

R. 6716

T 421

CATEDRA DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

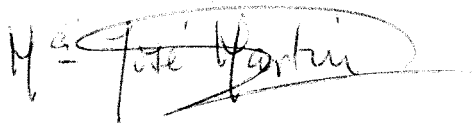
"CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA
DE *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter"

Trabajo para aspirar al grado
de Licenciatura que presenta
Ma FLORENTINA DELGADO RUIZ.

Florentina Delgado Ruiz

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 Dras. María José Martín Calero y Catalina Alarcón de la Lastra Romero.

Las directoras del trabajo:



Dra. M^a. José Martín Calero



Dra. Catalina Alarcón de la Lastra Romero



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, "Contribución al estudio de la actividad antiulcerosa de Dittrichia viscosa - (L.) W. Greuter", ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica-Farmacognosia y Farmacodinamia, bajo la dirección de la Prof. titular Dra. M^a José Martín Calero y de la Prof. Dra. Catalina Alarcón de la Lastra - Romero, durante el tiempo exigido y reuniendo los requisitos necesarios para este tipo de trabajo.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación en Sevilla a nueve de Julio 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

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Elisa Marhuenda Requena, por haberme permitido realizar este trabajo en la Cátedra - de Farmacognosia y Farmacodinamia.

A la Dra. María José Martín Calero y a la Dra. Catalina Alarcón de la Lastra Romero, mis directoras, por sus atenciones y estímulo constante.

A mis compañeras de Departamento por su afectuosa ayuda.

Y a todas las personas de las que haya recibido alguna colaboración.

A mi familia

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A : Amarillo

a : Amarillo débil

A₁ : Amarillo limón

P : Pardo

Az: Azul

az: Azul débil

N : Naranja

R : Rojo

V_a : Verde amarillento

(*) Fluorescencia

I - OBJETO	1
II - REVISION BIBLIOGRAFICA	4
II. 1.- <u>INTERES DE LA FITOTERAPIA GASTRODUODENAL</u>	5
III - PARTE EXPERIMENTAL	19
III. 1.- <u>MUESTRAS: RECOLECCION Y PREPARACION</u>	20
III. 2.- <u>EXTRACCION</u>	20
III. 3.- <u>ENSAYOS GENERALES CUALITATIVOS</u>	23
III. 3. 1.- CUERPOS GRASOS	23
III. 3. 2.- PIGMENTOS CAROTENOIDES	23
III. 3. 3.- ESTEROLES Y TRITERPENOS	24
III. 3. 4.- PIGMENTOS ANTOCIANICOS	26
III. 3. 5.- PIGMENTOS LEUCOANTOCIANICOS	26

III. 3. 6.- LACTONAS PENTAGONALES INSATURADAS.....	26
III. 3. 7.- DERIVADOS QUINONICOS.....	27
III. 3. 8.- SUSTANCIAS NITROGENADAS.....	27
III. 3. 9.- FLAVONOIDES.....	28
III. 3.10.- TANINOS.....	29
III. 3.11.- GLUCIDOS.....	30
III. 3.12.- RESINAS.....	31
III. 3.13.- SAPONINAS.....	32
III. 3.14.- RESULTADOS.....	33
III. 3.15.- DISCUSION DE RESULTADOS.....	35
III. 4.- <u>ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIUL-</u> <u>CEROSA</u>	36
III. 4. 1.- ACTIVIDAD ANTIULCEROSA AGUDA INDUCIDA POR INMOVILIZACION Y FRIO.....	36
III. 4. 1. 1.- <u>Descripción de la técnica</u>	37
III. 4. 1. 2.- <u>Desarrollo de la experiencia</u> ...	38

III. 4. 1. 3.- <u>Resultados</u>	40
III. 4. 1. 4.- <u>Discusión de resultados</u>	43
III. 5.- <u>ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DEL EXTRACTO METANO-</u> <u>LICO</u>	45
III. 5. 1.- DOSIS LETAL 50	45
III. 5. 1. 1.- <u>Descripción de la técnica</u>	45
III. 5. 1. 2.- <u>Desarrollo de la experiencia</u>	46
III. 5. 1. 3.- <u>Resultados</u>	48
III. 5. 2.- CAJA DE METABOLISMO.....	52
III. 5. 2. 1.- <u>Desarrollo de la experiencia</u>	52
III. 5. 2. 2.- <u>Resultados</u>	53
III. 5. 3.- DISCUSION DE RESULTADOS.....	55
III. 6.- <u>EXTRACCION DE COMPUESTOS POLIFENOLICOS</u>	56
III. 6. 1.- TECNICA DE EXTRACCION.....	56
III. 6. 2.- ESTUDIO POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL....	58

III. 6. 2. 1.- <u>Resultados</u>	58
III. 6. 2. 2.- <u>Discusión de resultados</u>	67
III. 6. 3.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA QUERCETINA.....	68
III. 6. 3. 1.- <u>Cromatografía preparativa</u>	68
III. 6. 3. 2.- <u>Espectrofotometría UV</u>	68
III. 6. 3. 3.- <u>Resultados</u>	69
III. 6. 3. 4.- <u>Discusión de resultados</u>	71
III. 7.- <u>ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE LOS EXTRACTOS POLIFENOLICOS</u>	73
III. 7. 1.- DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA.....	73
III. 7. 2.- RESULTADOS	74
III. 7. 3.- DISCUSION DE RESULTADOS	77
III. 8.- <u>ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DEL EXTRACTO ETereo Y DEL PRINCIPIO AISLADO (QUERCETINA)</u>	78
III. 8. 1.- ULCERA GASTRICA AGUDA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO.....	78

III. 8. 1. 1.- <u>Descripción de la técnica</u>	78
III. 8. 1. 2.- <u>Desarrollo de la experiencia</u>	78
III. 8. 1. 3.- <u>Resultados</u>	80
III. 8. 1. 4.- <u>Discusión de resultados</u>	83
III. 8. 2.- ULCERA GASTRICA CRONICA INDUCIDA POR ACIDO ACETICO.....	84
III. 8. 2. 1.- <u>Descripción de la técnica</u>	84
III. 8. 2. 2.- <u>Desarrollo de la experiencia</u>	85
III. 8. 2. 3.- <u>Resultados</u>	86
III. 8. 2. 4.- <u>Discusión de resultados</u>	89
IV - CONCLUSIONES	90
V - BIBLIOGRAFIA	93

I - OBJETO

La terapia con plantas medicinales tiene un - amplio campo de acción. En la actualidad los productos vegetales no constituyen un sustituto del medicamento - de síntesis sino un complemento al mismo, permitiendo una disminución favorable de su empleo abusivo. Así el "remedio natural" constituye una aportación eficaz a la terapéutica.

El papel de las sustancias de origen vegetal en las enfermedades graves es, fundamentalmente, complementario o de mantenimiento. En las afecciones benignas o crónicas del aparato digestivo, respiratorio, genitourinario y en dermatología tienen muchas posibilidades y - pueden sustituir a otros medicamentos.

Dittrichia viscosa (L) W. Greuter, es una planta de amplia distribución en Andalucía y otras regiones mediterráneas, que ha sido utilizada popularmente en el tratamiento de las alteraciones gástricas. Esta circunstancía es la que nos llevó a iniciar el estudio de la - actividad antiulcerosa gástrica de un Extracto acuoso - frente a distintos modelos de úlcera experimental aguda y crónica, obteniéndose unos valores altamente significativos, en los índices y porcentajes de curación de - las lesiones.

Así pues, hemos creído interesante continuar en esta línea, a fin de verificar la acción protectora

y cicatrizante gástrica de esta especie, centrándonos - en el estudio de diversos Extractos, con objeto de comprobar cual de ellos es el más activo.

De esta forma, posteriores trabajos los podemos orientar hacia el estudio fitoquímico que nos permita dilucidar la estructura de los principios responsables de esta acción.

II- REVISION

BIBLIOGRAFICA

II. 1.- INTERES DE LA FITOTERAPIA GASTRODUODENAL

La aplicación de la Fitoterapia en las afecciones gastroduodenales se remonta al empleo de la raíz de regalíz. Ya Teofrasto, en el siglo III a. de C, recomendaba la "raíz dulce" contra las úlceras. También Dioscórides (siglo I d. de C.) aconsejó el regalíz contra los ardores de estómago. Más tarde los médicos árabes lo prescribieron en asociación con purgantes para aumentar la tolerancia a éstos. En los albores del siglo XIX se recuerda que Napoleón, que sufría del estómago, empleaba un remedio secreto a base de regalíz por recomendación de un curandero.

A partir de la introducción de la Fitoterapia en este tipo de dolencias, son numerosas las plantas descritas con este fin.

A continuación exponemos una relación de las especies más utilizadas en las afecciones gastroduodenales, siguiendo la clasificación botánica actualizada por CRONQUIST (1):

División MAGNOLIOPHYTA

Clase MAGNOLIOPSIDA

I.- Subclase HAMAMELIDES

I. 1.- Orden URTICALES

I. 1. 1.- Familia Moráceas:

Humulus lupulus L. (Lúpulo). En la Edad Media se utilizó contra el estreñimiento, hoy también se usa en caso de molestias gástricas la infusión con la inflorescencia, en forma de extracto fluido y tintura en caso de exceso de jugo gástrico (2) (3)(4).

I. 1. 2.- Familia Urticáceas:

Urtica dioica L. (Ortiga).- Su empleo como remedio halló fundamento científico -- cuando, en 1.924, se descubrió en la ortiga la existencia de secretina, que ejerce un óptimo efecto sobre el estómago y el páncreas (2)(3)(4)(5).

II.- Subclase CARIOFILIDAS

II. 1.- Orden POLYGONALES

II. 1. 1.- Familia Poligonáceas:

Poligonum bistorta L. (Bistorta). Muy útil en enfermedades inflamatorias. Se usa el cocimiento del rizoma en trastornos gastrointestinales y diarreas. Su tisana es un tónico excelente (3)(4)(6)(7).

Poligonum aviculare L. (Centidonia). Se usa la planta entera en forma de polvos, infusión, tintura y extracto fluido. Posee una ligera acción laxante por la presencia de antraquinonas y también capacidad hemostática sobre las úlceras de estómago (5)(6).

III.- Subclase DILENIDAS

III. 1.- Orden MALVALES

III. 1. 1.- Familia Malváceas:

Althaea officinalis L. (Malvavisco). La planta, por su alto contenido en mucílagos,

actúa favorablemente sobre las mucosas del árbol respiratorio, del estómago y del tracto intestinal cuando están irritadas por causas mecánicas o inflamatorias. Se emplea preparando un sirupo, a partes iguales de flores y agua caliente, y se toma una cucharada cada dos horas para la irritación del estómago y del intestino (2)(4).

III. 2.- Orden CAPARALES

III. 2. 1.- Familia Crucíferas:

Brassica olerácea var. capitata L. (Col). La medicina popular alardea de haber descubierto las propiedades curativas de la col, especialmente del zumo utilizado en las úlceras de estómago y duodeno. Estudios clínicos posteriores realizados en EE. UU. confirmaron esta teoría en 1.956, que también fué ratificada por clínicos suizos(8).

Brassica nigra L. (Pimienta negra). Las semillas de mostaza se administran en pequeñas dosis en caso de trastornos gastrointestinales, estimulan el apetito, facilitan la deposición de las heces y coadyuvan en la curación de la úlcera péptica. Usadas como condimento facilitan la digestión (8)(9).

Nasturtium officinale Robert Brown (Berro).

El berro se ha usado como remedio casero, - se prefiere en ensalada o bien en tintura azucarada. Está indicado en estreñimientos, dolencias de estómago e intestino. Produce rápida cicatrización de úlceras escorbúti- cas colocando sobre ellas cataplasmas de - hojas y tallos triturados (7)(8)(10).

IV.- Subclase ROSIDAS

IV. 1.- Orden ROSALES

IV. 1. 1.- Familia Rosáceas:

Agrimonia eupatoria L. (Agrimonia). Aunque su principal virtud es la astringente, tam- bien se usa en la úlceras varicosas y, fi- nalmente, su "infuso teiforme" constituye una bebida recomendada en los enfermos a-- fectos de trastornos digestivos con diarrea, disentería y catarro intestinal (4)(10).

Alchemilla alpina L. (Alquimila alpina). Se usa contra el dolor de vientre e inflamacio- nes intestinales, en forma de tisana (10).

Fragaria vesca L. (Fresa). Las raíces y - las hojas se utilizan por su contenido en taninos, para tratar las alteraciones gastroduodenales. También se emplea en los - trastornos gastrointestinales el zumo del fruto (4)(8).

Potentilla anserina L. (Argentina). De - gran utilidad en los dolores espasmódicos de estómago e intestinos. Muy usada como - remedio casero en forma de té para el dolor menstrual. Se emplea también en veterinaria cuando los rumiantes padecen alteraciones gástricas. La raíz, desecada al sol, se - prepara en infusión (3)(7)(8).

IV. 2.- Orden FABALES

IV. 2. 1.- Familia Fabáceas:

Glycyrrhiza glabra L. (Regalíz). La medicina holandesa confirmó el efecto preventivo y curativo del regalíz frente a la úlcera gástrica provocada en animales. En los años cincuenta fueron confirmadas estas propiedades en Francia por Vicent y Pointet-Guillot, los cuales probaron las propiedades antiespasmódicas y el efecto proptector - frente a la úlcera gástrica, que se deben

en gran parte a los flavonoides. El modo de empleo es infusión, extracto seco, extracto fluido y polvos de la raíz del tercer año (2)(3)(4)(5)(7)(10)(11)(12)(13)(14).

Trigonella foenum-graccum L. (Alholva). Está recomendada para despertar el apetito, facilita la digestión de los alimentos y tonifica el estómago y el intestino. Se toma en infusión, que se prepara a partir de simientes de alholva (3)(7).

IV. 3.- Orden GERANIALES

IV. 3. 1.- Familia Geraniáceas:

Geranium robertianum L. (Hierba de San Roberto). Además de su uso para gargarismos y contra heridas y llagas, según Oliveira Feijarol, durante éstos últimos años, en Portugal se ha empleado mucho para tratar las úlceras de estómago. Antiguamente se le atribuía virtud estíptica y desecativa y se utilizaba para "encorar las llagas viejas y soldar las heridas frescas" (10).

IV. 4.- Orden APIALES

IV. 4. 1.- Familia Umbelíferas

Petroselinum crispum Mill. (Peregil cultivado). Se usa en las dolencias de estómago: acidez, flatulencia y gastralgia. Con las semillas se prepara una infusión que se administra al término de cada comida. (6) (8).

V.- Subclase ASTERIDAS

V.1.- Orden SOLANALES

V. 1. 1.- Familia Solanáceas:

Atropa Belladonna L. (Belladonna). Es espasmolítica, midriática y sedativa. Inhibe las secreciones glandulares, por lo que se ha usado en forma de preparados (extracto o tintura de las hojas) para el tratamiento de los trastornos gástricos o intestinales que van acompañados de convulsiones, siempre bajo prescripción médica, ya que presenta peligro de intoxicación. (3)(4)(8)(10)(12).

Solanum tuberosum L. (Patata) Se usa - -
la hoja por sus propiedades antiinflamato-
rias, en forma de jugo, 2 o 3 cucharadas -
al día en la úlcera gástrica y la hipera--
ciduria de estómago. Tambien el zumo de --
los tubérculos es un antiácido estomacal.
(3)(4)(10).

V. 2.- Orden LAMIALES

V. 2. 1.- Familia Boragináceas:

Symphytum officinale L. (Consuelda mayor).
Segun Leclerc, la única preparación eficaz
de la raíz de consuelda es la infusión con-
centrada, que tiene aplicación en el trata-
miento de la úlcera péptica. En caso de he-
ridas y llagas que tardan en cicatrizar, su
uso tópico estimula la formación de tejido
de granulación.(2)(3)(10).

V. 2. 2.- Familia Labiadas:

Lavandula spica L. (Espliego). Se usan las
sumidades floridas del espliego como diges-
tivo, antiespasmódico y sedante en forma de
infusión. Maceradas en aguardiente detergen
y sanean las úlceras crónicas, favoreciendo

su cicatrización.(7)(10).

