criterios de identificación antes mencionados fue identificado como Colina.

En consecuencia, esta base nitrogenada, de amplia difusión en la naturaleza está presente en ambas especies de *As-tragalus* aquí estudiadas.

IV.C. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS PARA DETERMINACION DE DOSIS TOXICA 50 Y DOSIS LETAL 50.

El producto tóxico aislado de ambas especies de Astragalus fue la Miserotoxina, β -D-glucósido de 3-nitro-1-propanol, según se describe en el capítulo Resultados.

Químicamente, la Miserotoxina es un glucósido que debe ser previamente hidrolizado para liberar el componente tóxico, el 3-nitro-1-propanol. Esta hidrólisis en situación de campo se produce en el rumen o en el estómago de los monogástricos, (24, 25, 26,32), pero en el laboratorio debe realizarse "in vitro", con ácido clorhídrico diluído.

Esta hidrólisis ácida, además de liberar el alcohol nitrado da lugar a la formación de productos secundarios de marcada toxicidad, lo que hace desaconsejable utilizar el hidrolizado en pruebas biológicas.

La técnica de hidrólisis consignada en bibliografía específica calentamiento a baño maría hirviente del glucósido en medio ácido clorhídrico 3N durante 3 horas y luego evaporación a seco, lo que conduce colateralmente a la formación de 5-hidroximetilfurfural, por acción del ácido mineral en caliente sobre la glucosa (67). Un ensayo en blanco en el que se / reemplazó Miserotoxina por glucosa p.a. y posterior inoculación del residuo obtenido presentó toxicidad elevada confirmando la presunción original.

Asimismo, en la técnica hidrolítica indicada el ácido clorhídrico es neutralizado con solución de hidróxido de amonio, formándose por lo tanto apreciable cantidad de cloruro de amonio, compuesto inorgánico cuya toxicidad fue evidenciada mediante otro ensayo en blanco realizado paralelamente.

Por los motivos expuestos, se decidió realizar la determinación de Dosis Tóxica 50 y Dosis Letal 50 con 3-nitro-1-propanol puro, obtenido por síntesis, suministrado por F.R. Stermitz.

IV.C.I. Determinación de Dosis Tóxica 50 (DT-50)

La Dosis Tóxica 50 es la menor dosis que inoculada a animales susceptibles, produce signos de intoxicación en el 50% de los animales.

En la Tabla N° 20, se indica la cantidad de animales usados, sus pesos, dosis ensayadas y la aparición o no de síntomas.

La sintomatología se presenta entre 20 y 30 minutos posteriores a la inoculación de la solución de 3-nitro-1-propanol y se manifiesta inicialmente con excitación y disnea. Posteriormente se produce atontamiento, indiferencia al medio y al cabo de 3 ó 4 horas los animales se fueron recuperando y luego de 24 horas no manifestaban comportamiento anormal.

Tabla N° 20: Resumen de las dosis y efectos de ensayo de DT-50

N°orden	Grupo	Peso de las leuchas (g)	mg/3-NO ₂ -1- PrOH por kg	Presencia de Síntomas
1	1	27	10	no
2	1	25	10	no
3	1	30	10	no
4	1	31	10	no

5	2	24	20	no
6	2	28	20	no
7	2	33	20	no
8	2	25	20	no

9	3	27	40	no
10	3	28	40	si
11	3	25	40	si
12	3	29	40	si

13	4	29	80	si
14	4	30	80	si
15	4	31	80	si
16	4	35	80	si

Para el cálculo de la dosis tenemos que tomar en cuenta el logaritmo de 10 como dosis mínima inicial, el logaritmo del factor geométrico, 2 y el valor de f de Tabla N°10, de 0,0, 3,4 animales con síntomas.

$$\text{Log } 10 = 1$$

$$\log 2 = 0,30103$$

$$\text{Valor de } f = 0,75$$

$$\text{Log DT-50} = 1 + 0,30103 \times (0,75 + 1)$$

$$\text{Log DT-50} = 1,5268$$

$$\text{DT-50} = \text{antilog. } 1,5268$$

$$\text{DOSIS TOXICA } 50 = 33,63 \text{ mg/kg de peso}$$

IV.C.II. Determinación de Dosis Letal 50 (DL-50)

El método usado para determinar Dosis Letal 50 es el mismo que en el caso anterior con la salvedad que aquí no cuentan los animales con síntomas sino los animales muertos.

Teniendo como punto de partida que la Dosis Tóxica 50 es de 33,63 mg de 3-nitro-1-propanol por kg de peso, se toma como dosis inicial mínima 50 mg/kg, también con una progresión geométrica de 2 y con cuatro animales inyectados por dosis.

Los primeros signos de intoxicación se presentaron en todos los animales a los 5-10 minutos posteriores a la inoculación. En el grupo 4, la muerte se produjo a los 15-20 minutos post-inoculación, mientras que los del grupo 3 lo hicieron aproximadamente a los 60 minutos.

