

CATEDRA DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

"ESTUDIO FARMACOQUIMICO Y FARMACODINAMICO
DE Erica andevalensis Cabezudo-Ribera"

Trabajo para aspirar al
grado de licenciada
que presenta
M^a DOLORES AUMENTE RUBIO

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



APARTADO DE CORREOS N.º 874

TELEFONO (954) 62 86 61

41071 SEVILLA - SPAIN

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA,
FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

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

CERTIFICA: Que el presente trabajo, "Estudio farmacológico y farmacodinámico de Erica andevalensis Cabezudo-Ribera", ha sido realizado en el departamento de Química Orgánica-Farmacognosia y Farmacodinamia, bajo la dirección de las Profesoras Titulares Dra. M^a Victoria Toro Sáinz y Dra. M^a Dolores García Giménez, durante el tiempo exigido y reuniendo los requisitos necesarios para este tipo de trabajos.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación en Sevilla a veintitrés de Septiembre de mil novecientos ochenta y siete.

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

Fdo.: Felipe Alcudia Gonzalez

El presente trabajo ha sido realizado en la cátedra de FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA de la FACULTAD DE FARMACIA de la UNIVERSIDAD DE SEVILLA, bajo la dirección de las profesoras Titulares Dra. M^a Victoria Toro Sáinz y Dra. M^a Dolores García Giménez.

Las Directoras del trabajo:



Dra. M^a Victoria Toro Sáinz



Dra. M^a Dolores García Giménez

He de agradecer a las Dras. M^a Victoria Toro Sáinz y M^a Dolores García Giménez la eficaz dirección con que han encauzado este trabajo. A mis compañeras del Departamento su continuo apoyo y a todas aquellas personas que de alguna forma han contribuido a que sea posible su elaboración.

Y un reconocimiento expreso a la Dra. M^a Jesús Ayuso González por todo el interés, colaboración y estímulo con que me ha -- acompañado a lo largo del mismo.

A mi Familia

SUMARIO

	<u>pag.</u>
I.- <u>O B J E T O</u>	1
II.- <u>R E V I S I O N B I B L I O G R A F I C A</u>	4
II.1.- <u>D E S C R I P C I O N D E L A E S P E C I E</u>	5
II.2.- <u>F L A V O N O I D E S</u>	7
II.2.1.- <u>I N T R O D U C C I O N</u>	7
II.2.2.- <u>L O C A L I Z A C I O N</u>	11
II.2.3.- <u>P A P E L E N E L V E G E T A L</u>	12
II.2.4.- <u>B I O G E N E S I S</u>	13
II.2.5.- <u>A C C I O N E S F A R M A C O L O G I C A S</u>	15
II.2.6.- <u>E X T R A C C I O N</u>	30
II.2.7.- <u>A I S L A M I E N T O E I D E N T I F I C A C I O N</u>	31
II.3.- <u>F L A V O N O I D E S E N E L G E N E R O E R I C A</u>	34
III.- <u>P A R T E E X P E R I M E N T A L</u>	38
III.1.- <u>M U E S T R A</u>	39
III.2.- <u>O B T E N C I O N D E L E X T R A C T O A E S T U D I A R</u>	39
III.3.- <u>E S T U D I O D E L E X T R A C T O E T E R E O P O R C R O M A T O G R A -</u> <u>F I A E N C O L U M N A</u>	42

	<u>pag.</u>
III.3.1.- IDENTIFICACION DEL COMPUESTO "C"	44
III.3.1.A.- REACCIONES COLOREADAS	44
III.3.1.B.- METODOS CROMATOGRAFICOS: CRO MATOGRAFIA EN PAPEL	46
III.3.1.C.- ESPECTROFOTOMETRIA U.V.	49
III.3.1.D.- ESPECTROFOTOMETRIA I.R.	60
III.3.1.E.- RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR	63
III.3.1.F.- DISCUSION DE RESULTADOS ...	65
III.3.2.- IDENTIFICACION DEL COMPUESTO "D"	66
III.3.2.A.- REACCIONES COLOREADAS	67
III.3.2.B.- METODOS CROMATOGRAFICOS: CRO MATOGRAFIA EN PAPEL	69
III.3.2.C.- ESPECTROFOTOMETRIA U.V. ...	71
III.3.2.D.- ESPECTROFOTOMETRIA I.R. ...	83
III.3.2.E.- RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR	86
III.3.2.F.- DISCUSION DE RESULTADOS ...	88
III.4.- <u>ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</u>	89
III.4.1.- CONDICIONES GENERALES DE LA EXPERIEN- CIA	89
III.4.1.1.- <u>Medio de cultivo</u>	89
III.4.1.2.- <u>Preparación del inóculo</u>	90
III.4.1.3.- <u>Siembra</u>	90
III.4.1.4.- <u>Impregnación y colocación de los discos</u>	91

	<u>Pag.</u>
III.4.1.5.- <u>Incubación</u>	92
III.4.1.6.- <u>Determinación de los halos de inhibición</u>	93
III.4.1.7.- <u>Microorganismos ensayados</u> ...	93
III.4.2.- MUESTRAS A ENSAYAR	94
III.4.2.1.- <u>Extracto Etereo</u>	94
III.4.2.2.- <u>Miricetina</u>	94
III.4.3.- RESULTADOS	96
III.4.4.- DISCUSION DE RESULTADOS	106
III.5.- <u>ACTIVIDAD DIURETICA</u>	107
III.5.1.- CONDICIONES GENERALES DE LA EXPERIENCIA	108
III.5.2.- DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA	109
III.5.3.- RESULTADOS	110
III.5.4.- DISCUSION DE RESULTADOS	124
IV.- <u>C O N C L U S I O N E S</u>	125
V.- <u>B I B L I O G R A F I A</u>	127



Erica andevalensis Cabezudo & Ribera



Distribución General de E. andevalensis Cabezudo & Ribera

INDICE DE ABREVIATURAS

CMI	= concentración mínima inhibitoria
E.U.V.	= excreción urinaria volumétrica
Ext ^o	= Extracto
Ext ^o ac.	= Extracto acuoso
Obs.	= observación
r.s.	= residuo seco
Sol.	= solución
Sol. alcohol	= solución alcohólica
Sol. fis.	= solución fisiológica

I- OBJETO

I- OBJETO

En diversas ocasiones se ha señalado la actividad antimicrobiana de algunas especies de Ericáceas (1,2).

Trabajos realizados en nuestra Cátedra pusieron de manifiesto dicha actividad en los extractos acuosos de Erica andevalensis Cabezudo-Ribera (3), ricos en principios polifenólicos, así como la influencia sobre la misma de la fracción correspondiente a los ácidos fenólicos (4), observándose en el proceso de purificación una pérdida de otros componentes con actividad antimicrobiana.

Debido a ello, en el presente trabajo hemos centrado nuestro estudio en el extracto étereo resultante del primer estadio de dicha purificación, investigando su actividad frente a diversos microorganismos, así como los principios activos que entran en su composición y su posible contribución a la actividad antimicrobiana.

Por otra parte, dado que algunas especies de Erica han sido utilizadas tradicionalmente como diuréticas en medicina popular (5,6), hemos creído interesante comprobar si la especie estudiada poseía también esta acción.

II - REVISION

BIBLIOGRAFICA

II.1.- DESCRIPCION DE LA ESPECIE

Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dillenidae
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Especie	<u>E. andevalensis</u>

Erica andevalensis Cabezudo-Ribera es un arbusto de 20 a 180 cm, perenne, ramificación densa y ascendente, al menos las ramas jóvenes, con indumento puberulento y con pelos glandulares cortos de 0,2 - 0,3 mm. Hojas de 2-5 mm en verticilos de 4, muy densos en las ramas jóvenes o laxos en el resto, las superiores lineales totalmente revolutas, las inferiores ovaladas con la base truncada y debilmente revolutas, dejando el revés claramente visible; al menos las jóvenes laxamente puberulentas y todas con pelos glandulares de 0,2 - 0,3 mm. Flores en umbela terminal; pedicelo puberulento de 4-5 mm. bracteolas próximas al cáliz. Sépalos de 1,5 mm, puberulentos pelos glandulares marginales, con 4 lóbulos revolutos. Anteras incluidas, apendiculadas. Ovario glabro, estigma capitado exerto. Fruto cápsula polisperma; semillas de 4 mm y muy numerosas.

Esta especie se encuentra restringida a las escómbreras y cercanías de las minas de pirita (5) de la comarca de Andévalo (Huelva), posiblemente por la necesidad de cre--

cer en medios ácidos-turbosos, (pH óptimo 5,6 - 6) (7).

II.2.- FLAVONOIDES

II.2.1.- INTRODUCCION

En el año 1.950 el "Joint Committe on Biochemical Nomenclature of the America Society of Biological Chemists - and of the American Institute of Nutrition" designó como --- "bioflavonoides" al grupo de estos compuestos con actividad biológica y estructura similar al complejo "citrina" (Vitamina P) aislada de ciertos frutos cítricos (8).

Los pigmentos flavónicos formaban una clase química homogénea basada en el esqueleto común de una sustancia - de referencia, "la flavona", obtenida por síntesis en 1.898 por Kostanecki (9).

Los progresos realizados a partir de 1.950 en fitoquímica y, más particularmente, los brillantes estudios biogenéticos emprendidos en el campo de los polifenoles vegetales, sustituyó estas claras nociones por una mayor confusión en - la nomenclatura y definición de los pigmentos flavónicos.

En 1.952 Geissman y Hinreiner (10) publican una importante memoria sobre la biogénesis de las antoxantinas y - los antocianos. Para designar al conjunto de estos compuestos emplean el término flavonoide, así llamados porque po--seen el esqueleto carbonado de la flavona. En efecto, el vocablo flavonoide evoca tanto los pigmentos flavónicos, como

la estructura de la flavona (2 fenil-cromona), englobando to dos los compuestos $C_6-C_3-C_6$ formados por dos ciclos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono, lo que permite incorporar los antocianos y las catequinas entre los flavonoides.

Swain reafirma que el esqueleto base de los flavonoides es el del flavano (2 fenil-cromano), donde el heterociclo está saturado. Las chalconas, dihidrochalconas, iso--flavonas, isoflavanonas y auronas no poseen tampoco la estrutura del flavano, pero las consideraciones biogénéticas permiten su admisión entre los flavonoides.

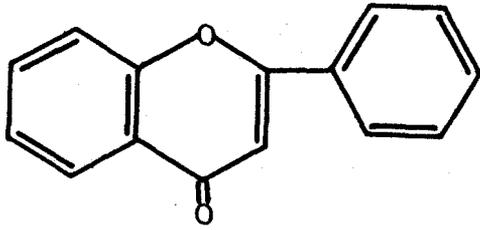
Ya, en 1.959, Venkataraman había previsto esta anomalía, e incorpora las estructuras de tipo 3 fenil.

Primando el criterio biogénético sobre las consideraciones químicas, se han visto incorporados a los flavonoides moléculas cada vez más heterogéneas, tales como cumari--nas, ac. clorogénico o, incluso, moléculas de síntesis. En medio de este conjunto, un grupo de sustancias debía individualizarse, a medida que sus caracteres químicos y farmacológicos se precisaban: las catequinas y sus derivados que poseen la estructura flavano 3-ol (11).

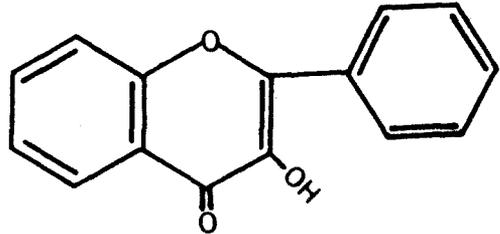
Haslam demostró que las reacciones de condensación caracterizan a los flavanos 3-ol, y las catequinas, aunque monómeros, participan en el proceso de polimerización. En

razón de este comportamiento, Masquelier y col. proponen la denominación de picnogenoles (etimológicamente "que engendran productos condensados"); no sólo criterios químicos si no también farmacológicos abogan en favor de esta nueva terminología, ya que los picnogenoles se caracterizan por su biodisponilidad y su inocuidad.

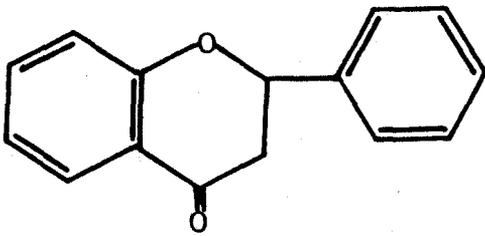
En la figura (1), presentamos la estructura gene--ral de los principales tipos, de los cuales derivan los numeros flavonoides naturales, diferenciándose unos de otros - por el número y posición de los diversos agrupamientos quí--micos que entran como sustituyentes en diferentes carbonos, preferentemente en posiciones 5,7,3',4', así como 6 y 8.



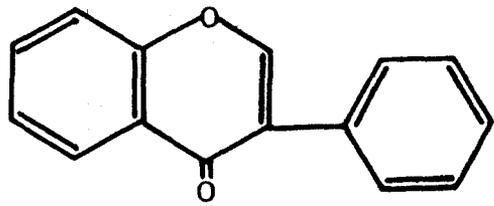
FLAVONA



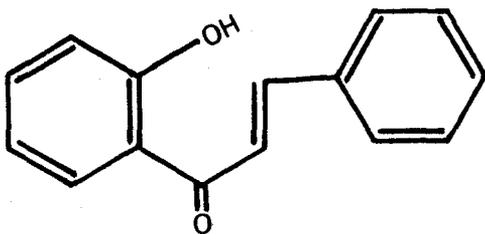
FLAVONOL



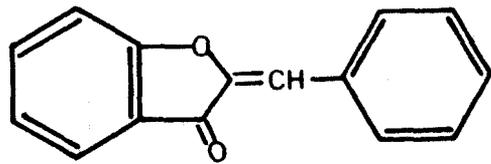
FLAVANONA



ISOFLAVONA



CHALCONA



AURONA

Fig.1

II.2.2.- LOCALIZACION

Los flavonoides, pigmentos naturales abundantemente repartidos por toda naturaleza, limitan su localización al mundo vegetal. La aparición de estos pigmentos en algunos animales (en alas de ciertas mariposas, en capullos de gusanos de seda) se debe a la ingesta de material vegetal - por parte de dichos insectos (12).

Dentro de los compuestos fenólicos, es el grupo - más ampliamente distribuido en el reino vegetal, encontrándose bien en forma de geninas o como heterósidos.

En Criptógamas vasculares son poco frecuentes, -- aunque se han localizado en ciertas algas y helechos (13). En Fanerógamas son muy abundantes, predominando en dicotiledóneas (14). Como familias más ricas podemos destacar Polygonáceas, Rutáceas, Umbelíferas, Asteráceas etc.

Un mismo pigmento puede encontrarse en las familias más dispares , pero lo normal es que existan familias donde se da con preferencia un determinado tipo de estructura. De todos los principios flavónicos, flavonas y flavonoles son los más extendidos.

Organográficamente, se encuentran distribuidos en todas las partes del vegetal: raíces, tallos, hojas, flores frutos y semillas; sin embargo, ciertas clases de compuestos

son más característicos de algunos tejidos (15). Así los flavonoles se aislan más frecuentemente de los órganos aéreos jóvenes (hojas, botones florales) y chalconas y auronas de flores.

A nivel celular se localizan, preferentemente, en el zumo vacuolar, citoplasma, cloroplastos y, a veces, en las membranas (16,17).

II.2.3.- PAPEL EN EL VEGETAL

La amplia distribución de estos compuestos y las variaciones que sufren en el curso de la vegetación, inclina a pensar que su función en la planta no sólo se limita a colorear las partes aéreas, sino que también intervienen en sus procesos fisiológicos. A este respecto se han formulado varias hipótesis. Debido a su localización en las partes más externas (epidermis) se les ha asignado un papel protector frente a las radiaciones ultra-violeta.

Probablemente intervienen en procesos de oxidoreducción. Son fácilmente oxidables por tanto de gran poder reductor; además, dado su poder de quelación de metales, pueden formar complejos con los oligo-elementos necesarios para determinados sistemas enzimáticos (18), de aquí su poder antioxidante en la planta.

Actúan también como reguladores del crecimiento y como protectores frente a la infección microbiana (19).

II.2.4.- BIOGENESIS

El proceso de formación de estos compuestos en los vegetales ha sido objeto de numerosas investigaciones (20, 21,22), de las que se deduce que todos ellos están relacionados biogénicamente. De manera experimental se demuestra que el núcleo A, segmento de seis carbonos del esqueleto $C_6-C_3-C_6$, tiene su origen en una policondensación de -- unidades acéticas. La porción restante de nueve carbonos -- tiene como precursor una unidad C_3-C_6 , formada a su vez a partir de osas por la vía de siquímico-prefénico.

La luz no es un factor esencial para su formación, pero influye cuantitativamente(23).

A continuación presentamos un esquema de formación de diferentes tipos de flavonoides (Grisebach, 1.965). Figura (2).

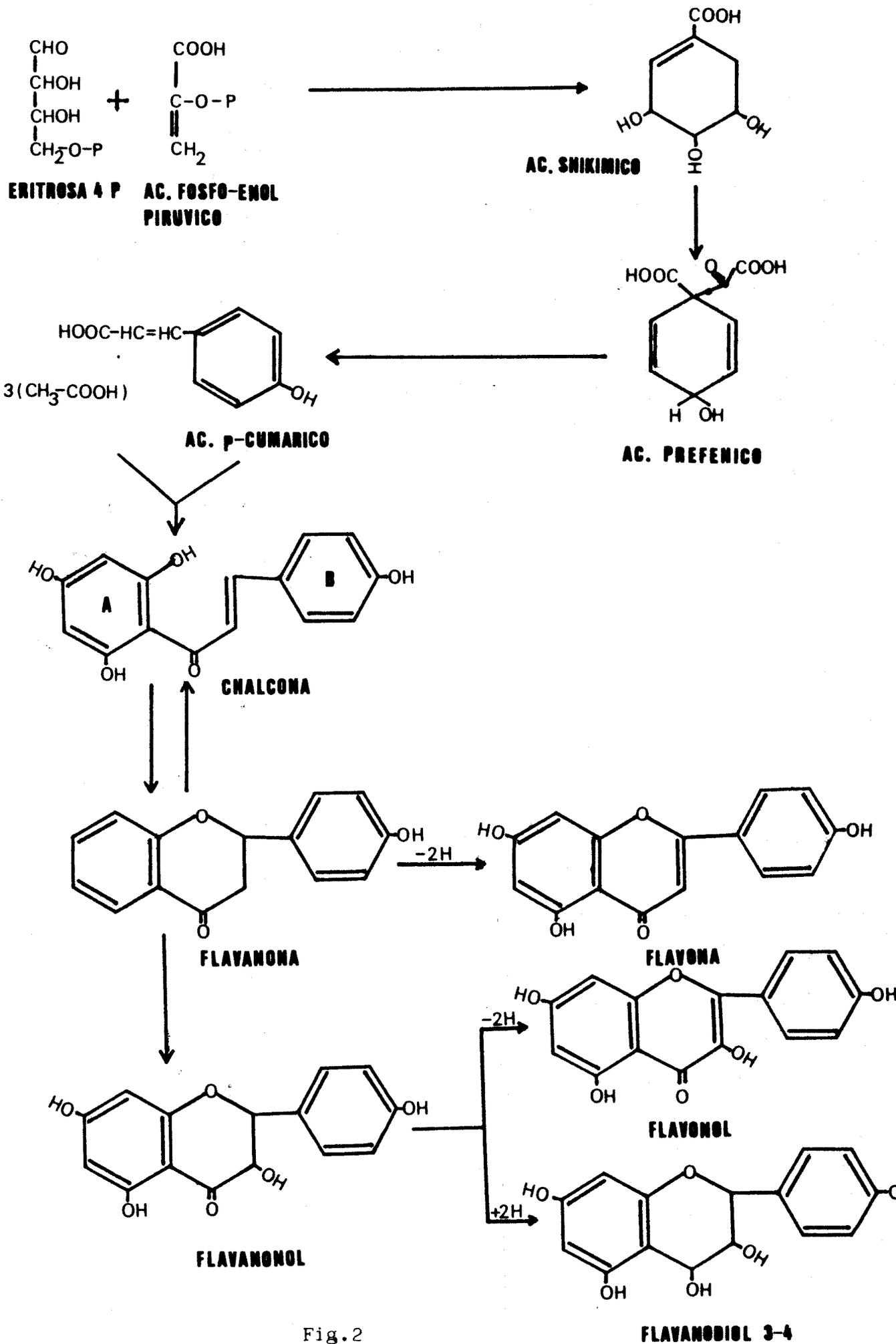


Fig. 2

II.2.5.- ACCIONES FARMACOLOGICAS

Acción vitamínica

Las primeras investigaciones farmacodinámicas de los flavonoides se realizaron en el año 1.913, alcanzando su mayor auge cuando en 1.936 Rusznyak y Szent-Gyorgy (24), estudiando un complejo extraído de ciertos frutos cítricos denominado "citrina", descubrieron su acción vitamínica. La citrina resultó ser una mezcla de dos flavonoides: hesperidina y eriodictiol.

En 1.968, De Eds (25) concluyó que los flavonoides con hidróxilos libres en las posiciones 3,4' ejercen un efecto beneficioso sobre los capilares a través del siguiente mecanismo de acción:

- Quelatando metales y, de este modo, luchando contra la oxidación del ácido ascórbico.
- Prolongando la acción de la epinefrina por la inhibición de la O-metil-transferasa. Parece ser que compiten con la adrenalina por la COMT, por consiguiente, disminuyen indirectamente la permeabilidad capilar por un efecto sobre el metabolismo de la adrenalina, responsable del mantenimiento del tono vascular.
- Estimulando el eje pituitaria-adrenal.

Srinivasan (1.971) y Robbins (1.973) demostraron que los flavonoides juegan un importante papel en los sistemas circulatorios por activación de la agregación de eritrocitos.

Flavonas, flavanoles, flavanonas, y flavandioles poseen entre otras acciones, la capacidad para disminuir la permeabilidad capilar y elevar su índice de resistencia (26, 27).

Entre los flavonoides con actividad vitamínica P. destaca, sobre todo, la rutina y, en menor grado, quercetina y hesperidina, así como la diosmina (7-ramnoglucósido 5,7,3'-trihidroxi-4 metoxiflavona), que resulta particularmente eficaz en el tratamiento de la retinitis diabética (28,29).

Acción antimicrobiana

Descrita y estudiada por diversos investigadores. Power (1964) (30,31) estudió los efectos de algunos flavonoides sobre Salmonella typhosa, S. enteritidis, Shigella paradysenteriae, Staphylococcus aureus, Aerobacter aerogenes, Proteus vulgaris, Escherichia coli, Lactobacillus casei L. y acidophilus; la mayoría de ellos inhibieron la respiración y reproducción a dosis de 1 o 2 μ moles si la glucosa estaba presente en el medio; en ausencia de glucosa, los flavonoides fueron metabolizados.

Weller y cols.(30) aislaron de la Primula malacoides una flavona capaz de inhibir el crecimiento del Mycobacterium tuberculosis. Uri-Szabo (1941) comprobaron la acción bacteriostática de la ramnetina y quercetina.

Los flavonoides aislados del Tribulus alatus, kanferol y quercetina, se han mostrado inhibidores frente a -- E.coli, S.aureus y Candida albicans (32), y la 5-hidroxi,7,4' dimetoxiflavona de Jatropha podagrica posee propiedad antimicrobiana y antifúngica, aunque no significativa si se compara con sulfato de Estreptomicina, Griseofulvina o Cloranfenicol (33).

Frente a los autores que obtienen resultados positivos en sus investigaciones (34), existen otros con resultados negativos (35). Así, en un reciente estudio sobre el mecanismo de la acción bacteriostática de los flavonoides sobre S.aureus, se puso de manifiesto la capacidad inhibidora de dos flavanonas naturales: la 5,7-dihidroxiflavona, y la 7-hidroxiflavanona, a dosis de 100 µg /ml y 220 µg /ml respectivamente, frente a la 4-hidroxiflavanona y la flavanona, obtenidas por síntesis, que dieron resultados negativos (36).

El mecanismo de la acción bacteriostática puede -- ser:

- por modificación de membranas celulares
- acomplejando metales esenciales

- alterando la cara interna de la membrana celular

El estudio de la relación estructura-actividad de 63 flavonoides, probados por su acción antibacteriana frente a las bacterias patógenas Pseudomonas maltophilia y Enterobacter cloacae (37), ha puesto de manifiesto una más -- alta actividad cuando el número de grupos hidroxilo aumenta. La inhibición del crecimiento de ambas especies fue observado para geninas de flavonas y flavonoles con grupos ortodihidroxi. La metilación generalmente baja la actividad. Los 3-O-glucósidos ensayados inhibían a P.maltophilia, pero sólo el correspondiente ramnósido inhibió a E.cloacae. Entre los 7-O-glicósidos ninguno inhibió E.cloacae y sólo aquellos en posición 3 fueron activos contra P.maltophilia.

Acción antivirásica

Algunos flavonoides son efectivos contra infecciones producidas por virus. El Herpesvirus hominis es inhibido por la quercetina a dosis de 300 $\mu\text{g/ml}$, pero no por rutina o dihidroquercetina (31).

Por otra parte, se ha demostrado la eficacia de la quercetina contra virus encapsulados; sin embargo, virus sin envoltura se muestran moderada o completamente resistentes.

Crisofenol B y crisofenol C aislados de *Chrysosplenium*, y axillarina muestran una potente actividad antiviral específica contra rhinovirus humano (picornavirus). Entre los flavonoides probados tan sólo las 3-metoxiflavonas poseen actividad. Los grupos 3 metoxil y 5 hidroxil del esqueleto de la flavona son necesarios para la actividad contra rinovirus, pudiendo verse ésta afectada por varios grupos en otras posiciones. Así, el sustituyente en posición 6, no parece afectar a la actividad directamente pero afecta a su citotoxicidad (38).

En general, los flavonoides tienen poca o ninguna actividad antiviral contra el virus de Herpes simple HFS (ADN virus) y virus de la influenza (ARN virus) in vitro (38).

Acción antihelmíntica

También ha sido demostrada para algunos flavonoides, siendo las chalconas generalmente efectivas contra la lombriz intestinal en ratones, especialmente aquellas con grupos hidroxilos como sustituyentes (31).

Acción citostática

Algunos flavonoides son conocidos por sus propiedades mutágenas, pudiendo igualmente presentar actividad cito-

tóxica sobre sistemas celulares normales y tumorales.

