

CATEDRA DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

"INICIACION AL ESTUDIO DE ERICA ANDEVALENSIS

CABEZUDO - RIBERA"

Tesina presentada por Josefa  
Riquelme Gálvez para aspirar  
al grado de Licenciada en  
Farmacia



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
CATEDRA DE FARMACOGNOSIA - FARMACODINAMIA

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, "Iniciación al estudio de Erica andevalensis Cabezu-do-Rivera" ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica-Farmacognosia y Farmacodinamia, bajo la dirección del Catedrático Interino Dra. Ma Victoria Toro Sáinz, 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 seis de Octubre de mil novecientos ochenta y tres.

Fdo. Felipe Alcudia González

El presente trabajo ha sido realizado en la  
Cátedra de Farmacognosia y Farmacodinamia  
de la Facultad de Farmacia de la Universi\_  
dad de Sevilla, bajo la dirección de la  
Dra M<sup>a</sup> Victoria Toro Sáinz.

Sevilla, septiembre de 1.983

La directora del trabajo

*Victoria Toro*

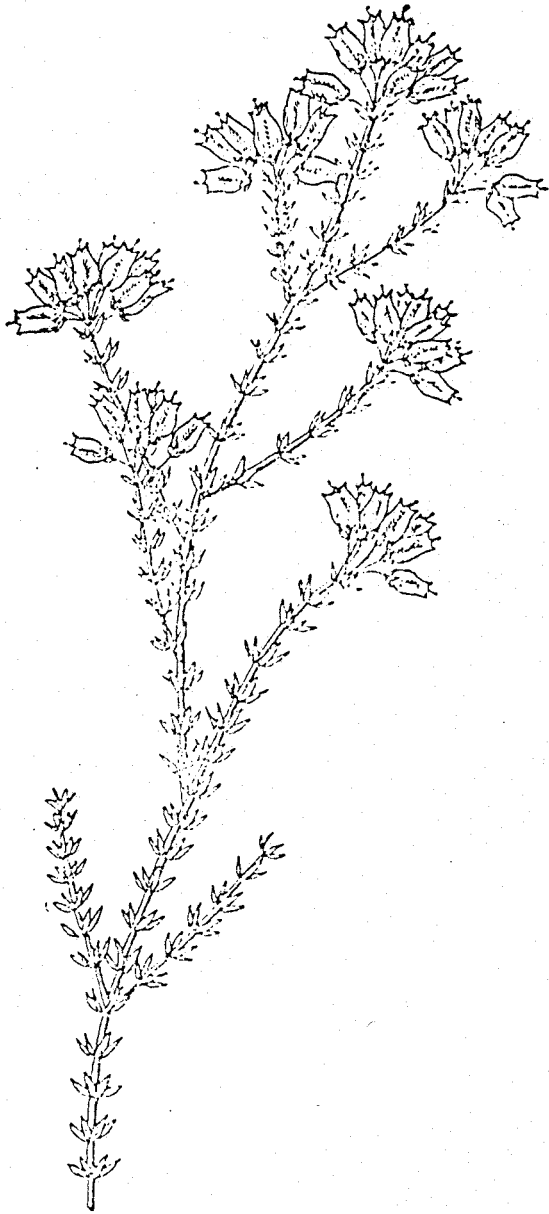
*Y. B.º El Director Dpto.*

*[Signature]*

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Ma Victoria Toro Sáinz por la dirección de este trabajo.

Agradezco su colaboración al Departamento de Microbiología y Botánica de esta Facultad de Farmacia y a Ma de los Angeles Novales del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina.

También deseo hacer patente mi gratitud a mis compañeras de departamento por su apoyo y ayuda que me han prestado.



*Erica andevalensis* Cabezudo - Rivera

A mis padres y hermana

S U M A R I O

## S U M A R I O

I.- <u>OBJETO</u> . . . . .	1
II.- <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u> . . . . .	3
II.1.- Botánica . . . . .	3
II.1.1.- Situación taxonómica . . . . .	3
II.1.2.- Descripción de la especie . . . . .	4
II.1.3.- Ecología . . . . .	5
II.2.- Macro y Micromorfología . . . . .	7
II.2.1.- Macromorfología . . . . .	7
II.2.2.- Micromorfología . . . . .	7
II.3.- Fitoquímica . . . . .	9
II.4.- Alelopatía . . . . .	12
II.5.- Acción farmacológica . . . . .	16
II.6.- Usos . . . . .	18
III.- <u>PARTE EXPERIMENTAL</u> . . . . .	19
III.1.- Muestras . . . . .	19
III.2.- Estudio anatomo-histológico de la hoja . . . . .	20
III.3.- Determinación de humedad y cenizas . . . . .	25
III.3.1.- Humedad . . . . .	25
III.3.2.- Cenizas totales . . . . .	26
III.4.- Screening fitoquímico . . . . .	27
III.4.1.- Extracción . . . . .	27
III.4.2.- Cuerpos grasos . . . . .	32
III.4.3.- Resinas . . . . .	32