Melisa officinalis L. (Torongil). Las hojas y sumidades floridas se emplean como antiespasmódico, tónico y digestivo, en forma de tisana.(3)(7)(10).

Salvia officinalis L. (Salvia). Como representante de las labiadas parece ser la más eficaz contra los desórdenes derivados de la atonía del aparato digestivo, dispepsia y gastralgia. Se administra la infusión de la sumidad foliar. (4)(7)(10).

Thymus serpyllum L. (Serpol). Posee las propiedades estomáquicas, estimulantes, emenagogas y antiespasmódicas de las demás labiadas, pero parece que actúa especialmente sobre el aparato digestivo y los órganos de la respiración. Se emplea, con éxito, sobre todo en las dolencias gastrointestinales y úlceras de estómago. Se administra la infusión de la sumidad florida. (2)(4)(7).

V. 3.- Orden PLANTAGINALES

V. 3. 1.- Familia Plantagináceas:

Plantago lanceolata L. (Llantén menor). Es estomáquica y vulneraria, además de poseer otras propiedades. Se usa un extracto fluido de la sumidad en caso de inflamación del tubo digestivo. (2)(3)(4).

V. 4.- Orden ESCROFULARIALES

V. 4. 1.- Familia Oleáceas:

Olea europea L. (Olivo). El aceite recogido de la expresión del fruto se emplea en las afecciones del estómago, úlcera gástrica, y del intestino. (4)(5).

V. 5.- Orden ASTERALES

V. 5. 1.- Familia Asteráceas:

Calendula officinalis L. (Maravilla). Sus flores tienen propiedades digestivas, respiratorias y sobre el sistema nervioso central. La infusión es eficaz en caso de atonía de los órganos digestivos. Asociada --

con ortiga, verónica y celidonia mayor, es activa frente a las úlceras estomacales (3) (7)(8)(14).

Hypericum perforatum L. (Hipérico). Quer, en su "Flora española", dice: "su principal uso es para nudificar y consolidar las heridas y ulceraciones, sean internas o externas". La infusión de las sumidades floridas, una taza antes de comer, fría y sin azúcar, facilita la digestión y evita el malestar gástrico. (4)(7)(9)(14).

Matricaria chamomilla L. (Manzanilla). La manzanilla, en forma de infusión, proporciona un alivio rápido en las algias estomacales. En los casos de gastritis crónica e incluso de úlcera de estómago, resulta igualmente recomendable la cura con manzanilla. (2)(8).

Inula helenium L. (Helenio). Dioscórides la citaba como confortativa del estómago; diecisiete siglos después, en "Flora española", Quer dice: "La raíz de esta planta, esté seca o fresca, es de mucha utilidad para el uso de la medicina y un potentísimo pectoral y estomacal". Se prescribe en

forma de infusión y vino de helenio. (3)(10).

Bidens aurea L. (Té). Los extractos acuosos de las sumidades floridas han sido utilizados tradicionalmente en el tratamiento de las afecciones digestivas, como epéptico y antiulceroso, habiéndose demostrado experimentalmente esta actividad, - (15)(16).

Clase LILIOPSIDA

I.- Subclase ARECIDAS

I. 1.- Orden ARALES

I. 1. 1.- Familia Aráceas:

Arum maculatum L. (Aro). Se usa la tintura de las raíces tuberosas, que está indicada en los catarros de las vías respiratorias, en gastritis y también en los eritemas sangrantés. (3).

II.- Subclase COMMELINIDAS

II. 1.- Orden CYPERALES

II. 1. 1.- Familia Gramíneas:

Oryza sativa L. (Arroz). Se usa el agua de arroz por la excepcional cualidad de tonificar la mucosa del tubo digestivo, con uti--
lidad en las irritaciones intestinales, en la úlcera gastroduodenal, enteritis y entero
ocolitis. Se le utiliza también, como enema, en las afecciones intestinales inflamatorias. (4)(6)(7).

III - PARTE

EXPERIMENTAL

III. 1.- MUESTRAS: RECOLECCION Y PREPARACION

Las muestras se recolectaron en los arcenes de la carretera Sevilla-San Juan de Aznalfarache, en la época de floración (octubre) de 1.986.

Las partes utilizadas fueron las sumidades floridas. En general, se prescindió, a todos los efectos, de los tallos mas gruesos y lignificados.

La desecación se llevó a cabo al aire libre y a la sombra, sobre superficie seca, a una temperatura entre 22° C - 24° C en nuestro Laboratorio; posteriormente se conservó el lugar seco, oscuro y cerrado.

III. 2.- EXTRACCION

Se ha procedido a la obtención de los extractos mediante el sistema Soxhlet, operando con tres disolventes de polaridad creciente.

Como disolvente inicial utilizamos cloroformo. Mantuvimos la droga en maceración 24 h., realizando posteriormente la extracción hasta agotamiento. El extracto obtenido se concentró a sequedad en rota-vapor

dando un residuo de color verde-negruczo y apariencia -
siruposa.

El marco de la droga, agotada con cloroformo, una vez evaporado todo resto de dicho disolvente, se sometió a una extracción con metanol, siguiendo la técnica expuesta anteriormente. El residuo seco obtenido fué de color verde y aspecto pulverulento.

Sobre el marco resultante, una vez seco, se -
llevó a cabo, en las mismas condiciones, una extracción con agua. El extracto acuoso se concentró igualmente -
hasta residuo seco, siendo éste de un color pardo.

En el siguiente esquema recogemos, de forma resumida, el proceso extractivo: Fig. 1

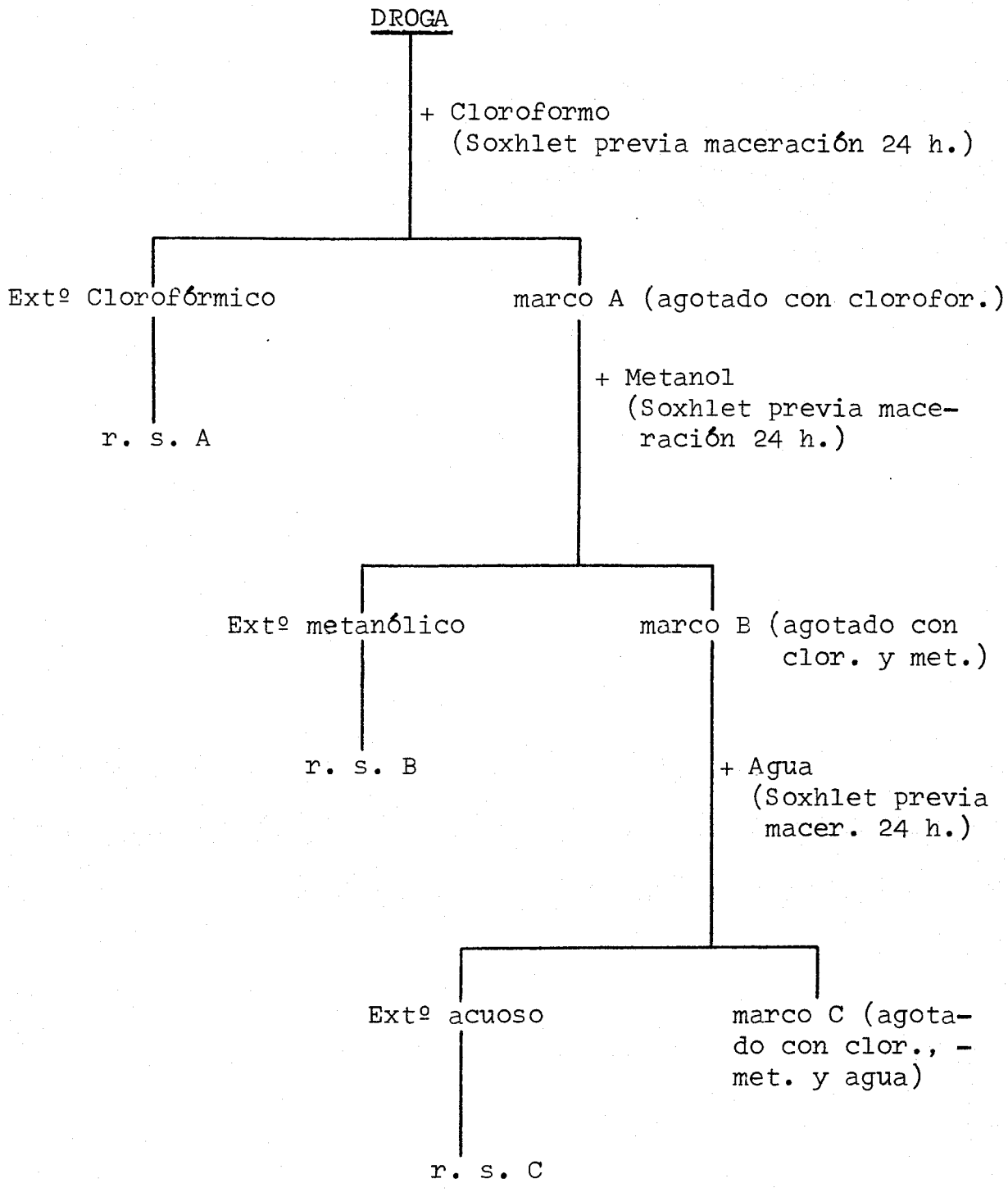


Fig. 1

III. 3.- ENSAYOS GENERALES CUALITATIVOS

Hemos procedido a investigar la presencia de diversos grupos de compuestos, mediante un sencillo - "screening fitoquímico".

III. 3. 1.- CUERPOS GRASOS

Reactivo: R. de Serger: Se prepara extemporáneamente di solviendo 0,1 g de molibdato sódico finamente pulverizado, en 10 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Técnica: Se adiciona 1 ml de reactivo a los extractos, se deja reposar y se forman dos capas, apareciendo una coloración gris-azulada en la capa inferior, en el caso de que existan grasas de origen vegetal. (17).

III. 3. 2.- PIGMENTOS CAROTENOIDES

A) Reactivo: R. de Carr y Price: Acido sulfúrico concentrado.

Técnica: Por adición del reactivo a los extractos correspondientes, se origina una coloración azul, en presencia de carotenoides.(13)(18).

B) Reactivo: Solución clorofórmica saturada de tricloruro de antimonio.

Técnica: A los extractos correspondientes se les añaden unas gotas del reactivo; los pigmentos carotenoides dan una coloración azul-violeta fugaz. (13).

III. 3. 3.- ESTEROLES Y TRITERPENOS

A) Reacción de Liebermann-Burchard

Reactivo: Anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado.

Técnica: Se le adiciona a los extractos 1/5 de volumen de anhídrido acético y, posteriormente, sulfúrico concentrado gota a gota. Se obtiene coloración violeta que pasa a azul y, por último, a verde si el ensayo es positivo. (13) (19).

Modificación a)

Reactivo: Anhídrido acético, cloroformo y ácido sulfúrico concentrado.

Técnica: Se mezcla 1 ml de anhídrido acético con -

1 ml de cloroformo, se enfrían a 0° C y se les añade una gota de sulfúrico concentrado. El reactivo así preparado es adicionado a los extractos, apareciendo coloración azul que pasa por distintas tonalidades: verde, rojo anaranjado.....etc. si la prueba es positiva.(20).

Modificación b)

Reactivo: Anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado.

Técnica: Se evapora, en vidrio de reloj, 1 ml del extracto, disolviendo el residuo en dos gotas de anhídrido acético. La adición de sulfúrico concentrado desarrolla, en presencia de compuestos esterólicicos o terpénicos, una coloración malva virando a verde. (20)(21).

B) Reacción de Salkowski

Reactivo: Acido sulfúrico concentrado.

Técnica: Se le adiciona a 1 ml del extracto 1 ml de sulfúrico concentrado; al agitarse se origina una coloración amarilla o rojiza en caso positivo.(20).

III. 3. 4.- PIGMENTOS ANTOCIANICOS

Reactivo: Acido clorhídrico y alcohol isoamílico.

Técnica: Se adiciona ácido clorhídrico a los extractos y se agitan con alcohol isoamílico, apareciendo una coloración rosa-anaranjada si el resultado es positivo. (20)(22).

III. 3. 5.- PIGMENTOS LEUCOANTOCIANICOS

Reactivo: Alcohol de 96°/ácido clorhídrico 1:1.

Técnica: Los extractos, se mezclan con el reactivo, se llevan a B.M. hirviente. Los pigmentos leucoantociánicos (incoloros) pasan a antociánicos coloreados (rojo o violeta) en contacto con el aire. (20)(22).

III. 3. 6.- LACTONAS PENTAGONALES INSATURADAS

Reactivo: R. de Baljet: Acido pícrico al 1 %/hidróxido sódico al 10 % 19:1.

Técnica: Al añadir a 6 ml de cada extracto 4 ml del reactivo, aparecerá una coloración naranja

que pasa a rojo oscuro si la reacción es positiva. (20).

III. 3. 7.- DERIVADOS QUINONICOS

A) Quinonas libres

Reactivo: Hidróxido amónico al 50 % .

Técnica: Se adiciona el reactivo a los extractos, tras agitación y posterior reposo, en caso de existir quinonas libres, aparece una coloración rosa, roja o violeta. (21)(22).

B) Quinonas combinadas

Reactivo: Acido sulfúrico 0,1 N, hidróxido amónico al 40 % y benceno.

Técnica: A los extractos les añadimos unas gotas de sulfúrico y se lleva a ebullición; una vez enfriados se agitan con benceno. Separada la capa orgánica debe colorearse de rojo al tratar la con amoniaco si la reacción es positiva.(21)(22).

III. 3. 8.- SUSTANCIAS NITROGENADAS

Reactivo: R. de Mayer: Solución mercurica de yoduro

potásico (precipitado blanco-amarillento).

R. de Dragendorff: Solución nítrica de bismuto y yoduro potásico (precipitado anaranjado).

R. de Bouchardat: Solución de yodo en yoduro potásico (precipitado castaño oscuro).

R. de Hager: Solución saturada de ácido pícrico (precipitado amarillo).

Técnica: Sobre las distintas fracciones de cada uno de los extractos se añaden, gota a gota, los reactivos, apareciendo un precipitado característico indicativo de la presencia de sustancias nitrogenadas. (25).

III. 3. 9.- FLAVONOIDES

Reacción de la cianidina

Reactivo: Acido clorhídrico al 10 % y cinta de magnesio.

Técnica: Se adiciona a los extractos unas gotas de ácido clorhídrico y un trozo de cinta de magnesio. En caso de que existan flavonoides, - aparecerá una coloración rosa, que lentamente pasa a roja, naranja o violeta según la naturaleza del flavonoide.(20)(23).

III. 3. 10.- TANINOS

Taninos catéquicos

A) Reactivo: Solución de tricloruro férrico al 10 %.

Técnica: Se adiciona gota a gota el reactivo a los extractos originándose coloración verde en caso positivo. (24).

B) Reactivo: Agua de bromo y ácido acético.

Técnica: Al añadir a los extractos ácido acético glacial gota a gota y agua de bromo, los taninos catéquicos precipitan rápidamente. (24).

C) Reacción de Stiasny

Reactivo: Acido clorhídrico concentrado y solución acuosa de formaldehído al 40 %.

Técnica: Se añaden a los extractos unas gotas de ácido clorhídrico y 1 ml de solución de formaldehído, hirviéndose durante varios minutos los taninos catéquicos precipitan. (24).

Taninos pirogálicos

Reactivo: Tricloruro férrico al 10 % .

Técnica: Los extractos utilizados en la reacción de - investigación de taninos catéquicos (R. Stiasny), se filtran y, en el filtrado, se ensaya la reacción del tricloruro férrico. En caso - de existir taninos pirogálicos aparece una coloración azul. (24).

III. 3. 11.- GLUCIDOS

A) Reacción de Keller-Kelliani modificada por Euw-Reichstein

Reactivo: Solución I: Solución de sulfato férrico al 5 % / ácido acético glacial 1:99.