Así, ramnetina, galantina, fisetina y quercetina, tienen una marcada actividad citostática (39,31). Eupatina, eupatoretina y cualquier centauridina son moderadamente -- efectivos frente a determinados carcinomas (31), mostrándose también con una mediana potencia rutina, dihidrofisetina y dihidroquercetina (39,40).

Las bioflavonas son generalmente más activas que los monómeros correspondientes.

El esqueleto flavónico es probablemente el principal responsable de la actividad citostática; el número, la naturaleza (OH libres) y la posición (dos OH en 3' y 4') de los sustituyentes podrían tener un papel en la biodisponibilidad de la sustancia considerada (39).

Acción estrogénica y antifertilizante

Concierne casi exclusivamente a isoflavonas -- (41,42,43), detectándose por primera vez en la genisteina.

La quercetina, el kanferol-3-ramnosilgalactósido-7-ramnósido y la tricina, han demostrado poca actividad. La hesperidina y morina administradas junto con progesterona, bloquean los efectos de ésta (44).

Sin embargo, los flavonoides son suaves agentes -estrogénicos en comparación con el 17- β -estradiol, y administrados con él muestran un efecto antiestrógeno por inhibición competitiva con el sitio del receptor en útero; poseen a su vez actividad uterotrópica (aumentan el peso del útero), e inhiben la implantación, produciendo una interrupción del embarazo (45).

Por otra parte, los flavonoides provocan una interrupción de la espermatogénesis, sin afectar a la morfología y función de las células de Liedig; disminuyen el diámetro de los túbulos seminíferos y alteran la función epididimal, estructuras todas ellas dependientes de los andrógenos (46). Reducen la concentración de ácido siálico, de proteínas y ARN, lo que se traduce en un bajo nivel de andrógenos.

Además, provocan un incremento del contenido de colesterol, así como de la actividad fosfatasa, que puede ser debido a la degeneración del epitelio seminal. Similar acumulación de colesterol se observa en machos tratados con estrógenos, así como una elevación de enzimas hidrolíticas, lo que demuestra la alteración de la función epididimal.

Acción espasmolítica

Luteolina, apigenina, cirsilineol, 8-metoxi-cirsilineol y timonina, aislados del Thymus vulgaris L., poseen una marcada actividad antiespasmódica, inhibiendo la respuesta a agonistas que estimulan específicamente los receptores (acetil-colina, histamina, L-noradrenalina), así como a agentes cuyas acciones no son mediadas por la vía específica del receptor (BaCl_2) (47,48,49). Van Den Broucke y col. (48) señalan que las flavonas del Thymus vulgaris L. actúan como antagonistas no competitivos y no específicos; son antagonistas de Ca^{++} originando una espasmolisis musculotrópica. Parece ser, sin embargo, que los flavonoides actúan de forma competitiva a bajas concentraciones, y no competitivamente a altas concentraciones.

Torck y col.(50) atribuyen a los flavonoides de Melilotus alba Desr., un efecto espasmolítico de naturaleza neurotrópa y, sobre todo, antihistamínica.

Otros flavonoides que también poseen ésta acción son el flavoxato, tetrahydroisoquinolil-alcoxiflavona y [N-(7-flavoniloxi)-acetil]-tetrahidropapaverina (51).

Algunos autores señalan que existe una correlación entre la acción espasmolítica y la inhibición del enzima AMP_c fosfodiesterasa, lo que revierte en un aumento de -

los niveles de AMP_c, proponiéndolo como posible mecanismo - de acción (52).

Se ha comprobado una cierta relación estructura-acción en estos compuestos, habiéndose demostrado que:

- las geninas poseen un efecto más potente que los glicósidos.
- una sustitución del grupo hidroxilo en el anillo de la cromona refuerza el efecto espasmolítico.
- grupos OH adicionales en el resto fenílico no tienen influencia marcada.

Acción antiinflamatoria

En 1977 Gabor y Blazsó señalaron la influencia de la O- β -hidroxietil-rutina sobre la formación del edema inducido por carragenina y prostaglandina E₁; así mismo, la taxifolina, flavonoide obtenido de Madhuca butyranca, mostró una significativa actividad similar a la hidrocortisona (51).

Entre los flavonoides activos destacan la hesperidin-metilchalcona, gossipina, podoverinas A,B y C de Podophyllum versipelle (61), nepritina de Nepeta hindostana usado - como agente antiinflamatorio y antiartrítico, e hipoletin-8-glicósido aislado de Sideritis mugronensis (53).

Della Logia y col. (54) manifiestan esta acción --

para un gran número de derivados de la benzo(γ)pirona.

Apigenina y luteolina aisladas de Chamomilla recutita han demostrado tener una potencia similar a la indometacina; sin embargo, quercetina, apigenina-7-glicósido y rutina son menos activas. Apigenina y luteolina, además de inhibir el desarrollo del edema, inhiben la filtración granulocítica.

En general, los flavonoides actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas pertenecientes a las series E_2 y $F_{2\alpha}$ (55), que juegan un papel importante en el desarrollo de la fase secundaria del edema, mediante la inhibición de la fosfolipasa A_2 (principal enzima involucrado en la síntesis de las mismas), de manera semejante al mecanismo fundamental de la acción antiinflamatoria de los corticoides (56).

Acción antiulcerosa

Existen numerosos flavonoides con efectos antiulcerosos entre los que podemos citar: la O - β -hidroxietil-rutina, aesculina, 3- O -metil(+)-catequina, cianidol, apigenina-7,4'-di- O -metileter, SU-88 (2'-carboximetoxi-4,4'-bis(3-metil-2-beteniloxi)chalcona), naringenina, e hipoletin-8-glicósido (51).

Estos compuestos reducen la incidencia de úlceras

así como la intensidad de marcas de la mucosa dañada (57). La actividad antiulcerosa parece ser debida a:

- la inhibición del enzima histidina descarboxilasa.
- inhibición de la desgranulación de mástocitos o -
celulas cebadas.
- el directo antagonismo de los efectos de la histamina sobre los capilares de la mucosa gástrica.
- cambios en la neurotransmisión histaminérgica.
- combinación de más de uno de estos mecanismos.

Acción antihepatotóxica

El estudio de los efectos antihepatotóxicos de silimarina y (+)cianidol-3, significó un nuevo rumbo, en la investigación de los derivados de la benzo(γ)pirona (51).

Silimarina, actúa sobre hígado dañado de rata, antagonizando los efectos de la intoxicación con faloidina, α -amanitina, praseodimio, Cl_4C y D-galactosamina, e inhibido la alteración cirrótica del parenquima hepático producida por tioacetamida.

A su vez, el cianidol ejerce un efecto protector sobre los desórdenes del hígado inducidos por el etanol; eleva el nivel hepático de ATP durante la esteatosis experimental, protege de la intoxicación con Cl_4C , faloidina y galactosamina, y estabiliza la membrana lisosomal.

Acción colerética

La acción de los derivados flavónicos sobre la coleresis parece variable.

No se ha observado aumento de la secreción biliar bajo la influencia del apiósido, mientras que el rutósido, luteolósido, quercetósido, miricitrósido, capilarisina, y - los citroflavonoides se han mostrado coleréticos (50,51)

Acción antihipercolesterolemica

Numerosos estudios han demostrado el efecto protector de los flavonoides contra la arteriosclerosis.

Savel en 1972 demostró la acción antihipercolesterolémica de quercetina, epicatequina y dietilflavona-5,7, bis/oxiacetato, mostrándose esta última además como vasodilatador y capilarotrópico.

Más tarde, Basaker y Hatvalne (1975) demostraron que la epicatequina produce una bajada de las tasas de colesterol en suero e hígado, mientras que la quercetina sólo baja los niveles en hígado (51).

Biochanina A, formononetina y pratenseina reducen el colesterol y los triglicéridos en suero.

Acción antitrombótica

La interacción de las plaquetas con los componentes de las paredes de los vasos, es uno de los primeros pasos en trombosis y arteriosclerosis. La inhibición de la agregación plaquetaria puede realizarse por muchos mecanismos, entre los cuales el incremento de los niveles de AMP_c en plaquetas es uno de los más potentes.

Los flavonoides actúan como antitrombóticos inhibiendo la AMP_c fosfodiesterasa, destacando por su actividad quercetina y fisetina (58)

Así mismo, los flavonoides inhiben la ciclooxigenasa y lipoxigenasa, impidiendo de este modo la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas; rutina, quercetina, metil--quercetina y cirsilineol actúan de este modo (59).

Por otro lado, el agrupamiento catecol puede interaccionar con los receptores adrenérgicos de las plaquetas, ejerciendo un posible antagonismo competitivo con la adrenalina, que pudiera prevenir las consecuencias de una hiperagregabilidad plaquetaria.

Los citroflavonoides ejercen un efecto protector antitrombótico frente al ADP, el cual es un potente inductor de la agregación plaquetaria; cabe suponer, que los citroflavonoides se oponen a su efecto por inhibir dicha

actividad antiagregante (60).

En 1985, se demostró el efecto inhibidor de la agregación plaquetaria de los citroflavonoides del Citrus limonum Risso eriodictiósido y hesperidósido; el distinto comportamiento de ambos flavonoides puso en evidencia una posible influencia de sus diferencias estructurales sobre su actividad. Parece ser que la actividad inhibidora radica en los sustituyentes del anillo fenólico que está unido al núcleo de la cromona; si estos sustituyentes son hidroxilos libres se manifiesta la actividad, la cual se ve reducida por:

- OH substituido en el C,2
- saturación del doble enlace C,2-C,3
- ausencia del carbonilo en el C,4
- un grupo azucarado en el C,3

Acción antihemólítica

Descrita y estudiada por diversos investigadores, se demostró la capacidad de los flavonoides para estabilizar las membranas del eritrocito humano (HRBC), manteniendo su integridad y conformación contra la hipotonicidad que induce su lisis.

El mecanismo de acción fue atribuido al hecho de que estos compuestos incrementan el "Volumen Hemolítico Crítico" (V_c) de los eritrocitos, debido a un aumento del área de la membrana o a un cambio en la visco-elasticidad de la misma (56).

Los flavonoides inhiben la fosfolipasa A_2 (principal enzima involucrado en la síntesis de prostaglandinas) y previenen la formación de lisolecitina.

La fosfolipasa A_2 , actúa sobre la lecitina para producir lisolecitina, que tiene la propiedad de lisar membranas eritrocíticas humanas.

Otras acciones a nivel del sistema cardiovascular son estimulantes de la función cardiaca (62,63,64) (posiblemente por aumentar el flujo por las arterias coronarias), vasodilatadora (48,59), hipotensora (65,66,67) y antianginosa.

La actividad antianginosa ha sido demostrada para oxiflavil (flavona 7-etiloxiacetato) que causa vasodilatación coronaria; ipriflavona (51) y puerarina aislada de Radix pueraria, usada en china como remedio a los síntomas de hipertensión y angina de pecho (68).

Acción diurética

Manifiestan dicha acción diferentes compuestos - flavonoides: flavonoles y sus correspondientes glicósidos (quercetina, rutina y quercetrina), flavonas (luteolina, -- apigenina), flavononas (hesperidina, naringenina) y otros flavonoides de estructura no precisada (69,70,71).

Otras acciones atribuidas a estos compuestos son: bloqueante β -adrenérgico (derivados del propanolol-tipo-flavona); expectorante (farnesol, aislado de Rhododendron dauricum L. y usado en el tratamiento de la bronquitis crónica), antialérgicos (baicaleina, que muestra una inhibición inmediata de las reacciones de hipersensibilización) y analgésica, como la gospina (51).

II.2.6.-EXTRACCION

Los heterósidos flavónicos son generalmente solubles en agua y alcohol e insolubles en éter, cloroformo y benceno; las geninas son, por el contrario, solubles en éter e insolubles en agua (28).

Un método preliminar de separación, es la extracción con distintos solventes de varias polaridades, que

puede permitir la separación de glicósidos flavónicos de agliconas (72).

Existen numerosos métodos para la extracción de flavonoides, entre los que destacan el de Netien-Lebreton (73) y el de Charaux-Paris (74), que utilizan cambios de disolventes de distinta polaridad.

La extracción de las geninas flavónicas se realiza según la técnica de Bate-Smith, modificada por Lebreton (75); las principales etapas consisten en la hidrólisis -- clorhídrica en caliente del material vegetal y en agotamiento sucesivo de la fase acuosa hidrolizada por éter etílico (flavonoles, flavonas, etc.) y por n-butanol (C-glicoflavonas, antocianidinas, etc.).

II.2.7.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

Para la separación y aislamiento se recurre generalmente a métodos cromatográficos.

En la cromatografía en papel, el Whatman nº1 es el más utilizado para la separación de los flavonoides. La cromatografía preparativa permite aislar una cantidad de sustancia apreciable, utilizando papel de mayor espesor -- (Whatman nº3 y 3MM), que tiene una gran capacidad de adsorción (76).

La cromatografía en capa fina posee la fineza de separación de la cromatografía en papel; como adsorbentes - suelen utilizarse silicagel, celulosa, o poliamida; la técnica es más rápida, pero la reproductibilidad de los Rf no es tan buena.

La detección de los componentes, se hace en las - mismas condiciones para la cromatografía en papel y capa fina. Algunos flavonoides se detectan directamente por su coloración propia a la luz U.V.; sin embargo, otros no pueden ser puestos en evidencia más que después de la pulverización con un reactivo apropiado. En ciertos casos, los heterósi-- dos pueden tener una reacción diferente de las de sus geni-- nas.

Entre los reveladores más utilizados se pueden citar: potasa alcohólica (coloración amarilla), cloruro férrico, reactivos de diazotación, cloruro de aluminio (fluorescencia con los flavonoles), borohidruro de potasio (manchas rojo-violáceas con las flavononas), etc. (28).

La cromatografía en columna tiene una misión do-- ble: perfeccionar la selectividad y conseguir la pureza cromatográfica de los productos aislados.

Otras técnicas menos utilizadas son la cromatografía Gas-Líquido, electroforesis en papel y cromatografía líquida de alta resolución (77).

La identificación preliminar del flavonoide se -- realiza mediante cromatografía en capa fina o en papel (76), por sus valores de Rf y coloración a la luz U.V. o tras el empleo de reveladores.

Para el análisis estructural de los flavonoides - se utilizan las técnicas de: espectrofotometría U.V.(78,79, 80,82), IR, RMN (78), espectrometría de masas (83,84,85,86, 87, 115,116), y el sistema acoplado CG-EM (88).

II.3.- FLAVONOIDES EN EL GENERO ERICA

Se puede afirmar que los compuestos fenólicos se encuentran en todos los vegetales superiores. El estudio de su presencia en especies vegetales (89) ha adquirido un gran interés por sus implicaciones taxonómicas y por su influencia en la fisiología de la planta.

Cabe destacar el gran papel de los flavonoides en quimiotaxonomía vegetal; en efecto, estos compuestos son particularmente interesantes como "marcadores taxonómicos" debido a su estabilidad, fácil identificación y amplia distribución en el reino vegetal (90).

En la tabla I, que incluimos en la página siguiente, intentamos ofrecer una visión de los flavonoides existentes en las diversas especies del género Erica (91,92,93, 94).

Según Fraga Vila (93), los compuestos fenólicos - identificados en las Ericas se pueden reunir en dos grupos.

En uno de ellos se incluyen todos aquellos que -- por estar universalmente distribuidos no tienen valor taxonómico (ac.p-hidroxibenzoico, ac.siringico, ac.vanillico, ac.protocatéquico, ac. cafeico, ac.sinápico, ac.p-cumárico, ac.ferúlico, ac.clorogénico).

El otro grupo comprende los compuestos que, por - estar su presencia restringida a determinadas especies, son considerados de interés taxonómico.

Dentro de este segundo grupo hay sustancias, como quercetina y taxifolina, que presentan valor taxonómico a - nivel de familia, pero no son buenos taxones a nivel de especies por estar presentes en muchas de ellas.

Entre los compuestos identificados con valor taxonómico a nivel específico, podemos citar: kanferol y miricetina.

Según Harbone (95), dentro del género Erica, la - miricetina parece estar presente en las plantas con mayor - grado de lignificación, mientras que el predominio de kanferol y ausencia de miricetina, generalmente se da en las menos lignificadas.

Por el contrario Fraga Vila (93) indica que en --
E.mackaiana Bab., que no es una de las especies con mayor --
grado de lignificación, existe un predominio de miricetina,
mientras que el kanferol está ausente.

III- PARTE

EXPERIMENTAL

III.1.- MUESTRA

La especie fue recolectada en Nerva (Huelva) a principio de Noviembre de 1986 en periodo de floración, desecándose a temperatura ambiente (15-25°C) con abundante ai reacción y conservándose al abrigo de la luz y la humedad.

En nuestras experiencias hemos utilizado la sumidad florida, eliminando los tallos más leñosos.

III.2.-OBTENCION DEL EXTRACTO A ESTUDIAR

Al estudiar con anterioridad la fracción correspondiente a los ácidos fenoles de Erica andevalensis (96,97) comprobamos una pérdida de la actividad farmacológica en la purificación de los mismos.

Es por ello que hemos abordado el estudio del extracto etéreo resultante del primer paso de dicho proceso, según el método de Lescao modificado (98), cuyo esquema representamos en la figura (3).

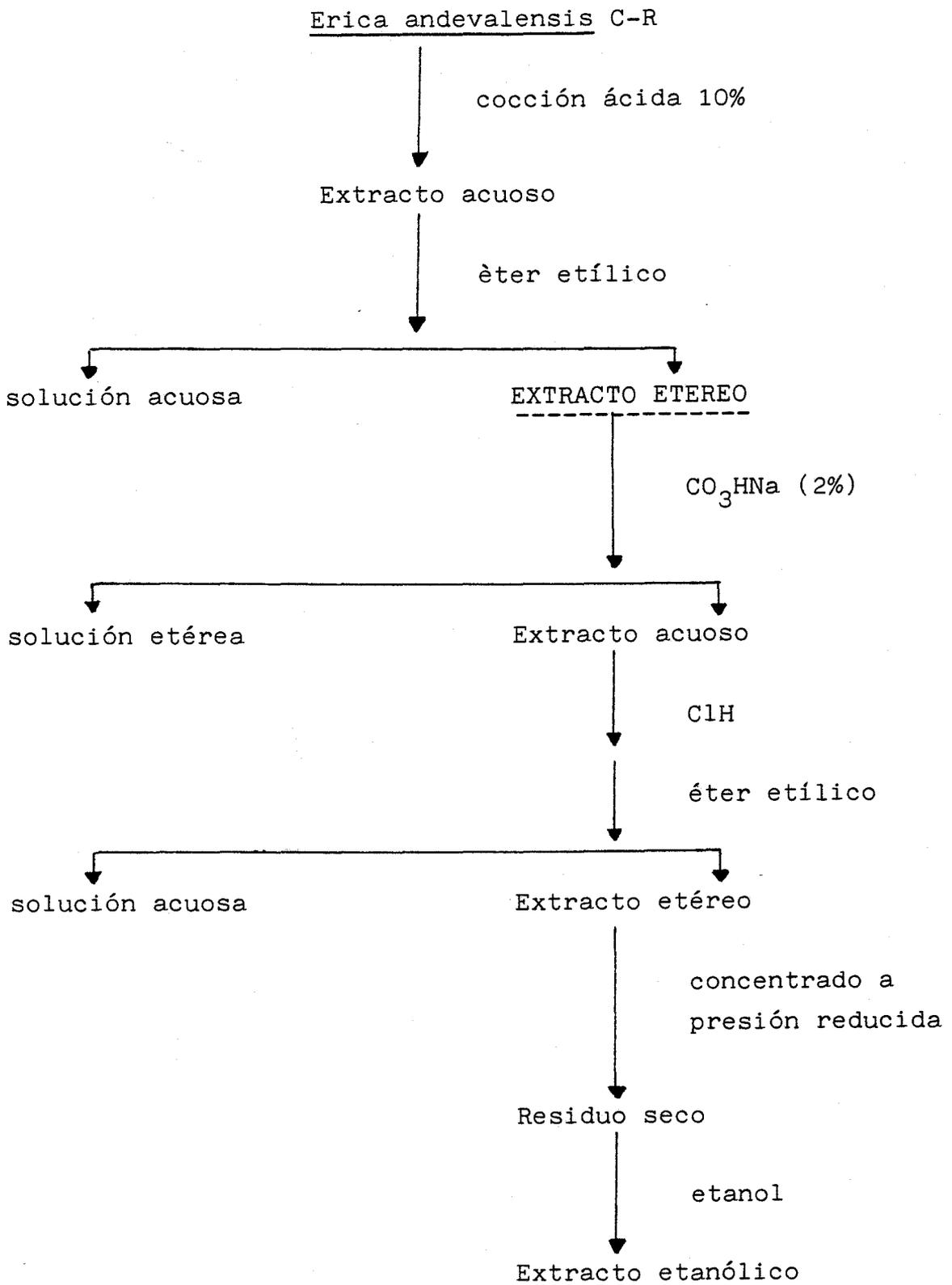


Fig. (3)

Partimos de las sumidades floridas que fueron extraídas con agua acidulada con ClH hasta pH ácido (aproximadamente 1), manteniéndolas previamente en maceración durante 15 minutos; el rendimiento de la extracción fue del 11,4 %.

El extracto acuoso así obtenido se trato con etér etílico hasta agotamiento, dando lugar al extracto etéreo - objeto de nuestro estudio y cuyo residuo seco es del -- 0,27 %.

III.3.- ESTUDIO DEL EXTRACTO ETereo POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

La separación de los diferentes componentes del extracto etéreo se realizó por cromatografía en columna de gel de sílice.

Previamente, se hizo un estudio cromatográfico en capa fina con soporte de silicagel y diversas fases móviles para establecer un criterio de selección de los eluyentes a emplear en la cromatografía en columna, con las mejores posibilidades de separación de los componentes de la mezcla.

Partimos de 1,0075 g de residuo seco que, una vez disuelto en metanol, fue mezclado con gel de sílice 0,2-0,5 mm formando una cabeza que se montó en una columna de gel de sílice 0,063-0,2 mm previamente humedecida con n-hexano, solvente con el que se inició la elución, para continuar -- con mezcla acetato de etilo/n-hexano (8:1) y acetato de -- etilo/metanol de polaridad creciente.

Se recogieron 267 fracciones de, aproximadamente, 15 ml cada una, que se agruparon de acuerdo con su comportamiento en cromatografía en capa fina. Esta cromatografía general se resume en la tabla (II).

TABLA (II)

<u>FRACIONES</u>	<u>ELUYENTE</u>	<u>OBSERVACIONES</u>
1	AcOEt/n-hexano (8:1)	A + B + Mezclas
2	"	C + Mezclas
3	"	C + D
4-5	"	D + Trazas
6	"	Mezclas
7-10	"	E + Mezclas
11-22	"	Mezclas
23-31	"	Mezclas
32-37	"	Mezclas
38-51	"	Mezclas
52-97	"	F + Mezclas
98-127	"	Mezclas
128-174	"	Mezclas
175-179	AcOEt/MeOH (6:4)	Mezclas
180-231	"	Trazas
232-261	AcOEt/MeOH/H ₂ O (80:5:5)	Trazas
262-267	MeOH	Trazas

III.3.1.- IDENTIFICACION DEL COMPUESTO "C"

Realizamos la identificación del compuesto C por medio de reacciones coloreadas, métodos cromatográficos y - espectrofotometría U.V., I.R. y RMN.

III.3.1.A- REACCIONES COLOREADAS

Los patrones y el compuesto, en solución metanólica, se observaron sobre papel cromatográfico (luz visible y U.V.-350 nm) sin revelar, revelados con Cl_3Al (sol. alcohólica 3 %) (28) y después de expuestos a vapores de amoníaco (99).

Las coloraciones observadas figuran en la tabla (III).

Los resultados obtenidos nos orientan hacia un flavonol 3-hidroxi-libre, con o sin OH libre en 5.

TABLA (III): COLORACIONES OBTENIDAS

COMPUESTOS	<u>OBS. DIRECTA</u>		<u>Cl₃Al(sol.alcohol.3%)</u>		<u>VAPORES NH₃</u>	
	VISIBLE	U.V.	VISIBLE	U.V.	VISIBLE	U.V.
Luteolina	Amarillo	Púrpura	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Quercetina	"	Amarillo	"	Amarillo- fluorescente	"	"
Rutina	"	Púrpura	"	Amarillo	"	"
C	"	Amarillo	"	Amarillo- fluorescente	"	"

III.3.1.B.- METODOS CROMATOGRAFICOS: CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Se ha utilizado el método descendente y se han seleccionado fases móviles que nos permitan distinguir si se trata de una genina o de un heterósido. Las condiciones -- cromatográficas son las siguientes:

Soporte papel Whatman nº1

Estado de saturación de
la cámara 1h

Método monodimensional descendente

Fases móviles:

- (a) n-butanol/ac.acético/agua (4:1:5 V/V)
(75,91,95)
- (b) ac.acético 60 % (75)
(característica de geninas)
- (c) ac.acético 15 % (100)
(característica de heterósidos)
- (d) ac.acético/H₂O/ClH (30:10:3 V/V) (75,
91,95,100) (característica de -
geninas)

Reveladores:

-luz U.V. (350 nm)

- Cl_3Al (sol. alcohólica 3 %)

Temperatura 20°C

Los Rf_{100} , según la fase móvil empleada, se encuentran en la tabla (IV).

TABLA (IV): VALORES MEDIOS DE RF_{100}

	(a)	(b)	(c)	(d)
Luteolina	77	47	5,4	65
Quercetina	66	30	2,7	45
Rutina	51	68	54	85
C	63	29	2,9	41

(a) n-butanol/ac.acético/agua (4:1:5 V/V)

(b) ac.acético 60 %

(c) ac.acético 15 %

(d) Forestal

III.3.1.C.- ESPECTROFOTOMETRIA U.V.

Los espectros se realizaron en un espectrofótopetro Lambda 3 Perkin Elmer, con registrador incorporado, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor y de 3 ml de capacidad. El disolvente empleado fué metanol de máximo grado de pureza.

Los compuestos flavonoides presentan unos máximos de absorción característicos; estas absorciones pueden ser modificadas por la adición de diferentes reactivos, debido a la presencia de sustituyentes en posiciones determinadas en su estructura (81).

El espectro en metanol (fig.4), y particularmente la posición de la banda I, nos da información acerca del tipo de flavonoide y del estado de oxigenación. El espectro del compuesto "C", presenta máximos de absorción a λ máxima de 370 nm (banda I) y 252 nm (banda II), así como un hombro a 290 nm; estas absorciones se corresponden con un flavonol 3-hidroxi libre (banda I entre 352-385 nm).

