

R. 11046

T 887

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA

"ESTUDIO FITOFARMACOLOGICO DE VISCUM CRUCIATUM SIEBER

PARASITO DE CRATAEGUS MONOGYNA JACQ."

Tesis Doctoral para aspirar al grado de Doctora en

Farmacia, presentada por la Licenciada M^a del

Carmen Ahumada Bilbao.



Sevilla Mayo de 1995

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Farmacia
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
al Sr. D. Jefe del Negociado de Farmacia
n.º 14 del libro
compendio
Sevilla, 19 MAYO 1995

El Jefe del Negociado de Farmacia,

M^a TERESA SAENZ RODRIGUEZ y M^a DOLORES GARCIA GIMENEZ,
Profesoras Titulares del Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada "Estudio Fitofarmacológico de
Viscum cruciatum Sieber parásito de Crataegus monogyna Jacq.",
realizada por M^a del CARMEN AHUMADA BILBAO, para aspirar
al grado de Doctora, ha sido llevada a cabo bajo nuestra dirección.

En Sevilla, a 19 de Mayo de 1995.

Fdo: M^a Teresa Sáenz Rodríguez

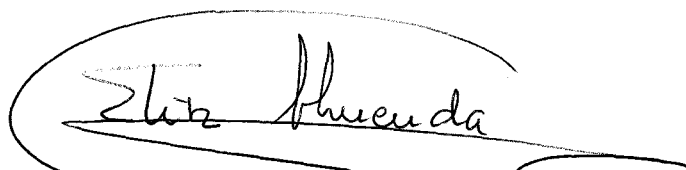
M^a Dolores García Giménez

ELISA MARHUENDA REQUENA, Catedrática de Farmacodinamia y Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral titulada "Estudio Fitofarmacológico de Viscum cruciatum Sieber parásito de Crataegus monogyna Jacq" ha sido dirigida por las Doctoras M^a Teresa Sáenz Rodríguez y M^a Dolores García Giménez y realizada en los Laboratorios de Farmacognosia y Farmacodinamia de esta Facultad, cumpliendo todos los requisitos para este tipo de trabajo.

y para que conste, firmo el presente.

En Sevilla, a 19 de Mayo de 1995.


Fdo. Elisa Marhuenda Requena

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera me han ayudado a concluir este trabajo.

A la Dra. Dña. Elisa Marhuenda Requena, por su acogida en este Departamento, y por su continuo interés y constante apoyo durante la realización de este trabajo.

A mis directoras de Tesis, Dra. Dña. M^a Teresa Sáenz Rodríguez y Dra. Dña. M^a Dolores García Giménez, por su amistad, dirección y apoyo.

Al Dr. D. Luis Bravo Díaz, por su estímulo constante en los momentos difíciles.

A todas las compañeras del Departamento por su colaboración, en especial a M^a Angeles y Rocío por su amistad y ayuda.

Al Departamento de Biología Vegetal y especialmente al Dr. D. Santiago Silvestre Domingo.

Al Instituto de la Grasa, muy especialmente al Dr. D. Arturo Cert Ventulá, por su colaboración y ayuda en la interpretación y realización de espectros.

Al Servicio de Espectroscopía de la Universidad de Sevilla y en especial al Dr. D. Antonio Gil Serrano, por su colaboración.

Al Departamento de Microbiología y Virología de la Facultad de Medicina, por su colaboración.

A Jose Antonio por su comprensión y ayuda en todo momento.

A M^a Carmen y Gerardo por su ayuda y paciencia.

A Jose Antonio

SUMARIO

| | |
|--|-----------|
| I. OBJETO..... | 1 |
| II. REVISION BIBLIOGRAFICA..... | 3 |
| II.1. <u>TRITERPENOS Y ESTEROIDES</u>..... | 4 |
| II.1.1. DISTRIBUCION EN LA NATURALEZA..... | 4 |
| II.1.2. RUTAS BIOSINTETICAS..... | 20 |
| II.1.3. IMPORTANCIA EN LOS VEGETALES..... | 27 |
| II.1.4. ACCIONES FARMACOLOGICAS Y EMPLEOS TERAPEUTICOS..... | 31 |
| II.2. <u>INFLAMACION</u>..... | 39 |
| II.2.1. ASPECTOS FARMACOLOGICOS..... | 39 |
| II.2.2. ACCION ANTIINFLAMATORIA DE ESTEROIDES CORTICALES..... | 42 |
| III. PARTE EXPERIMENTAL..... | 49 |
| III.1. <u>MUESTRA</u> | 50 |
| III.1.1. RECOLECCION Y PREPARACION..... | 50 |
| III.2. <u>ESTUDIO FITOQUIMICO</u>..... | 51 |
| III.2.1. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS A ESTUDIAR..... | 51 |
| III.2.2. TECNICAS CROMATOGRAFICAS..... | 54 |
| III.2.2.1. <u>CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA</u>..... | 54 |

| | |
|--|----|
| III.2.2.2. <u>CROMATOGRAFIA EN COLUMNA</u> | 55 |
| III.2.3. <u>TECNICAS INSTRUMENTALES</u> | 57 |
| III.2.4. <u>ESTUDIO DE VISCUM CRUCIATUM SIEBER</u> | 59 |
| III.2.4.1. <u>ESTUDIO DEL PRECIPITADO A₁</u> | 59 |
| III.2.4.1.a. <u>Resultados</u> | 59 |
| III.2.4.1.b. <u>Discusión de resultados</u> | 63 |
| III.2.4.2. <u>ESTUDIO DEL EXTRACTO HEXANOICO H₁</u> | 65 |
| III.2.4.2.a. <u>Identificación del compuesto AH₁</u> | 68 |
| - <u>Resultados</u> | 68 |
| - <u>Discusión de resultados</u> | 72 |
| III.2.4.3.b. <u>Identificación del compuesto BH₁</u> | 74 |
| - <u>Resultados y Discusión de resultados</u> | 74 |
| III.2.4.3.c. <u>Identificación de la fracción CH₁</u> | 75 |
| - <u>Resultados</u> | 77 |
| - <u>Discusión de resultados</u> | 87 |
| III.2.4.3.d. <u>Identificación del compuesto DH₁</u> | 92 |
| - <u>Resultados</u> | 92 |
| - <u>Discusión de resultados</u> | 96 |
| III.2.4.3.e. <u>Identificación del compuesto EH₁</u> | 97 |
| - <u>Resultados y Discusión de resultados</u> | 97 |
| III.2.5. <u>ESTUDIO DE CRATAEGUS MONOGYNA JACQ.</u> | |
| <u>PARASITADO POR VISCUM CRUCIATUM SIEBER</u> | 98 |
| III.2.5.1. <u>ESTUDIO DEL PRECIPITADO A₂</u> | 98 |
| III.2.5.1.a. <u>Resultados</u> | 98 |
| III.2.5.1.b. <u>Discusión de resultados</u> | 98 |

| | |
|--|-----|
| III.2.5.2. ESTUDIO DEL EXTRACTO HEXANOICO H ₂ | 99 |
| III.2.5.2.a. <u>Identificación de la fracción AH₂</u> | 102 |
| - <u>Resultados</u> | 102 |
| - <u>Discusión de resultados</u> | 106 |
| III.2.5.2.b. <u>Identificación del compuesto BH₂</u> | 107 |
| - <u>Resultados y Discusión de resultados</u> | 107 |
| III.2.5.2.c. <u>Identificación del compuesto CH₂</u> | 108 |
| - <u>Resultados y Discusión de resultados</u> | 108 |
| III.2.5.2.d. <u>Identificación del compuesto DH₂</u> | 109 |
| - <u>Resultados y Discusión de resultados</u> | 109 |
| | |
| III.2.6. ESTUDIO DE <u>CRATAEGUS MONOGYNA JACQ. SIN</u> | |
| <u>PARASITAR</u> | 110 |
| | |
| III.2.6.1. <u>ESTUDIO DEL PRECIPITADO A₃</u> | 110 |
| III.2.6.1.a. <u>Resultados y Discusión de resultados</u> | 110 |
| | |
| III.2.6.2. <u>ESTUDIO DEL EXTRACTO HEXANOICO H₃</u> | 111 |
| III.2.6.2.a. <u>Identificación del compuesto AH₃</u> | 114 |
| - <u>Resultados y Discusión de resultados</u> | 114 |
| III.2.6.2.b. <u>Identificación de la fracción BH₃</u> | 115 |
| - <u>Resultados</u> | 115 |
| - <u>Discusión de resultados</u> | 119 |
| III.2.6.2.c. <u>Identificación del compuesto CH₃</u> | 119 |
| - <u>Resultados y Discusión de resultados</u> | 120 |
| III.2.6.2.d. <u>Identificación del compuesto DH₃</u> | 121 |
| - <u>Resultados y Discusión de resultados</u> | 121 |
| | |
| III.2.7. <u>DISCUSION GENERAL DE RESULTADOS</u> | 122 |

| | |
|---|------------|
| III.3. ENSAYOS FARMACOLOGICOS..... | 124 |
| III.3.1. ENSAYOS GENERALES DE TOXICIDAD..... | 124 |
| III.3.1.1. <u>TOXICIDAD AGUDA: DL₅₀</u> | 124 |
| III.3.1.1.a. <u>Resultados</u> | 127 |
| III.3.1.1.b. <u>Discusión de resultados</u> | 129 |
| III.3.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOSTATICA | 130 |
| III.3.2.1. <u>ENSAYOS EN CULTIVOS VEGETALES</u> | 130 |
| III.3.2.1.a. <u>Condiciones generales de la experiencia</u> | 131 |
| III.3.2.1.b. <u>Muestras ensayadas</u> | 136 |
| III.3.2.1.c. <u>Resultados</u> | 137 |
| III.3.2.1.d. <u>Discusión de resultados</u> | 154 |
| III.3.2.2. <u>ENSAYOS EN CULTIVOS DE CELULAS ANIMALES</u> | 155 |
| III.3.2.2.a. <u>Condiciones generales de la experiencia</u> | 155 |
| III.3.2.2.b. <u>Muestras ensayadas</u> | 162 |
| III.3.2.2.c. <u>Resultados</u> | 164 |
| III.3.2.2.d. <u>Discusión de resultados</u> | 169 |
| III.3.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA..... | 170 |
| III.3.3.1. <u>TECNICA DE WINTER</u> | 170 |
| III.3.3.1.a. <u>Condiciones generales de la experiencia</u> | 172 |
| III.3.3.1.b. <u>Muestras y dosis ensayadas</u> | 173 |
| III.3.3.1.c. <u>Resultados</u> | 174 |
| III.3.3.1.d. <u>Discusión de resultados</u> | 179 |

| | |
|--|-----|
| III.3.3.2. <u>TECNICA DE GRISWOLD</u> | 180 |
| III.3.3.2.a. <u>Condiciones generales de la experiencia</u> | 180 |
| III.3.3.2.b. <u>Muestras y dosis ensayadas</u> | 181 |
| III.3.3.2.c. <u>Resultados</u> | 182 |
| III.3.3.2.d. <u>Discusión de resultados</u> | 185 |
| | |
| III.3.3.3. <u>ENSAYO "IN VITRO" DE ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A₂</u> | 186 |
| III.3.3.3.a. <u>Condiciones generales de la experiencia</u> | 186 |
| III.3.3.3.b. <u>Dosis ensayadas y enzimas utilizadas</u> | 190 |
| III.3.3.3.c. <u>Resultados</u> | 191 |
| III.3.3.3.d. <u>Discusión de resultados</u> | 192 |
| | |
| IV. <u>CONCLUSIONES</u> | 193 |
| | |
| V. <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 196 |

I. OBJETO

Desde los tiempos más remotos hasta la actualidad el hombre ha conocido las aplicaciones de las plantas en sus aspectos más diversos, de todos ellos, su utilización terapéutica es la que presenta un mayor interés para el farmacéutico.

Actualmente, como resultado de los modernos procedimientos de aislamiento de principios activos y de experimentación farmacológica, nuevas drogas vegetales encuentran su camino hacia la medicina.

Desde hace algún tiempo en nuestro laboratorio se viene estudiando la especie Viscum cruciatum Sieber, planta parásita que vive sobre diferentes huéspedes, con resultados bastante esperanzadores en el campo de los citostáticos.

En el presente trabajo, nuestro objetivo ha sido continuar nuestras experiencias en este sentido, con el fin de observar la influencia del hospedador Crataegus monogyna Jacq. sobre esta actividad, a la vez que hemos tratado de poner de manifiesto las posibles variaciones fitoquímicas que puedan repercutir de forma directa sobre la acción farmacológica.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1. TRITERPENOS Y ESTEROIDES

II.1.1. DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA

TRITERPENOS

Los terpenos, compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son particularmente abundantes en Gimnospermas, encontrándose no solo en distintos órganos vegetales (p. ej.: agujas de los pinos), sino también formando parte de productos farmacognósticos (oleo-resinas).

En las Coníferas, las principales fuentes de triterpenos descritas durante estos últimos años son las fracciones insolubles en hexano de las oleo-resinas y los extractos de distintas especies de los géneros Abies, Pinus, Picea, y Chamaecyparis. Estructuralmente estos triterpenos se han identificado como lanostanos, cicloartanos y derivados serratanos. (San Feliciano, A. y López, J.L.; 1991).

También en numerosas familias de Angiospermas se han identificado diversos triterpenos (Tabla I).

| FAMILIA | GENERO | ESPECIE | TRITERPENOS AISLADOS | REFERENCIA |
|-----------------|--------------|-----------------------|--|--|
| ANNONACEAE | POLYALTHIA | <u>P. suberosa</u> | Suberosol | (Li, H.Y. y cols.; 1993) |
| APOCYNACEAE | STROPHANTHUS | <u>S. intermedius</u> | Acido Ursólico | (Charlwood, B. V. y cols.; 1991) |
| ARECACEAE | SERENOA | <u>S. repens</u> | Cicloartenol | (Hatinguais, P. y cols.; 1981) |
| ASCLEPIADACEAE | ASCLEPIAS | <u>A. spiralis</u> | Cicloart-27-ene-3 α ,25-diol, cicloeucalenol, 24-Metilen cicloartanol | (Rasool, N. y cols.; 1991) |
| ASTERACEAE | ATRACTYLIS | <u>A. cardus</u> | Ac. Oleanólico, Lupeol | (Sarg, T.M.; 1987) |
| BIGNONIACEAE | JACARANDA | <u>J. decurrens</u> | Ac. Ursólico | (Varanda, E.M. y cols.; 1992) |
| BURSERACEAE | CANARIUM | Canarium sp. | Resina Dammar* | (Poehland, B.L. y cols.; 1987) |
| CARDIZABALACEAE | AKEBIA | <u>A. quinata</u> | Ac Oleanólico, Ac Mesembryanthemoidigenico, Ac. 3 β -Hidroxi-29(30)-al-olean-12-en-28-oico, Derivados del Ac. 30-Norolean-12,20(29)-dien-28-oico | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991) |
| CELASTRACEAE | MAYTENUS | <u>M. buchananii</u> | Ac. Polpunomico, Tingenona, 22 β -Hidroxi-tingenona | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991) |
| | TRIPTERYGIUM | <u>T. wilfordii</u> | Celastrol, Ac. Polpunomico, Ac. Oleanólico, Ac. 3,24-dioxi-fridelan-29-oico | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991) (Zhang, W.J.; 1986) |
| COMPOSITAE | AMBERBOA | <u>A. ramosa</u> | (22R)-Cicloart-25-ene-3 β ,22-diol, Cicloartanol, cicloart-23-ene-3 β ,25-diol. | (Akhtar, N. y cols.; 1993) |
| CUCURBITACEAE | CUCURBITA | <u>C. maxima</u> | α -Amirina, β -Amirina, Cicloartenol, 24-Metilemcicloartenol | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991) |

(*) Dammaradienol, Dammarenediol-II, Hidroxidammarenone-I, Ac. Ursónico, Hidroxihopanone, Ac. Dammarenólico, Ac. Shoerico, Ac. Eichlerianico, Lactona Hidroxioleanonica

Tabla I: Triterpenos aislados en diferentes familias de Angiospermas.

| FAMILIA | GENERO | ESPECIE | TRITERPENOS AISLADOS | REFERENCIA |
|------------------|----------------|----------------------|---|--|
| | TRICHOSANTHES | <u>T. kirilowii</u> | Cicloartenol, 24-Metilencicloartenol | (Charlwood, B.V.; 1991). |
| | LUFFA | <u>L. cylindrica</u> | Ac. Brionólico, Glicósido del Ac. Oleanólico. | (Tabata, M. y cols.; 1993). |
| | BRYONIA | <u>B. dioica</u> | Ac. Brionólico. | (Tabata, M. y cols.; 1993). |
| | CUCUMIS | <u>C. sativus</u> | Ac. Brionólico. | (Tabata, M. y cols.; 1993). |
| | | <u>C. melo</u> | Ac. Brionólico. | (Tabata, M. y cols.; 1993). |
| | CITRULLUS | <u>C. lanatus</u> | Ac. Brionólico. | (Tabata, M. y cols.; 1993). |
| | BENINCASA | <u>B. cerifera</u> | Ac. Brionólico. | (Tabata, M. y cols.; 1993). |
| | LEGENDARIA | <u>L. siceraria</u> | Ac. Brionólico. | (Tabata, M. y cols.; 1993). |
| CHENOPODIACEAE | CHENOPODIUM | <u>C. quinoa</u> | Ac. Oleanólico. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| DIPTEROCARPACEAE | HOPES | Hopes sp. | Resina Dammar* | (Poehland, B.L. y cols.; 1987). |
| | SHOREA | Shorea sp. | Resina Dammar* | (Poehland, B.L. y cols.; 1987). |
| | BALANOCARPUS | Balanocarpus sp. | Resina Dammar* | (Poehland, B.L. y cols.; 1987). |
| | VATERIA | Vateria sp. | Resina Dammar* | (Poehland, B.L. y cols.; 1987). |
| ERICACEAE | ARCTOSTAPHYLOS | <u>A. uva-ursi</u> | Ac. Ursólico, Uvaol, α -Amirina, Ac. Oleanólico, β -Amirina, Lupeol, Ac. Betulínico. | (Proliac, A.; 1980); (Jahodar, L. y cols.; 1988) |
| ESCROFULARIACEAE | DIGITALIS | <u>D. purpúrea</u> | Cicloartenol, 24-Metilencicloartenol. | (Evans, F.J.; 1973). |
| EUPHORBIACEAE | EUPHORBIA | <u>E. millii</u> | Cicloartenol, Acetato β -Amirina, lupeol, Eufol. | (Pancorbo, S. y cols.; 1972). |

(*) Dammaradienol, Dammarenediol-II, Hidroxidammarenone-I, Ac. Ursónico, Hidroxihoponone, Ac. Dammarenólico, Ac. Shoerico, Ac. Eichlerianico, Lactona Hidroxioleanonica

Tabla I (continuación): Triterpenos aislados de diferentes familias de Angiospermas.

| FAMILIA | GENERO | ESPECIE | TRITERPENOS AISLADOS | REFERENCIA |
|--------------|------------|------------------------|---|---|
| EUPTELEACEAE | EUPTELECEA | <u>E. tirucalli</u> | Eufol, Tirucallol. | (Charlwood, B.V. y colbs.; 1991). |
| | | <u>E. nivulia</u> | Cicloart-25-en-3 β -ol, Ciclolaudenol, Cicloartenol, Cicloeucalenol, Cicloart-25-en-3 β ,24 (α 6 β)-diol. | (Satyanarayana, V. y colbs.; 1992). |
| | | <u>E. clarkeana</u> | Cicloartanol, Cicloart-23-ene-3 β ,25-diol, Cicloarclarkeanol. | (Ayatollahi, S.A.M. y colbs.; 1992). |
| | | <u>E. mellifera</u> | Taraxerone, Moretenone, Cicloartenol, 24-Metilencicloartenol. | (Ferreira y colbs.; 1993). |
| | | <u>E. polyandra</u> | Ac. Oleanólico, Ac. 3-O-Acetiloleanólico, 3-O-Acetilertirodiol, Ac. Maslfnico, 1,3-Dioxoolean-12-ene, Acetato del Ac. Oleanólico, dos derivados del grupo Lupano. | (Konoshima y colbs.; 1987). |
| LABIATAE | SALVIA | <u>S. canariensis</u> | Escualeno, Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico, Ac. α -Hidroxiursólico. | (Luis, G.L.; 1991). |
| | | <u>S. tomentosa</u> | Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico, Ac. Crataególico, Ac. 2 β ,3 β -dihidroiolean-5,12-dien-28-oico, Ac. 2 β ,3 β ,18-trihidroiolean-12-en-28-oico. | (Ulubelen, A. y colbs.; 1984); (Ulubelen, A. y colbs.; 1992). |
| | | <u>S. pomifera</u> | Ac Oleanólico, α -Amirina, Lupeol, Ac. Metilesteroleanólico, Taraxasterol. | (Ulubelen, A. y colbs.; 1992). |
| | | <u>S. verticillata</u> | Ac. Ursólico, Ac. Crataególico, Ac. Oleanólico, Ac. Vergático, Ac. Betulfnico. | (Ulubelen, A. y colbs.; 1984). |
| | | <u>S. virgata</u> | Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico, Ac. Vergático. | (Ulubelen, A. y colbs.; 1984). |
| | | <u>S. pinnata</u> | Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico, Ac. Vergático. | (Ulubelen, A. y colbs.; 1984). |

Tabla I (continuación): Triterpenos aislados en diferentes familias de Angiospermas.

| FAMILIA | GENERO | ESPECIE | TRITERPENOS AISLADOS | REFERENCIAS |
|-------------|-------------|-----------------------|---|-----------------------------------|
| | | <u>S. officinalis</u> | Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico, Ac. Crataególico. | (Ulubelen, A. y colbs.; 1984). |
| | | <u>S. triloba</u> | Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico, Ac. Betulínico. | (Ulubelen, A. y colbs.; 1984). |
| | RABDOSIA | <u>R. japonica</u> | Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico. | (Charlwood, B.V. y colbs.; 1991). |
| | PERILLA | <u>P. frutescens</u> | Ac. Ursólico. | (Charlwood, B.V. y colbs.; 1991). |
| | PRUNELLA | <u>P. vulgaris</u> | Ac. Oleanólico, Ac. Ursólico, Metil-3-O-Acetilursolato, Metil-3-O-Propionilursolato, Metil-3-O-Senecioilursolato. | (Lee, K.H. y colbs.; 1988). |
| | HYPTIS | <u>H. capitata</u> | Metil-3-O-Myristoilursolato. | (Lee, K.H. y colbs.; 1988). |
| | GLECHOMA | <u>G. hederaceae</u> | Ac. Oleanólico, Ac Ursólico. | (Konoshima, T. y colbs.; 1987). |
| LEGUMINOSAE | GLYCYRRHIZA | <u>G. glabra</u> | Ac. Betulínico, β -Amirina, Lupeol. | (Charlwood, B.V. y colbs.; 1991). |

Tabla I (continuación): Triterpenos aislados en diferentes familias de Angiospermas.

| FAMILIA | GENERO | ESPECIE | TRITERPENOS AISLADOS | REFERENCIAS |
|---------------|-------------|----------------------|--|--|
| MELIACEAE | SANDORICUM | <u>S. koetjape</u> | Ac. Koetjapico, Ac. 3-oxo-olean-12-en-29-oico, Ac. Katónico. | (Kaneda, N.; 1992). |
| MYRTACEAE | EUCALYPTUS | <u>E. perriniana</u> | Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico, Ac. Maslínico, Ac. 2 α -hidroxiursólico, Hederagenina, Ac. 23-Hidroxiursólico, Ac. Arjunólico, Ac. Asiático. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| PAEONIACEAE | PAEONIA | <u>P. japonica</u> | Ac. Oleanólico, Hederagenina, Ac. Betulínico, 24-Cicloartanol, 30-Norhederagenina, Ac. 23-Hidroxibetulínico. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| RANUNCULACEAE | DELPHINIUM | <u>D. ajacis</u> | Cicloartenol, 24-Metilencicloartenol. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| RHAMNACEAE | COLUBRINA | <u>C. texensis</u> | Ac. 2 β -formil-3 α -hidroxi-nor-lup-20(29)-en-28-oico. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| ROSACEAE | CRATAEGUS | <u>C. monogyna</u> | Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico, Ac. Crataególico. | (Bezanguer-Beauquesne, L. y cols.; 1990) |
| | ERIOBOTRYA | <u>E. japonica</u> | Ac. 23-Trans-p-coumaroil tormentico, Ac. 23-Cis-p-coumaroil tormentico, Ac. 3-O-trans-p-caffeoil tormentico, Ac. 3-O-trans-p-coumaroil rotundico, Ac. 2 α ,3 α ,19 α -Trihidroxiurs-12-en-28-oico, Ac. 3 β ,6 β ,19 α -Trihidroxiurs-12-en-28-oico, Ac. 2 β ,3 β ,19 α ,23-Tetrahidroxiurs-12-en-28-oico. | (De Tommasi, N. y cols.; 1992). |
| | COWANIA | <u>C. mexicana</u> | Dammarenediol-II. | (Poehland, B.L. y cols.; 1987). |
| | GIEROCARPUS | <u>G. intricatus</u> | Isofouquierol | (Poehland, B.L. y cols.; 1987) |
| RUBIACEAE | PSYCHOTRIA | <u>P. serpens</u> | Ac. Ursólico, Metil-3-O-myristoil-ursolato. | (Lee, K.H. y cols.; 1988). |
| | UNCARIA | <u>U. tomentosa</u> | Ac. Ursólico, Ac. Oleanólico, 3 β ,6 β ,19 α -Trihidroxiurs-12-ene-23,28-dimetilato. | (Aquino, R. y cols.; 1991). |

Tabla I (continuación): Triterpenos aislados de diferentes familias de Angiospermas.

| FAMILIA | GENERO | ESPECIE | TRITERPENOS AISLADOS | REFERENCIAS |
|---------------|-----------|-----------------------------|---|---|
| RUTACEAE | CITRUS | <u>C. paradisi</u> | Limonin, monolactona de Limonato A-ring | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| | | <u>C. sinensis</u> | Limonin, monolactona de Limonato A-ring. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| SIMAROUBACEAE | ALIANTHUS | <u>A. altissima</u> | Nortriterpenos tetracíclicos. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| | | | Alianthona. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| SOLANACEAE | SOLANUM | <u>S. auiculare</u> | Ac. Betulínico. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| | | <u>S. dulcamara</u> | Cicloartenol, Cicloartanol, 24-Dihidrolanosterol, 24-Metilencicloartanol. | (Charlwood, B.V. y cols.; 1991). |
| VERBENACEAE | VITEX | <u>V. negundo</u> | Ac. 3 β -acetoxiolean-12-en-27-oico, Ac. 2 α ,3 α -dihidroxiolean-5,12-dien-28-oico, Ac. 2 β ,3 α -diacetoxiolean-5,12-dien-28-oico, Ac. 2 α ,3 β -diacetoxi-18-hidroxiolean-5,12-dien-28-oico. | (Chawla, A.S. y cols.; 1992). |
| VISCACEAE | VISCUM | <u>V. album</u> | Acetato de β -Amirina, Ac. Oleanólico, Ac. Betulínico. Ac. Ursólico, β -Amirina. | (Fukunaga, T. y cols.; 1987) (Delaveau, P.; 1980). |
| | | <u>V. cruciatum</u> | Acetato β -Amirina. | (Agudo, M.A.; 1989). |
| | | <u>V. liquidambaricolum</u> | β -Amirina. | (Chen, Ch.-S.; 1973). |
| | | <u>V. multinerve</u> | Acetato de β -Amirina | (Lin, J.-H.; 1979). |

Tabla I (continuación): Triterpenos aislados en diferentes familias de Angiospermas.

En algunas algas marinas, han sido identificados compuestos de naturaleza triterpénica.

En la familia Euphyaceae, subfamilia Clorofita, han sido aislados algunos triterpenos. En Caulerpa prolifera una serie derivada del escualeno, y tres triterpenos relacionados con el nor-cicloartano en Tydemania expeditionitis. (de Rosa, S.; 1991).

En la subfamilia Rhodophyta se han aislado algunos compuestos de este tipo en distintas especies del género Laurencia, siendo los más simples los 10-11-epóxidos del escualeno aislados de L. okamuri (de Rosa, S.; 1991).

ESTEROLES

Los esteroides, compuestos íntimamente identificados con los triterpenos según diversos autores, han sido aislados de numerosas familias botánicas (Tabla II).

Otros esteroides han sido aislados de diferentes hongos, especialmente en la familia Tricholomataceae, identificándose en la especie Hypsizigus marmoreus el Ergosterol y Ergosterol peróxido (Yasukawa, K. y cols.; 1994), y en la especie Polyporus versicolor, el 5α Ergosta-7,22- dien- $3\beta,5,6\beta$ -triol (Cerevisterol) y el 5α Ergosta-7,22-dien- $3\beta,5,6\beta,9\alpha$ -tetraol (Iorizzi, M. y cols.; 1988).

| FAMILIA | GENERO | ESPECIE | ESTEROLES AISLADOS | REFERENCIA |
|------------------|----------------|------------------------|--|---|
| ARECACEAE | SERENOA | <u>S. repens</u> | β -Sitosterol, Campesterol, Estigmasterol, Hexacosanol, Octacosanol, Triacontanol. | (Hatinguais, P. y cols.; 1981). |
| ASTERACEAE | ATRACTYLIS | <u>A. carduus</u> | β -Sitosterol, Estigmasterol. | (Sarg, T.M.; 1987). |
| CUCURBITACEAE | LUFFA | <u>L. cylindrica</u> | Δ^{25} -Esteroles. | (Goad, L.J.; 1991). |
| ERICACEAE | ARCTOSTAPHYLOS | <u>A. uva-ursi</u> | α -Spinasterol. | (Tabata, M. y cols.; 1993). |
| ESCROFULARIACEAE | DIGITALIS | <u>D. purpurea</u> | β -Sitosterol. | (Proliac, A.; 1980); (Jahodar, L. y cols.; 1988). |
| | | | Cicloecalanol, Obtusifoliol, 24-Metilenlofenol, 24-Etilenlofenol, Colesterol, Campesterol, Estigmasterol, Sitosterol, Isofucosterol, 24-Metilencolesterol. | (Evans, F.J.; 1973). |
| | | | Heterósidos cardiotónicos con genina esteroídica. | (Bruneton, J.; 1993). |
| EUPHORBIACEAE | EUPHORBIA | <u>E. millii</u> | β -Sitosterol. | (Pancorbo, S. y cols.; 1972). |
| | | <u>E. nivulia</u> | Sitosterol. | (Satyanarayana, V. y cols.; 1992). |
| | | <u>E. mellifera</u> | Lanosterol, Butirospermol, β -Sitosterol. | (Ferreira y cols.; 1993). |
| GRAMINAE | | | Campesterol, Sitosterol, Estigmasterol. | (Goad, L.J.; 1991). |
| LABIATAE | SALVIA | <u>S. pomifera</u> | β -Sitosterol. | (Ulubelen, A. y cols.; 1992). |
| | | <u>S. verticillata</u> | β -Sitosterol, Sitosterol β -D-glucósido. | (Ulubelen, A. y cols.; 1984). |

Tabla II: Esteroles aislados en diferentes familias botánicas.

| FAMILIA | GENERO | ESPECIE | ESTEROLES AISLADOS | REFERENCIA |
|-------------|-----------|-----------------------------|---|------------------------------------|
| LOGANIACEAE | GELSEMIUM | | 12- β -hidroxi-5 α -Pregn-16-en-3,20-diona, 12- β -hidroxi-Pregna-4,16-dien-3,20-diona. | (Schun, H. y colbs.; 1987). |
| SOLANACEAE | SOLANUM | <u>S. scorpioideum</u> | (25R)-6-hidroxi-5-Spirostan-3-on, (25S)-6-hidroxi-5-Spirostan-3-on, Clorogenina, Neoclorogenina. | (Usubillaga, A.N. y colbs.; 1987). |
| URTICACEAE | URTICA | <u>Urtica dioica</u> | Sitosterol, Sitosterol β -D-glucósido, 7 β -Hidroxisitosterol, 7 α -Hidroxisitosterol, (6'-O-palmitoil)-Sitosterol-3-O- β -D-glucósido, 7 β -Hidroxisitosterol- β -D-glucósido, 7 α -Hidroxisitosterol- β -D-glucósido, (28R)-etil-5 α -Colestano-3 β ,6 α -diol. | (Chaurasia, N. y colbs.; 1987). |
| VERBENACEAE | | | Δ^{25} -Esteroles | (Goad, L.J.; 1991). |
| VISCACEAE | VISCUM | <u>V. album</u> | Fitosteroles, Fitosterol- β -D-glucósido. | (Fukunaga, T. y colbs.; 1987). |
| | | <u>V. liquidambaricolum</u> | β -Sitosterol | (Chen, Ch-S.; 1973). |

Tabla II (continuación): Esteroles aislados de diferentes familias botánicas.

En invertebrados marinos, los esteroides polihidroxiados son metabolitos bastante comunes y durante estos últimos años se les ha prestado mucha atención, poniéndose de manifiesto en:

-Esponjas marinas:

Familia Dysideidae (Orden DICTYOCERATIDA). En la especie Spongiella gracilis se han aislado $3\beta,6\alpha$ -dihidroxiesteroides y $3\beta,5\alpha,6\beta$ - trihidroxiesteroides (Piccialli, V. y cols.; 1987). Los $3\beta,6\alpha$ -dihidroxiesteroides han sido identificados por Madaio y cols. en 1989 como:

(22E)-24-Nor- 5α -colesta-7,22-dien- $3\beta,6\alpha$ -diol.

(22E)-27-Nor-24-metil- 5α -colesta-7,22-dien- $3\beta,6\alpha$ -diol.

(22E)- 5α -Colesta-7,22-dien- $3\beta,6\alpha$ -diol.

(22E,24R)-24-Metil- 5α -colesta-7,22-dien- $3\beta,6\alpha$ -diol.

(24S)-24-Etil- 5α -colest-7-en- $3\beta,6\alpha$ -diol.

(24R)-24-Etil- 5α -colest-7-en- $3\beta,6\alpha$ -diol.

24-Keto- 5α -colesta-7,25(26)-dien- $3\beta,6\alpha$ -diol.

(22E)- 5α -colesta-7,9(11),22-trien- $3\beta,6\alpha$ -diol.

Familia Hymedesmidae; especie Stylopus australis. Se ha aislado un esteroide sulfato, el $3\beta,4\beta$ -Dihidroxi-pregn-5-en-20-ona-3-sulfato (Prinsep, M.R. y cols.; 1989).

Familia Spongiidae. En la especie Hippospongia communis se han aislado 3 β ,5 α ,6 β esteroides trihidroxilados (Madaio, A. y cols.; 1989) que han sido identificados como:

(24S)-24-Metil-5 α -colest-7-en-3 β ,5,6 β -triol.

(24R)-24-Metil-5 α -colest-7-en-3 β ,5,6 β -triol.

(24Z)-24-Etil-5 α -colest-7,24(28)-dien-3 β ,5,6 β -triol.

(24E)-24-Etil-5 α -colest-7,24(28)-dien-3 β ,5,6 β -triol.

En Spongia officinalis se han aislado 3 β ,5 α ,6 β -esteroides trihidroxilados (Madaio, A. y cols.; 1989) y también esteroides tetrahidroxilados identificados como:

5 α -Colest-7-en-3 β ,5,6 β ,9-tetraol.

(22E)-5 α -Colest-7,22-dien-3 β ,5,6 β ,9-tetraol.

(22E,24S)-24-Metil-5 α -colest-7,22-dien-3 β ,5,6 β ,9-tetraol.

24-Metil-5 α -colest-7-en-3 β ,5,6 β ,9-tetraol.

(24S)-24-Etil-5 α -colest-7-en-3 β ,5,6 β ,9-tetraol.

(24R)-24-Etil-5 α -colest-7-en-3 β ,5,6 β ,9-tetraol.

(Migliuolo, A. y cols.; 1990).

Familia Thorectidae. En la especie Ircina variabilis se han aislado 3 β ,5 α ,6 β -esteroides trihidroxilados (Madaio, A. y cols.; 1989).

Familia Oscarellidae. En la especie Oscarella lobularis se han aislado:

5 α ,6 β -Epoxicolest-9(14)-en-3 β -ol-7-on.

5 α ,6 α -Epoxi-24-metilcolesta-9(14),22E-dien-3 β -ol-7-on.

(Aiello, A. y colbs.; 1990).

