

R. 2841

T. 252

CATEDRA DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

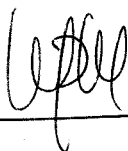
FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

"CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS POLIFENOLICOS
DE Erica andevalensis Cabezudo-Ribera"

Trabajo para aspirar al
grado de licenciatura
que presenta

MAGDALENA PASCUAL MARTINEZ





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 los compuestos polifenólicos de Erica andevalensis Cabezudo-Ribera", ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica Farmacognosia y Farmacodinamia, bajo la dirección de la Prof. titular Dra. M^a Victoria Toro Sáinz y de la Prof. Dra. M^a Dolores Garcia Gimenez, 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 dos de Octubre de mil novecientos ochenta y seis.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Felipe Alcudia Gonzalez', written over a light-colored background.

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 la Prof. titular Dra. M^a Victoria Toro Sáinz y de la Prof. M^a Dolores Garcia Gimenez.

Las Directoras del trabajo:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Victoria Toro Sáinz', with a large, sweeping flourish underneath.

Dra. M^a Victoria Toro Sáinz

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dolores Garcia Gimenez', with a horizontal line drawn underneath.

Dra. M^a Dolores Garcia Gimenez

Deseo expresar mi agradecimiento a las Dras. M^a Victoria Toro Sáinz y M^a Dolores Garcia Gimenez por su dirección, eficaz ayuda y constante estímulo en la realización de este trabajo.

A mis compañeras del Departamento por su continuo apoyo y a todas aquellas personas que de alguna forma han contribuido a su elaboración.

A mi Familia

S U M A R I O

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>	2
II.1.- <u>B O T A N I C A</u>	3
II.1.1.- SITUACION TAXONOMICA	3
II.1.2.- DESCRIPCION DE LA ESPECIE	4
II.1.3.- ECOLOGIA	5
II.2.- <u>F I T O Q U I M I C A</u>	8
II.2.1.- VISION GENERAL	8
II.2.2.- COMPUESTOS FENOLICOS	9
II.3.- <u>A L E L O P A T I A</u>	14
II.4.- <u>A C C I O N E S F A R M A C O L O G I C A S D E F E N O L E S</u>	18
II.4.1.- VISION GENERAL	18
II.4.2.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	20
II.4.3.- ACTIVIDAD ANTIMITOTICA	24
II.5.- <u>A C C I O N E S F A R M A C O L O G I C A S Y E M P L E O S T E R A P E U T I -</u> <u>C O S D E E R I C A C E A S</u>	26

	<u>pag.</u>
III.- <u>P A R T E E X P E R I M E N T A L</u>	28
III.1.- <u>MUESTRA</u>	28
III.2.- <u>"SCREENING" FITOQUIMICO</u>	28
III.2.1.- ESTEROLES Y TRITERPENOS	29
III.2.2.- QUINONAS LIBRES	29
III.2.3.- QUINONAS COMBINADAS	30
III.2.4.- LACTONAS PENTAGONALES INSATURADAS ..	30
III.2.5.- PIGMENTOS ANTOCIANICOS	31
III.2.6.- PIGMENTOS LEUCOANTOCIANICOS	31
III.2.7.- PRINCIPIOS POLIFENOLICOS	32
III.2.7.1.- <u>Taninos</u>	33
III.2.7.2.- <u>Flavonoides</u>	34
III.2.7.3.- <u>Cumarinas</u>	34
III.2.8.- COMPUESTOS NITROGENADOS	35
III.2.8.1.- <u>Alcaloides</u>	35
III.2.9.- DISCUSION DE RESULTADOS	38
III.3.- <u>EXTRACCION DE ACIDOS FENOLES</u>	39
III.4.- <u>IDENTIFICACION DE ACIDOS FENOLES POR CROMA-</u> <u>TOGRAFIA</u>	41

	<u>pag.</u>
III.4.1.- CROMATOGRAFIA EN PAPEL	42
III.4.2.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	45
III.4.3.- DISCUSION DE RESULTADOS	50
III.5.- <u>AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ACIDOS FENOLES</u> <u>POR ESPECTROFOTOMETRIA DE U.V./ VIS.</u>	51
III.5.1.- AISLAMIENTO	51
III.5.2.- IDENTIFICACION	52
III.5.3.- DISCUSION DE RESULTADOS	59
III.6.- <u>ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</u>	60
III.6.1.- CONDICIONES GENERALES	60
III.6.1.1.- <u>Medio de cultivo</u>	60
III.6.1.2.- <u>Preparación del Inóculo</u>	61
III.6.1.3.- <u>Siembra</u>	61
III.6.1.4.- <u>Incubación</u>	63
III.6.1.5.- <u>Determinación de los halos de inhi-</u> <u>bición</u>	63
III.6.1.6.- <u>Microorganismos ensayados</u>	64
III.6.2.- EXTRACTOS A ENSAYAR	65
III.6.2.1.- <u>Extracto acuoso</u>	65

	<u>pag.</u>
III.6.2.2.- <u>Extracto de ácidos fenoles</u>	65
III.6.3.- DISCUSION DE RESULTADOS	68
III.7.- <u>ACTIVIDAD ANTIMITOTICA</u>	70
III.7.1.- CONDICIONES GENERALES	72
III.7.1.1.- <u>Cultivo Celular</u>	74
III.7.1.2.- <u>Tratamiento</u>	75
III.7.1.3.- <u>Fijación y Tinción</u>	75
III.7.1.4.- <u>Montaje de Preparaciones</u>	77
III.7.1.5.- <u>Determinación de los Indices Mitó-</u> <u>ticos (IM) y de Fases (IF)</u>	78
III.7.2.- EXTRACTOS A ENSAYAR	79
III.7.2.1.- <u>Extracto acuoso</u>	79
III.7.2.2.- <u>Extracto de ácidos fenoles</u>	84
III.7.3.- RECUPERACION DEL INDICE MITOTICO (IM).	88
III.7.4.- DISCUSION DE RESULTADOS	91
IV.- <u>C O N C L U S I O N E S</u>	93
V.- <u>B I B L I O G R A F I A</u>	95



Flor



Estambre



Sépalos



Ovario

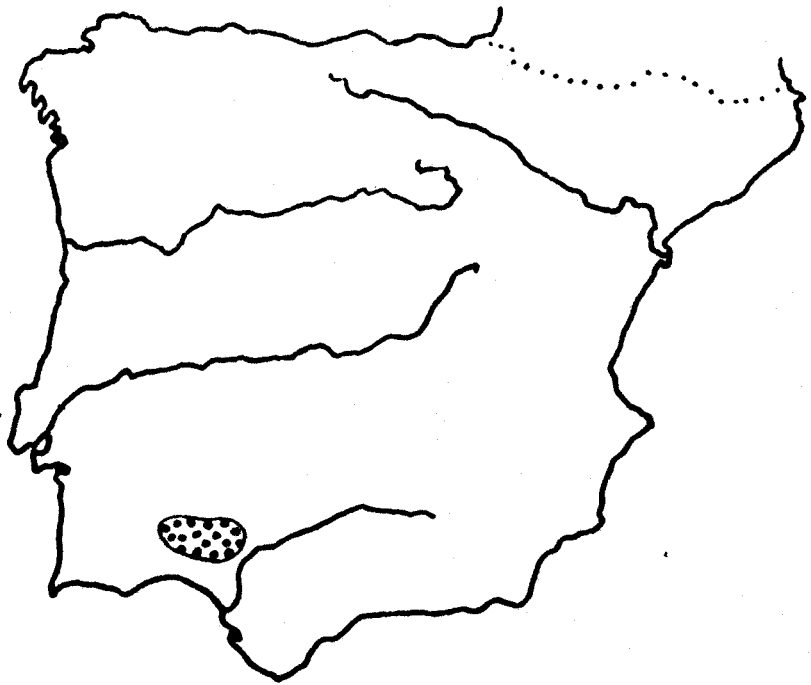


Hoja superior



Hoja inferior

Erica andevalensis Cabezudo & Ribera



Distribución General de E. andevalensis Cabezudo & Ribera

I. OBJETO

I.- OBJETO

En 1974 Cabezudo y Ribera, miembros del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de Sevilla, llevaron a cabo la recolección en la comarca del Andévalo (Huelva), de unas plantas de Erica que no recordaban a ninguna de las especies reseñadas para la provincia; su estudio detallado demostró que se trataba de una nueva especie: Erica andevalensis Cabezudo-Ribera (1), restringida exclusivamente a la citada comarca y, más concretamente, circunscrita a las cercanías de las minas de piritita de dicha región.

En diversas ocasiones ha sido puesta de manifiesto la actividad antibacteriana de algunas especies del género Erica sobre diferentes microorganismos (2,3), así como su capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de determinadas células (4,5).

En un trabajo preliminar realizado en nuestro Departamento sobre Erica andevalensis Cabezudo-Ribera, detectamos la actividad antibacteriana y cistostática de esta especie, siendo portadores de dicha actividad los extractos acuosos (6).

Habiendo comprobado que, a excepción del citado trabajo, no ha sido publicado ningún otro sobre la especie objeto de nuestro estudio, endémica en la región andaluza,

hemos creído interesante profundizar en su conocimiento.

Dado que el "screening" fitoquímico puso de manifiesto la presencia en estos extractos de compuestos polifenólicos como principios mayoritarios y teniendo en cuenta la complejidad de los mismos (ac. fenoles, taninos, flavonoides, cumarinas, etc...), hemos abordado en el presente trabajo la fracción de los ácidos fenoles, estudiando su actividad antibacteriana sobre diversos microorganismos, y su actividad citostática sobre cultivos de células vegetales.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1.- BOTANICA

III.1.1.- SITUACION TAXONOMICA

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

La familia Ericaceas abarca alrededor de 1.500 especies, de las cuales una tercera parte pertenece al género Erica, que da nombre a la familia (7).

El género está constituido por arbustos perennifolios, de pequeño a mediano tamaño. Hojas verticiladas, cortamente pecioladas, a menudo lineares o aparentemente lineares debido a los márgenes revolutos (8), capaces de replegarse en mayor o menor grado dependiendo de la humedad. Este carácter, común a otras familias (Franquiaceas), se conoce botánicamente como hojas ericoides (9). Flores vistosas, rojas, verdes o blanquecinas dispuestas en umbelas, racimos terminales, racimos axilares o umbelas más o menos reunidas en panículas o intercaladas entre las hojas no sentadas, con pedicelos de longitud variable, provistos de dos o más bracteolas. Sépalos libres, verdes o rosáceos, más cor

tos que la corola. Corola cilíndrica, campanulada o urceola da, con lóbulos de un disco (nectario discoidal); anteras - con o sin apéndice. El fruto es una cápsula loculicida (8).

II.1.2.- DESCRIPCION DE LA ESPECIE

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 u laxo en el resto, las superiores lineares totalmente revolutas, las inferiores ovaladas con la base truncada y debilmente - revolutas, dejando el envés claramente visible; al menos -- las jóvenes laxamente puberulentas y todas con pelos glandu lares de 0,2 - 0,3 mm. Flores en umbela terminal; pedicelo puberulento de 4-5 mm; bracteolas próximas al cáliz. Sépa-- los de 1,5 mm, puberulentos, pelos glandulares marginales, con 4 lóbulos revolutos. Anteras incluidas, apendiculadas. Ovario glabro, estigma capitado exerto. Fruto cápsula polis- perma; semillas de 4mm y muy numerosas.

Brezo es el nombre vulgar con que se conoce las - Ericas, aunque con este nombre suelen designarse tambien es pecies de otros géneros (Calluna y Daboecia), muy similares a las Ericas en aspecto y necesidades (10).

II.1.3.- ECOLOGIA

La familia es prácticamente cosmopolita teniendo dos áreas disyuntas con un máximo de representantes, uno en Eurasia y parte de América del Norte y otro en la región -- del Cabo (S. Africa) y Madagascar (9).

El género *Erica* es importante en el S.W. de Europa, siendo algunas de sus especies componentes destacados de los matorrales de la Península Ibérica conocidos como -- brezales (11), principalmente localizados sobre sustrato ácido y clima atlántico.

Erica andevalensis Cabezudo-Ribera se encuentra restringida a las escombreras y cercanías de las minas de -- pirita (12) de la comarca del Andévalo (Huelva), posiblemente por la necesidad de crecer en medios ácidos-turbosos, -- (pH óptimo 5,6 - 6) (10).

Todas las especies europeas de la familia *Ericaceas* que han sido investigadas, son micorrizales (8,13,14,15); es decir, sus raíces viven en asociación con los hongos del suelo, lo que supone un beneficio para ambos (15).

En el caso de las *Ericáceas* se trata de micorrizas endotróficas, viviendo el hongo en el interior de las células de la raíz huésped, por lo que las hifas no tienen contacto directo con el suelo (16). Esta asociación favore-

ce a las Ericáceas la supervivencia en hábitat bastante inhóspito, al aumentar por efecto de las micorrizas la permeabilidad de sus raíces.

En general, los seres asociados a hongos necesitan condiciones de acidez, de ahí, como hemos comentado anteriormente, casi todas las especies de Ericas requieren para vivir un suelo ácido-turboso (17). Si el suelo no es lo bastante ácido, el crecimiento será escaso y las hojas sufrirán decoloración (18).

La mayoría de las especies de esta familia son calcífugas (8), si bien algunos híbridos y cultivares pueden crecer en suelos que contengan cal en forma libre, pero no caliza sólida (10).

La relación Ca/K suele ser baja en las plantas calcífugas, sin embargo existen algunas especies de Ericáceas (19) donde dicha relación es elevada.

No son demasiado exigentes en lo que a suelo se refiere, debido principalmente a su enorme capacidad de evaporación, lo que le permite movilizar grandes cantidades de agua y obtener de esta manera, a partir de suelos muy oligotrófos los nutrientes necesarios.

Este es uno de los factores que condiciona la supervivencia de los brezales en el clima atlántico y sobre -

suelos paupérrimos, evitando la competencia con otras plantas de mayores necesidades.

II.2.- FITOQUIMICA DEL GENERO ERICA

II.2.1.- VISION GENERAL

Dentro del género Erica, se han encontrado una gran diversidad de compuestos químicos (20).

En algunas especies es común la presencia de resinas y aceites de olor muy desagradable (20); identificándose en el polen (21) de muchas de ellas, hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos (serina, histidina y cistidina).

Así mismo se ha detectado tanto en polen como en hojas, Fe, Ca, Mg, K, Na, y P, siendo relativamente elevado el contenido en Mn (21,22).

Por el contrario en las Ericaceas es muy rara la presencia de alcaloides (23), no obstante en *E. lusitánica* Rud (24), se encuentra presente la 4 metoxi-etil-amina en una proporción del 0,015%.

Los compuestos químicos mayoritarios encontrados en el género Erica, son principios fenólicos, entre ellos taninos, flavonoides, ac. fenoles y cumarinas (25,26,27,28) tanto en estado libre como formando unión heterosídica.

II.2.2.- COMPUESTOS FENOLICOS

Se puede afirmar que los compuestos fenólicos se encuentran en todos los vegetales superiores (25). El estudio de su presencia en especies vegetales, ha adquirido un gran interés (25) por sus implicaciones quimiotaconómicas y por su influencia en la fisiología de la planta.

En el cuadro que incluimos en la página siguiente, intentamos ofrecer una visión, lo más amplia y completa posible, de los compuestos fenólicos existentes en las diversas especies del género Erica (25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35).

Los compuestos fenólicos identificados en las Ericas se pueden reunir en dos grupos (29).

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

El p-hidroxibenzoico se ha encontrado ampliamente distribuido en las plantas vasculares (25).

El otro grupo (29) comprende los compuestos fenólicos que, por estar su presencia restringida a determinadas especies, son considerados de interés taxonómico.

Dentro de este segundo grupo, hay sustancias como el gentísico, hidroquinona, esculetina, escopoletina, arbutina, 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 fenólicos identificados con valor taxonómico a nivel específico, podemos citar: orcinol, ac.o-hidroxifenil-acético, kanferol , miricetina y los heterósidos de orcinol, ac.o-hidroxifenil-acético y escopoletina.

El orcinol, de acuerdo con HARBONE y WILLIAMS (31), está restringido a un número reducido de especies.

De forma análoga, el ac.o-hidroxifenil-acético sólo está presente en *E.scoparia* L., *E.vagans* L. y *E.umbellata* L. (31).

Dentro de las geninas de flavonoides, la quercetina no es un buen carácter taxonómico específico, pero sí lo son el kanferol y la miricetina.

Se ha detectado la presencia de kanferol en *E.arborea* L., *E.umbellata* L., *E.australis* L. y *E.tetralix* L. y de miricetina en *E.australis* L., *E.mackaiana* Bab., *E.vagans* L., *E.scoparia* L., *E.erigena* R.Ross y en *E.australis* L..

Según HARBONE (36), 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 (29) 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.

El heterósido de escopoletina, sólo aparece reseñado en el caso de *E.cinerea* L., destacando en esta espe--

cie su elevado contenido en escopoletina libre con respecto a otras del mismo género.

También pueden ser buenos caracteres taxonómicos los posibles heterósidos cianogenéticos presentes en *E.vagans* L., *E.scoparia* L. y probablemente en *E.umbellata* L.(29). Así mismo se ha detectado un compuesto resultante de la hidrolisis alcalina de los extractos acuosos de estas especies que parece estar relacionado con el ácido o-hidroxifenil-acético y que puede ser importante como taxón.

E.erígena R.Ross presenta además de los compuestos que son comunes en todas estas especies, miricetina como único compuesto fenólico identificado con valor taxonómico a nivel específico.

II.3.- ALELOPATIA

El fenómeno de alelopatía fué definido por MOLISCH en 1.917, como el proceso por el cual una planta desprende - al medio uno o más compuestos químicos que inhiben el crecimiento de otras plantas que viven en el mismo hábitat o en - hábitat cercano (37).

RICE (38) encuentra inhibidores del crecimiento y germinación en raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas de plantas que a ellos no les afecta, pero sí cuando actúan sobre otras especies vegetales. Es posible, que los inhibidores producidos por una especie, no actúen sobre otras directamente, sino sobre los microorganismos encargados de -- mantener en condiciones óptimas el suelo, empobreciéndolo y dificultando de esta forma el desarrollo vegetal (39).

Aparentemente, existen cuatro caminos diferentes (40) para que las plantas liberen al medio ambiente algún - compuesto:

- Lixiviación por lluvia
- Eliminación como componentes volátiles
- Acumulación de residuos vegetales en el suelo y posterior liberación de compuestos químicos
- Exudación por las raíces

Pero el hecho de que un compuesto sea liberado al medio ambiente no lleva implícito que produzca el fenómeno

de la alelopatía . Existe una serie de condicionamientos sin los cuales la alelopatía no tiene lugar. De acuerdo con HORSLEY (41), el paso de una toxina desde una planta dadora hasta la receptora (que finalmente será inhibida) deberá realizarse sin ruptura. Es decir , para que sea activa, la toxina no deberá ser absorbida por el suelo, no deberá fijarse a los ácidos húmicos, ni deberá ser metabolizada microbiológicamente.

Los productos orgánicos que producen estas inhibiciones son normalmente sustancias del metabolismo secundario de las plantas, y están representados por (37) una gran variedad de grupos orgánicos, que RICE los clasifica de la forma siguiente (41) : ácidos orgánicos sencillos solubles en agua; lactonas sencillas no saturadas; ácidos grasos de cadena larga; naftoquinonas, antraquinonas y quinonas complejas; terpenoides y esteroides; fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cinámicos y derivados; cumarinas; flavonoides y cianhidrinas.

Estudios realizados (42,43) sobre distintas especies de la familia Ericáceas, han puesto de manifiesto la existencia de inhibidores de la germinación en todas las especies examinadas, a excepción de E. arbórea L. (43). Posteriores trabajos han evidenciado el hecho de que dicho poder inhibidor pueden ser imputable a su contenido en compuestos de naturaleza fenólica (26,32,41).

Los ácidos fenoles pueden ser activadores del crecimiento a concentraciones bajas de (10^{-4} a 10^{-8} M) o inhibidores a concentraciones altas (mayor de 10^{-3} M).

Se ha ensayado con varias semillas en presencia de ácidos fenólicos (43) y comprobado que inhiben la germinación y crecimiento.

El p-hidroxibenzoico actúa como inhibidor a partir de 200 μ g/ml.

Los ácidos ferúlico y p-cumárico producen máxima inhibición; también hay que considerar los ácidos caféico y vaníllico.