III.4.4.-	Pigmentos carotenoides	. . . . .	33
III.4.5.-	Pigmentos leucoantociánicos	. . . . .	33
III.4.6.-	Pigmentos antociánicos	. . . . .	34
III.4.7.-	Flavonoides	. . . . .	34
III.4.8.-	Cumarinas	. . . . .	35
III.4.9.-	Quinonas libres	. . . . .	36
III.4.10.-	Quinonas combinadas	. . . . .	36
III.4.11.-	Esteroles y triterpenos	. . . . .	37
III.4.12.-	Lactonas pentagonales insaturadas	. . . . .	39
III.4.13.-	Azúcares	. . . . .	39
III.4.14.-	Saponinas	. . . . .	41
III.4.15.-	Taninos	. . . . .	43
III.4.16.-	Alcaloides	. . . . .	44
III.4.17.-	Discusión de resultados	. . . . .	49
III.5.-	Toxicidad aguda	. . . . .	50
	- Descripción del método	. . . . .	50
	- Desarrollo de la experiencia	. . . . .	50
	- Resultados	. . . . .	51
	- Discusión de resultados	. . . . .	51
III.6.-	Diuresis	. . . . .	52
	- Descripción del método	. . . . .	52
	- Desarrollo de la experiencia	. . . . .	53
	- Cálculos estadísticos	. . . . .	53
	- Resultados	. . . . .	55
	- Discusión de resultados	. . . . .	65

III.7.- Determinación cualitativa de la actividad	
antibacteriana . . . . .	66
- Método . . . . .	66
- Desarrollo de la experiencia . . . . .	67
- Resultados . . . . .	68
- Discusión de resultados . . . . .	69
III.8.- Actividad citostática . . . . .	70
- Descripción del método . . . . .	70
- Desarrollo de la experiencia . . . . .	71
- Resultados . . . . .	71
- Discusión de resultados . . . . .	75
IV.- <u>CONCLUSIONES</u> . . . . .	76
V.- <u>BIBLIOGRAFIA</u> . . . . .	79

I.- OBJETO

## I.- OBJETO

El género Erica tiene una amplia distribución geográfica en la Península Ibérica.

Desde tiempo inmemorial se le han atribuido a algunas de sus especies la propiedad de romper los cálculos urinarios (1), prescribiéndose además como diuréticas, antisépticas de vías urinarias y antidiarreicas (2).

Trabajos realizados sobre distintas especies del género Erica que crecen en nuestro país (3,4), han llevado a la conclusión de que algunos de los componentes de las mismas actúan como agentes alelopáticos. Este hecho puede tener una gran repercusión en la agricultura (5), al ser utilizadas estas especies o sus principios como herbicidas naturales.

En 1974, se recolectaron en la comarca del Andévalo (Huelva) unas plantas de Erica que no recordaban a ninguna de las especies reseñadas para la provincia. Su es

tudio detallado demostró que se trataba de una nueva especie: *E. andevalensis* Cabezudo-Rivera (6), restringida a la citada comarca.

Al iniciar su estudio, pretendemos abrir un camino para investigaciones más profundas, que puedan aportarnos datos sobre su posible interés en el campo de la Terapéutica o la Agricultura.

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

## II.1.- BOTANICA

### II.1.1.- Situación taxonómica

Clase . . . . .	Magnoliosida
Subclase . . . . .	Dilleniidae
Orden . . . . .	Ericales
Familia . . . . .	Ericaceas
Género . . . . .	Erica
Especie . . . . .	E. andevalensis

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 (Franqueniaceas) 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 cortos que la corola. Corola cilíndrica, campanulada o urceolada, con lóbulos más cortos o iguales que

el tubo. Los estambres 8(-10), insertos entre los lóbulos de un disco (nectario discoidal); anteras con o sin apéndice. El fruto es una cápsula loculicida (8).

### II.1.2.- Descripción de la especie

Etimológicamente el nombre de "Erica" deriva del verbo griego "ἔρειξεῖν" (romper), aludiendo a la propiedad atribuida a algunas de las especies desde tiempo inmemorial, de romper los cálculos urinarios (1).