Los cambios espectrales con diferentes reactivos se exponen en la tabla (V), página 52.

La medida realizada después de la adición de MeONa, reactivo característico para la determinación de grupos OH en posiciones 3 y/o 4' (81), nos muestra un desplazamiento

miento batocrómico de 62 nm en la banda I, (λ máx. 432 nm). La repetición del espectro a intervalos diferentes de tiempo, presentaba una disminución en la intensidad de dicho máximo de absorción, lo que nos indica la presencia del sistema 3,4' hidroxilos libres o bien 3,3',4' tri-hidroxilo.

La presencia de un grupo orto-dihidroxi en el anillo B de flavonas y flavonoles, puede ser detectada por comparación del espectro del flavonoide en presencia de Cl_3Al con el obtenido en $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{HCl}$. La desviación hipsocrómica de 30 nm en la banda I sugiere la existencia de este grupo. Se observa así mismo, un desplazamiento batocrómico de 55 nm con respecto al espectro en metanol, indicativo de un sistema 3,5 dihidroxiflavonol.

La adición de AcONa anhidro provoca un desplazamiento batocrómico de 20 nm en la banda II, que nos permite deducir la existencia de un grupo OH libre en posición 7.

El reactivo AcONa/ BO_3H_3 es indicativo para detectar grupos orto-dihidroxi; en nuestro caso, la aparición de un salto batocrómico de 14 nm en la banda I, identifica totalmente este grupo.

$\Delta \lambda$ = incremento en la longitud de onda

$\Delta \lambda_{\text{I}}$ = desplazamiento de la banda I con respecto al espectro en MeOH

$\Delta \lambda'_{\text{I}}$ = desplazamiento de la banda I del espectro del flavonoide en presencia de Cl_3Al con el obtenido en $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{HCl}$.

$\Delta \lambda_{\text{II}}$ = desplazamiento de la banda II con respecto al espectro en MeOH

TABLA (V): ESPECTROS U.V. EN MEOH

REACTIVOS AÑADIDOS	$\lambda_{\text{máx.}}, \text{nm}$		$\Delta \lambda$	CONCLUSIONES
	BANDA I	BANDA II		
	370	252		-Flavonol 3-hidroxi libre
MeONa	432	245	$\Delta \lambda_{\text{I}} = 62 \text{ nm}$	-3 y 4'dihidroxiilos libres, o 3,3',4' trihidroxiilos libres
AlCl_3/HCl	455	269		
AlCl_3/HCl	425	265	$\Delta \lambda_{\text{I}} = -30 \text{ nm}$ $\Delta \lambda_{\text{r}} = 55 \text{ nm}$	-grupo orto-dihidroxi en el anillo B 3,5 dihidroxiflavonol
NaOAc	390	272	$\Delta \lambda_{\text{II}} = 20 \text{ nm}$	-OH libre en 7
$\text{NaOAc}/\text{B}(\text{O})_3\text{H}_3$	384	247	$\Delta \lambda_{\text{I}} = 14 \text{ nm}$	- agrupamiento orto-dihidroxi