Extractos de *E.arborea* L. (32) y *E.australis* L.(13, 30), han demostrado tener actividad inhibitoria sobre la germinación de semillas de *Phleum pratense* y *Trifolium repens*.

Los extractos de flores y hojas son los de más alto poder fitotóxico, donde se encuentra el ácido salicílico y gentísico (32).

También se han identificado como inhibidores alelopáticos la esculetina (44) y la escopoletina (33,41). Esta última actúa como inhibidor de la germinación de las semillas de fleo incluso a concentraciones muy bajas.

Se ha demostrado que los inhibidores alelopáticos producen inhibición del crecimiento y la división celular, forman células con núcleos tetraploides o células binucleadas, impiden la toma de minerales, retrasan la fotosíntesis, inhiben la respiración o la apertura estomática, produce -- cambios en la permeabilidad de las membranas o inhiben la -- síntesis de proteínas o de enzimas específicos; es decir, actúan como auténticos herbicidas naturales. Así algunos autores, ante el uso indiscriminado de herbicidas sintéticos y en su mayoría tóxicos para el hombre, en un intento de imitar a la naturaleza, indican la conveniencia de investigar herbicidas naturales o recolectar especies vegetales que -- sean capaces de producirlos.

Este efecto de acción alelopática ha tenido una -- gran repercusión en agricultura y, en la actualidad, aunque no desarrolladas técnicamente, existen numerosas formas en que esta acción alelopática podría ser manipuladas por el -- hombre para su beneficio en cosechas, bosques y ecosistemas acuáticos (40).

II.4.- ACCIONES FARMACOLOGICAS DE LOS FENOLES

II.4.1.- VISION GENERAL

Los fenoles tienen una marcada y variada actividad farmacológica.

El fenol se ha usado como antiséptico desde hace años. En concentraciones muy bajas (0,2 - 1%), se ha utilizado como colutorio, pero esta aplicación está en decadencia.

En la actualidad se emplea ocasionalmente en la desinfección de excrementos y como antiprurítico (45).

Los alcoholes y ácidos fenoles son fundamentalmente antisépticos (46,47), aunque algunos de ellos muestran otras acciones farmacológicas; así, el ácido salicílico es además antipirético, analgésico y antirreumático; el gálico astringente; el caféico y clorogénico, colagogos; el siríngico (48) analgésico, etc....

Las cumarinas y las drogas que las contienen, son generalmente aromatizantes. Algunas de ellas tienen propiedades fotosensibilizantes, siendo responsables de fenómenos de alergias y dermatosis.

Sin embargo, las cumarinas también son portadoras de interesantes actividades farmacológicas (49,50), el dicumarol y la warfarina (51) son anticoagulantes, el escu-

letol tiene propiedades vitamínica P, mientras que otras cumarinas a dosis elevadas, son capaces de aumentar la fragilidad capilar; algunos poseen actividad uricosúrica, las furocumarinas son ichtiotóxicas, las piranocumarinas antiespasmódicas, etc...

Los flavonoides, normalmente desprovistos de toxicidad para el hombre, presentan acciones interesantes. Poseen acción vitamínica P, por lo que algunos derivados flavonóicos, se utilizan con frecuencia en terapéutica vascular; así, la diosmina, debido a esta actividad, resulta un tratamiento muy eficaz en la retinitis diabética (52,53).

Los flavonoides del género Chondrodendron tienen actividad antihemolítica (54), y los del Citrum limonum Risso (55) actúan inhibiendo la agregación plaquetaria.

Son numerosos también los flavonoides con actividad diurética y antiespasmódica; así mismo, ciertas flavonas presentan acción estrogénica.

Las drogas con taninos tienen interés en terapéutica sobre todo por sus propiedades astringentes en uso externo y antidiarréicas en uso interno (56).

Sobre la piel y las mucosas provocan una especie de curtido, produciendo capas superficiales menos permeables y protegiendo así las capas subyacentes. A esto se une una acción vasoconstrictora de los pequeños vasos, de ahí su em-

pleo contra las hemorroides y las heridas superficiales. Los extractos tánicos son también antiinflamatorios en las quemaduras.

Al interior las drogas con taninos son empleadas como antidiarreicas ya que, a la acción ralentizante del peristaltismo intestinal, se une la acción antiséptica.

Se ha constatado que ciertos extractos tánicos como los de los Acer, inhiben el crecimiento de hongos, bacterias y virus.

Esto puede justificar el empleo de los taninos como antisépticos, especialmente en las enfermedades pulmonares.

En algunas especies (57), los taninos se han mostrado activos frente a gonorrea, hematuria y abscesos febriles.

II.4.2.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Waksman en 1947 definió los antibióticos como : "Sustancias químicas derivadas o producidas por microorganismos que, a bajas concentraciones tienen la propiedad de inhibir o destruir bacterias y otros microorganismos" (58).

En la actualidad este concepto debe ampliarse para poder incluir sustancias similares obtenidas sintética--

mente o procedentes de plantas superiores.

La utilización de materias de origen vegetal para el tratamiento de infecciones data de la antigüedad; así -- Dioscórides (siglo I d.c.), en su Tratado sobre Plantas Medicinales hace alusión a diversas especies con esta actividad (59), y refiriéndose a las Ericáceas, cita entre otras a *Arbutus unedo* L. y *Arctostaphylos uva ursi* como antisépticos de vías urinarias, prescribiéndose además la primera en disentería.

Desde el empleo del fenol a partir de 1867 por - Lister, han sido muchos los derivados fenólicos utilizados como antisépticos y desinfectantes (45).

Los compuestos fenólicos generalmente se compor--tan como germistáticos, actuando sobre bacterias, micobacterias y hongos. No suelen tener acción sobre las esporas ni los virus.

La acción se debe a la formación de complejos estables con las proteínas a las que desnaturalizan.

En general, la actividad de los compuestos fenólicos es favorecida por un pH ácido, soluciones salinas, cloruros ferrosos y férricos, detergentes aniónicos y catiónicos y alcoholes.

Sin embargo, es desfavorable la presencia de mate-

ria orgánica (leche, suero, pus...), jabones no iónicos y lípidos.

Son las familias Compuestas, Ericáceas, Labiadas, Leguminosas, Myrtáceas, Rosáceas, Rutáceas y Solanáceas, las que presentan un mayor número de especies con compuestos fenólicos, lo que les confiere actividad antiséptica.

El resumen de la revisión bibliográfica que hemos realizado se encuentra expuesto en la tabla de la página siguiente.

TABLA (II) Revisión Bibliográfica de especies con Actividad Antimicrobiana

Familia	Especie	P.a. con Actividad Antimicrobiana
Anacardiáceas	Rhus coriaria	Esteres gálico (60)
	Rhus continus	" "
Annonáceas	Annona cherimolia	Alcaloides (61)
Campanuláceas	Campanula tridentata .	Cetonas y alcaloides (62)
Cannabináceas	Cannabis sativa	Cannabinol, cannabidiol, tetrahydrocannabinol (63)
Compuestas	Achillea salicifolia ..	Aceites esenciales (64)
	Artemisa nova	" " (65)
	Artemisa tridentata ..	" " (65,66)
	Inula grandis	" " (67)
Curcubitáceas	Bryonia alba	Aceites esenciales (68)
Cupresáceas	Cupressus turula	Aceites esenciales, d-limoneno (69)
Enoteráceas	Godetia whitneyi	Quercetina (70)
Ericáceas	Arbutus unedo	Flavonoides (71)
	Arbutus menciessii	Madronina (72)
	Arctostaphylus uva-ursi	Arbutina y quercetina (73)
	Rhododendron aurium ..	Rododendrina y quercetina (70)
Gutipheráceas	Garcinia morella	Alfa y Beta gutiferina (74)
Hypericáceas	Hypericum perforatum .	Imanina, novoimanina (75,76)
Iridáceas	Kniphofia uvaria	Ac.1-8 dihidroxi-3 antraquinona (77) carboxílico
Labiadas	Melissa officinalis ..	Taninos (78)
	Mentha piperita	Aceites esenciales (79)
	Thymus vulgaris	" " (80)
Lamiáceas	Sideritis spp.	Flavonoides (81)
Leguminosas	Lupinus luteo	Luteona (82)
	Ononis natrix	Acidos fenoles (83)
	Sophora japónica	Flavonoides (84)
Litráceas	Lawsonia inermis	Ac.gálico, lausona, 1-4 nafto-quinona (85)
Myrtáceas	Eucaliptus globulus ..	Aceites esenciales (69)
	" laevopinea ..	" " (86)
	" wilkinsoniana ..	" " (86)
	Myrtus communis	" " (86)
Poligonáceas	Rheum officinalis	Hidroxiantraquinona (87)
Rosáceas	Fragaria spp.	Acidos fenoles (88)
	Pyrus communis	Polifenoles (89)
Rutáceas	Canarium euphyllum	Aceites esenciales (90)
	Citrus auriantum	" " (91,92)
Solanáceas	Solanum dulcámara	Saponinas, alcaloides (93)
	Solanum tuberosum	Alcaloides esteroidicos (94,95) escopoletina y risitina
Valerianáceas	Valeriana spp.	Aceites esenciales (96)
Zingiberáceas	Alpinia galanga	Aceites esenciales (97)
	Curcuma caesia	" " (98)

II.4.3.- ACTIVIDAD ANTIMITOTICA

Si bien en la mayoría de los casos las infecciones microbianas tienen un tratamiento etiológico, no ocurre lo mismo con las proliferaciones cancerosas, donde aún se ignora su causa exacta (99).

Debido a que el cáncer es hoy por hoy un enigma prácticamente indescifrable, es necesario luchar con todos los medios a nuestro alcance para encontrar el fundamento de su mecanismo: Las plantas pueden tener un importante papel en esta labor.

Es por ello que se está realizando un gran esfuerzo en las investigaciones, no sólo en la química de síntesis sino también en el campo de los productos naturales.

En 1950 en el National Cancer Institute (N.C.I.) HARTWEL, comenzó a inventariar plantas, a publicar durante una veintena de años listas impresionantes de especies con posible actividad anticancerosa. Esta tarea tan extensa se convirtió en ingrata; de los millares de productos investigados con test positivo, sólo se podrían ensayar clínicamente una decena de ellos, para obtener finalmente sólo uno utilizable (99).

La naturaleza química de los principios con actividad citostática es muy diversa. Podemos encontrar: lignanos

terpenoides, esteroides, pigmentos de distintos tipos, heterósidos, prótidos, alcaloides, etc... (100,101).

Entre los componentes fenólicos con actividad antimitótica cabe destacar los flavonoides (102,103) que han sido objeto de muchas revisiones en cuanto al poder antineoplásico se refiere con consideración especial de las flavonas propiamente dichas y de las chalconas.

Entre las familias con actividad antimitótica donde los responsables son flavonas destacan: Annonáceas (Uva--ria), Compuestas (Brinckellia y Pluchea), Clorantáceas (Chlo--ranthus), Cupulíferas (Fagus), Clusiáceas (Mammea y Psorosper--mum), Ericáceas (Kalmia), Euforbiáceas (Micandra), Gramí--neas (Spartina), Leguminosas (Tephrosia y Psoralea), Terebin--táceas (Anacardium), Timeláceas (Wikstroemia y Wilestroe--mia) y Rutáceas (Merrillia y Micromelum), entre otras.

Las cumarinas también han sido objeto de estudio como posibles agentes citostáticos (104), mostrándose poten--cialmente activos como tales las de Clorantáceas (Chloran--thus), Euforbiáceas (Micandra), Rutáceas (Micromelum) y Time--láceas (Wikstroemia).

Los catecoles de las Terebintáceas (Anacardium), los taninos de diversas especies (105) y el ácido gálico se encuentran también entre los compuestos fenólicos con activi--dad antineoplásica.

II.5.- ACCIONES FARMACOLOGICAS Y EMPLEOS TERAPEUTICOS DE ERICACEAS

Desde tiempo inmemorial se han atribuido a algunas especies del género Erica la propiedad de romper los cálculos urinarios; el vocablo erica significa "romper", haciendo alusión a dicha propiedad (20).

Sus constituyentes químicos le confieren propiedades antisépticas, especialmente de vías urinarias, y diuréticas (20,106,107), prescribiéndose además como antidiarreicos. Dioscórides (107) señala también su utilidad contra las mordeduras de serpientes.

En algunas especies se le atribuyen a la arbutina las acciones antisépticas y diuréticas, siendo reforzada esta última por la quercetina (73), a la cual también se le imputa actividad evacuante intestinal.

La arbutina en el organismo pasa a hidroquinona, que se elimina rápidamente por el riñón, comunicándole a la orina una coloración verde oliva.

Las propiedades astringentes de las Ericas (73, 106,108,109) se deben a su alto contenido en taninos.

Estudios realizados sobre la actividad que presentan las Ericáceas frente a microorganismos y fibroblastos, demuestran su eficaz acción inhibitoria (4).

Los extractos de algunas Ericáceas han mostrado acción antibacteriana frente a Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Mycobacterium tuberculosis (2). Se señala también una actividad fungicida contra Candida albicans y Trichophyton mentagrophytes, siendo también activa frente al crecimiento de Trichomonas vaginalis (110).

Así mismo, se ha comprobado que extractos obtenidos de polen de *E. arborea* L. (3) son activos frente a cepas de *Proteus* y *Salmonellas*.

También se encuentran datos que señalan a las Ericáceas como plantas con actividad antimicrobiana (5).

E. cinerea se prescribe como antidiarreico (109) y en infecciones renales y de vías urinarias (20,109), Habiéndose observado en casos de cistitis que cursaban con piuria, resultados idénticos e incluso superiores a los obtenidos con ciertas especies pertenecientes a otros géneros de esta familia.

En enfermedades que cursan con enteritis y cistitis de origen bacteriano, el cocimiento de la planta ejerce una acción neta: las orinas turbias y fétidas recuperan su aspecto, olor y volumen normales, produciendo además una sedación del tenesmo que acompaña a las micciones (20). Se suelen asociar con otros diuréticos y se recomienda efectuar tratamientos discontinuos (109).

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1.- MUESTRA

La especie fue recolectada en Nerva (Huelva) a finales de Octubre de 1985, en periodo de floración, desecándose a temperatura ambiente (15-25°C) con abundante aireación, 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.- "SCREENING" FITOQUIMICO

A partir de las sumidades floridas de E. andevalensis C-R, hemos llevado a cabo extracciones por maceración con tres disolventes de distintas polaridades: éter de petróleo, alcohol etílico y agua (extractos A).

Así mismo hemos realizado extracciones en caliente (al baño maría) con alcohol y con agua (extractos B).

En cada uno de los extractos obtenidos, se ha investigado la presencia de diversos grupos de compuestos de acuerdo con la solubilidad de los mismos. Para ello hemos utilizado técnicas sencillas (generalmente reacciones de precipitación o coloración), premisa importante en la realización de cualquier "screening".

III.2.1.- ESTEROLES Y TRITERPENOS

Hemos empleado la reacción de Lieberman-Burchard, (111). Se mezcla 1ml de anhídrido acético, con 1ml de cloroformo, se enfría a 0°C y se le añade 1 gota de sulfúrico -- concentrado. El reactivo así preparado se adiciona a los extractos, apareciendo coloración violeta que pasa a azul y por último a verde si el ensayo es positivo.

Resultados

	A	B
Ext ^o . en éter de petróleo	+	
Ext ^o . alcohólico ...	+	++
Ext ^o . acuoso	+	++

III.2.2.- QUINONAS LIBRES

Tras agitación con NH_4OH al 50% y posterior reposo, debe aparecer una coloración rosa, roja o violeta en caso de existir quinonas libres (112,113)

Resultados

	A	B
Ext ^o . en éter de petróleo	-	
Ext ^o . alcohólico ...	-	-

III.2.3.- QUINONAS COMBINADAS

Tratados los extractos con sulfúrico 0,1N, se llevan a ebullición, agitándolos con benceno una vez enfriados.

Separada la capa orgánica, debe dar coloración roja al tratarla con NH_4OH al 50% (112).

Resultados

	A	B
Ext ^o . en éter de petróleo	-	
Ext ^o . alcohólico ...	-	-
Ext ^o . acuoso	-	-

III.2.4.- LACTONAS PENTAGONALES INSATURADAS

Hemos ensayado la reacción de Baljet (114), específica de esta estructura.

Reactivo:

Acido pícrico (solución acuosa 1%).. 95 ml

NaOH al 10% 5ml

Añadir a los extractos III ó IV gotas del reactivo; en caso positivo deberá aparecer coloración roja.

Resultados

	A	B
Ext ^o . en éter de petróleo	-	
Ext ^o . alcohólico	-	+
Ext ^o . acuoso	+	+

III.2.5.- PIGMENTOS ANTOCIANICOS

Se adiciona ClH al 20% a los extractos y se agita con alcohol isoamílico, apareciendo una coloración rosa-a-naranjada en caso positivo (112,115)

Resultados

	A	B
Ext ^o . en éter de petróleo	-	
Ext ^o . alcohólico ...	+	+
Ext ^o . acuoso	+	+

III.2.6.- PIGMENTOS LEUCOANTOCIANICOS

Tratados los extractos con ClH en caliente, dan coloración rojo-violáceo intensa por la formación de una an

tocianina (116).

Resultados

	A	B
Ext ^o . en éter de petróleo	+	
Ext ^o . alcohólico ...	+	+
Ext ^o . acuoso	+	+

III.2.7.- PRINCIPIOS POLIFENOLICOS

Hemos utilizado la reacción con cloruro férrico, típica de estos compuestos (117).

Se adicionan unas gotas de reactivos a los diferentes extractos, originándose coloraciones azul o negra con los polifenoles.

Resultados

	A	B
Ext ^o . alcohólico ...	++	+++
Ext ^o . acuoso	++	+++

III.2.7.1.- Taninos

Taninos Catéquicos

Reacción de Stiasny (118).

Se adiciona unas cuantas gotas de ClH concentrado y 1 ml de solución de formaldehido al extracto tánico, sometiéndolo a ebullición varios minutos. Los taninos catéquicos precipitan en caliente.

Reaccion con Agua de Bromo (119).

Al extracto tánico se le adicionan unas gotas de acético y, gota a gota, agua de bromo; los taninos catéquicos precipitan rapidamente.

Resultados

	A	B
Extº. alcohólico	++	+++
Extº. acuoso	++	+++

Taninos Pirogálicos

En los filtrados procedentes de la experiencia anterior, tras separar los precipitados, se ha investigado la presencia de taninos pirogálicos por adición de Cl_3Fe (118).

Resultados

	A	B
Ext ^o . alcohólico	-	-
Ext ^o . acuoso	-	-

III.2.7.2.- Flavonoides

Para la investigación de flavonoides, hemos realizado la reacción de la cianidina (120).

Se adicionan a los extractos unas gotas de ClH al 10% y cinta de magnesio. La aparición de un color rosa, que lentamente pasa a rojo, indica resultado positivo.

Resultados

	A	B
Ext ^o . alcohólico	++	+++
Ext ^o . acuoso	+	+++

III.2.7.3.- Cumarinas

Al depositar los extractos en una tira de papel de filtro, la observación de fluorescencia a la luz ultravioleta, indica la presencia de cumarinas (121).

Resultados

	A	B
Ext ^o . en éter de petróleo	-	
Ext ^o . alcohólico ..	-	-
Ext ^o . acuoso	+	+

III.2.8.- COMPUESTOS NITROGENADOS

Hemos ensayado una serie de reactivos de precipitación específicos de estas sustancias (122,123), tales como Bouchardat, Dragendorff, Mayer y ácido pícrico. En presencia de compuestos nitrogenados se formarán precipitados pardo, rojizo, blanco y amarillo respectivamente.

Resultados

	Ext ^o . Etéreo		Alcohólico		Acuoso	
	(f)	(c)	(f)	(c)	(f)	(c)
Bouchardat ..	-	-	+	+	-	-
Dragendorff .	-	-	+	+	-	-
Mayer	-	-	-	-	-	-
Ac. pícrico .	-	-	-	-	-	-

(f): extracción en frío

(c): extracción en caliente.

III.2.8.1.- Alcaloides

Se ha realizado el Método de Cabo Torres (116).

Se trata de una reacción muy sensible que da positiva con la casi totalidad de los alcaloides. Entre las excepciones podemos citar las bases xánticas y los derivados bencil-alquilaminas.

Se deposita el extracto en una tira de papel de filtro con ayuda de un capilar y en concentraciones crecientes; tras evaporar el disolvente, se sumerge la tira en el reactivo de Dragendorff en la modificación de Munier-Macheboeuf, secándola después al aire.