El epíteto específico "andevalensis" (6) hace mención a la comarca del Andévalo, a cuya zona minera se circunscribe la especie.

*Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera 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 y 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 glandulares de 0'2-0'3 mm. Flores en umbela terminal; pedicelos puberulentos de 4-5 mm; bracteolas próximas al cáliz. Sépalos de 1'5 mm, puberulentos, pelos glandulares marginales. Corola urceolada de 5-6 mm, rosa fuerte, persistente, con 4 lóbulos revolutos. Anteras incluidas, apendiculadas. Ovario glabro, estigma capitado exerto. Fruto cápsula polis



perma; semillas de C. 4 mm.

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

### II.1.3.- Ecología

La familia es prácticamente cosmopolita teniendo dos áreas disyuntas con un máximo de representantes, uno en Eurasia y parte de América del N. 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 importantes en los matorrales de la Península Ibérica conocidos por brezales (11), principalmente localizados sobre substrato ácido y clima atlántico (N., N.W., W. y S.W.).

Erica andevalensis Cabezudo-Rivera se encuentra restringida a las escombreras y cercanías de las minas de pirita (6) de la comarca del Andévalo (Huelva).

Todas las especies europeas de la familia Ericaceas que han sido investigadas, son micorrizales (3,8,12, 13); es decir, sus raíces viven en asociación con los hongos del suelo, lo que supone un beneficio para ambos (13). En caso de las Ericaceas 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 (14). Esta asociación favorece a las

Ericaceas la supervivencia en habitats 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 más arriba, casi todas las especies de Erica requieren un suelo ácido turboso para medrar (15). El ph ideal es de 5'6 a 6 (10). Si el suelo no es lo bastante ácido, el crecimiento será escaso y las hojas sufriran decoloración (16). La mayoría de las especies de esta familia son calcífugas (8) si bien algunos híbridos y cultivares pueden crecer en suelo, que contengan cal en forma libre, pero no caliza sólida (10).

No son demasiado exigentes en lo que a suelo se refiere debido principalmente a su enorme capacidad de evaporación, lo que las 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 condicionan la supervivencia de los brezales en el clima atlántico y sobre suelos paupérrimos evitando la competencia con otras plantas de mayores necesidades.

## II.2.- MACRO Y MICROMORFOLOGIA

### II.2.1.- MACROMORFOLOGIA

Para la macromorfología nos remitimos a la descripción botánica de la especie (apartado II.1.2.).

### II.2.2.- MICROMORFOLOGIA

El examen histológico de las hojas de Ericáceas muestra las siguientes características:

- Cutícula: varía considerablemente de espesor, pero casi siempre está más desarrollada en la capa superior que en la inferior (17).
- Epidermis: constituida por una sola capa de células (*E. tetralix* L.), o dos (*E. mackiana* Bab.) (18).

Las células epidérmicas varían en la forma y grosor de sus paredes (17), algunas de las cuales contienen frecuentemente mucílagos.

En el género *Erica* la epidermis inferior es papilosa y a veces también la superior.

- Mesofilo: en él se incluyen fibras o grupos de elementos esclerenquimatosos situados en el margen de las hojas en las especies de *Erica* (18).

Los haces vasculares de los nervios suelen estar asociados a tejidos mecánicos.

Los nervios secundarios están incrustados y a veces transcurren verticalmente.

Cristales que se presentan aislados o agrupados, si bien no existe en algunas especies de Erica.

- Estomas: situados en la cara inferior generalmente. Están limitados a las estrías o surcos que aparecen en esta cara en las especies con hojas enroscadas.
- Pelos: en la familia Ericaceas pueden encontrarse dis tintos tipos de pelos (17):

Tectores simples, a veces con ramificaciones

Glandulosos peltados o no peltados

En *E. andevalensis* Cabezudo-Rivera existen pelos glan dulosos de 0'2 a 0'3 mm (6).

Se ha observado (18) que algunos de los pelos cortos o papilosos de la cara inferior de las hojas de *E. te* tralix L. y otras especies relacionadas, presentan una estructura más compleja de la que en un principio se pensaba

En el peciolo pueden observarse células secretoras in tensamente coloreadas (probablemente conteniendo tani nos), así como cristales aislados o agrupados.

### II.3.- FITOQUIMICA

En el presente capítulo ofrecemos una visión general de los compuestos pertenecientes a los distintos grupos químicos que se encuentran presentes en el género Erica.