Solución II: Solución de sulfato férrico al 5 % / ácido sulfúrico concentrado 1:99.

Técnica: Se añade a los extractos unas gotas de la - solución I y se agita. A continuación se añaden otras tantas gotas de la solución II. La aparición de una coloración azul o azul-verdosa al cabo de 5-10 minutos indica la presen--cia de sustancias glucídicas. (20)(24).

B) Reacción de Molisch

Reactivo: Solución etanólica al 1 % de α -naftol y ácido sulfúrico concentrado.

Técnica: Se adiciona a los extractos solución de α -naftol y después se deja resbalar por las paredes 1 ml de sulfúrico. Si la reacción es positiva aparece un anillo en la interfase.(20)(26).

C) Reacción de Fehling

Reactivo: Solución I: Sol. de sulfato de cobre al --
35 %.

Solución II: Sol. de tartrato potásico al -
15 %.

Técnica: Se adiciona el reactivo a los extractos, calentando al B.M. durante 2 m. La aparición de un precipitado rojo indica resultado positivo. (13)(27).

III. 3. 12.- RESINAS

A) Reactivo: Agua.

Técnica: Al extracto se le añade agua. Si aparece un

precipitado turbio blanquecino indica resultado positivo. (13).

B) Reactivo: Solución de acetato de cobre.

Técnica: Se añade al extracto el reactivo, produciéndose una coloración verde esmeralda característica, si existen resinas. (13).

III. 3. 13.- SAPONINAS

A) Indice afrométrico

Reactivo: Acido clorhídrico concentrado.

Técnica: Dividimos en dos partes cada extracto; a la fracción I se le adicionan unas gotas de clorhídrico concentrado y se hierve durante 15 m. Ambas fracciones (I y II) se agitan por separado observando la cantidad de espuma persistente en cada una de ellas. (24).

B) Reacción de Rosenthaler

Reactivo: Vainilla alcohólica al 1 % y ácido sulfúrico concentrado.

Técnica: Se añaden a las fracciones de los extractos unas gotas de vainilla alcohólica y 1 o 2 gotas de sulfúrico concentrado. Aparece una coloración característica de estos compuestos en caso de resultado positivo. (20)(13).

III. 3. 14.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos, para cada muestra, figuran en la tabla I.

La intensidad de los resultados de las reacciones ensayadas se expresan de la siguiente forma:

Reacción fuertemente positiva	+++
Reacción positiva	++
Reacción débilmente positiva	+
Reacción negativa	-

RESULTADOS DEL SCREENING FITOQUIMICO

<u>Grupos químicos</u>	<u>Extº clorof.</u>	<u>Extº met.</u>	<u>Extº acuoso</u>
Cuerpos grasos	++	-	-
Pigm. carotenoides	+	-	-
Esterol. y triterpen.	++	-	-
Pigm. antociánicos	-	-	-
Pigm. leucoantocián.	-	-	-
Lactonas pent. insat.	+++	++	-
Quinonas libres	-	-	-
Quinonas combinadas	-	-	-
Sust. nitrogenadas	++	+	-
Flavonoides	+++	+++	-
Taninos catéquicos	-	++	++
Taninos pirogálicos	-	-	-
Glúcidos	-	-	++
Resinas	-	++	-
Saponinas	-	-	++

TABLA I

III. 3. 15.- DISCUSION DE RESULTADOS

El análisis cualitativo nos ha puesto de manifiesto los diferentes grupos fitoquímicos presentes en los extractos ensayados.

En el extracto clorofórmico hemos detectado lactonas y flavonoides mayoritariamente; cantidades - apreciables de cuerpos grasos, sustancias nitrogenadas, esteroides, triterpenos y trazas de pigmentos carotenoides.

El extracto metanólico ha resultado ser el más rico en principios polifenólicos: taninos y flavonoides, así como en resinas; también hemos observado - la presencia de lactonas y sustancias nitrogenadas.

La escasez de principios activos contenidos en el extracto acuoso es significativamente menor debido al agotamiento al que ha sido sometida la droga con los disolventes anteriormente utilizados. Únicamente encontramos en este extracto principios solubles en agua, glúcidos y saponinas, y también algunas sustancias tánicas.

III. 4.- ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA

III. 4. 1.- ACTIVIDAD ANTIULCEROSA AGUDA INDUCIDA POR INMOVILIZACIÓN Y FRÍO

El estudio preliminar de la actividad antiulcerosa gástrica de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de D. viscosa (L) W. Greuter, lo hemos iniciado siguiendo el modelo experimental de úlcera gástrica aguda, en el que se induce la lesión gástrica, habiendo administrado previamente el fármaco que va a prevenir dicha lesión.

Se han descrito diferentes métodos que producen la erosión de la mucosa gástrica, tales como la administración de agentes ulcógenos (28)(29)(30)(31)(32), las lesiones provocadas por stress(33)(34)(35), por ligadura de píloro (36) o por distensión del estómago con jugo gástrico artificial (37).

En nuestras experiencias hemos reproducido el método de SENAY y LEVINE (38) con el que se induce la ulceración gástrica aguda, utilizando dos situaciones estresantes: la inmovilización y el frío.

La ventaja de ésta técnica es, por una parte, una considerable disminución del tiempo de producción -

de las úlceras (3 h.), y, por otra parte, una gran uniformidad de las lesiones obtenidas y una fácil valoración de éstas, ya que se consiguen úlceras lineales.

III. 4. 1. 1.- Descripción de la técnica

Los animales de experimentación, ratas, se sometieron a ayuno 24 h. antes de la experiencia; tras este período se les administran las dosis correspondientes del fármaco a ensayar, procediendo, acto seguido, a su inmovilización.

Para ello se introduce el animal en unos cepos cilíndricos de unos 25-30 cm de longitud y 4-5 cm de diámetro, que se cierran por sus extremos para evitar la fuga.

Los animales así preparados, son colocados en cámara frigorífica a una temperatura de 3-5° C durante 3 horas.

Transcurrido este tiempo se sacrifican los animales, se les extrae el estómago, que se abre por su curvatura menor y se procede a contabilizar las úlceras producidas.

III. 4. 1. 2.- Desarrollo de la experiencia

Se han utilizado ratas de raza Wistar, dispuestas en lotes mixtos, que permanecieron en ayunas 24 h. - antes de la experiencia, permitiéndoles el libre acceso al agua.

Para obtener resultados aceptables, es imprescindible conseguir un vaciado total de los estómagos, - por lo que los animales se colocan en jaulas provistas de una rejilla metálica de una altura de 2 cm sobre el fondo, con lo que se aislan de sus defecaciones, evitando así la coprofagia.

Los animales así preparados, recibieron 30 - minutos antes del ensayo las dosis correspondientes de los distintos extractos, comprobándose los efectos producidos frente a un lote de referencia tratado con 100 mg Ranitidina / Kg de animal y frente a un lote blanco (tratado con solución fisiológica).

Las dosis ensayadas fueron:

Lote Patron:	100 mg Ranitidina/Kg animal
Lote Problema ₁ :	500 mg r.s. Extº clorofórm./Kg animal
Lote Problema ₂ :	500 mg r.s. Extº metanólico/Kg animal

Lote Problema₃: 250 mg r.s. Extº metanólico/Kg animal

Lote Problema₄: 500 mg r.s. Extº acuoso/Kg animal

La administración se hace por vía oral, a razón de un volumen constante de 1 ml / 100 g de animal.

La clasificación de las lesiones obtenidas se hizo siguiendo la escala utilizada por CIOLI y cols.(39):

0.- Ausencia de lesión, vasodilatación o hasta tres lesiones puntiformes.

1.- Mas de tres lesiones puntiformes.

2.- De una a cinco úlceras pequeñas 2 mm

3.- Mas de cinco úlceras pequeñas 2 mm

4.- Una o mas úlceras gigantes.

Para determinar el nivel de significación de los resultados obtenidos se aplicó el test de Mann-Whitney (40).

$$C = (n_1 \cdot n_2) + n_2 \frac{(n_2 + 1)}{2} - \bar{x}_2$$

III. 4. 1. 3.- Resultados

La tabla II recoge los resultados obtenidos, que reflejan el número de lesiones gástricas en relación a la escala de CIOLI, el porcentaje de estómagos ulcerados por lote y la superficie total de mucosa lesionada en mm².

En la figura 2 se representa, en forma de histograma, la superficie de mucosa gástrica ulcerada en cada uno de los grupos.

ÚLCERA GÁSTRICA INDUCIDA POR INMOVILIZACIÓN Y FRÍO

Lotes	nº estóm. /escala	% de ulcer.	Indice de ulc. (mm ²)
Lote control	2/2 3/3 4/4	100 %	3,23 ± 0,56
100 mg Ranitidina / Kg	5/0 2/2	28 %	0,18 ± 0,05 **
500 mg r.s.Ext.clorof/Kg	2/0 1/2 2/3 5/4	80 %	3,20 ± 0,78 n. s.
500 mg r.s.Ext.metan/Kg	4/0 3/1 3/2	60 %	0,33 ± 0,06 **
250 mg r.s.Ext.metan/Kg	4/0 2/1 1/2 1/3 2/4	60 %	1,42 ± 0,53 **
500 mg r.s.Ext.acuos/Kg	4/2 2/3 3/4	100 %	2,90 ± 0,51 n. s.

** P < 0,05 * P < 0,01 n.s. - no significativo.

TABLA II

ULCERA GASTRICA INDUCIDA POR INMOVILIZACION Y FRIO

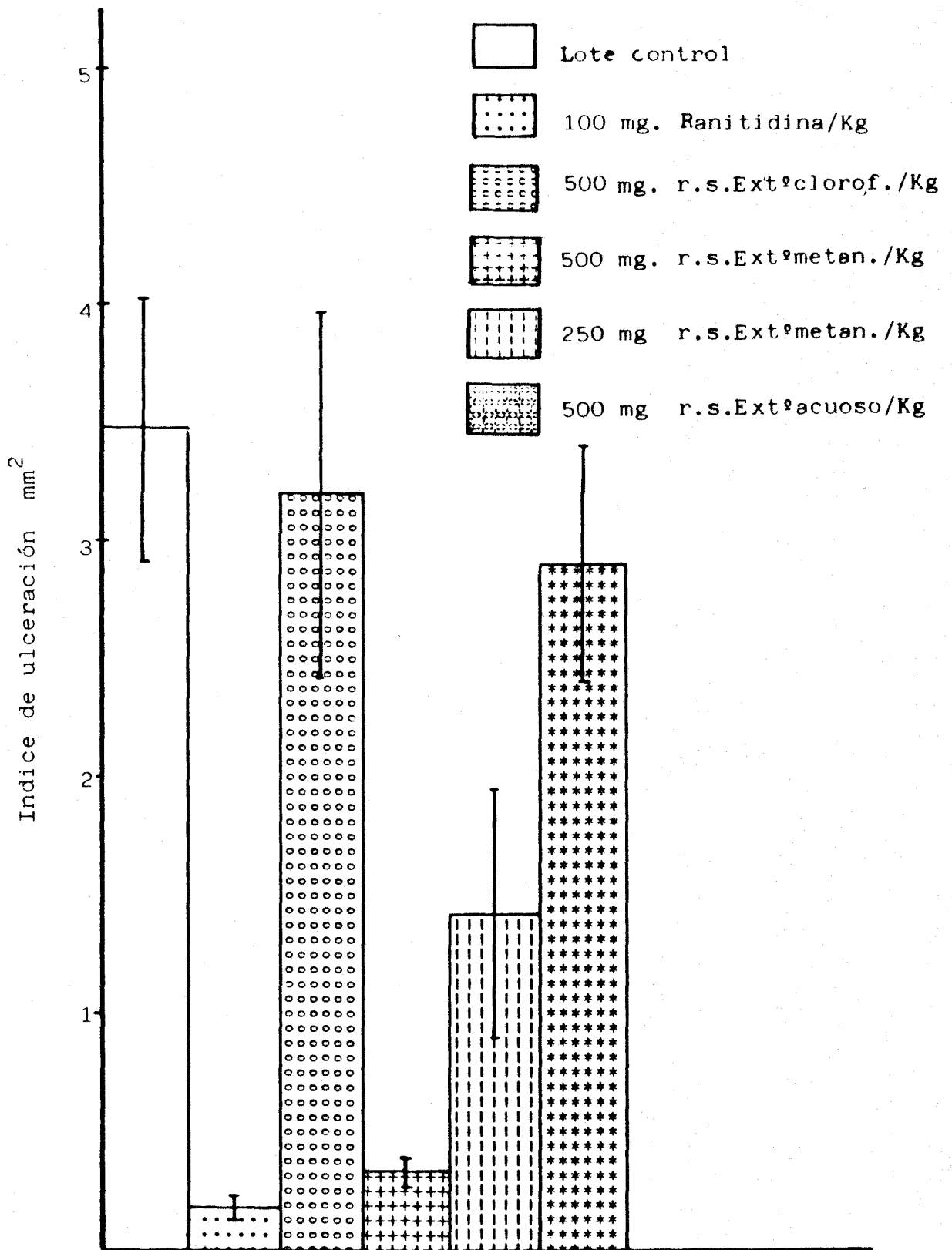


Fig. 2

III. 4. 1. 4.- Discusión de resultados

El estudio preliminar de la actividad antiulcerosa de los diferentes extractos obtenidos a partir de la sumidad florida de D. viscosa L., nos pone de manifiesto una marcada acción antiulcerosa del Extracto metanólico. Con las dos dosis ensayadas de dicho Extracto, 250 y 500 mg. residuo seco / Kg, se obtienen unos valores de índice de ulceración significativamente menores a los del lote control, $0,337 \pm 0,06$ y $1,425 \pm 0,53$ $P < 0,01$, respectivamente.

Por el contrario, los Extractos clorofórmico y acuoso no han mostrado actividad frente al modelo experimental ensayado con la dosis de 500 mg r.s. ext/Kg, por lo que no se administran dosis inferiores.

Aunque parece prematuro deducir la naturaleza de los principios que puedan ser responsables de la actividad antiulcerosa, podemos "a priori" descartar cuerpos grasos, esteroides y triterpenos y, posiblemente, sustancias nitrogenadas, grupos fitoquímicos detectados mediante el screening en el Extracto clorofórmico y que no aparecen en el metanólico, que es el que muestra mayor poder antiulceroso.

El agotamiento previo efectuado en la droga -

(cloroformo y metanol), impide que el Extracto acuoso sea rico en principios, lo que explica la ausencia de su actividad.

III. 5.- ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DEL EXTRACTO METANÓLICO

Dado que los resultados obtenidos en el estudio preliminar de la actividad antiulcerosa de D. viscosa pusieron de manifiesto que el Extracto metanólico era fundamentalmente el portador de esta actividad, centraremos en él nuestros posteriores ensayos, iniciándolos con el estudio de su toxicidad.

III. 5. 1.- DOSIS LETAL 50

La dosis letal media, DL_{50} , es el término en que se expresa la toxicidad aguda de una sustancia, y es aquella capaz de matar la mitad de una población ilimitada de la misma especie y cepa al cabo 48-72 h. de haber sido administrada. Puede obtenerse por interpolación, métodos estadísticos o bien directamente. (41) - (42)(43).

III. 5. 1. 1.- Descripción de la técnica

Para determinar la toxicidad aguda, hemos utilizado la técnica de MILLER y TAINTER (44). Consiste en experimentar sobre distintos lotes de animales, a los -

que se les administran dosis crecientes de la sustancia a ensayar, de tal manera que el porcentaje de mortalidad varíe entre 0-100. Transcurrido el tiempo necesario según la vía de administración elegida, se hará el recuento por dosis de los animales vivos y muertos.

Con los resultados obtenidos se construye una gráfica, representando el porcentaje de mortalidad transformado en probits, en función del logaritmo de la dosis. (45). De esta forma la representación obtenida es una línea recta.

III. 5. 1. 2.- Desarrollo de la experiencia

El ensayo se realizó con ratones Swiss, de 25-30 g de peso, de ambos sexos, que se mantuvieron en ayuno total (agua y comida), 16-18 h. antes de la experiencia.