Si los extractos contienen alcaloides, aparecerá en los lugares donde se depositaron, unas manchas rojizas sobre fondo amarillo claro.

Resultados

	A	B
Ext ^o . en éter de petróleo	-	
Ext ^o . alcohólico	-	-
Ext ^o . acuoso	-	-

TABLA (III): Resultados del "Screening" Fitoquímico.

	MACERACION			EXTRACCION EN CALIENTE	
	Ext ^o . Eter petróleo	Ext ^o . Alcohólico	Ext ^o . Acuoso	Ext ^o . Alcohólico	Ext ^o . Acuoso
ESTEROLES Y TRITERPENOS	+	+	+	++	++
QUINONAS LIBRES	-	-		-	
QUINONAS COMBINADAS	-	-	-	-	-
LACTONAS PENTAGONALES					
INSATURADAS	-	-	+	+	+
PIGMENTOS ANTOCIANICOS	-	+	+	+	+
PIGMENTOS LEUCOANTOCIANICOS	+	+	+	+	+
TANINOS		++	++	+++	+++
FLAVONOIDES		++	+	+++	+++
CUMARINAS	-	-	+	-	+
ALCALOIDES	-	-	-	-	-

(+++): reacción fuertemente positiva, (++): reacción positiva,

(+): reacción debilmente positiva, (-): reacción negativa

II.2.9.- DISCUSION DE RESULTADOS

De los resultados obtenidos en el "screening" fitoquímico, se deduce la ausencia en la muestra en estudio de quinonas y alcaloides.

Hemos puesto de manifiesto: esteroides, triterpenos, lactonas pentagonales insaturadas, pigmentos antocianicos y leucoantocianicos, flavonoides, cumarinas y taninos.

III.3.- EXTRACCION DE ACIDOS FENOLES

Se ha llevado a cabo por el método de Lescao y col. ligeramente modificado (124).

Las sumidades floridas fueron extraídas al 10% con agua acidulada con ClH hasta pH ácido (aproximadamente 1), manteniéndolas en maceración durante 15 minutos. El rendimiento de la extracción fué del 9,76%.

El extracto acuoso así obtenido se sometió a un proceso de purificación, para lo cual, fue tratado con una solución acuosa de CO_3HNa al 2% con lo que los ácidos fenoles libres son solubilizados al estado de sales de sodio. Después de la posterior acidificación, son liberados de su combinación y pueden ser de nuevo extraídos por el éter(125) obteniéndose finalmente un residuo de ácidos fenoles, que representa el 0,097% y al cual solubilizamos en etanol.

En realidad esta purificación no es tan simple como pudiera parecernos ya que, si la solución de bicarbonato no alcaliniza suficientemente, los ácidos no se extraen en su totalidad; si por el contrario el pH es excesivamente elevado, los fenoles que tienen un caracter ácido débil, pasan al medio acuoso.

El proceso esquematizado, se encuentra representado en la figura (1) de la página siguiente.

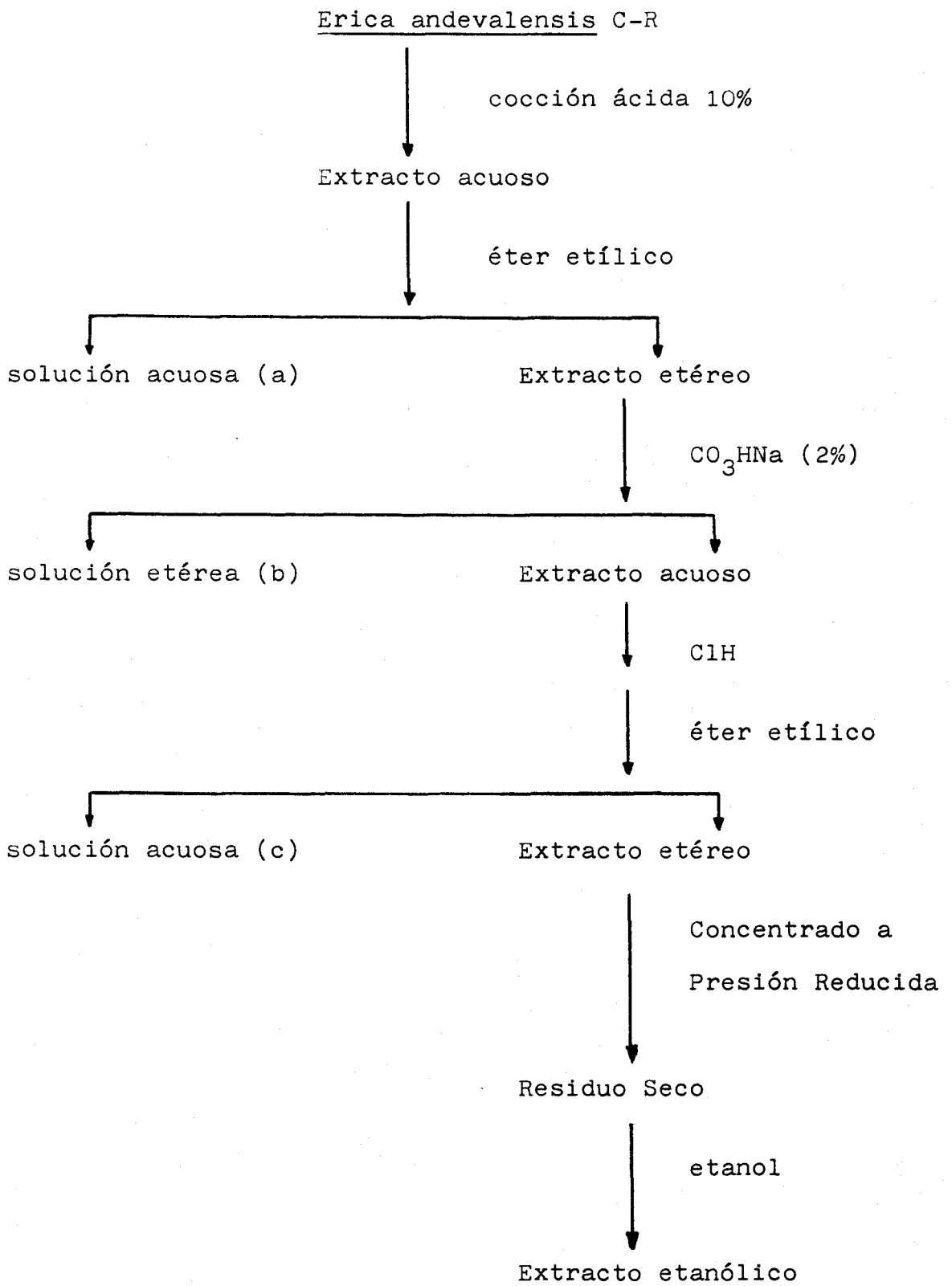


Fig. (1)

III.4.- IDENTIFICACION DE ACIDOS FENOLES POR CROMATOGRAFIA

La identificación la hemos llevado a cabo utilizando productos puros como patrones internos, realizando las experiencias en diversas fases móviles para evitar coincidencias de Rf de productos distintos.

Además de los valores de Rf, nos hemos servido para la identificación de las coloraciones obtenidas tras un primer revelado con p-Nitroanilina diazotada, seguida de una segunda pulverización con una solución de CO_3Na_2 al 15%.

Hemos desarrollado nuestras experiencias en las siguientes condiciones cromatográficas generales:

FASES MOVILES:

- (a) Acido fórmico al 2% (126)
- (b) Acido acético al 2% (126,127,128,129,130)
- (c) Acido acético al 15% (131)
- (d) Acido clorhídrico 0,1N (126,128)
- (e) Benceno/acético/agua 60:22:12 (132)

REVELADORES:

Luz U.V.

p-Nitroanilina diazotada + CO_3Na_2 15% (133)

III.4.1.- CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Soporte papel Whatman nº1

Método monodimensional descendente

FASES MOVILES:

(a) Acido fórmico al 2% (126)

(b) Acido acético al 2% (126,127,128,129,130)

REVELADORES

Luz U.V.

p-Nitroanilina diazotada+CO₃Na₂ 15% (133)

Los resultados de la cromatografía en papel se re
cogen en las tablas IV y V de las páginas siguientes.

TABLA (IV): Valores medios de Rf y coloraciones obtenidas con los distintos patrones en las fases móviles (a) y (b)

Patrones	Rf		p-Nitroanilina diazotada + CO ₃ Na ₂ al 15%
	(a)	(b)	
Ac.gentísico	0,55	0,80	amarillo - pálido
Ac.pirogálico	0,68	0,70	pardo - marrón
Ac.m-hidroxibenzoico	0,62	0,68	rosa
Ac.p-hidroxibenzoico	0,64	-	rosa
Ac.m-cumárico	0,44	0,63	rosa
Ac.vaníllico	0,54	0,53	morado
Ac.gálico	0,40	0,40	pardo - naranja
Ac.p-cumárico	0,39	0,10	azul

(a) Acido fórmico al 2%

(b) Acido acético al 2%

TABLA (V): Valores medios de Rf y coloraciones obtenidas con el extracto de ácidos fenoles en las fases móviles (a) y (b).

	Rf		p-Nitroanilina diazotada + CO ₃ Na ₂ al 15%
	(a)	(b)	
Extracto de ácidos fenoles de <u>E. andevalensis</u>	0,57	0,61	rosa
	0,52	0,61	amarillo - pálido
	0,51	0,55	morado
	0,46	0,51	azul - violeta
	-	0,49	amarillo
	0,40	0,46	naranja
	0,31	0,37	pardo

(a) Acido fórmico al 2%

(b) Acido acético al 2%

III.4.2.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Soporte celulosa microcristalina de Merck
(250 μ)

FASES MOVILES:

- (a) Acido fórmico al 2% (126)
- (b) Acido acético al 2% (126,127,128,129,130)
- (c) Acido acético al 15% (131)
- (d) Acido clorhídrico 0,1N (126,128)
- (e) Benceno/acético/agua 60:22:12 (132)

REVELADORES:

Luz U.V.

p-Nitroanilina diazotada + CO_3Na_2 15% (133)

En la tabla VI de la página siguiente, se exponen los R_f de los distintos compuestos puros utilizados como patrones internos, así como las coloraciones obtenidas tras revelar con p-Nitroanilina diazotada + CO_3Na_2 al 15%.

Así mismo, la tabla VII de la página 47, expresa los mismos parámetros para los componentes de nuestro extracto.

TABLA (VI): Valores medios de Rf y coloraciones obtenidas con los distintos patrones ensayados en las fases móviles (a),(b),(c),(d),(e).

Patrones	Rf					p-Nitroanilina diazo- tada + CO ₃ Na ₂ al 15%
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	
Ac.pirogálico	-	0,67	-	-	0,02	pardo - marrón
Ac.salicílico	-	0,66	0,75	-	0,73	amarillo
Ac.p-hidroxibenzoico .	0,61	0,65	0,78	-	0,23	rosa
Ac.m-hidroxibenzoico .	-	0,63	0,74	-	-	rosa
Ac.gentísico	0,54	0,56	0,67	-	0,08	amarillo-pálido
Ac.vaníllico	0,47	0,49	0,73	0,47	0,54	morado
Ac.siríngico	0,46	0,44	0,65	0,41	0,48	azul
Ac.clorogénico	0,45	-	-	-	-	pardo
Ac.protocatéquico	-	0,44	-	0,41	0,03	púrpura
Ac.isovaníllico	-	0,44	-	0,46	0,42	morado
Ac.p-cumárico	0,27	0,27	0,46	-	0,29	azul
Ac.m-cumárico	0,28	0,33	-	-	0,24	rosa
Ac.caféico	0,20	-	-	-	0,03	celeste
Ac.ferúlico	0,17	-	0,47	-	0,54	azul
Ac.gálico	-	0,33	0,47	-	-	pardo-naranja
Orcinol	-	-	-	-	0,15	naranja

(a) Acido fórmico 2%

(b) Acido acético 2%

(c) Acido acético 15%

(d) Acido clorhídrico 0,1N

(e) Benceno/acético/agua

60:22:12

TABLA (VII): Valores medios de Rf y coloraciones obtenidas con el extracto de ácidos fenoles en las fases móviles (a),(b),(c),(d),(e).

	Rf					p-Nitroanilina diazo- tada + CO ₃ Na ₂ al 15%
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	
Extracto de ácidos fenoles de <u>E.ande-</u> <u>valensis</u>	0,61	0,54	0,70	0,51	0,23	rosa
	0,54	0,53	0,69	0,48	0,08	amarillo-pálido
	-	-	0,66	-	-	verde
	0,47	0,48	0,62	0,46	0,54	morado
	0,46	0,47	-	0,45	-	amarillo
	0,44	0,43	-	0,40	0,50	azul-violeta
	-	-	0,59	-	0,03	púrpura
	0,36	0,35	0,54	0,36	0,06	naranja
	-	-	0,47	-	0,28	azul
	-	-	-	-	0,17	violeta

(a) Acido fórmico 2%	(c) Acido acético 15%	(e) Benceno/acético/agua
(b) Acido acético 2%	(d) Acido clorhídrico 0,1N	60:22:12

Exponemos a continuación algunas de las imágenes cromatográficas obtenidas en los distintos ensayos.

CROMATOGRAMA I: F.M.= Benceno/acético/agua (60:22:12)

Rev.= p-Nitroanilina diazotada + CO_3Na_2 al 15%

P= Protocatéquico, M+P= Ext^o.enriquecido con protocatéquico, M= Ext^o.ácido fenoles

PHB= p-Hidroxiben. M+PHB= Ext^o.enriquecido con p-hidroxiben. M= Ext^o.ácido fenoles

S= Siríngico, M+S= Ext^o.enriquecido con siríngico, M= Ext^o.ácido fenoles

V= Vanílicico, M+V= Ext^o.enriquecido con vanílicico, M= Ext^o.ácido fenoles

G= Gentísico, M+G= Ext^o.enriquecido con gentísico, M= Ext^o.ácido fenoles

Iv= Isovanílicico

CROMATOGRAMA II: F.M.= Benceno/acético/agua (60:22:12)

Rev.= p-Nitroanilina diazotada + CO_3Na_2 al 15%

Pc= p-Cumárico, M+Pc= Ext^o.enriquecido con p-cumárico, M= Ext^o.ácido fenoles

C= Caféico, M+C= Ext^o.enriquecido con cafeico, M=Ext^o.ácido fenoles

P= Pirogálico, M+P= Ext^o.enriquecido con pirogálico, M= Ext^o.ácido fenoles

O= Orcinol, M+O= Ext^o.enriquecido con orcinol, M= Ext^o.ácido fenoles

CROMATOGRAMA III: F.M.= Ac.acético al 2%

Rev.= p-Nitroanilina diazotada + CO_3Na_2 al 15%

S= Siríngico, M+S= Ext^o.enriquecido con siríngico, M= Ext^o.ácido fenoles

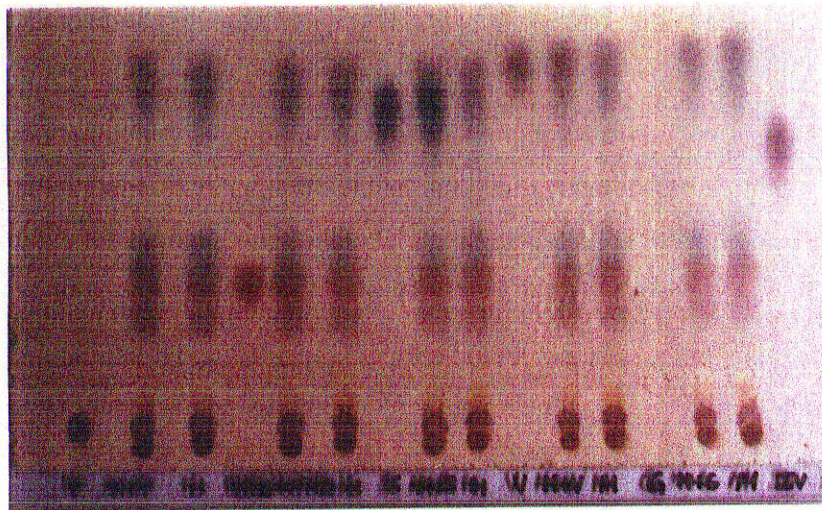
P= Protocatéquico, M+P= Ext^o.enriquecido con protocatéquico, M= Ext^o.ácido fenoles

V= Vanílicico, M+V= Ext^o.enriquecido con vanílicico, M= Ext^o.ácido fenoles

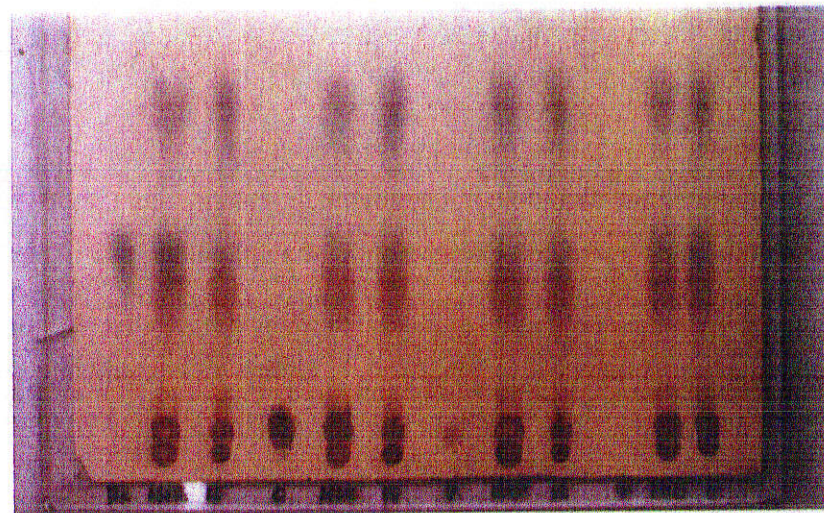
CROMATOGRAMA IV: F.M.= Ac.acético al 2%

Rev.= Luz U.V.

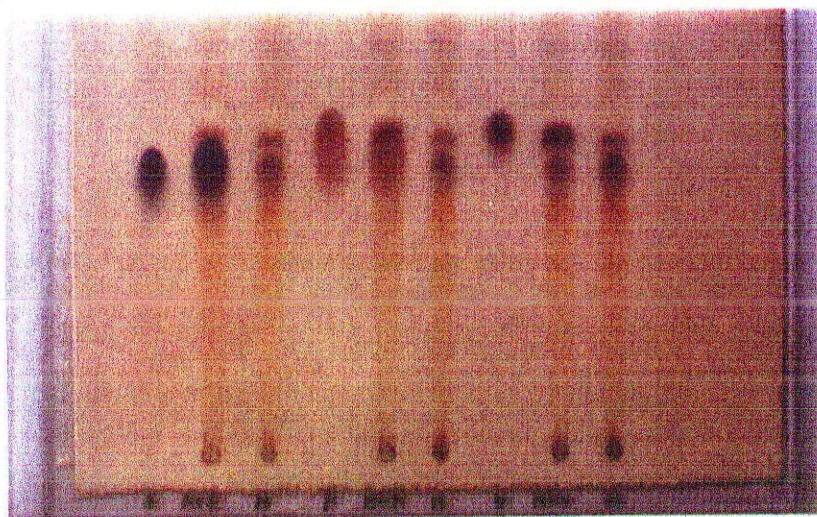
G= Gentísico, M+G= Ext^o.enriquecido con gentísico, M= Ext^o.ácido fenoles



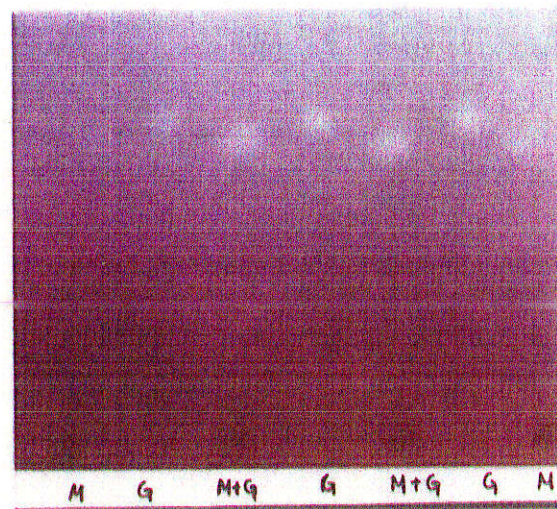
CROMATOGRAMA I



CROMATOGRAMA II



CROMATOGRAMA III



CROMATOGRAMA IV

III.4.3.- DISCUSION DE RESULTADOS

Entre las fases móviles ensayadas se seleccionaron cinco: ac.fórmico 2%, ac.acético 2%, ac.acético 15%, ac.clor_hídrico 0,1N y benceno/acético/agua (60:22:12), por haberse obtenido con ellos una mayor separación de los componentes.