Se han encontrado principios de diversa naturaleza tales como arbutósido (1,2,7,19), taninos (1,2,7,19,20), una materia resinosa y un aceite de olor desagradable (1). También se ha detectado orcinol tanto libre como en forma de heterósido (21,22). Parece probable que este compuesto se forme a partir de las micorrizas, ya que es un metabolito de hongos. Esto explicaría su presencia en plantas superiores.

El polen (23) contiene hidratos de carbono, lípidos, proteínas y aminoácidos (serina, cistidina, e histidina).

#### Elementos minerales

En polen y hojas se ha detectado Fe, Ca, Mg, K, Na y P, siendo relativamente elevado el contenido en Mn (23,24).

La relación Ca/K suele ser baja en las plantas calcífugas; sin embargo existen algunas especies de Ericeas (25) donde dicha relación es elevada.

#### Acidos

Contiene ácido benzoico, y cinámico (21,22); éste último se encuentra generalmente combinado en forma de ésteres.

### Acidos fenoles

Los más frecuentes en el género *Erica* son: p-cumárico, ferúlico, cafeico, vaníllico, protocatéquico, p-hidroxi-benzoico, gentísico (21,22,26,27)

Se han detectado también los ácidos sinápico y salicílico en *E. arborea* L. (28,29) y *E. australis* L. (3), (28), así como el 2-hidroxifenil acético en *E. scoparia* L. (30).

### Flavonoides

Numerosos flavonoides han sido aislados de las hojas de diversas especies pertenecientes al género *Erica*.

La quercetina se encuentra en casi todas las especies, también se presentan con frecuencia Kanferol y miricetina (31).

Se ha identificado así mismo azaleatina (quercetina-5-metil eter), kanferol-5-metil eter (32), 5-O-metil flavonoles y gosipetina (31) (de interés como marcador taxonómico), así como la gosipetina-3-galactósido (33).

### Cumarinas

La escopoletina se ha encontrado en *E. cinerea* L. (21,22), *E. arborea* L. (28), *E. australis* L. (3,28) y *E. vagans* L.. En esta última especie se ha detectado también un compuesto con comportamiento similar a las cumarinas (26).

La esculetina se encuentra presente en *E. australis* (3) y *E. vagans* L. (26).

### Alcaloides

En las Ericaceas es muy rara la presencia de alcaloides (7).

No obstante, se ha detectado en *E. lusitanica* Rud un contenido alcaloídico por encima de 0'015 %. La base identificada es 4-metoxi etil amina (34).

#### II.4.- ALELOPATIA

Se conoce a este fenómeno como el efecto inhibi\_ dor que una especie vegetal (dadora) produce sobre la ger\_ minación, crecimiento o desarrollo de otra especie (recep\_ tora), mediante uno o varios compuestos químicos naturales que son liberados por la primera al medio ambiente (5).

Aparentemente, existen cuatro caminos diferentes para que la planta ceda algún compuesto (35):

- lixiviación por lluvia
- eliminación como componentes volátiles
- acumulación de residuos vegetales en el suelo y posterior liberación de principios
- exudación por las raíces

Es necesario resaltar el efecto devastador de las malas hierbas en la agricultura mundial, que ha lleva\_ do al uso masivo de herbicidas (5); este hecho se ha vis\_ to sometido, desde hace años, a la presión de los grupos ecologistas, fundamentalmente en países donde este consu\_ mo ha sido más elevado, como en U.S.A., ya que han detec\_ tado malformaciones en niños y animales nacidos con poste\_ rioridad al empleo masivo de herbicidas.

Por todo ello, algunos autores, en un intento de imitar a la naturaleza, indican la conveniencia de in\_ vestigar herbicidas naturales o recolectar especies vege\_ tales que sean capaces de producirlos.



Se ha demostrado que los inhibidores alelopáticos detienen el crecimiento y la división celular, formando células con núcleos tetraploides o células binucleadas, impiden la toma de minerales, retrasan la fotosíntesis, inhiben la respiración o la apertura estomática, producen cambios en la permeabilidad de las membranas o inhiben la síntesis de proteínas o de enzimas específicos; es decir, actúan como auténticos herbicidas naturales.

Por lo tanto, sería conveniente encontrar variedades de especies de cultivo que liberen compuestos naturales altamente alelopáticos capaces de inhibir la germinación de la semilla, el crecimiento de las plántulas o prevenir la propagación de las malas hierbas. Especies de alto valor económico son muy pobres actualmente en su potencial alelopático. Sería necesaria la manipulación genética de estas especies para conseguir líneas o variedades altamente alelopáticas que actúen liberando auténticos herbicidas naturales.

Otra solución podría ser la de utilizar en un cultivo una "planta compañera" altamente alelopática que inhibiese a las malas hierbas, pero no a las del propio cultivo.