La sintomatología observada fue coincidente con la descrita en el caso anterior sólo que el período depresivo se acortó a medida que aumentaba la dosis.

En la Tabla N° 21, se consignan los resultados hallados como así también las dosis usadas en cada grupo.

Para el cálculo tomamos el logaritmo de la menor dosis usada, 50, del factor geométrico, 2 y el valor de f de Tabla N° 10, para 0,0,3,4.

$$\text{Log } 50 = 1,69897$$

$$\log 2 = 0,30103$$

$$\text{Valor de } f = 0,75$$

$$\text{Log DL-50} = 1,69897 + 0,30103 \times (0,75 + 1)$$

$$\text{Log DL-50} = 2,2257$$

$$\text{DT-50} = \text{antilo. } 2,2257$$

$$\text{DOSIS LETAL 50} = 168,17. \text{ mg/kg}$$

Tabla N° 21: Determinación de Dosis Letal 50

N°orden	Grupo	Peso de las A. uychas (g)	mg/3-NO ₂ -1-PrOH por kg	Animales muertos
1	1	37	50	no
2	1	36	50	no
3	1	33	50	no
4	1	35	50	no

5	2	31	100	no
6	2	30	100	no
7	2	32	100	no
8	2	32	100	no

9	3	29	200	no
10	3	28	200	si
11	3	29	200	si
12	3	30	200	si

13	4	27	400	si
14	4	26	400	si
15	4	27	400	si
16	4	23	400	si

V.- DISCUSION DE RESULTADOS

V. DISCUSION DE RESULTADOS

Debido a que los resultados obtenidos en el estudio de ambas especies de *Astragalus* son similares y con el objeto de evitar repeticiones, la discusión de los resultados se hará en forma conjunta, indicándose en el caso que sea necesario de qué especie se trata.

V.A. Ensayo de toxicidad del extracto acuoso total

Tal como se describe en IV.A.I. de este trabajo y con el objeto de confirmar la toxicidad de estas dos especies se inocularon las ratas con dosis de 1 o 2 g de planta observándose que los extractos eran tóxicos, aún cuando para *A. bergii* se necesitó doble dosis de la que estaba prevista (Materiales y Métodos).

Luego de examinar los resultados de los diferentes ensayos realizados y considerando que el producto tóxico principal es la Miserotoxina glucósido que necesita hidrólisis previa para liberar la fracción tóxica, el 3-nitro-1-propanol, se plantea el interrogante de cómo un extracto acuoso total, no hidrolizado, puede producir la muerte en forma tan rápida a las ratas inoculadas.

Como respuesta podría decirse que la sintomatología observada, la muerte rápida y la ausencia de lesiones macroscópicas y microscópicas hace pensar que se trataría de una intoxicación por nitritos. Esto se debería a que al ser inoculado el material por vía subcutánea, no se produciría la hidrólisis de la Miserotoxina y este sería rápidamente absorbida para llegar al hígado donde se produce la liberación del grupo nitro con bastante rapidez (46). Esta afluencia masiva de nitritos en sangre produciría la sintomatología observada, pero la muerte se retrasaría un poco hasta que el resto de la molécula comience a producir su efecto.

Paralelamente habría que agregar que según pudo observarse en todos los desarrollos cromatográficos, siempre hay un cierto tenor de 3-nitro-1-propanol libre, que al potenciarse con los nitritos podrían producir la muerte.

A pesar que las ratas no son los mejores animales de experimentación para estudios de toxicidad, debido a la necesidad de usar una vía de inoculación distinta a la digestiva,

se observó que fueron lo suficientemente sensibles como para probar la toxicidad de estas especies de *Astragalus* (36).

V.B. Ensayos de ácido cianhídrico

Ninguno de los ensayos realizados para este tóxico dieron resultados positivos.

La sensibilidad del método del Azul de Prusia de 0,01 mg de ión cianuro por ml confirma la ausencia de este tóxico para ambas especies en sus correspondientes estados fenológicos.

Estos resultados se contraponen a lo informado por Giusti (1937)(8) con respecto a la presencia de ácido cianhídrico en *A. bergii* y asimismo a sus recomendaciones hechas al respecto del uso del nitrito e hiposulfito de sodio como tratamiento específico en las intoxicaciones causadas por esta especie botánica.

Esta información es posteriormente tomada por Ragonesse (3) y Gallo (6); éste último informa que los frutos son los que poseen mayor tenor de ácido cianhídrico.

Como se ha explicado anteriormente (Introducción) el nitrito presente en esta especie y que forma parte estructural de la molécula del tóxico, ayuda a caracterizar el síndrome de intoxicación, por lo que si se agrega más nitrito, el animal puede sufrir una intoxicación aún más grave como consecuencia del tratamiento realizado.