En todas las fases móviles se ha podido comprobar la coincidencia, tanto de color como de R_f, de algunos de los componentes de nuestro extracto problema con patrones puros del mercado.

Los resultados conseguidos con las cuatro primeras fases móviles indicadas son muy similares, solapándose en todas ellas p-hidroxibenzoico con gentísico y siríngico con protocatéquico.

Sin embargo, con benceno/acético/agua (60:22:12) se obtiene una buena resolución para todos los ácidos fenoles presentes en la muestra en estudio.

Con los reveladores seleccionados, todos los componentes son fácilmente identificables, exceptuando el ac.gentísico que con p-nitroanilina diazotada + CO₃Na₂ al 15% da una coloración amarillo - pálido que no destaca sobre el fondo del cromatograma; sin embargo, este componente presenta una fuerte fluorescencia a la luz U.V..

Este hecho nos permite deducir la presencia en la muestra problema de los siguientes ácidos: p-hidroxibenzoico, gentísico, vaníllico, siríngico, p-cumárico y protocatéquico.

III.5.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ACIDOS FENOLES POR
ESPECTROFOTOMETRIA DE U.V.-VISIBLE.

III.5.1.- AISLAMIENTO

Para el aislamiento de los distintos ácidos fenólicos hemos utilizado la cromatografía preparativa en las siguientes condiciones:

Soporte celulosa microcristalina de Merck
(250 μ)

FASES MOVILES:

- (a) Acido fórmico al 2% (126)
- (b) Acido acético al 2% (126,127,128,129,130)
- (c) Acido acético al 15% (131)
- (d) Acido clorhídrico 0,1N (126,128)
- (e) Benceno/acético/agua 60:22:12 (132)

REVELADORES:

Luz U.V.

p-Nitroanilina diazotada + CO_3Na_2 15% (133)

Las bandas correspondientes a los componentes a estudiar, son eluidas con etanol de 96°, consiguiéndose así soluciones alcohólicas que fueron sometidas a un estudio cromatográfico en capa fina, lo que nos confirmó la existencia de un solo compuesto en cada eluato.

III.5.2.- IDENTIFICACION

Para contribuir a la identificación de estos compuestos realizamos un estudio espectrofotométrico al U.V. de cada uno de los eluatos obtenidos, operando frente a soluciones en etanol de 96° de los patrones correspondientes a los ácidos fenoles identificados previamente por cromatografía en papel y capa fina (aptdo. III.4).

Este estudio se ha llevado a cabo en un espectrofotómetro PERKIN-ELMER U.V./ VIS. de doble haz, modelo Lambda-3, con registrador incorporado, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor.

En la tabla VIII se indican las bandas de absorción a las distintas λ máximas de los diferentes compuestos (problemas y patrones).

Los espectros correspondientes aparecen en las figuras 2,3,4,5 y 6.

TABLA (VIII): λ máx. correspondientes a los Eluatos problemas y Soluciones patrones

Espectros al U.V. en alcohol de 96°

	<u>λ máximas (nm)</u>	<u>Soluciones Patrones</u>	<u>Eluatos Problemas</u>
Ac. p-hidroxibenzoico	252	máximo	máximo
Ac. vanílico	255	máximo	máximo
	289	máximo	máximo
Ac. protocatéquico	259	máximo	máximo
	294	máximo	máximo
Ac. siríngico	271	máximo	máximo
Ac. p-cumárico	220	sobrehombro	sobrehombro
	282	máximo	máximo
	306	sobrehombro	sobrehombro

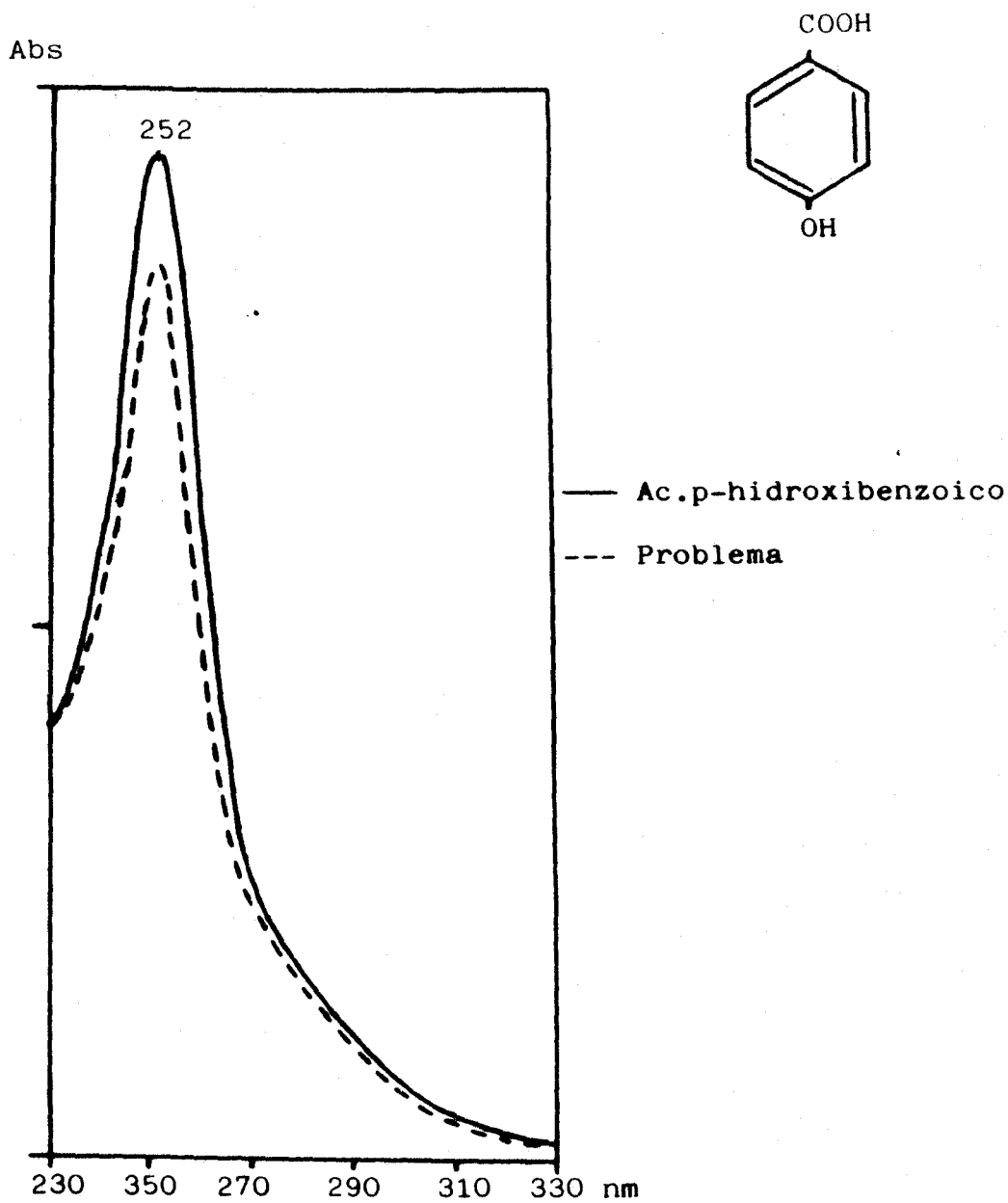
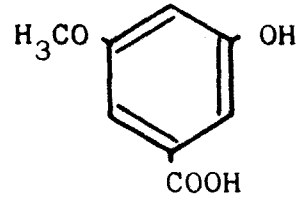
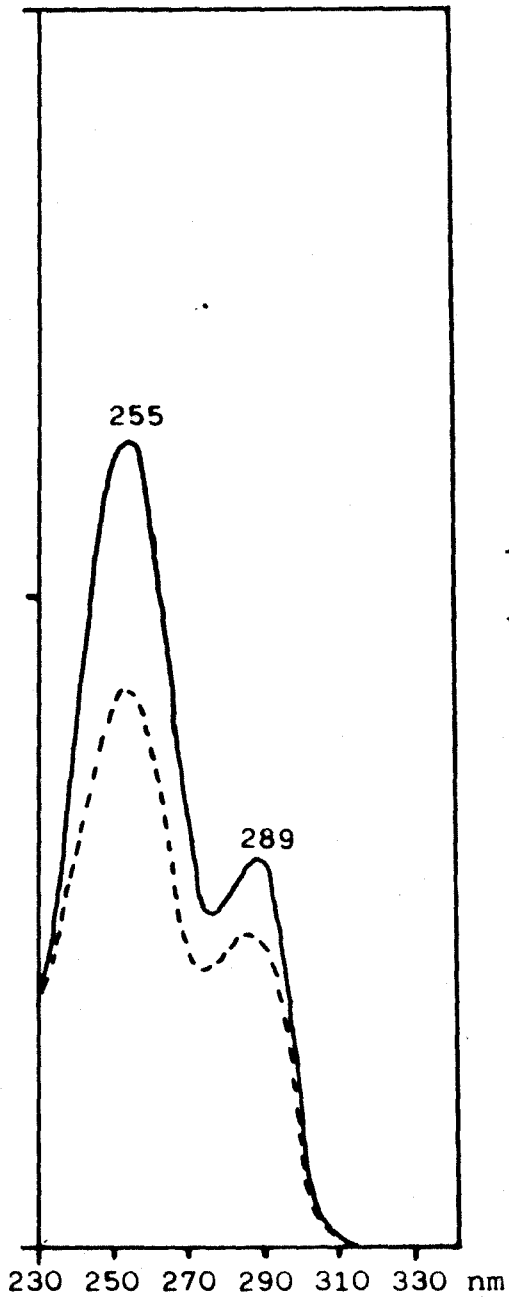


Fig. (2)

Espectro del Ac. P-HIDROXIBENZOICO

Abs

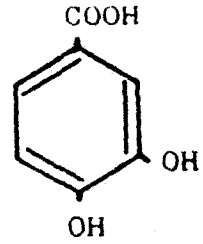
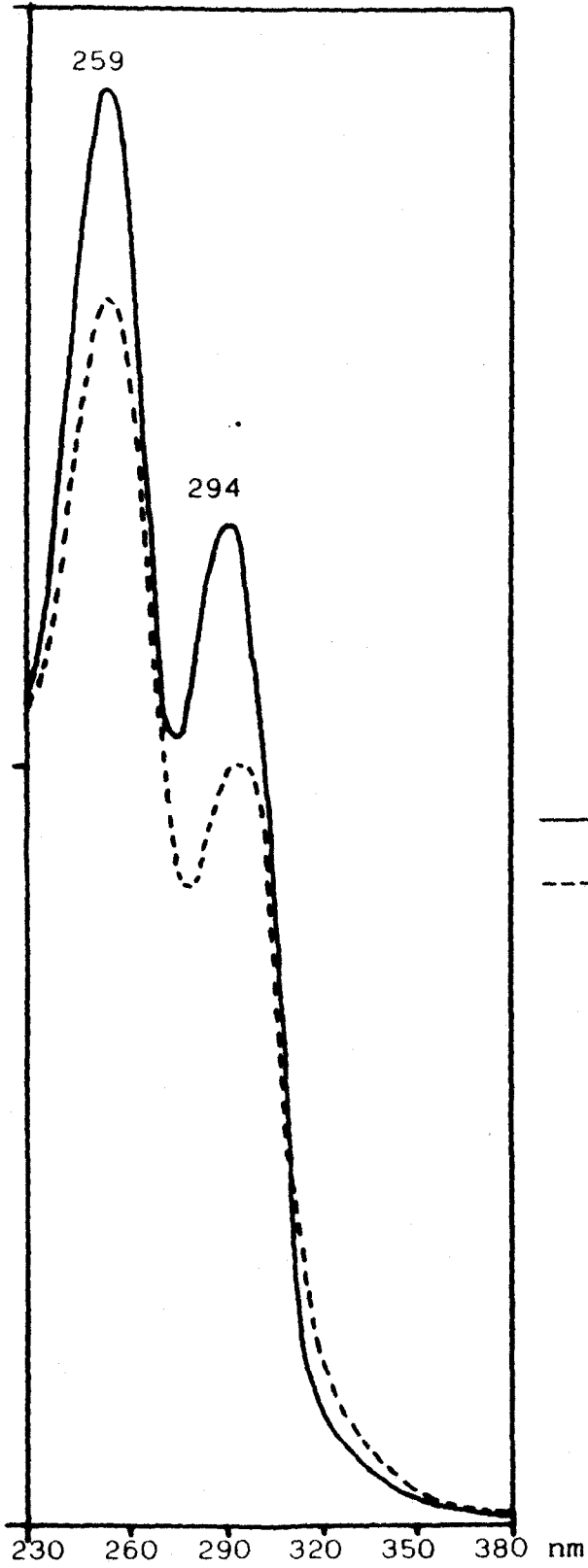


— Ac. vanillico
- - - Problema

Fig. (3)

Espectro del Ac. VANILLICO

Abs



— ac. protocatéquico

--- Problema

Fig. (4)

Espectro del Ac. PROTOCATEQUICO

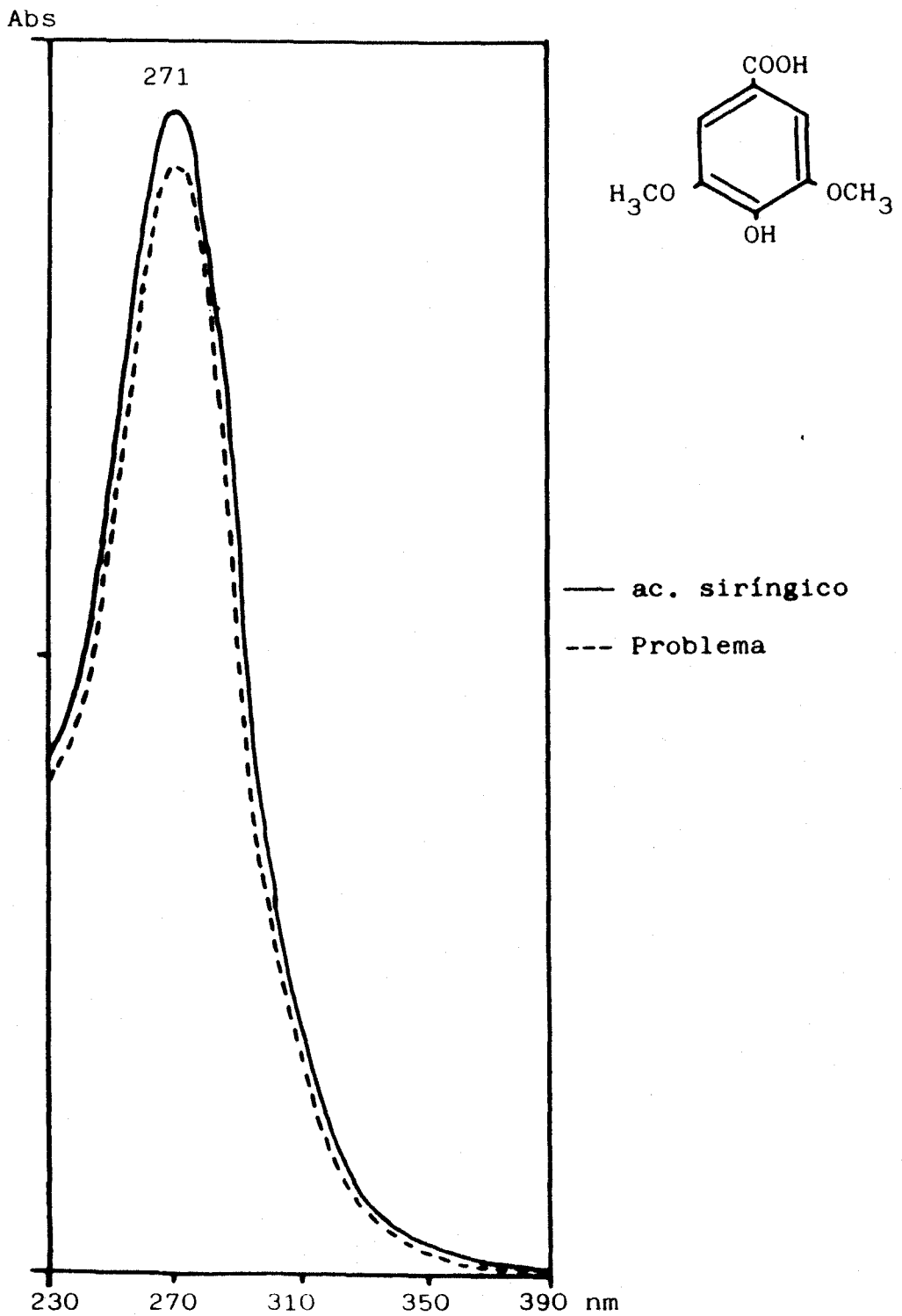


Fig. (5)

Espectro del Ac. SIRINGICO

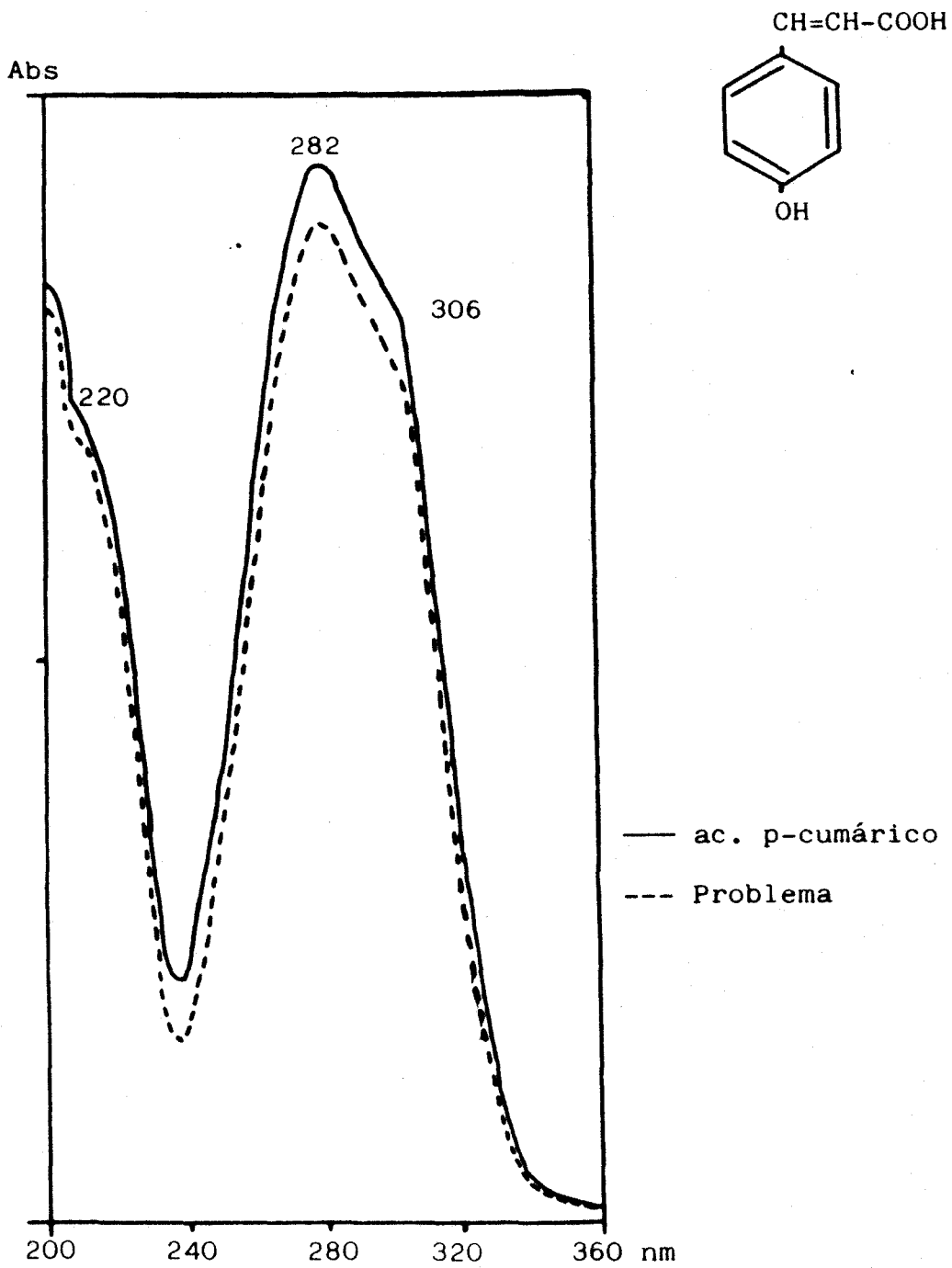


Fig. (6)

Espectro del Ac. p-CUMARICO

III.5.3.- DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos mediante el estudio espectrofotométrico U.V./ VIS. , nos ponen de manifiesto que los principios aislados por cromatografía preparativa, muestran el mismo comportamiento que los ácidos p-hidroxibenzoico, vaníllico, protocatéquico, siríngico y p-cumárico, lo que confirma los datos obtenidos en el estudio cromatográfico.