Las dosis ensayadas fueron las siguientes:

Lote I:	1.000 mg r.s./Kg animal
Lote II:	2.000 mg r.s./Kg animal
Lote III:	3.000 mg r.s./Kg animal
Lote IV:	4.000 mg r.s./Kg animal
Lote V:	5.000 mg r.s./Kg animal
Lote VI:	6.000 mg r.s./Kg animal
Lote VII:	8.000 mg r.s./Kg animal

Se administraron via intraperitoneal, utilizando solución fisiológica como vehículo, a razón de 0,25-0,5 ml disolución / animal.

Los animales fueron sometidos a observación directa, durante las 48 h. siguientes a la administración, para detectar cualquier tipo de sintomatología; transcurrido este tiempo se procedió al recuento de animales -- muertos en cada lote.

Los porcentajes de mortalidad se transforman en probits utilizando para ello las tablas de FISHER y YATES (46), con lo que se hace posible aplicar fácilmente el modelo gráfico de MILLER y TAINTER (44).

Para utilizar los porcentajes 0 y 100, en los que los probits tienden hacia el infinito, se ha empleado la transformación propuesta por BARTLETT (45):

$$\text{Para } 0 \% \text{ de muertos} = \frac{0,5}{n} \times 100$$

$$\text{Para } 100 \% \text{ de muertos} = \frac{n-0,5}{n} \times 100$$

Siendo n el número de animales por dosis.

Una vez transformados los datos en probits, se hace la representación gráfica de estos puntos, llevando a ordenadas los probits calculados y a abscisas los logaritmos de las dosis correspondientes.

La DL₅₀ se obtiene por la lectura directa de la dosis correspondiente al 50 % de animales muertos (probits 5) sobre la recta representada.

Para calcular el error standard se ha utilizado la siguiente expresión (45):

$$E_s \text{ DL}_{50} = \frac{2 S}{\sqrt{2 N'}}$$

Siendo 2 S la diferencia entre la dosis correspondiente al 84 % de mortalidad (probit 6) y la correspondiente al 16 % de mortalidad (probit 4), valores que se obtienen de la lectura directa del gráfico:

$$2 S = \text{DL}_{84 \%} - \text{DL}_{16 \%}$$

N' es el número total de animales que podrían haber mostrado una mortalidad comprendida entre el 93 % y el 7 %.

III. 5. 1. 3.- Resultados

La sintomatología observada al administrar dosis elevadas ha sido: movimientos rápidos seguidos de un estado de laxitud, ojos semicerrados, hasta que sobreviene la muerte, en algunos casos durante la primera hora,

en un estado convulsivo (dosis mas altas), y, en otros, no se produce antes de las 48 horas.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla III y la representación gráfica queda reflejada en la figura 3, en la que se obtiene un valor de la dosis letal 50:

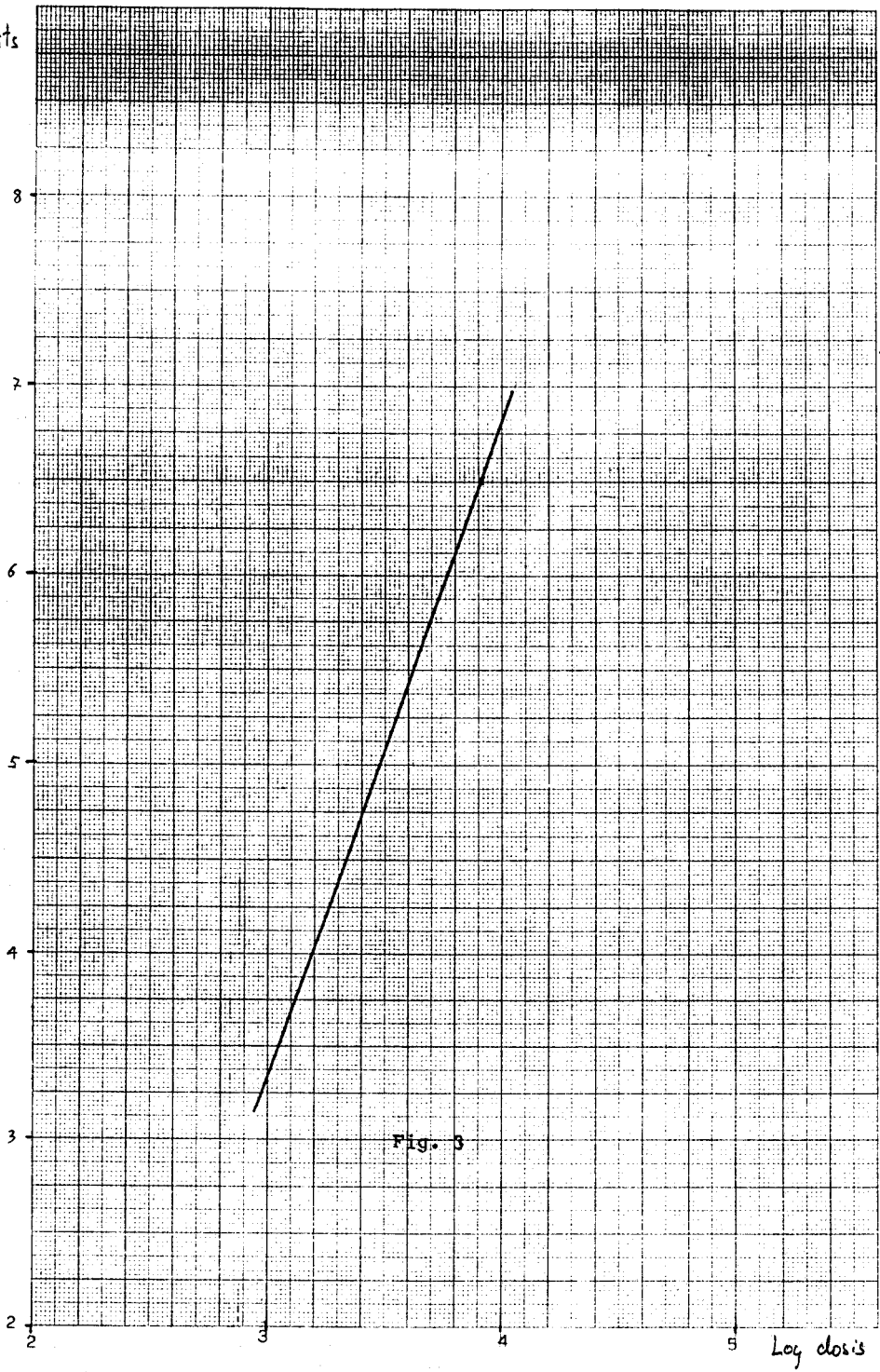
$$DL_{50} = 2,987 \ 542 \text{ mg r.s./Kg animal}$$

TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO METANOLICO

Dosis (mg r. s./Kg)	Log dosis	eq.droga %	% mortalidad	probits
1.000	3,0000	4,17	0	3,36
2.000	3,3010	8,34	30	4,48
3.000	3,4771	12,51	50	5,00
4.000	3,6020	16,68	60	5,25
5.000	3,6989	20,85	70	5,52
6.000	3,7781	25,02	90	6,28
8.000	3,9030	33,36	100	6,64

TABLA III

Probits



III. 5. 2.- CAJA DE METABOLISMO

Con esta experiencia se pretende determinar la influencia que ejerce el Extracto metanólico sobre el metabolismo, de acuerdo con los siguientes parámetros (47):

- Ingestión de alimentos y de agua
- Excreción de orina y heces
- Peso corporal

III. 5. 2. 1.- Desarrollo de la experiencia

Los animales empleados fueron ratas macho, de raza Wistar, de 220-240 g de peso, que se dispusieron - separadamente en cajas de metabolismo, a razón de seis animales por lote. Previamente, se mantuvieron en ayunas 18 h.

Se administraron cotidianamente 500 mg r.s./Kg animal, durante un período de cinco días, vía oral. Paralelamente se utilizó un lote control de animales sin tratar.

Determinamos diariamente el volumen de agua - que bebieron los animales y el de orina excretada; asimismo, se controló su peso, el de los alimentos ingeridos y el de los excrementos.

La significación estadística se calculó aplicando el test de Student (40):

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

III. 5. 2. 2.- Resultados

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla IV.

CAJA DE METABOLISMO

Lotes	P. inicial (g)	P. final (g)	Alimento (g/d)	Agua (ml/d)	E. fecal (g/d)	Orina (ml/d)
Blanco	221,00±6,54	213,00±7,65	9,47± 1,27	25,12±0,88	2,75± 0,32	12,02±0,54
500 mg r.s./Kg	221,00±13,44	227,00±14,88 Δp *	15,12±1,27 **	37,40±5,97 n.s.	4,33± 0,60 *	15,74±3,11 n.s.

(Test Student) ** P < 0,01 * P < 0,05 n.s. no significativo

TABLA IV

III. 5. 3.- DISCUSION DE RESULTADOS

Los valores obtenidos al determinar la DL_{50} del extracto metanólico revelan la ausencia de toxicidad de los principios contenidos en él, ya que la dosis necesaria para provocar la muerte del 50 % de la población es 2.987 mg/Kg animal, equivalente a 12,45 g de droga/Kg animal.

La atoxicidad vuelve a manifestarse al realizar los ensayos posteriores, en los que se determinan una serie de parámetros metabólicos, ya que administramos de forma reiterada dosis de 500 mg r.s./Kg animal - sin que en ningún momento aparezca sintomatología anómala.

Sí se puede constatar, que se produce un aumento de la ingestión de alimento y, como consecuencia, un incremento de peso corporal de los animales tratados, y quizás podamos establecer un paralelismo con estos datos y los obtenidos al determinar el peso de las heces que se encuentra también aumentado.

III. 6.- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

En el "screening" fitoquímico" del extracto metanólico se detectaron mayoritariamente compuestos polifenólicos, por lo que procedemos a su extracción para posteriormente investigar su posible actividad antiulcerosa. (48)(49)(50)(51)

III. 6. 1.- TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

La extracción se realizó siguiendo el método descrito por NETIEN - LEBRETON (52).

El r. s. procedente del extracto metanólico se disolvió en agua hirviendo, obteniéndose un extracto acuoso, que se lavó con éter etílico en ampolla de decantación hasta agotamiento. El extracto etéreo así obtenido se concentró hasta sequedad.

El extracto acuoso, agotado con éter etílico, se lavó de nuevo con acetato de etilo siguiendo el proceso anterior, separándose finalmente dos fracciones: acuosa y acetato de etilo. Ambas se concentraron a pre si ón reducida hasta r.s.

El proceso extractivo se especifica en el es qu ema de la figura 4 .

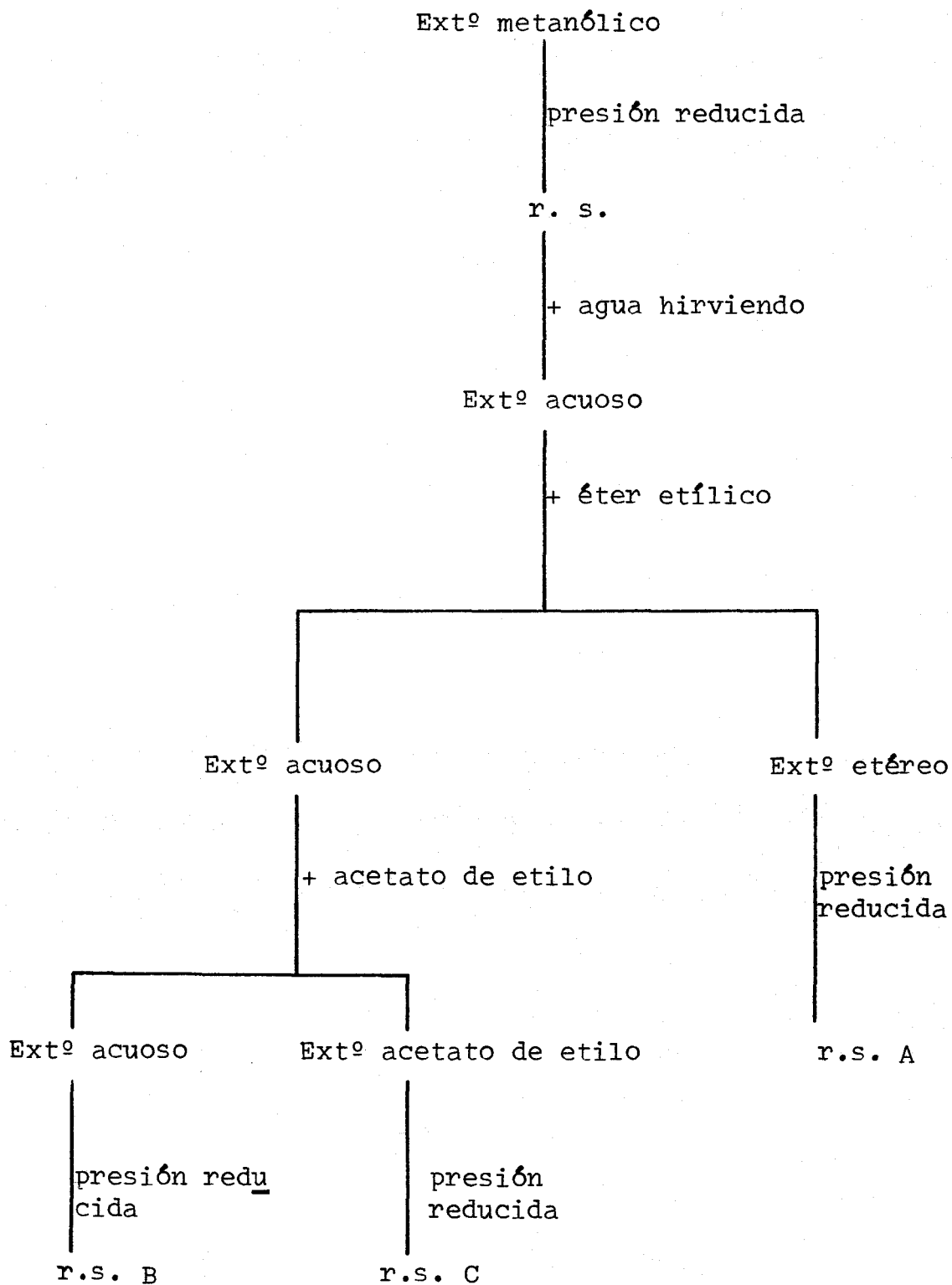


Fig. 4

III. 6. 2.- ESTUDIO POR CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

Los residuos obtenidos, A, B y C, así como el extracto metanólico inicial fueron cromatografiados en papel frente a tres patrones, los flavonoides: Quercetina (Merck), Luteolina (Sarsynthèse), y Rutina (Merck).

Condiciones experimentales

Soporte: papel Whatmann nº 1

Fases móviles: Forestal

Butanol: Acido acético: Agua (40:10:50)

Acido acético al 15 %

Acido acético al 60 %

Reveladores: Luz UV (266 y 254 nm)

Tricloruro de aluminio al 2 % en metanol

III. 6. 2. 1.- Resultados

Los Rf y las coloraciones obtenidas, así como las condiciones experimentales de cada cromatograma quedan reflejadas en las figuras 5, 6, 7, 8 y en las tablas V, VI, VII y VIII.

Fase móvil : Forestal (ácido acético: ácido clorhídrico: agua, 30:3:10)

Adsorbente: papel Whatmann nº 1

Revelador: luz ultravioleta

Tricloruro de aluminio

Desarrollo: descendente

Temperatura: 22° C

Tiempo de recorrido: 14 h.