En la revisión bibliográfica realizada, que se estima exhaustiva, no se han encontrado trabajos que informen de ácido cianhídrico en ninguna de las especies de *Astragalus* estudiadas en todo el mundo.

De cualquier forma, debido a la sencillez y sensibilidad de los métodos para determinar ácido cianhídrico, sería conveniente que se pudieran realizar ensayos sobre material vegetal fresco de otras zonas del país y en distintos estados fenológicos para descartar definitivamente la presencia de este tóxico en especies del género *Astragalus*.

V.C . Ensayos de Saponinas

Estos compuestos tóxicos, de amplia distribución dentro de especies de la familia Leguminosae no pudo ser encontrado en ninguna de las dos especies de Astragalus que se han estudiado en este trabajo.

La información existente en nuestro país, según Ragonese (3) y Gallo (6), le asigna al Astragalus bergii la presencia de saponinas, cuando en realidad el Astragalus que sí las contiene es el A. garbancillo Cav. originario del norte de nuestro país.

Tampoco se ha encontrado otra referencia en cuanto a toxicidad de especies de este género por saponinas, pero es probable que algunas especies las posean por estar generalmente / asociadas a especies de alto contenido de proteínas.

V. D Ensayo de Selenio

Como puede apreciarse en la descripción de la técnica usada, ésta es muy compleja y requiere de equipos muy específicos que hace que no pueda ser considerada una técnica de rutina, que no se desarrolle en el país y que sea la única técnica reconocida como oficial, a nivel internacional, para la determinación de selenio.

Todo esto hace que nunca se haya realizado un estudio a fondo de este metaloide en especies vegetales de nuestro país. El único intento anterior corresponde al año 1952 (11) con técnicas poco sensibles pero que de cualquier forma daban a los *Astragalus* argentinos como carentes de este tóxico.

Es lógico pensar entonces que la información de Gallo (6) ha sido tomada de referencias extranjeras sin tomar en cuenta de qué especie se trataba.

Las determinaciones aquí informadas indican que las cantidades presentes son sumamente bajas y están entre los valores mínimos que puede tener cualquier especie vegetal (7) y muy lejos de los valores tóxicos (2).

Al no contar con análisis de suelo no podemos saber si existe alto contenido de selenio en zonas donde crecen las distintas especies de *Astragalus*, que son consideradas "indicadores de selenio en suelo", por lo tanto habría que realizar ensayos de concentración de selenio en suelos y su relación con la planta, para ver de qué forma afecta un aporte abundante de este metaloide sobre el crecimiento o concentración de selenio en especies vegetales, especialmente *Astragalus*.

V.B . Ensayos de nitrocompuestos orgánicos

La información existente sobre la presencia de nitrocompuestos orgánicos en especies del género *Astragalus* es bastante abundante, pero en nuestro país sólo se había hecho un intento, trabajando sobre material de herbario, con resultados negativos (19). El material herborizado no pierde el contenido de tóxico presente en el momento del corte, ya que se informan resultados positivos en material herborizado desde el año 1900 (37), pero por tratarse por lo general de muy pequeñas cantidades de material vegetal, correspondiente a un solo ejemplar pueden encontrarse diferencias no específicas que hagan que tal o cual especie sea considerada libre de tóxico cuando realmente lo posee. A esto hay que sumarle que la técnica usada en la oportunidad del análisis de *Astragalus* argentinos no es tan sensible como la empleada en el desarrollo de este trabajo.

Por lo tanto hay que recalcar que en este caso se trabajó con material recolectado fresco, correspondiente a varios ejemplares de la misma especie de un ecosistema determinado, sobre el que había antecedentes de intoxicación y que las técnicas no se limitaron a análisis cualitativos sino que se realizó la extracción y posterior identificación del producto, no dejando lugar a dudas de la positividad de los resultados.

Los compuestos tóxicos hallados en ambas especies son idénticos, según ha sido precedentemente descrito. Su comportamiento es idéntico, tanto en cromatografía en capa fina frente a distintos sistemas de solventes, como frente al revelador usado y además las coincidencias encontradas en los resultados de los análisis espectroscópicos.

Los primeros indicios que permitieron determinar la naturaleza química del compuesto hallado surgieron de las observaciones de las placas de cromatografía en capa fina en las que se usaron patrones conocidos, obteniéndose resultados similares a los reportados por otros autores para casos semejantes (39,45,59).

La comparación de los análisis espectroscópicos realizados con el producto aislado en este trabajo, con los datos obtenidos de la información bibliográfica consultada surge que no hay diferencias entre este compuesto y la *Miserotoxina* (β -D-glucósido del 3-nitro-1-propanol) (17,16, 39,59).

La única diferencia encontrada y que no se debe al producto analizado en sí, sino a un cambio en la técnica propuesta, surgió del espectro de Resonancia Magnética Nuclear, al no contar con ácido clorhídrico deuterado para desplazar los picos producidos por el agua deuterada, de todas maneras las otras señales son coincidentes en su totalidad (17,16.38,39).