-Estrellas de mar

En la especie Sphaerodiscus placenta se han aislado esteroides glicósidos: Halitilósido E, 22-Dehidrohalitilósido E, 22-Dehidrohalitilósido D, Halitilósido B, Halitilósido A y Placentósido. También han sido aislados esteroides polihidroxilados (Zollo, F.; 1987) identificados como:

(25S)-5 α -Colestano-3 β ,6 β ,8,15 α ,16 β ,26-hexol.

(25R)-24-Metil-5 α -colest-24(28)-en-3 β ,6 β ,15 α ,16 β ,26-pentol.

(25R)-24-Metil-5 α -colest-24(28)-en-3 β ,6 β ,8,15 α ,16 β ,26-hexol.

En la especie Protoreaster nodosus, Cuidia maculata y Coscinasterias tenuispinas también fue aislado el (25S)-5 α -Colestano-3 β ,6 β ,8,15 α ,16 β ,26-hexol (Zollo, F. y colbs.; 1987).

En Poraster superbus se ha aislado el (25R)-24-Metil-5 α -colest-24(28)-en-3 β ,6 β ,8,15 α ,16 β ,26-hexol (Zollo, F. y colbs.; 1987).

En Halityle regularis se han aislado los Halitilósidos A,B y E (Zollo, F. y colbs.; 1987).

En Coscinasterias tenuispina también se ha aislado un esteroide glicósido al que se ha denominado Coscinasterósido D (Zollo, F. y colbs.; 1987).

- Hidras de mar

En hidras pertenecientes a la familia Eudendriadae, especie Eudendrium glomeratum, se han aislado e identificado:

Colest-5-en-2 α ,3 α ,16 β ,18-tetrol-2,16,18-triacetato.

Colest-5-en-3 α ,7 β ,15 β ,18-tetrol-7,15,18-triacetato.

(Aiello, A. y colbs.; 1987).

- Gorgonias

En la Familia Gorgonaceae, especie Isis hippuris, se aisló un esteroil polihidroxiado al que se le dió el nombre de Gorgostano-1 α ,3 β ,5 α ,6 β ,11 α -pentaol (Rao, CH.B. y colbs.; 1988).

- Moluscos

Clase Bivalba, especie Patinopecten yessoensis, se han aislado 7 esteroides polihidroxilados (Iorizzi, M. y cols.; 1988) identificados como:

Colesta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol.

24-Metilcolest-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol.

(22R)-24-Metilcolest-7,22E-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol.

Colest-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol.

(24S)-24-Metilcolest-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol.

24-Etilcolest-7,22E-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol.

24-Etilcolest-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol.

24-Etilcolest-7-en-3 β ,5 α ,6 β ,9 α -tetraol.

- Coral blando

Dos nuevos esteroides, Numersterol A y B, han sido aislados en el Sur de China del coral blando Sinularia numerosa (Alcyoniidae):

24-Metilencolestan-1 α ,3 β ,5 α ,6 β -tetrol (Numersterol A).

24-Metilen-22-homocolestan-1 β ,3 β ,5 α -triol (Numersterol B).

(Su, J. y cols.; 1989).

- Pluma de mar

En la familia Pennatulidae, especie Pteroides esperi, ha sido aislado otro esteroide polihidroxiado identificado como Colesta-3 β ,5 α ,6 β -triole por Datta y cols. en 1990.

II.1.2. RUTAS BIOSINTÉTICAS

Los terpenos y esteroides elaborados a partir de los mismos precursores, constituyen un amplio capítulo de metabolitos secundarios de los vegetales.

Todos los terpenos tienen algo especial en común, se puede considerar que se forman por el acoplamiento de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas, derivadas del 2-metilbutadieno.

Las estructuras esteroídicas parecen no obedecer a la regla isoprénica. Una serie de degradaciones y de recombinaciones de un esqueleto triterpénico originan estas anomalías aparentes.

La existencia de los terpenos y esteroides está condicionada por tres secuencias reaccionales fundamentales:

- Formación del isopreno activo a partir del acetato via ácido mevalónico.
- Acoplamiento "cabeza-cola" de las unidades de C_5 , que justifica la existencia de mono, sesqui, di, sester y politerpenos.
- Acoplamiento "cola-cola" de las unidades de C_{15} o C_{20} , que justifica la existencia de triterpenos, esteroides y carotenos.

En general los triterpenos y esteroides son compuestos de 30 átomos de

carbono, procedentes de la ciclación del escualeno. Los triterpenos poseen una estructura siempre policíclica, normalmente tetra o pentacíclica, casi siempre hidroxilados en 3, y al contrario de los demás terpenos, presentan una unidad estructural bastante fuerte.

No existe una diferencia fundamental entre triterpenos y esteroides, considerándose estos últimos triterpenos tetracíclicos que han perdido como mínimo tres metilos. Biogénicamente, las dos series tienen un precursor común, la diferenciación se realiza precozmente en función de impedimentos estéricos impuestos por un enzima.

El escualeno forma un epóxido en una de sus extremidades con el oxígeno del aire. La existencia de un hidroxilo en posición 3, constante en los esteroides y raramente ausente en los triterpenos, permite suponer que la ciclación se inicia por la ruptura ácido-catalasa de un oxirano. La ruptura del oxirano ocasiona la ciclación. De esta conformación inicial del 2,3-epóxido escualeno sobre la superficie del enzima, depende la orientación de la biosíntesis hacia esteroides y triterpenos tetracíclicos por una parte, y hacia triterpenos pentacíclicos por otra:

1. Cuando el precursor se mantiene sobre la zona activa del enzima en una conformación "silla-barco-silla-barco", se forma un carbocatión Protostano, precursor de los esteroides y triterpenos tetracíclicos.

2. Una conformación inicial "silla-silla-silla-barco" dará lugar al carbocación Dammarano, que puede o no sufrir una ciclación suplementaria con la formación de triterpenos pentacíclicos (Fig. 1).

Las directrices que deben conducir a la elaboración de los principales esqueletos triterpénicos se esquematizan en la figura 2. Algunas de estas secuencias son todavía hipotéticas.

Las modificaciones secundarias de los triterpenos son bastante limitadas, siendo las más usuales: hidroxilaciones suplementarias, insaturaciones, funcionalización de los metilos angulares y lactonización (Bruneton, J.; 1993).

Los esteroides típicos de las plantas superiores, tales como Campesterol, Sitosterol, Estigmasterol y Espinasterol, tienen un grupo alquilo normalmente metilo o etilo localizado en el C₂₄ de la cadena lateral. Se ha confirmado que de este grupo deriva la S-adenosil-metionina tras varios mecanismos de transmetilación.

Otra característica de la biosíntesis de fitosteroides es la producción de Cicloartenol como producto de la ciclación del escualeno-2,3-óxido en organismos fotosintéticos. Esta ciclación se produce mediante una alquilación del carbono 9 por el metilo en 18. En los seres no fotosintéticos, la pérdida de un protón en 9 origina Lanosterol.

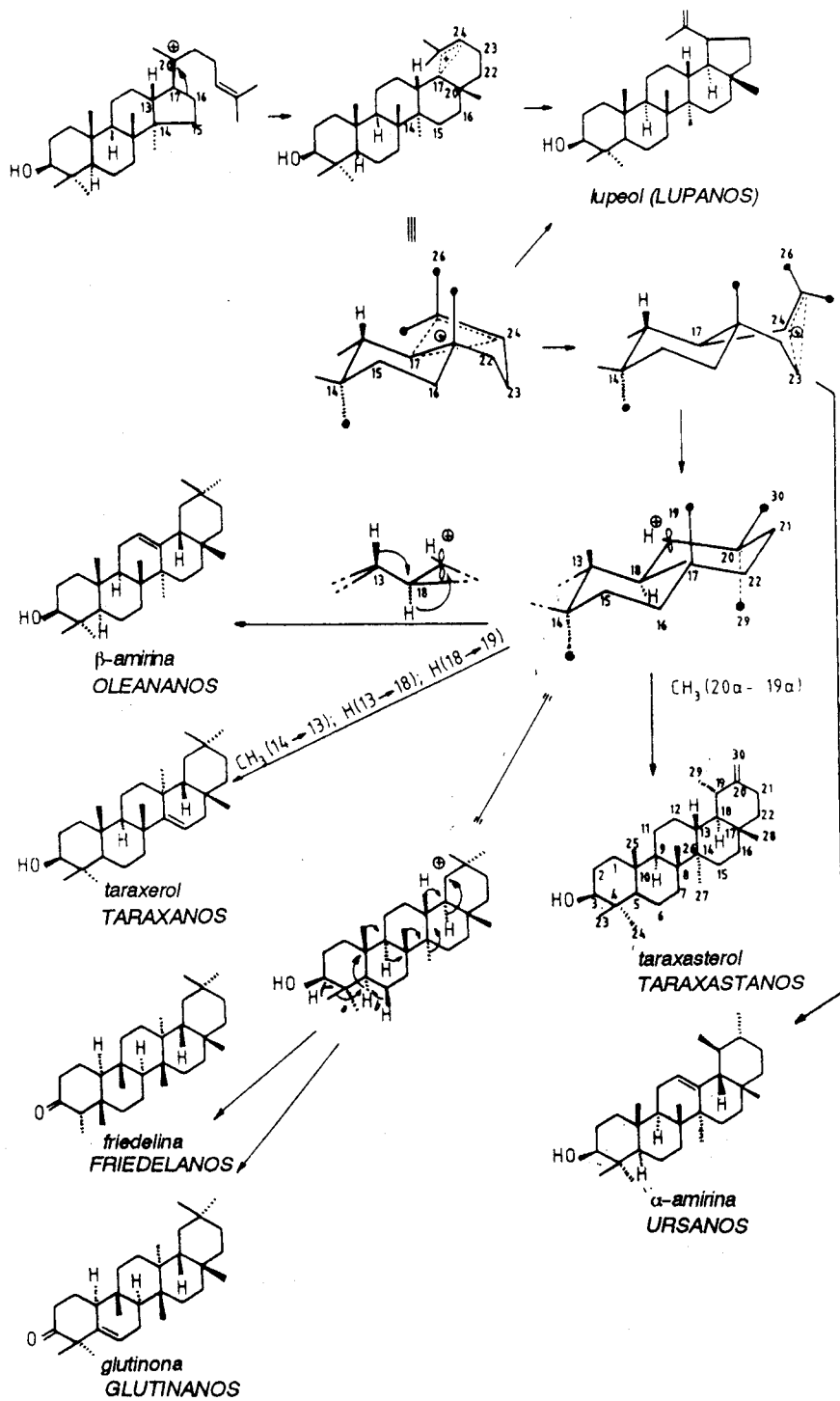


Fig. 2

El paso de triterpeno de C₃₀ (Lanosterol o Cicloartenol) al esqueleto esteroídico básico de C₂₇ implica una desmetilación progresiva en 4 y 14, reducción del doble enlace en 24, apertura del ciclopropano (en el Cicloartenol) y migración del doble enlace de la posición 8,9 (en el Lanosterol) a la posición 5,6.

La cadena lateral puede ser acortada, lo mismo que funcionalizada y ciclada, o poseer uno o dos carbonos suplementarios en forma de un grupo metilo o etilo fijado en C₂₄ (fitosteroles).

Los cambios que puede sufrir el Cicloartenol para su bioconversión a esteroides de plantas superiores se muestra en la figura 3. Esta ruta ha sido bastante discutida, pero deberíamos tener en cuenta que las secuencias de alquilación en las cadenas laterales y modificaciones del anillo por pérdida de grupos metilos en los C₄ y C₁₄ y por consiguiente los cambios del doble enlace, pudieran justificar la gran variedad de nuevos fitosteroides identificados en diferentes familias de plantas (Goad, L.J.; 1991) y (Bruneton, J.; 1993).

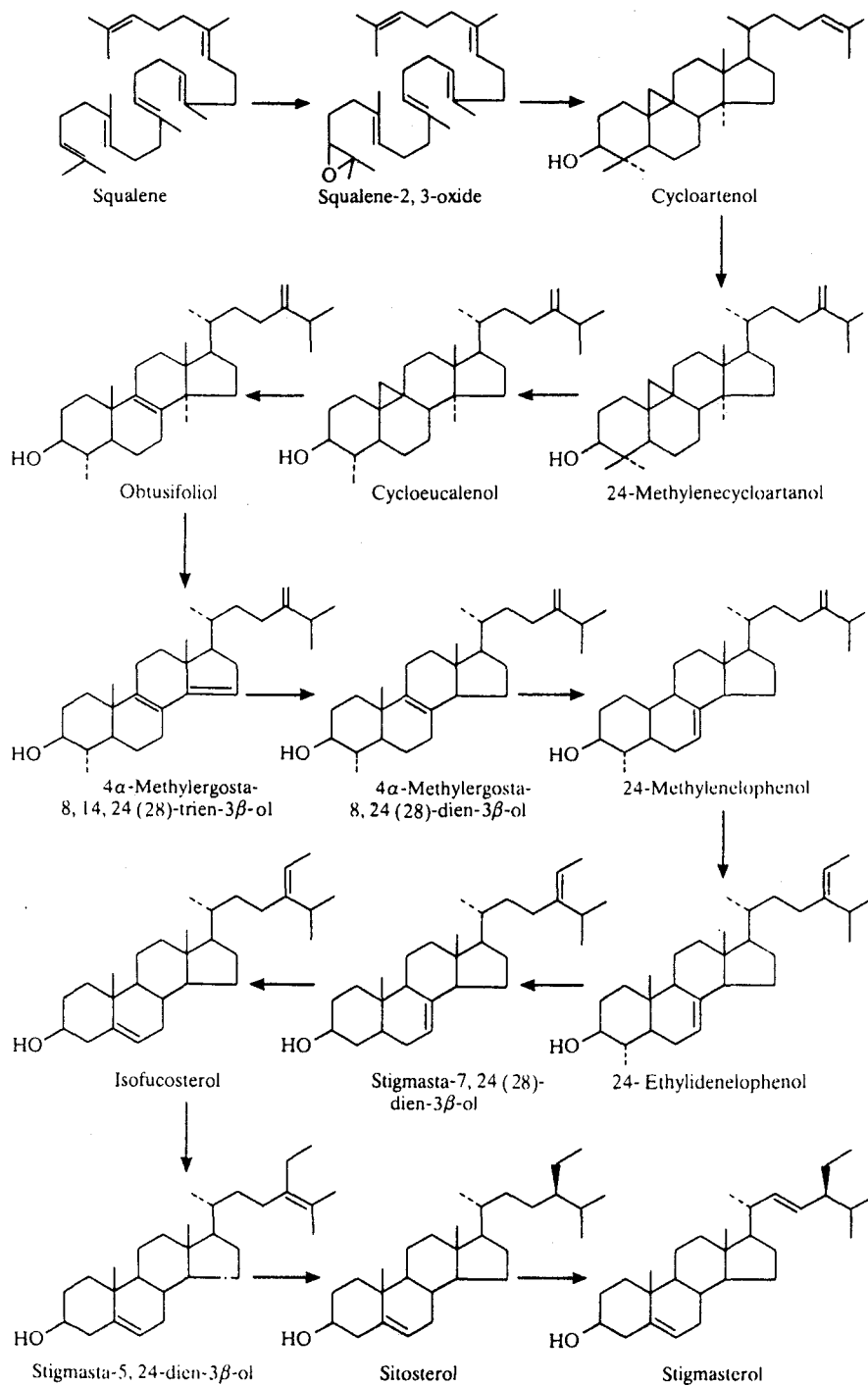


Fig. 3

II.1.2. IMPORTANCIA EN LOS VEGETALES.

Las plantas con terpenos presentan una enorme diversidad estructural y funcional, lo cual es bastante notable considerando que ellas poseen un origen biosintético común a partir de precursores isopentenilos, y que la mayoría de ellos son sustancias lipofílicas.

Poseen diferentes funciones en las plantas que van, desde la regulación del crecimiento actuando como pigmentos accesorios en la fotosíntesis, hasta su participación en la polinización, y además proporcionan a los vegetales una efectiva defensa contra herbívoros.

Algunos terpenos actúan en las plantas protegiéndolas de la invasión de agentes patógenos. Estas sustancias son conocidas como **fitoalexinas**. Recientemente se ha descubierto que triterpenos como el Ac. Ursólico y Ac. Oleanólico, producidos por Tabernaemontana divaricata, actúan como fitoalexinas. Estas fitoalexinas se acumulan en las células de cultivos celulares de T. divaricata que han sido tratadas con una preparación de Candida albicans. Los compuestos mayoritarios que se acumularon tras el tratamiento fueron el Ac. Ursólico y el Ac. Oleanólico, dos monohidroxi derivados de cada una de estos ácidos y dos dihidroxiderivados del Ac. 3-epi-isoflavónico. En las preparaciones de células libres, tras una inducción efectiva catalizada a las 12 y 24 horas se obtuvieron Escualeno, Escualeno-2,3-óxido, y β -Amirina, Uvaol, Oleanol, Uvaal y Oleanal en adición a los compuestos mencionados

anteriormente. Las preparaciones de células no inducidas sintetizaban Escualeno y una pequeña cantidad de Cicloartenol solamente. No hay evidencias de que estos compuestos sean catalizados por las células después de que su síntesis haya cesado (Threlfall, D.R. y colbs.; 1991).

Mientras que existen muchas evidencias indirectas de que la acumulación de triterpenos particulares en las plantas son una defensa contra herbívoros, hay pocos experimentos que implican a los triterpenos definitivamente como fuerzas disuasorias frente a animales que se alimentan de ellas. Uno de los primeros estudios detallados de este tipo fue el trabajo de Reichardt y colbs. en 1984, que trata sobre el papel del Ac. Papyriferico en la protección del Abedul de Alaska frente a la liebre de las nieves. En este caso el triterpeno se acumula específicamente en la superficie de las ramas juveniles, que protegen al árbol solamente cuando es más vulnerable al ataque. Experimentos de alimentación con estos animales muestran que los triterpenos son muy desagradables para estos herbívoros y que las concentraciones presentes son más que suficientes para explicar la ausencia de herbívoros en los estados juveniles del crecimiento. En los árboles viejos, las concentraciones disminuyen, porque la mayoría de los tejidos del abedul están fuera del alcance de los herbívoros, y en algunos casos los árboles viejos son capaces de resistir un mayor grado de herbívoros que los árboles jóvenes. Existen evidencias también de que el Ac. Papyriferico es un disuasorio del alce y de ciertos roedores.

La relación estructura-actividad no es todavía bien conocida y no se sabe si

todos los grupos funcionales presentes en esta molécula son esenciales para la acción disuasoria. Cuando el Sitosterol reemplaza al Ac. Papyriferico en estos experimentos con liebres, es bastante inactivo. Se piensa por esto que este papel disuasorio pudiera estar vinculado con la toxicidad mamaria de estas sustancias, ya que el Ac. Papyriferico mata a los ratones de laboratorio cuando se administra a concentraciones de 50 mg/Kg de animal.

Los Fitoedysones son agentes debastadores de la metamorfosis de insectos, constituyendo una defensa hormonal para la planta (Harborne, J.B.; 1991).

En las algas marinas ejercen un papel protector frente al ataque de peces y moluscos, por ser algunos de ellos compuestos muy tóxicos.

Aunque la importancia farmacológica de los esteroides ha sido bastante estudiada , sin embargo, su papel en los vegetales no está bien definido. El Reino animal elabora sus esteroides hormonales a partir del mevalonato via Lanosterol y Colesterol o, en el caso de no poder utilizar esta vía (insectos y crustáceos), a partir de fitosteroles que ingirieron en su alimentación. En los vegetales el papel de los esteroides se conoce peor (Bruneton, J.; 1991).

En vista de la considerable variedad de tipos de esteroides encontrados en las plantas, es muy posible que jueguen un papel estructural vital en algunas de sus membranas celulares, como ocurre en animales y otros organismos. Existen también

evidencias que sugieren que los esteroides pudieran también jugar algún otro papel importante en el metabolismo celular en adición a la función estructural de membranas. Esta propuesta dual de los papeles de los esteroides en las plantas es paralela a la situación que tienen en los hongos (Goad, L.J.; 1991).

II.1.4. ACCIONES FARMACOLÓGICAS Y EMPLEOS TERAPÉUTICOS

Las acciones farmacológicas de los triterpenos y esteroides, compuestos de gran diversidad estructural, han sido ampliamente estudiadas.

Tras una larga revisión bibliográfica destacamos algunos de los triterpenos y esteroides principales en las plantas, así como su acción farmacológica:

TRITERPENOS

Acción hipolipidémica.

- Alisol A. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).
- Ginsenósido Rb2. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).
- Saikosaponina A. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).
- Acido Oleanólico. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).
- Cimilicen. (Muravyou, I.A. y colbs.; 1985)
- Acido Glicirrético. (Vasilenko, Y.K.; 1982).
- Acido Ursólico. (Lee, K.-H. y colbs.; 1988).

Acción hipoglucémica.

- Acido Torméntico. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).

- Ginsenosido Rb2. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).
- Alisol A. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).
- Acido Ursólico. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993), (Lee, K.-H. y colbs.; 1988).
- Momordicina I. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).
- Acido Sumaresinólico. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).
- Acido Oleanólico. (Ling-Hua, Z. y colbs.; 1993).

Acción antitumoral, anticancerosa y citotóxica.

- Lupeol. (Bezanger-Beauquesne, L.; 1982).
- Betulósido. (Bezanguer-Beauquesne, L; 1982).
- Amirol. (Bezanguer-Beauquesne, L.; 1982).
- Acido Betulínico.(Bezanguer-Beauquesne, L.; 1982).
- Celastrol. (Zhang, W.J. y colbs.; 1986).
- Acido 3-oxo-olean-12-en-29-oico. (Kaneda, N. y colbs.; 1992).
- Acido Katónico. (Kaneda, N. y colbs.; 1992).
- Acido Ursólico. (Lee, K.-H. y colbs.; 1988).

Acción espermicida.

- Acido Oleanólico. (Pant, G. y colbs.; 1988).

Acción antiulcerosa.

- Algunas saponinas triterpénicas aisladas de Pyrenacantha staudtii (Aguwa, L.N. y colbs.; 1986).
- Acido Ursólico. (Lee, K.-H. y colbs.; 1988).

Acción antihepatotóxica.

- Papirogenina. (Hikino, H. y colbs.; 1984).
- Papirióside. (Hikino, H. y colbs.; 1984).

Acción arteriosclerótica.

- Acido Glicirrético. (Vasilenko, Y.K.; 1982).
- Acido Glicirrético. (Vasilenko, Y.K.; 1982).
- Acido Ursólico. (Vasilenko, Y.K.; 1982), (Lee, K.-H. y colbs; 1988).
- Acetato del Ac. Ursólico. (Vasilenko, Y.K.; 1982).

Acción anticonvulsivante.

- Acetato de α -Amirina. (Chaturvedi, A.K. y colbs.; 1974).
- Acetato de β -Amirina. (Chaturvedi, A.K. y colbs.; 1974).
- Friedelina. (Chaturvedi, A.K. y colbs.; 1974).

- Friedelan-3 β -ol. (Chaturvedi, A.K. y colbs.; 1974).

Acción antiinflamatoria.

- α -Amirina. (Kweifiookai, G. y colbs.; 1994).
- Palmitato de α -amirina. (Kweifiookai, G. y colbs.; 1994).
- Linolato de α -amirina. (Kweifiookai, G. y colbs.; 1994).
- Acetato de α -amirina. (Chaturvedi, A.K. y colbs.; 1974).
- Acetato de β -amirina. (Chaturvedi, A.K. y colbs.; 1974).
- Friedelina. (Chaturvedi, A.K. y colbs.; 1974).
- Friedelan-3 β -ol. (Chaturvedi, A.K. y colbs.; 1974).
- Acido Oleanólico. (Aquino, R. y colbs.; 1991).
- Acido Ursólico. (Cappalletti, E.M. y colbs.; 1982), (Lee, K.-H. y colbs.; 1988).
- Acido 3 β ,6 β ,19 α -trihidroxiurs-12-en-28-oico. (Aquino, R. y colbs.; 1991).
- Acido 2 α ,3 α -Dihidroxiolean-5,12-dien-28-oico. (Chawla, A.S.; 1992).
- Acido 2 β ,3 α -Dihidroxiolean-5,12-dien-28-oico. (Chawla, A.S.; 1992).
- Lupeol. (Recio, M.C. y colbs.; 1995).
- Eritrodiol. (Recio, M.C. y colbs.; 1995).
- Hederagenina. (Recio, M.C. y colbs.; 1995).
- Acido α -Glicirrético. (Recio, M.C. y colbs.; 1995).
- Acido β -Glicirrético. (Recio, M.C. y colbs.; 1995).

- Uvaol. (Recio, M.C. y colbs.; 1995).
- Acido Torméntico. (Recio, M.C. y colbs.; 1995).

Acción antiarrítmica.

- α -Amirina. (Kweifiookai, G. y colbs.; 1994).
- Palmitato de α -amirina. (Kweifiookai, G. y colbs.; 1994).
- Linolato de α -amirina. (Kweifiookai, G. y colbs.; 1994).
- Acido Ursólico. (Lee, K.-H. y colbs.; 1988).

Acción antivirásica.

- Suberosol. (Li, H. y colbs.; 1993).
- Acido 3-O-Trans-cafeoil tormentico. (De Tommasi, N. y colbs.; 1992).
- Dammaradienol. (Poehland, B.L. y colbs.; 1987).
- Dammarenediol-II. (Poehland, B.L. y colbs.; 1987).
- Hidroxidammarenona-I. (Poehland, B.L. y colbs.; 1987).
- Acido Ursónico. (Poehland, B.L. y colbs.; 1987).
- Hidroxihoponona. (Poehland, B.L. y colbs.; 1987).
- Acido Dammarenólico. (Poehland, B.L. y colbs.; 1987).
- Acido Shoérico. (Poehland, B.L. y colbs.; 1987).
- Acido Eichleriánico. (Poehland, B.L. y colbs.; 1987).
- Lactona del Ac. Hidroxioleanico. (Poehland, B.L. y colbs.; 1987).

- Acido Glicirrético. (Konoshima, T. y colbs.; 1987).
- Acido Retinóico. (Konoshima, T. y colbs.; 1987).
- Acido Oleanólico. (Konoshima, T. y colbs.; 1987).
- Acido Ursólico. (Konoshima, T. y colbs.; 1987).
- Acido 3-O-Acetiloleanólico. (Konoshima, T. y colbs.; 1987).
- 3-O-Aceteritrodiol. (Konoshima, T. y colbs.; 1987).
- Acido Maslínico. (Konoshima, T. y colbs.; 1987).
- 2,3-di-O-Acetilmaslínico. (Konoshima, T. y colbs.; 1987).
- Acido 1,3-Dioxoolean-12-en,3-O-acetil betulínico. (Konoshima, T. y colbs.; 1987).

Acción antialérgica.

- Acido Brionólico. (Tabata, M. y colbs.; 1993).

ESTEROIDES

Acción antitumoral y citotóxica.

- β -Sitosterol. (Bezanger-Beauquesne, L.; 1982).
- Withaferina A. (Bezanger-Beauquesne, L.; 1982).
- Withanólido E. (Bezanger-Beauquesne, L.; 1982).
- Cardenólidos. (Bezanger-Beauquesne, L.; 1982).
- 12 β -Hidroxi-5 α -pregna-16-ene-3,20-diona. (Shun, Y. y colbs.; 1987).
- 12 β -Hidroxipregna-4,16-dien-3,20-diona. (Shun, Y. y colbs.; 1987).
- Ergosterol. (Yasukawa, K. y colbs.; 1994).
- Ergosterol peróxido. (Yasukawa, K. y colbs.; 1994).

Acción antiinflamatoria tópica.

- Prednisolona. (Hong, D. y colbs.; 1994).
- 6-Metoxicarbonilprednisolona. (Hong, D. y colbs.; 1994).
- 21-ol-Acetato de la 6-metoxicarbonilprednisolona. (Hong, D. y colbs.; 1994).
- 7,21-diol-Acetónido de la 6-metoxicarbonilprednisolona. (Hong, D. y colbs.; 1994).
- Metil 11 β ,17 α ,21-Trihidroxi-3,20-dioxopregna-14-dien-16 α -carboxilato. (Heiman, A.S. y colbs.; 1990).

Acción cardiotónica.

- Digitoxina. (Bruneton, J.; 1993), (Trease y Evans; 1991).
- Gitoxina. (Bruneton, J.; 1993), (Trease y Evans; 1991).
- Purpureaglucósido B. (Bruneton, J.; 1993).
- Gilatoxina. (Bruneton, J.; 1993).
- Glucogitaloxósido. (Bruneton, J.; 1993).
- Lanatóside A, B, C y D. (Bruneton, J.; 1993), (Trease y Evans; 1991).
- Digoxina. (Bruneton, J.; 1993), (Trease y Evans; 1991).
- Diginatóside. (Bruneton, J.; 1993).

Acción diurética.

- Sarsapogenina. (Bruneton, J.; 1993).
- Digitogenina. (Bruneton, J.; 1993).
- Gitogenina. (Bruneton, J.; 1993).
- Digalogenina. (Bruneton, J.; 1993).

II.2. INFLAMACIÓN

II.2.1. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

La inflamación es una reacción local conectivo-vascular, provocada por microorganismos o sustancias irritantes, cuyo fin es localizar y destruir dichos agentes patógenos, así como reparar aquellos daños que estos puedan producir (Litter, M.; 1986).

Los sucesos vasculares implican una dilatación inicial de los vasos sanguíneos con un incremento en el flujo sanguíneo, seguidamente se produce enlentecimiento y éstasis de la sangre, un aumento en la permeabilidad de las vénulas poscapilares y la exudación de líquido. La vasodilatación se lleva a cabo por varios mediadores producidos por la interacción del agente con las células del tejido (Histamina E_2 e I_2 , el factor activador de plaquetas etc.).

Algunos de estos mediadores, la histamina y el factor activador de plaquetas (P.A.F.), también son responsables de la fase inicial del incremento en la permeabilidad vascular.

El exudado de líquido contiene una gran variedad de mediadores que tienen influencia sobre las células adyacentes y sobre los propios vasos sanguíneos. Estos incluyen los componentes de 4 cascadas enzimáticas: Sistema del Complemento,

Sistema de la Coagulación, Sistema Fibrinolítico y Sistema de las Cinasas (Rang, H.P. y cols.; 1992).

Al incrementar la permeabilidad y la dilatación vascular, estas sustancias facilitan el desplazamiento de leucocitos hacia el lugar de la herida.

Los mediadores clásicos de la inflamación tienen la capacidad de inducir solamente una modesta acumulación de leucocitos en los tejidos inflamados, mientras que los productos bacterianos, los tejidos dañados y los inmunocomplejos provocan una migración leucocitaria masiva. La acción de tales factores sobre los leucocitos puede ejercerse por vía directa, o mediante activación del Sistema del Complemento a través de la vía clásica o alterna. Entre los componentes del complemento, los factores C_{3a} y C_{5a} están dotados de poder quimiotáctico muy notable, también los factores C_5 , C_6 y C_7 pueden desarrollar actividad quimiotáctica.

La quimiotaxis es una respuesta compleja, la movilidad leucocitaria es vectorial en presencia de un gradiente de concentración de los factores quimiotácticos (representados sobre todo por proteínas y polipéptidos), y causal, si falta dicho gradiente. Se desconoce el mecanismo a través del cual los leucocitos reconocen las proteínas que inducen su migración.

En general las sustancias quimiotácticas son producidas por estímulos patógenos, daños tisulares, o infecciones. Las enzimas proteolíticas son capaces de

convertir en quimiotácticos numerosos sustratos proteicos.

El mecanismo de acción de las sustancias quimiotácticas no ha sido todavía determinado, probablemente su lugar de acción puede hallarse en los microfilamentos y microtúbulos contráctiles del citoplasma de los leucocitos.

También intervienen en esta etapa de la inflamación las quininas, que estimulan las terminaciones nerviosas y producen dolor.

La generación de Prostaglandinas coincide con la migración de leucocitos polimorfonucleares hacia el lugar de la herida.

Durante el proceso de inflamación, en etapas posteriores, las enzimas lisosómicas son liberadas por los glóbulos blancos. Estas enzimas son capaces de degradar todas las macromoléculas, tanto del huésped como de las bacterias invasoras. Una de estas enzimas lisosómicas es la fosfolipasa A₂ responsable de la liberación de ácido araquidónico, precursor de la síntesis de eicosanóides. Las enzimas lisosómicas son capaces de engendrar las quininas y de activar la plasmina para movilizar todavía más glóbulos blancos y aumentar la respuesta inflamatoria (Luis Chiesa, J.A. y cols.; 1983).

II.2.2. ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DE ESTEROIDES CORTICALES

En la actualidad existen pruebas de que los esteroides inhiben la liberación de prostaglandinas , aunque no la síntesis . Inhiben las manifestaciones iniciales de rubor, calor, dolor y tumefacción, y las tardías de cicatrización, reparación y reacciones proliferativas.

Los Glucocorticoides reducen el grado de dilatación de los vasos sanguíneos, por lo que hay una menor exudación de fluidos. Una de sus principales acciones antiinflamatorias es disminuir el acúmulo de leucocitos sanguíneos en el lugar de la inflamación. Con relación a los leucocitos neutrófilos, la acción de estas hormonas es promover la liberación de los mismos de la médula ósea, provocando una leucocitosis neutrófila. Por el contrario, los glucocorticoides, disminuyen la liberación de monocitos de la médula ósea, disminuyendo su número en sangre.

En presencia de glucocorticoides, la síntesis de las principales linfocinas está disminuida, por ello existe una menor secreción de proteasas neutras de los macrófagos, razón por la que, en los procesos asociados a la liberación extracelular de estas enzimas se producirá un menor daño hístico.

Los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides se producen merced a dos mecanismos:

- Disminución de la producción de células y mediadores inflamatorios.
- Generación de mediadores antiinflamatorios.

En lo que se refiere a los mediadores antiinflamatorios se ha identificado, al menos, una proteína mediadora putativa, que los glucocorticoides inducen en los leucocitos; esta proteína se denomina lipocortina. En la actualidad se sabe que existen al menos cinco lipocortinas que se consideran miembros de una familia de proteínas que liga fosfolípidos y están reguladas por calcio. Todas las lipocortinas inhiben la actividad de la Fosfolipasa A₂, aunque existe gran controversia en torno al modo como lo hacen. Cualquiera que sea el mecanismo, el resultado es una disminución en la producción del factor activador de plaquetas, del arquidonato, y de todos los mediadores inflamatorios derivados de éste (Rang H.P. y cols.; 1992).

Recientemente se ha demostrado también que los glucocorticoides inhiben la inducción de una NO-sintasa, enzima responsable de producir NO en macrófagos activados y en endotelio vascular. Este mismo mecanismo puede ser responsable de cierta actividad antiálgica que repetidas veces ha sido postulada por diversos informes clínicos y experimentales (Florez, J. y Reig, E.; 1993).

Las principales acciones antiinflamatorias de los glucocorticoides pueden resumirse en los siguientes apartados:

1. Reacciones mesenquimáticas.

Una de las acciones sobresalientes de los glucocorticoides (Cortisona, Hidrocortisona, Prednisona, Prednisolona, Meprednisolona, Triamcinolona, Dexametasona, Betametasona, Cortivazol y Corticotropina) es la de suprimir la respuesta inflamatoria de los tejidos a los agentes irritantes, infecciosos y agresivos; en primer lugar suprimen los mesenquimáticos, especialmente tejido conectivo.

Esta acción antiinflamatoria o antiflogística puede demostrarse en animales de experimentación, en los que son capaces de suprimir las inflamaciones agudas y crónica por:

- a) Inhibir el eritema inflamatorio en cobaya y rata, producido por rayos U.V.
- b) Inhibir el edema inflamatorio producido en la oreja del conejo y ratón por el aceite de croton.
- c) Suprimir el edema inflamatorio producido por la inyección subplantar en la pata de la rata, de formaldehído, levadura, carragenina, mostaza, dextrano, albúmina de huevo o serotonina.

d) Inhibir la artritis producida en rata por inyección articular de formaldehído y en el conejo por inyección intrarticular de suero de caballo en animales sensibilizados a este antígeno.

e) Inhibir la peritonitis y pleuresia experimental en rata por inyección de formaldehído en las serosas.

f) Inhibir la formación de granuloma inflamatorio producido en el tejido subcutáneo de la rata por implantación de una bolita de algodón o por inyección de aire o aceite de croton.