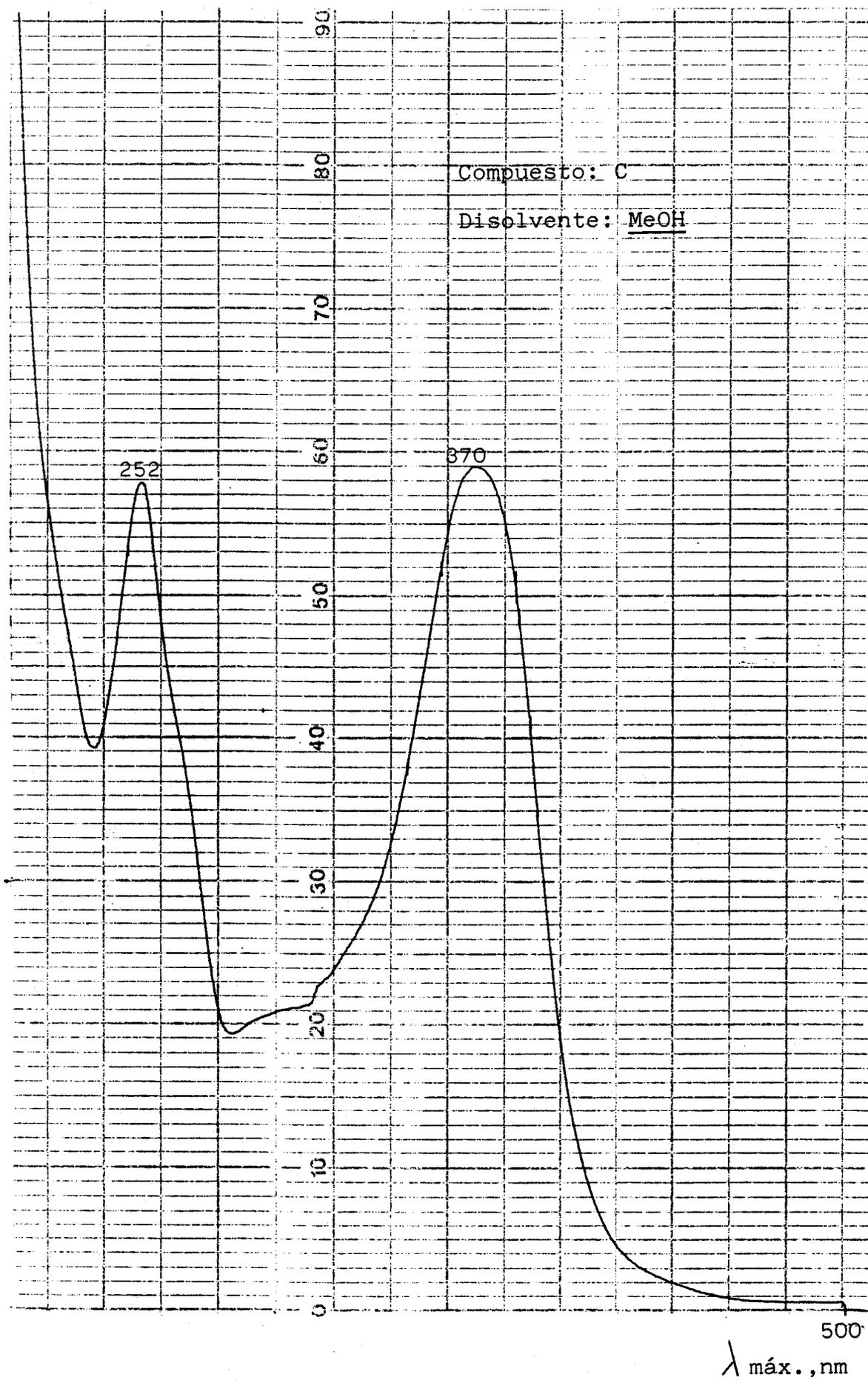


Fig. 4

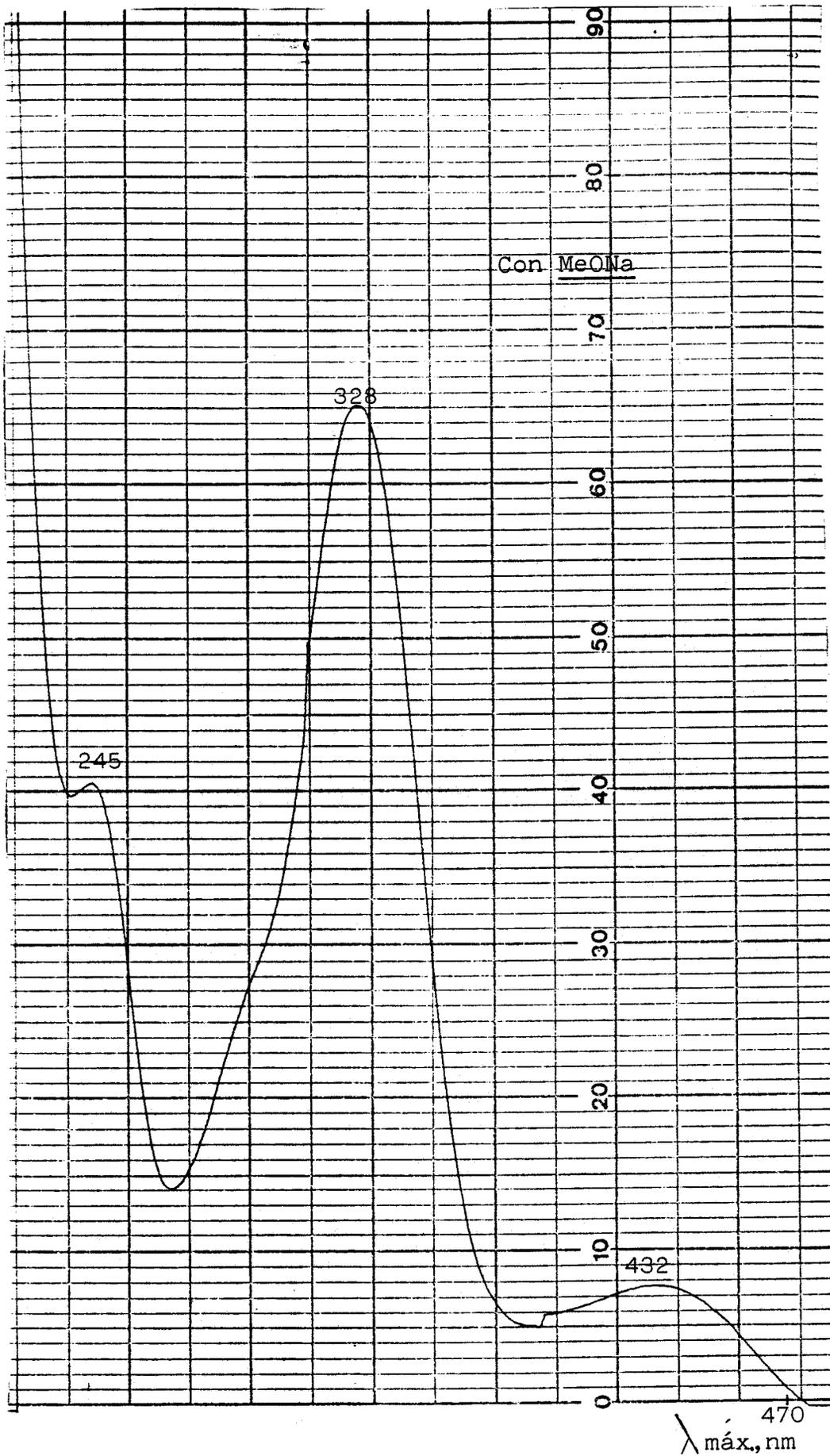


Fig. 5

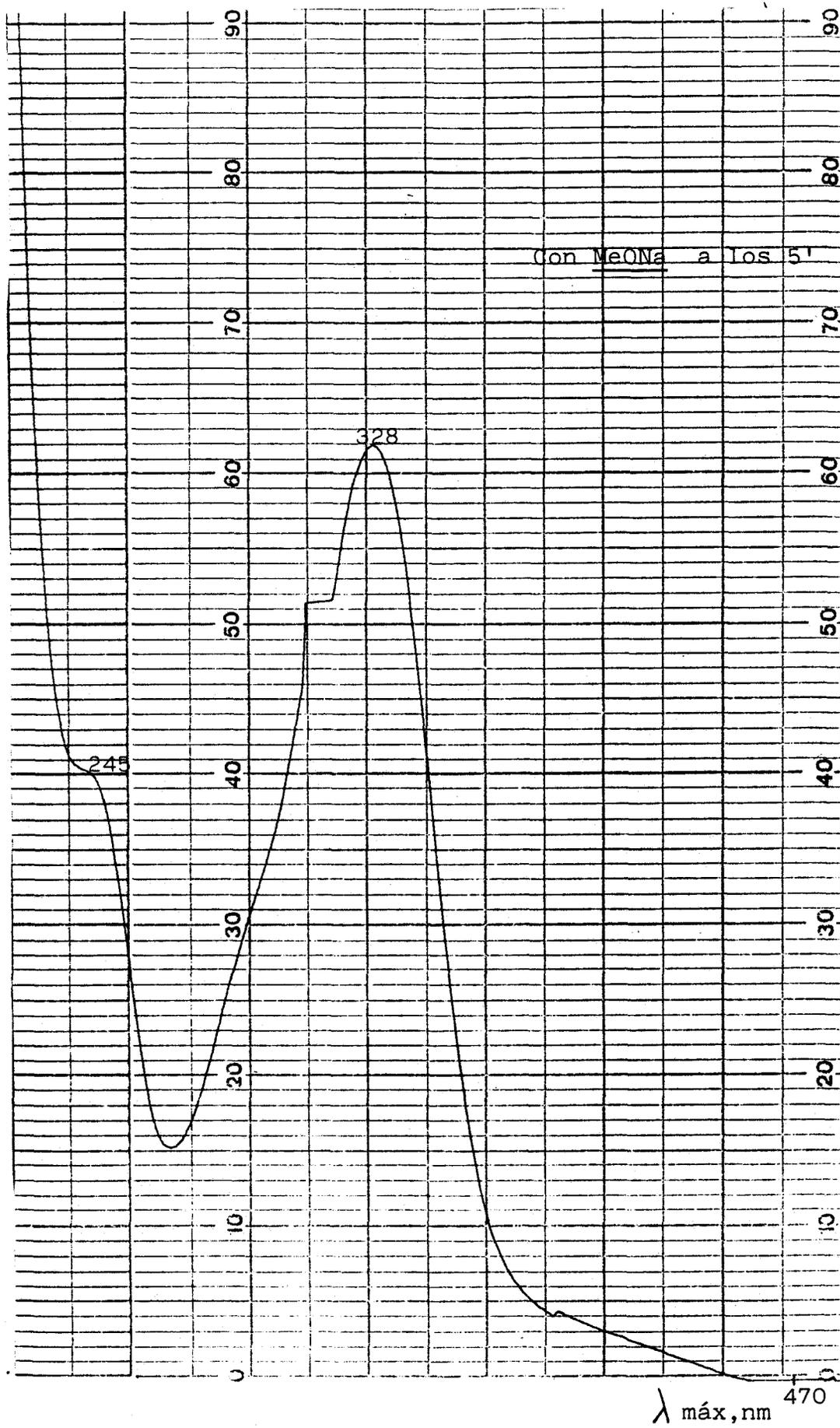


Fig. 6

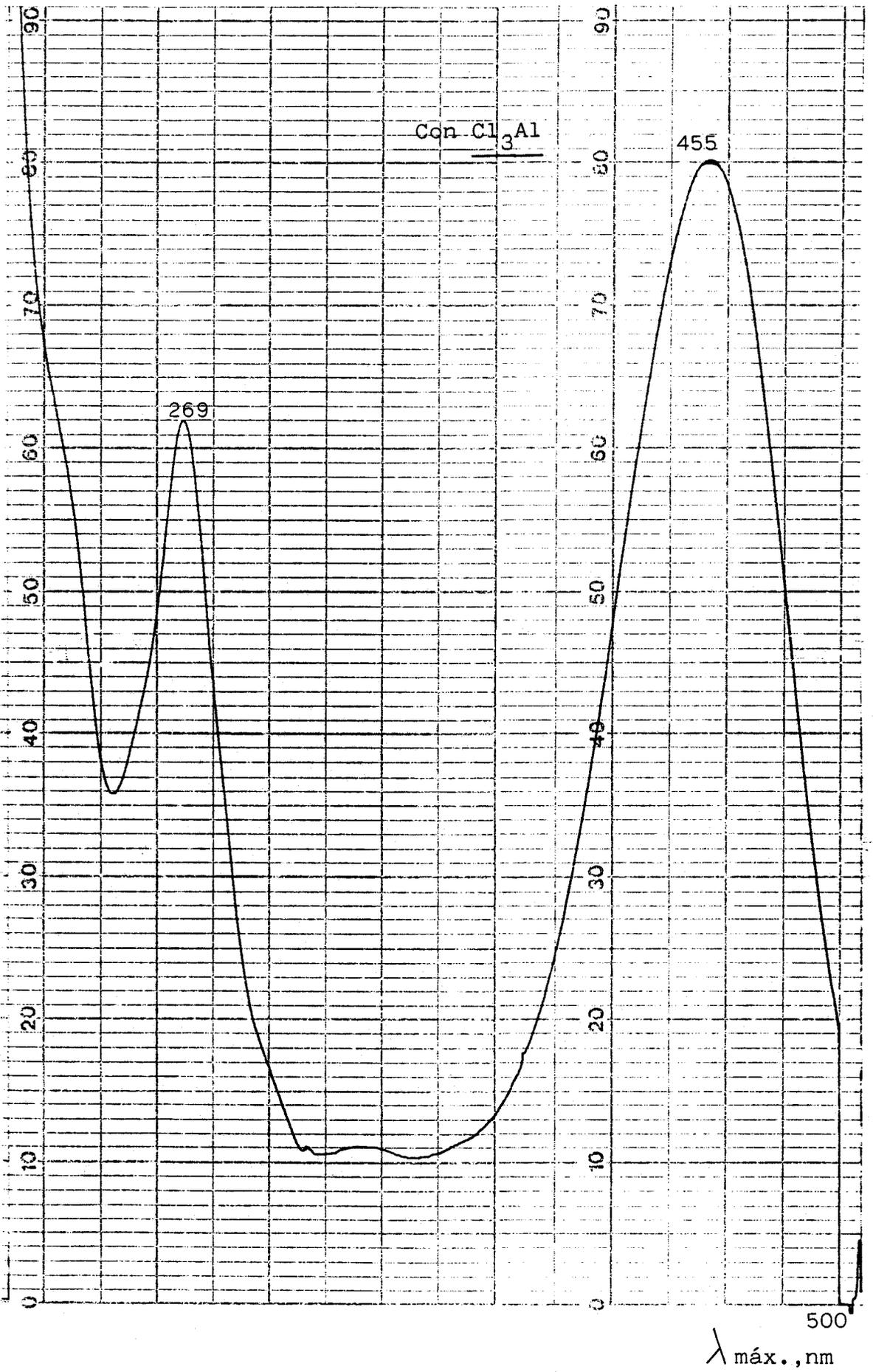


Fig. 7

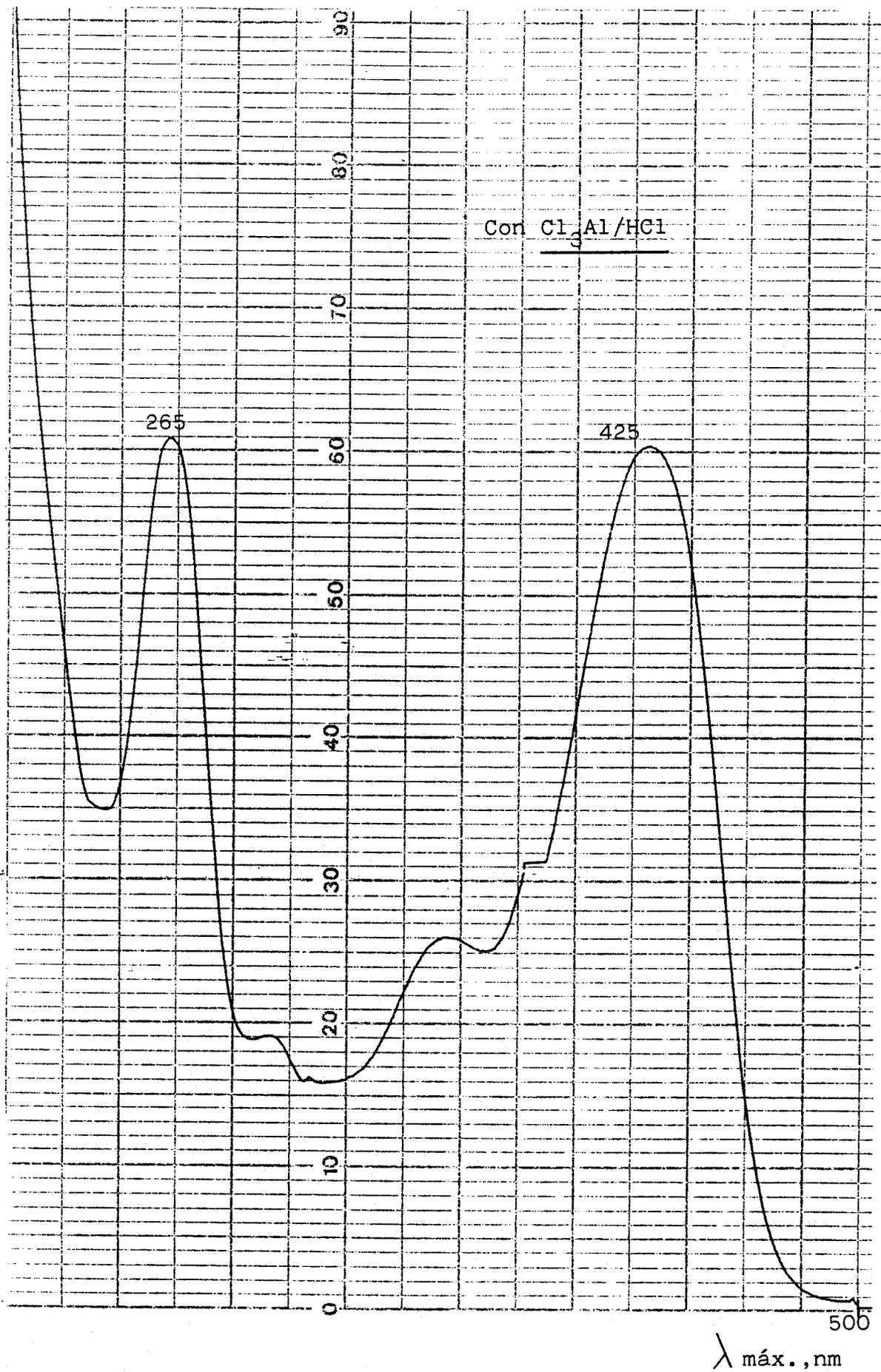


Fig. 8

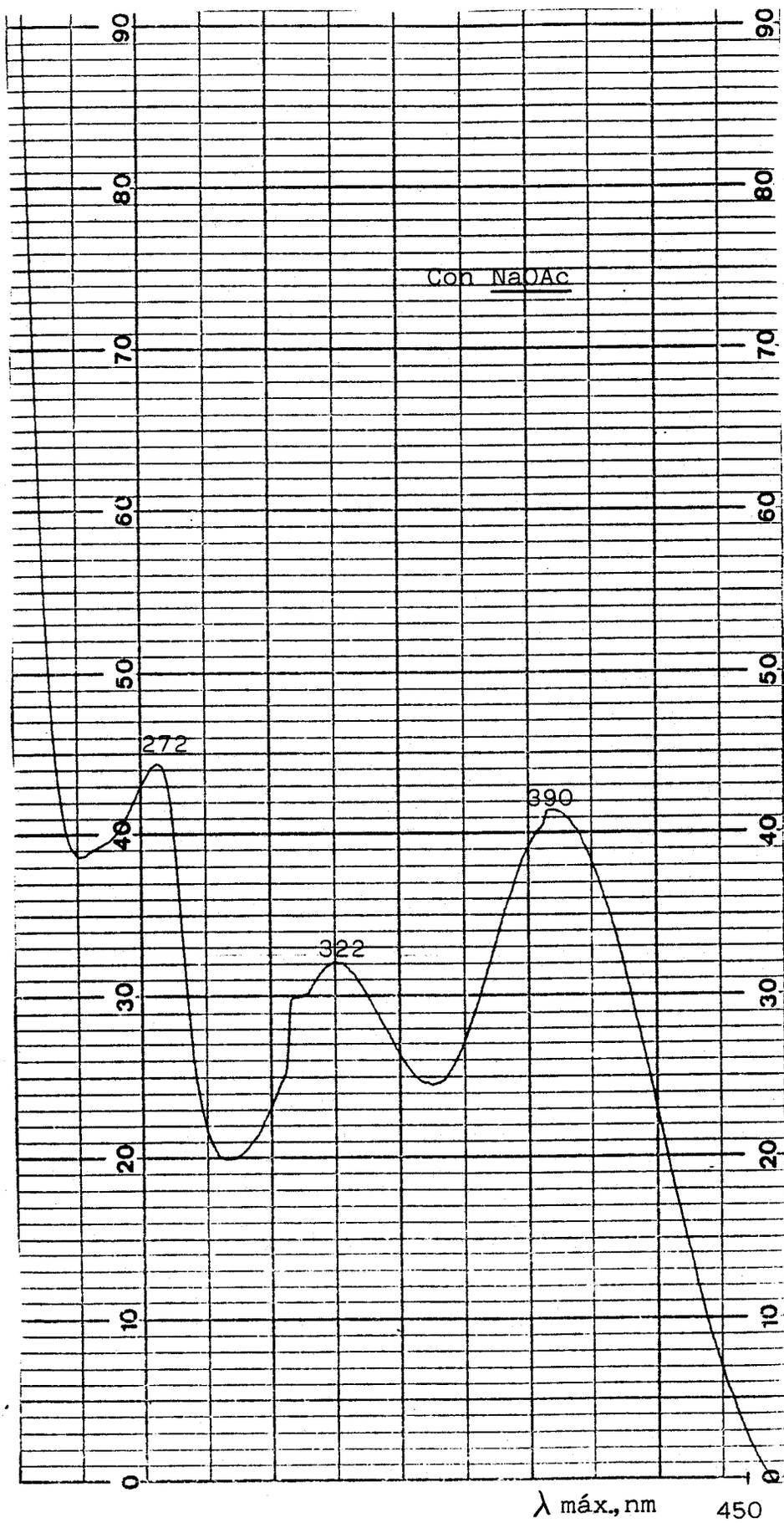


Fig. 9

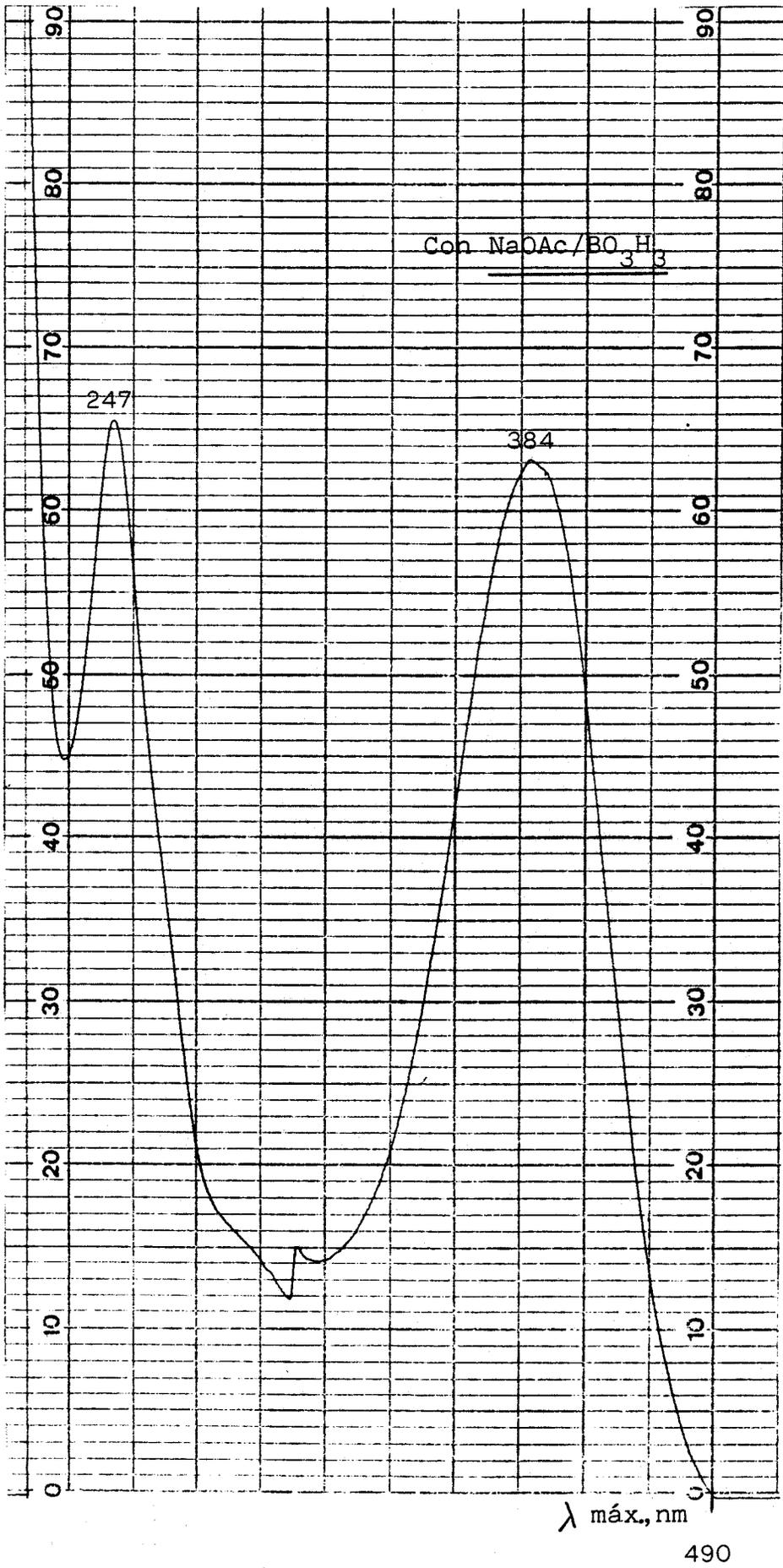


Fig. 10

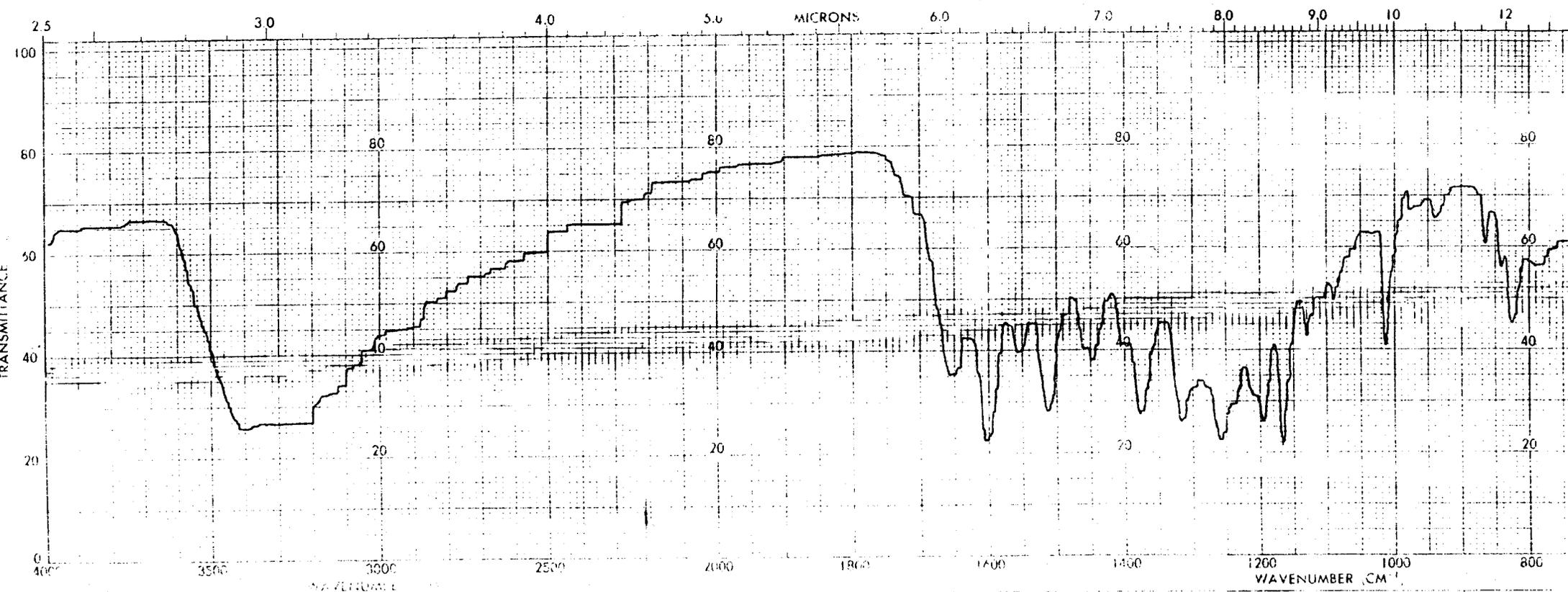
III.3.1.D.-ESPECTROFOTOMETRIA I.R.

Para la determinación de los espectros I.R. utilizamos un aparato Perkin Elmer 1310, con registrador incorporado. Se emplearon comprimidos de BrK.

Las absorciones del compuesto "C" son las correspondientes a la estructura flavonoide (benzo- γ -pirona).

3.420 cm ⁻¹	(OH) absorción de grupos OH; esta banda es amplia por estar asociados <u>intra</u> molecularmente.
1.660 cm ⁻¹	(C=O) absorción característica de grupos cetónicos.
1.610 cm ⁻¹ 1.560 cm ⁻¹ 1.115 cm ⁻¹	(C=C) absorción debida a la tensión de los <u>dobles en</u> laces del anillo aromático.
1.380 cm ⁻¹	vibración de flexión de OH fenólico.
1.260 cm ⁻¹	vibración de tensión <u>asimé</u> trica de grupos Ar-C-O-C-.

- 1.170 cm^{-1} vibración de tensión simétrica C=C-O-C-.
- 1.020 cm^{-1} vibración de tensión simétrica de éteres.



Sample Compuesto "C" ORIGIN	SOLVENT KBr CONCENTRATION CELL PATH REFERENCE	REMARKS	SCA* - MOIN SPT - 112 DATE IN
---------------------------------------	---	---------	-------------------------------------

Fig. 11

III.3.1.E- RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Los espectros de ^1H -RMN se realizaron en un aparato Varian XL-200 (200MHz), utilizando como disolvente dimetil sulfóxido deuterizado (DMSO-d_6) y con patrón interno de tetrametilsilano (TMS).

Analizados los datos obtenidos del espectro (figura 12) se obtienen las siguientes señales de resonancia para el compuesto "C".

^1H -RMN (200 MHz, DMSO-d_6)

δ 6,21 (1H, sa, H-6)

6,44 (1H, sa, H-8)

6,90 (1H, dd, $J_{5',-6'}=8,7$; $J_{5',-2'}\approx 0$, H-5')

7,55 (1H, dd, $J_{6',-5'}=8,7$; $J_{6',-2'}\approx 0$, H-6')

7,69 (1H, dd, $J_{2',-5'}\approx 0$; $J_{2',-6'}\approx 0$, H-2')

Corresponden a los cinco protones aromáticos en las posiciones 2',5',6',6 y 8 del flavonoide.

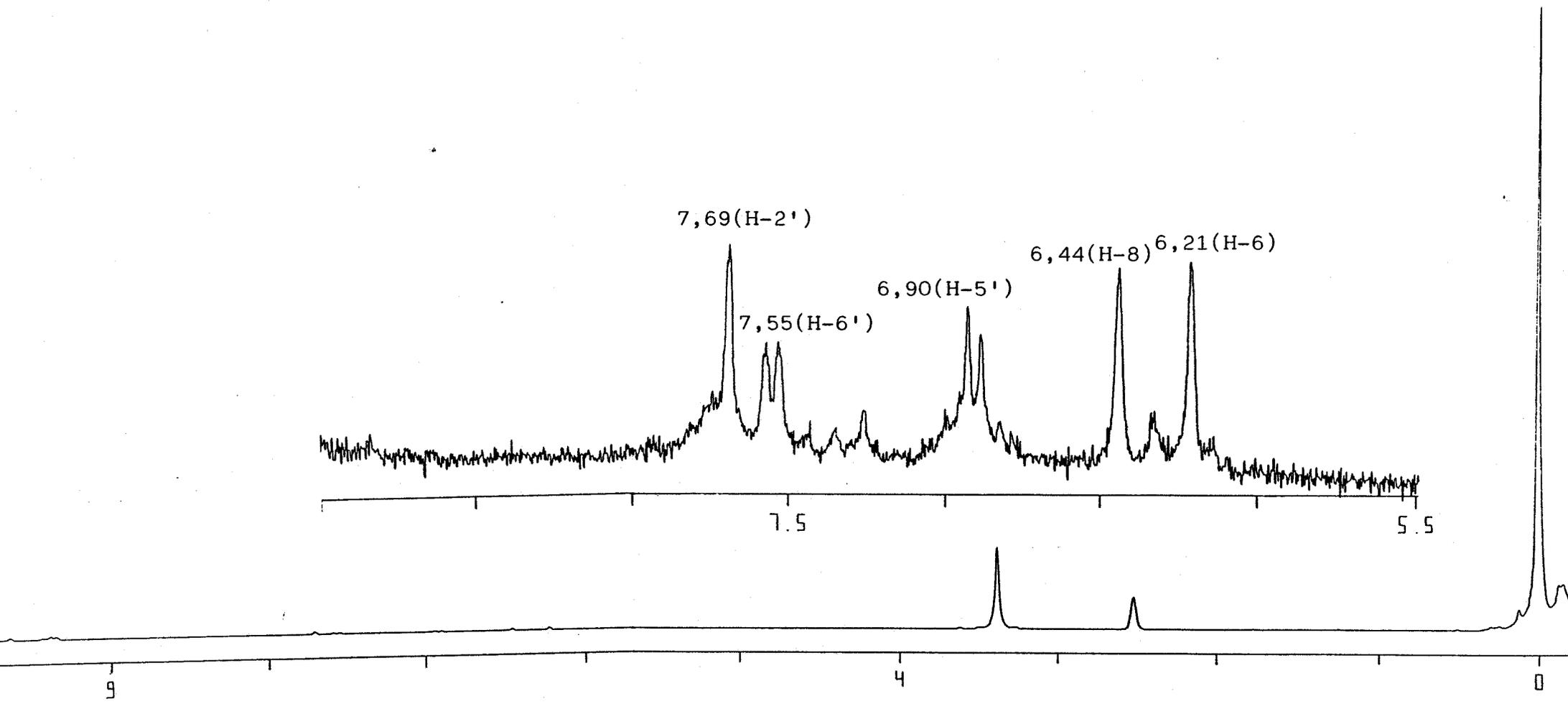


Fig. 12

III.3.1.F.- DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos para el compuesto "C" con las reacciones coloreadas, nos orientan hacia un flavonol-3-hidroxi libre, con o sin OH libre en 5.

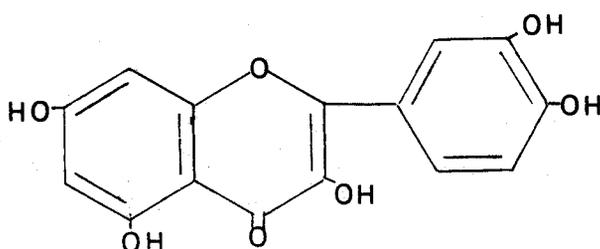
En su estudio cromatográfico se pone de manifiesto que se trata de una genina, cuyos R_fs y coloraciones coinciden con los obtenidos para la Quercetina.

La espectrometría U.V. nos confirma su naturaleza flavonoide, presentando el compuesto OH libres en las posiciones 3,5,7,3' y 4'.

El examen espectrofotométrico I.R. nos revela la presencia de OH fenólicos unidos intramolecularmente y la de un agrupamiento carbonilo.

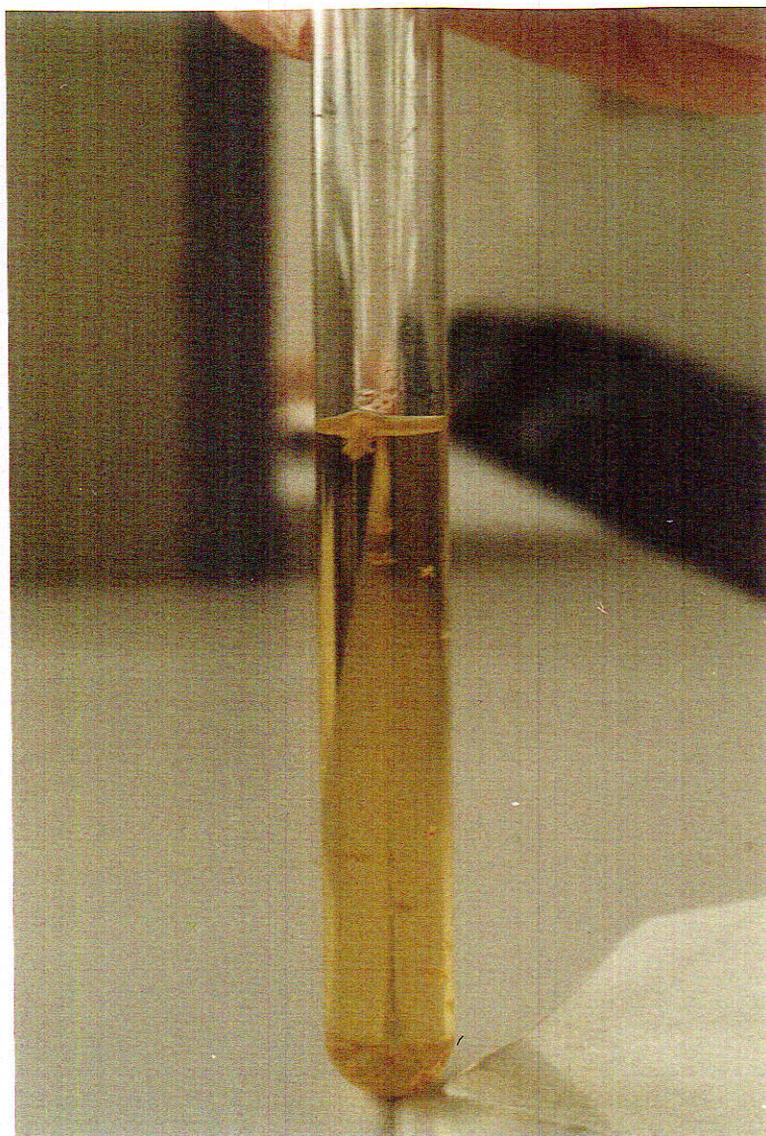
Las señales de ¹H-RMN obtenidas comprueban la existencia de cinco protones aromáticos en 6,8,2',5' y 6'.

Por todo lo expuesto podemos asignar al compuesto "C" la siguiente estructura, que se identifica con la QUERCETINA.



III.3.2.- IDENTIFICACION DEL COMPUESTO "D"

Como en el caso del compuesto "C", la identificación se ha llevado a cabo por medio de reacciones coloreadas, métodos cromatográficos y espectrometría U.V., I.R., y RMN.



Compuesto "D" cristalizado (fracción 4-5 de la columna)

III.3.2.A.- REACCIONES COLOREADAS

La solución metanólica del compuesto "D" y de los patrones, se observaron sobre papel cromatográfico a la luz visible y U.V. (350 nm) sin revelar, reveladas con Cl_3Al y después de ser expuestos a vapores de amoníaco, presentando las coloraciones que figuran en la tabla (VI).

Los resultados obtenidos nos orientan hacia un -- flavonol 3-hidroxi-libre y con o sin OH libre en 5.

TABLA. (VI): COLORACIONES OBTENIDAS

COMPUESTOS	OBS. DIRECTA		$\text{Cl}_3\text{Al}(\text{sol. alcohol. 3\%})$		VAPORES NH_3	
	VISIBLE	U.V.	VISIBLE	U.V.	VISIBLE	U.V.
Luteolina	Amarillo	Púrpura	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Quercetina	"	Amarillo	"	Amarillo- fluorescente	"	"
Rutina	"	Púrpura	"	Amarillo	"	"
D	"	Amarillo	"	Amarillo- fluorescente	"	"

III.3.2.B.- METODOS CROMATOGRAFICOS: CROMATOGRA-
FIA EN PAPEL

Las experiencias se llevaron a cabo en las condiciones cromatográficas detalladas en la página 46, para el estudio del compuesto "C".

Los Rf_{100} , según la fase móvil empleada, se encuentran en la tabla (VII).

De los resultados obtenidos podemos observar el distinto comportamiento cromatográfico que muestra el compuesto en estudio en las cuatro fases móviles ensayadas, con respecto a los patrones utilizados .

Sin embargo, los Rf del compuesto "D", coinciden con los encontrados en la bibliografía consultada (75,91,95) para la miricetina.

TABLA (VII): VALORES MEDIOS RF_{100}

	(a)	(b)	(c)	(d)
Luteolina	77	47	5,4	65
Quercetina	66	30	2,7	45
Rutina	51	68	54	85
D	42	20	2,9	29

(a) n-butanol/ac.acético/agua (4:1:5 V/V)

(b) ac.acético 60 %

(c) ac.acético 15 %

(d) Forestal

III.3.2.C.- ESPECTROFOTOMETRIA U.V.

Se realizó en solución metanólica y en las mismas condiciones que la determinación del compuesto "C".

El espectro en metanol (fig 13), presenta máximos de absorción a λ máx. de 374 nm (banda I) y 252 nm (banda II); dichas absorciones se corresponden con un flavonol 3-hidroxi-libre.

En la tabla(VIII) se exponen los cambios espectrales con diferentes reactivos.

Con la adición de MeONa, la banda I sufre un desplazamiento batocrómico de 63 nm, que degenera en pocos minutos; esto nos indica la presencia del sistema 3,3',4' trihidroxilo.

En presencia de Cl₃Al y unas gotas de ClH al 10 % se produce un desplazamiento hipsocrómico de 17 nm en la banda I, que nos permite deducir la existencia de tres grupos OH adyacentes en el anillo B; además, se observa una desviación batocrómica de 54 nm, con respecto al espectro obtenido en metanol, indicativo de un sistema 3,5-dihidroxi flavonol.

El AcONa anhidro es el reactivo diagnóstico útil para la detección de OH libre en posición 7; la aparición

de un salto batocrómico de 17 nm en la longitud de onda de la banda II, identifica este grupo.

La presencia de AcONa/BO₃H₃ produce un desplazamiento batocrómico de 18 nm en la banda I, que denota la -- presencia de agrupamiento orto-dihidroxi en el anillo B.

$\Delta \lambda$ = incremento en la longitud de onda

$\Delta \lambda_{\text{I}}$ = desplazamiento de la banda I con respecto al espectro en MeOH

$\Delta \lambda'_{\text{I}}$ = desplazamiento de la banda I del espectro del flavonoide en -
presencia de Cl_3Al con el obtenido en $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{HCl}$.

$\Delta \lambda_{\text{II}}$ = desplazamiento de la banda II con respecto al espectro en MeOH

TABLA (VIII): ESPECTROS U.V. EN MEOH

REACTIVOS AÑADIDOS	$\lambda_{\text{max.}}, \text{nm}$		$\Delta\lambda$	CONCLUSIONES
	BANDA I	BANDA II		
	374	252		- Flavonol 3-hidroxi libre
MeONa	437 _{dec}	285	$\Delta\lambda_{\text{I}}=63 \text{ nm}$	- 3 y 4'dihidroxiolos libres o 3,3',4', thidroxiolos libres
AlCl ₃	445	268		
AlCl ₃ /HCl	428	266	$\Delta\lambda_{\text{I}}=17 \text{ nm}$ $\Delta\lambda_{\text{I}}=54 \text{ nm}$	- 3 OH adyacentes en el anillo B. 3,5, dihidroxiflavonol
NaOAc	334	269	$\Delta\lambda_{\text{I}}=17 \text{ nm}$	- OH libre en posición 7
NaOAc/BO ₃ H ₃	392	256	$\Delta\lambda_{\text{I}}=18 \text{ nm}$	- Agrupamientos orto-dihidroxi en el anillo B