Por lo tanto y sin lugar a dudas, se puede informar que los compuestos hallados en ambas especies de *Astragalus* aquí estudiadas corresponden a Miserotoxina, [β -D-glucósido-de 3-nitro-1-propanol] y al producto de su hidrólisis el 3-nitro-1-propanol, basándose en los análisis cualitativos y cuantitativos con reactivo de Griess-Ilosvay, cromatografía en capa fina con revelador de p-nitroanilina diazotada, y análisis espectroscópicos de Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear y Masas.

V.F. Ensayos sobre productos de baja polaridad (terpenos-esteroides) y alcaloides:

Aún cuando no existían referencias con respecto a la presencia de compuestos como terpenos-esteroides y alcaloides en especies tóxicas del género *Astragalus* se consideró importante su búsqueda ya que son productos de aparición frecuente en extractos vegetales.

Aquellos productos que por haber sido extraídos en pequeñas cantidades imposibilitaron realizar análisis espectroscópicos, fueron ensayados sobre lauchas albinas para determinar si tenían algún efecto tóxico, que en caso positivo hubieran justificado un trabajo por sí solo. Al obtenerse resultados negativos en las inoculaciones practicadas se descartaron como productos de interés para el desarrollo de este trabajo.

La presencia de Colina en *A. bergii* y *A. distans*, no había sido informada con anterioridad, pero carece de importancia desde el punto de vista toxicológico por tratarse de un compuesto atóxico y de amplia distribución en el reino vegetal.

V. G. Ensayos de determinación de Dosis Tóxica 50 y Dosis Letal 50.

La elección del método de Weil (65) para la determinación de Dosis Tóxica y Dosis Letal se hizo en base a la sencillez que presenta en los cálculos al contar con tablas y hacer uso de una fórmula simple.

El producto aislado, Miserotoxina, requiere una hidrólisis previa para liberar la fracción tóxica, el 3-nitro-1-propanol. Los ensayos realizados para obtener a partir del glucósido este compuesto con alto grado de pureza y sin elementos ajenos que pudieran interferir en el efecto tóxico resultaron infructuosos. Según pudo comprobarse, en la totalidad de los ensayos realizados por otros autores, el compuesto que se usa proviene de la síntesis del mismo probablemente debido a la dificultad de obtener el producto natural en forma totalmente pura (68).

En este caso se debió trabajar con 3-nitro-1-propanol puro facilitado por F.R. Stermitz, que se usara como patrón para cromatografía en capa fina y cuyo origen es sintético.

Según pudo observarse por comparación entre ambas dosis obtenidas la diferencia es amplia (33,63 mg/kg y 168 mg/kg) y podría interpretarse erróneamente teniendo en cuenta la información bibliográfica que dice que la diferencia entre dosis tóxica y letal es muy pequeña (30).

Hay que puntualizar que por definición, Dosis Tóxica 50 es la menor dosis que produce síntomas de intoxicación en el 50% de los animales inoculados y a lo que se refiere la bibliografía es que entre la dosis máxima que produce síntomas de intoxicación y la mínima dosis que produce la muerte hay muy poca diferencia (30).

Para descartar la posibilidad de que las muertes producidas en la determinación de Dosis Letal 50 se debieran al nitrito que se libera en el hígado (46), se hicieron ensayos inoculando simultáneamente azul de metileno al 1% en dosis desde 0,1 a 0,5 ml por animal (66).

Lo observado en estos casos no modificó los resultados finales, lo único que se notó era que los animales demoraban más en morir (alrededor de 45 minutos) y no manifestaron síntomas tan espectaculares.

Diferentes referencias bibliográficas informan sobre dosis tóxicas de nitrocompuestos expresadas como mg de nitritos por kg de peso (12,30,45,25) por lo tanto hubo que hacer una serie de cálculos para uniformar el criterio de expresión de las dosis, fundamentalmente debido a que los análisis cuantitativos se expresan en mg de nitrito: por gramo de planta seca y que en definitiva son los que indican la capacidad de producir intoxicación.

El cálculo realizado es el siguiente:

Peso molecular de Miserotoxina = 267,217 g

Peso molecular de 3-nitro-1-propanol = 105,086 g

Peso molecular de nitrito = 46,005 g

Según esto se puede decir que 1 g de Miserotoxina equivale a 0,172 g de nitrito, por lo que partiendo de las dosis aquí determinadas se obtiene que:

427,62 mg de Miserotoxina	168,17 mg de 3-nitro-	73,622 mg de
por kg de peso	= 1-propanol por kg de	= nitrito/kg
	peso	

Estos resultados son considerablemente más altos que los informados en otras oportunidades y que son 25 mg de nitritos y 57 mg de 3-nitro-1-propanol por kilo de peso (12) pero son bastante coincidentes con lo informado recientemente por Gould y col. (1985)(68) y que determina la dosis en 190 mg de 3-nitro-1-propanol por kg de peso usando lauchas de aproximadamente 25 g de peso y una sola inyección subcutánea del tóxico.