En general, todos los fenómenos inflamatorios disminuyen de intensidad: vasodilatación, exudación, edema, infiltración leucocitaria, fagocitosis...

Estos compuestos inhiben también la formación de los fibroblastos, el tejido de granulación y el depósito de la sustancia fundamental del tejido conectivo, con lo que se retarda el proceso de cicatrización. Esta acción antiinflamatoria puede ser beneficiosa en ciertos casos (procesos inflamatorios oculares y cutáneos) y no serlo en otros, ya que impide la formación de la barrera fibroblástica, línea natural de defensa contra la invasión de tejidos adyacentes por el agente agresivo.

Experimentalmente se ha demostrado que cuando se provoca un granuloma en la rata por inyección subcutánea de aire o un agente irritante como el aceite de

croton, dicho granuloma constituye una barrera que evita la necrosis cutánea, por nueva inyección de la sustancia irritante a gran concentración. En cambio en animales tratados con Hidrocortisona no se forma dicha barrera y se produce la necrosis de la piel.

2. Acción antirreumática.

La acción antiinflamatoria de los glucocorticoides se observa de manera sobresaliente en los procesos reumáticos inflamatorios tales como la artritis reumatoidea y la fiebre reumática aguda.

a) Artritis reumatoidea. En esta enfermedad la administración de glucocorticoides hace que desaparezca el dolor articular rápidamente, y luego la tumefacción, rubor y calor. La limitación de movimientos y la eritrosedimentación acelerada se normaliza.

b) Fiebre reumática. Con la administración de glucocorticoides los síntomas: dolor, rubor y tumefacción articular desaparecen rápidamente igual que la fiebre y la taquicardia, la eritrosedimentación acelerada se normaliza y desaparece la Proteína C-reactiva (signo de actividad reumática) en la sangre. Se trata también de una acción supresiva.

3. Enfermedades del colágeno.

Los glucocorticoides como la Hidrocortisona, Prednisona, Prednisolona, Metilprednisolona, Triamcinolona, Dexametasona, Betametasona y la Corticotropina, tienen la propiedad de aliviar la mayor parte de las manifestaciones inflamatorias de las enfermedades del colágeno. Se trata de una acción antiinflamatoria y también inmunosupresiva.

4. Síndrome nefrótico.

La acción antiinflamatoria de los glucocorticoides produce una restauración de la estructura normal del glomérulo renal y restablecimiento de la impermeabilidad de los capilares glomerulares a las proteínas sanguíneas, pudiendo intervenir también una acción inmunosupresiva.

5. Síndrome asmático.

Los glucocorticoides tienen también la propiedad de inhibir la respuesta alérgica de los tejidos, esta acción está relacionada con sus efectos antiinflamatorios. Los glucocorticoides inhiben la liberación de histamina y de los otros mediadores formados en los estados alérgicos, lo que se debe a la estabilización de las membranas de los mastocitos impidiendo su desgranulación.

6. Acción antiinflamatoria local.

La aplicación local de los glucocorticoides provoca una vasoconstricción, que es en parte responsable de esta acción. Es importante esta acción antiinflamatoria de los glucocorticoides en las articulaciones, en el ojo (incluyendo conjuntiva y córnea) y en la piel (eczemas y psoriasis).

En el hombre, los glucocorticoides constituyen las drogas antiinflamatorias por excelencia y las más potentes. Tienen la propiedad de inhibir todo tipo de inflamaciones, tanto las deseables o útiles (mecanismos de defensa) como las indeseables o inútiles (producen daño). Justamente la importancia terapéutica de estas drogas reside en esta última propiedad (Litter, M.; 1986).

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. MUESTRAS

III.1.1. RECOLECCION Y PREPARACION.

El material vegetal está constituido por las sumidades del hemiparásito Viscum cruciatum Sieber y del hospedador Crataegus monogyna Jacq., recolectadas en la primera quincena de Febrero, después de un período frío, en el Puerto de los Vientos (Serranía de Ronda, Málaga).

La desecación se realizó a la sombra, sobre una superficie lisa, a una temperatura media de 25°C, y posteriormente se conservó en lugar seco, oscuro y cerrado.

El material vegetal ha sido determinado en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia, quedando depositado un ejemplar testigo del mismo en el herbario de dicha Facultad (SEV-F.).

III.2. ESTUDIO FITOQUIMICO

III.2.1. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS A ESTUDIAR.

Partimos de 500g de Viscum cruciatum Sieber parásito de Crataegus monogyna Jacq., 500g de Crataegus monogyna Jacq. parasitado por Viscum cruciatum Sieber y 500g de Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar.

Las muestras desecadas, fueron troceadas e introducidas en el cuerpo intermedio de un extractor tipo Soxhlet y sometidas a una extracción continua, operando con disolventes de polaridad creciente: n-Hexano, Cloroformo y Metanol (Dominguez, X.A., 1961).

El proceso esquematizado para cada una de las drogas queda recogido en la figura 4.

Seleccionamos para nuestro estudio el precipitado A y el extracto hexanoico (H) obtenido con cada una de las muestras; denominandolos en cada caso:

A₁, H₁: Obtenidos de Viscum cruciatum Sieber.

A₂, H₂: Obtenidos de Crataegus monogyna Jacq. parasitado por
Viscum cruciatum Sieber.

A₃, H₃: Obtenidos de Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar.

Los rendimientos de las extracciones, expresados en gramos de residuo seco (r.s.) por 100g de planta han sido:

| | Ext° Hexanoico (%) | Ext° Clorofórmico (%) | Ext° Metanólico (%) |
|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| <u>V. cruciatum</u> | 2,30 | 2,35 | 19,1 |
| <u>C. monogyna</u> paras. | 0,59 | 1,17 | 10,47 |
| <u>C.monogyna</u> sin paras. | 1,26 | 2,00 | 9,81 |

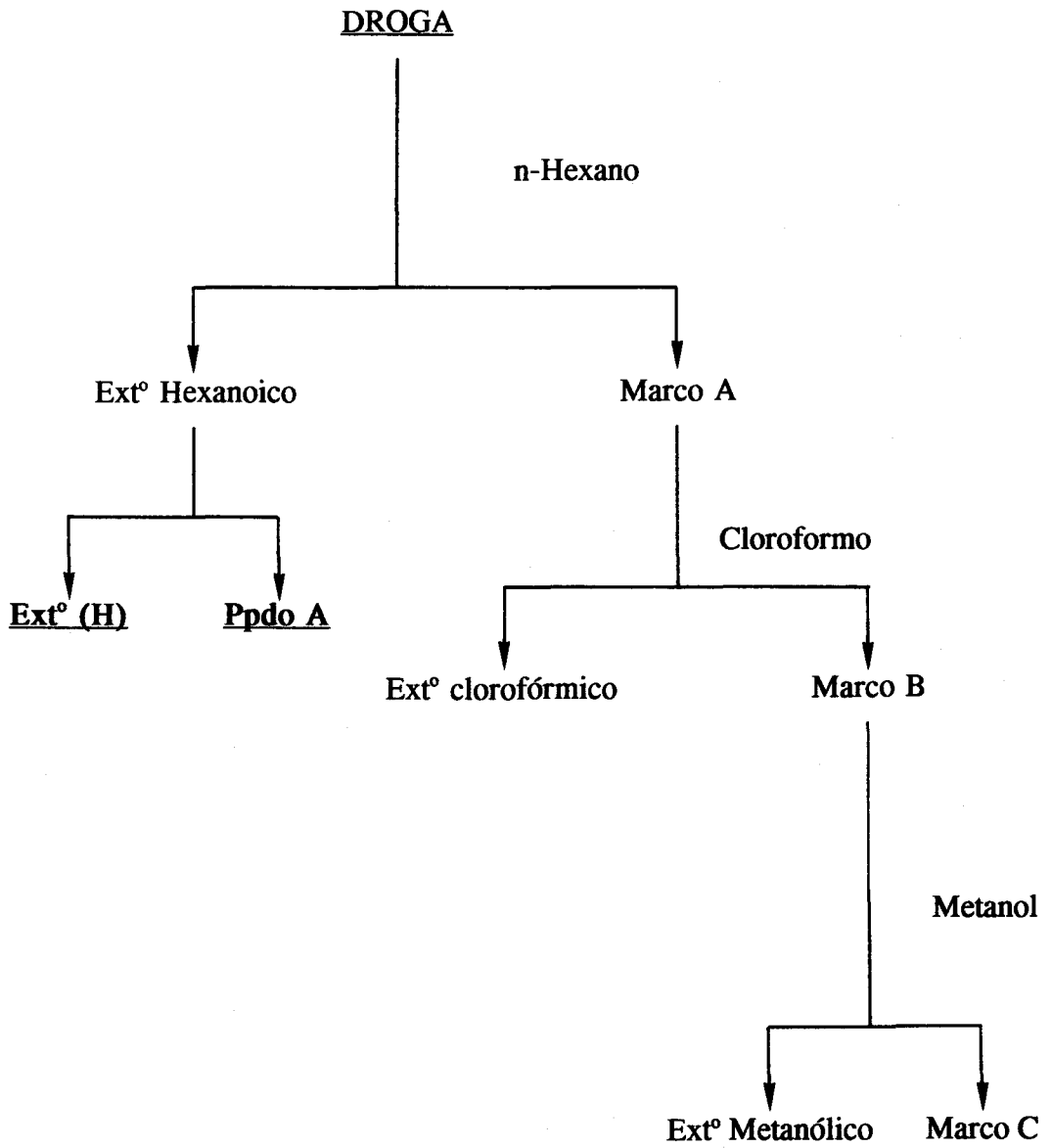


Fig. 4: Esquema del proceso extractivo

III.2.2. TECNICAS CROMATOGRAFICAS

La separación de los distintos componentes de los extractos obtenidos se realizó por cromatografía en columna de gel de sílice.

Previamente, se hizo un estudio cromatográfico en capa fina, con el fin de establecer un criterio de selección de los eluyentes a emplear en la cromatografía en columna.

III.2.2.1. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Material

Cromatofolios PL de silicagel 60 F₂₅₄, Merk.

Cubetas cromatográficas de vidrio.

Lámpara Luz U.V. de 366 nm y 254 nm.

Estufa de desecación.

Pulverizador de aire a presión.

Reactivos (Panreac-PRS)

n-Hexano

Eter etílico

Cloroformo

Acetato de etilo

Fases móviles

n-Hexano/Cloroformo a distintas proporciones.

Cloroformo/Acetato de etilo a distintas proporciones.

n-Hexano/Eter etílico (70:30).

Reveladores

Oleum: Acido Sulfúrico/Acido Acético glacial/Agua (2:40:8).

Exposición a 120°C durante 5 min. (Bermejo, 1968).

Luz Ultravioleta (Wagner y cols.; 1984).

Método

El desarrollo de los cromatofolios se realizó en cámaras previamente saturadas con las fases móviles. La técnica seguida es la propuesta por STHAL (Sthal, 1969), en su modalidad unidimensional ascendente de simple recorrido. Los cromatofolios desarrollados se observan a la luz U.V. revelándose a continuación y observándose, en algunos casos, de nuevo a la luz U.V.

III.2.2.2. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Material

Columnas de vidrio de diversas longitudes y diámetros.

Colector de fracciones LKB 8070 Ultrorac II.

Rotavapor Buchi.

Reactivos

Adsorbentes: Silicagel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck).

Silicagel (0,2-0,5 mm) (Merck).

Eluyentes: n-Hexano, Eter etílico, Cloroformo, Acetato de etilo, a distintas proporciones según las diferentes columnas.

Método

Se sigue el procedimiento clásico de cromatografía sólido-líquido en columna.

El empaquetamiento se realiza formando una suspensión de silicagel (0,063-0,200 mm) en n-Hexano, dejándose en reposo durante 24 horas. Para formar la cabeza de la columna se utiliza silicagel 0,2-0,5 mm.

El seguimiento de la columna se realiza por cromatografía en capa fina.

III.2.3. TECNICAS INSTRUMENTALES

- **Determinación del punto de fusión:** El punto de fusión se determinó en un microscopio THERMOVAR HT 1B11.

- **Espectroscopía:**

Los **espectros U.V.** se realizaron en un espectrofotómetro PERKIN ELMER Lambda 3, con registrador incorporado, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor y 3 ml de capacidad. El disolvente utilizado fue Cloroformo de máximo grado de pureza.

Los **espectros de masas (E.M.)** se realizaron en un espectrómetro de masas KRATOS MS 80 RFA. La temperatura de la fuente fue de 250°C y la energía de ionización 70 e.v.

La **cromatografía gaseosa** se realizó en un cromatógrafo de gases CHROMPACK-CP 9000 usando helio como gas portador.

La **cromatografía de gases-Espectrometría de masas** se realizó en un aparato CARLO ERBA/KRATOS MS 80 RFA.

Los **espectros de masas** se realizaron a una resolución de 1000 y la

medida exacta de las masas, bajo una resolución de 10.000.

El barrido espectral se ajustó dependiendo de la muestra.

III.2.4. ESTUDIO DE VISCUM CRUCIATUM SIEBER.

III.2.4.1. ESTUDIO DEL PRECIPITADO A₁

De la extracción realizada (aptdo. III.2.1.) se obtuvo un precipitado en forma de polvo blanco, que pesó 1,46g (0,29%), al que realizamos un estudio preliminar por cromatografía en capa fina, resultando ser un solo compuesto.

El compuesto obtenido al que denominamos A₁ fue sometido para su identificación a diversas técnicas físicas, cromatográficas y espectrofotométricas.

III.2.4.1.a. Resultados

- Punto de fusión: 270-273°C.

- Cromatografía en capa fina:

El estudio realizado mediante cromatografía en capa fina en soporte de silicagel, nos proporcionó los siguientes valores de R.f.:

| <u>Fase móvil</u> | <u>Rf</u> | <u>Coloración (Oleum)</u> |
|-------------------------------------|-----------|---------------------------|
| n-hexano/Eter etílico (70:30) | 0,09 | Púrpura |
| n-hexano/Eter etílico (50:50) | 0,46 | Púrpura |
| Cloroformo/Acetato etilo (50:50) | 0,55 | Púrpura |

- Espectroscopia U.V. (realizada en Cloroformo)

U.V.: λ (máx): 235 y 285 nm (Fig. 5).

- Espectrometría de masas: E.M. m/z (%):

456(M⁺,6), 411 (2), 300 (6), 248 (100), 219 (8), 203 (44), 133 (33), 119 (19) (Fig. 6).

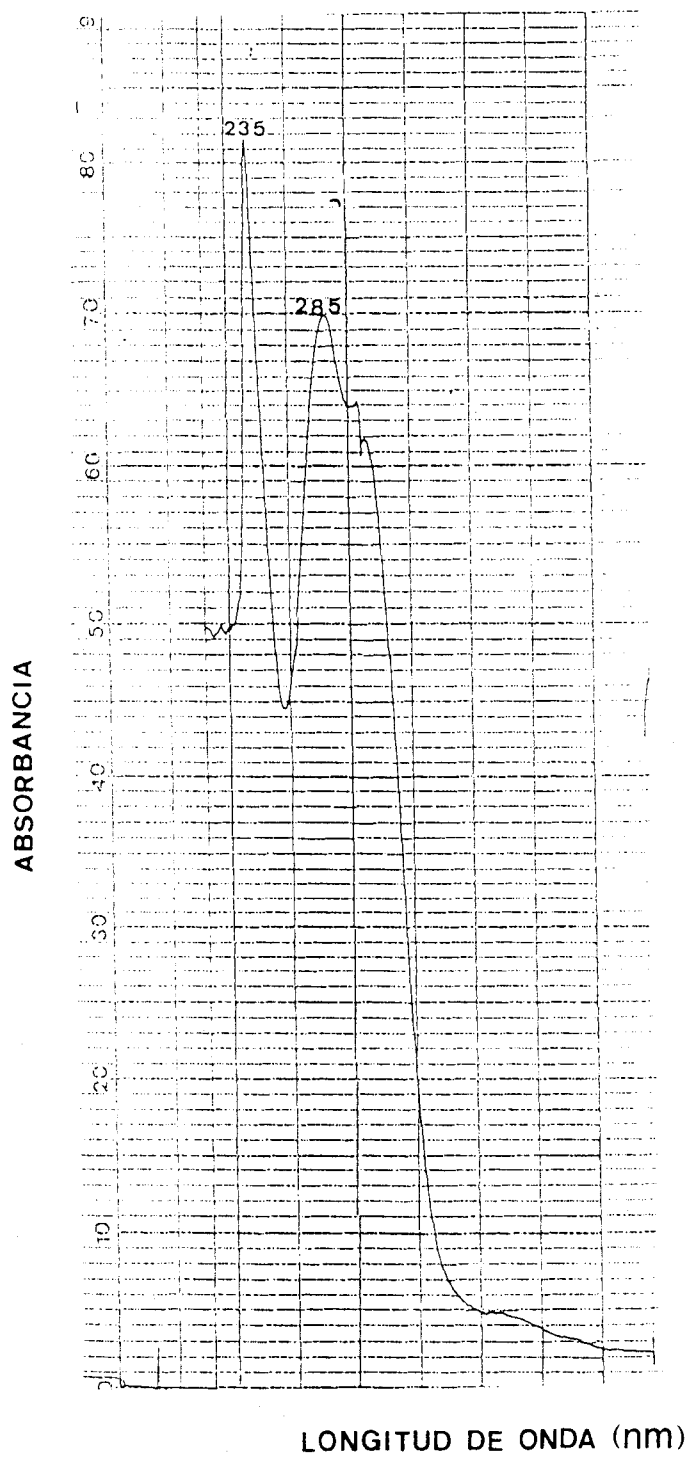


Fig. 5: Espectro U.V. del compuesto A₁

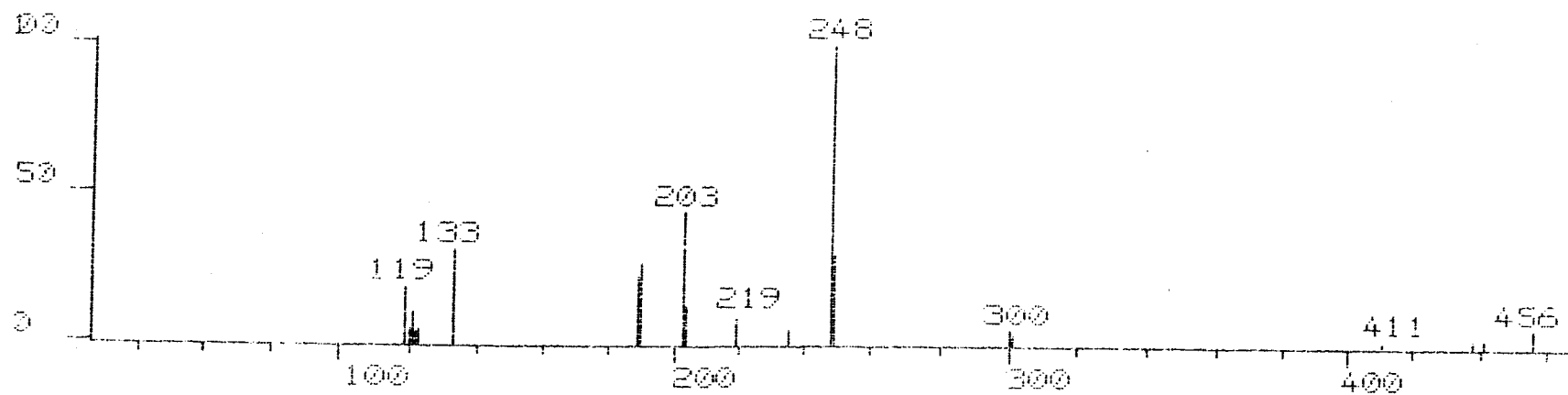
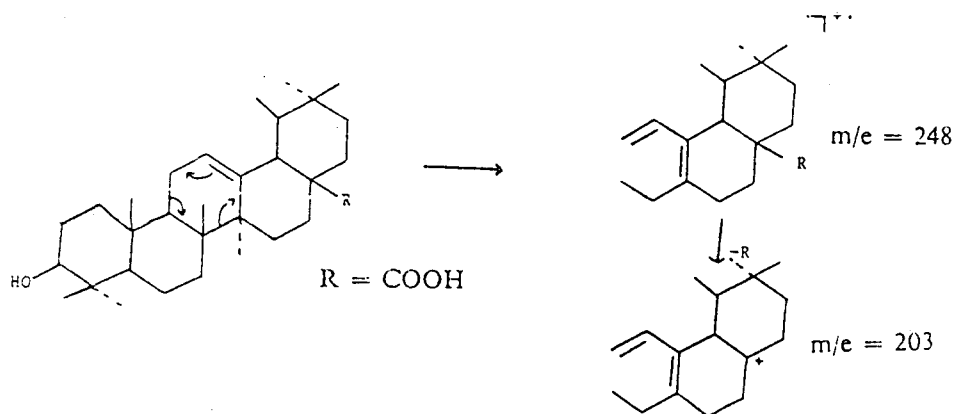


Fig. 6: E.M correspondiente al compuesto A₁

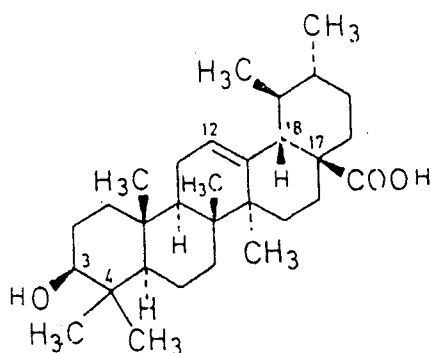
III.2.4.1.b. Discusión de Resultados

El espectro de masas muestra el ión molecular a m/z 456, con una fórmula empírica determinada por alta resolución $C_{30}H_{48}O_3$, su pico base aparece a m/z 248 correspondiéndole una fórmula empírica $(M-C_{14}H_{24}O)^+$ y el pico a m/z 203 nos orienta hacia un ácido triterpénico correspondiente a la serie oleano-12-en o ursal-12-en.



Es una fragmentación retro Diels-Alder con iones en m/z 248 y 203, indicativos de triterpenos que tienen una insaturación en $C_{11}-C_{12}$ (Proliac, A.; 1980).

El comportamiento cromatográfico y espectral nos identifica el compuesto A_1 como el ACIDO URSOLICO cuya estructura es:



Este compuesto ha sido identificado con anterioridad en un extracto clorofórmico de Viscum cruciatum Sieber parásito de Prunus Amygdalus Stokes, mezclado con el Acido Oleanólico (Agudo, M.A.; 1989).

El Acido Ursólico también ha sido puesto de manifiesto en Viscum album L.
(Delaveau, P.; 1980).

III.2.4.2. ESTUDIO DEL EXTRACTO HEXANOICO (H₁)

El extracto hexanoico (H₁) lo concentramos a presión reducida hasta residuo seco, y realizamos un estudio del mismo en columna de gel de sílice.

Como eluyentes se utilizaron: n-Hexano, n-Hexano/Cloroformo, Cloroformo/Acetato de etilo, a diferentes proporciones.

Se obtuvieron 169 fracciones, que se agruparon según su comportamiento cromatográfico en capa fina (Tabla III).

Las fracciones 76-106 reunidas se vuelven a cromatografiar por columna de gel de sílice, utilizando como eluyentes: n-Hexano, n-Hexano/Eter etílico a distintas proporciones, y Eter etílico. Se obtuvieron 139 fracciones, las cuales se han agrupado según su comportamiento cromatográfico. Los resultados se recogen en la Tabla IV.

| FRACCIONES | ELUYENTES | OBSERVACIONES |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 1-26 | n-Hexano | Mezclas |
| 27-43 | n-Hexano/Cloroformo (90:10) | Mezclas |
| 44-55 | n-Hexano/Cloroformo (90:10) | Mezclas + AH ₁ |
| 56-67 | n-Hexano/Cloroformo (80:20) | Mezclas + AH ₁ |
| 68-73 | n-Hexano/Cloroformo (80:20) | Mezclas |
| 74-75 | n-Hexano/Cloroformo (80:20) | Mezclas |
| 76-80 | n-Hexano/Cloroformo (70:30) | Mezclas |
| 81-84 | n-Hexano/Cloroformo (70:30) | Mezclas |
| 85-90 | n-Hexano/Cloroformo (50:50) | Mezclas |
| 91-106 | n-Hexano/Cloroformo (50:50) | Mezclas |
| 107-112 | n-Hexano/Cloroformo (30:70) | Mezclas + BH ₁ |
| 113-128 | n-Hexano/Cloroformo (30:70) | Mezclas + BH ₁ |
| 129-164 | n-Hexano/Cloroformo (10:90) | Mezclas + BH ₁ |
| 164-169 | Clorof./Acet. etilo (50:50) | Mezclas |

Tabla III: Desarrollo de la columna correspondiente al extracto hexanoico de Viscum cruciatum Sieber(H₁).

| FRACCIONES | ELUYENTES | OBSERVACIONES |
|-------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 1-2 | n-Hexano | Mezclas |
| 3-4 | n-Hexano | Mezclas |
| 5-7 | n-Hexano | Mezclas |
| 8-10 | n-Hexano/Eter etílico (90:10) | Mezclas |
| 11-16 | n-Hexano/Eter etílico (90:10) | Mezclas + CH ₁ |
| 17-21 | n-Hexano/Eter etílico (90:10) | Mezclas + CH ₁ |
| 22-31 | n-Hexano/Eter etílico (80:20) | Mezclas + CH ₁ |
| 32-34 | n-Hexano/Eter etílico (80:20) | Mezclas + CH ₁ |
| 35-44 | n-Hexano/Eter etílico (80:20) | Mezclas + DH ₁ |
| 45-83 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas + DH ₁ |
| 84-92 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 93-98 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 99 | n-Hexano/Eter etílico (50:50) | Mezclas |
| 100-101 | n-Hexano/Eter etílico (50:50) | Mezclas + AH ₁ |
| 102-105 | n-Hexano/Eter etílico (50:50) | Mezclas + EH ₁ |
| 106-117 | Eter etílico | Mezclas + EH ₁ |
| 118-139 | Eter etílico | Mezclas |

Tabla IV: Desarrollo de la columna correspondiente a las fracciones 76 a 106

III.2.4.2.a. Identificación del compuesto AH₁

El compuesto AH₁ fue separado de sus fracciones correspondientes mediante cromatografía en capa fina preparativa de silicagel, utilizando como fase móvil n-Hexano/Eter etílico (90:10).

Resultados

- **Punto de fusión:** 235-237°C.

- **Cromatografía en capa fina:**

Los valores de R_f y coloraciones obtenidas en el estudio cromatográfico fueron las siguientes:

| <u>Fases móviles</u> | <u>R_f</u> | <u>Coloración (Oleum)</u> |
|----------------------------------|----------------------|---------------------------|
| n-Hexano/Eter etílico (95:5) | 0,49 | Púrpura-anaranjado |
| n-Hexano/Eter etílico (70:30) | 0,92 | Púrpura-anaranjado |
| n-Hexano/Cloroformo (60:40) | 0,15 | Púrpura-anaranjado |

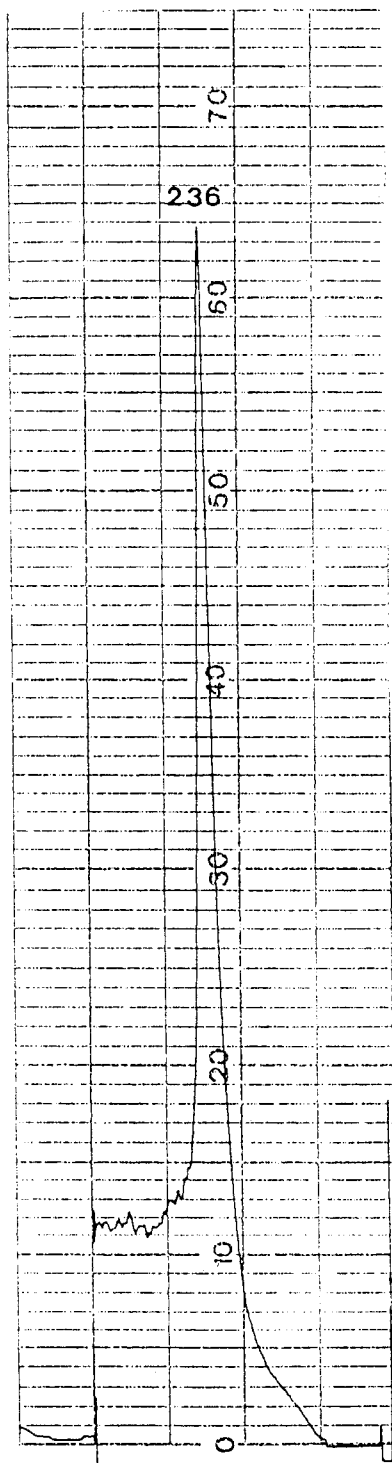
- **Espectroscopía U.V.** (realizada en Cloroformo).

U.V.: $\lambda(\text{máx.})$: 236 nm (Fig. 7).

- **Espectrometría de masas:** E.M. m/z (%):

468(M⁺,3), 408 (3), 218 (100), 203 (70), 189 (40) (Fig. 8)

ABSORBANCIA



LONGITUD DE ONDA (nm)

Fig. 7: Espectro U.V. del compuesto AH₁

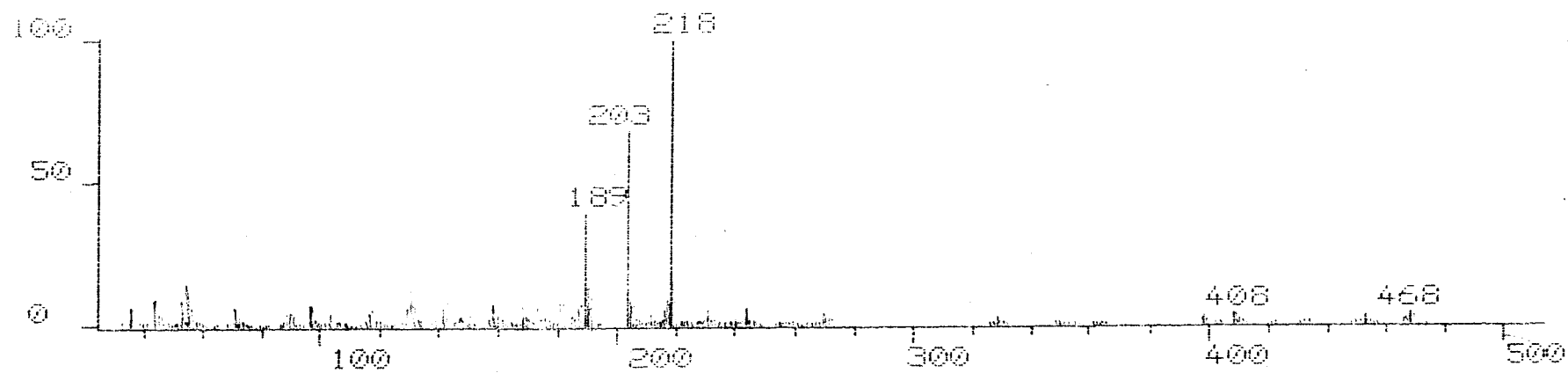
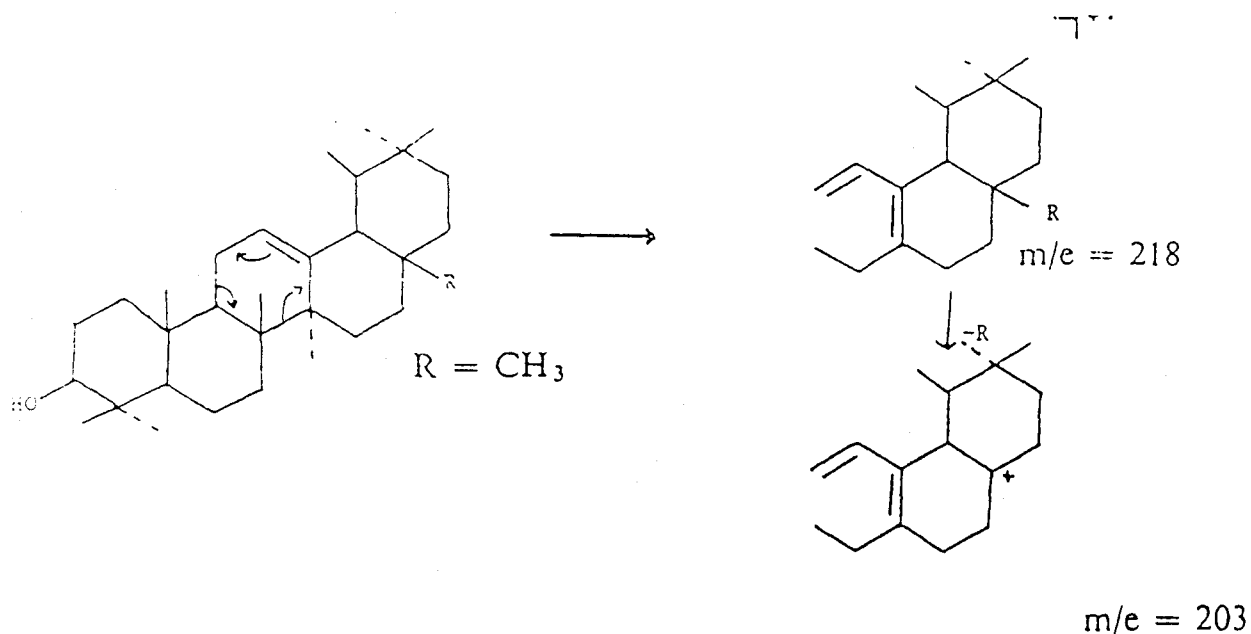


Fig. 8: E.M. correspondiente al compuesto AH₁

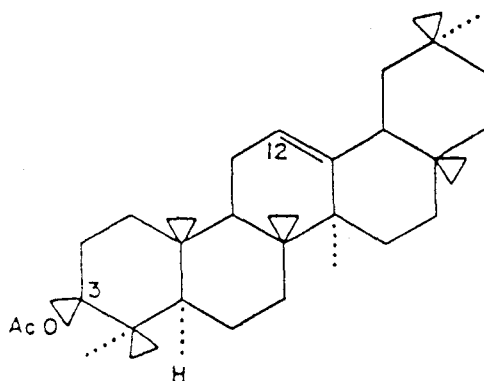
Discusión de resultados

El espectro U.V. da una λ máx. a 236 nm. que se encuentra dentro del rango de absorbancia de los triterpenos.

El espectro de masas de alta resolución muestra el ión molecular a m/z 468 al que le corresponde la fórmula empírica $C_{32}H_{52}O_2$. El pico a m/z 203 nos da idea de un triterpeno con una insaturación entre el C_{11} - C_{12} , el pico base a m/z 218 nos orienta hacia un triterpeno perteneciente a la serie ursano u oleano (Proliac, A.; 1980).



Consultando la bibliografía, hemos deducido que se trata de un monoacetato de un triterpeno identificado como ACETATO DE β -AMIRINA (Olean-12-en-3-ol, Acetato, (3, β)), y su estructura es la siguiente:



Este compuesto, fue aislado e identificado anteriormente en Viscum cruciatum Sieber parasito de Prunus amygdalus Stokes (Agudo Martínez, M.A.; 1989).

El Acetato de β -Amirina ha sido identificado también en otras dos especies pertenecientes a este mismo género: Viscum album L. (Fukunaga, T. y colbs.; 1987) y Viscum multinerve Hayata (Lin, J-H.; 1979).

III.2.4.2.b. Identificación del compuesto BH₁

Se separó de la mezcla por cromatografía preparativa en cromatofolios de silicagel, utilizando como fase móvil n-Hexano/Cloroformo (10:90).

Resultados y Discusión

Los datos cromatográficos y espectrales para este compuesto coinciden con los obtenidos para el precipitado A₁ (apdo. III.2.4.1.b.), identificado como ACIDO URSOLICO.

III.2.4.2.c. Identificación de la fracción CH₁

La fracción denominada CH₁ se aisló de las fracciones 11-34 (Tabla IV) por cromatografía en capa fina preparativa de silicagel, utilizando como fase móvil n-Hexano/Eter etílico (70:30).

El estudio cromatográfico preliminar de dicha fracción, dió como resultado:

| <u>Fases móviles</u> | <u>Rf</u> | <u>Coloración (Oleum).</u> |
|----------------------------------|-----------|----------------------------|
| n-Hexano/Eter etílico (70:30) | 0,40 | Morada |
| n-Hexano/Eter etílico (60:40) | 0,46 | Morada |
| n-Hexano/Cloroformo (50:50) | 0,06 | Morada |

Para separar los diferentes componentes se aplicó la cromatografía en fase gaseosa, con columnas capilares y detector de ionización de llama. La identificación de los constituyentes se llevó a cabo mediante la obtención de los espectros de masas de los picos cromatográficos utilizando un sistema combinado cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas.