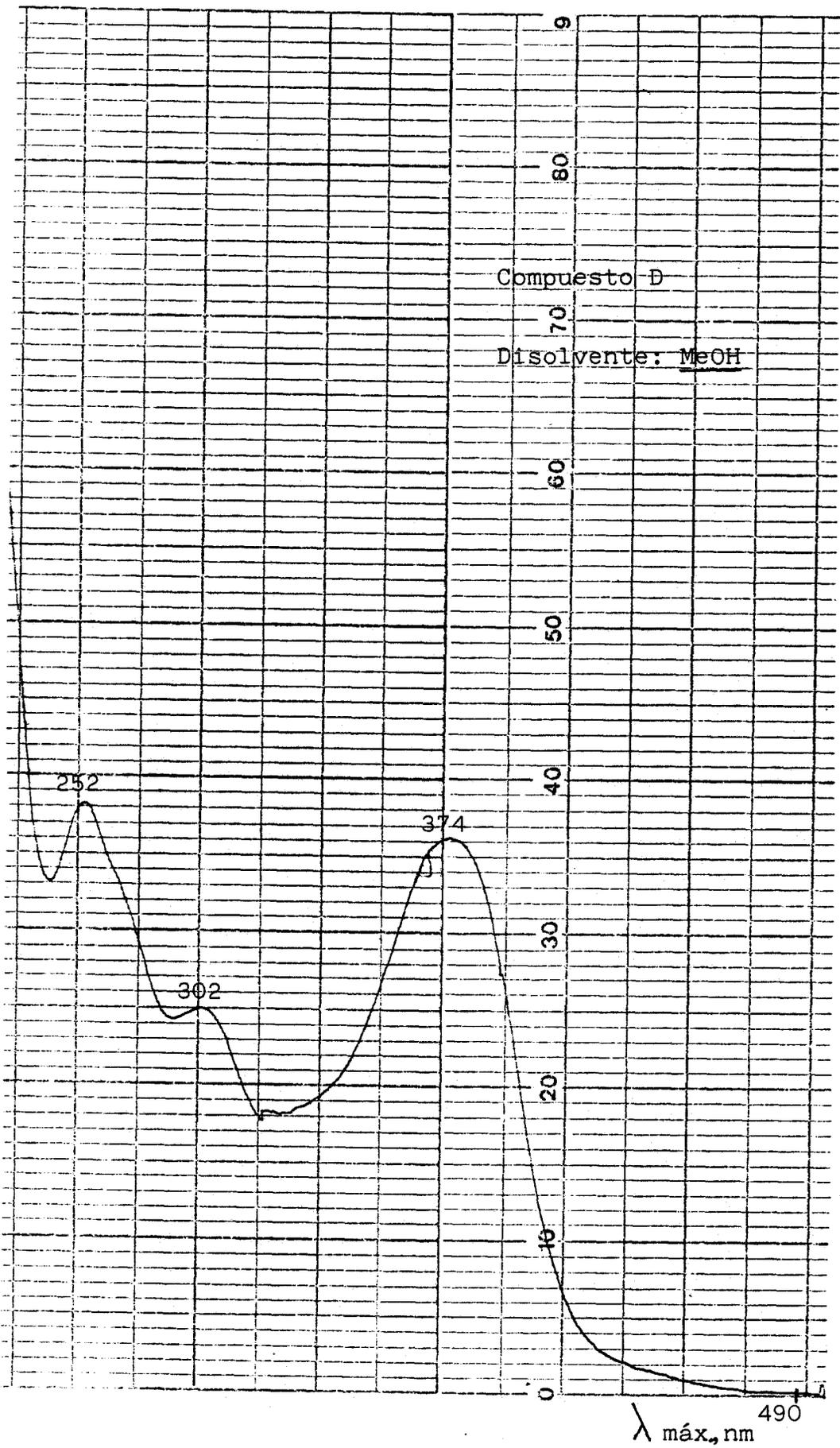


Fig.13

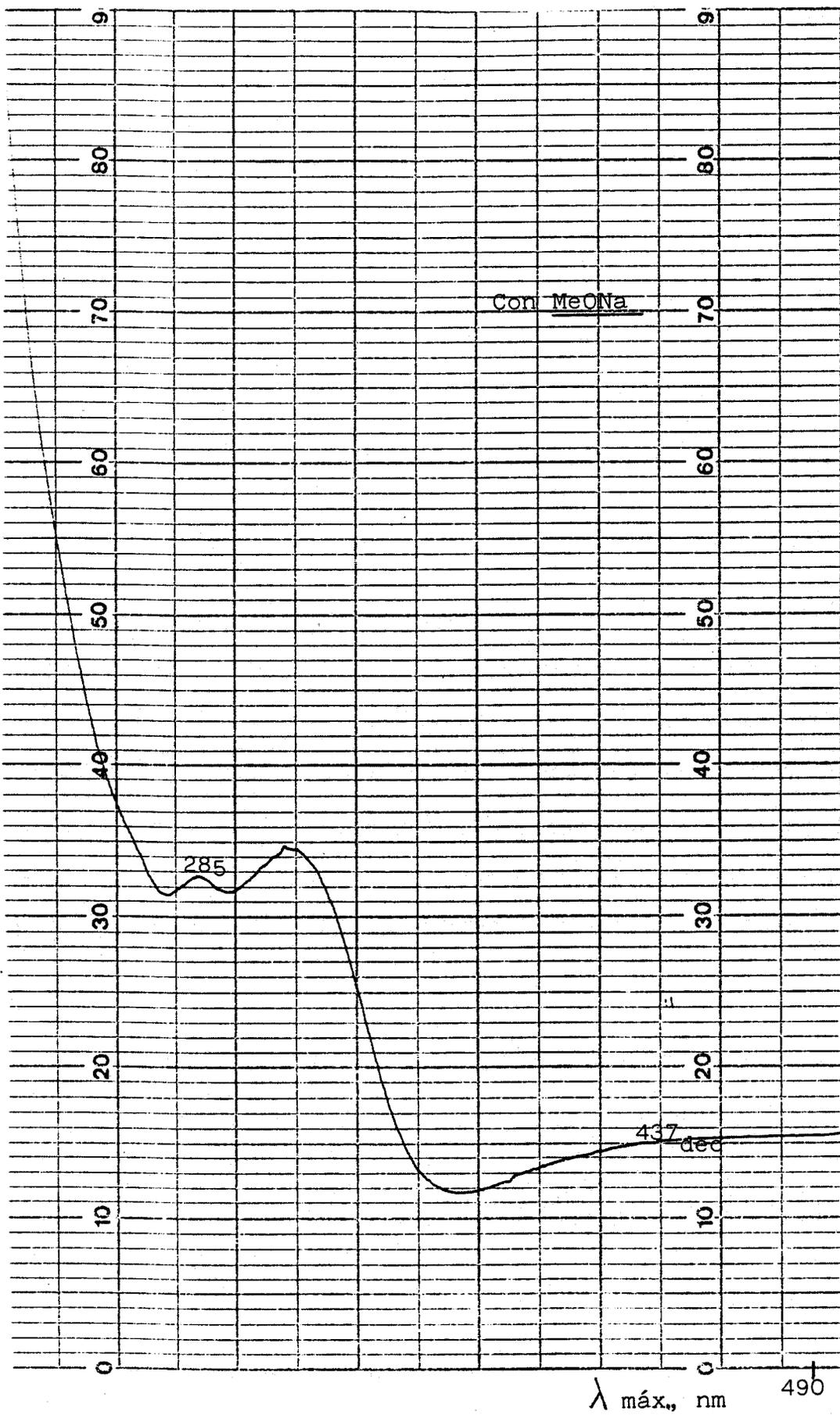


Fig.14

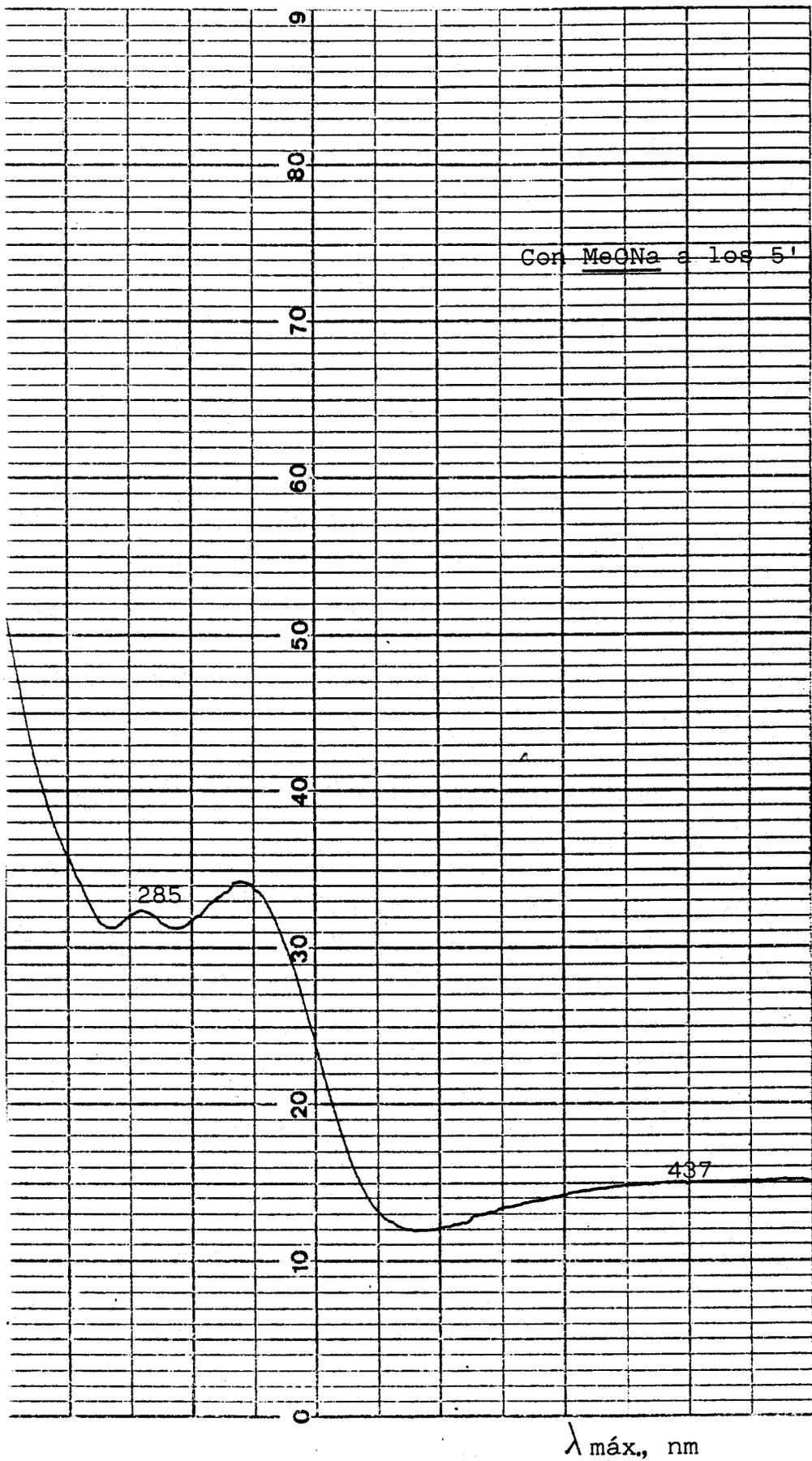


Fig.15

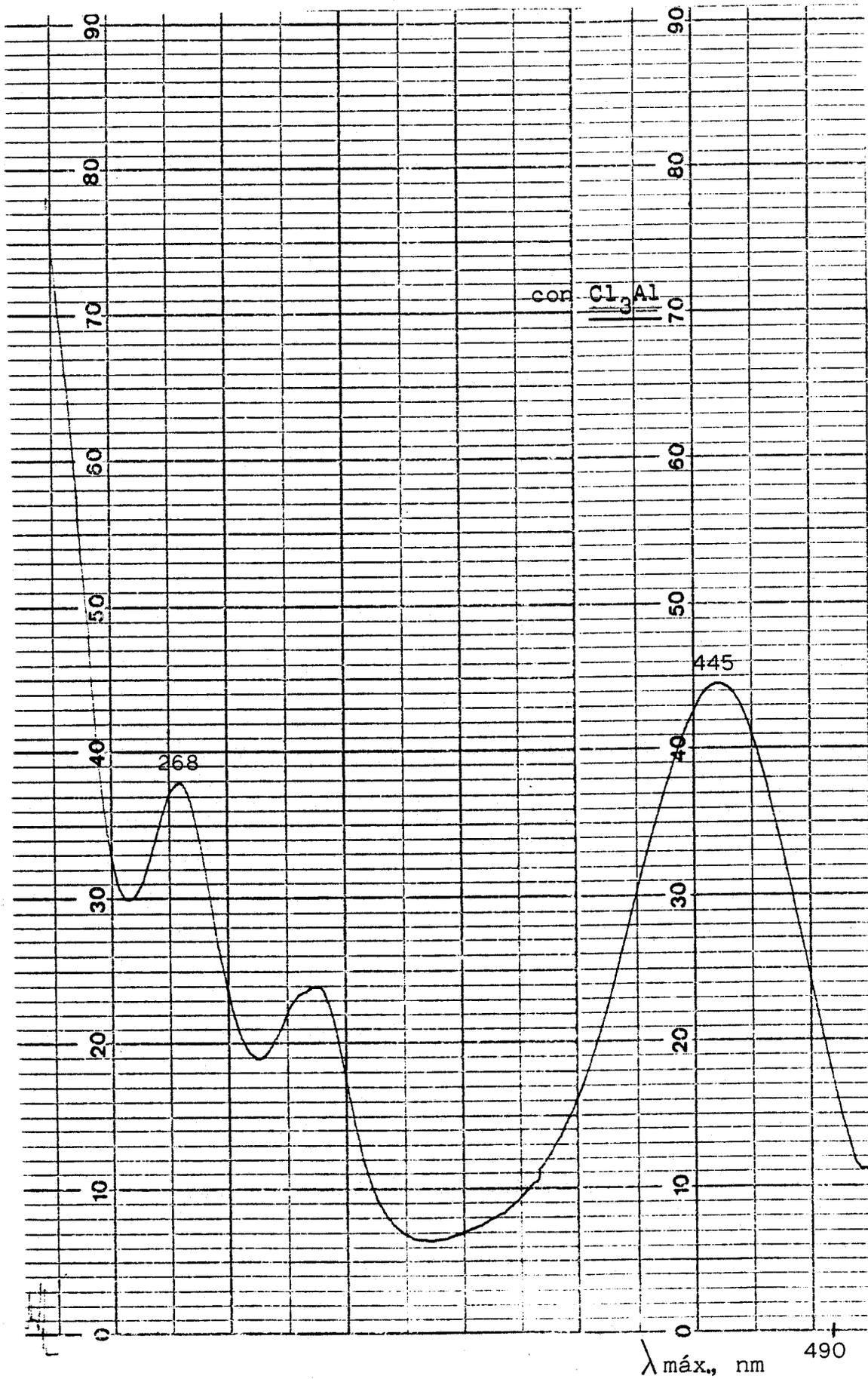


Fig.16

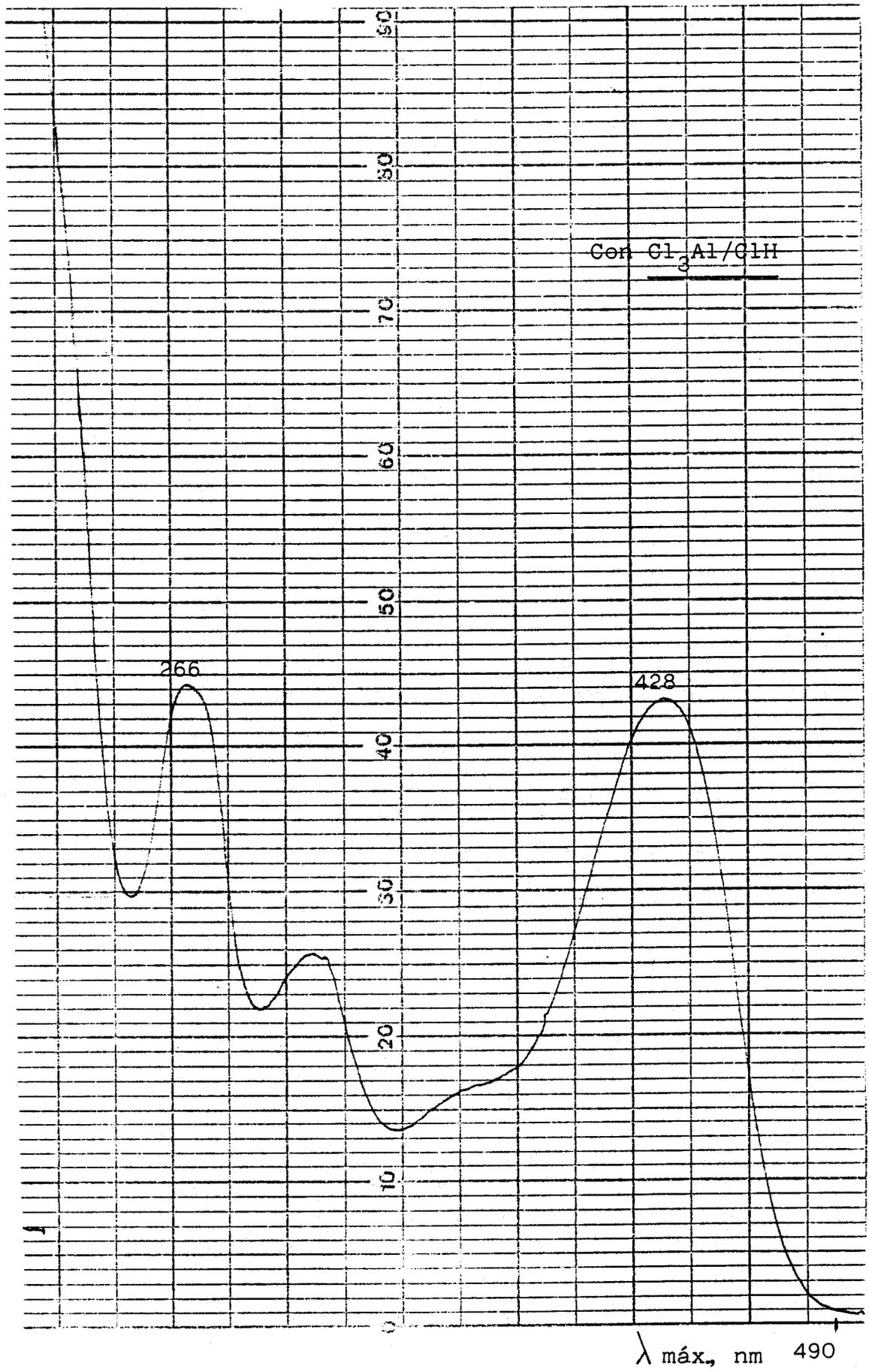


Fig.17

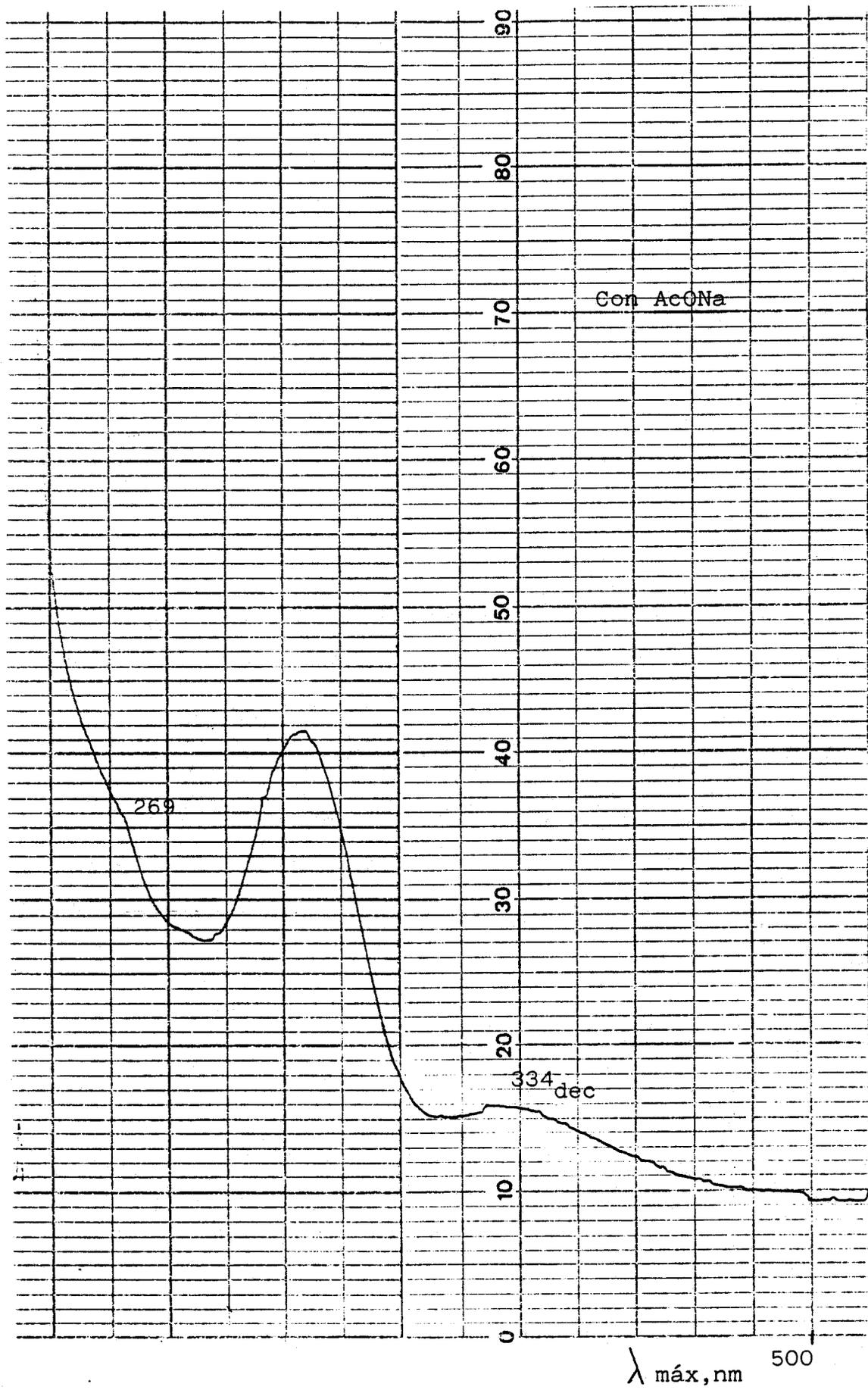


Fig.18

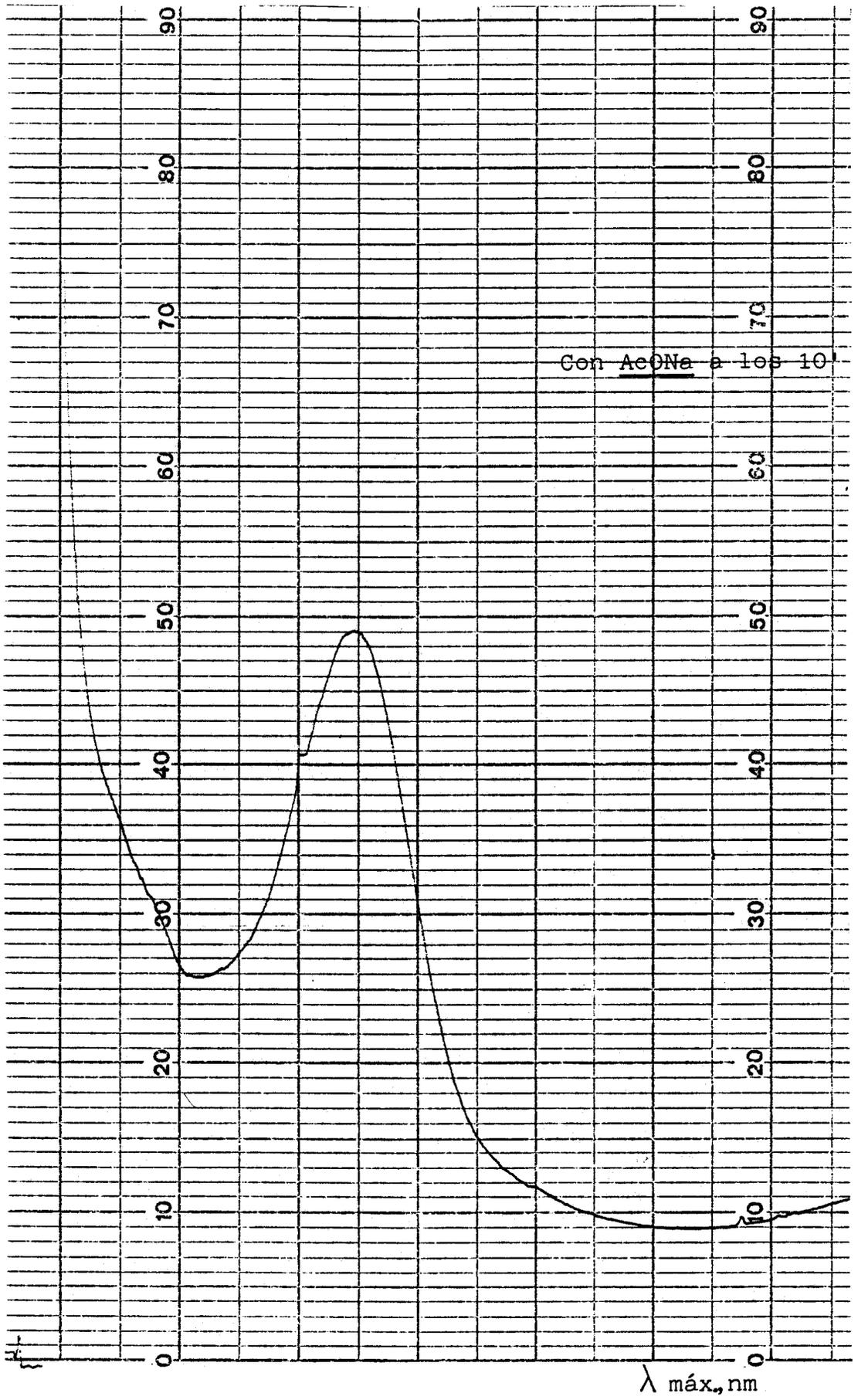


Fig.19

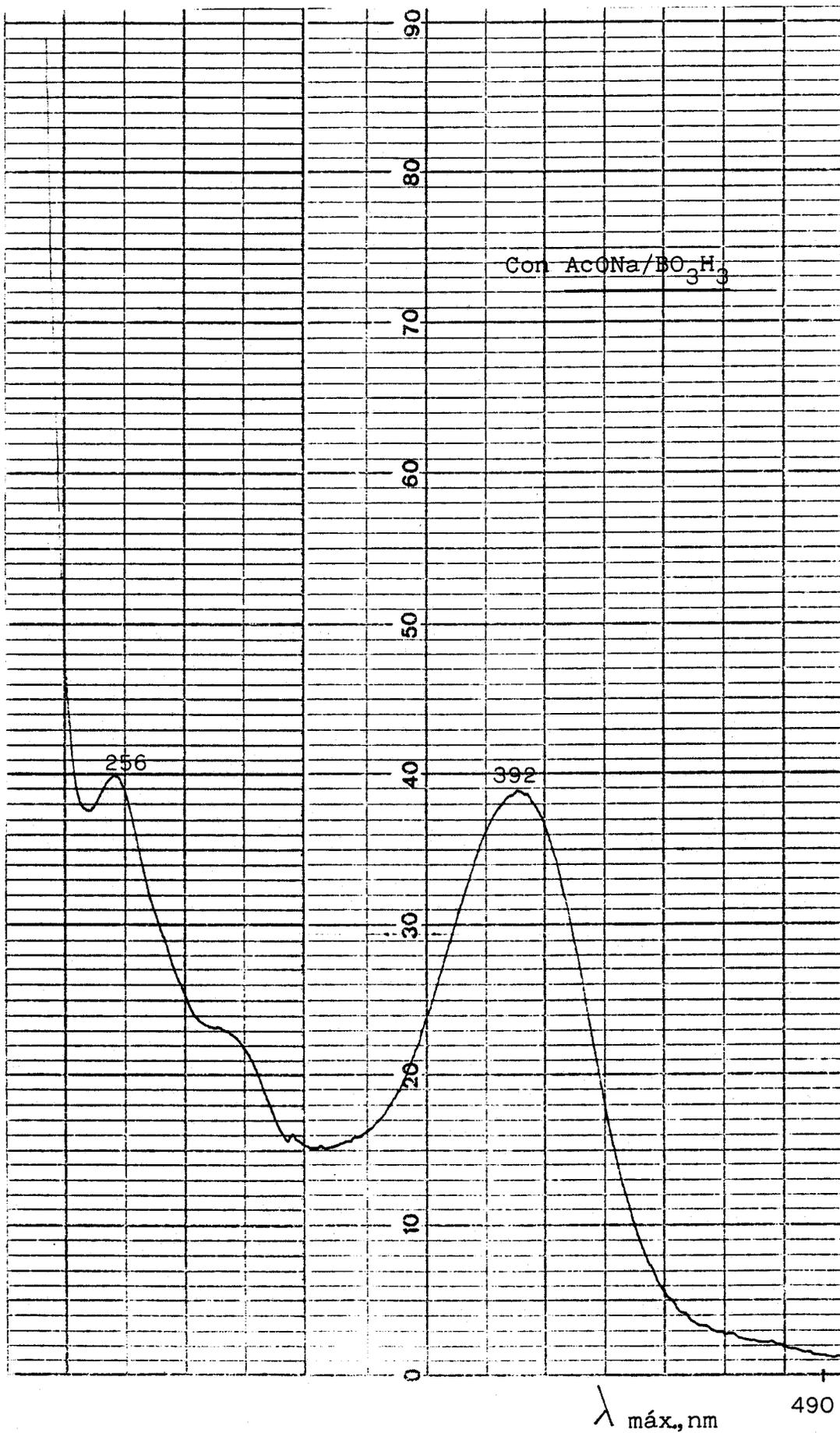


Fig.20

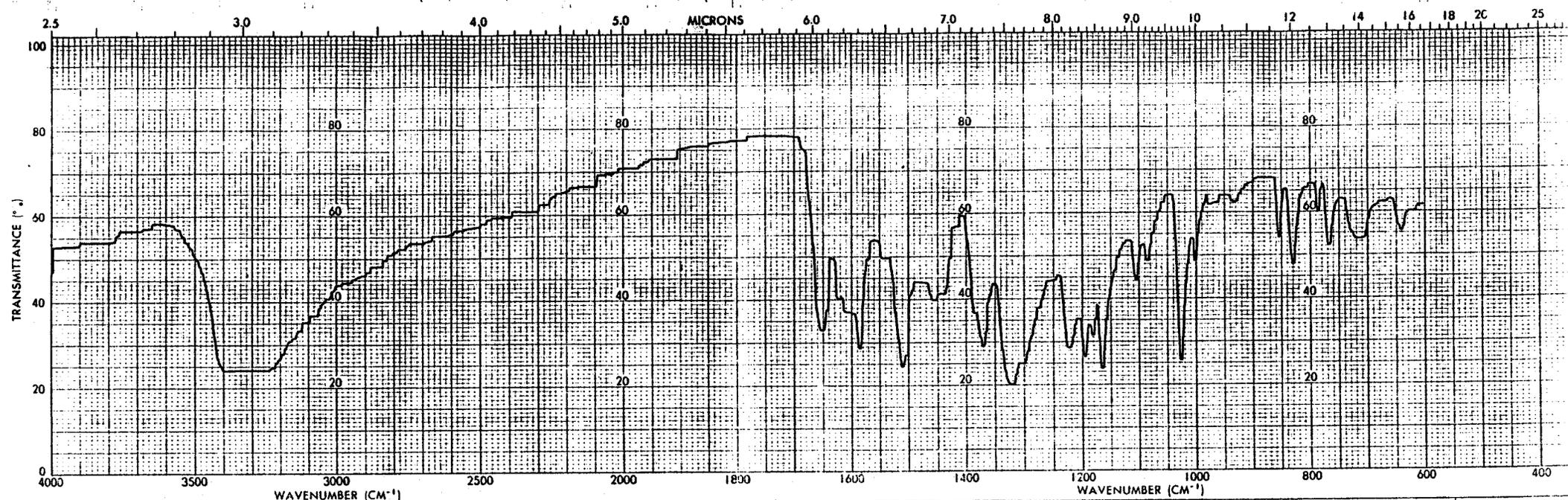
III.3.2.D.- ESPECTROFOTOMETRIA I.R.