La presencia de ácido gentísico en E. andevalensis no pudo ser ratificada por espectrofotometría U.V. dada la gran dificultad para aislar este compuesto.

III.6.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para ensayar la actividad antimicrobiana, se han determinado los halos de inhibición (134) que provocan los extractos de la droga en el crecimiento de los microorganismos investigados.

En nuestro trabajo hemos seguido la técnica de Kirby-Bauer (134).

Experimentamos diferentes dosis de extractos, sobre distintos microorganismos y observamos la presencia o no de halos de inhibición.

III.6.1.- CONDICIONES GENERALES DE LA EXPERIENCIA

III.6.1.1.- Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado para realizar el ensayo de actividad antimicrobiana, es el de Müller-Hinton.

Para la preparación del mismo, se rehidrata suspendiendo 38g de éste en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta temperatura de ebullición para disolver el medio por completo. Se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C (135).

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 en la placa 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.

III.6.1.2.- Preparación del Inóculo

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

Si no se controla la concentración bacteriana - del inóculo (135) se pueden producir significativas variaciones en el tamaño de las zonas de inhibición.

III.6.1.3.- 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 Müller-Hinton; a fin de cubrir uniformemente toda su superficie, se estría con el hisopo al menos en tres direcciones (137), girando la placa sucesivamente en ángulos de, aproximadamente, 60°.

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

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

Por ello, en nuestras experiencias los discos impregnados con los extractos, se llevaron a estufa a 60° durante 30 min. con el fin de evaporar el disolvente.

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

La colocación se ha hecho manualmente con una pinza estéril. Los discos se presionan suavemente sobre la superficie con la punta de la pinza, para asegurar un con-

tacto firme con el agar, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

III.6.1.4.- Incubación

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 37°C de 18 a 24 h.

III.6.1.5.- Determinación de los halos de inhibición

Tras el conveniente periodo de incubación, aparecen las zonas de inhibición alrededor de los discos impregnados con nuestros extractos.

Los diámetros de estas zonas se deben medir cuidadosamente (135) por la parte posterior de la placa, utilizándose una fuente de luz transmitida.

Se pueden emplear calibres móviles y graduados, reglas marcadas en milímetros o plantillas especialmente preparadas.

III.6.1.6.- Microorganismos ensayados

	<u>Bacillus subtilis</u> ATCC6633
	<u>Bacillus megaterium</u> ATCC 33085
	<u>Bacillus cereus</u> ATCC 14579
GRAM (+)	<u>Staphylococcus epidermidis</u> (aislado clinicamente)
	<u>Staphylococcus aureus</u> (aislado clinicamente)
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> (aislado clinicamente)
	<u>Proteus mirabilis</u> (aislado clinicamente)
GRAM (-)	<u>Proteus morganii</u> (aislado clinicamente)
	<u>Serratia marcescens</u> (aislado clinicamente)
	<u>Escherichia coli</u> (aislado clinicamente)
HONGOS	<u>Candida albicans</u> (aislado clinicamente)

III.6.2.- EXTRACTOS A ENSAYAR

III.6.2.1.- Extracto acuoso

Hemos operado con el extracto acuoso ácido inicial de la extracción de ácidos fenoles (aptdo. III.3), en las siguientes dosis:

<u>Extracto</u>	<u>Residuo seco(mg)</u>	<u>Droga(mg)</u>
5 λ	0,5	4,5
10 λ	1	9
15 λ	1,5	13,5
20 λ	2	18

III.6.2.2.- Extracto de ácidos fenoles

Extracto etanólico de ácidos fenoles obtenido por el método de Lescao modificado (aptdo. III.3)(124).

En los ensayos realizados con este extracto hemos utilizado unas concentraciones de residuo seco inferiores a las del extracto acuoso ácido, ya que su equivalencia en droga es muy superior.

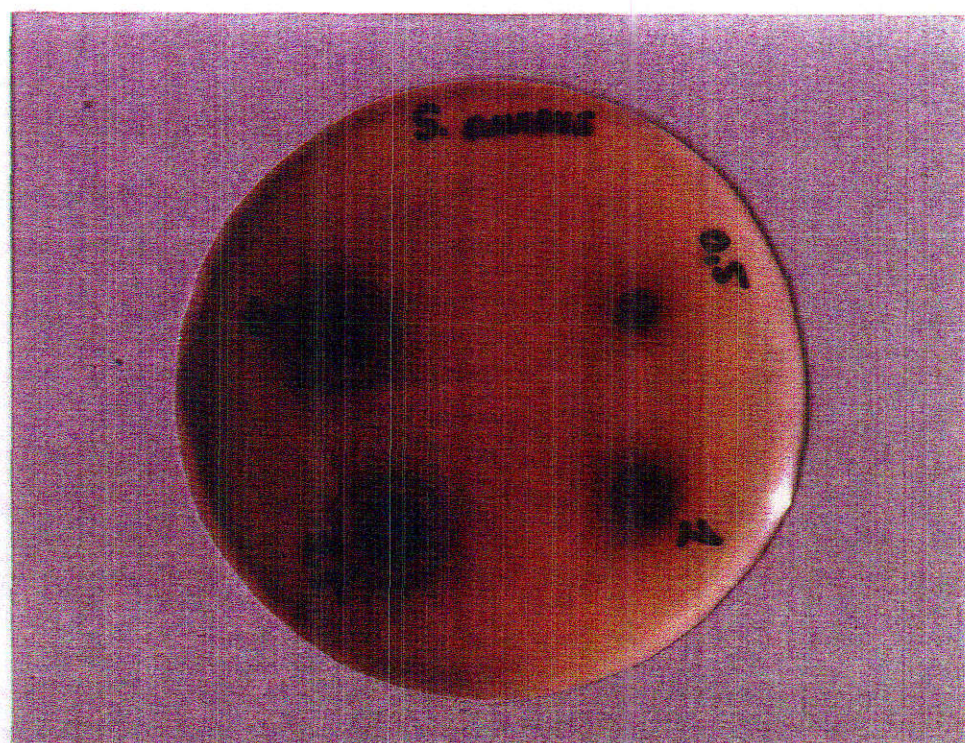
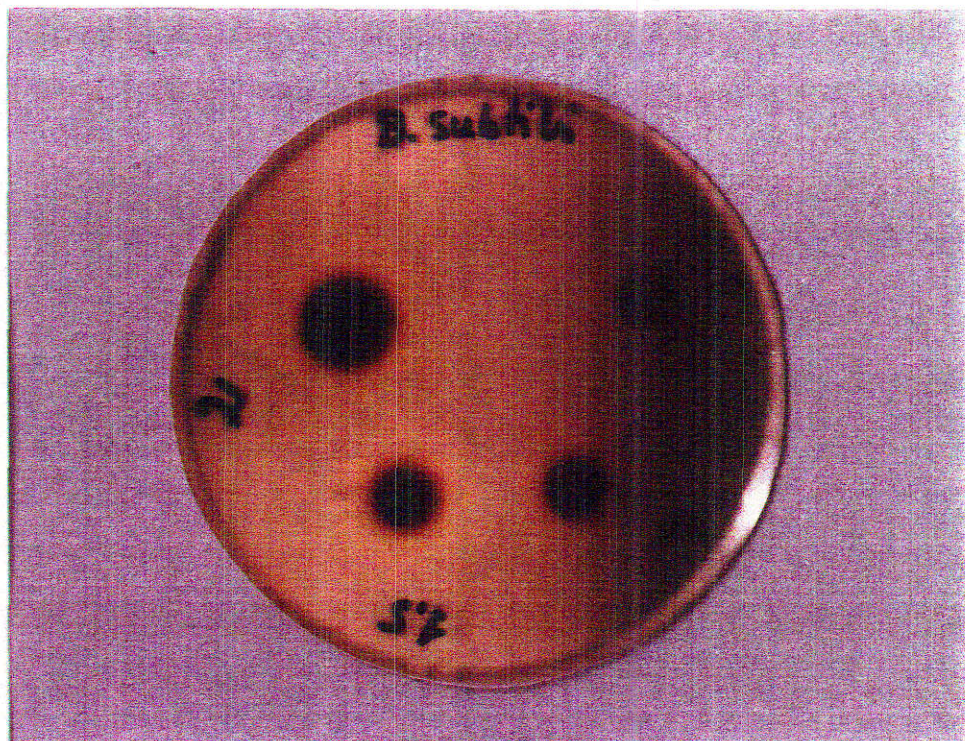
<u>Extracto</u>	<u>Residuo seco(mg)</u>	<u>Droga(mg)</u>
10 λ	0,25	260
20 λ	0,5	520
30 λ	0,75	780
40 λ	1	1.040

TABLA (IX): Halos de inhibición (mm) del EXTRACTO ACUOSO ACIDO

	Residuo seco			
	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
<u>GRAM (+)</u>				
B. subtilis	10,6	13,6	16,3	18,6
B. megaterium	10,3	12,3	13	15
B. cereus	7,6	9,6	10,6	11
S. epidermidis	10,6	12	12	12
S. aureus	8	10,3	13	14
<u>GRAM (-)</u>				
P. aeruginosa	-	6,5	9	10
P. mirabilis	6	6,6	8	9,6
P. morgani	6	6	7	9
S. marcescens	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-
<u>Hongos</u>				
Candida albicans	-	5,9	6	6,2

TABLA (X): Halos de inhibición (mm) del EXTRACTO ETANOLICO DE ACIDOS FENOLES

	Residuo seco			
	0,25 mg	0,50 mg	0,75 mg	1 mg
<u>GRAM (+)</u>				
B. subtilis	6	7,3	9	9,3
B. megaterium	6,3	7	7,6	8
B. cereus	6	6,5	7	8
S. epidermidis	-	6,6	8,6	9,6
S. aureus	-	6	6,5	7
<u>GRAM (-)</u>				
P. aeruginosa	-	6	6,3	7
P. mirabilis	6	6,5	7	7
P. morgani	-	-	6,5	7,1
S. marcescens	-	-	6	7
E. coli	-	-	-	-
<u>HONGOS</u>				
Candida albicans	-	-	6	6



Actividad antimicrobiana del Ext^o acuoso ácido a las distintas concentraciones ensayadas.

III.6.4.- DISCUSION DE RESULTADOS

A la vista de los resultados obtenidos, podemos observar que ambos extractos presentan actividad antimicrobiana, especialmente frente a organismos Gram (+).

La menor actividad del extracto de ácidos fenoles nos induce a pensar que, si bien contribuyen a dicha actividad, no son los únicos responsables de la misma.

Cabe destacar, sin embargo, que S. marcescens se muestra sensible solamente a las concentraciones más altas ensayadas de ácidos fenoles.

Para detectar en que estadio del proceso de purificación de ácidos fenoles se han perdido otros componentes con actividad antimicrobiana, hemos llevado a cabo un ensayo con los distintos extractos desechados en dicho proceso:

- Solución acuosa (a)
- Solución etérea (b)
- Solución acuosa (c)

La experiencia se ha realizado frente a B. subtilis, por haberse mostrado como uno de los microorganismos más sensibles a los principios activos de nuestra droga.

Hemos podido comprobar que las soluciones (a) y

(b) muestran actividad, mientras que en la (c) no se detec
ta.

III.7.- ACTIVIDAD ANTIMITOTICA

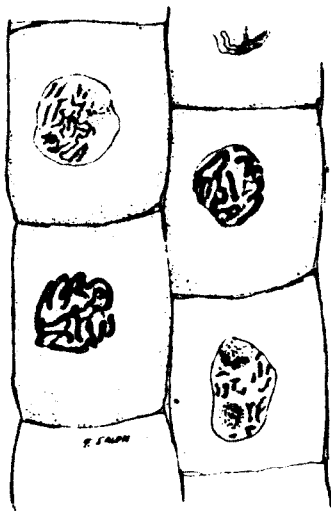
El proceso de la replicación celular es esencialmente cíclico (138). Se denomina ciclo mitótico o celular al conjunto de eventos que dan lugar a la división celular o mitosis (139).

La mitosis es un proceso continuo, pero se suele dividir en fases: profase, metafase, anafase y telofase.

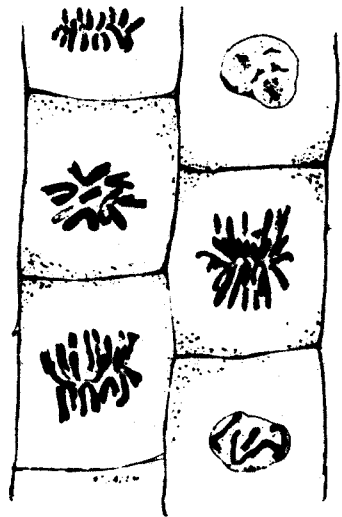
Las fases previas a las mitosis se denominan Interfase y es el periodo durante el cual tienen lugar diversas actividades sintéticas (140) que son esenciales para recobrar la capacidad mitótica, (fig.7).

La complejidad de estos procesos pueden verse interrumpida por causas muy heterogéneas, denominándose "antimitóticos" o "citostáticos", a todas las sustancias que imposibilitan esta división.

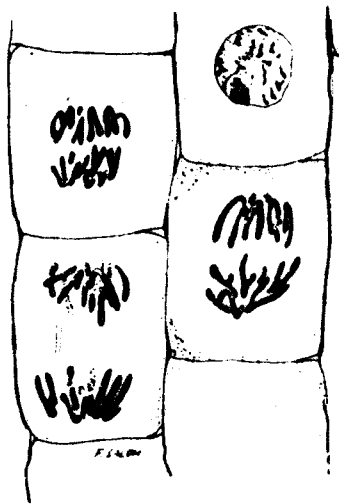
Las plantas han sido usadas en el tratamiento - del cáncer desde hace unos 3.500 años, pero es sólo desde 1.959 cuando se ha realizado un esfuerzo sistémico llevándose a cabo un "screening" de estos extractos de plantas(141) para estudiar la actividad inhibitoria de éstos sobre el - crecimiento celular.



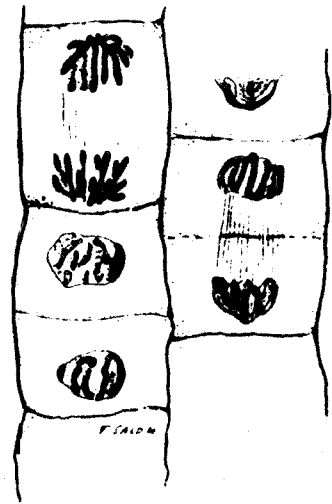
Profase



Metafase



Anafase



Telofase

Fig.(7): Esquema de las distintas fases de la mitosis

Las drogas citotóxicas actúan fundamentalmente - sobre la biosíntesis de los ácidos nucleicos (139) y en relación con el ciclo mitótico o celular, interfiriendo en su mayor parte los procesos de reproducción y crecimiento, por lo que su actividad tendrá lugar únicamente sobre las células que se encuentran en periodo proliferativo.

Dependiendo del mecanismo de acción, las diferentes drogas afectarán a distintas fases del ciclo celular; existen compuestos que actúan sobre las células en cualquier momento del ciclo, mientras que otros actúan sólo en una fase determinada.

III.7.1.- CONDICIONES GENERALES

LEVAN y LOTFY (142) introdujeron el empleo de raíces obtenidas de los bulbos de Allium cepa L., para el estudio de los efectos producidos por diferentes sustancias sobre el ciclo celular.

Nosotros hemos utilizado los meristemos apicales radicales de Allium cepa L. var. denominada "francesa", debido a su fácil manejo y su gran producción de raíces.

Las preparaciones microscópicas se realizaron a partir del ápice de la raíz de la cebolla. Este consta de una cofia, un meristemo y una zona diferenciada (143), - (fig.8).

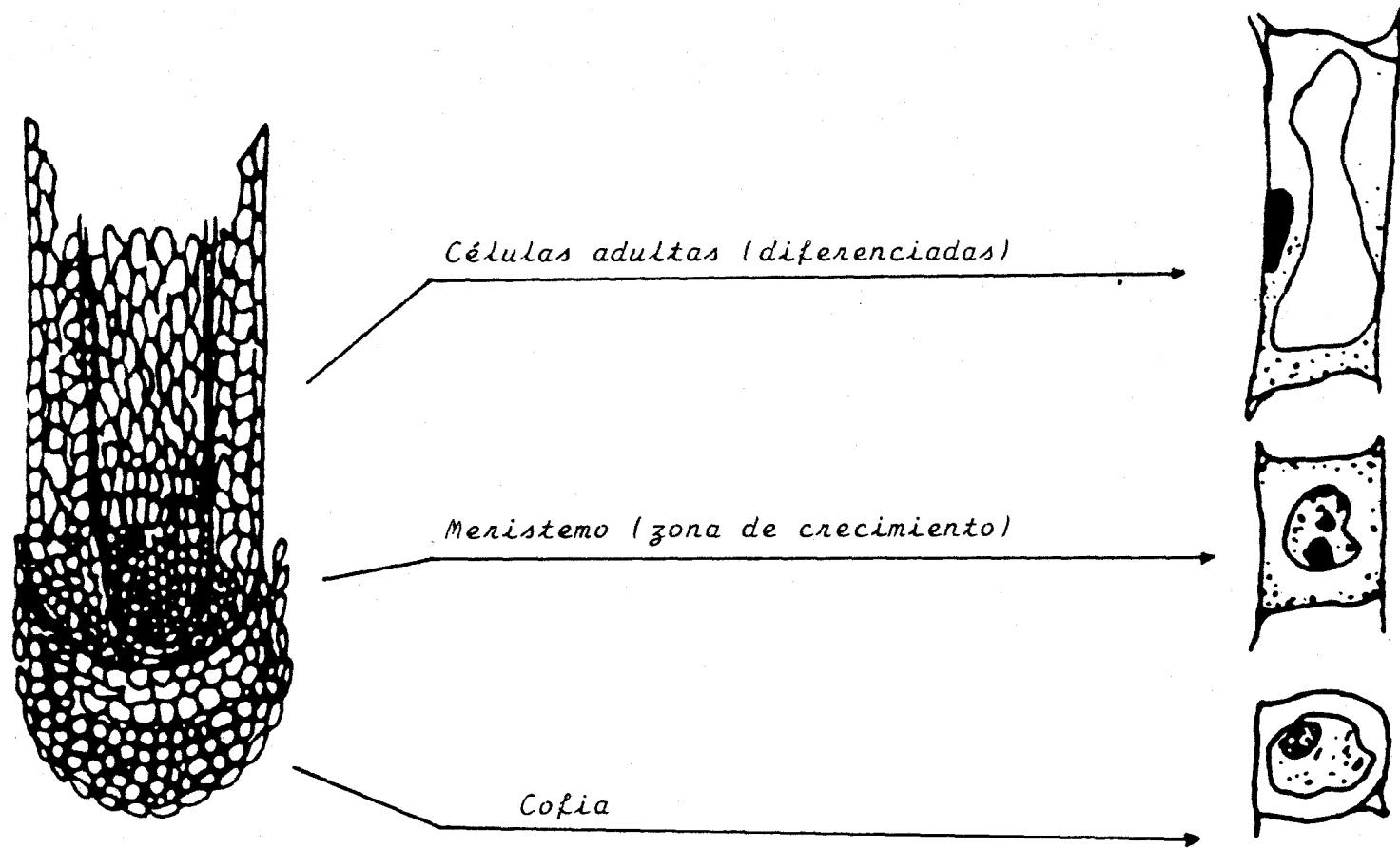


Fig.(8): Corte longitudinal de la raíz de Allium cepa L.

El meristemo radical es un área de crecimiento rápido; en él, las divisiones celulares se suceden con gran celeridad, de aquí que sea un material excelente para estudio de la mitosis.