Cantidades: patrones 8 µl

extractos 20 µl

Rf x 100

1-Quercetina	41				
2-Extº etéreo	41		69		84
3-Rutina				70	
4-Extº acuoso			70		87
5-Luteolina		59			
6-Extº acet. et.			69		87
7-Extº metan.	39		70		87
Color: UV	A*	P	Az	P	N
Cl ₃ Al	A* ₁	A	Az	A	N

TABLA V

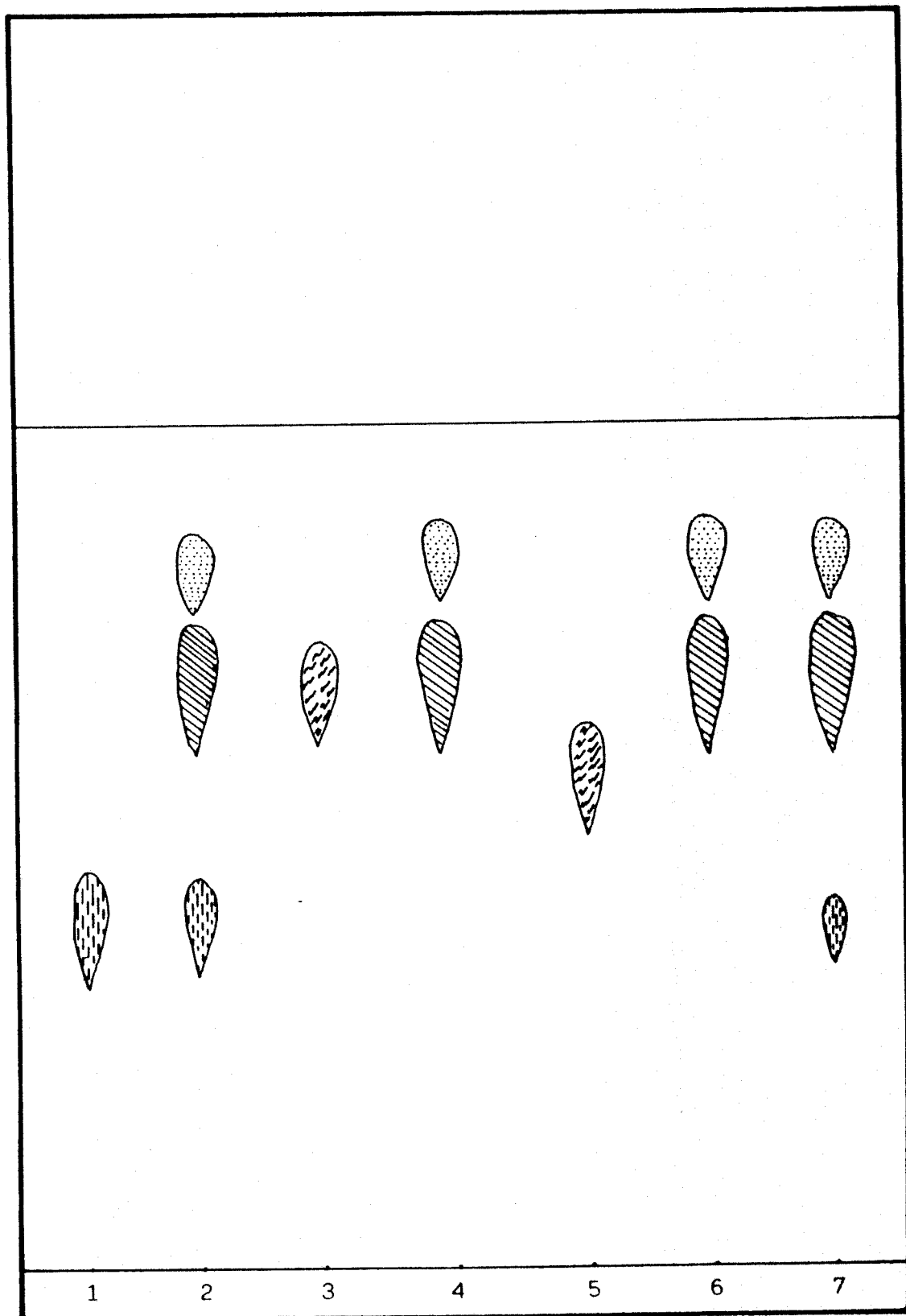


Fig. 5

Fase_móvil: butanol: ácido acético: agua, 40:10:50

Adsorbente: papel Whatmann nº 1

Revelador: luz UV

Tricloruro de aluminio

Desarrollo: ascendente

Temperatura: 19° C

Tiempo_de_recorrido: 24 h.

Cantidades: patrones 8 µl

extractos 16 µl

Rf x 100

1-Quercetina				75				
2-Extº etéreo				74	80		86	96
3-Rutina		56						
4-Extº acuoso	40		58		80			
5-Luteolina						80		
6-Extº acet.et.	42		59		80			
7-Extº metan.	41		59		80		86	96
Color: UV	A	P	A	A*	Az*	P	A	R
Cl ₃ Al	A	A	A	A	Az*	A	A	R

TABLA VI

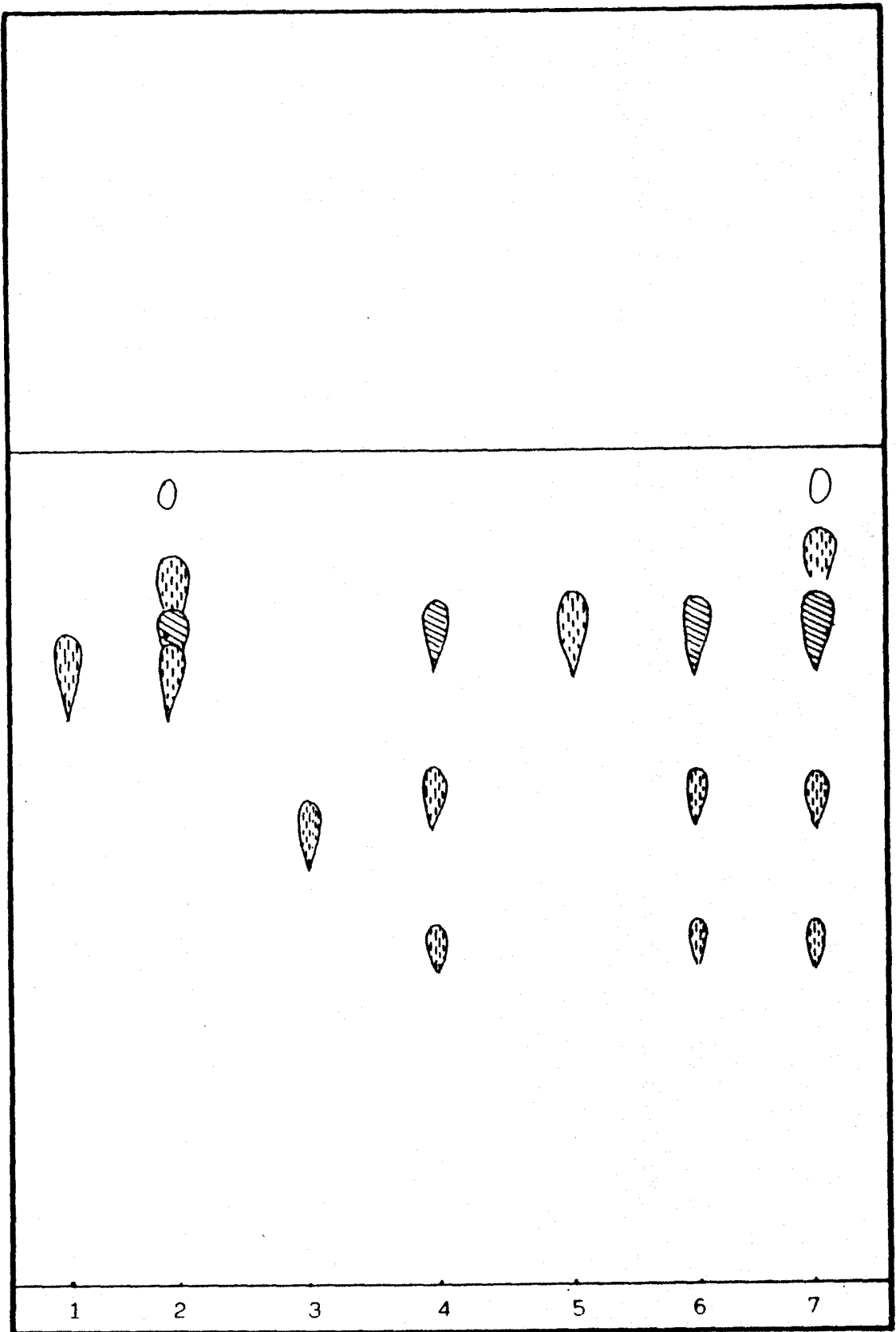


Fig 6

Fase_móvil: ácido acético al 15 %

Adsorbente: papel Whatmann nº 1

Revelador: luz UV

tricloruro de aluminio

Desarrollo: ascendente

Temperatura: 18° C

Tiempo de recorrido: 15 h.

Cantidades: patrones 8 μ l

extractos 16 μ l

Rf x 100

1-Quercetina	3							
2-Extº etéreo	3			35				
3-Rutina						55		
4-Extº acuoso			8	38			69	
5-Luteolina		5						
6-Extº acet. et.			7	39	49		66	75
7-Extº metan.	3			37	49		66	75
Color: UV	A	P	a	Az	az	P	Az	az
Cl ₃ Al	A	A	a	Az	az	A	Az	az

TABLA VII

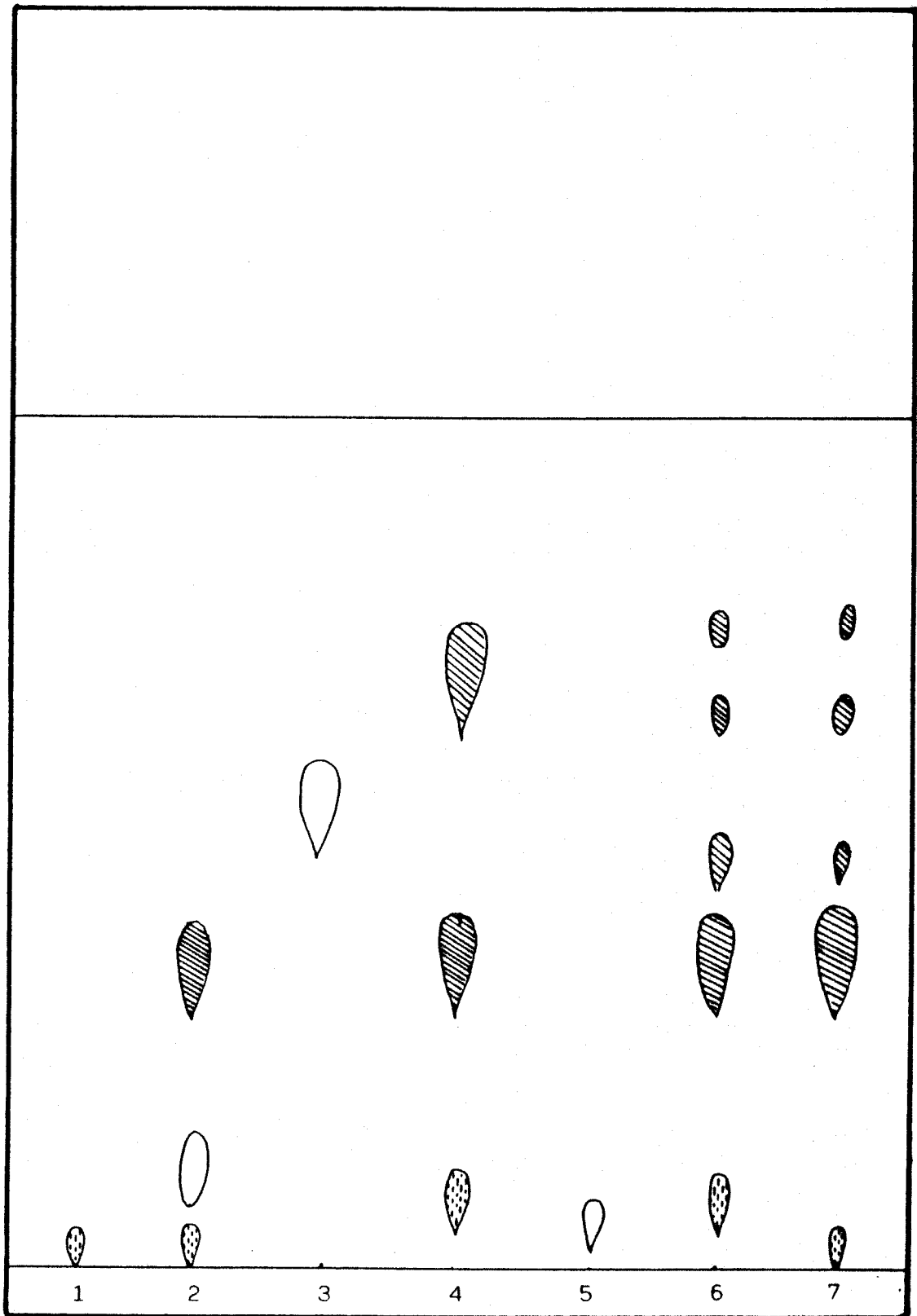


Fig 7

Fase móvil: ácido acético al 60 %

Adsorbente: papel Whatmann nº 1

Revelador: luz UV

Tricloruro de aluminio

Desarrollo: ascendente

Temperatura: 22° C

Tiempo de recorrido: 19 h.

Cantidades: patrones 8 µl

extractos 20 µl

Rf x 100

1-Quercetina	36					
2-Extº etéreo	36				73	86
3-Rutina				73		
4-Extº acuoso		33	50		74	85
5-Luteolina				54		
6-Extº acet. et.		31	51		74	86
7-Extº metan.	36				75	86
Color: UV	A	a	a	P	Az	V* a
Cl ₃ Al	A	a	a	A	Az	V* a

TABLA VIII

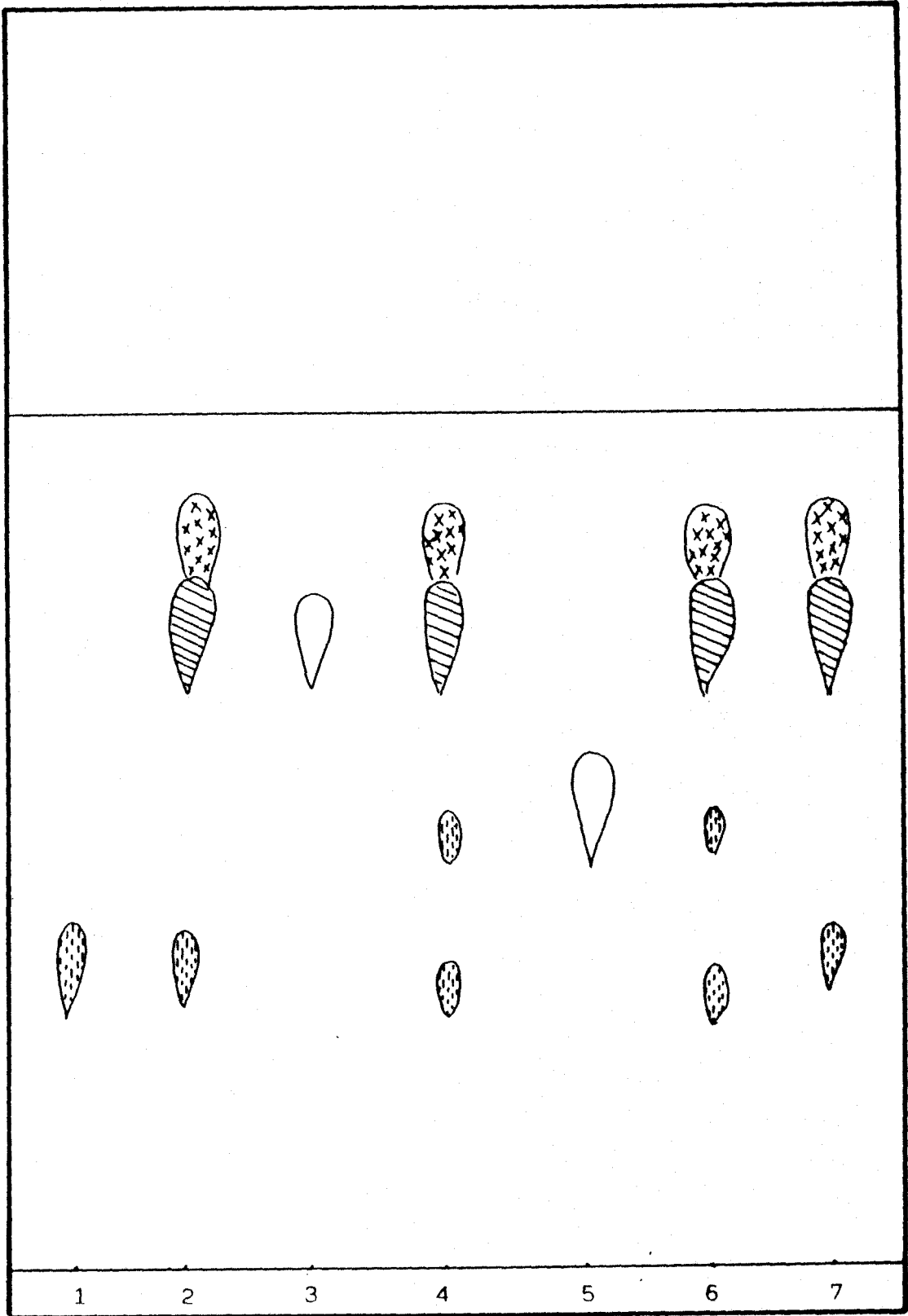


Fig 8

III. 6. 2. 2.- Discusión de resultados

Los extractos etéreo, acetato de etilo y acuoso obtenidos siguiendo el método de NETIEN-LEBRETON para compuestos polifenólicos, presentan, lógicamente, distinto comportamiento cromatográfico según la fase móvil seleccionada, mostrándose más resolutivas las constituidas por ácido acético al 15 % y butanol/ácido acético/agua, 40:10:50, ya que permiten observar la presencia de cinco componentes en el extracto acetato de etilo, que coinciden mayoritariamente con los detectados en el extracto metanólico inicial. No obstante, existe una característica común en todos los cromatogramas y es la existencia de un componente en el Extracto etéreo y metanólico inicial, cuyos valores de R_f coinciden con el del patrón - Quercetina, sin que este hecho se repita con los otros dos patrones utilizados: Rutina y Luteolina.