Antes de su inyección en el cromatógrafo de gases la muestra fue silanizada, con el reactivo silanizante: Piridina/Hexametildisilazano/Trimetilclorosilano. Añadimos 50 μ l de este reactivo por cada mg de compuesto, se tapa el frasco, se agita y se deja estar durante unos minutos.

La fracción silanizada se inyecta en una columna capilar de sílice fundida, de 25m de longitud, 0,25mm de diámetro interior, impregnada con 5% Fenilmetilsilicona con 0,23 μ m de espesor de fase.

Gas portador: Helio (1 ml/min).

Temperaturas:

Inyector.....275°C

Columna.....230°C (6 min.) + 4°C/min. hasta 300°C.

Detector.....325°C

Con las condiciones experimentales que acabamos de describir, se procede a realizar el análisis cromatográfico de la muestra y se registran los espectros de masas de cada uno de los constituyentes que aparecen en el cromatograma.

Resultados

- Cromatografía de gases:

El cromatograma obtenido (Figura 9), y los porcentajes de area de los picos cromatográficos indican que se trata de una mezcla muy compleja de compuestos donde hay cuatro componentes mayoritarios ($T_R = 16,18, 19,77, 23,11$ y $27,29$ min.).

Los Tiempos de Retención (T_R) y areas relativas de los picos obtenidos en el análisis por cromatografía de gases de la fracción CH_1 (Fig. 9) se detallan a continuación:

| <u>PICOS</u> | <u>T_R</u> | <u>Area Relativa(%)</u> |
|--------------|----------------------|-------------------------|
| 1 | 5,57 | 0,25 |
| 2 | 7,09 | 0,32 |
| 3 | 8,79 | 1,18 |
| 4 | 10,58 | 0,16 |
| 5 | 12,44 | 5,95 |
| 6 | 14,29 | 1,11 |
| 7 | 16,18 | 16,64 |
| 8 | 17,94 | 1,78 |
| 9 | 19,77 | 29,18 |
| 10 | 21,41 | 1,66 |
| 11 | 23,11 | 13,85 |
| 12 | 24,80 | 0,28 |
| 13 | 26,83 | 2,09 |
| 14 | 26,94 | 3,70 |
| 15 | 27,29 | 13,79 |
| 16 | 27,75 | 0,21 |
| 17 | 28,30 | 7,63 |
| 18 | 30,00 | 0,27 |

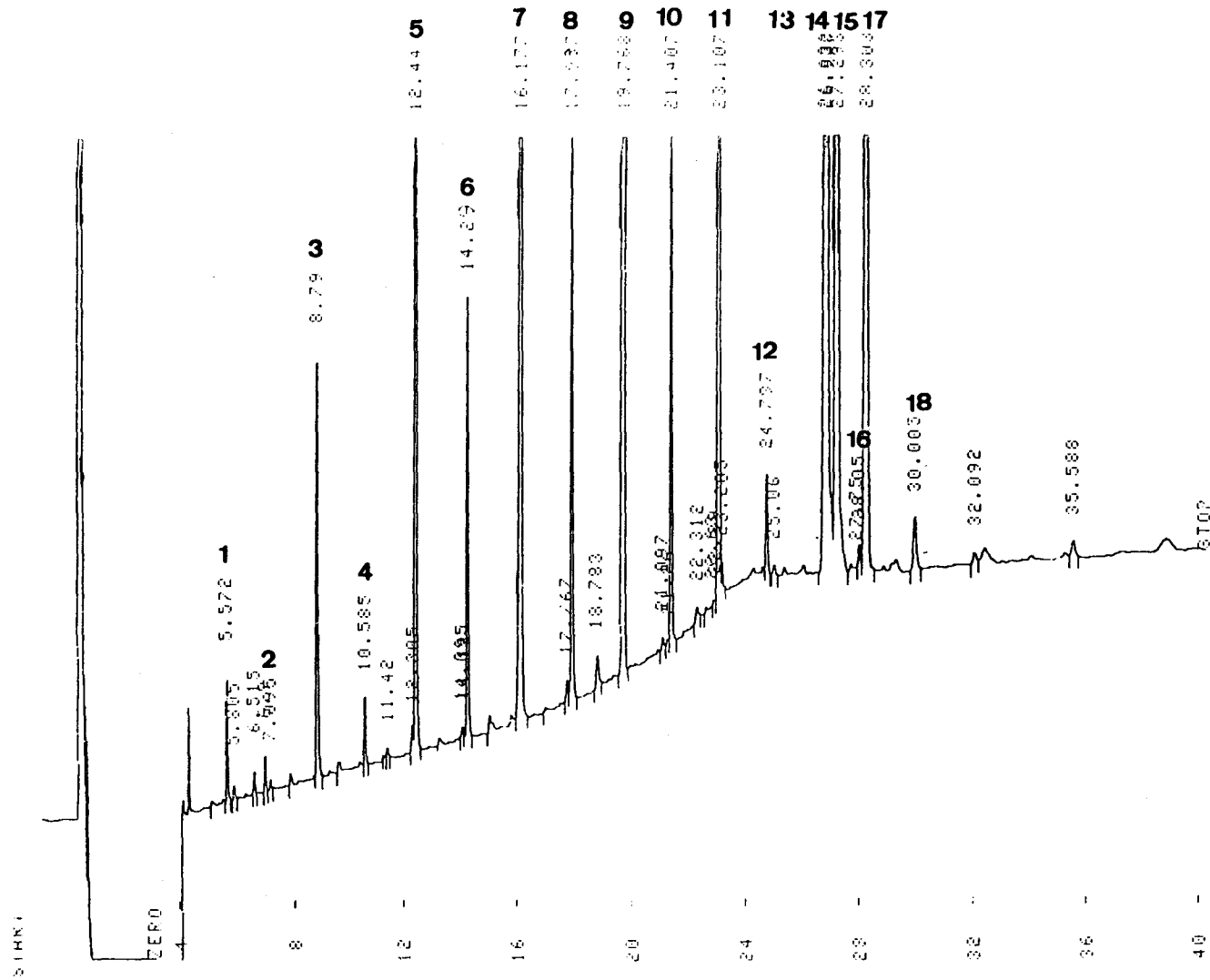


Fig. 9: Cromatograma de gases correspondiente a la fracción CH₁.
Fase 5% Fenil-metilsilicona

- Cromatografía de gases-Espectrometría de masas:

Los datos correspondientes al espectro de masas de los derivados silanizados, de los componentes de CH₁ se expresan a continuación. Los números entre paréntesis indican las abundancias relativas en %:

P₁ - m/z 327 (M⁺-15,100), 103 (29), 83 (21), 76 (68), 57 (28), 43 (34).

P₂ - m/z 341 (M⁺-15,70), 97 (10), 69 (15), 57 (21), 55 (25), 43 (100),
41 (75).

P₃ - m/z 355 (M⁺-15,100), 103 (31), 83 (14), 75 (72), 57 (32), 43 (20).

P₄ - m/z 369 (M⁺-15,85), 97 (45), 69 (42), 57 (74), 55 (80), 43 (100),
41 (65).

P₅ - m/z 383 (M⁺-15,100), 103 (30), 83 (23), 75 (74), 57 (30), 43 (33).

P₆ - m/z 397 (M⁺-15,70), 97 (68), 69 (61), 57 (85), 55 (91), 43 (100),
41 (78).

P₇ - m/z 411 (M⁺-15,100), 103 (35), 83 (27), 75 (70), 57 (36), 43 (32).

P_8 - m/z 425 ($M^+ - 15, 93$), 97 (22), 69 (95), 57 (99), 55 (100), 53 (76),
41 (71).

P_9 - m/z 439 ($M^+ - 15, 100$), 103 (43), 83 (33), 75 (79), 57 (48), 43 (43).

P_{10} - m/z 453 ($M^+ - 15, 75$), 97 (57), 69 (63), 57 (98), 55 (100), 43 (82),
41 (60).

P_{11} - m/z 467 ($M^+ - 15, 100$), 103 (19), 83 (13), 75 (36), 57 (4), 43 (16).

P_{12} - m/z 481 ($M^+ - 15, 69$), 97 (62), 69 (66), 57 (98), 55 (100), 43 (80),
41 (62).

P_{13} - m/z 495 ($M^+ - 15, 100$), 103 (33), 83 (30), 75 (61), 57 (81), 43 (95).

P_{14} - m/z 498 ($M^+, 3$), 483 (1), 218 (100), 135 (6), 69 (16) (Fig. 10).

P_{15} - m/z 498 ($M^+, 23$), 483 (37), 393 (72), 203 (16), 189 (22), 145 (35),
109 (60), 95 (42), 69 (100) (Fig. 11).

P_{16} - m/z 512 ($M^+, 3$), 497 (14), 483 (19), 393 (47), 339 (7), 271 (7), 189
(17), 69 (100) (Fig. 12).

P_{17^-} m/z 498 (M^+ ,2), 483 (31), 408 (96), 393 (99), 286 (26), 189 (26),
175 (40), 135 (51), 109 (53), 95 (76), 69 (100), 55 (78) (Fig.13)

La interpretación e identificación de los espectros, se realiza por comparación con los contenidos en la librería correspondiente del banco de datos (NBSLIB2).

En las figuras 10, 11, 12 y 13 se muestran los espectros de masas correspondientes a los picos P_{14} , P_{15} , P_{16} y P_{18} respectivamente.

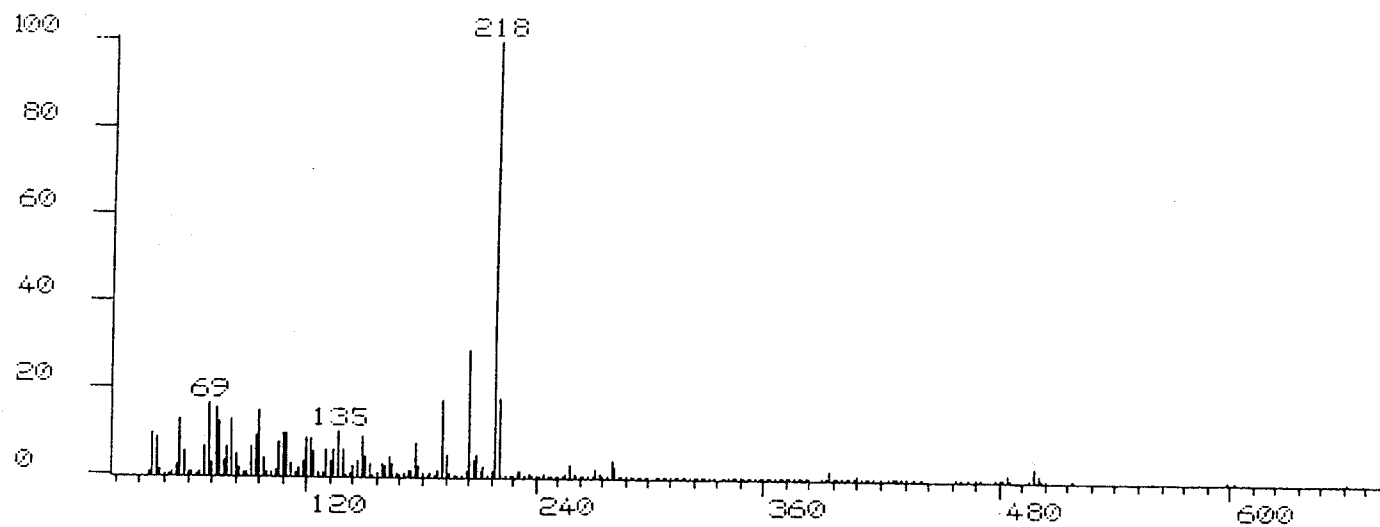


Fig. 10: E.M. correspondiente al P₁₄



Fig. 11: E.M. correspondiente al P₁₅

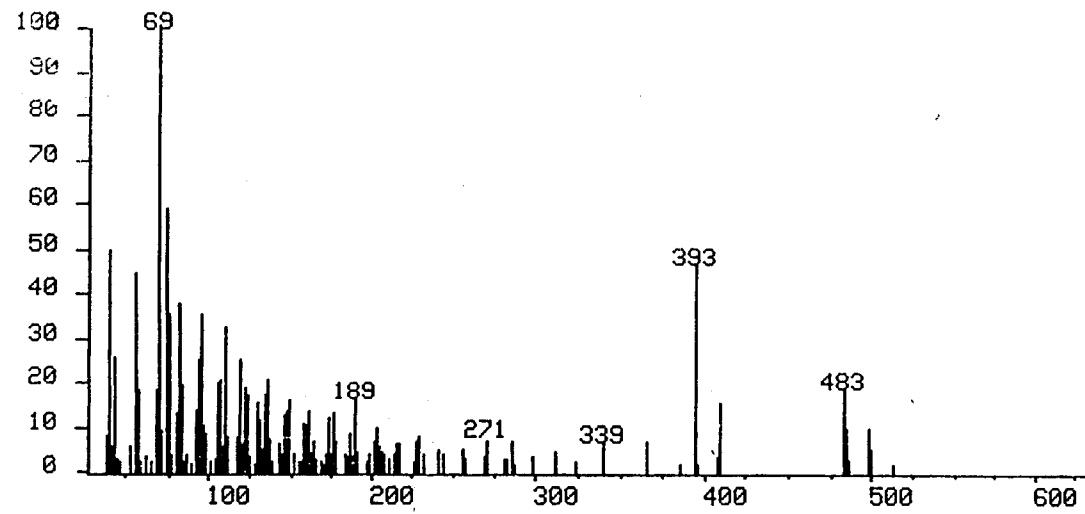


Fig. 12: E.M corrispondente al P_{16}



Fig. 13: E.M correspondiente al P₁₇

Discusión de resultados

Los resultados anteriores nos han llevado a la identificación de los siguientes compuestos:

P₁: Alcohol alifático de 18 átomos de carbono (C₁₈H₃₈O): OCTADECANOL-1

P₂: Alcohol alifático de 19 átomos de carbono (C₁₉H₄₀O): NONADECANOL-1

P₃: Alcohol alifático de 20 átomos de carbono (C₂₀H₄₂O): ICOSANOL-1

P₄: Alcohol alifático de 21 átomos de carbono (C₂₁H₄₄O): HENICOSANOL-1

P₅: Alcohol alifático de 22 átomos de carbono (C₂₂H₄₆O): DOCOSANOL-1

P₆: Alcohol alifático de 23 átomos de carbono (C₂₃H₄₈O): TRICOSANOL-1

P₇: Alcohol alifático de 24 átomos de carbono (C₂₄H₅₀O): TETRACOSANOL-1

P₈: Alcohol alifático de 25 átomos de carbono (C₂₅H₅₂O): PENTACOSANOL-1

P₉: Alcohol alifático de 26 átomos de carbono (C₂₆H₅₄O): HEXACOSANOL-1

P₁₀: Alcohol alifático de 27 átomos de carbono (C₂₇H₅₆O): HEPTACOSANOL-1

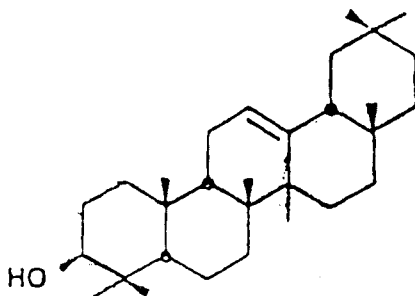
P₁₁: Alcohol alifático de 28 átomos de carbono (C₂₈H₅₈O): OCTACOSANOL-1

P₁₂: Alcohol alifático de 29 átomos de carbono (C₂₉H₆₀O): NONACOSANOL-1

P₁₃: Alcohol alifático de 30 átomos de carbono (C₃₀H₆₂O): TRIACONTANOL-1

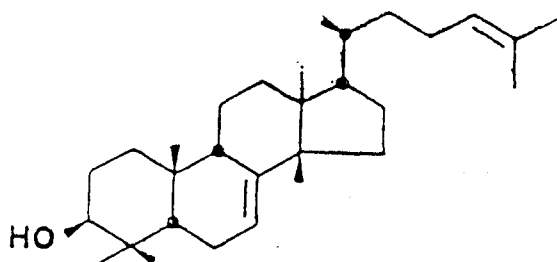
Los alcoholes alifáticos se encuentran en la mezcla en una proporción del 74,41%, constituyendo los principios mayoritarios.

P₁₄: La medida exacta de la masa, medida a resolución 10.000, nos da para el ión molecular a m/z 498 la fórmula empírica C₃₀H₄₉OSi-(CH₃)₃. El pico base a m/z 218 (Fig. 10) nos indica que se trata de un triterpeno perteneciente a la serie oleano. Estos datos, junto a otros recogidos en la bibliografía consultada (Kornfeldt, A. y colbs.; 1981), nos llevan a la conclusión de que se trata del compuesto Olean-12-en-3β-ol denominado β-AMIRINA.



La β -Amirina ha sido identificada con anterioridad en otras especies de este género: Viscum liquindabanicola Hayata (Chiung-Sheve Chen; 1973), Viscum multinerve Hayata (Lin, J-H.; 1979) y Viscum album L. (Delaveau, P.; 1980).

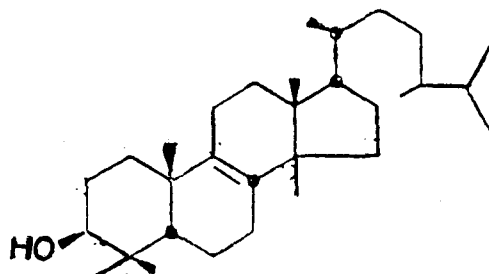
P₁₅: La medida exacta de la masa, medida a resolución 10.000, nos muestra el ión molecular a m/z 498 correspondiéndole la fórmula empírica: C₃₀H₄₉OSi-(CH₃)₃. Los iones en los que se fragmenta esta molécula así como su pico base nos orienta que este compuesto es el 3 β -lanosta 8,24-dien, 3-ol, conocido como BUTIROESPERMOL (Itoh, T. y cols.; 1981).



No hemos encontrado bibliografía referente a la existencia de este compuesto en este género.

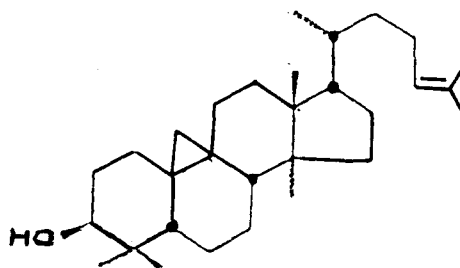
P₁₆: La medida exacta de la masa, medida a resolución 10.000 para este compuesto silanizado nos muestra el ión molecular a m/z 512, al que le corresponde la fórmula empírica C₃₁H₅₁OSi-(CH₃)₃. La fragmentación de la molécula corresponde a la de un triterpeno tetracíclico, y

consultando la bibliografía proponemos que se trata del 24-METILEN,24-DIHIDROLANOSTEROL (24-metilen-5 α -Lanost-8-en-3 β -ol)(Kornfeldt, A. y colbs.; 1981).



Este compuesto no ha sido aislado con anterioridad en ninguna especie de este género.

P₁₇: La medida exacta de la masa, realizada a resolución 10.000, nos dá para el ión molecular a m/z 498 la fórmula empírica C₃₀H₄₉OSi-(CH₃)₃. El pico a m/z 175 se corresponde con el ión (C₁₃H₁₉)⁺, y el m/z 109 con el (C₈H₁₃)⁺. Proponemos que se trata del 9 β ,19-ciclo-5 α ,9 β -lanost-24-ene-3 β -ol, descrito con el nombre de CICLOARTENOL (Kornfeldt, A. y colbs.; 1981).



Este derivado terpénico no se había puesto de manifiesto anteriormente en ninguna especie de *Viscum*.

El cromatograma de gases muestra la existencia de un compuesto que se corresponde con el pico número 18 que no ha sido identificado.

III.2.4.2.d. Identificación del compuesto DH₁

Este compuesto ha sido aislado por cromatografía en capa fina preparativa de gel de sílice utilizando como fase móvil n-Hexano/Acetato de etilo (60:40).

Resultados

- **Punto de fusión:** 140-141°C.

- **Cromatografía en capa fina:**

Los valores de R_f y coloraciones obtenidos en el estudio cromatográfico fueron los siguientes:

| <u>Compuestos</u> | <u>Fases móviles</u> | <u>R_f</u> | <u>Coloración (Oleum)</u> |
|-------------------|----------------------------------|----------------------|---------------------------|
| DH ₁ | n-Hexano/Eter etílico (60:40) | 0,20 | Púrpura-morada |
| β-Sitosterol | n-Hexano/Eter etílico (60:40) | 0,20 | Púrpura-morada |
| DH ₁ | n-Hexano/Cloroformo (30:70) | 0,06 | Púrpura-morada |
| β-Sitosterol | n-Hexano/Cloroformo (30:70) | 0,06 | Púrpura-morada |

-Espectroscopía U.V (realizada en Cloroformo):

U.V.: λ (máx.): 236 nm, 262 nm. (s.h.) (Fig. 14).

- Espectrometría de masas: E.M. m/z (%):

414 (M^+ ,25), 381 (11), 145 (36), 95 (50), 81 (68), 69 (52), 55 (86), 43
(100) (Fig. 15).

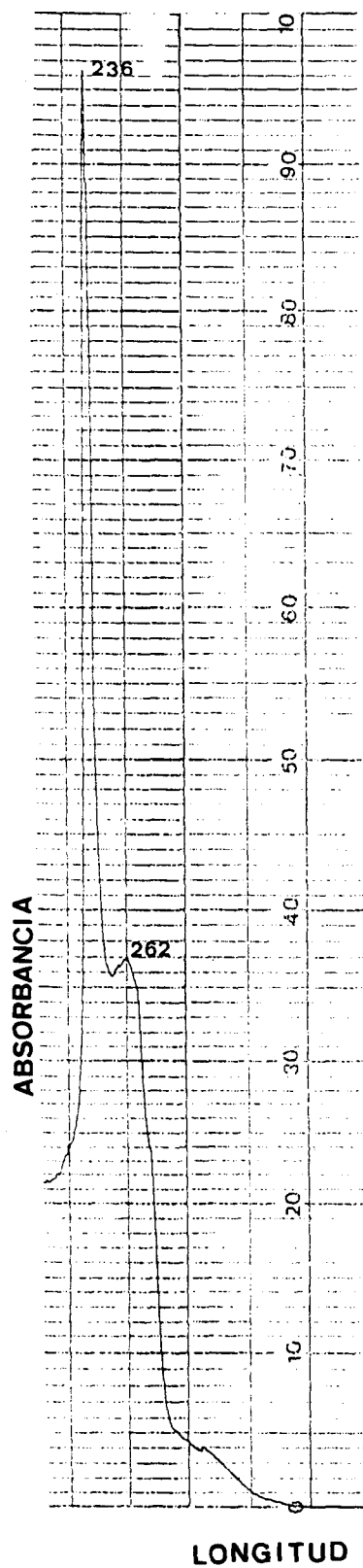


Fig. 14: Espectro U.V. correspondiente al compuesto DH₁

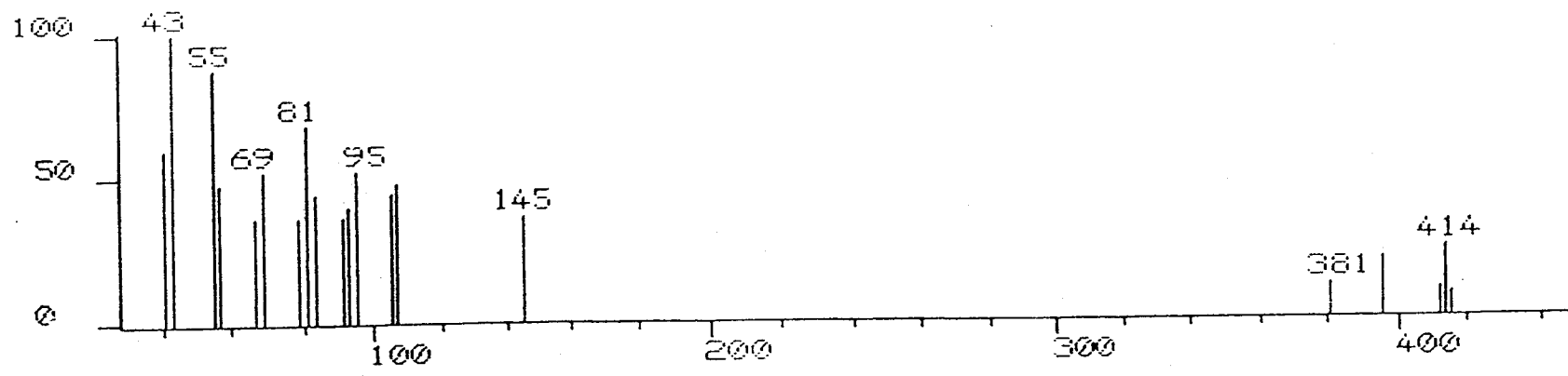


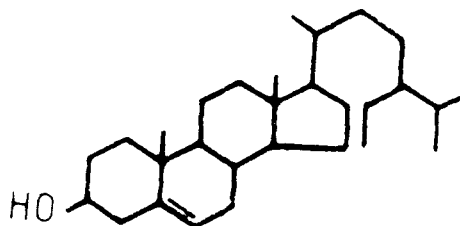
Fig. 15: E.M. correspondiente al compuesto DH_1

Discusión de resultados

Los valores de Rf y coloraciones obtenidos en los ensayos cromatográficos realizados con el compuesto DH₁, coinciden con los encontrados en bibliografía (Itoh, T. y colbs.; 1981), (Kornfeldt, A. y colbs.; 1981) y con los correspondientes al patrón utilizado, β-Sitosterol.

El E.M. de alta resolución muestra el ión molecular a m/z 414 al que le corresponde la fórmula empírica C₂₉H₅₀O.

Estos resultados nos dan idea de que se trata del β-SITOSTEROL, cuya estructura es:



Este compuesto fue aislado por Chiung-Sheve Chen en 1973 en la especie Viscum liquidambaricum, sin embargo, no hemos encontrado referencias bibliográficas referentes al aislamiento de este compuesto en Viscum cruciatum Sieber con anterioridad.

III.2.4.2.e. Identificación del compuesto EH₁

Este compuesto fue separado de sus fracciones correspondientes mediante cromatografía en capa fina preparativa de silicagel, utilizando como fase móvil n-Hexano/Eter etílico (20:80).

- Resultados y Discusión

El punto de fusión, R_fs, espectro U.V. y espectro de masas de este compuesto coinciden con los del precipitado A₁ (aptdo: III.2.4.1.a.) y con los del compuesto BH₁ (aptdo: III.2.4.2.b.), identificados como ACIDO URSOLICO.

III.2.5. ESTUDIO DE CRATAEGUS MONOGYNA JACQ.

PARASITADO POR VISCUM CRUCIATUM SIEBER.

III.2.5.1. ESTUDIO DEL PRECIPITADO A₂

Del extracto hexanoico se obtuvo un precipitado amorfo de color blanco de peso 0,23g (0,05%), que sometido a estudio cromatográfico en capa fina resultó ser un solo compuesto que denominamos A₂.

III.2.5.1.a. Resultados

Los datos físicos, cromatográficos y espectrales del compuesto A₂ se corresponden con los del denominado A₁ (aptdo. III.2.4.1.a.).

III.2.5.1.b. Discusión de resultados

Según el comportamiento cromatográfico y espectral, hemos identificado este compuesto como ACIDO URSOLICO.

Este compuesto ha sido aislado e identificado anteriormente en Crataegus monogyna Jacq. (Bezanguer-Beauquesne, L. y colbs.; 1990), (Van Hellemont, J.; 1986).

III.2.5.2. ESTUDIO DEL EXTRACTO HEXANOICO (H₂)

El extracto hexanoico (H₂) fue concentrado a presión reducida hasta residuo seco y posteriormente se separaron los distintos componentes por cromatografía en columna de gel de sílice.

Como eluyentes se emplearon: n-Hexano/Cloroformo, Cloroformo y Cloroformo/Acetato de etilo a distintas proporciones.

En esta columna se obtuvieron 436 fracciones que se agruparon según su comportamiento cromatográfico. Los resultados se recogen en la Tabla V.

Las fracciones 151-427 reunidas, se vuelven a cromatografiar en columna de gel de sílice, utilizando como eluyentes: n-Hexano/Eter etílico a distintas proporciones, obteniéndose 105 fracciones, que se agrupan según su comportamiento cromatográfico. Los resultados se recogen en la Tabla VI.

| FRACCIONES | ELUYENTES | OBSERVACIONES |
|-------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 1-43 | n-Hexano/Cloroformo (80:20) | Mezclas |
| 44-98 | n-Hexano/Cloroformo (80:20) | Mezclas |
| 99-130 | n-Hexano/Cloroformo (80:20) | Mezclas |
| 131-132 | n-Hexano/Cloroformo (60:40) | Mezclas |
| 133-148 | n-Hexano/Cloroformo (60:40) | Mezclas |
| 149-150 | n-Hexano/Cloroformo (40:60) | Mezclas |
| 151-165 | n-Hexano/Cloroformo (30:70) | Mezclas + AH ₂ |
| 166-214 | n-Hexano/Cloroformo (10:90) | Mezclas + AH ₂ |
| 215-427 | Cloroformo/Acetato etilo (90:10) | Mezclas + AH ₂ |
| 428-436 | Cloroformo/Acetato etilo (80:20) | Mezclas + BH ₂ |

Tabla V: Desarrollo de la columna correspondiente al extracto hexanoico de Crataegus monogyna parasitado (H₂).

| FRACCIONES | ELUYENTES | OBSERVACIONES |
|-------------------|----------------------------------|---|
| 1-3 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 4-7 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 8-12 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | AH ₂ |
| 13-17 | n-Hexano/Eter etílico (60:40) | Mezclas + AH ₂ + CH ₂ |
| 18-23 | n-Hexano/Eter etílico (60:40) | Mezclas |
| 24-27 | n-Hexano/Eter etílico (60:40) | Mezclas + DH ₂ |
| 28-35 | n-Hexano/Eter etílico (60:40) | Mezclas |
| 36-61 | n-Hexano/Eter etílico (50:50) | Mezclas |
| 62-67 | n-Hexano/Eter etílico (40:60) | Mezclas |
| 68-87 | n-Hexano/Eter etílico (40:60) | Mezclas |
| 88-105 | n-Hexano/Eter etílico (50:50) | Mezclas |

Tabla VI: Desarrollo de la columna correspondiente a las fracciones 151-427.

III.2.5.2.a. Identificación de la fracción AH₂

La fracción denominada AH₂ precipitó en forma de cristales de color blanco y su proporción en la droga corresponde al 0,09%.

El estudio cromatográfico por capa fina nos orienta a la presencia de un solo componente, sin embargo las técnicas espectroscópicas nos indicaron que se trataba de varios componentes de R_f semejantes.

Resultados

- Cromatografía de gases.

Procedimos a realizar una cromatografía en fase gaseosa, siguiendo las condiciones experimentales del apartado III.2.4.2.c..

El cromatograma obtenido se presenta en la figura 16.

Los datos correspondientes a la cromatografía gaseosa de cada uno de los picos detectados (t_R y porcentajes de Area) se detallan a continuación.

Los datos obtenidos nos indican que se trata de una mezcla muy compleja de compuestos donde hay un compuesto mayoritario ($t_R = 27,31$).

| <u>PICOS</u> | <u>t_R</u> | <u>Area Relativa(%)</u> |
|--------------|----------------------|-------------------------|
| 1 | 6,55 | 0,09 |
| 2 | 7,70 | 0,02 |
| 3 | 8,86 | 0,43 |
| 4 | 10,01 | 0,05 |
| 5 | 11,80 | 1,53 |
| 6 | 13,63 | 0,18 |
| 7 | 15,46 | 2,85 |
| 8 | 17,24 | 0,21 |
| 9 | 18,98 | 1,59 |
| 10 | 20,68 | 0,10 |
| 11 | 22,32 | 0,63 |
| 12 | 23,48 | 0,20 |
| 13 | 25,82 | 1,32 |
| 14 | 26,05 | 0,45 |
| 15 | 26,20 | 7,77 |
| 16 | 26,97 | 2,69 |
| 17 | 27,31 | 79,47 |
| 18 | 29,34 | 0,20 |
| 19 | 33,78 | 0,21 |

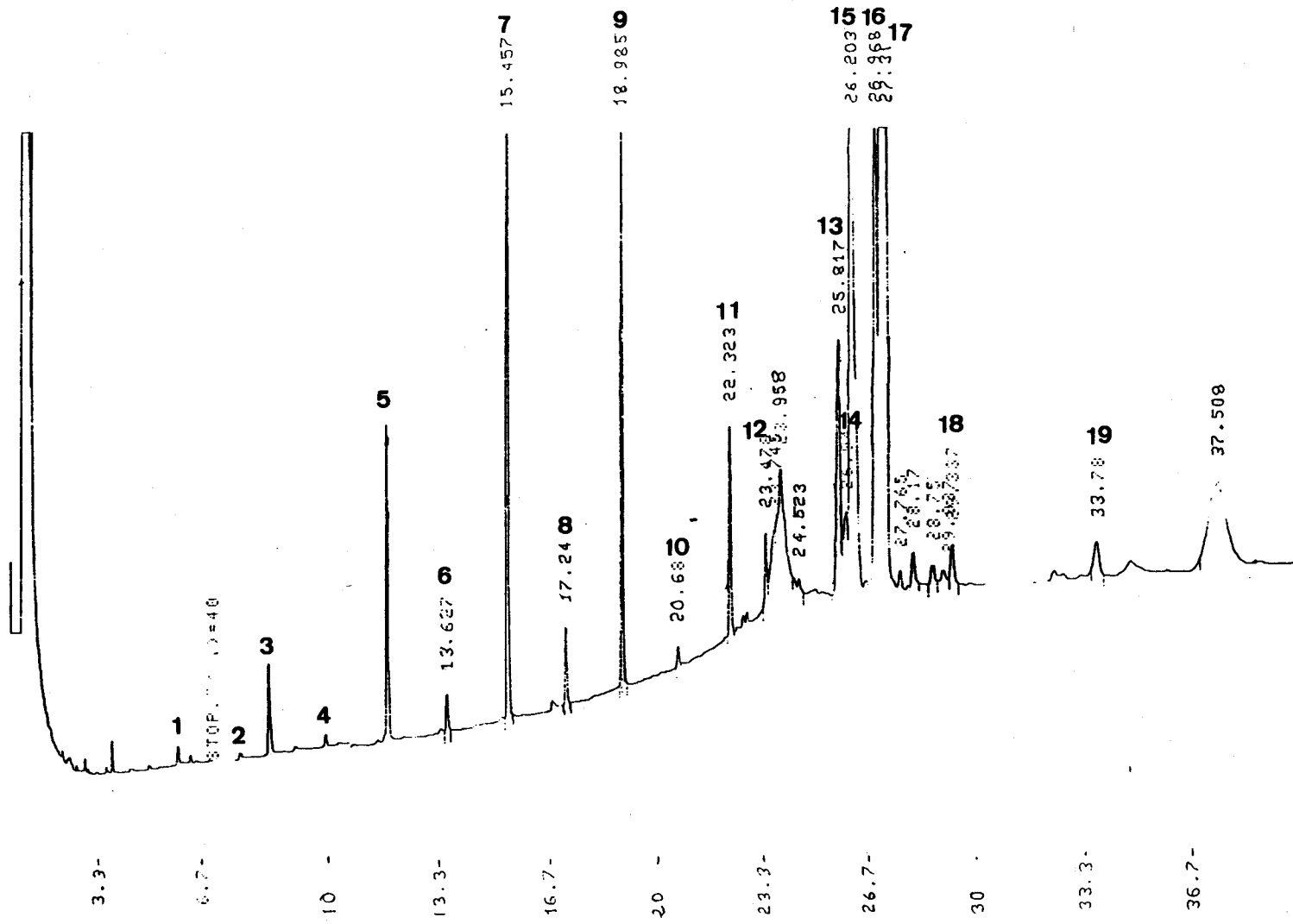


Fig. 16: Cromatograma de gases correspondiente a la fracción AH₁. Fase 5% Fenil-metilsilicona.

- Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.