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

III.7.1.1.- Cultivo Celular

Se colocaron los bulbos sobre tubos de vidrios de aproximadamente 70 ml de capacidad, utilizando como medio de cultivo agua filtrada, renovada cada 24 h..Se hizo burbujear aire por medio de una bomba Rena 101, con el fin de -- mantener el medio a un nivel constante de oxígeno y en permanente agitación.

Hay que cuidar que sólo la porción inferior del bulbo, el disco, se mantenga en contacto permanente con el nivel del agua, manteniendo éste para evitar la desecación.

Todo el sistema de cultivo se aisló dentro de una cámara a temperatura comprendida entre 20-25°C, consiguiéndose además la oscuridad necesaria para el desarrollo de las raíces que, en estas condiciones, alcanzan a los dos o tres días unos tres centímetros de longitud.

III.7.1.2.- Tratamiento

Una vez desarrolladas las raíces, los bulbos fueron trasladados a otros recipientes de cultivo conteniendo las soluciones acuosas a ensayar. Este momento se consideró "tiempo cero" o tiempo de iniciación de la prueba.

Las condiciones en las que se realizaron estas experiencias, fueron idénticas a las que habíamos mantenido durante el desarrollo de las raíces.

III.7.1.3.- Fijación y Tinción

Cuando las raíces han alcanzado el tamaño adecuado (prueba control), o transcurrido los tiempos de tratamiento establecidos en cada caso (prueba problema), tomamos mediante pinzas, 3-4 raíces de cada bulbo, fijándose inmediatamente en solución Carnoy (etanol absoluto/acético 3:1), (144). Se procuró siempre elegir raíces bien desarrolladas, que no presentasen anomalías morfológicas visibles, y de un tamaño medio.

Todas las pruebas se realizaron con un mínimo de 3 bulbos, fijándose al menos 6 raíces (2 de cada bulbo) a cada uno de los tiempos indicados.

La tinción fué efectuada mediante la técnica con

orceina/acético/clorhídrico de Tjio y Levan (145).

orceina (Merck)	2 g
acético glacial	45 ml
agua dest. c.s.p.	100 ml

Para preparar el colorante, la orceina nº7091 se adiciona al acético glacial y se lleva a ebullición a reflujo durante 10 min.

Dejamos enfriar a temperatura ambiente y añadimos agua destilada hasta completar 100 ml, después de 12 h. de reposo, se filtra. La solución de orceina así obtenida tiene una concentración del 2%.

La "solución de trabajo" se obtiene añadiendo una parte de ClH 1N por cada 9 de la solución descrita anteriormente.

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

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

antes de proceder al aplastamiento.

III.7.1.4.- Montaje de Preparaciones

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

En todo momento hay que operar rápidamente a fin de evitar que se dessequen los tejidos.

Se deposita encima del fragmento de raíz un cubreobjetos y se somete a presión.

El extremo de la raíz está formado por tejidos -- blandos; la presión ejercida sobre el cubreobjetos debe ser suave al principio, aumentándola lentamente.

Hay que evitar que el cubreobjetos se deslice en el curso de la presión. La finalidad perseguida es aplastar los tejidos a fin de conseguir una monocapa de células meristemáticas.

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio

copio Olympus BH y las fotografías realizadas con un fotomicroscopio Olympus.

III.7.1.5.- Determinación de los Índices Mitóticos (IM) y de Fases (IF)

El Índice Mitótico (IM) se define como el porcentaje de células meristemáticas que en un instante dado están en división; es decir, cursan algunas de las etapas de la mitosis (146).

Viene expresado por la siguiente relación:

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

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

El Índice de Fases (IF), expresa el número de células observadas en cada una de las fases mitóticas, por cada 100 células meristemáticas en curso de división.

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

III.7.2.- EXTRACTOS A ENSAYAR

III.7.2.1.- Extracto acuoso

Realizamos diversas experiencias utilizando pesos variables del residuo seco procedente del cocimiento acuoso ácido, operando a diferentes tiempos de tratamiento y recuperación.

A partir del residuo seco se prepararon soluciones en agua filtrada a una concentración de 0,5 y 1% equivalentes a 4,56 y 9,12 g de droga respectivamente.

Las fijaciones se realizaron a las 2, 4, 8, 24, 48 y 72 h. de tratamiento.

A las 48 y 72 h. existe una gran proliferación de sustancia extraña en la base del bulbo, que provoca un endurecimiento de las raíces, impidiendo el aplastamiento normal de las mismas, lo cual hace poco fiable el contaje.

Antes de iniciar el tratamiento, se recogieron raíces que fueron fijadas como prueba control.

Tiempo de tratamiento	Nº Cél. totales	Nº Cél. división	Indice Mitótico	Fases Mitóticas				Indice de fases			
				Prof.	Metaf	Anaf.	Telof	IFp	IFm	IFa	IFt
Control	2.702	240	8,88	117	47	21	55	48,75	19,58	8,75	22,90
2 h.	2.371	129	5,44	68	23	8	30	52,71	17,82	6,20	23,25
4 h.	1.956	64	3,27	28	12	4	20	43,75	18,75	6,25	31,25
8 h.	2.007	43	2,14	32	2	-	9	74,42	4,65	-	20,93
24 h.	2.062	22	1,07	15	-	-	7	68,18	-	-	31,81
48 h.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 h.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA XI : Variación de IM e IF, a diferentes tiempos de tratamiento correspondientes al extracto acuoso (0,5 g r.s.).

Tiempo de tratamiento	Nº Cél. totales	Nº Cél. división	Indice Mitótico	Fases Mitóticas				Indice de fases			
				Prof.	Metaf	Anaf.	Telof	IFp	IFm	IFa	IFt
Control	1.616	123	7,79	66	18	9	33	52,33	14,28	7,14	26,19
2 h.	2.361	102	4,32	51	34	5	12	50,00	33,33	4,90	11,76
4 h.	2.475	76	3,07	38	14	8	16	50,00	18,42	10,53	21,05
8 h.	1.889	41	2,17	28	4	-	9	68,29	9,75	-	21,95
24 h.	2.236	26	1,16	12	4	3	7	46,15	15,38	11,50	26,92
48 h.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 h.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA XII:Valores de IM e IF, a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes al extracto acuoso (1 g r.s.).

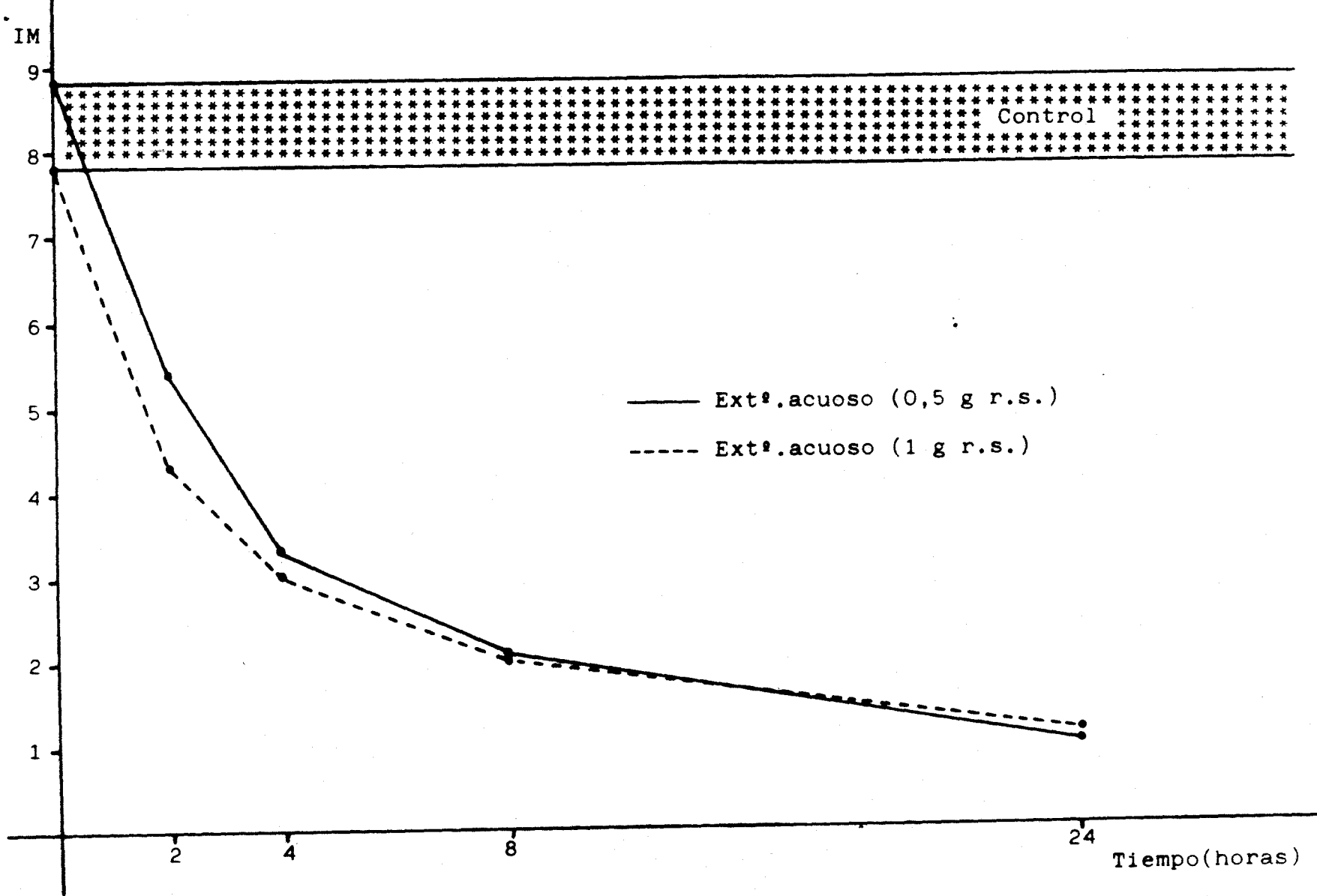
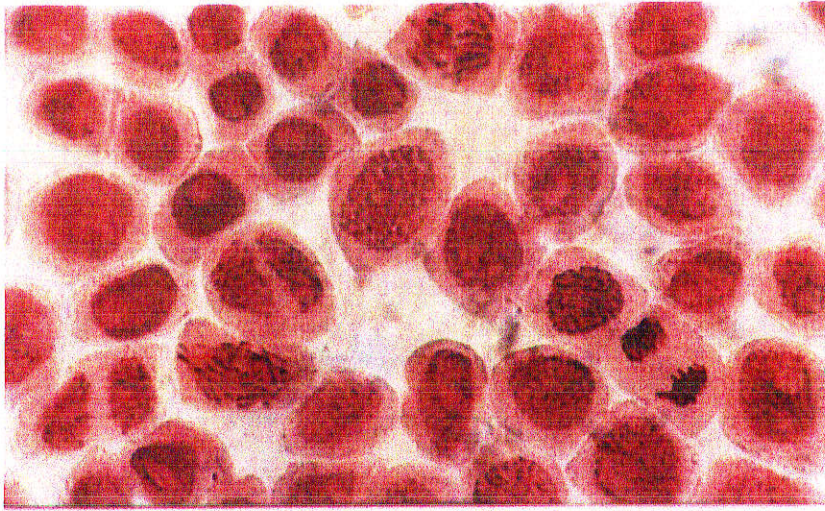
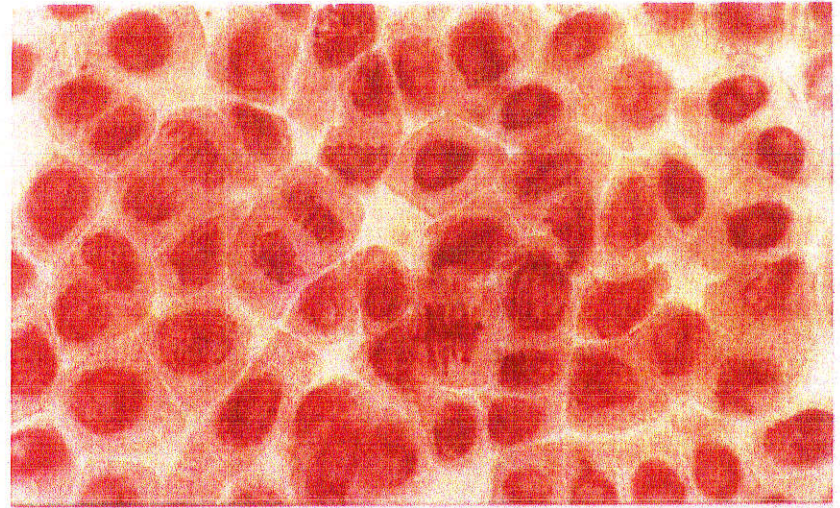


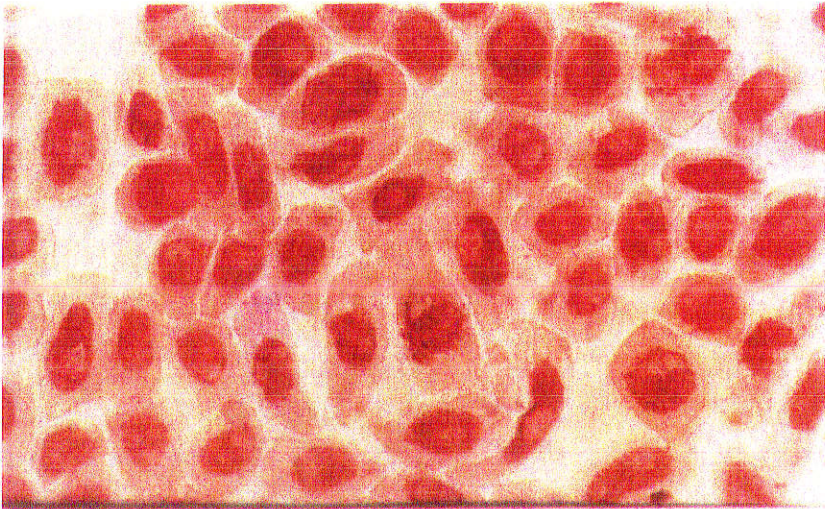
Fig.(9)- Variación del IM en función del tiempo de tratamiento.



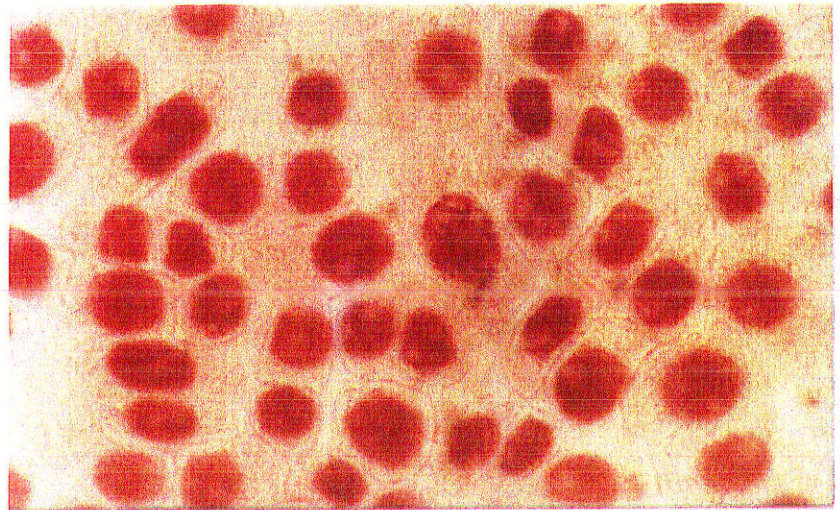
Control



Ext^a. acuoso (0,5 g r.s.) 2^ah. trat.



Ext^a. acuoso (0,5 g r.s.) 8^ah. trat.



Ext^a. acuoso (0,5 g r.s.) 24^ah. trat.

III.7.2.2.- Extracto de ácidos fenoles

A partir del residuo seco procedente de la purificación de ácidos fenoles, (apartado III.3), se obtuvieron soluciones en agua filtrada a una concentración de 4,42 y 8,85 mg/100ml, correspondientes a 4,56 y 9,12 g de droga - respectivamente, y por tanto, equivalentes a la misma cantidad de droga que los 0,5 y 1 g de residuo seco utilizados en los ensayos con el extracto acuoso ácido.

Con dichas soluciones llevamos a cabo los tratamientos realizando las fijaciones, de igual manera que con el extracto acuoso, a las 2, 4, 8, 24, 48 y 72 h.

Tiempo de tratamiento	Nº Cél. totales	Nº Cél. división	Indice Mitótico	Fases Mitóticas				Indice de fases			
				Prof.	Metaf	Anaf.	Telof	IFp	IFm	IFa	IFt
Control	1.754	154	8,78	81	24	10	39	52,59	15,58	6,50	25,32
2 h.	1.825	145	7,94	78	19	8	40	53,79	13,10	5,52	27,58
4 h.	1.556	106	6,81	63	14	11	18	59,43	13,21	10,38	16,98
8 h.	1.699	112	6,59	70	12	9	21	62,50	10,70	8,04	18,75
24 h.	2.111	119	5,63	75	33	6	35	63,02	27,73	5,04	29,41
48 h.	2.102	112	5,32	50	22	8	32	44,64	19,64	7,14	28,57
72 h.	1.520	80	5,26	44	14	5	17	55,00	17,50	6,25	21,25

TABLA XIII: Valores de IM e IF, a diferentes tiempos de tratamiento correspondientes al extracto de ácidos fenoles (4,42 mg r.s.).

Tiempo de tratamiento	Nº Cél. totales	Nº Cél. división	Indice Mitótico	Fases Mitóticas				Indice de fases			
				Prof.	Metaf	Anaf.	Telof	IFp	IFm	IFa	IFt
Control	1.870	165	8,82	91	29	11	34	55,15	17,57	6,66	20,60
2 h.	2.171	144	6,63	88	16	11	29	61,10	11,11	7,64	20,14
4 h.	2.264	146	6,45	97	19	8	22	66,44	13,01	5,48	15,06
8 h.	1.597	99	6,19	55	19	6	19	55,55	19,19	6,06	19,19
24 h.	1.232	68	5,52	24	14	10	20	35,29	20,58	14,70	29,41
48 h.	1.879	96	5,11	44	19	9	24	45,83	19,79	9,37	25,00
72 h.	2.174	110	5,06	53	24	6	27	48,18	21,81	5,45	24,54

TABLA XIV : Valores de IM e IF, a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes al extracto de ácidos fenoles (8,85 mg r.s.).