III. 6. 3.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA QUERCETINA

III. 6. 3. 1.- Cromatografía preparativa

El aislamiento de la quercetina, lo hemos efectuado mediante cromatografía preparativa.

Soporte: papel Whatmann nº 3

Fase móvil: Forestal: ácido acético/ácido clorhídrico/agua (30:3:10)

Reveladores: -luz UV (266 y 254 nm)

-Tricloruro de aluminio al 2 % en metanol

La banda obtenida se diluye en metanol, y para confirmar la pureza del compuesto eluido, se procedió de nuevo a cromatografiarlo.

III. 6. 3. 2.- Espectrofotometría UV

Al compuesto aislado se le realizó un espectro UV en metanol y en presencia de los reactivos habituales (53)(54) para confirmar los datos obtenidos en los ensayos cromatográficos. El espectrofotómetro utilizado fue

Perkin Elmer Lambda 3 UV/VIS.

Las condiciones operativas fueron:

-velocidad de la carta: 60 mm/min.

-sensibilidad: 0,0 - 1,0

- λ máx: 500 nm

- λ mín: 200 nm

III. 6. 3. 3.- Resultados

El espectro UV en metanol se muestra en la figura 9.

Los máximos de absorción que aparecen con los reactivos habituales quedan reflejados a continuación:

NaOMe λ máx (nm): 249 sh, 322 (dec)

AlCl₃ λ máx (nm): 272, 306 sh, 333, 461

AlCl₃/HCl λ máx (nm): 269, 302 sh, 360, 430 (dec)

NaOAc λ máx (nm): 269 sh, 274, 329, 392 (dec)

NaOAc/H₃BO₃ λ máx (nm): 263, 307 sh, 389

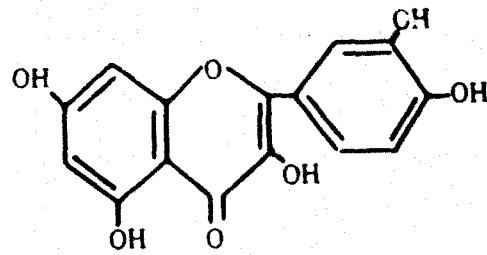
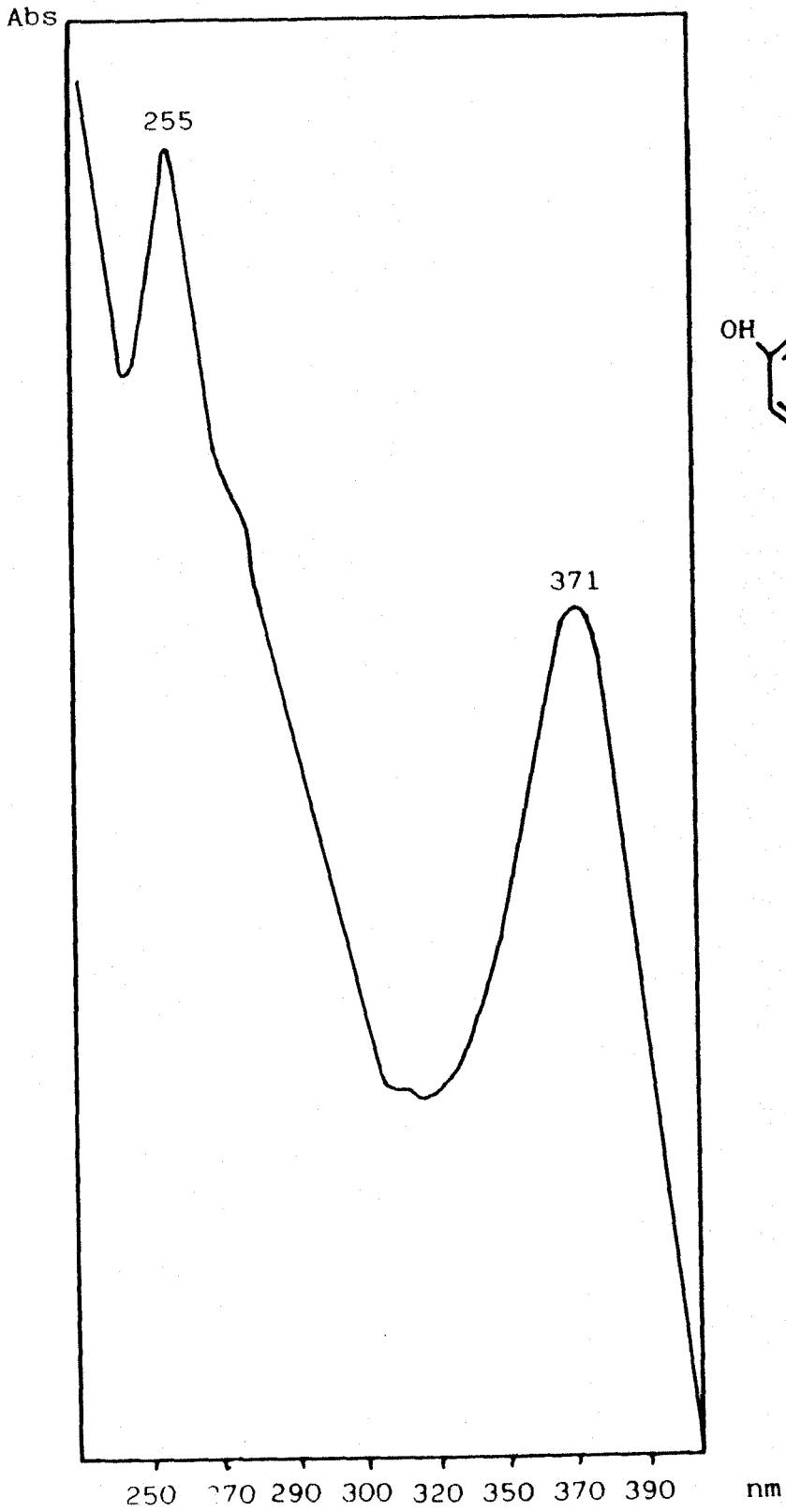


Fig. 9

III. 6. 3. 4.- Discusión de resultados

El espectro UV en metanol posee cuatro picos de absorción, un máximo a 371 nm y un hombro a 297 nm debidos a las absorciones del grupo cinamoilo correspondientes a la banda I del espectro y un hombro a 269 nm así como un máximo a 255 nm, como consecuencia de las absorciones producidas por el grupo benzoilo del flavonoide (banda II).

La adición de MeONa produce una descomposición espontánea y rápida del compuesto, al comparar el espectro realizado inmediatamente tras la administración de álcali y al cabo de los 5-10 min., lo que nos indica la posible presencia de un sistema 3,4'-dihidroxi.

En presencia de NaOAc al igual que con el reactivo anterior nos revela la existencia de grupos alcalino-sensibles, produciéndose la rápida descomposición del flavonoide en cuestión al cabo de pocos minutos. El espectro UV presentó entonces un desplazamiento batocrómico de 14 y 5 nm en los picos de absorción correspondientes a la banda II, con respecto al espectro efectuado en MeOH. Este hecho nos hace pensar en la posible detección de un grupo hidroxilo libre en el C₇.

El ácido bórico en presencia de NaOAc quelata grupos ortohidroxilos, Este hecho provoca un despla-

miento batocrómico de 18 nm en la banda I del espectro, por lo que podemos diagnosticar la existencia de un grupo ortodihidroxilo en el anillo B.

La adición de ClH al espectro medido con $AlCl_3$ provoca un desplazamiento hipsocrómico de 31 nm como consecuencia de la descomposición del complejo $AlCl_3$ -grupos ortohidroxilos. La no regeneración del espectro en metanol al añadir ácido, nos indica la posible presencia de grupos hidroxilos libres en el C_3 y C_5 .

El comportamiento espectral del principio aislado nos orienta hacia la 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona o quercetina.

III. 7.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE LOS EXTRACTOS POLIFENOLICOS

Para determinar la actividad antiulcerosa de los extractos obtenidos a partir del extracto metanólico inicial (etéreo, acuoso y acetato de etilo) ensayamos, en primer lugar, el modelo experimental de úlcera aguda inducida por inmovilización y frío, ya descrita en el apartado III. 4. 1. 1., ya que nos permite comprobar si la actividad se mantiene tras los nuevos tratamientos o bien se incrementa al emplear extractos más purificados (55)(56).

Paralelamente realizamos el estudio de la actividad antiulcerosa del principio aislado: Quercetina, conocido como inhibidor ulceroígeno (57)(58)(59)(60)(61)-(62) a fin de observar si la actividad de D. viscosa L. es debida a este flavonoide o coadyuvan otros principios que serán objeto de posteriores estudios.

III. 7. 1.- DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA

Las dosis ensayadas han sido las siguientes:

Lote Control: 10 ml sol. fisiológica/Kg animal
Lote Patrón: 100 mg Ranitidina/Kg animal
Lote Problema₁: 500 mg r.s. Extº etéreo/Kg animal

Lote Problema₂: 500 mg r.s. Extº acuoso/ Kg animal

Lote Problema₃: 500 mg r.s. Extº acet. etilo/Kg animal

Lote Problema₄: 100 mg Quercetina/Kg animal

III. 7. 2.- RESULTADOS

La Tabla IX recoge los resultados obtenidos.

En la figura 10 se representa, en forma de -
histograma, la superficie de mucosa gástrica ulcerada
en cada uno de los grupos (Índice de ulceración).

ULCERA GASTRICA INDUCIDA POR INMOVILIZACION Y FRIO

Lotes	nº estóm /escala	% de ulcer.	Indice de ulc. (mm ²)
Lote control	2/2 3/3 4/4	100	3,23 ±0,56
100 mg Ranitidina/Kg	5/0 2/2	28	0,18 ±0,05 **
500 mg r.s.Extº etér/Kg	4/0 1/1 3/2 1/4	55	0,76 ±0,24 *
500 mg r.s.Extº acuos/Kg	2/0 1/1 3/2 3/2	78	1,42 ±0,41 *
500 mg r.s.Extº aceta- to de etilo/Kg	2/0 3/2 3/3 2/4	80	1,50 ±0,40 *
100 mg Quercetina/Kg	3/0 1/1 2/2 2/3 2/4	70	1,41 ±0,37 *

** P < 0,01 * P < 0,05 n.s. no signi-
ficativo

TABLA IX

ULCERA GASTRICA INDUCIDA POR INMOVILIZACION Y FRIO

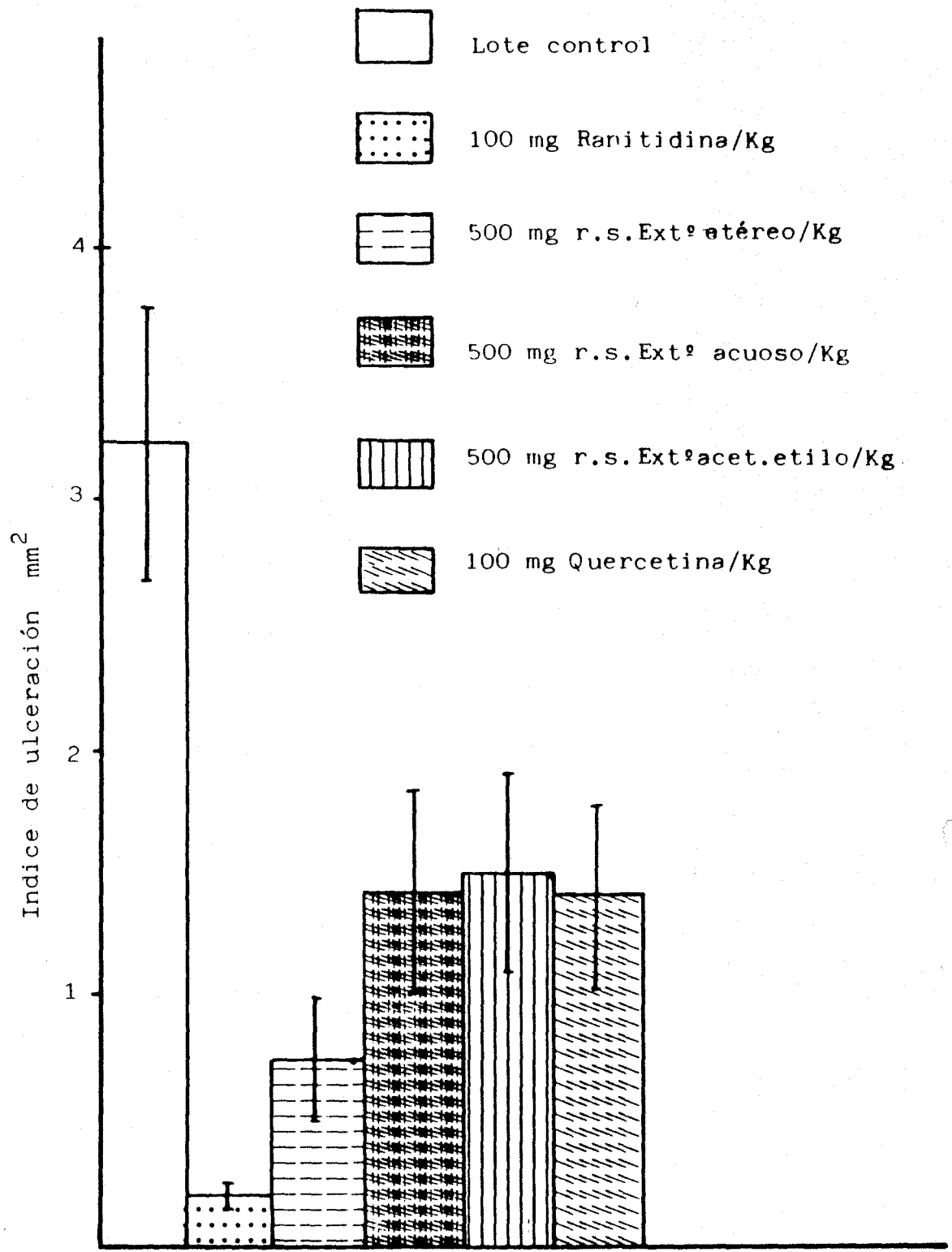


Fig. 10

III. 7. 3.- DISCUSION DE RESULTADOS

El análisis de los datos obtenidos al estudiar la actividad antiulcerosa de los tres extractos en el modelo de úlcera gástrica aguda, inducida por inmovilización y frío, nos muestra el siguiente orden de actividad: Extracto etéreo (Índice de ulceración $0,76 \pm 0,24$ $P < 0,05$) , Extracto acuoso (Ind. ulc. $1,42 \pm 0,41$ $P < 0,05$), Extracto acetato de etilo (Ind. ulc. $1,50, \pm 0,40$ $P < 0,05$); -- siendo el de la Quercetina de $1,41 \pm 0,37$, prácticamente igual que el logrado tras la administración de 500 mg de r.s. procedente del extracto acuoso.