Los datos correspondientes a los espectros de masas de los compuestos silanizados P₁-P₁₇ de la fracción AH₂, se corresponden con los de los compuestos P₁-P₁₇ de Viscum cruciatum Sieber (apdo. III.2.4.2.c.).

Discusión de resultados

La unión de la cromatografía gaseosa-espectrometría de masas nos ha permitido separar 19 componentes de los cuales los picos 1-13, han sido identificados como alcoholes alifáticos de 18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29 y 30 átomos de carbono.

El **pico 14** ha sido identificado como la β -AMIRINA.

El **pico 15** como el BUTIROESPERMOL.

El **pico 16** como 24 METILEN-24-DIHIDROLANOSTEROL.

EL **pico 17** como el CICLOARTENOL.

El componente mayoritario de la mezcla es el CICLOARTENOL (79,47%), estando los alcoholes alifáticos en una proporción del 9,20%.

El cromatograma en fase gaseosa nos muestra la existencia de dos compuestos que se corresponden con los picos 18 y 19 que no han sido identificados.

Consultando la bibliografía , no hemos encontrado ninguna referencia de que estos compuestos hayan sido identificados anteriormente en Crataegus monogyna Jacq.

III.2.5.2.b. Identificación del compuesto BH₂

El compuesto denominado BH₂ se aisló por cromatografía preparativa de silicagel, utilizando como fase móvil n-Hexano/Eter etílico (20:80).

- Resultados y Discusión

Los datos físicos, cromatográficos y espectrales de este compuesto, son los mismos que los del precipitado denominado A₂ (aptdo. III.2.5.1.), identificado como ACIDO URSOLICO.

III.2.5.2.c. Identificación del compuesto CH₂

Este compuesto fue separado de sus fracciones por cromatografía en capa fina preparativa de gel de sílice, utilizando como fase móvil n-Hexano/Eter etílico (50:50).

Resultados y Discusión de resultados

Los datos de punto de fusión, cromatográficos u espectrales del compuesto denominado CH₂ se corresponden con el denominado DH₁ (aptdo. III.2.4.2.d.) identificado como β-SITOSTEROL.

El β-Sitosterol no es la primera vez que se describe en esta especie (Van Hellemont, J.; 1986).

III.2.5.d. Identificación del compuesto DH₂

- Resultados y Discusión

Los datos físicos, cromatográficos y espectrales del compuesto DH₂, aislados de las fracciones 24-27 por cromatografía preparativa se superponen con los del ACIDO URSOLICO (aptdo. III.2.5.1.a.).

III.2.6. ESTUDIO DE CRATAEGUS MONOGYNA JACQ. SIN PARASITAR

III.2.6.1. ESTUDIO DEL PRECIPITADO A₃

El compuesto denominado A₃ precipitó durante el proceso extractivo en forma de polvo amorfo blanco de peso 0,12g (0,025%).

III.2.6.1.a. Resultados y Discusión de resultados

Los datos cromatográficos, físicos y espectrales, coinciden con los obtenidos para los compuestos A₁ (aptdo. III.2.4.1.) y A₂ (III.2.5.1.) identificado como ACIDO URSOLICO..

III.2.6.2. ESTUDIO DEL EXTRACTO HEXANOICO (H₃)

El extracto hexanoico H₃ fue concentrado a presión reducida hasta residuo seco y posteriormente realizado el estudio del mismo en columna de gel de sílice.

Los eluyentes usados fueron: n-Hexano, n-Hexano/Cloroformo, Cloroformo y Cloroformo/Acetato de etilo a distintas proporciones.

Se obtuvieron 323 fracciones que reunimos según su comportamiento cromatográfico (Tabla VII).

Reunimos las fracciones 120-143 y montamos una nueva columna utilizando como eluyentes: n-Hexano y n-Hexano/Eter etílico a distintas proporciones. Se obtuvieron 114 fracciones, que se agruparon según su comportamiento cromatográfico como muestra la Tabla VIII.

| FRACCIONES | ELUYENTES | OBSERVACIONES |
|-------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 3-12 | n-Hexano/Cloroformo (70:30) | Mezclas |
| 13-25 | n-Hexano/Cloroformo (70:30) | Mezclas |
| 26-75 | n-Hexano/Cloroformo (70:30) | Mezclas |
| 76-90 | n-Hexano/Cloroformo (70:30) | Mezclas |
| 91-119 | n-Hexano/Cloroformo (50:50) | Mezclas |
| 120-127 | n-Hexano/Cloroformo (50:50) | Mezclas |
| 128-143 | n-Hexano/Cloroformo (50:50) | Mezclas |
| 144-190 | Cloroformo/Acetato etilo (80:20) | Mezclas |
| 191-265 | Cloroformo/Acetato etilo (80:20) | Mezclas + AH ₃ |
| 266-316 | Cloroformo/Acetato etilo (80:20) | Mezclas + AH ₃ |
| 317-318 | Cloroformo/Acetato etilo (80:20) | Mezclas |
| 319-321 | Cloroformo/Acetato etilo (60:40) | Mezclas |
| 322-323 | Cloroformo/Acetato etilo (60:40) | Mezclas |

Tabla VII: Desarrollo de la columna correspondiente al extracto hexanoico de Crataegus monogyna sin parasitar (H₃).

| FRACCIONES | ELUYENTES | OBSERVACIONES |
|-------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 1-11 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 12 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 13-14 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 15-17 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 18-20 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 21 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas |
| 22-27 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | BH ₃ |
| 28-29 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas + BH ₃ |
| 30-31 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas + CH ₃ |
| 32-34 | n-Hexano/Eter etílico (70:30) | Mezclas + CH ₃ |
| 35-44 | n-Hexano/Eter etílico (60:40) | Mezclas |
| 45-53 | n-Hexano/Eter etílico (60:40) | Mezclas |
| 54-68 | n-Hexano/Eter etílico (60:40) | Mezclas + DH ₃ |
| 69-86 | n-Hexano/Eter etílico (50:50) | Mezclas + DH ₃ |
| 87-108 | n-Hexano/Eter etílico (40:60) | Mezclas + DH ₃ |
| 109-114 | n-Hexano/Eter etílico (40:60) | Mezclas |

Tabla VIII: Desarrollo de la columna correspondiente a las fracciones 120-143

III.2.6.2.a. Identificación del compuesto AH₃

Este compuesto obtenido de las fracciones 191-316 de la columna inicial fue aislado por cromatografía en capa fina preparativa de silicagel, utilizando como fase móvil n-Hexano/Eter etílico (20:80).

- Resultados y Discusión de resultados

Los datos físicos, espectrales y cromatográficos coinciden con los obtenidos para el precipitado A₁, A₂ y A₃ (aptdo. III.2.4.1.), identificado como ACIDO URSOLICO.

III.2.6.2.b. Identificación de la fracción BH₃

La fracción denominada BH₃, precipitó en forma de cristales blancos, en una proporción del 0,14% (Tabla VIII).

El estudio cromatográfico por capa fina nos orienta a la presencia de un solo compuesto, pero las técnicas espectroscópicas nos indicaron que se trataba de varios compuestos de R_f muy parecidos.

Resultados

- Cromatografía de gases.

Realizamos una cromatografía en fase gaseosa siguiendo las condiciones experimentales detalladas en el apartado III.2.4.2.c..

El cromatograma resultante se muestra en la figura 17.

Los datos obtenidos nos indican que se trata de una mezcla muy compleja de compuestos donde se observa la presencia de un componente mayoritario ($t_r = 26,02$ min.). Los tiempos de retención y las áreas relativas de los picos obtenidos en este análisis cromatográfico se indican a continuación:

| <u>PICOS</u> | <u>t_R</u> | <u>Area relativa(%)</u> |
|--------------|----------------------|-------------------------|
| 1 | 3,48 | 0,03 |
| 2 | 5,19 | 0,02 |
| 3 | 7,19 | 0,03 |
| 4 | 10,69 | 0,39 |
| 5 | 12,52 | 0,08 |
| 6 | 14,35 | 2,73 |
| 7 | 16,14 | 0,29 |
| 8 | 17,91 | 4,61 |
| 9 | 19,56 | 0,23 |
| 10 | 21,27 | 3,05 |
| 11 | 22,47 | 0,11 |
| 12 | 22,86 | 0,40 |
| 13 | 24,57 | 2,16 |
| 14 | 24,92 | 1,29 |
| 15 | 25,60 | 3,56 |
| 16 | 26,02 | 80,87 |

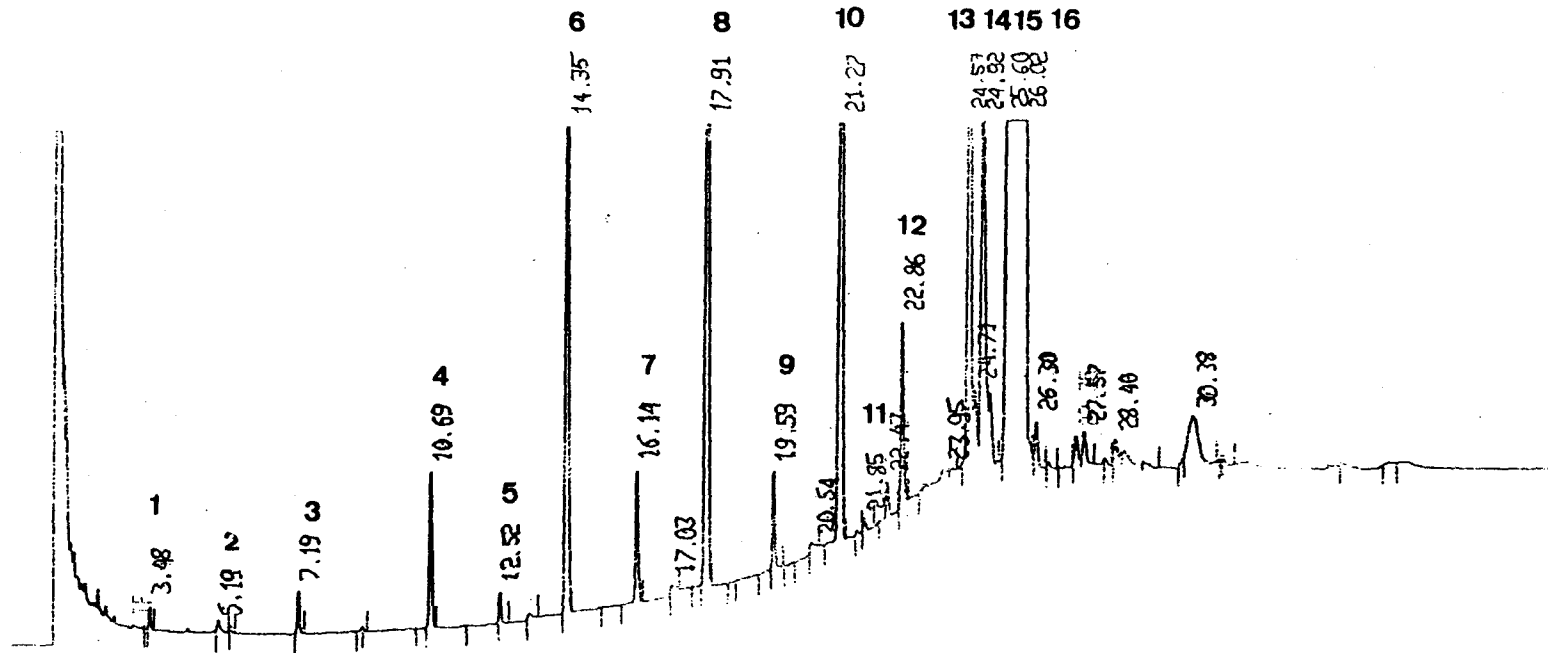


Fig. 17: Cromatograma de gases correspondiente a la fracción BH_3 .
Fase 5% Fenil-metilsilicona

- Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.

Los datos correspondientes a los espectros de masas de los compuestos silanizados P₁-P₃, P₄-P₁₀, P₁₂-P₁₃ y P₁₄-P₁₆ de Crataegus monogyna sin parasitar, se corresponden con los denominados P₁-P₃, P₅-P₁₁, P₁₂-P₁₃ y P₁₅-P₁₇ en Viscum cruciatum Sieber (aptado. III.2.4.2.c.).

Discusión de resultados

La espectrometría de masas nos orientó nuevamente hacia la identificación de los picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 13 como los alcoholes alifáticos de 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30 átomos de carbono.

El P₁₄ es el BUTIROESPERMOL.

El P₁₅ es el 24 METILEN-24-DIHIDRO LANOSTEROL.

El P₁₆ es el CICLOARTENOL.

El P₁₁ no ha sido identificado.

El componente mayoritario de esta mezcla es el CICLOARTENOL (80,87%), los alcoholes alifáticos se encuentran en una proporción del 14,02 %.

III.2.6.2.c. Identificación del compuesto CH₃

Este compuesto se aisló de la mezcla por cromatografía en capa fina preparativa de silicagel, utilizando como fase móvil n-Hexano/Eter etílico (50:50).

Resultados y Discusión de resultados

Los datos físicos, cromatográficos y espectrales de este compuesto, coinciden con los de los compuestos denominados DH₁ (aptdo. III.2.4.2.d.) y CH₂ (aptdo. III.2.5.2.c.), identificado como β-SITOSTEROL.

III.2.6.2.d. Identificación del compuesto DH₃

- Resultados y Discusión de resultados

El compuesto denominado DH₃ se aisló de la fracción correspondiente por cromatografía en capa fina preparativa de silicagel, utilizando como fase móvil n-Hexano/Eter etílico (20:80). Todos los datos físicos, espectrales y cromatográficos coinciden con los obtenidos para el ACIDO URSOLICO.

III.2.7. DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS

En los extractos hexanoicos procedentes de las tres muestras estudiadas se han identificado el ACIDO URSOLICO (A₁, A₂, A₃, BH₁, EH₁, BH₂, DH₂, AH₃ y DH₃). Este compuesto precipitó en mayor proporción en la especie Viscum cruciatum Sieber (0,29 %).

El ACETATO de β -AMIRINA (AH₁) se ha aislado del extracto hexanoico procedente de la especie Viscum cruciatum Sieber; sin embargo, no se ha identificado ni en Crataegus monogyna parasitado ni sin parasitar. Con anterioridad este compuesto fue aislado en Viscum cruciatum Sieber parásito de Prunus amygdalus Stokes (Agudo, M.A.; 1989).

El compuesto denominado β -SITOSTEROL ha sido aislado e identificado de las tres muestras en estudio (DH₁, CH₂ y CH₃). Es la primera vez que este compuesto se ha puesto de manifiesto en Viscum cruciatum Sieber, aunque ya había sido descrito con anterioridad en Crataegus monogyna Jacq. (Van Hellemont, J.; 1986).

Las fracciones CH₁, AH₂ y BH₃, han sido aisladas e identificadas como una mezcla de alcoholes alifáticos de 18 a 30 átomos de Carbono y compuestos de naturaleza terpénica, entre los que cabe destacar la presencia de BUTIROESPERMOL, 24-METILEN-24-DIHIDROLANOSTEROL y

CICLOARTENOL. La β -AMIRINA y el HENICOSANOL sólo se han identificado en Viscum cruciatum Sieber y en Crataegus monogyna Jacq. parasitado.

Mientras que en Crataegus monogyna parasitado y sin parasitar, el componente mayoritario de la fracción terpénica es el CICLOARTENOL (79,47 % y 80,87 % respectivamente), en Viscum cruciatum Sieber, este compuesto está en menor proporción (7,63%), siendo en este caso los ALCOHOLES ALIFATICOS (74,41 %) los componentes mayoritarios. En Crataegus monogyna parasitado, los alcoholes alifáticos constituyen el 9,20 % y en Crataegus monogyna sin parasitar el 14,02 %.

El BUTIROESPERMOL se encuentra en una mayor proporción en Viscum cruciatum Sieber (13,79%), mientras que el 24-METILEN-24-DIHIDROLANOSTEROL es mayoritario en Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (3,56%).

Por la bibliografía revisada hemos podido comprobar que de esta fracción terpénica no había sido aislado ni identificado ninguno de estos compuestos en ninguna de las dos especies estudiadas. Algunos hacen referencia en Crataegus monogyna Jacq., a la existencia de una crataeguslactona que parece ser una mezcla de los ácidos crataególico, ursólico y oleanólico (San Martín, R.; 1977).

III.3.- ENSAYOS FARMACOLOGICOS

III.3.1. ENSAYOS GENERALES DE TOXICIDAD

Para que un compuesto con actividad farmacológica pueda ser utilizado como medicamento, es necesario que el efecto aparezca a dosis en las que la toxicidad sea nula o mínima. Por este motivo, los ensayos de toxicidad acompañan siempre a los de actividad en la selección de nuevos fármacos.

III.3.1.1. TOXICIDAD AGUDA: DL₅₀

El ensayo más común para el estudio de la toxicidad aguda por administración única de la sustancia en estudio, es la determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀).

Se conoce como DL₅₀ aquella dosis capaz de matar, en condiciones determinadas, a la mitad de los animales de la misma especie en experimentación.

- Descripción de la técnica

El método utilizado ha sido el de MILLER y TAINTER (Miller, LL.C. y Tainter, M.C.; 1944). Consiste en experimentar sobre varios lotes de animales a los que se administran dosis crecientes de las sustancias a ensayar, de tal manera que el

porcentaje de mortalidad varíe entre 0-100 %. Transcurrido el tiempo, según la vía de administración elegida, se hace el recuento por dosis, de animales vivos y muertos de cada lote.

Con los resultados obtenidos se construye una gráfica, representando el porcentaje de mortalidad transformado en probits en función del logaritmo de la dosis (Wepierre, J.; 1977).

De esta forma la representación obtenida es una recta, sobre la que deducimos el valor de la DL_{50} por la lectura directa de la dosis correspondiente al 50 % de animales muertos (probit 5).

- **Condiciones generales de la experiencia**

Muestras ensayadas:

- **Extractos hexanoicos (H_1 , H_2 y H_3)**

Resíduos secos (r.s.) procedentes del extracto hexanoico (aptdo III.2.1.) a la dosis de 1000 y 1500 mg/Kg animal de:

* Viscum cruciatum Sieber parásito de Crataegus monogyna Jacq. (equivalente a 43,48 y 62,50 gramos de planta respectivamente).

* Crataegus monogyna Jacq. parasitado por Viscum cruciatum Sieber (equivalente a 164,49 y 246,73 gramos de planta respectivamente).

* Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (equivalente a 79,73 y 119,60 gramos de planta respectivamente).

- Fracciones terpénicas (AH₂ y BH₃) de:

* Crataegus monogyna Jacq. parasitado por Viscum cruciatum Sieber (AH₂, aptdo III.2.5.2.a.).

. 148 mg/Kg animal (164,49g planta/Kg).

. 238,2 mg/Kg animal (264,73g planta/Kg).

* Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (BH₃, aptdo III.2.6.2.b.).

. 111,6 mg/Kg animal (79,73g planta/Kg).

. 167,4 mg/Kg animal (119,60g planta/Kg).

Reactivo animal

Hemos seleccionado ratones raza Swiss, de ambos sexos y peso comprendido

entre 25-30g, agrupados en lotes de 6 animales cada uno y mantenidos en ayunas 17-18h antes de cada experiencia.

Los animales fueron sometidos a observación directa durante las primeras 48h para detectar cualquier tipo de sintomatología durante dicho período.

III.3.1.1.a. **Resultados**

Los resultados obtenidos se indican en la tabla IX.

Sólo tras la administración de la dosis más alta ensayada de extracto hexanoico y fracción terpénica, los animales empiezan a manifestar síntomas de inquietud, taquicardia, erizamiento del pelo y relajación muscular en las patas traseras, sin que se produzca la muerte de ninguno de ellos y encontrándose totalmente recuperados a las 24h de la administración.

| PLANTA | DOSIS (mg/Kg de animal) | % Mortalidad |
|--|------------------------------------|---------------------|
| <u>V. cruciatum</u> | 1000 | 0 |
| Extº hexanoico(H₁) | 1500 | 0 |
| <u>C. monogyna paras.</u> | 1000 | 0 |
| Extº hexanoico(H₂) | 1500 | 0 |
| <u>C. monogyna paras.</u> | 148 | 0 |
| Fracción terpénica (AH₂) | 238,2 | 0 |
| <u>C. monogyna sin paras.</u> | 1000 | 0 |
| Extº hexanoico (H₃) | 1500 | 0 |
| <u>C. monogyna sin paras.</u> | 111,6 | 0 |
| Fracción terpénica (BH₃) | 167,4 | 0 |

Tabla IX: Valores de Toxicidad aguda correspondientes a los extractos hexanoicos y fracciones terpénicas.

III.3.1.1.b. Discusión de resultados

Los estudios de toxicidad aguda realizados pusieron de manifiesto que ambas especies son poco tóxicas, ya que serían necesarias dosis muy elevadas para que aparezcan efectos indeseables.

III.3.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOSTATICA

III.3.2.1. ENSAYOS EN CULTIVOS VEGETALES

(Meristemos de Allium cepa L.)

Un antimitótico es todo lo que dificulta la división celular, siendo ésta una de las acciones ideales que debe poseer un preparado anticanceroso.

Cuando exponemos una población de células a una sustancia o condición antimitótica, sólo podemos determinar en un exámen microscópico: 1) si las células entran o no en mitosis, y 2) en caso de que lo hagan, si su proceso hacia la telofase es normal o no.

El material experimental más apropiado es una población sincronizada de células que puedan ser estudiadas rápidamente, en lo que se refiere a las respuestas a distintos agentes en diversos estadíos del ciclo. Se han obtenido bastantes éxitos con células en cultivos de tejidos, en los que se destacan los meristemos radiculares de las plantas (Wilson, G.B.; 1969).

LEVAN y LOTFY en 1.944 introdujeron el empleo de raíces producidas por los bulbos de Allium cepa L. para el estudio de los efectos producidos por diferentes sustancias sobre el ciclo celular.

Nosotros hemos utilizado los meristemos apicales radicales de Allium cepa L. variedad denominada "francesa" debido a su fácil manejo, su gran producción de raíces, y por presentar dichos meristemos un número elevado de células en división.

III.3.2.1.a. Condiciones generales de la experiencia

Los ensayos se realizaron con los extractos hexanólicos (H₁, H₂ y H₃) de Viscum cruciatum Sieber, Crataegus monogyna Jacq. parasitado y Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar, y con las fracciones terpénicas aisladas de Crataegus monogyna parasitado y sin parasitar (AH₂ y BH₃) , a diferentes concentraciones, comparando en cada caso con un control.

Los bulbos sobre los que se realizaron las pruebas, fueron seleccionados de un tamaño medio y peso comprendido entre 20-40 g.

- Cultivo celular

Los bulbos se cultivaron en tubos de vidrio de aproximadamente 70 mL de capacidad, con agua filtrada mediante un depurador de agua Braun y renovada cada 24 h. Se hizo burbujear aire a través del mismo, utilizando una bomba de membrana Rena 101 con el fin de mantener el medio a un nivel constante de oxígeno y en permanente agitación.

Todo el sistema de cultivo se aisló dentro de una cabina a una temperatura comprendida entre 20-25°C, consiguiéndose al mismo tiempo la oscuridad necesaria para el desarrollo de las raíces. Los bulbos se colocaron de tal manera, que sólo sus bases permanecieron sumergidas en agua, manteniéndose así, hasta que sus raíces alcanzaron una longitud de 2-3cm.

- Tratamiento

Se realizó trasladando los bulbos con raíces desarrolladas a otros recipientes de cultivo conteniendo las soluciones a ensayar. Este momento se consideró "tiempo cero" o "tiempo de iniciación de las pruebas".

Las condiciones ambientales en las que se realizaron estas experiencias, fueron idénticas a las que habíamos mantenido durante el desarrollo de las raíces. Igualmente se mantuvo el sistema de aireación mediante burbujeo.

- Fijación y tinción

Transcurridos los tiempos de tratamiento, tomamos mediante pinzas 3-4 raíces de cada bulbo y se fijaron inmediatamente en la solución Carnoy (Etanol absoluto: Acido acético 3:1) (Wilson; 1971). Se procuró siempre elegir raíces bien desarrolladas, que no presentaran anomalías morfológicas visibles, y de un tamaño medio.

Todas las pruebas se realizaron con un mínimo de tres bulbos, fijándose un mínimo de seis raíces a cada uno de los tiempos indicados.

La tinción se efectuó mediante la técnica de TJIO y LEVAN con orceina acético-clorhídrica (Tjio y Levan; 1950).

Orceina (Merk)..... 2 g
Acido acético glacial.....45 mL
Agua destilada. c.s.p.....100 mL

Para preparar el colorante, la orceina se adiciona al ácido acético glacial y se lleva a ebullición a reflujo durante 10 minutos. Dejamos enfriar a temperatura ambiente y añadimos agua destilada hasta completar 100mL; después de 12h de reposo se filtra. La solución de orceina, así obtenida, tiene una concentración del 2%.

La "solución de trabajo" se obtiene añadiendo una parte de CIH 1N por cada nueve de la solución descrita anteriormente.

Las raíces previamente fijadas, se colocan en un vidrio de reloj con solución colorante hasta cubrirlas totalmente. A continuación se calienta a la llama de un mechero de alcohol, sujetándolo con unas pinzas espatuladas y haciendolo girar suavemente alrededor de la llama, hasta que la temperatura alcanza unos 50°C

aproximadamente. El control de la temperatura puede realizarse apoyando el vidrio de reloj sobre el dorso de la mano.

Dejamos enfriar durante 5 min., repitiendo posteriormente esta operación dos veces más. Finalmente se deja en reposo a temperatura ambiente durante 15-20 min.

- **Montaje de preparaciones**

Una vez teñidas las raíces por el procedimiento anteriormente descrito, se coloca una de ellas sobre un portaobjetos y con una lanceta se separa la zona correspondiente al meristemo apical radical, desechando el resto de la raíz (cofia y zona de diferenciación tisular). A continuación se añaden unas gotas de solución colorante y con la lanceta efectuamos un ligero "troceado" con el fin de facilitar la extensión del material.

Colocamos encima el cubreobjetos, y damos unos pequeños golpes sobre él para eliminar las burbujas de aire. Se extiende el material, procurando que las células meristemáticas queden distribuidas en un mismo plano (distribución en monocapa), haciendo posible un buen enfoque con el microscopio.

Las preparaciones teñidas fueron observadas y fotografiadas en un microscopio Olympus BH.

- Determinación de los índices mitóticos (I.M.) y de fase (I.F.)

El índice mitótico (I.M.) se define como el "porcentaje de células meristemáticas que en un instante dado están en división, es decir, cursan algunas de las etapas de la mitosis" (Lopez-Saez; 1965).

Se establece mediante el siguiente cociente:

$$\text{IM} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células en división}}{\text{n}^\circ \text{ células totales}} \times 100$$

Entendiéndose por n° células totales, el de las células en interfase más el de las células en división.

El índice de fase (I.F.) expresa el número de células observadas en cada una de las fases mitóticas, por cada 100 células meristemáticas en curso de división.

$$\text{IF} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células en una fase determinada}}{\text{n}^\circ \text{ células en división}} \times 100$$

Estos índices se determinaron contando un número variable de células, que

en todos los casos fue superior a 2000.

III.3.2.1.b. Muestras ensayadas

- **Extractos hexanoicos (H₁, H₂ y H₃).**

Las dosis ensayadas han sido de: 0,25 y 0,5 g de residuo seco que en los tubos de cultivo se disolvieron en 100mL de agua filtrada (para la correcta disolución de los extractos hexanóicos en agua, se utilizó Tween 80 en una proporción no superior al 10%).

- **Fracciones terpénicas (AH₂ y BH₃).**

Las dosis ensayadas fueron de 20 y 40mg, que se disolvieron en 100mL de agua filtrada en los tubos de cultivo (para su correcta disolución utilizamos Tween 80 en una proporción no superior al 10%).

En todos los casos las raíces se fijaron a las 4, 8, 24, 48, y 72h de tratamiento.

Antes de iniciar los tratamientos, se recogieron raíces que fueron fijadas como prueba control.

III.3.2.1.c. Resultados

Los valores de los índices mitóticos e índices de fases obtenidos con los extractos hexanoicos, a las diferentes dosis, se presentan en las tablas X-XV y los correspondientes a las fracciones terpénicas en las tablas XVI a XIX inclusive.

La tabla XX muestra un resumen de los valores de I.M. en los diferentes ensayos realizados.

Una representación gráfica de estos resultados se presentan en las figuras 18, 19 y 20.

En las figuras 21 y 22 se observan las células meristemáticas de Allium cepa antes y después de 72h de tratamiento con el extracto hexanoico (500mg r.s./100mL) procedente de Viscum cruciatum Sieber (H₁).

La figura 23 muestra la inhibición producida en la mitosis por la fracción terpénica aislada de Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (BH₃).

FASES MITÓTICAS

INDICES DE FASE

| <i>TIEMPO Trat.</i> | <i>Células Totales</i> | <i>Células División</i> | <i>I.M.</i> | <i>Prof</i> | <i>Metaf</i> | <i>Anaf</i> | <i>Telof</i> | <i>I.Fp</i> | <i>I.Fm</i> | <i>I.Fa</i> | <i>I.Ft</i> |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Control | 2433 | 195 | 8,01 | 117 | 23 | 13 | 42 | 60,00 | 11,79 | 6,67 | 21,54 |
| 4 h | 2318 | 188 | 8,11 | 112 | 25 | 15 | 36 | 59,57 | 13,29 | 7,98 | 19,15 |
| 8 h | 3107 | 227 | 7,31 | 143 | 29 | 16 | 39 | 62,99 | 12,77 | 7,05 | 17,18 |
| 24 h | 2161 | 126 | 5,83 | 72 | 9 | 8 | 37 | 57,14 | 7,14 | 6,35 | 29,36 |
| 48 h | 2180 | 130 | 5,96 | 68 | 15 | 9 | 38 | 52,31 | 11,54 | 6,92 | 29,23 |
| 72 h | 2362 | 132 | 5,59 | 62 | 19 | 19 | 32 | 46,97 | 14,39 | 14,39 | 24,24 |

Tabla X: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes al extracto hexanoico de Viscum cruciatum Sieber (Dosis 250 mg).

FASES MITÓTICAS

INDICES DE FASE

| <i>TIEMPO Trat.</i> | <i>Células Totales</i> | <i>Células División</i> | <i>I.M.</i> | <i>Prof</i> | <i>Metaf</i> | <i>Anaf</i> | <i>Telof</i> | <i>I.Fp</i> | <i>I.Fm</i> | <i>I.Fa</i> | <i>I.Ft</i> |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Control | 2641 | 241 | 9,12 | 115 | 41 | 22 | 63 | 47,72 | 17,01 | 9,13 | 26,14 |
| 4 h | 2545 | 185 | 7,27 | 78 | 33 | 24 | 50 | 42,16 | 17,84 | 12,97 | 27,03 |
| 8 h | 3291 | 201 | 6,11 | 91 | 32 | 30 | 48 | 45,27 | 15,92 | 14,90 | 23,88 |
| 24 h | 3075 | 165 | 5,36 | 79 | 28 | 21 | 37 | 47,88 | 16,97 | 12,73 | 22,42 |
| 48 h | 3957 | 147 | 3,71 | 79 | 31 | 13 | 24 | 53,74 | 21,09 | 8,84 | 16,32 |
| 72 h | 3875 | 85 | 2,19 | 37 | 23 | 7 | 18 | 43,53 | 27,06 | 8,23 | 21,18 |

Tabla XI: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes al extracto hexanoico de Viscum cruciatum Sieber (Dosis 500 mg).

| TIEMPO Trat. | Células Totales | Células División | FASES MITÓTICAS | | | | | INDICES DE FASE | | | |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | I.M. | Prof | Metaf | Anaf | Telof | I.Fp | I.Fm | I.Fa | I.Ft |
| Control | 1970 | 150 | 7,61 | 98 | 18 | 10 | 24 | 65,33 | 12,00 | 6,67 | 16,00 |
| 4 h | 1760 | 130 | 7,39 | 63 | 22 | 14 | 31 | 48,46 | 16,92 | 10,77 | 23,85 |
| 8 h | 2327 | 77 | 3,31 | 29 | 14 | 7 | 27 | 37,66 | 18,18 | 9,09 | 35,06 |
| 24 h | 3240 | 140 | 4,32 | 67 | 23 | 15 | 35 | 47,86 | 16,43 | 10,71 | 25,00 |
| 48 h | 4456 | 176 | 3,94 | 94 | 29 | 11 | 42 | 53,41 | 16,48 | 6,25 | 23,86 |
| 72 h | 3659 | 169 | 4,61 | 67 | 31 | 16 | 55 | 39,64 | 18,34 | 9,47 | 32,54 |

Tabla XII: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes al extracto hexanoico de Crataegus monogyna Jacq. parasitado por Viscum cruciatum Sieber (Dosis 250 mg).

| <i>TIEMPO Trat.</i> | <i>Células Totales</i> | <i>Células División</i> | FASES MITÓTICAS | | | | | INDICES DE FASE | | | |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | <i>I.M.</i> | <i>Prof</i> | <i>Metaf</i> | <i>Anaf</i> | <i>Telof</i> | <i>I.Fp</i> | <i>I.Fm</i> | <i>I.Fa</i> | <i>I.Ft</i> |
| Control | 2032 | 252 | 12,40 | 97 | 56 | 24 | 75 | 38,49 | 22,22 | 9,52 | 29,76 |
| 4 h | 3124 | 184 | 5,89 | 109 | 27 | 13 | 35 | 59,24 | 14,67 | 7,06 | 19,02 |
| 8 h | 3513 | 213 | 6,06 | 107 | 27 | 21 | 58 | 50,23 | 12,58 | 9,86 | 27,23 |
| 24 h | 3129 | 129 | 4,12 | 72 | 22 | 11 | 24 | 55,81 | 17,05 | 8,53 | 18,60 |
| 48 h | 2200 | 60 | 2,72 | 26 | 16 | 4 | 14 | 43,33 | 26,66 | 6,66 | 23,33 |
| 72 h | 2529 | 119 | 4,70 | 55 | 27 | 13 | 24 | 46,22 | 22,69 | 10,92 | 20,17 |

Tabla XIII: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes al extracto hexanoico de Crataegus monogyna Jacq. parasitado por Viscum cruciatum Sieber (Dosis 500 mg).

| TIEMPO Trat. | Células Totales | Células División | FASES MITÓTICAS | | | | | INDICES DE FASE | | | |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | I.M. | Prof | Metaf | Anaf | Telof | I.Fp | I.Fm | I.Fa | I.Ft |
| Control | 1938 | 168 | 8,67 | 101 | 15 | 10 | 42 | 60,12 | 8,93 | 5,95 | 25,00 |
| 4 h | 2400 | 140 | 5,83 | 76 | 22 | 11 | 31 | 54,28 | 15,71 | 7,86 | 22,14 |
| 8 h | 1962 | 152 | 7,75 | 66 | 24 | 12 | 50 | 43,42 | 15,80 | 7,89 | 32,89 |
| 24 h | 2121 | 101 | 5,00 | 46 | 17 | 13 | 25 | 45,54 | 16,83 | 12,87 | 24,75 |
| 48 h | 2213 | 113 | 5,11 | 60 | 15 | 13 | 25 | 53,10 | 13,27 | 11,50 | 22,12 |
| 72 h | 2414 | 134 | 5,55 | 55 | 31 | 15 | 33 | 41,04 | 23,13 | 11,19 | 24,63 |

Tabla XIV: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes al extracto hexanoico de Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (Dosis 250 mg).

FASES MITÓTICAS

INDICES DE FASE

| <i>TIEMPO Trat.</i> | <i>Células Totales</i> | <i>Células División</i> | <i>I.M.</i> | <i>Prof</i> | <i>Metaf</i> | <i>Anaf</i> | <i>Telof</i> | <i>I.Fp</i> | <i>I.Fm</i> | <i>I.Fa</i> | <i>I.Ft</i> |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Control | 2135 | 240 | 11,24 | 109 | 47 | 21 | 63 | 45,42 | 19,58 | 8,75 | 26,25 |
| 4 h | 2665 | 175 | 6,57 | 83 | 32 | 17 | 43 | 47,43 | 18,28 | 9,21 | 24,57 |
| 8 h | 2198 | 138 | 6,28 | 55 | 30 | 18 | 35 | 39,85 | 21,74 | 13,04 | 25,36 |
| 24 h | 2064 | 124 | 6,00 | 56 | 25 | 14 | 29 | 45,16 | 20,16 | 11,29 | 23,38 |
| 48 h | 3273 | 143 | 4,37 | 53 | 35 | 20 | 35 | 37,06 | 24,47 | 13,98 | 24,47 |
| 72 h | 1999 | 99 | 4,95 | 37 | 15 | 11 | 36 | 37,37 | 15,15 | 11,11 | 36,36 |

Tabla XV: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes al extracto hexanoico de *Crataegus monogyna* Jacq. sin parasitar (Dosis 500 mg).