Se realizó en las mismas condiciones que la determinación del compuesto "C".

Las absorciones del compuesto "D" son las correspondientes a la estructura flavonoide (benzo- γ -pirona).

3.420 cm^{-1}	(OH) absorción de grupos OH; esta banda es amplia por estar asociados intramolecularmente.
1.660 cm^{-1}	(C=O) absorción característica de grupos cetónicos.
1.585 cm^{-1}	
1.510 cm^{-1}	(C=C) absorción debida a la tensión de los dobles enlaces del anillo aromático.
1.370 cm^{-1}	vibración de flexión de OH fenólico.
1.230 cm^{-1}	absorción de tensión asimétrica de grupos Ar-C-O-C-.

- 1.165 cm^{-1} vibración de tensión simétrica de C=C-O-C-.
- 1.025 cm^{-1} vibración de tensión simétrica de éteres.
- 825 cm^{-1}
855 cm^{-1} anillo aromático 1,2,3,5 tetrasustituido.



SAMPLE Compuesto "D"	SOLVENT KBr	REMARKS	SCAN MODE	OPERATOR	
ORIGIN	CONCENTRATION		SLIT	TIME CONSTANT 12	DATE
	CELL PATH		PART No 5100-4367	REF. No	
	REFERENCE				

Fig.21

III.3.1.E.- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los espectros de ^1H -RMN del compuesto "D" se realizaron en las mismas condiciones que para el compuesto "C", se utilizó igualmente patrón interno de tetrametilsilano - (TMS) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) como disolvente.

Analizados los datos del espectro (figura 22) se obtienen las siguientes señales de resonancia:

^1H -RMN (200 MHz, DMSO-d_6)
 δ 6,18 (1H, d, $J=1,95$, H-6)
6,37 (1H, d, $J=1,95$, H-8)
7,24 (2H, s, H-2' y H-6')

Corresponden a los cuatro protones aromáticos en las posiciones 2',6',6 y 8 del flavonoide.

7,24(H-2',H-6')

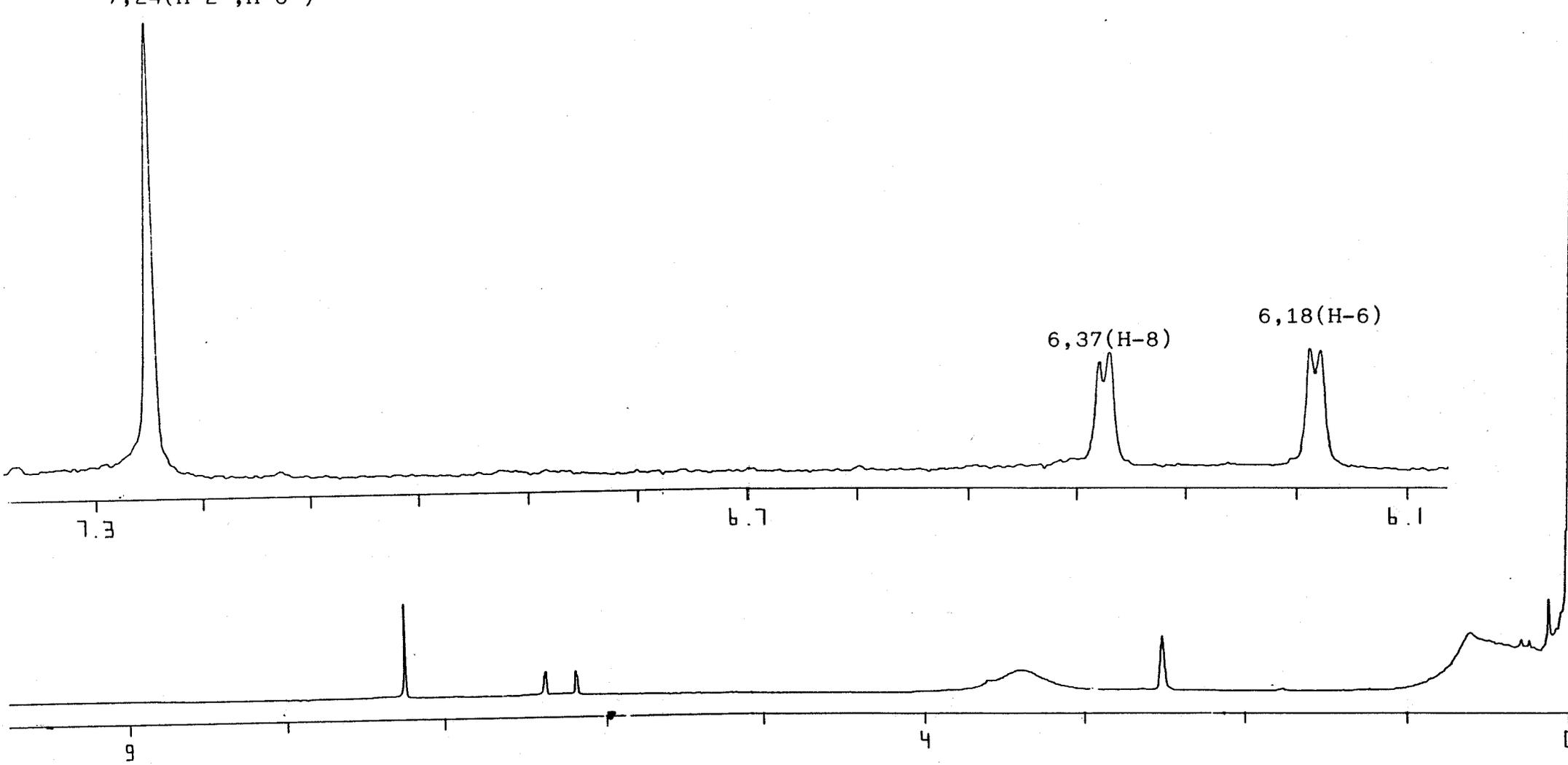


Fig. 22

III.3.2.F- DISCUSION DE RESULTADOS

Las reacciones coloreadas practicadas al compuesto "D" nos orienta hacia un flavonol-3-hidroxi libre con o sin OH libre en 5.

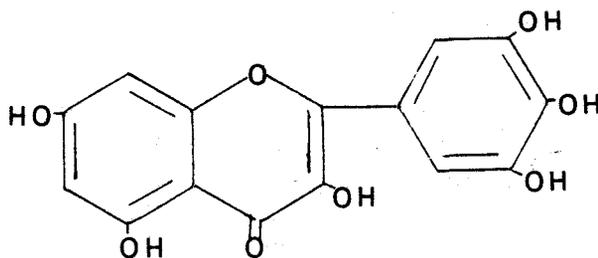
El comportamiento cromatográfico es análogo al recogido en Bibliografía para la Miricetina.

Los resultados obtenidos con la espectrofotometría U.V. nos informa que se trata de un flavonoide con OH libres en posiciones 3,5,7,3',4' y 5'.

La espectrofotometría I.R. pone de manifiesto la presencia de OH fenólicos unidos intramolecularmente y un agrupamiento carbonilo.

Con los espectros de $^1\text{H-RMN}$ se obtienen señales correspondientes a 4 protones aromáticos en 6,8,2' y 6'.

De todos los datos obtenidos podemos deducir que la estructura de este compuesto se corresponde con la MIRICETINA.



III.4.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Experimentamos diferentes dosis, sobre distintos microorganismos y observamos la presencia o no de halos de inhibición, determinando la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) definida como la menor concentración de producto - que inhibe el desarrollo "in vivo" de los microorganismos (101,102).

En nuestro trabajo hemos seguido la técnica de -- Bauer-Kirby (103).

III.4.1.- CONDICIONES GENERALES DE LA EXPERIENCIA

III.4.1.1.-Medio de cultivo

Se ha seleccionado como medio de cultivo estándar el agar de Mueller-Hinton, debido a que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos, clínicamente significativos (103).

Para la preparación del mismo, se rehidrata suspendiendo 38 g de éste en 1000 ml de agua destilada y se calienta hasta temperatura de ebullición para disolver el medio por completo.

Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a - 121 °C (104).

La reacción final del medio será de un pH de 7,4 a una temperatura de 25 °C.

Una vez preparado, se vierte en placas estériles; es importante que el medio alcance un espesor uniforme de 4 mm; si es más fino, los antibióticos tienden a difundir - más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce -- una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

III.4.1.2.- Preparación del inóculo

El inóculo se ha preparado hasta conseguir que la turbidez del medio sea equivalente al estándar nº 0,5 de la escala de McFarland. Esto equivale a una concentración de 10^8 microorganismos/ml aproximadamente.

III.4.1.3.- Siembra

Una vez lograda la turbidez adecuada, se sumerge un hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana, --

eliminando el exceso de líquido antes de retirarlo; para ello, se hace rotar el escobillón contra la pared interna del tubo.

Sembramos con este hisopo la superficie de una placa de agar de Mueller-Hinton, dejando previamente que la placa tome la temperatura ambiente y manteniendo la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar.

A fin de cubrir uniformemente toda la superficie de la placa, se estría con el hisopo en tres direcciones, dando vueltas sucesivamente a la placa en ángulos de aproximadamente 60°.

Una vez seca, la placa está lista para la colocación de los discos impregnados con las muestras a ensayar.

III.4.1.4- Impregnación y colocación de los discos

Estudios realizados en nuestro Departamento sobre la influencia de distintos disolventes en el crecimiento microbiano, pusieron de manifiesto una inhibición por los mismos en el desarrollo de los microorganismos, lo cual era paliado por la eliminación del líquido extractivo (98).

Por ello en nuestras experiencias, los discos impregnados con los extractos se llevaron a estufa a 60°C durante 30 minutos, con el fin de evaporar el disolvente. Antes de ser colocados deben estar a temperatura ambiente.

El diámetro de los discos ha sido en todos los casos de 5 mm.

La colocación se ha hecho manualmente con una pinza estéril, separándolos al menos 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa, para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen.

Los discos se presionan suavemente sobre la superficie con la punta de la pinza para asegurar un contacto firme con el agar, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

III.4.1.5.- Incubación

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de la susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 37°C durante 18h; éste es el periodo en el que la reactividad entre los microorganismos en desarrollo y los efectos inhibidores de la sustancia son óptimos, siendo los bordes de las zonas de inhibición más nítidos.

III.4.1.6.- Determinación de los halos de inhibición

Después de 18h de incubación, aparecen las zonas de inhibición alrededor de los discos impregnados con las muestras.

Los diámetros de estas zonas se miden cuidadosamente por la parte posterior de la placa, utilizando una fuente de luz brillante transmitida. Se pueden utilizar calibres móviles y graduados, reglas marcadas en milímetros o plantillas especialmente preparadas.

Todas las mediciones se realizan con la aproximación de 1 mm.

III.4.1.7.- Microorganismos ensayados

Gram (+)

Bacillus subtilis ATCC 6633

Bacillus megaterium ATCC 33085

Bacillus cereus ATCC 14579

Staphylococcus aureus ATCC 25923

	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> ATCC 27853
	<u>Escherichia coli</u> CCM 100
Gram (-)	<u>Serratia marcenscens</u> ATCC 8100
	<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 13315
Hongos	<u>Candida albicans</u> S.Q. 1580

III.4.2.- MUESTRAS A ENSAYAR

Hemos estudiado la actividad antimicrobiana del extracto etéreo de Erica andevalensis C-R, así como del principio activo mayoritario aislado de él, miricetina.

III.4.2.1.- Extracto etéreo

Hemos operado con el residuo seco correspondiente al extracto etéreo objeto de nuestro estudio (aptdo. III.2), realizando a partir de él distintas diluciones, con el fin

de ensayar diferentes dosis del mismo.

<u>Extracto</u> (λ)	<u>Residuo seco</u> (mg)	<u>Droga</u> (mg)
5	0,125	4,49
10	0,25	89,83
20	0,5	179,6
40	1	359,32
80	2	718,6

III.4.2.2- Miricetina

Para los ensayos realizados con miricetina, componente aislado del extracto etéreo, se seleccionó un microorganismo de cada grupo: Bacillus subtilis (Gram(+)), Escherichia coli (Gram(-)) y Candida albicans (hongo).

Las dosis ensayadas fueron las siguientes:

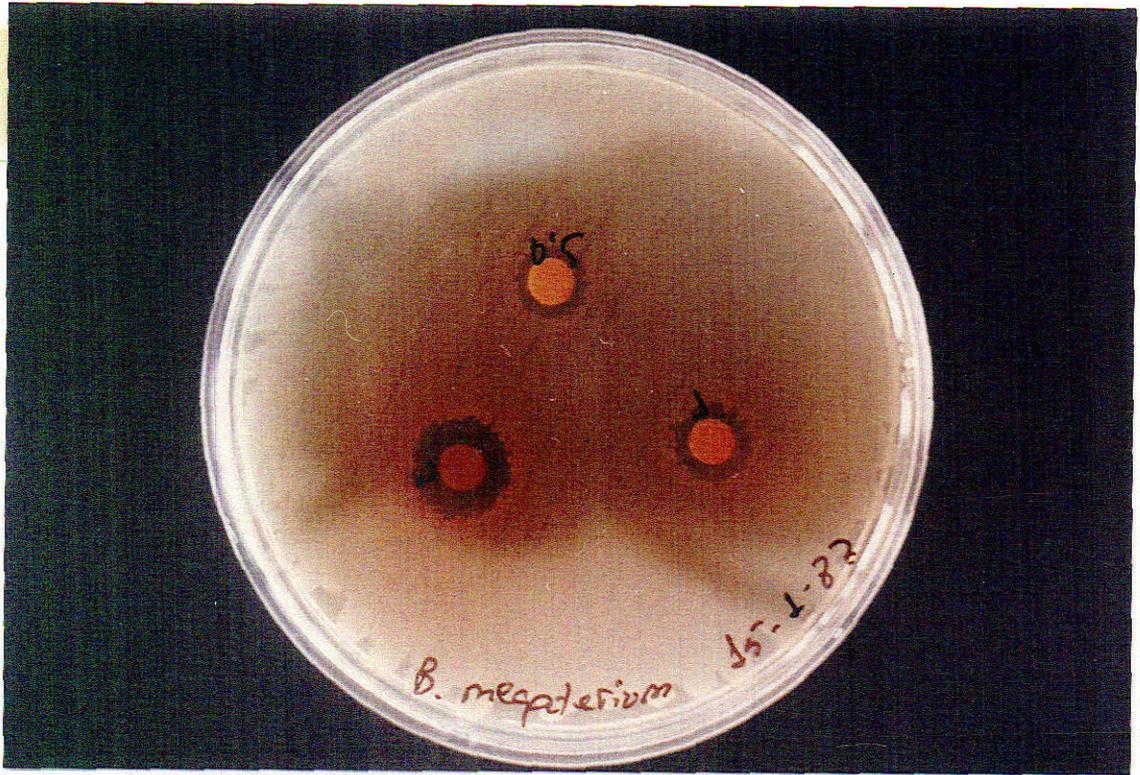
<u>Solución</u> (λ)	<u>Residuo seco</u> (mg)
5	0,025
10	0,05
20	0,1
40	0,2

III.4.3- RESULTADOS

Los halos de inhibición, tanto del extracto etéreo como de la miricetina aislada, se muestran en las tablas (IX) y (X), recogiendo las concentraciones mínimas inhibitorias en las tablas (XI) y (XII).

Cada determinación se efectuó en tres placas, promediándose aritmeticamente los resultados antes de interpretar las mediciones.

El estudio de la relación dosis-efecto lo hemos llevado a cabo mediante el cálculo de la recta de regresión y su correspondiente coeficiente de correlación, siendo el método utilizado el de los mínimos cuadrados (105), figura 23 y figura 24.



Actividad antimicrobiana del Extª etéreo a distintas concen-
traciones ensayadas.

TABLA (IX): halos de inhibición (mm) del EXTRACTO ETereo

	Residuo seco				
	0,125 mg	0,25 mg	0,5 mg	1 mg	2 mg
<u>BACTERIAS GRAM (+)</u>					
<u>B. subtilis</u>	-	6,3	9	9,6	11
<u>B. megaterium</u>	-	5,5	9	10	12,3
<u>B. cereus</u>	-	5,6	9	10	11,3
<u>S. aureus</u>	-	5,5	8,3	9,6	11
<u>BACTERIAS GRAM (-)</u>					
<u>P. aeruginosa</u>	-	-	-	5,5	6,3
<u>E. coli</u>	-	5,6	6	7	8
<u>P. vulgaris</u>	-	-	5,5	6,3	7,3
<u>S. marcescens</u>	-	-	-	-	6
<u>HONGOS</u>					
<u>Candida albicans</u>	-	5,5	6	8	9,6

TABLA (X): halos de inhibición (mm) de MIRICETINA

	Residuo seco			
	0,025 mg	0,05 mg	0,1 mg	0,2 mg
<u>BACTERIAS GRAM (+)</u>				
<u>B. subtilis</u>	-	-	5,5	7,5
<u>BACTERIAS GRAM (-)</u>				
<u>E. coli</u>	-	-	5,5	8
<u>HONGOS</u>				
<u>Candida albicans</u>	-	5,5	9,6	10,6

TABLA (XI)

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO
ETEREO

MICROORGANISMO ENSAYADO

mg de r.s.

Gram(+)	<u>Bacillus subtilis</u>	0,25
	<u>Bacillus megaterium</u>	0,25
	<u>Bacillus cereus</u>	0,25
	<u>Staphylococcus aureus</u>	0,25

Gram (-)	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	1
	<u>Escherichia coli</u>	0,25
	<u>Proteus vulgaris</u>	0,5
	<u>Serratia marcescens</u>	2

Hongos	<u>Candida albicans</u>	0,25
--------	-------------------------------	------

TABLA (XII)

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DE MIRICETINA

<u>MICROORGANISMO ENSAYADO</u>	<u>mg de r.s.</u>
Gram(+)	<u>Bacillus subtilis</u> 0,1
Gram(-)	<u>Escherichia coli</u> 0,1
Hongo	<u>Candida albicans</u> 0,25

RECTA DE REGRESION DEL EXTRACTO ETereo
 DE Erica andevalensis

————	<u>Bacillus subtilis</u>	$y=5,98+2,84x$	$c=0,878$
—...—	<u>Bacillus megaterium</u>	$y=5,45+3,74x$	$c=0,925$
—...—	<u>Bacillus cereus</u>	$y=5,70+3,19x$	$c=0,882$
.....	<u>Staphylococcus aureus</u>	$y=5,47+8,10x$	$c=0,913$
— —	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	$y=4,79+0,73x$	$c=0,988$
—...—..	<u>Escherichia coli</u>	$y=5,14+1,52x$	$c=0,975$
————	<u>Proteus vulgaris</u>	$y=4,83+1,28x$	$c=0,991$
—...—..	<u>Serratia marcescens</u>	$y=4,79+0,52x$	$c=0,898$
-----	<u>Candida albicans</u>	$y=4,89+2,48x$	$c=0,982$

RECTA DE REGRESION DEL EXTRACTO ETEREO
DE Erica andevalensis

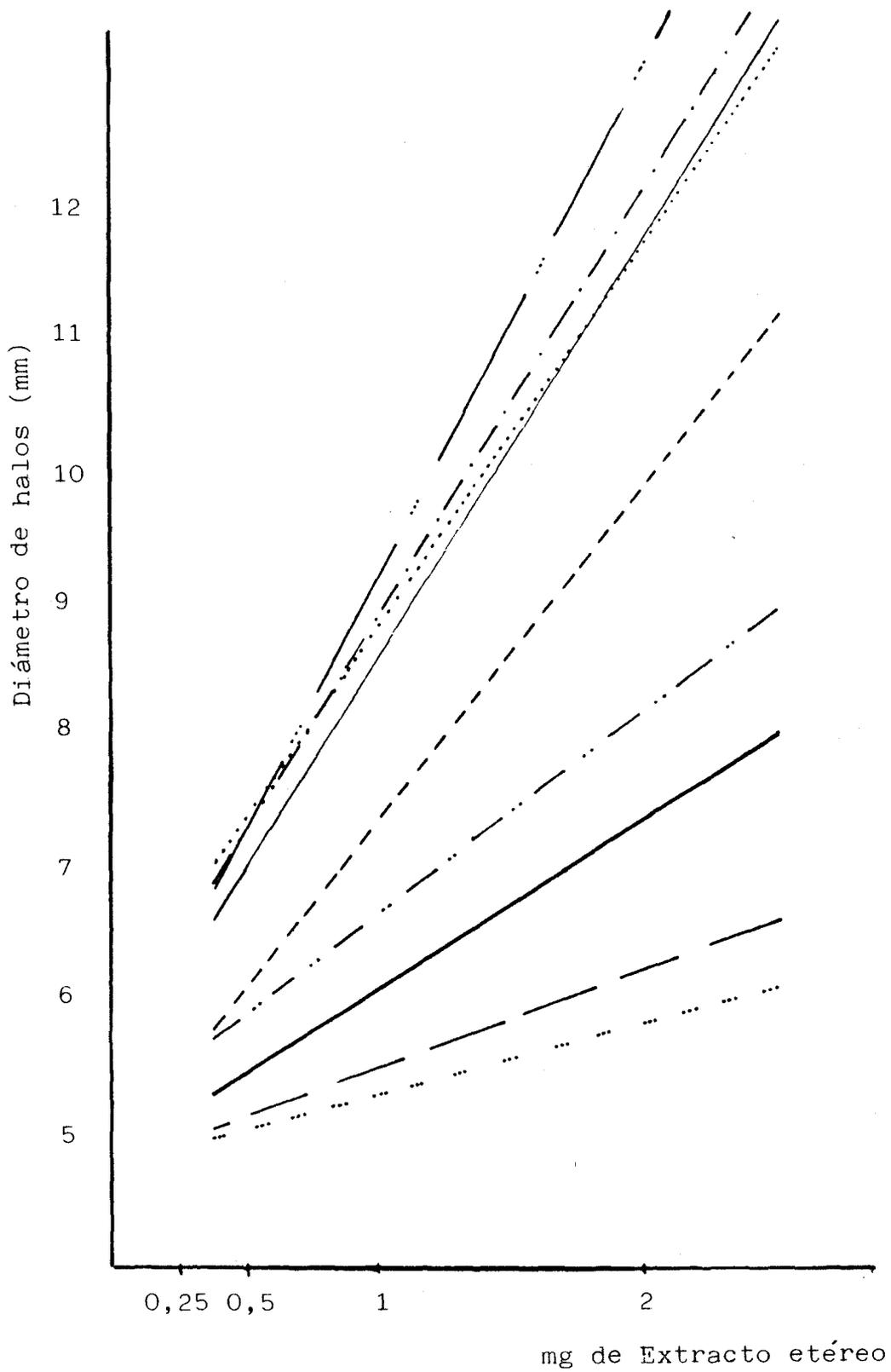


Fig.23

RECTA DE REGRESION DE LA MIRICETINA AISLADA
DE Erica andevalensis

————	<u>Bacillus subtilis</u>	$y=4,34+14,9x$	$c=0,972$
- - - -	<u>Escherichia coli</u>	$y=4,19+17,9x$	$c=0,965$
- - - -	<u>Candida albicans</u>	$y=4,53+33,5x$	$c=0,914$

RECTA DE REGRESION DE LA MIRICETINA AISLADA
DE Erica andevalensis

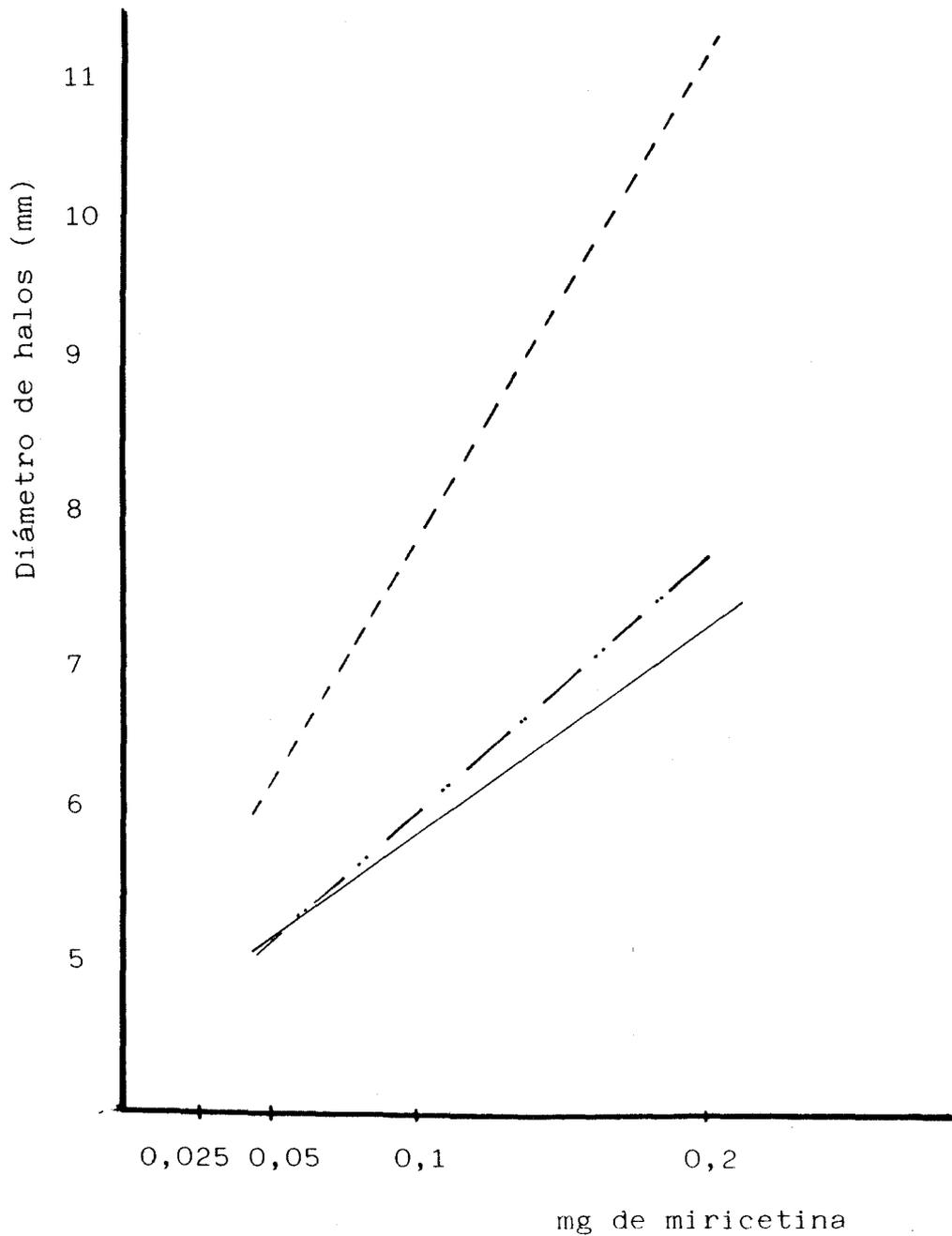


Fig.24

III.4.4.- DISCUSION DE RESULTADOS

A la vista de los resultados obtenidos podemos observar que el extracto etéreo presenta acción antimicrobiana, especialmente con las bacterias Gram (+), mostrándose algo menos activo frente al hongo ensayado y viéndose esta actividad disminuida en el caso de las bacterias Gram (-).