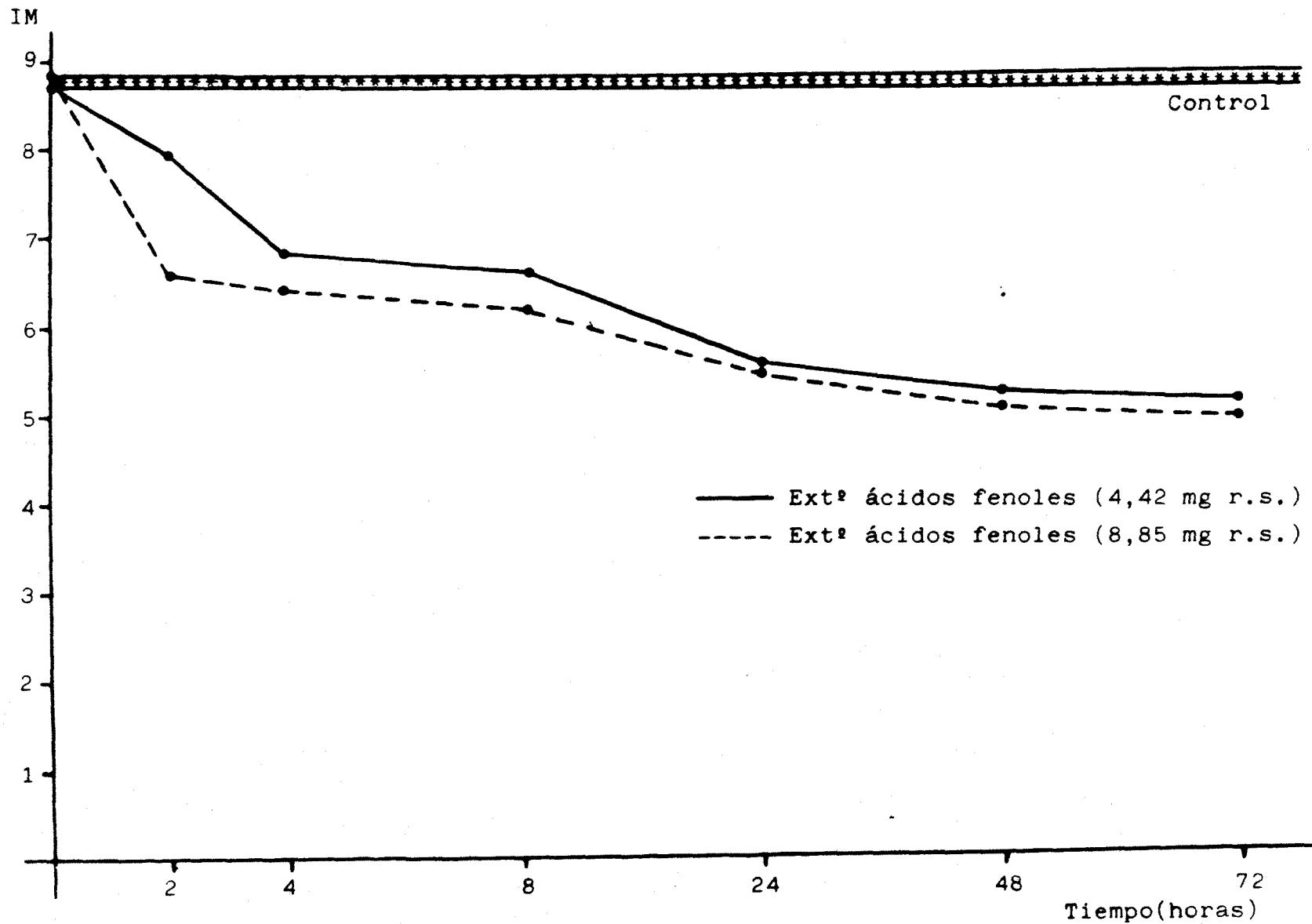


Fig.(10)-Variación del IM en función del tiempo de tratamiento

III.7.3.- RECUPERACION DEL INDICE MITOTICO (IM)

La recuperación del IM, prueba necesaria en caso positivo para comprobar la reversibilidad del efecto nocivo ejercido sobre las raíces, se determinó a continuación del tratamiento de 8 h.. Para ello, una vez transcurrido los -- tiempos de tratamiento, se pusieron los bulbos en contacto con el medio normal de cultivo (agua filtrada), en el cual se mantuvieron 10, 12, 14 y 16 h. El tiempo se eligió basán donos en las experiencias de LOPEZ-SAEZ y Colbs (147) que fijan la duración del ciclo celular entre 13-14 h.

Nuestros ensayos de recuperación se han realizado sólo con las dosis superiores ensayadas tanto en el extrac to acuoso como en el de ácidos fenoles, por ser los que pusieron de manifiesto una mayor disminución del IM.

En todas las experiencias se realizaron la corres pondientes pruebas controles.

Tiempo de tratamiento	Nº Cél. totales	Nº Cél. división	Indice Mitótico	Fases Mitóticas				Indice de fases			
				Prof.	Metaf	Anaf.	Telof	IFp	IFm	IFa	IFt

Extracto acuoso (1 g r.s.)

Control	1.828	155	8,48	78	30	12	35	50,32	19,35	7,74	22,58
8 h. trat.	1.944	35	1,95	30	3	-	5	87,71	8,57	-	14,28
10 h.recup.	1.808	8	0,44	6	-	-	2	75,00	-	-	25,00
12 h.recup.	1.920	5	0,26	5	-	-	-	100	-	-	-
14 h.recup.	1.900	2	0,10	2	-	-	-	100	-	-	-
16 h.recup.	2.101	1	0,04	1	-	-	-	100	-	-	-

Extracto de ácidos fenóles (8,85 mg r.s.)

Control	2.198	177	8,05	91	37	3	46	51,41	20,90	1,69	25,98
8 h. trat.	1.879	112	5,96	60	21	9	22	53,57	18,75	8,03	19,64
10 h.recup.	1.531	78	5,09	35	13	9	21	44,87	16,66	11,53	26,92
12 h.recup.	2.084	104	4,99	54	20	8	22	51,92	19,23	7,69	21,15
14 h.recup.	2.097	99	4,72	52	12	5	24	52,52	12,12	5,05	24,24
16 h.recup.	1.626	75	4,61	48	6	2	19	64,00	8,00	2,66	25,33

TABLA XV: Valores de IM e IF, a distintos tiempos de tratamiento y recuperación correspondientes al extracto acuoso (1g) y ácidos fenóles (8,85 mg).

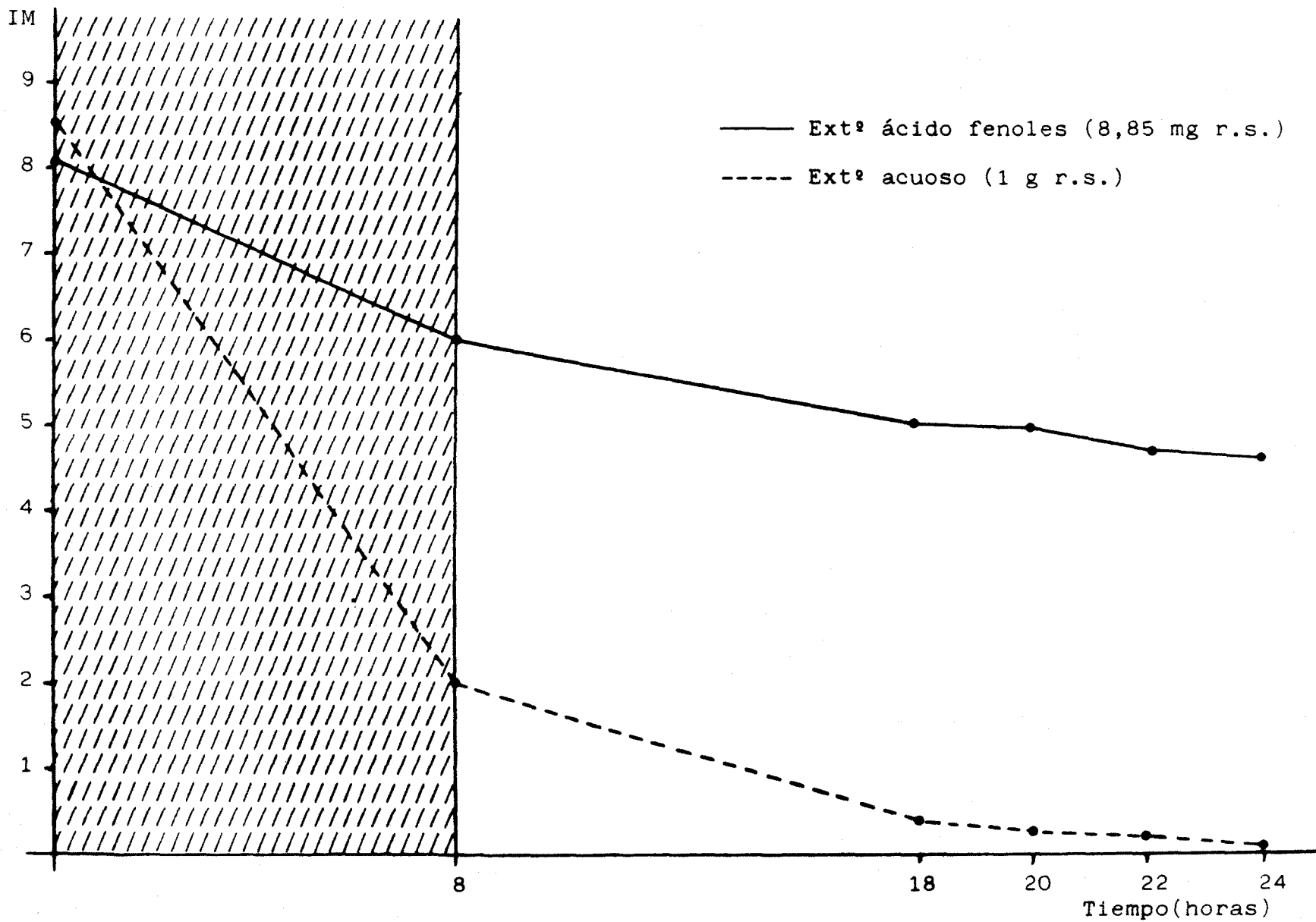


Fig.(11)- Variación del IM después de 8h de tratamiento y posterior recuperación.

III.7.4.- DISCUSION DE RESULTADOS

A medida que avanza el tiempo de tratamiento puede observarse una disminución del IM con las dosis ensayadas.

Con el extracto acuoso ácido este descenso es muy marcado, hasta la 4ª hora de tratamiento para ambas dosis (0,5 y 1 g r.s.), continuando la disminución de forma menos acusada hasta las 24 horas, a partir de las cuales consideramos el contaje poco fiable debido al endurecimiento de las raíces, aunque podía observarse un bajo número de células en división.

En el caso del extracto de ácidos fenóles, los resultados obtenidos fueron prácticamente paralelos con las dosis utilizadas (4,42 y 8,85 mg r.s.), si bien, el descenso del IM no fué tan brusco hasta la 4ª hora de tratamiento como ocurría en el caso del extracto acuoso ácido.

Este ensayo se pudo llevar a cabo hasta las 72 horas ya que las raíces no alcanzaron el mismo grado de endurecimiento que con el extracto acuoso ácido.

El estudio comparativo muestra una mayor actividad del extracto acuoso ácido respecto al de ácidos fenóles, obteniéndose para las dosis menores ensayadas de ambos extractos (equivalente a 4,56 g de droga), una disminución --

del IM de 87,95% y 35,88% y de 85,11% y 37,42% para las mayores (9,12 g de droga).

Estos resultados nos hacen pensar que los ácidos fenoles, si bien contribuyen a la actividad antimitótica de Erica andevalensis, no son los únicos responsables de esta acción.

En todos los casos, extracto acuoso y extracto de ácidos fenoles, las células presentan un aspecto normal, -- sin deformaciones protoplasmáticas ni alteraciones nucleares.

La frecuencia de las fases mitóticas, IF, varía en relación al tiempo de tratamiento de la muestra problema.

La detención provocada en la mitosis no pudo restablecerse de ningún tratamiento, después de someterse a -- tiempos variables de recuperación en agua.

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- En el "screening" fitoquímico hemos detectado los siguientes grupos de compuestos: esteroides, triterpenos, lactonas pentagonales insaturadas, pigmentos antocianínicos y leucoantocianínicos, flavonoides, cumarinas, taninos y ácidos fenólicos, encontrándose en mayor proporción los compuestos polifenólicos.
- 2.- Los ensayos cromatográficos nos revelan la presencia en E. andevalensis de los ácidos fenólicos p-hidroxibenzoico, gentísico, vanílico, sirínico, p-cumárico y protocatéuico.
- 3.- Mediante el estudio por espectrofotometría U.V. / VIS., hemos podido ratificar las identificaciones llevadas a cabo por cromatografía.
- 4.- Tanto el extracto acuoso ácido como el de ácidos fenólicos presentan actividad antimicrobiana a las dosis ensayadas, especialmente frente a microorganismos Gram (+), siendo más acusada para el extracto acuoso.
- 5.- A medida que avanza el tiempo de tratamiento, puede observarse, a las dosis ensayadas, una disminución del Índice Mitótico (IM) con los dos extractos en estudio, variando así mismo el Índice de Fases (IF).

Su estudio comparativo muestra una mayor actividad del extracto acuoso ácido con respecto al de ácidos fenoles, no restableciéndose la detención provocada en la mitosis en ninguno de los casos ensayados.

- 6.- Los resultados obtenidos nos inducen a pensar que, si bien los ácidos fenoles contribuyen a dichas acciones (antimicrobiana y antimitótica), no son los únicos responsables de las mismas.

V. BIBLIOGRAFIA

- (1) B.CABEZUDO, J.RIBERA (1.980).
"Erica andevalensis Cabezudo-Ribera, S.P.NOV."
Lagasalia, 9, (2), 223-226
- (2) G.H.CONSTANTINE, Jr., P.CATAFOLMO, K.SHETH, L.A.SCIUCHETTI
(1.966).
"Phytochemical investigation of Arctostaphylos columbiana
piper and Arctostaphylos patula greene (Ericaceae)"
J.Pharm. Sci., 55, (12), 1378-1382
- (3) R.CHAUVIN, P.LAVIE (1.956)
"Antibiotic substance of polen"
Ann. Inst. Pasteur, 90, 523-527. A través C.A. (1.956), 50
12191b.
- (4) T.WATANABE, T.ARAKI, K.AGATA, M.GOTO, H.ITO (1.956).
"Antibiotic componentes of plants"
Ann. Repts. Takeda Research Lab., 14, 92-11. A través C.
A. (1.956), 50, 5987b.
- (5) S.D.MANCINI, J.M.EDWARDS (1.972)
"Cytotoxic principles from the Kalmia latifolia"
Lloydia, 42, 483-488
- (6) M.V.TORO, M.J.RIQUELME (1.984)
"Iniciación al estudio de Erica andevalensis Cabezudo-Ri
bera".
Comunicación presentada al XVI Congreso Internacional de
Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino. Marsella
(1.984). En fase de publicación en Pharm. Méd.
- (7) P.FONT QUER (1.976)
"Plantas Medicinales, El Dioscóride renovado"
3ªed. Ed. Labor S.A., Barcelona, p.530

- (8) T.G.TUTIN, V.H.HEYWOOD (1.972)
"Flora Europea"
Ed. Cambridge University Press, 3, p.5
- (9) C.R.METCALFE, L.CHALK (1.965)
"Anatomy of the Dicotyledons".
Ed. Oxford at the Claredons Press, 2, p.872
- (10) "Plantas y Flores"
Ed. Sarpe, 1 , p.164
- (11) O.POLUNIN, B.E.SMTHIES (1.977)
"Guía de Campo de las Flores de España, Portugal y Sud-
este de Francia".
Ed. Omega, Barcelona, p.297
- (12) H.FERNANDEZ, A.NIETO (1.982)
"Plantas Medicinales"
Ed. Eunsa, Pamplona, p.57
- (13) A.CARBALLEIRA (1.980)
"Phenolic inhibitors in Erica australis L. and in associa
ted soil".
J. Chem. Ecol., 6, (3), 593-595
- (14) H.W.YOUNGKEN (1.951)
"Tratado de Farmacognosia"
Ed. Atlante, México, p.835
- (15) A.FAHN (1978)
"Anatomía Vegetal"
Ed. H.Blume, Madrid, p.323

- (16) A.CARBALLEIRA (1.980)
"Phenolic inhibitors in Erica australis L. and in associated soil".
J. Chem. Ecol., 6, (3), p.324
- (17) "Plantas y Flores" (1.980)
Ed. Sarpe, 1, p.2257
- (18) "Plantas y Flores" (1.980)
Ed. Sarpe, 1, p.166
- (19) L.BOUWERS, J.LONGIN (1.979)
"The foliar manganese in the herbaceous layer and relation with the ecophysiology of calcicoles and calcifuges"
Bull Soc. R.Bot. Belg., 112, (2), 243-251. A traves C.A.
(1.980), 93, 146286q
- (20) H.LECLERC (1966)
"Précis de Phytoterapie"
5^{ed.}, Ed. Masson et Cie., París, p.57
- (21) A.R.McLELLAN (1.977)
"Minerals carbohydrates and aminoacids, of pollen from some woody and herbaceous plants"
Ann.Bot., 41, (176), 1225-1232
- (22) H.KINZEL, O.HORAK (1.969)
"Comparative physiology of Ericaceae"
Oestern Bot.Z., 116, (1-5), 112-118
- (23) P.FONT QUER (1.976)
"Plantas Medicinales, El Dioscóride renovado"
3^{ed.}, Ed. Labor S.A., Barcelona, p.531

- (24) E.P.WHITE (1.970)
"4-Methoxyphenethylamine, an alkaloid of Erica lusitánica Rud"
N.Z.JL.Sci., 13, (3), 359-361
- (25) J.ARINES, J.L.G.MANTILLA, E.VIEITEZ (1.974)
"Compuestos fenólicos en Erica vagans L."
Ann.Edafol., 33, (9-10), 891-899
- (26) E.VIEITEZ, A.BALLESTER (1.972)
"Compuestos fenólicos y cumáricos en Erica cinerea L."
Ann.Inst.Bot. A.J.Cavanilles, 29, 129-142
- (27) J.B.HARBONE, C.A.WILLIAMS (1.973)
"A chemotaxonomia survey of flavonoids and simple phenols in leaves of the Ericaceae"
Bot. J.Linn. Soc., 66, 37-54
- (28) J.B.HARBONE (1.969)
"Occurrence of flavonol 5-methyl ether in higher plants and their systematic significance"
Phytochemistry, 8, 419-423
- (29) I.FRAGA VILA (1.982)
"Aportaciones al estudio taxonómico de las especies de los géneros Erica y Calluna presentes en Galicia"
Tesis Doctoral; Santiago de Compostela.
- (30) A.CARBALLEIRA, A.CUERVO (1.980)
"Seasonal variation in allelopathic potential of soil from Erica australis L. Heathland"
Ecol. Plant., 1, (4), 345-353

- (31) J.B.HARBONE, A.WILLIAMS (1.969)
"The identification of orcinol in higjer plants in the family Ericaceae"
Phytochemistry, 8, 2223-2226
- (32) J.L.ALONSO, F.DE LANDA, E.VIEITEZ (1.976)
"Inhibidores fenólicos de la germinación en Erica arbórea L."
Ann. Edafol. Agrobiol., 35, (3-4), 367-375
- (33) A.BALLESTER, E.VIEITEZ (1.971)
"Estudio de sustancias de crecimiento aisladas de Erica cinerea L."
Acta Científica Compostelana, 8, (2), 79-84
- (34) A.BALLESTER, A.VERWEY, J.C.OVEREEM (1.975)
"2-Hydroxyphenylacetic acid and 2-4 dihidroxyphenylacetoneitrile from Erica scoparia"
Phytochemistry, 14, 1667-1668
- (35) R.K.IBRAHIN (1.963)
"The distribution of o-pyrocatechin acid in plants"
Naturviss, 50, (1), 124-129
- (36) J.B.HARBONE, C.A.WILLIAMS (1.971)
"Leaf survey of flavonoids and simple fenols in the genus Rhododendron"
Phitochemistry 10, 2727-2744
- (37) A.BALLESTER, A.M.VIEITEZ (1978)
"Estudio de potenciales alelopáticos en comunidades vegetales"
Ann.Inst.Bot. J.A.Cavanilles 34, (2), 715-722

- (38) E.L.RICE (1.967)
"Chemical warfare between plants."
Bio., 38, (2), 67-74. A través C.A.(1.967) 67, 42745k
- (39) E.L.RICE (1.965)
"Inhibitions of nitrogen-fixing and nitrifying bacterias
by seed plants II. Caracterización and identification
of inhibitors."
Physiol. Plant. 18, (1), 255-268
- (40) A.BALLESTER (1.980)
"Hacia el uso de herbicidas naturales"
Las Ciencias, 45, (2-3), 218-220
- (41) A.BALLESTER (1.980)
"La alelopatía y su aplicación en la mejora de la pro-
ducción agrícola"
E.F.C.E. Publications serie, 1, (12), 283-288
- (42) A.BALLESTER, A.M.VIEITEZ (1977)
"Estudio químico de compuestos alelopáticos presentes
en Ericáceas."
Act. Quim. Compostelana, 1, 69-75
- (43) M.C.SALAS, A.BALLESTER, E.VIEITEZ (1.973)
"Estudio biológico y químico de Erica umbellata L."
Ann. Edafol. Agrobiol., 32, (9-10), 808-814
- (44) A.BALLESTER, A.M.VIEITEZ, E.VIEITEZ (1.974)
"The allelopathic potential of Erica australis L. and
Erica arborea L."
Bot. Gaz., 140, (4), 433-436
- (45) A.MARTIN (1.980)
"Antisépticos y desinfectantes"
Panorama, 63, 5-12