FASES MITÓTICAS

INDICES DE FASE

| <i>TIEMPO Trat.</i> | <i>Células Totales</i> | <i>Células División</i> | <i>I.M.</i> | <i>Prof</i> | <i>Metaf</i> | <i>Anaf</i> | <i>Telof</i> | <i>I.Fp</i> | <i>I.Fm</i> | <i>I.Fa</i> | <i>I.Ft</i> |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Control | 2535 | 237 | 9,34 | 103 | 48 | 22 | 64 | 43,46 | 20,25 | 9,28 | 27,00 |
| 4 h | 2175 | 195 | 8,96 | 86 | 30 | 25 | 54 | 44,10 | 15,38 | 12,82 | 27,69 |
| 8 h | 2989 | 159 | 5,32 | 75 | 35 | 15 | 34 | 47,17 | 22,01 | 9,43 | 21,38 |
| 24 h | 2721 | 111 | 4,08 | 31 | 27 | 18 | 35 | 31,53 | 24,32 | 16,21 | 31,53 |
| 48 h | 2331 | 81 | 3,47 | 21 | 25 | 8 | 27 | 25,92 | 30,86 | 9,88 | 33,33 |
| 72 h | 3688 | 138 | 3,74 | 33 | 34 | 26 | 45 | 23,91 | 24,64 | 18,84 | 32,61 |

Tabla XVI: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes a la fracción terpénica de Crataegus monogyna parasitado (AH₂) (Dosis 20 mg).

FASES MITÓTICAS

INDICES DE FASE

| <i>TIEMPO Trat.</i> | <i>Células Totales</i> | <i>Células División</i> | <i>I.M.</i> | <i>Prof</i> | <i>Metaf</i> | <i>Anaf</i> | <i>Telof</i> | <i>I.Fp</i> | <i>I.Fm</i> | <i>I.Fa</i> | <i>I.Ft</i> |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Control | 2334 | 244 | 10,45 | 97 | 58 | 21 | 68 | 39,75 | 23,77 | 8,61 | 27,87 |
| 4 h | 2330 | 140 | 6,01 | 54 | 31 | 14 | 41 | 38,57 | 22,14 | 10,00 | 29,28 |
| 8 h | 2572 | 162 | 6,30 | 57 | 40 | 21 | 44 | 35,18 | 24,69 | 12,96 | 27,16 |
| 24 h | 2686 | 106 | 3,95 | 44 | 18 | 13 | 31 | 41,51 | 16,98 | 12,26 | 29,24 |
| 48 h | 2947 | 47 | 1,59 | 12 | 17 | 6 | 12 | 25,53 | 36,17 | 12,76 | 25,53 |
| 72 h | 2992 | 62 | 2,07 | 24 | 15 | 13 | 20 | 38,71 | 24,19 | 4,84 | 32,25 |

Tabla XVII: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes a la fracción terpénica de *Crataegus monogyna* parasitado (AH₂) (Dosis 40 mg).

FASES MITÓTICAS

INDICES DE FASE

| <i>TIEMPO Trat.</i> | <i>Células Totales</i> | <i>Células División</i> | <i>I.M.</i> | <i>Prof</i> | <i>Metaf</i> | <i>Anaf</i> | <i>Telof</i> | <i>I.Fp</i> | <i>I.Fm</i> | <i>I.Fa</i> | <i>I.Ft</i> |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Control | 2368 | 208 | 8,78 | 104 | 37 | 19 | 48 | 50,00 | 17,79 | 9,13 | 23,08 |
| 4 h | 2859 | 169 | 5,91 | 67 | 32 | 22 | 48 | 39,64 | 18,93 | 13,01 | 28,40 |
| 8 h | 3529 | 139 | 3,98 | 54 | 29 | 15 | 41 | 38,85 | 20,86 | 10,79 | 29,50 |
| 24 h | 3307 | 127 | 3,84 | 40 | 27 | 15 | 45 | 31,50 | 21,26 | 11,81 | 35,43 |
| 48 h | 3062 | 112 | 3,66 | 56 | 26 | 11 | 19 | 50,00 | 23,21 | 9,82 | 16,96 |
| 72 h | 3180 | 80 | 2,51 | 30 | 21 | 9 | 20 | 37,50 | 26,25 | 11,25 | 25,00 |

Tabla XVIII: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes a la fracción terpénica de Crataegus monogyna sin parasitar (BH₃) (Dosis 20 mg).

| <i>TIEMPO Trat.</i> | <i>Células Totales</i> | <i>Células División</i> | FASES MITÓTICAS | | | | | INDICES DE FASE | | | |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | <i>I.M.</i> | <i>Prof</i> | <i>Metaf</i> | <i>Anaf</i> | <i>Telof</i> | <i>I.Fp</i> | <i>I.Fm</i> | <i>I.Fa</i> | <i>I.Ft</i> |
| Control | 2355 | 205 | 8,70 | 118 | 36 | 12 | 39 | 57,56 | 17,56 | 5,85 | 19,02 |
| 4 h | 3176 | 176 | 5,54 | 93 | 35 | 10 | 38 | 52,84 | 19,89 | 5,68 | 21,59 |
| 8 h | 2595 | 95 | 3,66 | 41 | 27 | 8 | 19 | 43,16 | 28,42 | 8,42 | 20,00 |
| 24 h | 4276 | 26 | 0,60 | 20 | 1 | 0 | 5 | 76,92 | 3,85 | 0,00 | 19,23 |
| 48 h | 2000 | 0 | 0,00 | -- | -- | -- | -- | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 72 h | 2000 | 0 | 0,00 | -- | -- | -- | -- | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Tabla XIX: Valores de I.M. e I.F. a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes a la fracción terpénica de *Crataegus monogyna* sin parasitar (BH₃) (Dosis 40 mg).

| | Control | 4h. | 8h. | 24h. | 48h. | 72h. |
|---|---------|------|------|------|------|------|
| <u>Viscum cruciatum</u> (250 mg) | 8,01 | 8,11 | 7,31 | 5,83 | 5,95 | 5,59 |
| <u>Viscum cruciatum</u> (500 mg) | 9,12 | 7,27 | 6,11 | 5,36 | 3,71 | 2,19 |
| <u>Crataegus monogyna</u> paras. (250 mg) | 7,61 | 7,39 | 3,31 | 4,32 | 3,94 | 4,61 |
| <u>Crataegus monogyna</u> paras. (500 mg) | 12,4 | 5,89 | 6,06 | 4,12 | 2,72 | 4,70 |
| <u>Crataegus monogyna</u> sin paras. (250 mg) | 8,67 | 7,75 | 5,83 | 5,00 | 5,11 | 5,55 |
| <u>Crataegus monogyna</u> sin paras. (500 mg) | 11,24 | 6,67 | 6,28 | 6,00 | 4,37 | 4,95 |
| Fracción terpénica <u>C.monogyna</u> paras. (20 mg) | 9,34 | 8,96 | 5,32 | 4,08 | 3,47 | 3,74 |
| Fracción terpénica <u>C.monogyna</u> paras. (40 mg) | 10,45 | 6,01 | 6,30 | 3,95 | 1,59 | 2,07 |
| Fracción terpénica <u>C.monogyna</u> sin paras. (20 mg) | 8,78 | 5,91 | 3,94 | 3,84 | 3,66 | 2,51 |
| Fracción terpénica <u>C.monogyna</u> sin paras. (40 mg) | 8,70 | 5,54 | 3,66 | 0,60 | 0,00 | 0,00 |

Tabla XX: Valores de I.M., a diferentes tiempos de tratamiento y concentración, correspondientes a los ensayos realizados.

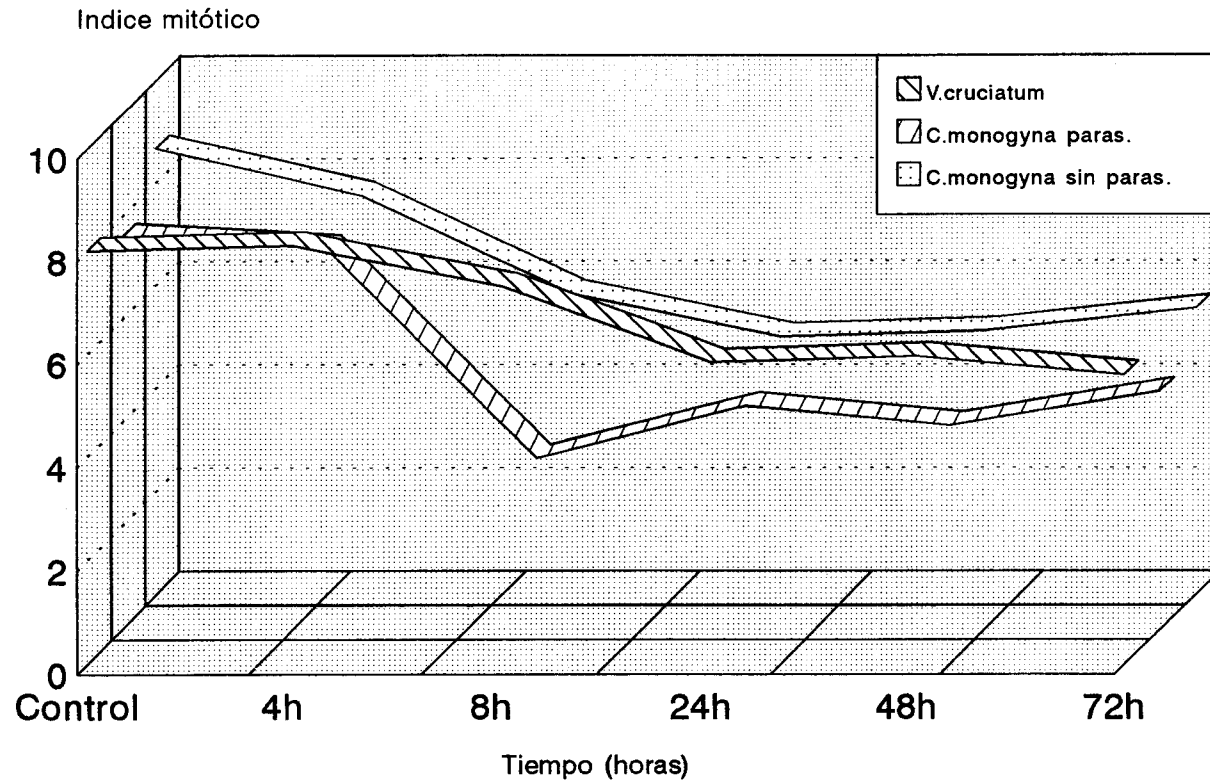


Fig. 18: Variación del I.M. con respecto al tiempo.
(Dosis: 250 mg).

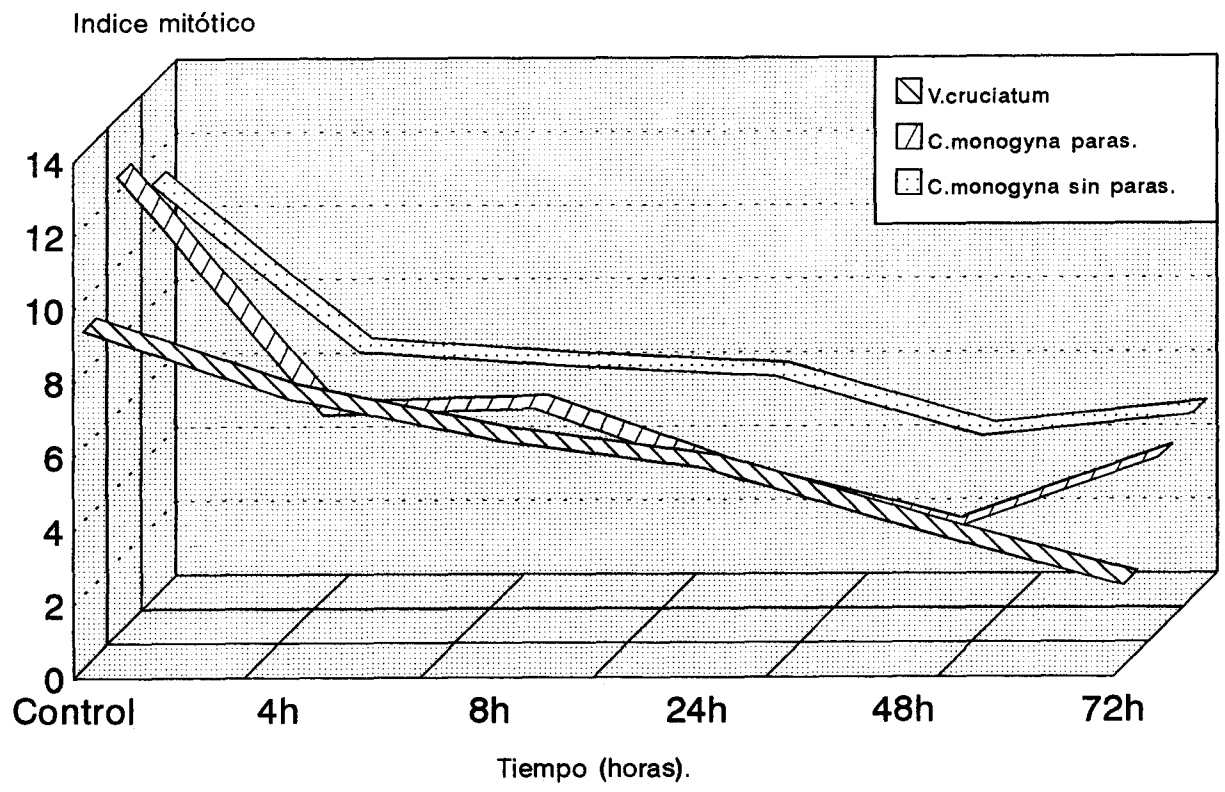


Fig. 19: Variación del I.M. con respecto al tiempo
(Dosis: 500 mg)

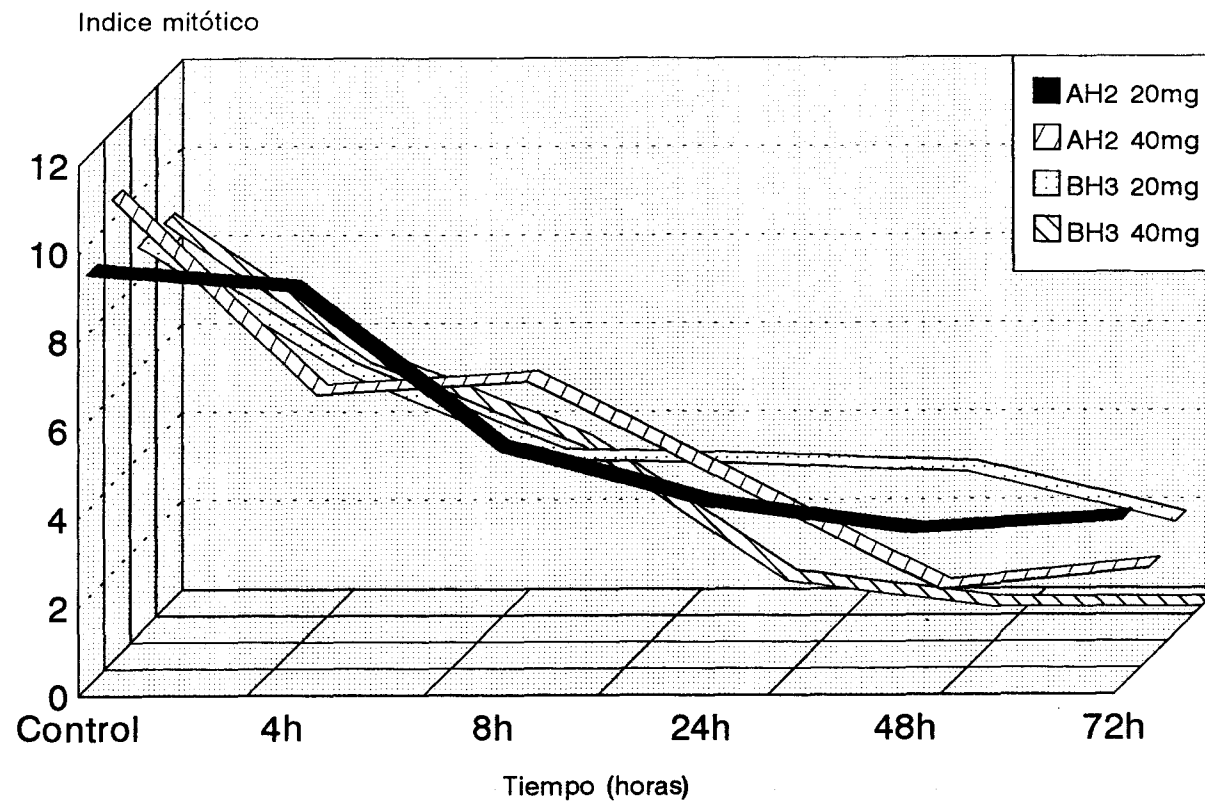


Fig. 20: Variación de los índices mitóticos con respecto al tiempo, correspondientes a las fracciones terpénicas de *C. monogyna* parasitado (AH2) y sin parasitar (BH3).

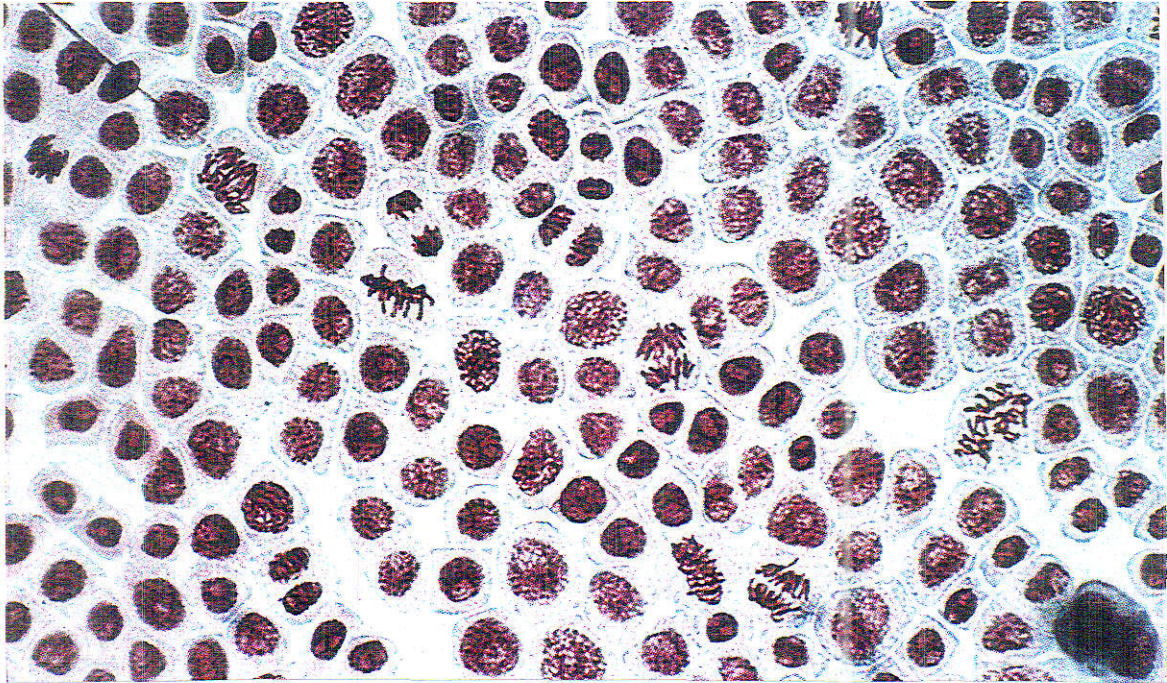


Fig. 21: Células meristemáticas de Allium cepa correspondientes a una preparación control.

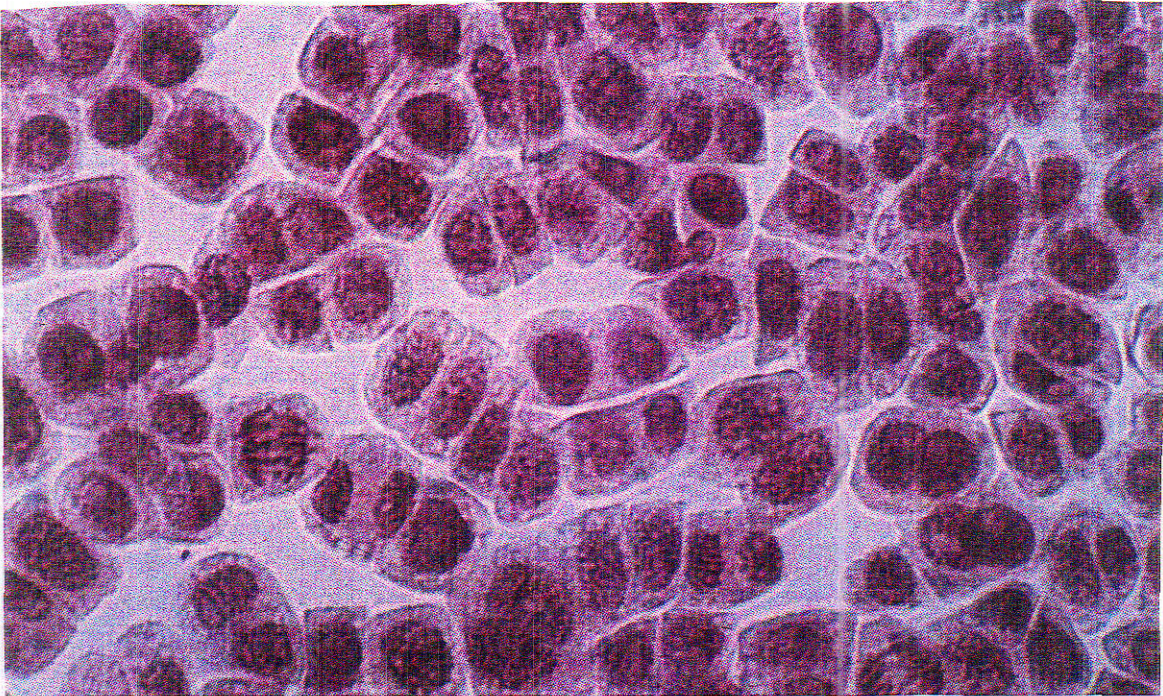


Fig. 22: Células meristemáticas de Allium cepa a las 72h de tratamiento con el extracto hexanoico de Viscum cruciatum (H₁), a la dosis de 500mg.

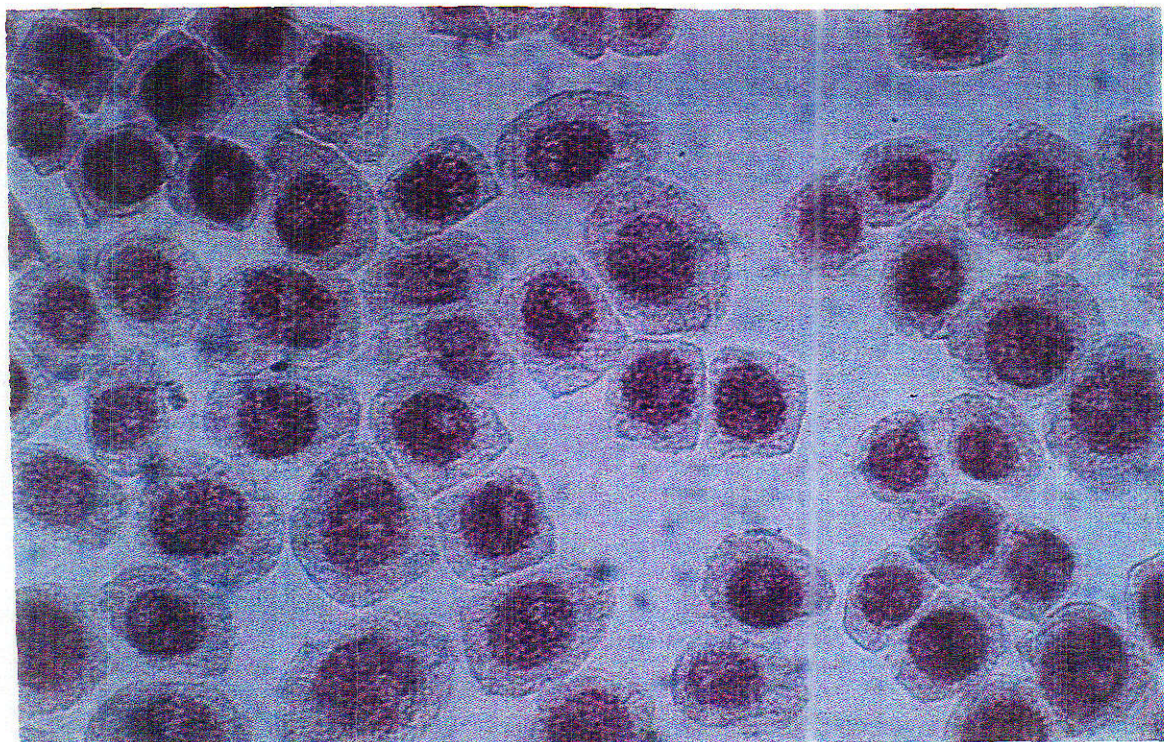


Fig. 23: Células meristemáticas de Allium cepa, a las 24h de tratamiento con la fracción terpénica de Crataegus monogyna sin parasitar (BH₃) (40mg/100mL)

III.3.2.1.d. Discusión de resultados

Los extractos hexanoicos de las tres muestras estudiadas originan un descenso de los I.M. a medida que se prolonga el tiempo de tratamiento, siendo éste más marcado en el caso de Viscum cruciatum Sieber.

Sin embargo, los resultados obtenidos con las fracciones terpénicas presentan una mayor actividad con la muestra de Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar, produciéndose una inhibición total del desarrollo del ciclo celular a partir de las 48h de tratamiento. Esta acción puede ser atribuida a un mayor contenido en derivados terpénicos en dicha muestra.

III.3.2.2.- ENSAYOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES.

(Línea celular HEP-2).

A menudo es necesario determinar la proporción de células viables en una población, ya sea, como un paso para controlar la estandarización del cultivo antes de ser usado, o para ensayar la respuesta de un cultivo ante una variable experimental en la preparación de un cultivo primario, o en el tratamiento siguiente de una línea celular con una droga citotóxica o un anticuerpo. (Freshney, R. Ian, 1983).

III.3.2.2.a.- Condiciones generales de la experiencia

- Cultivos utilizados. Preparación de subcultivos

Ensayamos la actividad citostática frente a la línea celular: células HEP-2, proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Sevilla.

Rutinariamente, las células se subcultivaron en frascos para cultivos de tejidos (Greiner Labor-technik) de 75 cm² de superficie y 250 mL de capacidad en el medio adecuado. Antes de la inoculación, 24 h, tomamos los correspondientes frascos de células que contenían una monocapa continua (generalmente se utilizaron cultivos de 3 días de crecimiento) y eliminamos el medio metabolizado.

Para dispersar las células se utilizó una solución de tripsina-verseno (T-V) previamente calentada a 37°C (para favorecer la acción enzimática de la tripsina), lavamos la monocapa con 5 mL de dicha solución con el fin de arrastrar las células desprendidas y decantamos. Añadimos nuevamente 5 mL de T-V que dejamos en contacto con las células durante un minuto aproximadamente, hasta que comienza a desprenderse la monocapa. Pasado este tiempo, retiramos el exceso de T-V y llevamos el frasco a estufa a 36°C hasta observar el total desprendimiento de las células.

A continuación se añaden 8 mL del medio de crecimiento "medio esencial mínimo de Eagle" (M.E.M.) y se dispersa la masa celular. Posteriormente resuspendemos las células en 30 mL de M.E.M., y tomamos una pequeña muestra para realizar un conteo y así saber el número de células para poder disponer del número de frascos y cantidad de medio que sea necesario. Ajustamos dicha suspensión celular a 100.000 cél./mL añadiendo la cantidad necesaria de M.E.M.

Por último, distribuimos las células en frascos de 25 cm² de superficie y 50 mL de capacidad, a razón de 5 mL por frasco, incubándolos a 36°C durante 24 h para la obtención de una monocapa continúa.

Las características de la línea celular quedan recogidas en la tabla XXI.

| | |
|---------------------------------|---|
| Establecida | Células procedentes de carcinoma epidermoide de laringe de un hombre adulto, establecidas por A.E. Moore, L. Sabachewsky y A.W. Toolan en 1952 (Cáncer Res. 15: 588, 1955). |
| Morfología | Epiteloides |
| Nº modal de cromosomas | 76(59-195) |
| Subcultivos | cada 3 días |
| Tiempo de tripsinización | 0,2 %, aproximadamente 5 minutos |
| Medio | Medio esencial mínimo de Eagle + suero bovino fetal 5 % + solución penicilina-estreptomicina (5000 UI/mL-5000 µg/mL) 2 %. |
| Cambio de cultivo | Diarios a partir del tercer día de la siembra. |
| Tª de incubación | 36°C |

Tabla XXI: Características de la línea celular HEp-2.

- Inoculación de la muestras

Todas las muestras antes de ser inoculadas, se esterilizaron por filtración a través de una membrana Millipore de 0,22 μ .

Se inoculó 0,5 mL de la muestra a ensayar (tanto para las muestras problemas como patrón) en cada frasco que contenía 5 mL del medio de crecimiento, dejando siempre frascos controles.

Todas las muestras se incubaron a 36°C durante 72h.

- Determinación de la concentración de las proteínas celulares

Antes de la determinación de las proteínas celulares, sometemos el cultivo a un proceso de purificación. Para ello, eliminamos el medio una vez transcurridas las 72 h de la inoculación, añadimos a cada frasco 5 mL de T-V y los llevamos a estufa a 36°C durante 10 minutos.

Cuando las células se han desprendido le añadimos 5 mL de M.E.M. y centrifugamos 10 minutos a 200 r.p.m. Recogemos el precipitado y lo lavamos con 10 mL de P.B.S. (tampón fosfato, pH 7,2) con el fin de eliminar los aminoácidos que quedan en el medio. Centrifugamos durante 10 minutos. El precipitado se resuspende nuevamente en 1 mL de P.B.S. y así lo empleamos para hacer la

determinación proteica.

Dicha determinación se realizó por el método colorimétrico descrito por BRADFORD (Bradford, 1976), basado en la observación de que el colorante "azul brillante de Coomasie" puede presentar coloración roja o azul según esté libre o unido a proteínas, dando máximos de absorción a 465 nm y 595 nm respectivamente (Reisner y cols. 1975).

El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción molar, por lo que la técnica puede detectar μg de proteínas. La unión a la proteína se realiza en un corto espacio de tiempo (2 min), y el color es estable durante 1h aproximadamente.

El reactivo está constituido por:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Azul brillante de Coomasie G-250..... | 100 mg |
| Alcohol etílico 95 %..... | 50 mL |
| Acido ortofosfórico 85 %..... | 100 mL |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 mL |

Una vez realizada la solución, se filtra a vacío y se mantiene a temperatura ambiente en frasco de vidrio topacio; en estas condiciones el reactivo es estable durante dos semanas.

La determinación se realizó en tubos de vidrio de 10 mL, cada uno de los cuales contenía:

| Tubo n° | I | II | III | IV | V | VI |
|--------------------------------------|----|----|-----|----|----|----|
| Standar albúmina (μL) | - | 20 | 40 | 60 | 70 | - |
| Tritón X-100 1% (μL) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Agua bidestilada (μL) | 90 | 70 | 50 | 30 | 20 | 85 |
| Solución a valorar (μL) | - | - | - | - | - | 5 |
| Reactivo (mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

El standar de albúmina se preparó a una concentración de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ por lo que las cantidades de proteínas en cada tubo correspondían a:

| Tubo n° | I | II | III | IV | V | VI |
|---------------------------|---|----|-----|----|---|-------------------------|
| μg de albúmina | 0 | 2 | 4 | 6 | 7 | a comparar en cada caso |

Después de mezclar bien el contenido de todos los tubos, se dejan a temperatura ambiente durante 3-5 minutos, y a continuación medimos las absorbancias a 595 nm en un espectrofotómetro PERKIN ELMER, Lambda 3.

Todas las determinaciones fueron dobles.

Con los valores obtenidos para las soluciones de albúmina, construimos una recta patrón, representando en ordenadas absorbancias, y en abcisas la cantidad de proteínas en μg contenidas en cada tubo. La ecuación de la recta resultante es:

$$y = 0,0638x - 0,0021$$

La cantidad de proteínas de nuestras muestras, expresadas en μg , se calculan a partir de esta ecuación.

Los resultados se expresan en porcentajes de inhibición del crecimiento celular frente al control.

- Fijación y tinción del cultivo celular

Se realizó para observar la morfología característica de las células cultivadas y así poder detectar la posible presencia de transformaciones.

Previamente a la fijación del cultivo, decantamos el medio de crecimiento de las células (una vez transcurrido el período de incubación) y lavamos con la solución salina tamponada (P.B.S.) a 37°C .

Fijamos con alcohol etílico al 70 %, durante 24 h, donde se mantienen hasta el momento de hacer la tinción, que se llevó a cabo con Hematoxilina-Eosina.

Para ello, lavamos (2 veces) con agua y tratamos con Hematoxilina de Harris (Difco) durante 3 minutos, y a continuación con Carbonato de Litio unos minutos más (hasta que aparezca un cambio de coloración de morado a azul). Volvemos a lavar (2 ó 3 veces más) y mantenemos en agua durante 5 minutos. Decantamos nuevamente, tratamos con Eosina (Difco) durante 20 segundos, se vuelve a decantar y lavamos seguidamente con agua.

Las preparaciones, montadas en glicero-gelatina, se observaron y fotografiaron con un equipo microfotográfico Olympus BH.

III.3.2.2.b - Muestras ensayadas

- **Extractos hexanoicos (H₁, H₂ y H₃).**

Las determinaciones de la actividad citostática se realizaron con los extractos hexanoicos de las tres especies en estudio: Viscum cruciatum Sieber (H₁), Crataegus monogyna Jacq. parasitado por Viscum cruciatum Sieber (H₂) y Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (H₃), utilizando como patrón 6-Mercaptopurina.

Las dosis a ensayar se tomaron de acuerdo con los protocolos dados por el

National Cancer Institute (N.C.I.) para este cultivo celular (Anon; 1962) (Geran y colbs.; 1972) y fueron de 30 μg r.s./mL para los extractos hexanoicos y 0,5 μg /mL para el patrón, que son las dosis recomendadas como DE_{50} para extractos vegetales y 6-Mercaptopurina respectivamente (Anon; 1962).

- Fracciones terpénicas (CH_1 , AH_2 y BH_3).

La dosis ensayada fue de 6 μg /mL para las tres fracciones en estudio: CH_1 (aislada de Viscum cruciatum Sieber), AH_2 (aislada de Crataegus monogyna Jacq. parasitado) y BH_3 (aislada de Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar). Para facilitar la disolución de estos compuestos en agua, se añadió Tween 80 en una proporción del 10%. Estas dosis fueron elegidas de acuerdo con los protocolos dados por el N.C.I. como DE_{50} (Anon, 1962), para principios activos.

Estas soluciones fueron medidas frente a un control y a la solución patrón de 6-mercaptopurina, a las dosis anteriormente indicada.

En todos los casos, una vez inoculados los frascos de cultivo con las cantidades correspondientes para obtener las concentraciones anteriormente indicadas, se incubaron a 36°C durante 72h.

A continuación, y previa purificación, se procedió a la determinación de las proteínas celulares por el método colorimétrico de BRADFORD, expuesto en el

apartado III.3.2.2.a.

III.3.2.2.c. Resultados

Los valores de absorbancia de las muestras, sus equivalentes en μg de proteínas, y los porcentajes de inhibición del crecimiento celular frente al control, para cada una de las muestras ensayadas, se recogen en la Tabla XXII.

La figura 24 corresponde a la representación gráfica de los porcentajes de inhibición del crecimiento celular, de los extractos hexanoicos y fracciones terpénicas estudiadas.