De todos los microorganismos ensayados, Serratia marcescens se muestra como el más resistente, presentando halo de inhibición sólo a la dosis máxima ensayada.

El comportamiento del compuesto "D", aislado del extracto etéreo e identificado como miricetina, nos induce a pensar que, si bien contribuye a la actividad antibacteriana de dicho extracto, no es el principal responsable de la misma.

Cabe destacar, sin embargo, el papel que juega este flavonol en su actividad antifúngica.

III.5.- ACTIVIDAD DIURETICA

El haber emprendido el estudio de la actividad -- diurética de E. andevalensis se debe a que otras especies - de este género han sido utilizadas tradicionalmente con estos fines en medicina popular (5,6).

Las técnicas que suelen emplearse en esta determinación son muy variadas; desde las que precisan una inter--vención en el animal, utilizándose normalmente perros y conejos, a las más sencillas que no precisan cirugía y en las que se suele utilizar el perro (su sistema renal se asemeja al del hombre más que el de otras especies), o la rata (por la facilidad de su manejo) (106,107,108).

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

- desde el punto de vista físico: pH, osmolaridad, densidad (109).
- especialmente, desde el punto de vista químico: determinación de los principales cationes y aniones, así como de algunos constituyentes orgánicos (110,111).

III.5.1.- CONDICIONES GENERALES DE LA EXPERIENCIA

La técnica seleccionada para nuestra experiencia es la de Lipschitz y col. (112), uno de los métodos más clásicos y frecuentes.

Los animales de experimentación son ratas Wistar macho de un peso medio de 250 ± 50 g, mantenidas en ayuna total de comida y agua 18h antes de iniciar la experiencia.

Los productos a estudiar se administran por vía oral mediante sonda intragástrica, recibiendo por la misma vía una sobrecarga hídrica de 50 ml/Kg animal de solución salina fisiológica. El grupo control sólo recibe dicha solución.

Tras la administración, se introducen los animales en jaulas de metabolismo.

En todos los casos se ha determinado:

- Volumen de orina excretada cada hora, durante 6 horas.
- volumen total de orina excretada en 6h
- excreción urinaria volumétrica (E.U.V.)
- densidad
- pH
- iones Na^+ y K^+

La excreción urinaria volumétrica se ha calculado según la formula:

$$E.U.V. = \frac{\text{Volumen recogido}}{\text{Volumen administrado}} \times 100 \quad (113)$$

El balance de Na^+ y K^+ se realizó en un fotómetro de llama Elvi-655. Las soluciones patrones se prepararon con agua desionizada a concentraciones de 1-10 ppm para el Na^+ y de 1-5 ppm para el K^+ .

III.5.2- DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA

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

- Lote I (control): 50 ml de solución fisiológica/kg animal
- Lote II (patrón): 20 mg de furosemida/kg animal
- Lote III (problema): 250 mg de r.s. de ext^o acuoso E. andevalensis/Kg animal
- Lote IV (problema): 500 mg de r.s. de ext^o acuoso E. andevalensis/Kg animal
- Lote V (problema): 200 mg de cenizas/Kg animal

La dosis de cenizas empleada en nuestras experiencias, es la equivalente a la misma cantidad de droga que se corresponde con 500 mg de residuo seco del ext^o acuoso ensayado.

III.5.3.- RESULTADOS

Las tablas (XIII) y (XIV) reflejan los valores medios de los datos obtenidos.

El volumen total de orina, E.U.V. y concentraciones de Na⁺ y K⁺, se exponen en forma de diagramas de barra en las figuras 25,26,27,28.

Los parámetros estadísticos que se determinaron a los datos obtenidos en la experiencia fueron los siguientes:

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

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

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

Diferentes valores de la variable: x_i

Número de individuos: n

Para determinar el nivel de significación de los -
datos obtenidos se aplicó el " test de student" (114).

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

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

El estudio de la relación dosis-efecto lo hemos -
llevado a cabo mediante el cálculo de la recta de regresión
y su correspondiente coeficiente de correlación, siendo el -
método empleado el de los mínimos cuadrados (105)

La recta de regresión correspondiente al volumen
de orina excretada respecto al tiempo aparece en la figura
29.

TABLA (XIII): Volúmenes de orina excretada (ml) y valores de E.U.V.

	1h	2h	3h	4h	5h	6h	E.U.V.
Lote control 50 ml sol.fis./Kg	0,26 [±] 0,14	0,90 [±] 0,22	1,70 [±] 0,35	2,27 [±] 0,31	2,28 [±] 0,31	2,88 [±] 0,48	23,64 [±] 3,92
Lote patrón (furosemida) 20 mg/Kg	4,02 [±] 0,43	10,7 [±] 0,84	12,7 [±] 1,00	14,1 [±] 1,12	14,5 [±] 1,19	14,7 [±] 1,21 ****	130,7 [±] 9,86 ****
Lote problema 250 mg r.s. Ext ^o ac./Kg	0,25 [±] 0,12	1,38 [±] 0,12	2,15 [±] 0,27	2,63 [±] 0,39	2,93 [±] 0,37	3,18 [±] 0,40 n.s.	25,79 [±] 2,53 n.s.
Lote problema 500 mg r.s. Ext ^o ac. /Kg	0,70 [±] 0,27	2,04 [±] 0,24	3,75 [±] 0,30	4,56 [±] 0,41	5,38 [±] 0,38	6,00 [±] 0,41 ****	48,15 [±] 3,68 ****
Lote problema 200 mg cenizas/Kg	1,45 [±] 0,25	2,43 [±] 0,34	3,43 [±] 0,31	4,16 [±] 0,42	4,72 [±] 0,27	4,87 [±] 0,36 **	34,10 [±] 2,35 *

**** P < 0,001

** P < 0,01

* P < 0,05

n.s. no significativo

TABLA (XIV): Valores de densidad, pH, Na⁺ y K⁺

	Densidad	pH	meq. Na ⁺ /6h/Kg	meq. K ⁺ /6h/Kg
lote control 50 ml sol.fis./Kg	1,028 [±] 1,23.10 ⁻³	6,12 [±] 0,07	2,25 [±] 0,36	0,57 [±] 0,13
Lote patrón (furosemida) 20 mg/Kg	1,017 [±] 1,14.10 ⁻³ ****	5,37 [±] 0,06 ****	12,2 [±] 0,80 ****	1,98 [±] 0,10 ****
Lote problema 250 mg r.s. Ext ^o ac./Kg	1,029 [±] 6,32.10 ⁻⁴ n.s.	5,85 [±] 0,07 *	4,90 [±] 0,34 ***	1,27 [±] 0,13 ***
Lote problema 500 mg r.s. Ext ^o ac./Kg	1,027 [±] 1,38.10 ⁻³ n.s.	5,78 [±] 0,07 *	5,27 [±] 0,35 ***	1,76 [±] 0,13 ****
Lote problema 200 mg cenizas/Kg	1,027 [±] 1,76.10 ⁻³ n.s.	5,82 [±] 0,11 *	4,24 [±] 0,31 ***	0,97 [±] 0,11 *

**** P < 0,001

*** P < 0,005

** P < 0,01

* P < 0,05

n.s. no significativo

VOLUMEN DE ORINA (ml). TECNICA DE LIPSCHITZ



50 ml solución fisiológica/Kg animal



20 mg furosemida/Kg animal



250 mg residuo seco del Extracto acuoso/Kg animal



500 mg residuo seco del Extracto acuoso/Kg animal



200 mg cenizas/Kg animal

VOLUMEN DE ORINA (ml). TECNICA DE LIPSCHITZ

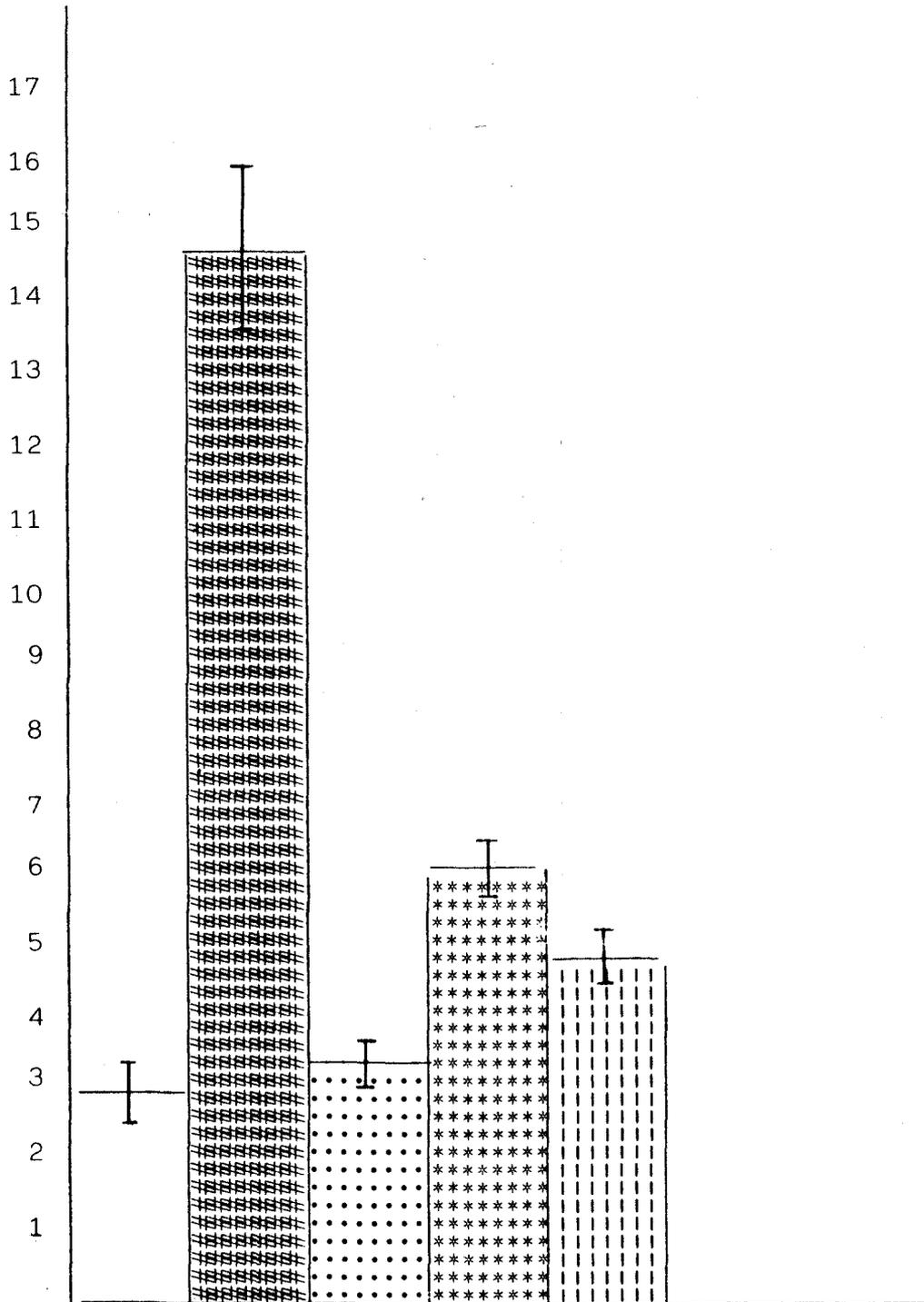


Fig.25

EXCRECION URINARIA VOLUMETRICA (E.U.V.)



50 ml solución fisiológica/Kg animal



20 mg furosemida/Kg animal



250 mg residuo seco del Extracto acuoso/Kg animal



500 mg residuo seco del Extracto acuoso/Kg animal



200 mg cenizas/Kg animal

EXCRECION URINARIA VOLUMETRICA (E.U.V.)

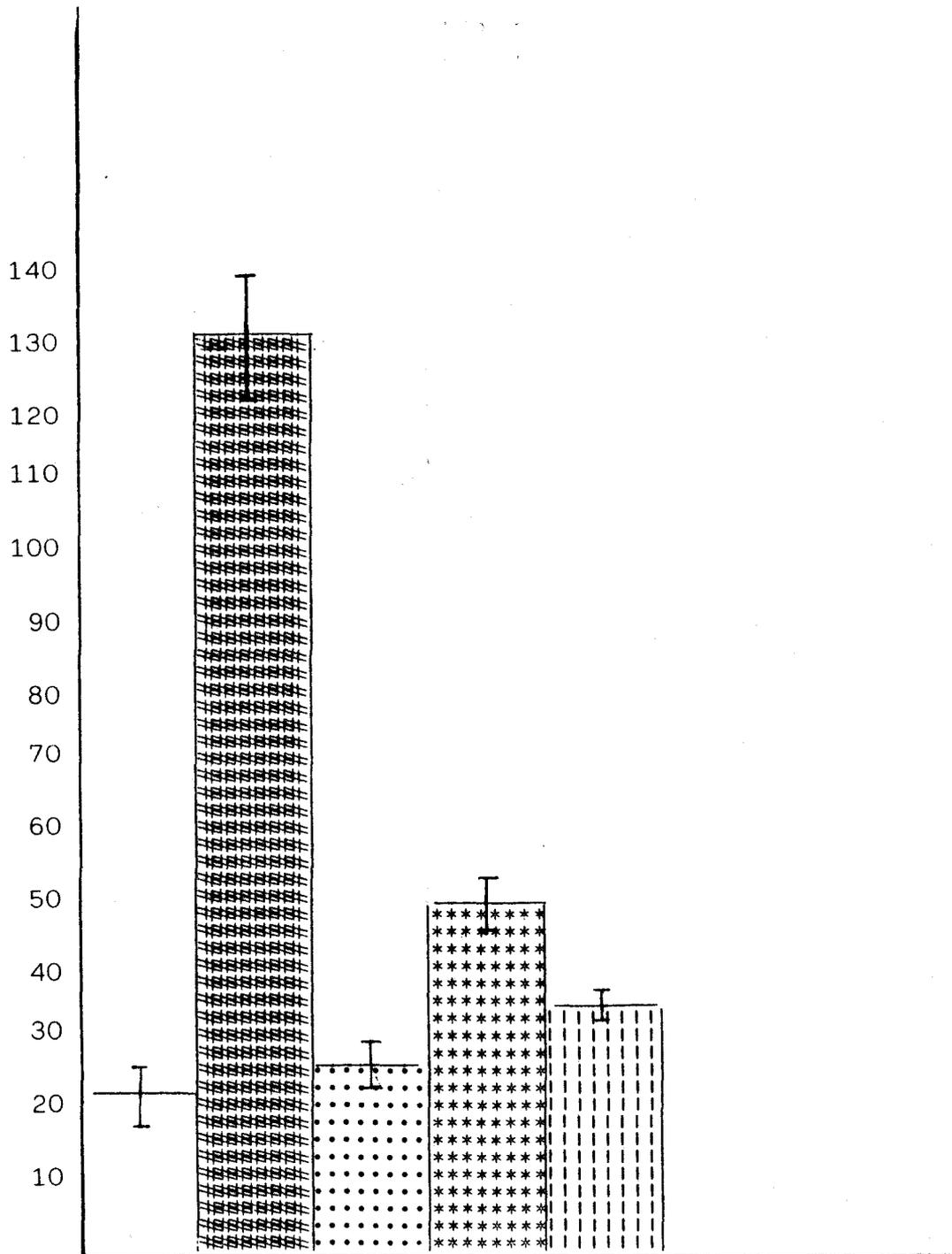


Fig.26

BALANCE DE Na⁺



50 ml solución fisiológica/Kg animal



20 mg furosemida/Kg animal



250 mg residuo seco del Extracto acuoso/Kg animal



500 mg residuo seco del Extracto acuoso/Kg animal



200 mg cenizas/Kg animal

BALANCE DE Na⁺

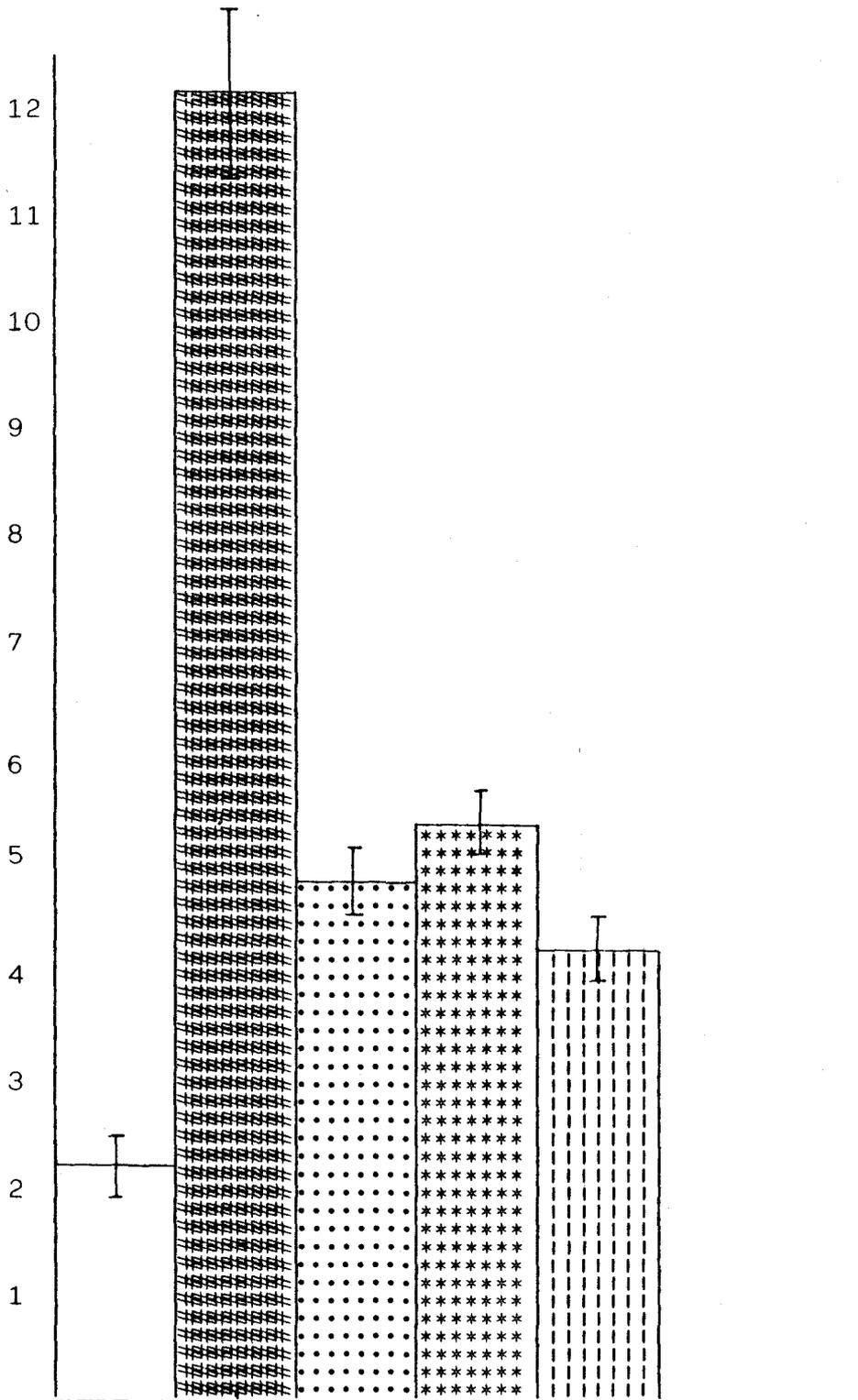


Fig.27

BALANCE DE K⁺



50 ml solución fisiológica/Kg animal



20 mg furosemida/Kg animal



250 mg residuo seco del Extracto acuoso/Kg animal



500 mg residuo seco del Extracto acuoso/Kg animal



200 mg cenizas/Kg animal

BALANCE DE K^+

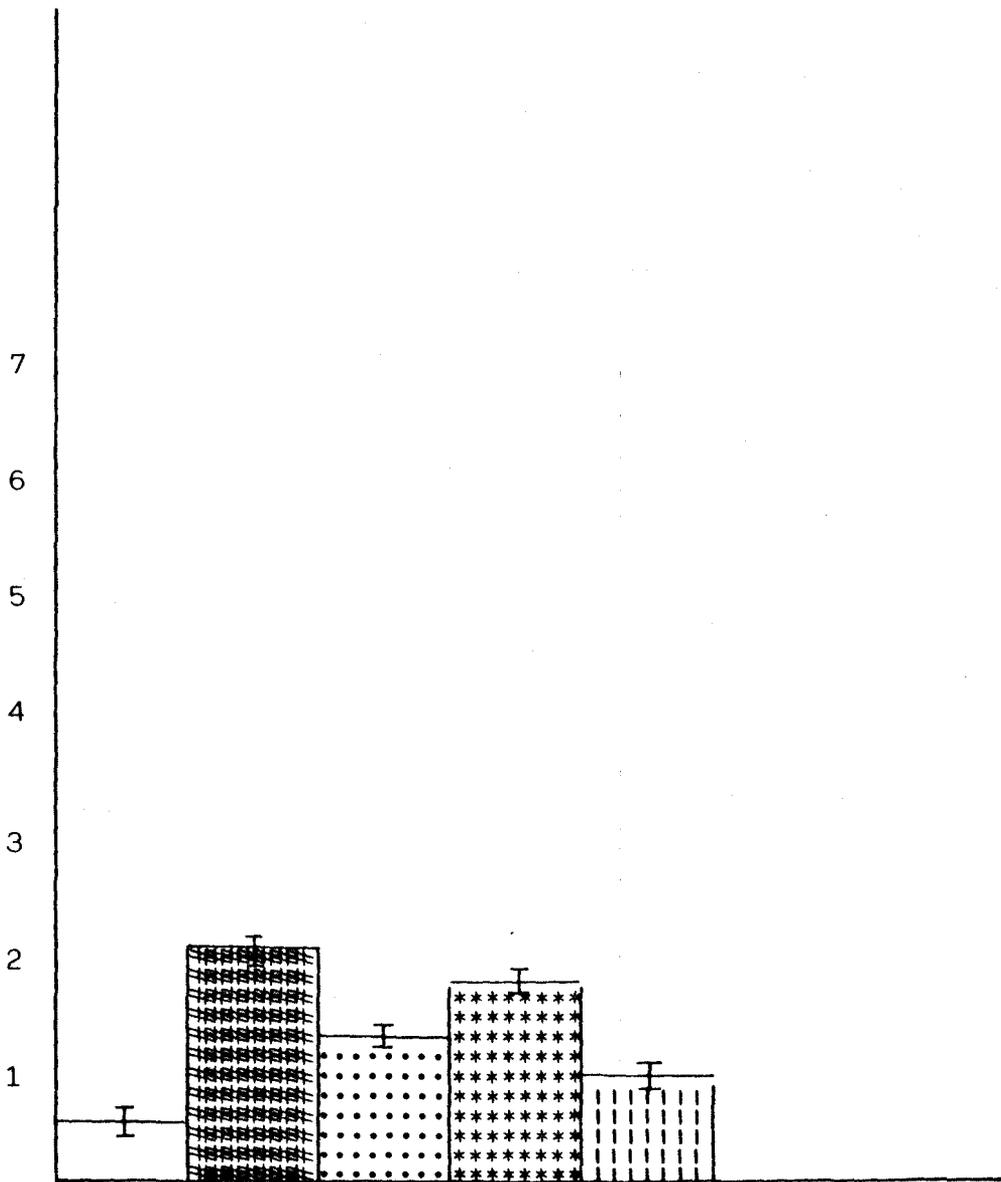


Fig.28

RECTA DE REGRESION DEL EXTRACTO ACUOSO

— —	50 ml sol. fis./Kg	$y = -0,06 + 0,51x$	$c = 0,975$
.....	20 mg furosemida/Kg	$y = 5,17 + 1,89x$	$c = 0,865$
————	250 mg r.s. Ext ^o ac./Kg	$y = 0,10 + 0,56x$	$c = 0,959$
— · — · —	500 mg r.s. Ext ^o ac./Kg	$y = 5,33 \cdot 10^{-3} + 1,06x$	$c = 0,983$
— — —	200 mg cenizas/Kg	$y = 1,04 + 0,70x$	$c = 0,975$

RECTA DE REGRESION DEL EXTRACTO ACUOSO

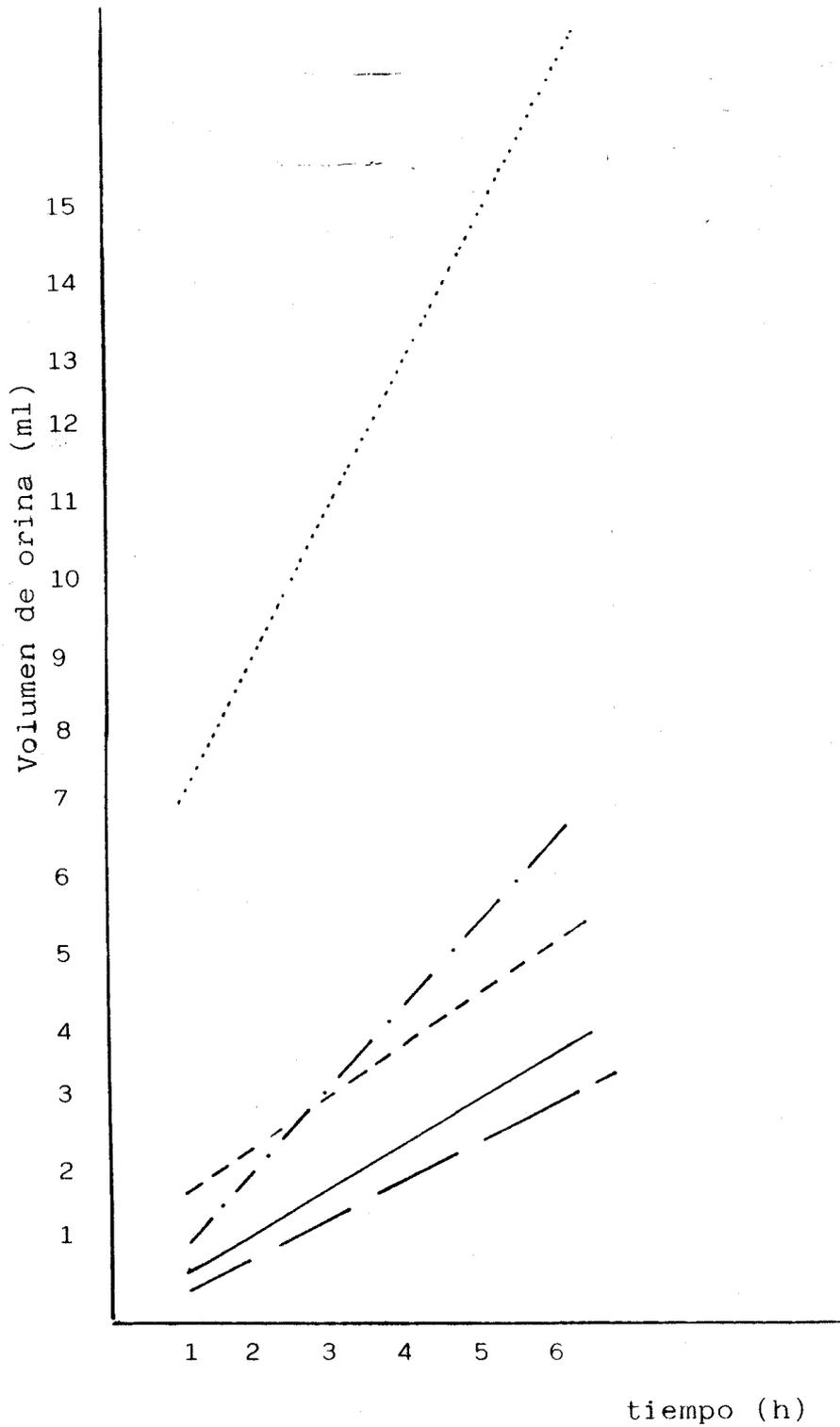


Fig.29

III.5.4.- DISCUSION DE RESULTADOS

Con la dosis de 500 mg de residuo seco del cocimiento ácido de Erica andevalensis se origina un aumento de la excreción urinaria volumétrica (E.U.V.) del 50,9 % con respecto al lote control. Este incremento no parece ser debido exclusivamente a los componentes minerales, ya que en las cenizas, éste es sólo del 30,6 %.