A la vista de estos resultados procedemos al estudio de la actividad antiulcerosa del extracto etéreo frente a otros modelos experimentales de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto y por ácido acético, determinándose paralelamente también la actividad de - la Quercetina para poder comprobar la influencia que es te principio pueda ejercer.

III. 8.-ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DEL EXTRACTO ETÉREO Y DEL PRINCIPIO AISLADO (QUERCETINA)

III. 8. 1.- ULCERA GÁSTRICA AGUDA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO

III. 8. 1. 1.- Descripción de la técnica

Utilizamos el modelo de etanol absoluto descrito por SOLDATO y cols. (63).

Consiste en administrar 1 ml de etanol absoluto a animales de experimentación, concretamente a ratas.

En este caso el tratamiento con la sustancia a ensayar, se realiza 1h. antes de la experiencia, procediendo a continuación a la administración del agente ulcérigeno mediante sonda intragástrica.

Al cabo de 1 h. se sacrifican los animales, - se extraen los estómagos y se procede a medir la superficie ulcerada de acuerdo con una escala preestablecida (64) (65)

III. 8. 1. 2.- Desarrollo de la experiencia

El ensayo se realizó con ratas Wistar, distribuidas en lotes mixtos, que se mantuvieron en ayunas -- 24 h. antes de la experiencia, permitiéndoles el libre acceso al agua.

Las dosis administradas fueron:

Lote control: 10 ml sol. fisiológica/ Kg animal
Lote problema 1: 500 mg r.s. Ext^o etéreo/ Kg animal
Lote problema 2: 100 mg Quercetina/ Kg animal
Lote patrón: 50 mg Gefarnato/ Kg animal

La vía de administración fué oral, mediante sonda intragástrica, a razón de 1 ml/100 mg peso animal.

Una hora despues de haber sido tratados se procedió a la administración del agente ulcógeno, etanol absoluto.

Hemos valorado la ulceración producida de acuerdo con la siguiente escala (64):

- 0.- Sin lesión
- 1.- Ulceras hemorrágicas dispersas de longitud <5 mm y finas.
- 2.- Una úlcera hemorrágica de longitud >5 mm y fina.

- 3.- Más de una úlcera de grado 2.
- 4.- Una úlcera de longitud $>5\text{mm}$ y diámetro $<2\text{ mm}$.
- 5.- De una a tres úlceras de grado 4.
- 6.- De cuatro a cinco úlceras de grado 4.
- 7.- Más de seis úlceras de grado 4.
- 8.- Lesión generalizada.

III. 8. 1. 3.- Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla X.

En la figura 11 se representa, en forma de histograma, la superficie de mucosa gástrica ulcerada en cada uno de los grupos.

ULCERA GASTRICA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO

Lotes	Nºestóm. /escala	% ulcer.	Indice de ulc. (mm ²)
L. Control	1/3 1/4 1/5 4/6 2/8	100	70,83 ± 19,36
50 mg Gefarnato/Kg	1/1 1/2 1/5 6/6 2/8	100	51,88 ± 10,05 n.s.
500 mg r.s. Extº etér/Kg	4/1 1/2 1/3 1/5 3/6	100	33,03 ± 10,77 *
100 mg Quercetina/Kg	4/1 1/2 3/6 2/8	100	59,50 ± 18,11 n.s.

* P < 0,05 n. s. - no significativo

TABLA X

ULCERA GASTRICA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO

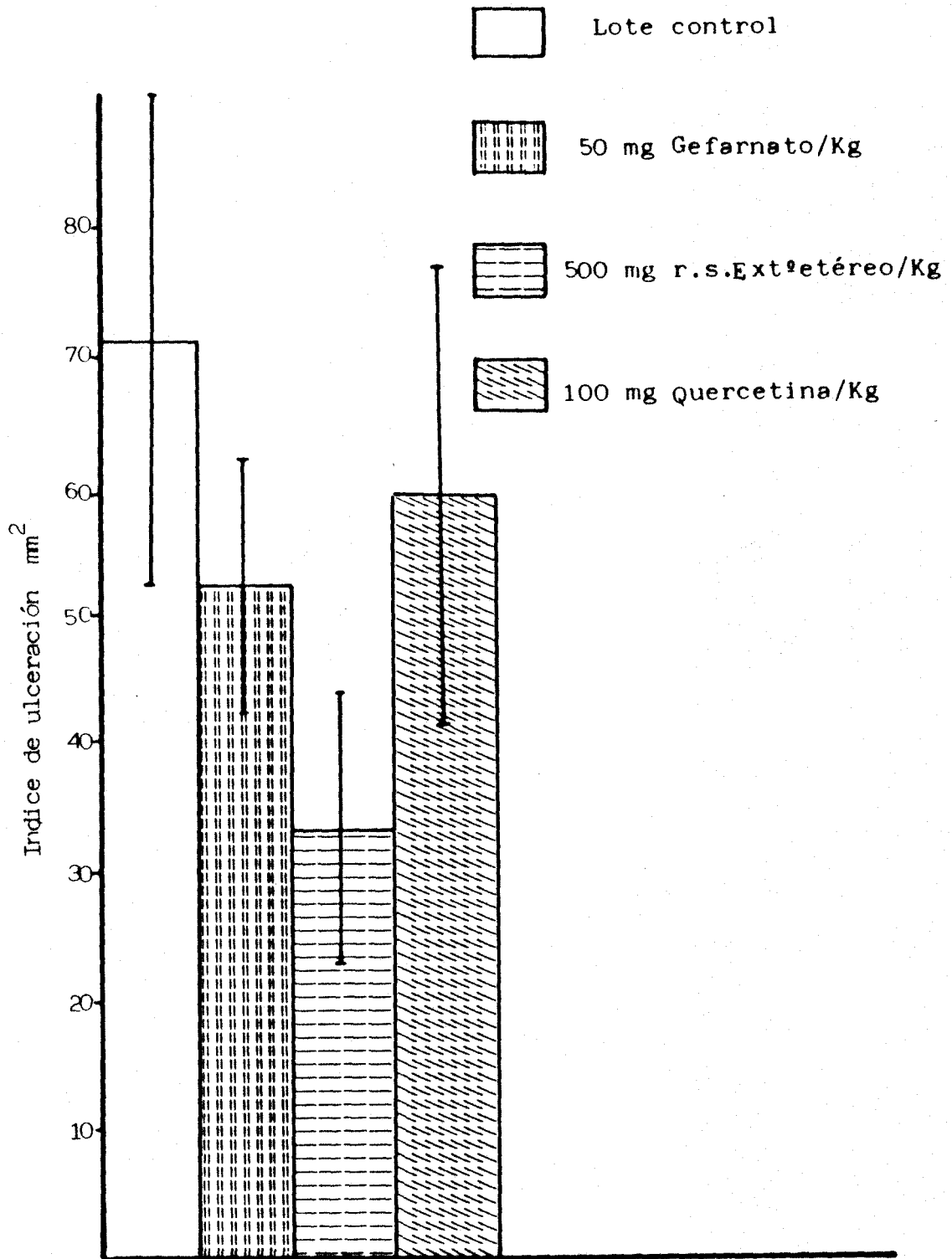


Fig. 11

III. 8. 1. 4.- Discusión de resultados

La administración a los animales objeto del experimento de 1 ml de alcohol absoluto origina unas lesiones hemorrágicas que ocupan una gran parte de la superficie de la mucosa gástrica.

Este modelo experimental permite valorar la mayor o menor capacidad de los productos ensayados para prevenir o bien disminuir el número de lesiones.

Los resultados obtenidos tras la administración del fármaco (Gefarnato) y del principio activo aislado (Quercetina) no son significativos, aunque disminuyen los valores del índice de ulceración con respecto al grupo control. Sólo la administración de 500 mg de r.s. del extracto etéreo/Kg peso animal, es capaz de reducir el índice de ulceración a la mitad aproximadamente ($P < 0,05$).

El extracto etéreo se muestra claramente preventivo y a este efecto además de la Quercetina, tienen que coadyuvar otros principios solubilizados en él.

III. 8. 2.- ULCERA GASTRICA CRONICA INDUCIDA POR ACIDO ACETICO

En este modelo experimental se provoca, en primer lugar, la ulceración y, a continuación, se le administra el fármaco para poder evaluar su potencia antiulcerosa.

III. 8. 2. 1.- Descripción de la técnica

Uno de los métodos mas usados para inducir este tipo de úlcera es el de TAGAKI y cols. (66), que utiliza como agente ulceroígeno una solución de ácido acético inyectada en la pared estomacal.

Los animales, ratas macho, se someten a una anestesia superficial con éter durante el tiempo que dura la intervención (7-10 min.). Realizamos una laparotomía de unos 2-3 cm que permite localizar el estómago. Posteriormente se procede a inyectar en la subserosa de la pared anterior 0,05 ml de ácido acético al 20 %. A continuación se desplaza de nuevo el estómago a su sitio y se sutura la pared abdominal por planos.

Trascurridas 36-48 h. de la intervención, tiempo necesario para originar la ulceración de la mucosa, -

se administra a los animales las dosis correspondientes de la sustancia a ensayar, durante un tiempo preestablecido, que puede ser 7, 14, o 21 días.

Al cabo de este período, se sacrifican los animales, se disecan los estómagos y se contabilizan las erosiones producidas.

En este tipo de úlcera, tan importante como medir la superficie de las lesiones es observar la cicatrización de las mismas y la recuperación del epitelio gástrico (66).

III, 8. 2. 2.- Desarrollo de la experiencia

Como en los casos anteriores, los animales, - ratas Wistar macho, se mantuvieron en ayunas total, agua y comida, 24 h. antes de la experiencia.

A las 36 h. de la misma, cada uno de los lotes, recibió, durante siete días consecutivos, con intervalos de 12 h. las dosis correspondientes de las soluciones-- problema, que fueron las mismas que en la experiencia anterior, comprobándose los efectos producidos frente - a un lote patrón tratado con 100 mg Ranitidina por Kg - de animal.

La vía de administración fué oral, mediante -

sonda intragástrica.

Al finalizar el tratamiento se sacrifican los animales para diseccionar los estómagos y medir la superficie que ocupa el cráter erosionado, que se expresa en términos de índice de ulceración (mm^2) (66).

También se calculó el porcentaje de curación de los diferentes grupos tratados con respecto al control, según la siguiente expresión:

$$\% \text{ de curación} = \frac{\text{I. ulc. control} - \text{I. ulc. tratados}}{\text{I. ulc. control}} \times 100$$

III. 8. 2. 3.- Resultados

Los resultados obtenidos están recogidos en la tabla XI, mostrándose en la figura 12 la representación gráfica del Índice de ulceración de los distintos lotes.

ULCERA GASTRICA INDUCIDA POR ACIDO ACETICO

Lotes	Indice de ulcer. (mm ²)	% Curación
Lote control	76,30 ± 4,45	-
100 mg Ranitidina/Kg	42,57 ± 13,57 *	44,20
500 mg Ext ^o etéreo/Kg	45,14 ± 12,64 *	40,83
100 mg Quercetina/Kg	37,75 ± 7,93 **	50,52

** P < 0,001 * P < 0,025

TABLA XI

ULCERA GASTRICA INDUCIDA POR ACIDO ACETICO

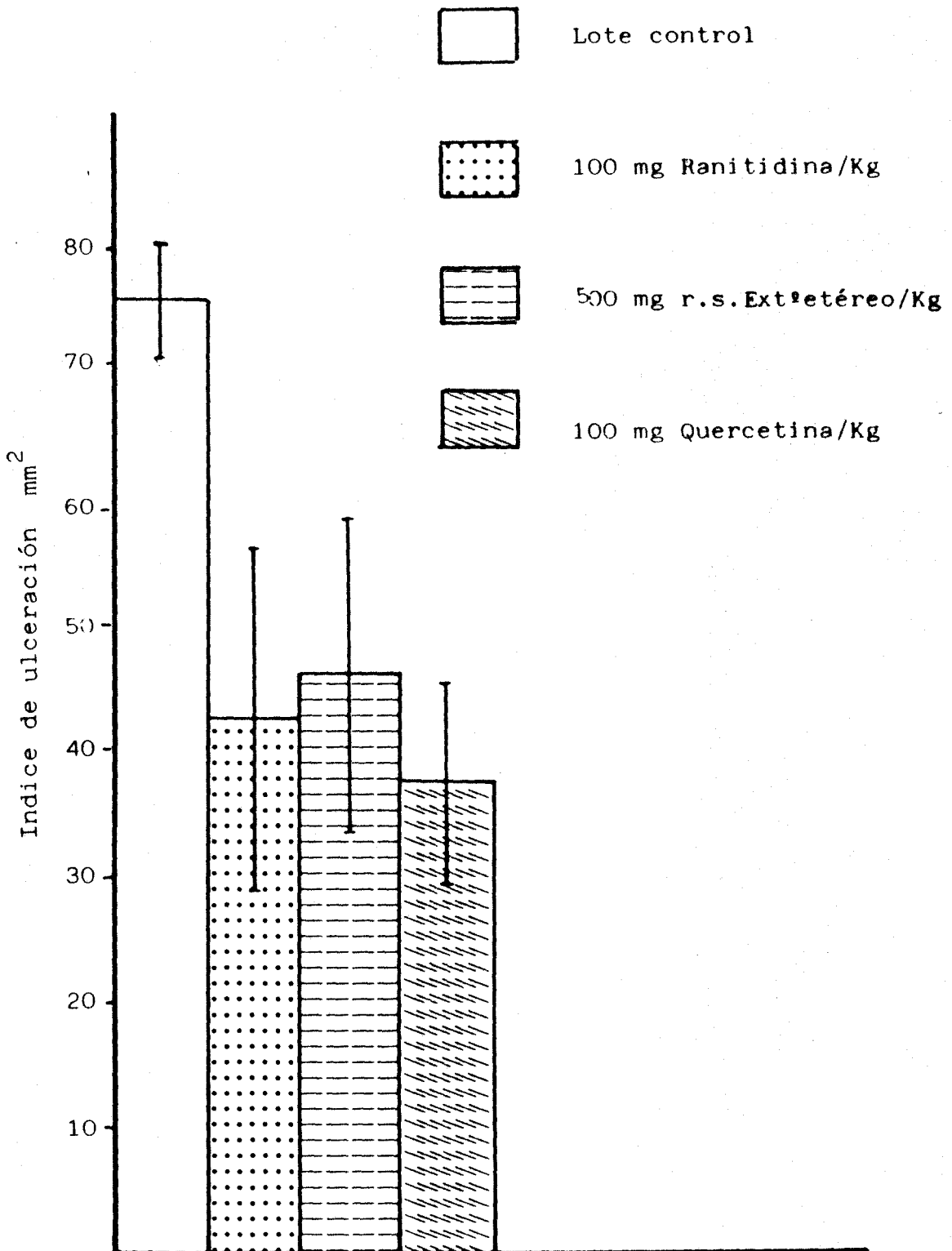


Fig. 12

III. 8. 2. 4.- Discusión de resultados

La inyección de 0,05 ml de ácido acético en la subserosa de la pared anterior del estómago origina unas lesiones gástricas consistentes en la necrosis del tejido adyacente a la zona inyectada, que da lugar a un cráter ulceroso de evolución crónica.