La figura 25, muestra un cultivo control de células HEp-2, y en las figuras 26 y 27 se observan estas células después del tratamiento con el extracto hexanoico de Viscum cruciatum Sieber (H_1), y la fracción terpénica de Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (BH_3), respectivamente.

| | Absorción (595 nm) | Conc. Prot. (μg) | % Inhibición celular |
|--|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|
| CONTROL | 0,572 | 9,04 \pm 0,15 | -- |
| Ext° Hexanoico <u>V. cruciatum</u> (H ₁) | 0,199 | 3,15 \pm 0,24 *** | 65,13 |
| Ext° Hexanoico <u>C. monogyna paras.</u> (H ₂) | 0,220 | 3,48 \pm 0,27 *** | 61,50 |
| Ext° Hexanoico <u>C. monogyna sin paras.</u> (H ₃) | 0,243 | 3,85 \pm 0,33 *** | 57,43 |
| Fracción terpénica <u>V. cruciatum</u> (CH ₁) | 0,047 | 0,72 \pm 0,20 *** | 92,01 |
| Fracción terpénica <u>C. monogyna paras.</u> (AH ₂) | 0,094 | 1,51 \pm 0,23 *** | 83,34 |
| Fracción terpénica <u>C. monogyna sin paras.</u> (BH ₃) | 0,051 | 0,61 \pm 0,27 *** | 93,20 |
| 6-Mercaptopurina | 0,141 | 4,26 \pm 0,083 *** | 52,85 |

Tabla XXII: Valores obtenidos en las pruebas realizadas sobre el cultivo celular HEp-2.

* $p < 0,025$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0.001$ n.s. no significativo.

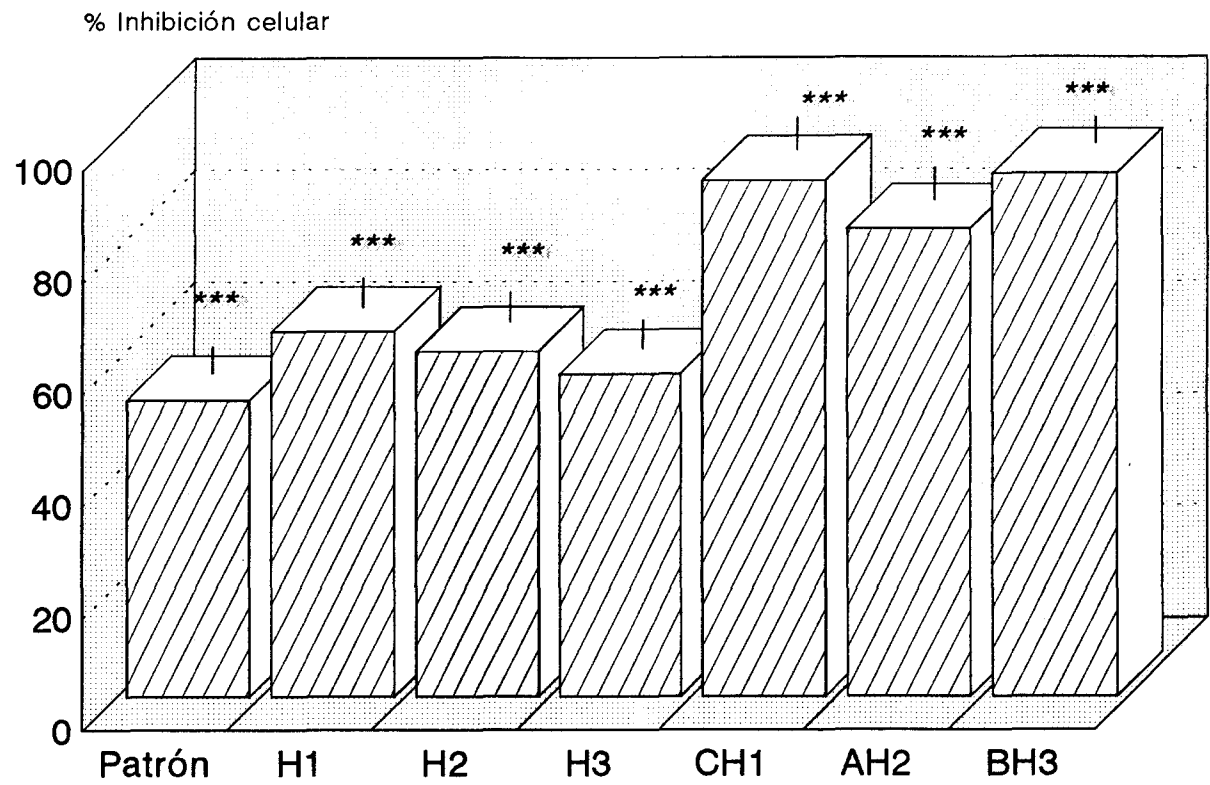


Fig. 24: Representación gráfica de los porcentajes de inhibición del crecimiento celular, de los extractos hexanoicos (H1, H2 y H3) y de las fracciones terpénicas (CH1, AH2 y BH3).

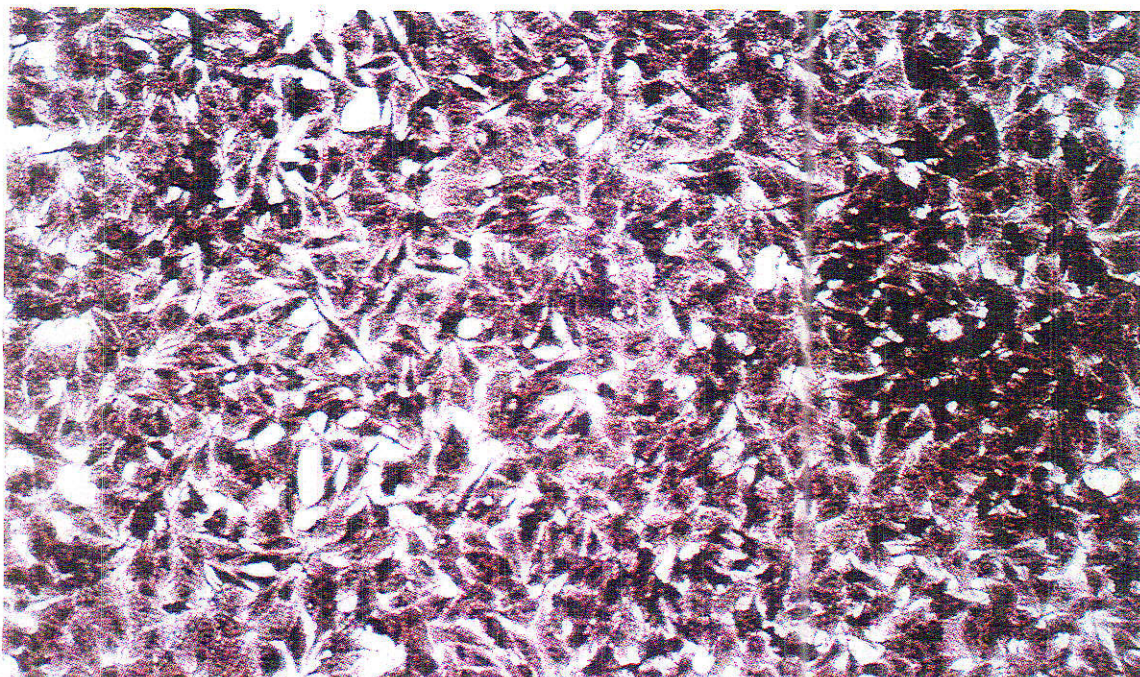


Fig. 25: Cultivo control de células HEp-2



Fig. 26: Células HEp-2 tratadas con el extracto hexanoico de Viscum cruciatum

Sieber.

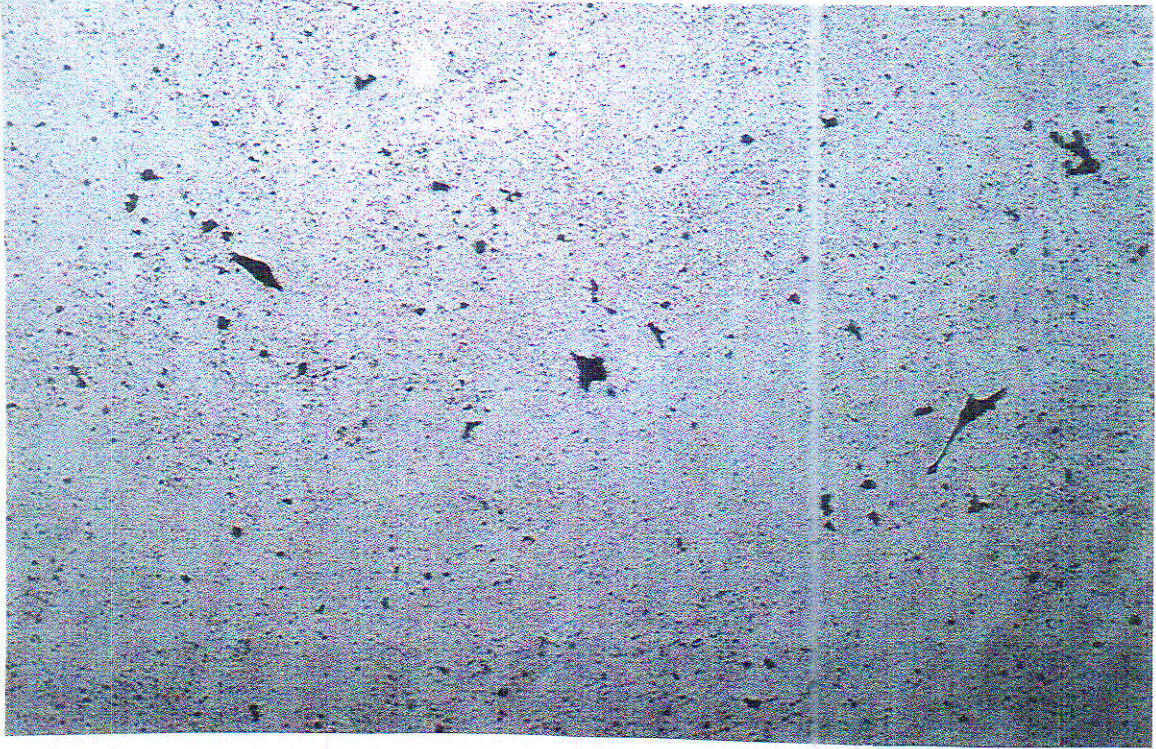


Fig. 27: Células HEp-2 tratadas con la fracción terpénica correspondiente a Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar.

III.3.2.2.d. Discusión de resultados

La actividad citostática obtenida con los distintos extractos hexanoicos frente a cultivos de células animales es muy marcada con todas las muestras ensayadas, siendo ligeramente superior en el caso de Viscum cruciatum Sieber.

Las fracciones terpénicas ensayadas muestran una mayor actividad en Crataegus monogyna sin parasitar (93,20%), siendo en todos los casos significativamente mayor que el patrón utilizado, 6-mercaptopurina.

Los resultados obtenidos pueden estar justificados, ya que algunos autores han demostrado con anterioridad la actividad citotóxica de triterpenos tipo ursano y oleano frente a diferentes líneas celulares (Kaneda, N. y colbs.; 1992).

El Acido Ursólico se ha mostrado especialmente activo frente a cultivos celulares P-388 (Lee, K.-H. y colbs.; 1988) y el β -Sitosterol parece desempeñar un papel protector importante en la carcinogénesis alimentaria (Bezanguer-Beauquesne, L.; 1982).

III.3.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

El motivo que nos ha llevado a estudiar la acción antiinflamatoria de estas especies, se debe principalmente al alto contenido en derivados triterpénicos, compuestos ampliamente descritos en bibliografía con esta actividad (apdo. II.1.4 y II.2.2.).

Hemos optado por la realización de dos métodos de determinación de la actividad antiinflamatoria que son complementarios. Estos son: la técnica de WINTER (Winter y cols.; 1962) descrita por COLOT (Colot, M.; 1972) que cuantifica la inflamación producida por una inyección subplantar de carragenina en la pata de la rata, y la técnica de GRISWOLD (Griswold y cols.; 1987), que nos permite determinar "in vivo" la migración leucocitaria. Así mismo, hemos determinado "in vitro" la actividad de la Fosfolipasa A₂.

III.3.3.1. TECNICA DE WINTER. (Modelo experimental de inflamación aguda en pata de rata).

Se ha realizado esta técnica, ya que la utilización del pletismómetro de mercurio permite una rápida y reproducible determinación cuantitativa del hinchamiento consecuente a la inyección subplantar de carragenina en la pata de la rata.

La carragenina es un mucopolisacárido obtenido de Chondrus crispus, alga marina del Mar de Irlanda (Almagro, C.B.; 1976), que no parece ser influenciada ni por la cepa, sexo, ni peso del animal, y por tanto, es más fácilmente reproducible el resultado.

La determinación cuantitativa del edema de la pata de la rata se efectúa mediante un pletismómetro de mercurio LENCE (Lence; 1962), especialmente diseñado para medir el volumen de la pata. Se marca con tinta la pata de la rata a nivel del maléolo lateral y a continuación se sumerge en un recipiente lleno de mercurio. El aumento del volumen que experimenta el mercurio se registra en una escala. La medida se realiza inmediatamente después de la inyección plantar de carragenina, y a las 3 y 5 horas posteriores a la misma. En cada caso se calcula el porcentaje de inflamación en relación con el volumen inicial.

La carragenina produce una reacción inflamatoria de tipo bifásico (Cook, L. y cols.; 1957), es decir, durante la primera hora tras su administración se eleva rápidamente debido al trauma de la inyección (Di Rosa y cols.; 1971) (Doherty y Robinson; 1975) y en muy alto grado el volumen de la pata, este efecto comienza a decrecer a los 30 min. aproximadamente. Transcurrida dicha hora, se inicia la segunda fase que se mantiene hasta las tres horas posteriores. Al principio de la misma se observa un aumento suave del volumen, pero a los 30 min. tiene lugar un incremento muy acelerado. Aparentemente la primera fase está relacionada con la liberación de los mediadores de la inflamación, histamina y serotonina. Por el

contrario la segunda parece deberse a la liberación de quininas.

En estudios recientes se ha indicado que la fase de liberación de histamina y serotonina se prolonga durante toda la primera hora y es seguida, por un aumento en la permeabilidad vascular relacionada con la liberación de quininas, que se mantiene hasta las tres horas.

Pero el efecto inflamatorio se mantiene hasta transcurridas 6 horas desde la administración, ya que la migración de leucocitos al lugar de la inflamación libera una prostaglandina que colabora con la permanencia del edema.

III.3.3.1.a. Condiciones generales de la experiencia.

Se han utilizado ratas de raza Wistar, machos y hembras, de peso medio comprendido entre 150-200 g, las cuales fueron agrupadas en lotes de 6 y mantenidas en ayunas 18 horas previas a la experiencia.

La inflamación se provoca por la inyección de 0,1 mL de una suspensión acuosa de carragenina al 1% en la aponeurosis plantar de la pata derecha de la rata.

Una hora antes de la inyección del agente flogógeno, se procede a la administración de los extractos y principios aislados a ensayar, por vía oral.

Para facilitar la disolución en solución salina fisiológica de los extractos y principios ensayados insolubles en agua, se ha utilizado Tween 80 en una proporción no superior al 10 %.

Al lote control se le administró solución salina fisiológica (10 mL/Kg animal) con Tween 80.

El antiinflamatorio seleccionado como patrón ha sido Indometacina, administrada a una dosis de 25 mg/Kg animal.

III.3.3.1.b. Muestras y dosis ensayadas.

- Extracto hexanoico de Viscum cruciatum (H₁), de Crataegus monogyna parasitado (H₂) y de Crataegus monogyna sin parasitar (H₃) a las dosis de 250 y 500 mg/Kg animal respectivamente.

- Fracción terpénica aislada del extracto hexanoico de Crataegus monogyna parasitado (AH₂) a las dosis de 20 y 40 mg/Kg animal.

- Fracción terpénica aislada del extracto hexanoico de Crataegus monogyna sin parasitar (BH₃) a las dosis de 20 y 40 mg/Kg animal.

III.3.3.1.c. Resultados

La actividad antiinflamatoria es calculada en porcentajes de reducción del edema de las ratas tratadas, referidas al lote control (Piña y Armijo; 1978).

$$\% \text{ AAI} = \frac{(\text{Ic} - \text{Ii}) \times 100}{(\text{Ic} - 100)}$$

% AAI ----- % Actividad antiinflamatoria.

Ic ----- Indice de inflamación del lote control (valor medio).

Ii ----- Indice de inflamación individual de cada rata.

$$I = \frac{\text{Vt} \times 100}{\text{Vo}}$$

Vt ----- Volumen de la pata en el tiempo t (3 ó 5 h).

Vo ----- Volumen inicial.

La significación estadística se ha realizado mediante el Test de Student.

Los resultados obtenidos son expresados en la Tabla XXIII y XXIV, figuras 28 y 29.

| | Indice Inflamación | | % A.A.I. | | DE ₅₀ | |
|---|----------------------|----------------------|------------|------------|------------------|--------------|
| | 3h | 5h | 3h | 5h | 3h | 5h |
| Control | 142,98±3,52 | 150,32±3,94 | --- | --- | | |
| Indometacina (25mg) | 104,17±2,85 *** | 110,86±3,13 *** | 90,30±6,62 | 78,41±6,22 | | |
| Ext ^o Hex.(H ₁) <u>V.cruciatum</u> | | | | | | |
| (125 mg) | 134,20±8,32 n.s. | 140,25±5,32 n.s. | 20,43±3,23 | 20,01±2,54 | | |
| (250 mg) | 131,30±10,80 n.s. | 137,96±10,13 n.s. | 28,75±2,42 | 27,65±1,76 | 789,92±47,32 | 781,59±47,32 |
| (500 mg) | 127,22±6,93 * | 131,95±6,94 * | 37,89±1,55 | 37,65±1,31 | | |
| Ext ^o Hex.(H ₂) <u>C.monogyna</u> paras. | | | | | | |
| (125 mg) | 132,13±7,90 n.s. | 131,40±7,82 * | 25,24±2,55 | 27,60±3,61 | | |
| (250 mg) | 129,70±1,41 n.s. | 127,74±1,95 * | 29,97±3,24 | 44,86±3,89 | 934,28±45,83 | 360,98±52,87 |
| (500 mg) | 126,74±6,61 * | 133,88±1,18 n.s. | 37,79±1,54 | 32,67±2,34 | | |
| Ext ^o Hex.(H ₃) <u>C.monogyna</u> sin paras. | | | | | | |
| (125 mg) | 137,00±8,90 n.s. | 140,00±3,90 n.s. | 13,91±3,07 | 20,51±1,35 | | |
| (250 mg) | 135,88±5,18 n.s. | 139,82±2,83 n.s. | 17,37±1,16 | 20,85±5,63 | 931,34±56,67 | 808,81±53,57 |
| (500 mg) | 132,51±6,10 n.s. | 143,67±5,09 n.s. | 25,51±1,36 | 16,39±0,81 | | |

Tabla XXIII: Actividad antiinflamatoria (A.A.I.) de los extractos hexanoicos de V. cruciatum (H₁), C. monogyna parasitado (H₂) y C. monogyna sin parasitar (H₃).

*** p < 0,001 ** p < 0,01 * p < 0,05 n.s. p < 0,10

| | Indice Inflamación | | % A.A.I. | | DE ₅₀ | |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|------------|------------|------------------|-------------|
| | 3h | 5h | 3h | 5h | 3h | 5h |
| Control | 142,98±3,52 | 150,32±3,94 | --- | --- | | |
| Indometacina (25 mg) | 104,17±2,85 *** | 110,86±3,13 *** | 90,30±6,62 | 78,41±6,22 | | |
| F. Terpénica AH ₂ | | | | | | |
| (10 mg) | 129,32±1,32 n.s. | 133,40±2,14 * | 31,78±2,35 | 33,62±1,57 | | |
| (20 mg) | 127,97±1,97 n.s. | 132,14±1,19 ** | 34,91±4,59 | 38,12±1,94 | 45,51±4,32 | 101,19±3,57 |
| (40 mg) | 125,05±6,58 ** | 130,06±6,19 ** | 44,45±1,34 | 40,27±1,23 | | |
| F. Terpénica BH ₃ | | | | | | |
| (10 mg) | 125,32±8,13 * | 135,42±7,20 n.s. | 41,09±1,33 | 29,61±3,21 | | |
| (20 mg) | 122,64±7,76 * | 131,87±12,8 n.s. | 47,33±1,80 | 38,01±2,51 | 24,45±4,40 | 35,10±4,40 |
| (40 mg) | 116,56±3,72 * | 123,90±6,91 ** | 61,45±0,86 | 54,00±1,42 | | |

Tabla XXIV: Actividad antiinflamatoria (A.A.I.) de las fracciones terpénicas de *C. monogyna* parasitado (AH₂) y sin parasitar (BH₃)

*** p < 0,001 ** p < 0,01 * p < 0,05 n.s. p < 0,10

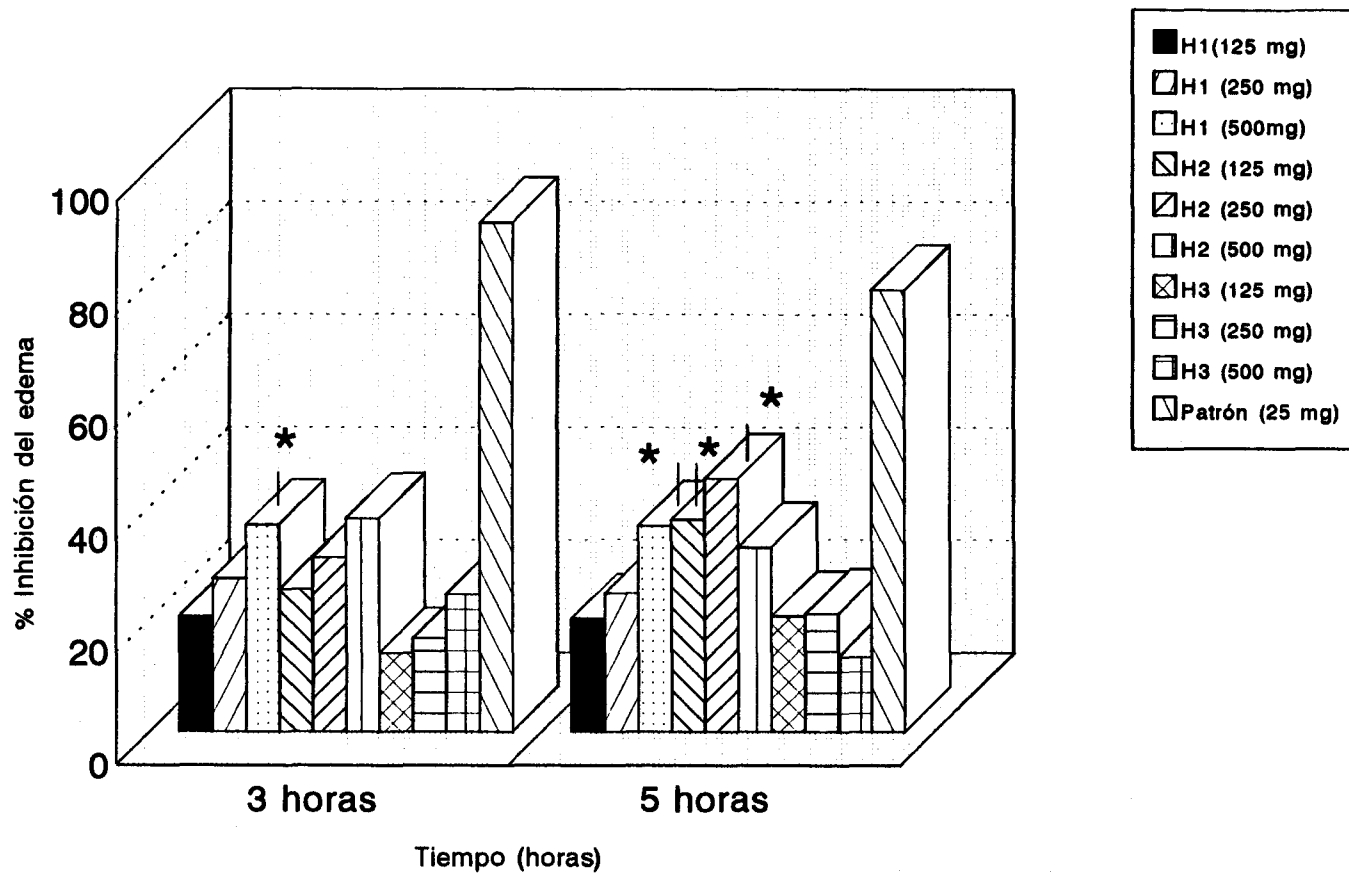


Fig. 28: % Inhibición del edema a las 3 y 5h correspondientes a los extractos hexanoicos de *V. cruciatum* (H1), *C. monogyna* paras. (H2) y sin parasitar (H3)

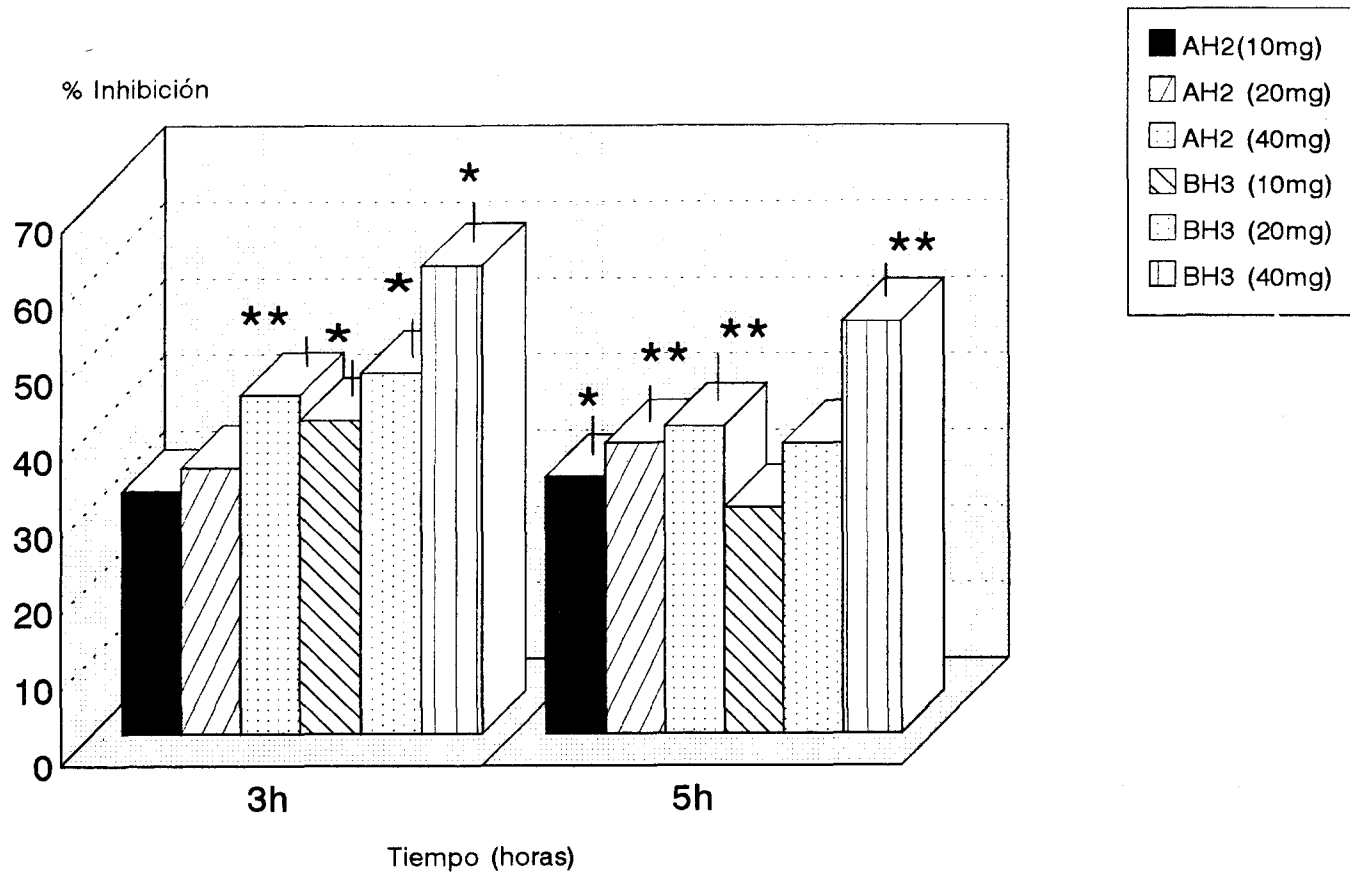


Fig. 29: % Inhibición del edema a las 3 y 5h correspondiente a las fracciones terpénicas de *C. monogyna* parasitado (AH2) y sin parasitar (BH3).

III.3.3.1.d. Discusión de resultados

Los extractos hexanoicos ensayados (H_1 , H_2 y H_3) muestran una cierta actividad antiinflamatoria, siendo ésta más acusada en el caso de Crataegus monogyna Jacq. parasitado donde el valor de DE_{50} a las 5 h de tratamiento es de $360,98 \pm 52,87$.

Los resultados obtenidos con las fracciones terpénicas de Crataegus monogyna muestran una mayor actividad antiinflamatoria que los extractos de procedencia, siendo el correspondiente a Crataegus monogyna sin parasitar el que alcanza una mayor inhibición (61,47%) a las 3h y a la dosis más alta ensayada.

Con las fracciones terpénicas, los resultados obtenidos muestran que la acción antiinflamatoria disminuye ligeramente a las 5h, mientras que los extractos ensayados no siguen este comportamiento.

Según los resultados obtenidos las fracciones terpénicas podrían ejercer en parte su acción sobre la 2ª fase de la inflamación aguda. Esta es inducida por la liberación de mediadores como prostaglandinas, proteasas, bradiquininas y enzimas lisosomales (Vinegar y cols.; 1987), con lo cual el mecanismo de acción de estas fracciones pudiera estar relacionado con la inhibición en la liberación de algunos de estos mediadores.

III.3.3.2. TECNICA DE GRISWOLD. (Peritonitis por carragenina en ratones).

Este ensayo nos permite determinar "in vivo" la inhibición de las actividades ciclooxigenasa o lipooxigenasa, así como la migración leucocitaria. Nosotros sólo hemos determinado la migración leucocitaria para completar los resultados obtenidos con la técnica anterior. Hemos preferido aplicarla a los productos puros aislados (fracción terpénica aislada) ya que nos dieron resultados más satisfactorios que los extractos hexanoicos ensayados.

Es una técnica que proporciona elevada información y que al utilizar ratones, requiere menos cantidad del producto en estudio, que las que se emplean en ratas.

III.3.3.2.a. Condiciones generales de la experiencia.

Se comienza con la administración, generalmente via oral, de los productos en estudio, o su vehículo, a ratones raza Swiss, en grupos de 6 animales. Después de 1 hora se les inyecta intraperitonealmente 0,25 mL de carragenina al 0,75 % en suero fisiológico y 4 horas más tarde se sacrifican los animales.

Se les inyecta en la cavidad peritoneal 2 ml de P.B.S. sin calcio ni magnesio, y después de un masaje, se recogen los fluidos peritoneales con una jeringa

determinándose el número de leucocitos presentes en una cámara de Neubauer. Se procede también a hacer un recuento de neutrófilos en preparaciones teñidas mediante tinción de Giemsa y May Grünwald-Giemsa al microscopio óptico. Se centrifuga el exudado a 3000 r.p.m. durante 8-10 min., recogiendo el sobrenadante.

El "pellet" de células se resuspende en un pequeño volumen de P.B.S. (1 ml). Los eritrocitos contaminantes se lisan mezclando la suspensión celular con 9 volúmenes de solución isotónica de cloruro sódico (0,2 %). Las células se separan de los eritrocitos lisados por centrifugación y el "pellet" resultante se resuspende de nuevo en P.B.S.

III.3.3.2.b. Muestras y dosis ensayadas.

- Fracción terpénica aislada del extracto hexanoico de Crataegus monogyna Jacq. parasitado por Viscum cruciatum Sieber (AH₂) a las dosis de 10, 20 y 40 mg de principio /Kg animal.

- Fracción terpénica aislada del extracto hexanoico de Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (BH₃) a las dosis de 10, 20 y 40 mg de principio /Kg animal.

Se han utilizado dos patrones, un antiinflamatorio no esteroideo y un glucocorticoide:

- Indometacina, a una dosis de 10 mg /Kg animal.

- Prednisolona, a una dosis de 10 mg /Kg animal.

Al lote control se le administró 10 ml de solución salina fisiológica/ Kg de animal con Tween 80.

III.3.3.2.c. Resultados

Los resultados obtenidos del recuento de leucocitos totales, % de inhibición en la migración leucocitaria, DE_{50} , el número de neutrófilos y % de cambio observado en los neutrófilos, se expresan en la tabla XXV.

La figura 30 muestra el % de inhibición leucocitaria en el área inflamada.

La significación estadística se ha realizado mediante el Test de Student.

| | N°leucoc./ml x 10 ⁶ | %Inhib. Leucocitaria | DE ₅₀ | Neutrof./ml x10 ⁶ | % cambio neutrófilo |
|--|--------------------------------|----------------------|------------------|------------------------------|---------------------|
| CONTROL | 0,25±0,45 | -- | | 2,57±0,14 | -- |
| Indometacina (10mg) | 2,81±0,24 * | 33,89 | | 0,97±0,07 *** | -62,26 |
| Prednisolona (10mg) | 0,78±0,15 *** | 81,65 | | 0,06±0,01 *** | -97,56 |
| Fracción terpénica <u>C. monogyna</u> paras. (AH₂) | | | | | |
| (10mg) | 2,63±0,03 * | 38,11 | | 0,71±0,03 *** | -72,37 |
| (20mg) | 1,96±0,01 *** | 53,58 | 17,52±3,41 | 0,22±0,04 *** | -91,53 |
| (40mg) | 0,32±0,05 *** | 92,97 | | 0,17±0,02 *** | -93,38 |
| Fracción terpénica <u>C. monogyna</u> sin paras. (BH₃) | | | | | |
| (10mg) | 2,47±0,17 ** | 41,49 | | 0,65±0,07 *** | -74,49 |
| (20mg) | 1,50±0,09 *** | 64,70 | 14,61±3,20 | 0,25±0,04 *** | -90,16 |
| (40mg) | 0,45±0,05 *** | 89,41 | | 0,11±0,007 *** | -95,81 |

Tabla XV: Efecto de las fracciones terpénicas de C. monogyna parasitado (AH₂) y sin parasitar (BH₃), sobre la migración leucocitaria en los exudados intraperitoneales.

*** p<0,001

** p<0,005

* p<0,05

n.s. p<0,1

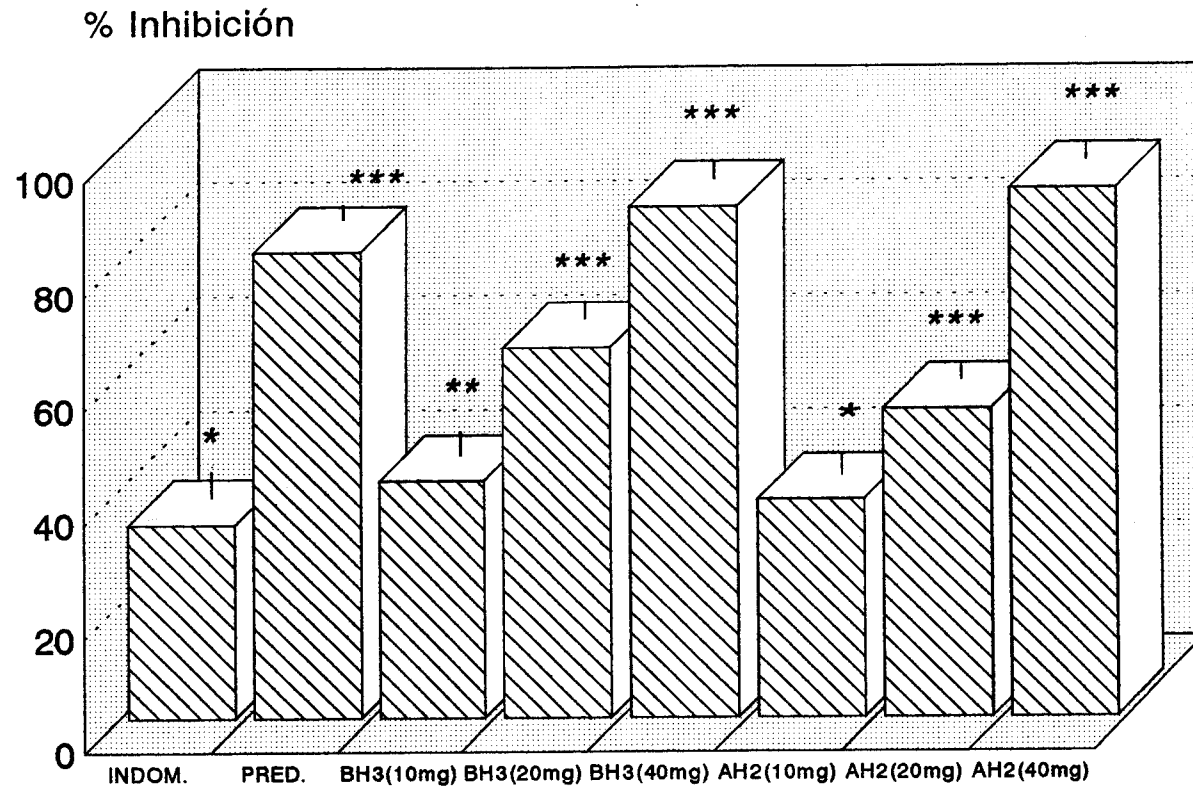


Fig. 30: % Inhibición de la infiltración leucocitaria obtenida con las fracciones terpénicas de *C. monogyna* parasitado (AH2) y sin parasitar (BH3).