Para finalizar se puede resumir diciendo que la Dosis Tóxica 50 y Dosis Letal 50 de 3-nitro-1-propanol en lauchas albinas, inoculadas por vía subcutánea es de 33,63 mg/kg y 168,17 mg/kg respectivamente.

VI. CONCLUSIONES

Luego de haber revisado exhaustivamente la bibliografía y de realizado todos los ensayos previstos, es posible concluir lo siguiente:

Se confirma la toxicidad de *Astragalus bergii* y *Astragalus distinens* luego de las inoculaciones de extractos totales de ellos.

Se determina que *A. distinens* en fructificación y *A. bergii* en floración no poseen ácido cianhídrico, saponinas, alcaloides ni terpenos.

Se encuentra que aún cuando ambas especies contienen selenio, la poca cantidad presente en estos estados fenológicos y en estas condiciones de suelo, no constituyen fuente de intoxicación por este elemento, a pesar de considerar necesario continuar los estudios a este respecto.

A través de los ensayos realizados se puede asegurar la presencia de nitrocompuestos orgánicos en concentración suficiente como para producir intoxicación y que la aislación e identificación de ellos no deja lugar a dudas de que corresponden al β -D-glucósido de 3-nitro-1-propanol, comunmente denominado Miserotoxina y 3-nitro-1-propanol.

También se concluye que la toxicidad del *A. distinens* y *A. bergii* se debe exclusivamente a estos nitrocompuestos alifáticos identificados.-

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- GOMEZ SOSA, E. Las especies Sudamericanas del Género Astragalus (leguminosae). I. Las especies patagónicas argentinas. Darwiniana 22 (1-3) 313-376, 1979.
- 2.- JAMES, L.F.; HARTLEY, W.J.; VAN KAMPEN, K.R. Syndromes of Astragalus poisoning in Livestock. J.A.V.M.A. 178 (2), 146-150. 1981.
- 3.- RAGONESE, A.E. Plantas tóxicas para el ganado en la Región Central Argentina. Rev. de Agronomía de La Plata (3era.) Epoca T.XXXI, Diciembre, 201, 1955.
- 4.- GIUSTI, L. Experiencias sobre la acción de Astragalus bergii Hieron. Rev. de Med. Vet. 15 a 19, 99-108, 1932.
- 5.- GIUSTI, L. Experiencias sobre la acción fisiológica de la Wedelia glauca y del Astragalus bergii. Rev. de Arg. 1(3), 223-228, 1934.
- 6.- GALLO, G.G. Plantas tóxicas para el ganado en el cono sur de América. EudeBA. Bs. As. 77, 1979.
- 7.- BUTLER, G.W. and BAILEY, R.W. Chemistry and Biochemistry of Herbage. Tomos I, II y III. Acad. Press. N. York, 1973.
- 8.- CONN, E.E. Cyanogenic Glucosides. J. Agr. and Food Chem. 17(3), 519; 1969.
- 9.- GIUSTI, L. Plantas forrajeras cianogenéticas. Jornadas de Agr. y Vet. 43-49, Bs. As. 1937.
- 10.- ETCHEVEHERE, P.H. Normas para el reconocimiento de suelos. 2da. Edic. INTA, Dpto de Suelos. Castelar. 751-754. 1976.
- 11.- RAGONESE, A.E. Clasificación de las Plantas Tóxicas desde el punto de vista florístico, fitoquímico y de su toxicidad. Memorias del III Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias y III Simposio Nac. de Cs. y Tecn. de Carnes Soc. de Med. Vet. Bs. As. 197-203, 1980.
- 12.- SMOLENSKI, S.J.; KINGHORN, A.D. and BALANDRIN, M.F. Toxic constituents of Legumes plants. Econ. Bot. 35 (3) 321-355, 1981.