La densidad urinaria no sufre cambios significativos con las preparaciones administradas; sin embargo, el pH se ve ligeramente modificado en todos los lotes tratados.

Con respecto a la actividad natriurética y kaliurética, observamos un aumento significativo en todas las muestras analizadas, especialmente en las procedentes de la dosis de 500 mg de residuo seco/Kg del cocimiento, hecho que coincide con los resultados obtenidos para la E.U.V.

IV - CONCLUSIONES

- 1ª- Basándonos en los resultados obtenidos por reacciones coloreadas, métodos cromatográficos y espectrofotometría U.V., I.R. y $^1\text{H-RMN}$, el compuesto "C", aislado del extracto etéreo procedente de las sumidades floridas de Erica andevalensis C-R, se identifica como QUERCETINA.

- 2ª- El compuesto "D", aislado del mismo extracto, ha sido identificado como MIRICETINA, según los datos obtenidos utilizando las técnicas anteriormente expuestas.

- 3ª- El extracto etéreo presenta acción antimicrobiana especialmente frente a Bacterias Gram(+).

- 4ª- El compuesto "D", principio mayoritario de dicho extracto, contribuye sólo en parte a la acción antimicrobiana del mismo; sin embargo, cabe destacar su importancia en la actividad antifúngica.

- 5ª- Los ensayos de acción diurética de distintas preparaciones de la especie estudiada, nos permite deducir que, de las dosis ensayadas, es la de 500 mg la que muestra mayor actividad, lo cual no parece deberse exclusivamente a los compuestos minerales.

V- BIBLIOGRAFIA

- (1) G.H.CONSTANTINE, Jr., P.CATAFOLMO, K.SHETH, L.A.SCIU-
CHETTI. (1966).
"Phytochemical investigation of Arctostaphylos columbi-
ana piper and Arctostaphylos patula greene (Ericaceae)"
J. Pharm. Sci., 55, (12), 1378-1382
- (2) R.CHAUVIN, P.LAVIE (1956)
"Antibiotic substance of polen"
Ann. Inst. Pasteur, 90, 523-527. A través C.A. (1956),
50, 12191b.
- (3) M.V.TORO, M.J.RIQUELME (1984)
"Iniciación al estudio de Erica andevalensis Cabezudo-
Ribera".
Comunicación presentada al XVI Congreso Internacional
de Sociedad Farmacéutica del Mediterraneo Latino. Mar-
sella (1984). En prensa en Pharm. Méd.
- (4) M.PASCUAL MARTINEZ (1986)
"Contribución al estudio de los Compuestos Polifenólicos
de Erica andevalensis Cabezudo-Ribera". Tesis de
Licenciatura. Sevilla, 1986.
- (5) M.FERNANDEZ, A.NIETO (1982)
"Plantas medicinales"
Ed. Eunsa, Pamplona, p.75
- (6) L.BEZANGER-BEAUQUESNE, M. PINKAS, M.TORK (1975)
"Les Plantes dans la Thérapeutique Moderne".
Ed. Maloine S.A., Paris, p.214.
- (7) "Plantas y Flores"
Ed. Sarpe, 1, p.164

- (8) M.J.AYUSO GONZALEZ (1976)
"Drogas con bioflavonoides y compuestos relacionados:
Lupinus albus L. y Artemisia barrelieri Bess."
Tesis Doctoral, Granada, p.1
- (9) T.A.GEISSMAN (1955)
"Modern methods of plants analysis"
K.Paech and M.V.Tracey, Ed. Julius-Springer, Berlin,
3, p.450
- (10) J.MASQUELIER, J.MICHAUD, J.LAPARRA, M.C.DUMON (1979)
"Pycnogenols"
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 118, 95-108
- (11) J.MASQUELIER, J.MICHAUD, J.LAPARRA, M.C.DUMON (1979)
"Flavonoides et pycnogenols"
Internat. J. Vit. Nutr. Res 49, 3, 307-311
- (12) S.MORRIS, R.H.THOMSON (1963)
"Tricin and vitexin from marbled white butterfly wings"
Tetrahedron lett., 101
- (13) T.A.GEISSMAN (1962)
"The chemistry of flavonoids compounds"
Ed.Pergamon press., Oxford
- (14) K.HERRMANN (1964)
"Phenolic plant components as naturally occurring anti-oxidans"
Fette, Seifen, Anstrichm, 75(8), 499-504
- (15) C.MELA (1966)
"Sostanze flavoniche"
Fitoterapia, 37, 11

- (16) Loc. Cit. (8), p.5
- (17) R.PARIS (1971)
"Acquisitions recentes dans le domaine des flavonoïdes"
Pharm. Week. Sci. Ed., 5, 9-14
- (18) F.TOMAS, O.CARPENA, J.J.MATAIX (1972)
"Análisis estructural de flavonoides en U.V."
Ann. Quim. 68 (2), 115-121
- (19) G.MAGGIO (1952)
"New biochemical and pharmacological aspects of the action of flavones"
Congr. Inter. Biochem., Résumes commus 2^e Congr. Paris, p.440-441
- (20) A.C.NEISH (1964)
"Biochemistry of phenolic Compounds",
Ed. J.B. Harbone, Academic-Press, Londres
- (21) E.C.BATE-SMITH, T.SWAIN (1965)
"Recent developments in the chemotaxonomy of flavonoid compounds"
Lloydia, 28, 313
- (22) H.GRISEBACH (1967)
"Biosynthetic patterns in microorganisms and higher plants"
Ed. Wiley, Londres.
- (23) R.R.PARIS, H.MOYSE (1976)
"Matière Médicale"
Ed. Masson, Paris, p.106

- (24) A.SZERT-GYORGYI (1936)
"Über den Einfluss von Substanzen der Flavongrupe auf die Permeabilität der Kapillaren. Vitamin P"
Dtsch. med. Wschr. 62, 1325
- (25) J.B.HARBONE, T.J.MABRY, H.MABRY (1975)
"The Flavonoids"
Ed. Chapman and Hall, London, p.1035
- (26) V.A.MAKAROV, V.I.LITITVINENKO (1968)
"Prunus Spinosa Flavonoids"
Aktual. Vol. Farm. (pub 1970) p.200-1, A través C.A. (1972), 76, 108082m.
- (27) M.GABOR (1974)
"Pharmacological research on flavonoids"
Bull. Liaison, Groupe polyphénols, 5,4, 14pp., A través C.A. (1975), 83, 71223z.
- (28) Loc. Cit. (23) p.107
- (29) F.I.CAIRD, A.PIRIE, T.G.RANSELL (1977)
"Diosmina: tratamiento eficaz de la retinitis diabética"
Medicina e Higiene, 345, 7-9
- (30) Loc. Cit. (8) p.12
- (31) Lot. Cit. (25) p. 1033
- (32) S. JIT, T.N. NAG (1985)
"Antimicrobial principles from in vitro tissue culture of Tribulus alatus"
Indian J. Pharm. Sci. 47, (3), 101-3, a través C.A. (1986) 104, 165.379j.

- (33) O.O.ODEBIYI (1985)
" Propiedades antimicrobianas y antifúngicas de los extractos de Jatropha podagrica"
Fitoterapia, 56 (5), 397-9
- (34) A.G.MARKWAN, C.W.NAGEL (1986)
"Microbial inhibitors of chamberries"
J.Food. Sci. 51(4), 1009-13, a través C.A. (1985),
105, 132.487k
- (35) Y.P.CHEN, C.C.CHEN, H.Y.SHU (1986)
"Pharmacological activities of flavonoids of Bauchinia championii and Milletia reticulata"
Prog. Clin. Biol. Res. 213 (Plant. Flavonoids Biol. Med.) 297-300, a través C.A.(1986) 105, 35165w
- (36) N.B.PAPPANO, S.E.BLANCO, N.B.DEBBATTISTA, R.F.SEGOVIA
F.H.FERRETTI (1985)
"Mechanisms of bacteriostatic action of flavonoids on a Staphylococcus aureus strain"
Comun Biol. 4(1), 23-37, a través C.A. (1986), 104,
31619d
- (37) P.A.HEDIN, S.K.WAAGE (1986)
"Roles of flavonoids in plant resistance to insects"
Prog. Clin. Biol. Res. 213 (Plant flavonoids Biol. - Med.), 87-100
- (38) Y.TSUCHIYA, M.SHIMIZU, Y.HIYAMA, K.ITOH, Y.HASHIMOTO,
M.NAKAYAMA, T.HORIE, N.MORITA (1985)
"Antiviral Activity of Natural Occurring Flavonoids in Vitro"
Chem. Pharm. Bull., 33(9), 3881-6

- (39) M.JOLY, J.P.HAAG-BERRURIER, R.ANTON (1980)
"Cytotoxicite de flavonoides sur cellules d'hepatome"
en culture"
Planta med., 39(3), 230
- (40) T.J.MABRY, B.N.TIMMERMANN, M.ROBERT, A.ULUBELEN
R.MUES (1980)
"Cytotoxic 6-Methoxyflavonoids from Brickellia"
Planta med., 39(3), 220
- (41) J.J.WILLAMAN (1955)
"Some biological effects of the flavonoids"
J. Amer. Pharm. Assoc., 44, 104
- (42) M.G.BRUSH (1963)
"Oestrogens in pasture plantes"
Biochem. J., 88, 203
- (43) K.YAMASHITA (1965)
"Antiprogestional activity of rutin on the rabbits
uterus"
Nature, 207, 199
- (44) Loc. Cit. (25), p.1037
- (45) S.K.BHARGAVA (1984)
"Estrogenic and pregnancy interceptory effects of the
flavonoids (VI-VII) of vitex negundo L. seeds in mice"
Plant. Méd. et Phytother., 18(2), 74-79
- (46) S.K.BHARGAVA (1986)
"Antifertility effects of flavonoids (VI-VII) of vi-
tex negundo L. seeds in dogs"
Plant. Méd. et Phytother., 20(2), 188-198

- (47) M.GABOR (1985)
"Flavonoids and Bioflavonoids"
Eds. L.Farkas, M.Gabor, F.Kallay., Szeged, p.304
- (48) C.O.VAN DEN BROUCKE, J.A.LEMLY (1983)
"Spasmolytic activity of the flavonoids from Thymus vulgaris".
Pharm. Week. Sci. Ed., 5, 9-14
- (49) C.VAN DEN BROUCKE, J.LEMLY, J.LAMY (1982)
"Action spasmolytique des flavones de différentes espèces de Thymus"
Plant. Med. et Phytother., 16(4), 310-317
- (50) M.TORK, L.BEZANGER-BEAUQUESNE, A.ROBELET (1971)
"Recherches sur les flavonoïdes des Legumineuses"
Ann. Pharm. Franç., 29(4), 297-304
- (51) M.GABOR (1985)
"Advances in the pharmacology of benzopyrone derivatives and related compounds"
Proceedings International Bioflavonoids Symposium,
Munich , p.363-401
- (52) A.BEREZT, J.C.STOCLET, R.ANTON (1980)
"Inhibitions of isolated rat aorta contraction by flavonoids possible correlation with cAMP phosphodiesterase inhibition"
Planta med., 39(3), 236
- (53) Loc. Cit. (47), p.315

- (54) R.DELLA LOGGIA, A.TUBARO, P.DRI, C.ZILLI, P.DEL NEGRO (1986)
"The role of flavonoids in the anti-inflammatory activity of the Chamomilla recutita"
Prog. Clin. Biol. Res., 213, (Plant. Flavonoids Biol. Med.), 481-4
- (55) A.VILLAR, J.ESPLUGUES, M.J.ALCARAZ (1982)
"Acute anti-inflammatory activity of the Sideritis murgonensis flavonoids"
Archivos de ecología y toxicología, 8(2), 99-106
- (56) S.SOMASUNDARAN, J.SADIQUE (1986)
"Anti-hemolytic effects of flavonoidal glycosides of Clerodendron inerme: An in vitro study"
Fitoterapia, (2), 103-110
- (57) Loc. Cit. (47), p.310
- (58) A.BERETZ, J-P.CAZENAVE, R.ANTON (1980)
"Flavonoids inhibition of agregation and secretion of Washed Human Platelets: Structure-Activity relationships"
Planta med., 99(3), 240
- (59) G.M.LAEKEMAN, M.CLAEYS, P.C.RWANGABO, A.C.HERMAN, A.J.VLIETINCK (1986)
"Cardiovascular effects of 3-methylquercetin"
planta med., (6), 433-437
- (60) F.ZARAGOZA, I.IGLESIAS, J.BENEDI, P.FDEZ-CORBEIRA(1985)
"Efecto sobre la agregación plaquetaria de los citroflavonoides"
Fitoterapia, (6), 343-348

- (61) H.ARENS, B.ULBRICH, H.FISCHER, H.J.PARNHAM, A.ROMER
(1986)
"Novel antinflamatory flavonoids from Podophyllum ver-
sipelle cell culture"
Planta Med., (6), 468-473
- (62) H.PETER (1966)
"Vasoactivity of Ginkgo biloba preparation"
Conf. Hung. Phar., Invest. pharmacol., Soc.pharmacol.
rung. 4th, 77-81, a través C.A.(1970), 72, 11142k
- (63) F.OCCHIUTO, C.CIRCOSTA, R.COSTA, F.BRIGUGLIO, A.TO-
MMASINI (1986)
"Etude compareé de l'activité cardiovasculaire des
pousses feuilles et des fleurs de Crataegus oxycantha"
Plant. Med. et Phytother., 20(1), 52-63
- (64) P.MANOLOV, L.DALEVA (1969)
"Pharmacological study of a preparation based on a
flavonoids mixture from Crataegus monogyma"
Farmatsiya (Sofía), 19(3), 38-44. A través C.A., 72
(1970), 11223n
- (65) A.LUZ PAREDES, R.LUQUE, C.OLARTE, A.CALLE (1985)
"Caracterización de la fracción responsable de los e-
fectos hipotensores de Croton glabellus"
Rev. Colomb. Cienc. Quim-Farm., 4(2), 1-6,
A través C.A. (1986), 104, 155779d
- (66) Kh.M.NARYROV (1971)
"Pharmacological properties of some plants belonging
to the family Scrophulariaceae grown in Barhkiria"
Farmakol. Toksikol.(Moscow), 34(6), 773-5.
A través C.A. (1972), 76, 94806m

- (67) K.K.HSU, F-C.CHEN (1973)
"Structure-activity relation of substituted flavonoids I"
Tai-wan k'o hsueh., 27(1-2), 23-6, A través C.A.,
(1974), 80, 66597h
- (68) Loc. Cit (47), p.305
- (69) Loc. Cit. (23), p.108
- (70) K.HILLER (1965)
"Flavonoide als pflanzenfarbstoffe und therapeutica"
Deutch. Apoth. Ztg., 102, 1088
- (71) O.M.BONDARENKO, R.K.CHAGOVETS, V.I.LITVINENKO, G.L.
OBOLENTSEVA, V.I.SILA, T.B.KIGEL (1971)
"Euphorbia palustris and Euphorbia steposa flavonoids
and their pharmacological properties"
Farm. Zh.(Kiev)., 26(6) 46-8, a través C.A.(1972)
76, 121697k
- (72) Loc. Cit (25), p.5
- (73) G.NETIEN, P.H.LEBRETON (1964)
"Sur les flavonoides et autres substances polypheno-
liques du Millepertius hypericum nummularium L."
Ann. Pharm. Fr., 22, 69
- (74) R.PARIS, A.NOTHIS (1970)
"Plantes de nouvelle caledonie. Etude particuliere
de plantes e derives polyphenoliques"
Plant. Med. et Phytother., 4, 64

- (75) M.JAY, J-F.GONNET, E.WOLLENWEBER, B.VOIRIN (1975)
"Sur l'analyse qualitative des aglycones flavoniques
dans optique chimiotaxinomique"
Phytochemistry, 14, 1605-1612
- (76) P.RIBEREAU-GAYON (1963)
"Les composés phénoliques des végétaux"
Ed. Dunod, Paris, p.70
- (77) Loc. Cit (25), p. 35-37
- (78) R.ALVES DE LIMA, G.DELLE-MONACHE (1978)
"Studies on flavones, acetophenones as model compounds
for analyzing flavonoids using U.V. and NMR spectroscopy"
Rend. Accad. Naz. 40, 3, 181-91, a traves C.A.(1980)
92, 6368x.
- (79) F.TOMAS, J.J.MATAIX, O.CARPENA (1973)
"Indice de desplazamiento típico de los flavonoides
en U.V."
Ann. de Química, 69(3), 357-64
- (80) B.VOIRIN (1983)
"U.V. spectral differentiation of 5-hydroxy-and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B. ring"
Phytochemistry, 22, (10), 2107-2145
- (81) T.J.MABRY, K.R.MARKHAM, M.B.TOMAS (1970)
"The systematic identification of flavonoids"
Ed. Springer-Verlag, New York, p.35-57

- (82) F.TOMAS, O.CARPENA, J.MATAIX (1972)
"Análisis estructural de flavonoides en el U.V. II.
reactivos alcalinos"
An. de Química, 68(2), 123-9
- (83) L.M.BOUILLANT, J.FAVRE-BONVIN, J.CHOPIN (1974)
"Application of mass spectrometry of permethylated de
rivatives in determination of structure of C-glycosyl
flavonas"
C.R.Acad. Sci. Ser.D., 279, (3), 295-7, a través C.A.
(1974), 80, 152574a
- (84) S.SHINICHIN, K.NAKANISKI (1966)
"Mass spectra of flavonoids"
Vietnamica. Chim. Acta., 43-47, a través C.A.(1970)
72, 26333x
- (85) B.DOMON, K.HOSTETTMANN (1985)
"Mass spectrometric studies of underivatized polyphe-
nolic glycosides"
Phytochemistry, 24, (3), 575-580
- (86) D.G.I.KINGSTON (1971)
"Mass spectrometry of organic-compounds-VI* electron-
impact spectra of flavonoids compounds"
Tetrahedron, 27, 2691-2700
- (87) D.G.I.KINGSTON (1973)
"Methane chemical ionization mass spectrometry of fla
vonoids "
Tetrahedron, 29, 4033-4086

- (88) R.D.SCHMID, R.MUES, J.H.McREYNOLDS, G.VANDER VELDE, N.NAKATANI, E.RODRIGUEZ (1973)
"GC-MS of perdeuteriomethylated flavonoid aglycones"
Phytochemistry, 12, 2765-2772
- (89) J.ARINES, J.L.G.MANTILLA. E.VIEITEZ (1974)
"Compuestos fenólicos en Erica vagans L."
Ann. Edafol., 33, (9-10), 891-899
- (90) P.TETENYI (1970)
"Infraespecific chemical taxa of medicinal plants"
Akademiai kiado, Budapest.
- (91) J.B.HARBONE, C.A.WILLIAMS (1973)
"A chemotaxonomía survey of flavonoids and simple phenols in leaves of the Ericaceae"
Bot. J. Linn. Soc. 66, 37-54
- (92) J.B.HARBONE (1969)
"Ocurrence of flavonol 5-methyl ether in higher plants and their systematic significance"
Phytochemistry, 8, 419-423
- (94) R.K.IBRAHIN (1963)
"The distribution of O-pyrocatechin acid in plants"
Naturviss, 50, (1), 124-129
- (95) J.B.HARBONE, C.A.WILLIAMS (1971)
"Leaf survey of flavonoids and simple phenols in the genus Rhododendron"
Phytochemistry, 10, 2727-2744

- (96) M.PASCUAL, M.D.GARCIA, M.V.TORO, M.T.SAENZ (1987)
"Actividad antimitótica del extracto acuoso ácido y de la fracción de ácidos fenóles de Erica andevalensis Cabezudo-Ribera"
Il Farmaco. Ed. r., 42,(4), 101-115
- (97) M.V.TORO, M.D.GARCIA, M.PASCUAL
"Isolement et identification des acides phénols dans Erica andevalensis Cabezudo-Ribera: Sa contribution a l'activité antimicrobienne de l'espèce"
Ann. Pharm. Franç. (en prensa).
- (98) E.MARHUENDA, M.D.GARCIA (1985)
"Mise en évidence des propriétés antimicrobiennes des sommités fleuries d'Ononis natrix L. Identification de l'acide férulique"
Plant. Med. et phytother., 19,(3), 163-172
- (99) X.A.DOMINGUEZ (1973)
"Metodos de Investigación fitoquímica"
Ed. Limusa, Mexico, p.84-85
- (100) M.PARIS (1968)
"Méthodes modernes d'etude des c'flavonosides, application a la salicaire"
Plant. Med. et Phytother., 2(1), 36
- (101) D.DAMASO, M.MORENO-LOPEZ, R.M.DAZA (1984)
"Antibióticos y quimioterápicos, uso clínico"
Ed. Grutesa, Madrid, p.68

- (102) E.W.KONEMAN, S.D.ALLEN, V.R.DOWELL, H.M.SOMMER (1983)
"Diagnóstico microbiológico"
Ed. Med. Panamericana, Buenos Aires, p.382
- (103) IBID, p.386
- (104) F.SORIANO (1976)
"Manual de bacteriología (recopilación de técnicas)"
Difco Laboratories, p.98
- (105) K.MATHER (1965)
"Analyse statistique en biologia"
Ed. Ganthier-Villas, Paris, p.32
- (106) R.M.TAYLOR, J.G.TOPLISS (1962)
"Essay of diuretics"
J. Med. Pharm. chem. 4,312
- (107) J.BURN (1957)
"Prácticas de Farmacología"
Ed. Acribia, Zaragoza
- (108) J.J.TRAVERSO (1962)
"Bioassay of diuretias in dog"
J. Med. Pharm. Chem. 5, 808
- (109) J.G.M.FAUCON (1980)
"Pharmacologie cardiovasculaire, pulmonaire et rénale"
Ed. Doin, Paris
- (110) P.MONTASTRUC. J.L.MONTRASTRUC (1979)
"Comparative effects of isoprenaline, dopamine and
angitensin on drinking, diuresis and natriuresis in
normal and diabetic insipidus dog"
Arch. de Pharmacol. y Toxicol., 5, 73

- (111) D.H.P.STREETEN (1961)
"Symposium on the experimental pharmacology and clinical use of antimetabolites. Part.VII the spirolactones"
Clin. Pharmacol. and Therap., 2,359
- (112) W.L.LIPSCHITZ, Z.HADIDIAN, A.KERACSAR (1943)
"Bioessay of diuretics"
J. Pharmacol. Exper. Therap., 79, 97
- (113) C.BARESTEGUI (1976)
"Esquemas y prácticas de Farmacología"
Ed. Espaxc, Barcelona.
- (114) M.PASCUA (1974)
"Metodología bioestadística"
Ed. Paz Montalvo, 2ª ed., Madrid.
- (115) F.A.TOMAS-BARBERAN, F.TOMAS-LORENTE (1986)
"Espectrometría de masas de agliconas de flavonas, 3-metoxiflavonas y flavonoles. I. Ión molecular y derivados por pérdida de radicales"
Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 26(1),35-51
- (116) F.TOMAS-LORENTE, F.A.TOMAS-BARBERAN (1986)
"Espectrometría de masas de agliconas de flavonas, 3-metoxiflavonas y flavonoles. II. Iones producidos por fragmentación Retro-Diels-Alder"
Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 26(2),203-212