III.3.3.2.d. Discusión de resultados

Las fracciones terpénicas de Crataegus monogyna parasitado y sin parasitar (AH₂ y BH₃) son capaces de inhibir el acúmulo de leucocitos totales y neutrófilos en el lugar de la inflamación, de una manera dosis dependiente.

De las dos fracciones ensayadas, la correspondiente a Crataegus monogyna sin parasitar ($DE_{50} = 14,61 \pm 3,20$ mg) se muestra algo más activa como inhibidores de la infiltración leucocitaria que la del parasitado ($DE_{50} = 17,52 \pm 3,41$ mg). Ambas fracciones alcanzan valores de % inhibición de leucocitos totales superiores a los obtenidos con la Indometacina a la misma dosis (10 mg/Kg animal). Sin embargo, sólo se alcanzan valores comparables con el patrón Prednisolona (10 mg/Kg animal), si aumentamos la dosis hasta 40 mg con nuestras muestras.

III.3.3.3. ENSAYO "IN VITRO" DE ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A₂

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) es una enzima que cataliza específicamente la hidrólisis del éster en la segunda posición de un fosfolípido, para producir un lisofosfolípido y un ácido graso libre, el ácido araquidónico (AA). La liberación de este ácido aporta el sustrato necesario para la biosíntesis de eicosanoides.

La activación de la PLA₂ puede mediar una gran variedad de reacciones fisiopatológicas, bien a través de una acción directa o bien mediante la transformación subsiguiente de sus productos (Lisofosfolípido y AA) en potentes sustancias biológicamente activas como prostaglandinas, leucotrienes y factor activador de plaquetas.

Todas estas sustancias juegan un papel clave en el desarrollo del proceso inflamatorio, de ahí el interés que tiene el encontrar inhibidores de la PLA₂ capaces de interferir en la primera etapa de la síntesis de todos estos mediadores, pero con menores efectos secundarios que los corticosteroides antiinflamatorios.

III.3.3.3.a. Condiciones generales de la experiencia

- Incorporación del ácido oleico a las membranas celulares.

El ácido oleico tritado se incorpora a las membranas celulares de un cultivo

de Escherichia coli. La liberación del ^3H -ácido oleico desde las membranas bacterianas produce una emisión β que se mide en un contador de centelleo líquido refrigerado (Wallac 1410), que nos permitirá calcular la inhibición sobre la actividad fosfolipasa producida por los productos ensayados.

Para obtener el cultivo de E. coli metabólicamente activo, se añade 60 ml de medio de cultivo (bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l y 7,8 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH=5,0-5,5) a 15 μl de una suspensión madre de E.coli CECT-101 (conservadas previamente en glicerol al 20% en congelador). Se incuban a 37°C durante 10 h. y posteriormente se mide la densidad óptica a 550 nm y cuando esta se encuentre en el rango 0,25-0,30, estará disponible para la obtención de membranas.

- Obtención de membranas.

Partimos de 0,5 ml de E. coli metabólicamente activo y se añaden 9,5 ml de medio de cultivo, así como 10 μl de ^3H -ácido oleico (con una actividad de partida de 1 mCi/0,2 ml), de forma que se introduzcan 50 mCi de ^3H -ácido oleico por cada 10 ml de medio.

El cultivo se mantiene de 6-8 h. a 37°C con oxigenación, y cuando se alcanza una densidad óptica a 550 nm entre 0,8-1,0, se detiene el crecimiento mediante centrifugación (1500 g/4°C/10 min.). Se deshecha el sobrenadante y lavamos el

"pellet" con un volumen igual de tampón de lavado (0,7 M Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0,1% albúmina sérica bovina (B.S.A.), 0,2% azida sódica, pH=8,0). Se centrifuga de nuevo y se resuspende el "pellet" resultante en un volumen igual al de partida con suero fisiológico (NaCl 0,9%). Se autoclavan las membranas durante 30 min. a máxima temperatura y presión, y una vez enfriadas, se añade azida sódica en una concentración final del 0,2%.

- Cálculo de la incorporación de ³H-ácido oleico.

Trabajamos con minicolumnas Bond Elut-NH₂ de intercambio iónico, que nos permiten separar la radioactividad incorporada a las membranas en tres fracciones:

1^{ra}. Lo que no se retiene en la columna y sale en la primera fracción:

Triglicéridos.

2^{da}. Lo que sale en la segunda fracción: Ácidos Grasos.

3^{ra}. La última fracción: Fosfolípidos.

Las minicolumnas se acondicionan haciéndoles pasar a través de ellas 0,5 ml de una solución de Tetrahidrofurano (THF) y posteriormente 0,5 ml de THF.H₂O (19:1). Una vez las columnas separadas, se hace pasar a través de ellas 1,5 ml de la suspensión de membranas en THF (100 ml suspensión de membranas + 1,4 ml de THF), recogiendo la primera fracción (TG_s). Para eluir las siguientes fracciones en orden creciente de polaridad, utilizamos una solución de THF: AcOH (49:1) y

MeOH:NH₄OH 0,91% (19:1), respectivamente.

A las tres fracciones recogidas se adiciona 2 ml de líquido de centelleo y se procede al contaje de la emisión β del tritio en el contador de centelleo. La incorporación de ³H-ácido oleico como fosfolípido debe ser superior al 95%.

- Determinación de la actividad PLA₂.

El método utilizado se ajusta al descrito por Gil y cols. en 1994.

En la experiencia se trabaja con cuatro series de tubos:

* T (cuentas totales): Contienen únicamente membranas y tampón. No se centrifugan, pero serán agitados antes de retirar el sobrenadante.

* B (Tampón o blanco): Contienen membranas y tampón. Se centrifugan y no se agitan antes de retirar el sobrenadante.

* E (enzima): Contienen membranas, tampón y enzima. Se centrifugan y no son agitadas antes de retirar el sobrenadante.

* C (compuestos a ensayar): Contienen membranas, tampón, compuesto a ensayar y enzima. Se centrifugan y no se agitan antes de retirar el sobrenadante.

El protocolo a seguir ha sido:

Se preincuban durante 5 min. a 37°C los productos a ensayar (2,5 μ l) con 250 μ l de tampón (0,1 M Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 0,2% azida sódica, pH= 7,5) y 10 μ l de fosfolipasa A₂.

Posteriormente se adicionan 10 μ l de membranas y se incuban los tubos 15 min. a 37°C. A continuación, se adicionan a todos los tubos 100 μ l del tampón anterior que contiene 0,25% de albúmina sérica bovina.

Se centrifugan todos los tubos a 3000 r.p.m./4°C/10 min., excepto aquellos que nos proporcionaran las cuentas totales (T). Se decantan los sobrenadantes en tubos de centelleo, se añaden 2 ml de líquido de centelleo y se lee en contador β .

III.3.3.3.b. Dosis ensayadas y enzimas utilizadas.

Para este ensayo se han utilizado dos tipos de PLA₂ secretoras: PLA₂ de veneno de serpiente *Naja naja* y PLA₂ de veneno de abeja, con el fin de evaluar la especificidad de los productos en estudio.

La dosis de la fracción terpénica de *Crataegus monogyna* sin parasitar (BH₃) ensayada ha sido 10⁻² M, dosis considerada como la máxima para que un compuesto pueda empezar a considerarse activo.

Como patrón se utilizó la Mepacrina a una dosis de 10^{-3}M .

III.3.3.3.c. Resultados

El porcentaje de inhibición de la PLA_2 se calcula con la ecuación:

$$\% \text{Inhibición} = 100 - (100 \times \text{cpm} (C-B/E-B))$$

Siendo C las cuentas por minuto de las fracciones a ensayar, B la de los blancos y E las del enzima.

Los resultados obtenidos fueron:

| Enzima | Compuesto | % Inhibición |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------|
| PLA_2 Naja naja | BH_3 (10^{-2}M) | $34,12 \pm 2,4$ |
| | Mepacrina (10^{-3}M) | $68,11 \pm 3,17$ |
| PLA_2 abeja | BH_3 (10^{-2}M) | $12,35 \pm 1,12$ |
| | Mepacrina (10^{-3}M) | $65,38 \pm 2,97$ |

III.3.3.3.d. Discusión de resultados

La fracción terpénica estudiada (BH₃) produjo sobre la PLA₂ de veneno de abeja un ligero efecto inhibitorio, mientras que la inhibición producida frente a la PLA₂ de veneno de serpiente *Naja naja* ha sido de 34,12%, siendo este resultado algo más significativo frente al patrón utilizado, Mepacrina.

Estos resultados nos permiten deducir que la acción antiinflamatoria de esta fracción no puede ser atribuida únicamente a la inhibición de la actividad de la PLA₂, sino que posiblemente haya otros mecanismos implicados.

IV. CONCLUSIONES

1. En el estudio fitoquímico realizado con las tres muestras en estudio se han identificado: ACIDO URSOLICO, β -SITOSTEROL y una fracción terpénica constituida por compuestos de esta naturaleza y alcoholes alifáticos. El ACETATO DE β -AMIRINA sólo fue puesto de manifiesto en Viscum cruciatum Sieber.
2. La fracción terpénica está constituida por ALCOHOLES ALIFATICOS de 18 a 30 átomos de carbono y los triterpenos: BUTIROESPERMOL, 24-METILEN-24-DIHIDROLANOSTEROL y CICLOARTENOL. La β -AMIRINA sólo fue identificada en las muestras correspondientes a Viscum cruciatum Sieber y Crataegus monogyna Jacq. parasitado, sin embargo no ha sido detectada en Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar, por lo que se podría pensar en la posibilidad de que dicho compuesto sea cedido o sintetizado a través del parásito.
3. El contenido en ACIDO URSOLICO es mayor (0,19%) en Viscum cruciatum Sieber, disminuyendo hasta 0,05% en Crataegus monogyna Jacq. parasitado y haciéndose aún menor en Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (0,025%).
4. La fracción terpénica, más abundante en Crataegus monogyna Jacq. sin parasitar (0,14%), disminuye cuando esta especie está parasitada por Viscum cruciatum Sieber (0,09%) y sólo se obtiene en estado de trazas en

el caso del parásito.

5. Los compuestos mayoritarios de dicha fracción son: el CICLOARTENOL en Crataegus monogyna Jacq. y los alcoholes alifáticos en Viscum cruciatum Sieber.
6. Los ensayos de actividad citostática frente a cultivos de células animales y vegetales muestran a Crataegus monogyna Jacq. como especie potencialmente citostática y confirman dicha actividad en Viscum cruciatum Sieber.
7. Las fracciones terpénicas de Crataegus monogyna parasitado (AH₂) y sin parasitar (BH₃) se muestran como potenciales agentes antiinflamatorios, reduciendo muy significativamente el acúmulo de leucocitos y neutrófilos en el área inflamada, de forma dosis-dependiente, en un rango superior a la Indometacina y comparable al patrón Prednisolona. Así mismo, la fracción terpénica correspondiente a Crataegus monogyna sin parasitar (BH₃) fue capaz de inhibir, a la dosis de 10⁻² M, moderadamente la PLA₂ secretora de veneno de serpiente *Naja naja*.
8. Como resultado del estudio de los extractos hexanoicos, podemos concluir que, el parásito Viscum cruciatum Sieber no ejerce una influencia significativa sobre el hospedador Crataegus monogyna Jacq., produciendo sólo ligeras variaciones fitoquímicas y farmacológicas.

V. BIBLIOGRAFIA

- AGUDO MARTINEZ, M.A. (1989) - "Estudio fitoquímico de Viscum cruciatum Sieber parásito de Prunus amygdalus Stokes", Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Sevilla.

- AGUWA, C.N. y OKUNJI, C.O. (1986) - "Gastrointestinal studies of Pyrenacantha staudtii leaf extracts", J. Ethnopharmacol., 15: 45-55.

- AIELLO, A.; FATTORUSSO, E. y MAGNO, S. (1987) - "Isolation and structure elucidation of two new polyhydroxylated sterols from the mediterranean hydroid Eudendrium glomeratum", J. Nat. Prod., 50(2): 191-194.

- AIELLO, A.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MAYOL, L. y MENNA, M.L. (1990) - "Isolation of two novel 5 α ,6 α -Epoxy-7-ketosterols from the encrusting demospongia Oscarella lobularis", J. Nat. Prod., 53(2): 487-491.

- AKHTAR, N.; MALIK, A.; AFZA, N. y BADAR, Y. (1993) - "Cycloartane-type triterpenes from Amberboa ramosa", J. Nat. Prod., 56(2): 295:299.

- ALMAGRO, C.B. (1976) - "Esquemas y Practicas de Farmacología", Ed. Espaxs., Barcelona.

- ANJANEYULU, V.; PRASAD, K.H. y RAO, G.S. (1982) - "Triterpenoids of the root-bark of Magnifera indica", Indian J. Pharm. Sci., 44: 85-87.

- ANON, P. (1962) - "Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems", *Cancer Chemotherapy Reports*, 25: 22-58.

- AQUINO, R.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. y CIRINO, G. (1991) - "Plant metabolites. New compounds and antiinflammatory activity of Uncaria tomentosa", *J. Nat. Prod.*, 54(2): 453-459.

- AYATOLLAHI, S.A.M.; AHMED, Z.; MALIK, A.; AFZA, N. y BADAR, Y. (1992) - "Cicloclarkeanol, a new triterpene from Euphorbia clarkeana", *J. Nat. Prod.*, 55(7): 959-962.

- BERMEJO, J.; BRETON, J.L.; GONZALEZ, A.G. y VILLAR, A. (1968) - "Terpenoides de los Sonchus VII. Lactonas sesquiterpénicas de Sonchus hierrensis Pit.", *An. Real Soc. Esp. Fis. Quim.*, 54: 893-898.

- BEZANGER-BEAUQUESNE, L. (1982) - "Plantes supérieures antitumorales", *Pl. Méd. Phytothér.*, 16(3): 206-229.

- BEZANGER-BEAUQUESNE, L.; VINKAS, M.; TORK, M. y TROTIN, F. (1990) - "Plantes médicinales des régions tempérées", Ed. Maloine, 2^a ed., Paris.

- BRADFORD, M.M. (1976) - "A rapid and sensitive method for the quantitation

of microgram. quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72(1-2): 248-254.

- BRUNETON, J. (1991) - "Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia", Ed. Acribia, S.A., Zaragoza.

- BRUNETON, J. (1993) - "Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales", Ed. Technique et Documentation Lavoisier, 2^a ed., Paris.

- CAPPALLETTI, E.M.; TREVISAN, R. y CANIATO, R. (1982) - "External antirheumatic and antineuralgic herbal remedies in the traditional medicine of north-eastern Italy", *J. Ethnopharmacol.*, 6: 161-190.

- COLOT, M. (1972) - "Notions Techniques de Pharmacologie Generale", Ed. Masson et Cie, Paris.

- COOK, L. y WEIDLEY, E. (1957) - "Behavioural effects of some psicpharmacological agents", *Ann. Ny Acad. Sci.*, 66: 740-752.

- CHARLWOOD, B.V. y CHARLWOOD, K.A. (1991) - "Terpenoid production in plant cell cultures" en "Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids", Harborne, J.B. y Tomas-Barberan, F.A. Editores, Ed. Clarendon Press-Oxford, New York.

- CHATURVEDI, A.K.; PARMAR, S.S.; BHATNAGAR, S.C.; MISRA, G. y NIGAM, S.K. (1974) - "Anticonvulsivant and antiinflammatory activity of natural plant coumarins and triterpenoids", Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol., 9: 11-22.

- CHAURASIA, N. y WICHTL, M. (1987) - "Sterols and steryl glycosides from Urtica dioica", J. Nat. Prod., 50(5): 881-885.

- CHAWLA, A.S.; SHARMA, A.K.; HANDA, S.S. y DHAR, K.L. (1992) - "Chemical investigation and anti-inflammatory activity of Vitex negundo seeds", J. Nat. Prod., 55(2): 163-167.

- CHEN, CH.S. (1973) - "Phytochemical study on Viscum liquidambaricolum", J. Taiwan Pharm. Ass., 25(1-2): 55-56.

- DATTA, P.K.; RAY, A.K.; BARUA, A.K.; CHOWDHURI, S.K. y PATRA, A. (1990) - "Isolation of a bioactive sterol from a sea pen, Pteroeides esperi", J. Nat. Prod., 53(5): 1347-1348.

- DELAVEAU, P. (1980) - "Gui", Les actualités pharmaceutiques, 167: 33-34.

- DE ROSA, S. (1991) - "Terpenoids of marine plants" en "Ecological chemistry and biochemistry of plants terpenoids", Harborne, J.B. y Tomas-Barberan, F.A.

Editores, Ed. Clarendon Press-Oxford, New York.

- DE TOMMASI, N.; DE SIMONE, F. y PIZZA, C. (1992) - "Constituents of Eriobotrya japonica", J. Nat. Prod., 55(8): 1067-1073.

- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P. y WILLOUGHBY, D.A. (1971) - "Studies of the mediators of acute inflammatory sites by carrageenan and turpentine", J. Pathol., 104: 15.

- DOHERTY, N.S. y ROBINSON, B.V. (1975) - "The inflammatory response to carrageenan", J. Pharm. Pharmacol., 27: 701.

- DOMINGUEZ, A. (1961) - "Análisis Fitoquímico", Rev. Ciencia, 21: 126-131.

- EVANS, F.J. (1973) - "Steryl esters of Digitalis purpurea L. herb", J. Pharm. Pharmacol., 25: 156-163.

- FERREIRA, M.J.V.; LOBO, A.M. y WYLER, H. (1993) - "Triterpenes of Euphorbia mellifera", Fitoterapia, 64(4): 377.

- FLOREZ, J y REIG, E. (1993) - "Terapéutica farmacológica del dolor", Ediciones Universidad de Navarra, S.A. (EUNSA), Navarra.

- FRESHNEY, R. I. (1983) - "Culture of animal cells. A manual of basic technique", Ed. Aian R. Liss. Inc., New York.

- FUKUNAGA, T; KAJIKAWA, I.; NISHIYA, K.; WATANABE, Y.; TAKEYA, K. y ITOKAWA, H. (1987) - "Studies on the constituents of the european mistletoe, Viscum album L.", Chem. Pharm. Bull., 35(8): 3292-3297.

- GANAPATY, S. y RAO, D.U. (1985) - "Triterpenoids of the stem bark of Clerodendron nerifolium", Indian J. Pharm. Sci., 47: 167-168.

- GERAN, R.I.; GREENBERG, N.H.; MAC DONALD, M.M.; SCHUMACHER, A.M. y ABBOTT, B.J. (1972) - "Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems", Cancer Chemotherapy Reports, 3(3): 17-79.

- GIL, B.; SANZ, M.J.; TERCENIO, M.C.; FERRANDIZ, M.L.; BUSTOS, G.; PAYA, M.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M.J. (1994) - "Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A₂ and inflammatory responses in mice", Life Sci., 54: 333-338.

- GOAD, L.J. (1991) - "Inhibition of phytosterol biosynthesis and the consequences for plant growth" en "Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids", Harborne, J.B. y Tomas-Barberan, F.A. Editores, Ed. Clarendon Press-Oxford, New

York.

- GRISWOLD, D.E.; MARSHALL, P.J.; WEBB, E.F.; GODFREY, R.; NEWTON, J.Jr.; DIMARTINA, M.J.; SARAU, H.M.; GLEASON, J.G.; POSTE, G. y HANNA, N. (1987) - "SK&F86002: A structurally novel antiinflammatory agent that inhibits lipoygenase and cyclooxygenase-mediated metabolism of arachidonic acid", *Biochem. Pharmacol.*, 36: 3463-3470.

- HONG, D.; HEIMAN, A.S.; KWON, T. y LEE, H.L. (1994) - "Synthesis of 6-(Methoxycarbonil) prednisolone and its derivatives as new antiinflammatory steroidal antedugs", *J. Pharm. Sci.*, 83(3): 357-361.

- HARBORNE, J.B. (1991) - "Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids" en "Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids", Harborne, J.B. y Tomas-Barberan, F.A., Editores, Ed. Clarendon Press-Oxford, New York.

- HATINGUAIS, P.; BELLE, R.; BASSO, Y.; RIBET, J.P. y BAUER, M. (1981) - "Composition of the hexane extract from Serenoa repens Bartram fruits", *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 41(4): 253-262.

- HEIMAN, A.S.; TARAPOREWALA, I.B., Mc LEAN, H.M.; HONG, D. y LEE, H.J. (1990) - "New patent topical anti-inflammatory steroids with reduced side

effects: Derivatives of steroid-16-carboxy esters", J. Pharm. Sci., 79(7): 617-621.

- HIKINO, H.; KISO, Y.; AMAGAYA, S. y OGIHARA, Y. (1984) - "Antihepatotoxic actions of Papyriogenins and Papyriosides, triterpenoids of Tetrapanax papyrifera leaves", J. Ethnopharmacol., 12: 231-235.

- IORIZZI, M.; MINALE, L.; RICCIO, R.; LEE, J.S. y YASUMOTO, T. (1988) - "Polar steroids from the marine scallop Patinopecten yessoensis", J. Nat. Prod., 51(6): 1098-1103.

- ITOH, T.; YOSHIDA, K.; YATSU, T.; TAMURA, J.; MATSUMOTO, T. y SPENCER, G.F. (1981) - "Triterpene alcohols and sterols of Spanish olive oil", JAOCS, Abril: 545-550.

- JAHODAR, L.; GRYGAROVA, V. y BUDESINSKY, M. (1988) - "Triterpenoids of Arctostaphylos uva-ursi roots", Pharmazie, 43: 442-443.

- KANEDA, N.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. y FARNSWORTH, N.R. (1992) - "Plant anticancer agents, L. cytotoxic triterpenes from Sandoricum koetjape stems", J. Nat. Prod., 55(5): 654-659.

- KONISHIMA, T.; TAKASAKI, M.; KOZUKA, M. y TOKUDA, H. (1987) - "Studies on inhibitors of skin-tumor promotion, I. Inhibitory effects of triterpenes

from Euptelea polyandra on Epstein-Barr virus activation", J. Nat. Prod., 50(6): 1167-1170.

- KORNFELDT, A. y CROON, L.-B. (1981) - "4-Demethyl-, 4-Monomethyl- and 4,4-Dimethylsterols in some vegetable oils", Lipids, 16(5): 306-314.

- KWEIFIO-OKAI, G.; DE MUNK, F.; RUMBLE, B.A.; MACRIDES, T.A. y CROPLEY, M. (1994) - "Antiarthritic mechanisms of amyrin triterpenes", Res. Com. Molec. Pathol. Pharmacol., 85(1): 45-55.

- LEE, K.H.; LIN, Y.-M.; WU, T.-SH.; ZHANG, D.-CH.; YAMAGISHI, T.; HAYASHI, T.; HALL, I.H.; CHANG, J.-J.; WU, R.-Y. y YANG, J.H. (1988) - "The cytotoxic principles of Prunella vulgaris, Psychotria serpens and Hyptis capitata: Ursolic Acid and related derivatives", Planta Med., 308: 310.

- LENCE, P. (1962) - "A new device for plethysmographic measuring of small object", Arch. Int. Pharmacodyn., 136: 237-241.

- LEVAN, A. y LOTFY, T.H. (1944) - "Naphthalenacetic acid in the Allium test", Ed. Hereditas, 35: 336-374.

- LI, H.-Y.; SUN, N.-J.; KASHIWADA, Y. y SUN, L. (1993) - "Anti-AIDS agents, 9-Suberosol, a new C₃ lanostane-type triterpene and anti-HIV principle from

Polyalthia suberosa", J. Nat. Prod., 56(7): 1130-1133.

- LIN, J-H. (1979) - "Studies on the constituents of the chinese drug "Chi-Sheu"(I): On the leaves of Viscum multinerve Hayata.", J. Taiwan Pharm. Ass., 31(1): 12-22.

- LING-HUA, Z. y PEI-GEN, X. (1993) - "Recent advances in studies of antihyperlipaemic and antihyperglycaemic compounds from chinese traditional and herbal medicines", Phytother. Res., 7: 217-226.

- LITTER, M. (1986) - "Farmacología experimental y clínica", Ed. El Ateneo, 7ª ed., Buenos Aires.

- LOPEZ-SAEZ, J.F. y FERNANDEZ GOMEZ, M.E. (1965) - "Partial mitotic index and phase indices", Experientia 21: 591-594.

- LUIS, J.G. (1991) - "Chemistry, biogenesis and chemotaxonomy of the diterpenoids of Salvia" en "Ecological and biochemistry of plant terpenoids" Harborne, J.B. y Tomas-Barberan, F.A. Editores, Ed. Clarendon Press-Oxford, New York.

- LUIS CHIESA, J.A. y PETERSEN, A.C.B. (1983) - "El ABC de las prostaglandinas", Ediciones Toray S.A., Barcelona.

- MADAIO, A.; PICCIALI, V.; SICA, D. y CORRIERO, G. (1989) - "New polyhydroxysterols from the Dictyoceratid sponges Hippospongia communis, Spongia officinalis, Ircinia variabilis and Spongionella gracilis", J. Nat. Prod., 52(5): 952-961.

- MIGLIUOLO, A.; NOTARO, G.; PICCIALI, V. y SICA, D. (1990) - "New tetrahydroxylated sterols from the marine sponge Spongia officinalis", J. Nat. Prod., 53(6): 1414-1424.

- MILLER, L.L.C. y TAINTER, M.L. (1944) - "Stimulation of the DL₅₀ and its error by means of logarithmic probit graphaper", Proc. Soc. Exper. Biol. Méd., 57: 261-264.

- MURAVYOV, I.A.; VASILENKO, Y.K.; BASHAROV, A.Y.; PARFENTIEVA, E.P. y SKULTE, I.V. (1985) - "Hypolipidemic properties of Cimilicen the drug isolated from Cimicifuga dahurica (Tircz.) maxim.", Farmatsiya Moscow, 34(4): 38-42.

- PANCORBO, S. y HAMMER, R.H. (1972) - "Preliminary phytochemical investigation of Euphorbia millii", J. Pharm. Sci., 61: 954-957.

- PANT, G.; PANWAR, M.S.; RAWAT, M.S. y NEGI, D.S. (1988) - "Spermicidal activity and chemical examination of Pentapanax leschenaultii (D.C.)"

seem fruits", *Herba Pol.*, 34(3): 161-162.

- PICCIALLI, V. y SICA, D. (1987) - "Four new trihydroxylated sterols from the sponge Spongionella gracilis", *J. Nat. Prod.*, 50(5): 915-920.

- PIÑA, M. y ARMIJO, M. (1978) - "Estudio de los efectos antiinflamatorios y analgésicos del Esterilato, Benerilato y Acido Acetilsalicílico", *Arch. de Farmacolog. y Toxicol.*, 4: 183-186.

- POEHLAND, B.L.; CARTE, B.K.; FRANCIS, T.A.; HYLAND, L.J., ALLAUDEEN, H.S. y TROUPE, N. (1987) - "In vitro antiviral activity of Dammar resin triterpenoids", *J. Nat. Prod.*, 50(4): 706-713.

- PRINSEP, M.R.; BLUNT, J.W. y MUNRO, M.H.G. (1989) - "A new sterol sulfate from the marine sponge Stylopus australis", *J. Nat. Prod.*, 52(3): 657-659.

- PROLIAC, A. (1980) - "Triterpénes D' Arctostaphylos uva-ursi spreng.", *Pl. Méd. et Phytothér.*, 14(3): 155-158.

- RANG, H.P. y DALE, M.M. (1992) - "Farmacología", Ed. Alhambra Logman, S.A., 2ª ed., Madrid.

- RAO, CH.B.; RAMANA, K.V.; RAO, V.; FAHY, E. y FAULKNER, J. (1988) -

"Metabolites of the gorgonian Isis hippuris from Indian", J. Nat. Prod., 51(5): 954-958.

- RASOOL, N.; KHAN, A.Q.; AHMAD, V.U. y MALIK, A. (1991) - "A new cycloartane-type triterpene from Pentatropis spiralis", J. Nat. Prod., 54(3): 889-892.

- RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MAÑEZ, S. y RIOS, J.L. (1995) - "Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids", *Planta Med.*, 61: 182-185.

- REICHARDT, P.B.; BRYANT, J.P.; CLAUSEN, T.P. y WIELAND, G.D. (1984) - "Defence of winter-dormant Alaska paper birch against snowshoe hare", *Oecologia*, 65: 58-69.

- REISNER, A.H.; NEMES, P. y BUCHOLTZ, C. (1975) - "Use of Coomassie Brilliant Blue G-250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels", *Anal. Biochem.*, 64(2): 509-516.

- SAN FELICIANO, A. y LOPEZ, J.L. (1991) - "Recent chemistry of Conifer terpenoids" en "Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids", Harborne, J.B. y Tomas-Barberan, F.A. Editores, Ed. Clarendon Press-Oxford, New York.

- SAN MARTIN, R. (1977) - "Tratado de Farmacognosia", Ed. Científico-Médica,

Barcelona.

- SARG, T.M.; ATEYA, A.; EL DOMIATY, M. y EL DAHMY, S. (1987) - "Sapogenin, triterpenoid and steroid constituents of Atractylis carduus", Sci. Pharm., 55: 91-94.

- SATYANARAYANA, V.; DAVID KRUPADANAM, G.L.D. y SRIMANNARAYANA, G. (1992) - "Tetracyclic triterpenes from the latex of Euphorbia nivulia", Fitoterapia, 63(1): 82-83.

- SCHUN, Y. y CORDELL, G.A. (1987) "Cytotoxic steroids of Gelsemium sempervirens", J. Nat. Prod., 50(2): 195-198.

- STHALL, E. (1969) - "Thin-Layer chromatography", Ed. Springer-Verlag, 2^a ed., Berlin.

- SU, J.; YU, X.; ZENG, L. y MAK, T.C.W. (1989) - "Novel polyhydroxylated sterols from the soft coral Sinularia numerosa", J. Nat. Prod., 52(5): 934-940.

- TABATA, M.; TANAKA, S.; CHO, H.J.; UNO, C.; SHIMAKURA, J. e ITO, M. (1993) - "Production of an anti-allergic triterpene, Bryonolic Acid, by plant cell cultures", J. Nat. Prod., 56(2): 165-174.

- THRELFALL, D.R. y WHITEHEAD, J.M. (1991) - "Terpenoid phytoalexins: Aspects of biosynthesis catabolism and regulation" en "Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids" Harborne, J.B. and Tomas-Barberan, F.A. Editores, Ed. Clarendon Press-Oxford, New York.

- TJIO, J.H. y LEVAN, A. (1950) - "The use of Oxiquinoline in chromosome analysis", Ann. Estac. Exp. Aula Dei., 2: 21-64.

- TREASE y EVANS, W.CH. (1991) - "Farmacognosia", Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill, 13^a ed., Mexico.

- ULUBELEN, A. y TOPCU, G. (1984) - "Flavonoids and terpenoids from Salvia verticillata and Salvia pinnata", J. Nat. Prod., 47(6): 1068.

- ULUBELEN, A. y TOPCU, G. (1992) - "Abietane diterpenoids from Salvia pomifera", Phytochemistry, 31(11): 3949-3951.

- ULUBELEN, A. y TOPCU, G (1992) - "Terpenoids from the roots of Salvia tomentosa", Nat. Prod. Let., 1: 141-147.

- USUBILLAGA, A.N y MECCIA, G. (1987) - "Steroidal sapogenins from Solanum scorpioideum", J. Nat. Prod., 50(4): 636-641.

- VAN HELLEMONT, J. (1986) - "Compendium de Phytotherapie", Ed. A.P.B. Service Scientifique, Bruselas.

- VARANDA, E.M.; ZUÑIGA, G.E.; SALATINA, A.; ROQUE, N.F. y CORCUERA, C.J. (1992) - "Effect of Ursolic Acid from epicuticular waxes of Jacaranda decurrens on Schizophis graminum", J. Nat. Prod., 55(6): 800-803.

- VASILENKO, Y.K.; PONOMAREV, V.A. y OGANESYAN, E.T. (1982) - "Comparative investigation of the hypolipidemic properties of triterpenoids", Pharm. Chem. J. USSR., 15: 329-332.

- VINEGAR, R.; TRAU, J.F.; SELPH, J.L.; JONSTON, P.R.; VENABEL, A.L. y MCKENZIE, K.K. (1987) - "Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat", Fed. Proc., 46: 118-126.

- WAGNER, H.; BLADT, S. y ZAINSKY, E.M. (1984) - "Plant drug analysis", Ed. Springer-Verlag, Berlin.

- WEPIERRE, J. (1977) - "Abrégé de Pharmacodinamie général", Ed. Masson, Paris.

- WILSON, G.B. (1969) - "División celular y ciclo mitótico", Ed. Alhambra S.A., Madrid.

- WILSON, G.B. y MORRISON, J.H. (1971) - "Citología", Ed. C.E.C.S.A., Barcelona.

- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A. y NUSS, G.W. (1962) - "Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs", Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111: 544-547.

- YASUKAWA, K.; AOKI, T.; TAKIDO, M.; IKEKAWA, T.; SAITO, H. y MATSUZAWA, T. (1994) - "Inhibitory effects of Ergosterol isolated from the edible mushroom Hypsizigus marmoreus on TPA-induced inflammatory ear oedema and tumor promotion in mice", Phytother. Res., 8: 10-13.

- ZHANG, W.J.; PAN, D.J.; ZHANG, L.X. y SHAO, Y.D. (1986) - "Studies on triterpenoids of Tripterygium wilfordii Hook-F", Yaoxue Xuebao, 21: 592-598.

- ZOLLO, F.; FINAMORE, E. y MINALE, L. (1987) - "Starfish saponins XXXI. Novel polyhydroxysteroids and steroidal glycosides from the starfish Sphaerodiscus placenta", J. Nat. Prod., 50(5): 794-799.

Barcelona.

- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A. y NUSS, G.W. (1962) - "Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs", Proc. Secc. Exp. Biol. Med., 111: 544-547.

- YASUKAWA, K.; AOKI, T.; TAKIDO, M.; IKEKAWA, T.; SAITO, H. y MATSUZAMA, T. (1994) - "Inhibitory effects of Ergosterol isolated from the edible mushroom Hypsizigus marmoreus on TPA-induced inflammatory ear oedema and tumor promotion in mice", Phytotherapy Research, 8: 10-13.

- ZHANG, W.J.; PAN, D.J.; ZHANG, L.X. y SHAO, Y.D. (1986) - "Studies on triterpenoids of Tripterygium wilfordii Hook-F", Yaoxue Xuebao, 21: 592-598.

- ZOLLO, F.; FINAMORE, E. y MINALE, L. (1987) - "Starfish saponins XXXI. Novel polyhydroxysteroids and steroidal glycosides from the starfish Sphaerodiscus placenta", Journal of Natural Products, 50(5): 794-799.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resolución de la Junta, integrada por los abajo firmantes
en el día 11 de Julio de 1957, por el Sr. D. Dña. Doctora de
D. M^a del Carmen Almada Bilbao
titulada "Estudio fitodemográfico de *Vilum cruciatum*
Hebe parviflora de heterogus Monogyna galq"
acordó otorgarle la distinción de Apto "cum Laude"

Sevilla, 11 de Septiembre de 1957

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,