- 13.- WILLIAMS, M.C. and PARKER, R. Distribution of Organic Nitrites in Astragalus. Weed Sc. 22 (3), 259-262, 1974.
- 14.- DAVIS, A.M. Se accumulation in Astragalus species. Agr. J. 64 (Nov.-Dec.) 751-754, 1972.
- 15.- NIETO, M. Alcaloides del Cereus validus Haworth (Cactaceae) y de la Enantia pilosa Exell (annonaceae) Tesis Doctoral. UNSL. Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. San Luis, 1978.
- 16.- STERMITZ, F.R.; NORRIS, F.A. and WILLIAMS, M.C. Miserotoxin, a new naturally occurring nitrocompounds. J. of the Am. Chem. Soc. 91 (16), 4599-4600, 1969.
- 17.- STERMITZ, F.R.; LOWRY, W.T.; NORRIS, F.A.; BUCKERIDGE, F. A. and WILLIAMS, M.C. Aliphatic nitrocompounds from Astragalus species. Phytochemistry. 11, 1117-1124, 1972.
- 18.- HARLOW, M.C.; STERMITZ, F.R. and THOMAS, R.D. Isolation of nitrocompounds from Astragalus species. Phytochem. 14, 1421-1423, 1975.
- 19.- STERMITZ, F.R.; HNATYSZYN, O.; BANDONI, A.L.; RONDINA, R.V. and COUSSIO, J.D. Screening of Argentine plants for aliphatic nitrocompounds. Hiptagin from Heteropteris angustifolia. Phytochemistry, 14, 1341-1345, 1975.
- 20.- WILLIAMS, M.C.; STERMITZ, F.R. and THOMAS, R.D. Nitrocompounds in Astragalus species. Phytochem. 14, 2306-2308, 1975.
- 21.- RONDINA, R. Comunicación Personal.
- 22.- WILLIAMS, M.C. and BINNS, W. Toxicity of Astragalus miser Dougl., var. oblongifolius Cronq. Weeds 15 (4), 359-362, 1967.
- 23.- JAMES, L.F. Syndromes of Locoweed poisoning in Livestock. Clin. Tox. 5(4) 567-573, 1972.
- 24.- WILLIAMS, M.C.; NORRIS, F.A.; VAN KAMPEN, K.R. Metabolims of Miserotoxin to 3-nitro-1-propanol in bovine and ovine ruminal fluids. Am. J. Vet. Res. 31 (2), 259-262, 1971.

- 25.- MOSHER, G.A.; KRISHNAMURTI, G.R. and KITTS, W.D. Metabolism of Toxic principle of *Ast. miser* var *serotinus* in ruminants and non ruminants. *Can. J. An Sc.* 51, 475-480, 1971.
- 26.- MAJAK, W. and CLARK, L.F. Metabolism of aliphatic nitrocompounds in Bovine rumen fluids. *Can. J. An. Sc.* 60 (june) 319-325, 1980.
- 27.- WILLIAMS, M.C. Toxicological investigation on *Ast. hamosus* and *Ast. sesameus*. *Aust. J. Exp. Agr. and An. Husbandry.* 20, 162-165, 1980.
- 28.- WILLIAMS, M.C. and JAMES, L.F. Poisoning in sheep from Emory Milkvetch and nitrocompounds. *J. range Mgt.* 29 (2), 319-325, 1980.
- 29.- WILLIAMS, M.C.; JAMES, L.F. and BLEAK, A.T. Toxicity of introduce nitrocontaining *Astragalus* to sheep, cattle and chicks. *J. of Range Mgt.* 29 (1), 30-33, 1976.
- 30.- WILLIAMS, M.C.; JAMES, L.F. and BOND, B.O. Emory milkvetch (*Ast. emoryanus* var. *emoryanus*). Poisoning in chicks, sheep and cattle. *Am. J. Vet. Res.* 40(3) 403-406, 1979.
- 31.- WILLIAMS, M.C. Nitrocompounds in *Indigosfera* species. *Agr. J.* 73, 434-436, 1981.
- 32.- MAJAK, W.; UDEMBERG, T.; MC DIARMID, R.E. and DOUWES, H. Toxicity and metabolic effects of intravenously administered 3-NPOH in cattle. *Can.J. An Sc.* 61 (Sept.) 639-347, 1981.
- 33.- JAMES, L.F. Effects of *Astragalus tennellus* on sheep. *J. Range Mgt.* 24 (2) 161, 1971.
- 34.- MC DONALD, M.A. Timber Milkvetch. Poisoning on British Columbia Ranges.
- 35.- GOMEZ SOSA, E. Novedades en el género *Astragalus*. I. (Leguminosae-Galeguea) *Darwiniana* 23(2-4) 507-516, 1981.
- 36.- GOMEZ SOSA, E. Novedades en el género *Astragalus*. II. (Leguminosae-Galeguea) *Darwiniana.* 24 (1-4) 23-31, 1981.