El efecto curativo que ejercen los diversos preparados administrados durante 7 días, con intervalos de 12 horas, se manifiesta tanto por la disminución del área de superficie ulcerada como por la cicatrización de las lesiones.

La administración del extracto etéreo origina un porcentaje de curación de un 40,83 %, próximo a los valores logrados con 100 mg de Ranitidina/Kg animal (44,20 %). El porcentaje de curación conseguido con 100 mg de Quercetina/Kg animal supera los valores anteriores (50,52 %).

Aunque los resultados obtenidos tras la administración de Quercetina superan los alcanzados con el extracto etéreo, no se puede responsabilizar exclusivamente a este principio de la actividad del extracto, ya que la dosis administrada (100 mg/Kg) es lógicamente superior a la cantidad de Quercetina contenida en la dosis de x.s. administrado.

IV - CONCLUSIONES

- 1.- Los principales grupos fitoquímicos detectados en los tres extractos ensayados, de acuerdo con su solubilidad son: cuerpos grasos, esteroides y triterpenos, sustancias nitrogenadas, taninos, glúcidos, resinas y saponinas, observándose como principios mayoritarios lactonas pentagonales insaturadas y flavonoides.
- 2.- En el estudio preliminar de la actividad antiulcerosa, el extracto metanólico es el único que resulta activo, proporcionándonos un índice de ulceración significativamente menor con las dos dosis seleccionadas (500 mg/Kg = $0,337 \pm 0,06$; 250 mg/Kg = $1,425 \pm 0,53$) que el del lote control ($3,238 \pm 0,56$).
- 3.- Los valores obtenidos al determinar la DL_{50} del extracto metanólico revelan la ausencia de toxicidad del mismo. Su administración reiterada (500 mg r.s./Kg) da lugar a un incremento de la ingesta con el consiguiente aumento de peso de los animales.
- 4.- La extracción de compuestos polifenólicos de acuerdo con el método de NETIEN-LEBRETON nos proporciona tres fracciones, identificándose en el extracto etéreo, por cromatografía en papel, frente a un patrón, Quercetina, y por espectrofotometría UV, previo aislamiento por cromatografía preparativa en papel, al coincidir el espectro UV registrado con el descrito en bibliografía para este flavonol.

5.- Tras el estudio comparativo de la actividad antiulcerosa de las tres fracciones, seleccionamos el extracto etéreo por mostrar una mayor capacidad para inhibir la úlcera inducida según el método de SENAY-LEVINE.

6.- Frente al modelo experimental descrito por SOLDATO y cols. el extracto etéreo muestra mayor actividad que 50 mg de Gefarnato y 100 mg de Quercetina.

Sin embargo, frente al modelo experimental de úlcera crónica inducida por ácido acético de acuerdo con la técnica de TAGAKI, es la Quercetina la que muestra mayor poder antiulceroso.

V - BIBLIOGRAFIA

- (1) CRONQUIST, A. (1981).- "An integrated system of classification of flowering plants " Columbia University Press, New York.
- (2) FURLENMEIER, M. (1984).- " Plantas curativas y sus propiedades medicinales " Ed. Schwitler Zug, Suiza.
- (3) SCHAUBENBERG, P.; PARIS, F. (1977).- " Guide des plantes médicinales " Ed. Delachaux & Niestle, París.
- (4) DA LEGNANO, L. P. (1954).- " Le piante medicinali " Ed. Mediterranee, Roma.
- (5) CECCHINI, T. (1971).- " Enciclopedia de las hierbas y de las plantas medicinales " Ed. De Vecchi S.A., Barcelona.
- (6) CHIEJ, R. (1983).- " Guía de plantas medicinales " Ed. Grijalbo S.A., Barcelona.
- (7) FLEURY DE LA ROCHE, A. (1931).- " Las plantas bien hechoras " Ed. Iberia, Barcelona.
- (8) PAHLOW, P. (1979).- " El gran libro de las plantas medicinales " Ed. Everest, León.
- (9) (1981).- " Secretos y virtudes de las plantas medicinales " Ed. Iberia, Barcelona.

- (10) FONT QUER, P. (1973).- " Plantas medicinales; El Dioscórides renovado " Ed. Labor S.A., Barcelona.
- (11) B. KREIG, M. (1976).- " Medicina verde " Ed. - C.E.C.S.A., México.
- (12) TREASE, G.E. ; EVANS, W.CH. (1976).- " Farmacognosia " Ed. C.E.C.S.A., Barcelona.
- (13) PARIS, R.R. ; MOYSE, H. (1976).- " Matière médicale " 2ª Ed. Ed. Masson, París.
- (14) BEZANGER-BEAUQUESNE, L. ; PINKAS, M. ; TORK, M. (1975).- " Les plantes dans la therapeutique moderne " Ed. Maloine S.A., París.
- (15) MARTIN, M.J. (1983).- " Contribución al estudio farmacodinámico de Bidens aurea (Aiton) Sherff " Tesis Doctoral, Sevilla.
- (16) AYUSO, M.J. ; MARHUENDA, E. ; MARTIN, M.J. (1986) " Contribution á l'étude pharmacodynamique de Bidens aurea (Aiton) Sherff. Activité vis-à-vis de differents modèles d'úlceres gastriques experimentaux " Plantes médicinales et phytotherapie, 3 , 255-263.
- (17) OTERO, E. (1946).- " Análisis de grasas, ceras y sus mezclas comerciales " Ed. Dossat S.A., Madrid.

- (18) GATHERCOAL, E.N. ; WIRTH, E.H. (1948).- " Pharmacognosy " Ed. Lea-Febiger, Filadelfia.
- (19) PINDER, A. (1960).- " The chemistry of terpenes " - Ed. Chapman et Hall, Londres.
- (20) DOMINGUEZ, X.A. (1973).- " Métodos de investigación fitoquímica " Ed. Limusa, México.
- (21) BOUQUET, A. ; FOURET, A. (1975).- " Recherches chimiques preliminaires sur les plantes medicinales du - Congo-Brazaville " Firoterapia, 46, 175-177.
- (22) TORRENT, M.T. (1976).- " Algunos aspectos farmacológicos y farmacodinámicos de Lippia citriodora " Rev. B. Acad. de Barcelona, 19, 39-41.
- (23) LESCAO, F. ; FAUGERAS, G. ; PARIS, R. (1972).- " Sur divers constituant phenoliques (ácides, phenols, flavonoids) de L'Osyris alba " Plantes medicinales et - phytotherapia, 16 (3), 216-219.
- (24) CABO, J. ; PARDO, P. (1974).- " Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia " 4ª Ed; Ed. Gráficas del Sur, Granada.
- (25) SAN MARTIN CASAMADA, R. (1977).- " Tratado de Farmacognosia " Ed. Científica-Médica, Barcelona.

- (26) PAVIA, D.L. ; LAMPMAN, G.M. ; KRIZ, G.,S.(1976)
" Química orgánica experimental. Productos naturales. Compuestos de interés farmacológico e industrial " Ed. Eunibar, Barcelona.
- (27) LITWACK, G. (1967).- " Bioquímica experimental. Un manual de laboratorio " Ed. Omega, Barcelona.
- (28) COOKE, A.R. (1973).- " The role of acid in the pathogenesis of aspirin-induced gastrointestinal erosion and hemorrhage " Amer. J. Dig. Dis. ,18, 225-227.
- (29) WALGER, R. ; WILSON, L. (1979).- " A novel method for the detection of drug induced gastrointestinal irritancy " J. Pharm. and Pharmacol. , 31, 13.
- (30) SEEGER, A.J.M. ; JAGER, L.P. ; VAN NOOROIJK, J. (1978) ,- " Gastric erosions induced by analgesic drug mixtures in the rat " J. Pharm. and Pharmacol., 30, 84-87.
- (31) FRANCO-BROWDER, S. ; MASSON, G.M.C. ; COROCORAN, A.C. (1959).- " Induction of acute gastric lesions by histamine liberators in rats " J. Allergy, 39, 1-10.

- (32) GUPTA, M.B. ; TANGRI, K. K. ; BHARGAVA, K.P.(1974)
" Mechanism of ulcerogenic activity of reserpine in
albino rats " Eur. J. Pharmac. ,27, 269-271.
- (33) BRODIE, D.A. ; HANSON, H.M. (1960).- " A study of
the factor involved in the production of gastric ul-
cers by the vestraind technique " Gastroentology,
38, 353-360.
- (34) HAYDEN, L.J. ; THOMAS, G. ; WEST, G.B. (1978).-
" Inhibition of gastric lesions in the rat " J.Pharm.
Pharmacol, 30, 244-246.
- (35) BRODIE, D.A. ; LOFTI, B. ; BAUER, T. (1970).- " Drug
effets on gastric secretion and stress gastric hemo-
rrhage in the rat " . Emer. J. Dig. Dis. 15, 111-120.
- (36) SHAY, H. ; CAMAROU, S.A. ; FELS, SS. ; MERANZE; D. ;
GRUNSTEIN, M. ; SIPLER, H. (1945).- " A simple method
for the uniform production of gastric ulceration in -
the rat " Gastroenterology, 5, 43-61.
- (37) MARTI-BONMATI, E. ; ALIÑO, S.F. ; ;LLORIS, J.M.; ES-
PLUGES, J. (1980).- " Effets of cimetidine atropine
and prostaglandin e₂ on rat mucosal erosion produced
by intragastric distension " Eur. J. Pharmac., 68,
49-53.

- (38) SENAY, E.C. ; LEVINE, R.J. (1967).- " Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcer in rats " Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 124,-- 1221-1223.
- (39) CIOLI, V. ; SILVESTRINI, B. ; DORDONI, F. (1967).-- " Evaluation of the potencial of gastric ulceration after administration of certain drugs " Experim. and Molec. Pathology, 6, 68.
- (40) PASCUA, M. (1974).- " Metodología bioestadística " 2ª Ed. Ed. Paz Montalvo, Madrid.
- (41) CALESNIK (1974).- " Estudio de la acción de las drogas. IV: Farmacología aplicada, animal y humana ". En: DRILL, V.A. " Farmacología médica " 3ª Ed., Ed. La Prensa médica mexicana, México.
- (42) VELASCO, A. (1977).- " Farmacometría y Bioestadística ". En: LORENZO, B. " Farmacología y su proyección a la clínica " 14ª Ed., Ed. Otelos, Madrid.
- (43) KLAASEN, C.D. (1981).- " Principios de Toxicología " En: GOODMAN GILMAN, A. ; GOODMAN, L.S. " Las bases farmacológicas de la Terapéutica " 6ª Ed., Ed. Panamericana, Buenos Aires.
- (44) MILLER, LL. C. ; TAINTER, M.L. (1944).- " Stimulation of the DL₅₀ and its error by means of logarithmic - probit graphaper " Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 57, 261-263.

- (45) WEPIERRE, J. (1977).- " Abrégé de Pharmacodynamie - générale " Ed. Masson, Paris.
- (46) AVRAM, M.D. ; LEWIS, Ph.D. ; SUMNER, M.D. (1978).- " Farmacología " 2ª Ed., Ed. Limusa, México.
- (47) ESPLUGUES, J. ; VILLAR, A. ; ALCARAZ, M.J. (1982) " Activité pharmacodynamique de *Sideretis mugronensis* " Plantes medicinales et Phytotherapie, 2, - 137-146.
- (48) OKSUZ, S. (1977).- " Flavonoidal compounds of *Inula viscosa* " Planta Médica, 31, 270-273.
- (49) TAILLADE, C.L. ; SUSPLUGAS, P. ; BALANSARD, G. - (1980).- " Sur les flavonoids d'*Inula viscosa* Ait " Plantes medicinales et Phytotherapie, 14, 26-28.
- (50) GRANDE, M. ; PIERA, F. ; CUENCA, P. ; TORRES, P. ; BELLIDO, I.S. (1985).- " Flavonoids from *Inula viscosa* " Planta médica, 5, 415-419.
- (51) CHIAPPINI, I. ; FARDELLA, G. ; MENGHINI, A. ; ROSSI, C. (1982).- " Flavonoids from *Dittrichia viscosa* " Planta médica, 44, 159-161.
- (52) NETTIEN, G. ; LEBRETON, P. (1964).- " Sur les flavonoids et autres substances polyphenoliques du *Millepertuis hypericummmularium* L. " Ann. Pharm. Fr. , 22, 69.

- (53) MABRY, T.J. ; MARKHAM, K.R. ; THOMAS, M.B. (1970).-
" The systematic identification of flavonoids " Springer-Verlag, New York.
- (54) HARBORNE, J.B. ; MABRY, T.J. ; MABRY, H. (1975).-
" The flavonoids " Chapman and Hall, Londres.
- (55) GABOR, M. (1985).- " Flavonoids and Bioflavonoids "
Eds. L. Farkas, M. Gabor, F. Kallay, Szeged.
- (56) GABOR, M. (1981).- " Advances in the pharmacology
of benzopyrone derivates and related compounds "
Proceeding International Bioflavonoid Symposium,
Munich.
- (57) KHRENOVA, D. ; DARGAEVA, T.D. ; NICOLAEV, S. ; FE-
DOTOVSKIKH, N.N. ; BRUTKO, L.I. (1986).- " Qualitative
phytochemical study of antiulcer drugs from
plants " Farmatsiya, 35 (3), 46-48. En: C.A., 105,
102403 n (1986).
- (58) ALCARAZ, M.J. ; HOULT, J.R. (1985).- " Actions of
flavonoids and the novel antiinflammatory flavone,
hypoletin - 8 - glucoside, on prostaglandin biosyn-
thesis and inactivation " Bioch. Pharmacol. 35 (14)
2477-2482. En: C.A., 103, 115900 f (1985).

- (59) BARNAULOV, O.D. ; MANICHEVA, O.A. ; KOMISSARENKO, N.F. (1983).- " Comparative evaluation of the effect of some flavonoids on changes in the gastric wall - of reserpine-treated or immobilized mice " Khim--Farm. Zh., 17 (8), 946-951. En: C.A., 100, 231 j (1984).
- (60) WARM, G. ; BAUMANN ; J. ; GERES, U. (1982).- " Effect of flavonoids on arachinodic acid metabolism". Disch. Apoth.-Ztg., 122 (4), 2062-2068. En: C.A.,-98, 189 s (1983).
- (61) BARNAULOV, O.D. ; MANICHEVA, O.A. ; DENISENKO, P.P. (1982).- " Method for evaluation the effect of preparations on the ulcerogenic activity of reserpine in mice " Farmakol. Toksikol, 45 (4), 105-110. En: C.A., 97, 155794 p (1983).
- (62) BARNAULOV, O.D. ; MANICHEVA, O.A. ; ZAPESOLUNAYA, G.G. ; SHELYUTO, V.L. ; GLYZIN, U. I. (1982).- " Effect of some flavonoids on the ulcerogenic activity of reserpine in mice " Khim-Farm. Zh., 16(3) 300-303. En: C.A., 96, 192934 j (1982).
- (63) SOLDATO, P. ; FOSCHI, D.; VARIN, L. ; DANIOTTI, S. (1984).- " Comparison of the gastric cytoprotective properties of atropine, ranitidine and PGE₂ in rats " Eur. J. Pharmacol. 106 (1), 53-58.

- (64) JIMENEZ, B. (1986).- " *Dittrichia viscosa* (L) W. Greuter. Estudio farmacológico y farmacodinámico " Tesina de Licenciatura, Sevilla.
- (65) MARHUENDA, E. ; MARTIN, M.J. ; ALARCON, C. ; JIMENEZ, B. (1986).- " Determination de l'activité antiulcerose de *Dittrichia viscosa* (L) W. Greuter " Actas proceedings del Primer Congreso Internacional - Plantes et substances naturelles d'interet therapeutique, - Monasteir (Tunisie).
- (66) TAGAKI, K. ; OKABE, S. ; SAZIKI, R. (1966).- " A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing " Jap. J. Pharmacol. 19, 416-418.