- (46) R.PARIS, H.MOYSE (1.976)
"Matière Médicale"
1, 2^aed., Ed. Masson, Paris p.75
- (47) R.PARIS, H.MOYSE (1.976)
"Matière Médicale"
1, 2^aed., Ed. Masson, Paris p.85
- (48) K.A.ZIRVI, M.IKRAM, M.S.DAR, T.FAKOUHI, E.F.ERKER (1.978)
"Chemical and Pharmacological Screening of some Iranian Medicinal Plants"
Fitoterapia, 5, 213-220
- (49) R.PARIS, H.MOYSE (1.976)
"Matière Médicale"
1, 2^aed., Ed.Masson, Paris p.104
- (50) LINK & Colbs. (1.941)
"The Merck Index " (1,983)
J.Biol.Chem., 138, (21), 513-529
10^aed. Ed. Merck y Co. INC. RAHWAY, New York
- (51) R.S.MEEKS, D.COURI (1.978)
"The effect of warfarin and vitamin-K, on the carboxylation and glycosylation of prothrombin in vivo"
Biochem. Biophys. Acta, 544, (3), 634-637
- (52) R.PARIS, H.MOYSE (1.976)
"Matière Médicale"
1, 2^aed., Ed. Masson, Paris p.107
- (53) F.I.CAIRD, A.PIRIE, T.G.RAMSELL (1.977)
"Diosmina: tratamiento eficaz de la retinitis diabética"
Medicina e Higiene, (345), 7-9

- (54) S.SOMASUMDARAM, J.SADIQUE (1.986)
"Antihemolytic effect of flavonoidal glycoside of Cle-
rodendron inerme: an in vitro study"
Fitoterapia, (2), 103-110
- (55) F.ZARAGOZA, I.IGLESIAS, J.BENEDI, P.FDEZ-CORBEIRA (1.985)
"Efecto sobre la Agregación Plaquetaria de los Citrofla-
vonoides"
Fitoterapia, (6), 343-348
- (56) R.PARIS, H.MOYSE (1.976)
"Matière Médicale"
1, 2^aed., Ed. Masson, Paris p.195
- (57) A.AMICO (1.977)
"Medicinal plants of Southern Zambesia"
Fitoterapia, (3), 101-135
- (58) B.LORENZO VELAZQUEZ (1.976)
"Farmacología y su proyección a la Clínica"
13^aed., Ed. Oteo, Madrid p.892
- (59) P.FONT QUER (1.976)
"Plantas Medicinales, El Dioscóride renovado"
3^aed., Ed. Labor S.A., Barcelona p.536
- (60) K.BOUKEF, G.BALANSARD, M.LALLEMAND, M.BERNARD, P.SUSPLU-
GAS (1.976)
"Study of the phenolic acids isolated from Eucaliptus -
globulus Labill. leaves."
Plant.Med. et Phytother., 10, (1), 24-29
- (61) A.VILLAR, M.MARES; J.L.RIOS (1.983)
"Propiétés antimicrobiennes des feuilles d'Anona cheri-
molia Mill"
Plant.Med. et Phytother. 17, (4), 230-235

- (62) I.S.MELKUMRYAN (1.963)
"Bacterial activity of some Armenian flora"
Izv.Akad.Nauk Arm. SSR, Biol Nauki 16, (9), 83-88. A -
través C.A. (1.964) 60, 9601a
- (63) I.A.VELIKY, K.GENEST (1.972)
"Growth and metabolites of Cannabis sativa cell suspen
sion cultures"
Lloydia, 35, (4), 450-456
- (64) J.RAO TIRUMALA (1.976)
"The in vitro antimicrobial effect of the essencial oil
Ageratum conizoides"
Riechst, Aromen, Koerperpflegen, 26,(4), 50-56. A tra--
vés C.A. (1.976) 35, 87904z
- (65) J.G.NAGY, R.P.TENGERDY (1.967)
"Antimicrobial action of essential oils of Artemisia as
an ecological factor.I. Antibacterial action of the vo
latile oils of A.tridentata and A.nova on aerobic bac
teria"
Appl.Microbiol., 15, (4), 819-821
- (66) C.RAMIREZ (1.969)
"Antibacterial action nonvolatile substances extracted
from Artemisia tridentata subespecie tridentata"
Can. J.Microbiol., 15, (11), 1341
- (67) E.A.YUDOVICH, T.R.TASKENTSK (1.962)
"Essential oil in underground organs of Inula grandis"
Farmatsev.Inst., 3, 145-154. A través C.A. (1.964), 61
529d

- (68) L.S.KAZARNOVSKII, M.L.TSATSKO (1.962)
"Bryonia alba"
Tr.Khar'kovsk. Farmatsevt.inst. (2), 35-39. A través
C.A. (1.964), 60, 1534c
- (69) S.PRASKASH, G.K.SINHA (1.972)
"Antibacterials oils extracted from medicinal plants
of the Kumaon region"
India oil Soap J., 37, (9), 230-232. A través C.A.
(1.976), 79, 727y
- (70) S.A.VICHKANOVA, L.V.GORYUNOVA (1.971)
"Antiviral activity of flavonoids"
Tr.Vses.Nauch.Issled.Inst.Lek.Rast., (14), 212-217. A
través C.A. (1.973), 79, 728z
- (71) J.DAUGUET, J.P.FOUCHER (1.982)
"Les flavonoides de Arbutus unedo L."
Plant.Med. et Phytother., 16, (3), 185-191
- (72) B.KABADI, E.R.HAMMERLUND (1.963)
"Preliminary identification of the antibacterial prin
ciple madronin from the leaves of Arbutus menziesii"
J.Pharm.Sci., 52, (12), 1154-1159
- (73) R.SAN MARTIN CASAMADA (1.977)
"Tratado de Farmacognosia"
Ed. Científico Médica, Barcelona p.218
- (74) D.KAJAGOPALA RAO, T.R.GUPTA, V.S.GUPTA, K.V.NAGESWARA
RAO, P.L.NARASIMHA RAO (1.963)
"Antibiotic principles of Garcinia morella. IV. Adsor
tion chromatography of active substances occurring in
tissus of Garcinia morella an allied species"
Indian J.Chem., (1), 276-277

- (75) T.YA.OMEL'CHUK-MYAKUSHKO, A.YA.FASTOVSKAYA (1.968)
"Dynamis of the accumulation of antimicrobial substances in Hypericum perforatum"
Rast.Resur., 4, (3), 346-349. A través C.A. (1.969),
70, 9367c
- (76) A.K.NEGRASH, P.V.POCHINOK (1.969)
"Comparative study of chemotherapeutic and pharmacological properties of antimicrobial preparations from common St.John's wort"
Fitontsidy, Mater soveshch., 198-200. A través C.A.
(1.973), 78, 66908u
- (77) LASYLO BOROSS (1.963)
"Isolation and identification of the antibacterial substance of Kniphofia uvaria"
Acta Chim.Acad.Sci.Hung., (35), 195-198. A través C.A.
(1.963), 58, 10505h
- (78) L.S.KUCERA, E.C.HERRMANN (1.967)
"Antiviral substances in plants of the mint family (Labiatae).I. Tannin of Melissa officinalis"
Jr. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 124, (3), 865-869. A través C.A. (1.967), 66, 5749v
- (79) A.C.PIZSOLITTO, B.MANCINI, S.A.LONGO FRANCALANZA, M.A. DONINI MANCINI (1.975)
"Determination of antibacterial activity of essential oils officialized by the Pharmacopeia 2nd edition"
Rev.Fac.Farm.Odont.Araraquara, 9, (1), 55-61. A través C.A. (1.975), 86, 12226s

- (80) J.PELLECUEER, J.ELLEGRINI, M.SIMON de BROCHBERG (1.976)
"Bacterial and fungical essential oils"
Rev.Inst.Pasteur, 9, (2), 135-159. A través C.A. (1.977), 86, R 177132w
- (81) A.VILLAR, J.L.RIOS, M.C.ZAFRA-POLO, M.MARES, M.C.RE--
CIO (1.985)
"Activité antimicrobienne d'espèces de Sideritis"
Plant.Med. et Phytother., 19, (4), 248-254
- (82) H.FUKUI, H.EGAWA, K.KOSHIMIZU, T.MITSNI (1.973)
"New antifungal isoflavona from immature fruits of
Lupinus luteus"
Agr.Biol.Chem., 37 (2), 417-421
- (83) E.MARHUENDA, M.D.GARCIA (1.985)
"Mise en evidence des propriétés antimicrobiennes des
sommités fleuries d'Ononis natrix L.. Identification
de l'acide ferúlique"
Plant.Med. et Phytother., 19, (3), 163-172
- (84) V.A.BANDYUKOVA (1.959)
"antibiotic activity of substances in Sophora japonica
fruit and their chemical nature"
Uchenye Zapiski, Pyatigorskii Farm.Inst., (3), 33-38.
A través C.a. (1.962), 56, 9075d
- (85) M.A. EL-LEITHY, F.A.REDA, M.KDALIL (1.973)
"Antimicrobial principles in leaves of Lawsonia inermis"
Zentralbe.Bakteriol.Parasitenk, Infektionskr.Hyg., Abt.
2, 128, (1-2), 61-67. A través C.A. (1.973), 79, 62033c

- (86) A.P.DEGTYAREVA (1.962)
"Antibiotics in Myrtus comunis, Eucaliptus laevopinea
and E.wilkinsoniana"
Tr.Gas.Nikittsk.Botan.Sada, 36, 173-186
- (87) I.INAGAKI, M.YAMAZAKI, A.TAKAHASHI, K.DOYG, S.SHIBATA
(1.967)
"Bacteriostatic effects of the constituents of several
crude drug"
Takeda, Sono Nagoya, Shiritsu Daigaku, Yakugakubu Ken-
kyur, Nempo, (15), 27-32
- (88) A.S.BONDARENKO, S.I.ZELEPUKHA (1.962)
"Antibacterial properties of strawberries"
Mikrobiol.Zh., Akad.Nauk.Ukr. RSR, 24, (1), 41-45. A
través C.A. (1.963), 57, 5114e
- (89) L.V.GORYUNOVA, S.A.VICHKANOVA (1.971)
"Antiviral characteristics of pear polyphenols"
Tr.Uses.Nauch.Issled.Inst.Lek.Rast., (14), 238-242. A
través C.A. (1.973), 78, 155111w
- (90) S.K.DAS, A.N.SAMA (1.963)
"Utilization of Andaman resin"
Bull.Reg.Res.Lab., Jamnu, India, 1, 190-191. a través
C.a. (1.964), 60, 9095b
- (91) M.S.UBBA, T.C.SOUMITHRI, R.SURYANARA YANA (1.967)
"Antimicrobial action of citrus oils"
J.Food Sci., 32, (2), 225-227

- (92) A.S.MATHAR, J.I.SINDHA, C.S.KRISHNAMURTHY (1.973)
"Efficacy of different fungicides and antibiotics on
the control of citrus canker caused by Xanthomonas ci-
tri"
Periyakulam. Madras Agric. J., 60, (7), p.626. A tra-
vés C.a. (1.975), 82, 119949z
- (93) B.WOLTERS (1.965)
"The share of the steroid saponins in the antibiotic
action of Solanum dulcamara"
Plant.Medic., 13, (2), 189-193
- (94) B.WOLTERS (1.964)
"Relations between structure and antibiotic activity
of certain steroid alkaloids"
Arch.Pharm., 297, (12), 748-754. A través C.A. (1.965)
62, 9498b
- (95) N.I.VASYUKOVA, O.L.ORESTKOUSKAYA, L.V.METLITSKII
(1.970)
"Phytoalexins of potatoes"
Prikl.Biokhim.Mikrobiol., 6, (4), 431-436. A través C.
A. (1.970), 73, 127885e
- (96) Y.I.KORNIJEVSKII, A.S.RYBAZ'CHENKO, M.V.STELBLYUK
(1.970)
"Antibacterial properties of essentials oils of Vale-
riana stolonifera, V.nitida, V.escaltata"
Zh.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol., 47, (11), 137-139
A través C.A. (1.971), 74, 95967k
- (97) A.M.JANSSEN, J.J.C.SCHEFFER (1.985)
"Acetoxychavicol acetate, an antifungal component of
Alpinia galanga"
Plant.Medic., (6), 507-511

- (98) A.BANERJEE, S.S.NIGAM (1.976)
"Antibacterial activity of essential oil of Curcuma caesia Roxb."
Indian J.Pharm., 38, (4), 103-105
- (99) L.BENZANGER-BEAUQUESNE (1.982)
"Plantes supérieures antitumorales"
Plant.Med. et Phytother., 16, (3), 206-229
- (100) G.A.CORDELL (1.978)
"Anticancer agents from plants"
Progress in Phytochemistry, (5), 273-316
- (101) G.A.CORDELL (1.976)
"Recent experimental and clinical data concerning antitumor and citotoxic agents from plants"
New Nat.Prod.Plant.Drug Pharmacol., Biol.ther.Act.,
Proc.Int.Congr 1st, 55-82
- (102) D.Y.ZHU, Z.X.CHEN, B.W.ZHOU, J.S.LIU, B.S.HUANG, Y.Y.XIE (1.979)
"Studies on the chemical constituents of Bu-Gu-Zhi, the seeds of Psoralea corifolia L."
Yao Hsueh Hsueh Pao, 14, (10), 605-611
- (103) J.P.S.SARIN; H.S.GARG, N.M.KHANNA, M.M.DHAR (1,976)
"A flavonol glycoside with anticancer activity from Tephrosia candida"
Phytochemistry, 15, (1), 232-234
- (104) P.H.TAI, Y.F.HUNG (1.981)
"Antitumor constituents in Cloranthus glober"
Chung Ts'ao Yao, 12, (3), 9-12. A través C.A. (1.981)
95, 103209r

- (105) E.A.TUKALO, E.S.LEPLYA, B.T.IVANCHENKO (1.972)
"Antibiotic action of glycoside alkaloid preparations"
Biol.Nauki, 15, (12), 99-100 (1.972). A través C.A.
(1.973), 78, 93033m
- (106) L.BENZANGER-BEAUQUESNE, M.PINKAS, M.TORCK (1.975)
"Les plantes dans la Thérapeutique Moderne"
Ed. Maloine S.A., París, p.214
- (107) A.LAGUNA (1.968)
"Pedacio Dioscórides Anazarbeo (1.555)"
Instituto de España, Madrid, (1), p.72
- (108) M.FERNANDEZ, A.NIETO (1.982)
"Plantas Medicinales"
Ed. Eunsa, Pamplona, p.57
- (109) R.R.PARIS, H.MOYSE (1.971)
"Matière Medicale"
3, 2ªed. Ed.Masson, París p.8
- (110) J.GLEE-COEFÉ, J.M.SENET (1.982)
"Estude de l'influence d'extraits aqueuse de végétaux
supérieurs sur la multiplication de Trichomonas vagi-
nalis en culture axénique in vitro"
Plant.Med. et Phytother., 16, (1), 39-45
- (111) X.A.DOMINGUEZ (1.973)
"Métodos de investigación fitoquímica"
Ed. Limusa S.A., México p.84

- (112) W.T.TORRENT MARTIN (1.976)
"Algunos aspectos farmacognósticos y farmacodinámicos
de Lippia citriodora H.B.K."
Rev.B.Acad. de Barcelona, (14), 39
- (113) R.PARIS, H.MOYSE (1.971)
"Matière Médicale"
3, 2ªed., Ed. Masson, París p.59
- (114) J.CABO TORRES, P.PARDO (1.974)
"Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia"
4ªed., Ed. Gráficas del Sur, Granada, p.256
- (115) R.PARIS, H.MOYSE (1.971)
"Matière Médicale"
3, 2ªed., Ed. Masson, París p.111
- (116) R.PARIS, H.MOYSE (1.971)
"Matière Médicale"
3 2ªed., Ed. Masson, París p.110
- (117) J.CABO TORRES, P.PARDO (1.974)
"Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia"
4ªed., Ed. Gráficas del Sur, Granada, p.91
- (118) J.CABO TORRES, P.PARDO (1.974)
"Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia"
4ªed., Ed. Gráficas del Sur, Granada, p.92
- (119) J.CABO TORRES, P.PARDO (1.974)
"Prácticas de Farmacognosia y Farmacodianmia"
4ªed., Ed. Gráficas del Sur, Granada, p.56

- (120) X.A.DOMINGUEZ (1.973)
"Métodos de investigación fitoquímica"
Ed. Limusa S.A., México, p.85
- (121) R.PARIS, H.MOYSE (1.971)
"Matière Médicale"
3, 2^aed. Ed. Masson, Paris p.103
- (122) J.CABO TORRES, P.PARDO (1.974)
"Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia"
4^aed., Ed. Gráficas del Sur, Granada, p.104
- (123) R.PARIS, H.MOYSE (1.971)
"Matière Médicale"
3, 2^aed. Ed. Masson, Paris p.8
- (124) E.MARHUENDA, M.D.GARCIA (1.985)
"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
- (125) N.DIDRY, M.PINKAS, M.TORCK (1.982)
"Sur la composition chimique et l'activité antibacte
rienne des feuilles de diverses espèces de Grindelia"
Plant.Med. et Phytother., 26, (1), 7-15
- (126) M.TORCK, M.PINKAS (1.980)
"Sur quelques polyphénols de Medicago arborea L."
Plant.Med. et Phytother., 14, (1), 20-25
- (127) P.RIBERAU-GAYON (1.968)
"Les acides-phenols et leurs dérivés"
Ed. Dunod, Paris, p.97

- (128) N.DIDRY, M.PINKAS, M.TORK (1.980)
"Recherche sur les polyphenols du Tussilage"
Ann.Pharm.Fran., 38, (3), 237-241
- (129) R.R.PARIS, H.JACQUEMIN (1.975)
"Sur les feuilles de deux quinquinas de Madagascar
(Cinchona ledgeriana Moens et C.succirubra Pavon).
Etude particulière des polyphénols (acides-phénols,
anthocyanes et flavonoides)"
Ann.Pharm.Fran., 33, (2), 73-76
- (130) M.C.SALAS, A.BALLESTER, E.VIEITEZ (1.973)
"Estudio biológico y químico de Erica umbellata L."
Ana.Edafol.Agrobiol., 32, (9-10), 807-814
- (131) M.I.FRAGA VILA (1.982)
"Aportaciones al estudio taxonómico de las especies
de los géneros Erica y Calluna presentes Galicia"
Tesis Doctoral, Santiago de Compostela
- (132) Y.PELISSIER, R.P.GODEAU, I.FOURASTE (1.980)
"Les constituants de Viburnum rhytidophyllum Hemsl.
Composés phénoliques des feuilles: acides phénols"
Phaem.Med., 13, p.528-532
- (133) M.TORCK, M.PINKAS (1.980)
"Sur quelques polyphénols de Medicago arborea L."
Plant.Med. et Phytother., 14, (1), 20-25
- (134) E.W.KONEMAN, S.D.ALLEN, V.R.DOWELL (1.979)
"Diagnostic microbiology"
Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, p.319

- (135) F.SORIANO (1.976)
"Manual de Bacteriología (Recopilación de Técnicas)"
Difco Laboratories, p.98
- (136) T.G.ANDERSON (1.961)
"An evaluation of antimicrobial susceptibility tes--
ting. In antimicrobial agents annual"
Plenum Press, New York, 400-414
- (137) E.W.KONEMAN, S.D.ALLEN, V.R.DOWELL, H.M.SOMMER (1.983)
"Diagnóstico Microbiológico"
Ed. Panamericana, Buenos Aires p. 380
- (138) G.B.WILSON (1.969)
"División Celular y Ciclo Mitótico"
Ed. Alhambra, Madrid p.37
- (139) M.LITTER (1.980)
"Farmacología"
6ªed. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, p.1818
- (140) W.MORRISON (1.971)
"Citología"
C.E.C.S.A., México, p.182
- (141) G.A.CORDELL (1.976)
"Recent Experimental and Clinical Data Concerning
Antitumor and Citotoxic Agents from plants"
New.Nat.Prod.Plant.Drugs Pharmacol; Biol.Ther.Act;
Proc.Inst.Congr., 1st, 55-82
- (142) A.LEVAN, TH.LOTFY (1.949)
"Naphthalenacetic acid in the Allium test"
Hereditas, 35, 336-374

- (143) F.SALOM, M.H.CANTARINO (1.983)
"Curso de prácticas de Biología General"
Ed. H.Blume, Madrid, p.64
- (144) G.B.WILSON, J.H.MORRISON (1.971)
"Citología"
C.E.C.S.A., Barcelona, p.276
- (145) J.B.TJIO, A.LEVAN (1.950)
"The use of oxiquinoline in chromosome analysis"
Ann.Estac.Exp.Aula Dei, 2, 21-64
- (146) J.F.LOPEZ-SAEZ, M.E.FERNANDEZ GOMEZ (1.965)
"Partial mitotic index and phase indices".
Experimentia, 21, 591-594
- (147) J.F.LOPEZ-SAEZ & Colbs (1.966)
"Duration of the cell division cycle and its dependence on temperature"
Z.Zellforsch, 75, 591-600