- 37.- WILLIAMS, M.C. and BARNEBY, R.C. The occurrence of nitrotoxins in Old World and South American Astragalus (Fabaceae) Brittonia. 29. 327-331, 1977.
- 38.- WILLIAMS, M.C. and NORRIS, F.A. Distribution of Miseroxin in varieties of *Astragalus miser* D. ex. Hook. Weed. Sc. 17(2), 236-238, 1969.
- 39.- STERMITZ, F.R.; LOWRY, W.T.; UBBEN, E. and SHARIFI, ...
1,6-Di-3-Nitro-propanoyl- β -D-glucopyranoside from *Astragalus cibarius*. Phytochem. 11, 3523-3527, 1972.
- 40.- STERMITZ, F.R. and YOST, G. Analysis and characterization of Nitrocompounds from Astragalus species. Effects of Poisonous plants on Livestock, 1978. Acad. Press. N. York, 1978.
- 41.- WILLIAMS, M.C. and JAMES, L.F. Toxicity of nitrocontaining Astragalus to sheep and cattle. J. of Range Mgt. 28 (4), 260-263, 1975.
- 42.- JAMES, L.F. Effects of Locoweed (*Astragalus lentiginosus*) feeding on fetal lamb development. Can J. Comp. Med. 40 (4) 380-384, 1976.
- 43.- JAMES, L.F.; HARTLEY, W.J.; PATH, F.R.; WILLIAMS, M.C. and VAN KAMPEN, K.R. Field and experimental studies in cattle and sheep poisoned by nitrobearing Astragalus or their toxins. Am. J. vet. Res. 41 (3), 377-382, 1980.
- 44.- WILLIAMS, M.C. and BARNEBY, R.C. The occurrence of nitrotoxins in North American Astragalus (Fabaceae) Brittonia 29, 310-326, 1977.
- 45.- WILLIAMS, M.C. and DAVIS, A.M. Nitrocompounds in introduced Astragalus species. J. of Range Mgt. 35 (1) 113-115, 1982.
- 46.- WILLIAMS, M.C. 3-Nitropropanoic acid and 3-nitro-1-propanol in species of Astragalus. Can. J. of Bot. 60, 1956-1963, 1982.
- 47.- WILLIAMS, M.C. Nitrocompounds in foreign species of Astragalus. Weed Sc. 29(30) 261-269, 1981.

- 48.- JAMES, L.F. and VAN KAMPEN, K.R. Acute and residual lesions of Locoweed poisoning in cattle and horses. J.A.V. M.A. 158 (5) 614-618, 1971.
- 49.- JAMES, L.F.; VAN KAMPEN, K.R. and JHONSON, A.E. Physiopathologic changes in Locoweed poisoning of Livestock. Am. J. Vet. Res. 31 (4) , 663-671, 1970.
- 50.- NELSON, B.K. and JAMES; L.F. Locoweed embriotoxicity in rats. Clin. Tox. 16 (2) 149-166, 1980.
- 51.- JAMES, L.F. and VAN KAMPEN, K.R. Effects of Locoweed toxin on rats. Am. J. Vet. Res. 37 (7) 854-856, 1976.
- 52.- JAMES, L.F. and BINNS, W. Blood changes associated with Locoweed toxin on rats. Am. J. Vet. Res. 28 (125), 1107-1110, 1967,
- 53.- DI FIORI, M.S.H. Diagnóstico Histológico. 7ma. Edic. Edit. "El Ateneo" pp. 69-88, Tomo I, Bs. As. 1975.
- 54.- ECKELL, O.A. Veterinaria Práctica. 8va. Edic. Edit. "El Ateneo". Bs. As. pp. 130, 1975.
- 55.- BURRIEL, MARTI, F.; LUCENA CONDE, F. y ARRIBAS GIMENO, S. Química Analítica cualitativa (Teoría y semimicrométodos) p. 455, 8va. Edic. Edit. Paraninfo. Madrid, 1972.
- 56.- KOLTHOFF, I.M.; SANDELL, E.B.; MEEHAN, E.J. and BUCKENSTEIN, S. Análisis químico cuantitativo. p. 840. 4ya. Edic. Edit. Nigor S.R.L. Madrid, 1972.
- 57.- GHISSI, J.J.; GODOY, J.A. y CIMINO, H.R. Evaluación cianhídrica en forrajes por el método de digestión ruminal in vitro. Prod. An. Vol. 8 pp. 196-216, AAPA. Edit. Hemisferio, Sur, 1981.
- 58.- BOLTZ, F. and HOWEEL, J.A. Colorimetric determination of non metals. Vol. 8. 2nd. Edit. Chapter 10, 371-419, 1978.
- 59.- MAJAK, W.; HOWARTH, R.E.; FRESSER, A.C.; GOPLEN, B.P. and PEDERSEN, M. W. Relationship between ruminants bloat and the composition of Alfalfa herbage. II. Saponins. Can J. An. Sc. 60 (Sep.) 699-708, 1980.

- 60.- WILLIAMS, M.C. Toxicity of saponins in Alfombrilla (*Drymaria arenarioides*). J. of Range Mgt. (31)(3), 182-184, 1978.
- 61.- WILLIAMS, M.C. and FIERRO, L.C. Seasonal concentration and toxicity of saponins in Alfombrilla. J. Range Mgt. 33 (2) 157-158, 1980.
- 62.- WHETTER, P.A. and ULLREY, D.E. Improved Fluorometric Method for determining Selenium. J. ASSOC. Off. Anal. Chem. 61 (4), 927-930, 1978.
- 63.- MAJAK, W. and BOSE, R.J. Chromatographic methods for the isolation of Miserotoxin and detection of aliphatic nitrocompounds. Phytochem. 13, 1005-1010, 1974.
- 64.- RANDERATH, K. Cromatografía en capa fina. Enciclopedia de la Química Industrial, Tomo 8. Edit. URMO. Bilbao, España, pp. 242, 1969.
- 65.- WEIL. Tables for convenient calculation of Median Effective Dose (LD 50 o ED 50) and instruction in their use. Biometrics. 8, 249-263, 1952.
- 66.- WILLIAMS, M.C. and JAMES, L.F. Livestock poisoning from Nitrobearing Astragalus. pp. 379-389. in Effects of Poisonous Plants on Livestock. 1978. Acad. Press. Inc. N. York.
- 67.- LEHNINGER, A.L. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da. Edic. Ediciones Omega. S.H. Barcelona, p. 261, 1979.
- 68.- GOULD, D.H.; WILSON, M.P. and HAMAR, D.W. Brain Enzyme- and clinical alterations induced in Rats and Mice by Nitroaliphatic toxicants. Department of Pathology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523. U.S.A. Submitted for Publication May, 1985.-

VIII. INDICE DE TABLAS

<u>Tabla N° 1:</u> Especies de Astragalus que contienen selenio	10
<u>Tabla N° 2:</u> Fórmulas de nitrocompuestos aislados del género Astragalus	13
<u>Tabla N° 3:</u> Metabolismo de la Miserotoxina	15
<u>Tabla N° 4:</u> Especies de Astragalus identificados en el país.....	18
<u>Tabla N° 5:</u> Astragalus que poseen nitrocompuestos orgánicos tóxicos.....	19
<u>Tabla N° 6:</u> Especies de Astragalus que producen el Síndrome de locura.....	24
<u>Tabla N° 7:</u> Curva patrón para determinación de nitrocompuestos orgánicos.....	45
<u>Tabla N° 8:</u> Extracción, aislamiento y purificación de nitrocompuestos orgánicos de especies de Astragalus.....	51
<u>Tabla N° 9:</u> Procesamiento de material vegetal para ensayos de productos de baja polaridad (terpenos-esteroides) y alcaloides.....	61
<u>Tabla N° 10:</u> Tabla para valores de "f" en el cálculo de Dosis 50	64
<u>Tabla N° 11:</u> Resultados del ensayo de toxicidad del extracto acuoso total de A. distinens.....	66
<u>Tabla N° 12:</u> Determinaciones de selenio en A. distinens.....	70
<u>Tabla N° 13:</u> Resultados de los análisis cualitativos de nitrocompuestos orgánicos en A. distinens	71
<u>Tabla N° 14:</u> Resultados de los análisis cuantitativos de nitrocompuestos orgánicos en A. distinens.....	73
<u>Tabla N° 15:</u> Nuevos solventes para cromatografía en capa fina para nitrocompuestos orgánicos.....	85
<u>Tabla N° 16:</u> Resultados del ensayo de toxicidad del extracto acuoso total de A. bergii.....	95
<u>Tabla N° 17:</u> Determinaciones de selenio en A. bergii.....	97
<u>Tabla N° 18:</u> Resultados de los análisis cualitativos de nitrocompuestos orgánicos en A. bergii.....	98
<u>Tabla N° 19:</u> Resultados de los análisis cuantitativos de nitrocompuestos orgánicos en A. bergii.....	99
<u>Tabla N° 20:</u> Resultados de la determinación de Dosis Tóxica 50 de 3-nitro-1-propanol.....	106
<u>Tabla N° 21:</u> Resultados de la determinación de Dosis Letal 50 de 3-nitro-1-propanol.....	109

IX. INDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA N° 1:</u> Astragalus distinens Macloskie	3
<u>FIGURA N° 2:</u> Astragalus bergii Hieronimus	5
<u>FIGURA N° 3:</u> Esquema de la columna cromatográfica usada.....	54
<u>FIGURA N° 4:</u> Esquema de la cromatografía en capa fina de extractos totales de A. distinens y patrones	72
<u>FIGURA N° 5:</u> Espectro Infrarrojo de Miserotoxina.....	78
<u>FIGURA N° 6:</u> Algunos modos de fragmentación de glucopiranosas.....	79
<u>FIGURA N° 7:</u> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Miserotoxina.....	82
<u>FIGURA N° 8:</u> Espectro Infrarrojo de 3-nitro-1-propanol.....	84
<u>FIGURA N° 9:</u> Fotografías de placas cromatográficas desarrolladas en dos sistemas de solventes.....	86
<u>FIGURA N° 10:</u> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Miserotoxina aislado de A. miser.....	89

LA FACULTAD NO SE HACE SOLIDARIA DE
LAS OPINIONES VERTIDAS EN UNA TESIS