Podría darse también el caso de que la "planta compañera" no liberase directamente compuestos tóxicos sino que depositase residuos en el suelo y la descomposición microbiana de los mismos desprendiesen las toxinas.

El introducir en un cultivo una "planta compañera" puede hacer pensar en la competencia de ambas especies por la humedad, luz, o los nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos. Sin embargo, la alelopatía no altera ninguno de estos factores ya que no es un mecanismo competitivo, sino que añade al habitat un factor nuevo de naturaleza bioquímica.

Diversos autores (21,22,29) indican la posibilidad de que los compuestos fenólicos presentes en las Ericáceas actúen como agentes alelopáticos, lo que ha sido confirmado (5) mediante experiencias realizadas en los invernaderos.

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

Se ha ensayado con varias semillas en presencia de ácidos fenólicos (27) y comprobado que inhiben la germinación y crecimiento.

El PHB actúa como inhibidor a partir de 200  $\mu$ g/ml.

Los ácidos ferúlico y p-cumárico producen máxima inhibición.

Hay que considerar también los ácidos cafeicos y vaníllico.

Extractos de *E. arborea* L. (29) y *E. australis* L. (3,36) han demostrado tener actividad inhibitoria sobre la

germinación de semilla de *Phleum pratense* y *Trifolium repens*.

Los extractos de flores y hojas son los de más alto poder fitotóxico, donde se encuentran el ácido salicílico y gentísico (29).

También se han identificado como inhibidores alopatícos la esculetina (28) y la escopoletina (5,22). Esta última actúa como inhibidor de la germinación de las semillas de fleo incluso a concentraciones muy bajas.

## II.5.- ACCION FARMACOLOGICA

Como se ha señalado anteriormente, el vocablo Erica significa "romper", haciendo alusión a la propiedad que se le atribuye de romper los cálculos urinarios (1).

Su constitución química le confiere una acción diurética (1,19,37) y antiséptica (1) innegable. La acción diurética es debida tanto al arbutósido como a la quercetina (37).

El arbutósido es responsable también de la actividad antiséptica de las vías urinarias (1,2,19,20,37); en el organismo pasa a hidroquinona que se elimina rápidamente por el riñón, comunicando a la orina una coloración verde oliva (37).

La quercetina tiene además actividad purgante.

Las propiedades astringentes de las Ericas (2,19,20,37) se deben a los taninos.

Estudios realizados sobre la actividad que presentan las Ericaceas sobre microorganismos y fibroblastos, demuestran su eficaz acción inhibitoria (38).

Extractos de algunas Ericaceas tienen acción antibacteriana frente a Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Mycobacterium tuberculosis (39), siendo el arbutósido y la quercetina, entre otros compuestos, los que le confieren esta acción.

Así mismo, se ha comprobado que extractos obtenin

dos de polen de *E. arborea* L.(40) se muestran activos frente a cepas de Proteus y Salmonella.

Se señala también una actividad fungicida contra Candida albicans, y Trichophyton mentagrophytes (39); también activos frente al crecimiento de Trichomonas vaginalis (41).

## II.6.- USOS

Erica cinerea se prescribe como antidiarréico (2) y en infecciones renales y de las vías urinarias (1,2), habiéndose observado en caso de cistitis con piuria resultados idénticos e incluso superiores a los obtenidos con otras Ericaceas (Gayuba).

En enfermos con enteritis y cistitis de origen bacteriúrico, 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 de tenesmo que acompaña que acompaña a las micciones (1).

Se utilizan las sumidades floridas bien bajo forma de coción (50 g/l, sometiendo a ebullición hasta un tercio de su volumen) o de extracto fluido (1-2 cucharadas de café por día) (2,42). Se suele asociar con otras drogas diuréticas y se recomienda efectuar tratamientos discontinuos (2)

III.- P A R T E E X P E R I M E N T A L

III.1.- MUESTRA

Especie . . . . . E. andevalensis Cabezudo  
y Rivera  
Fecha de recolección . . . 30-1-82  
Localidad . . . . . Nerva (Huelva)  
Parte utilizada . . . . . Sumidad florida



### III.2.- ESTUDIO ANATOMO-HISTOLOGICO DE LA HOJA

Para el estudio de la anatomía microscópica de la hoja de *E. andevalensis* Cabezudo-Ribera hemos utilizado las técnicas clásicas de cortes y posteriores manipulaciones.

Los cortes se han efectuado a mano, sometiéndolos sistemáticamente a la acción de algunos reactivos que nos permitieran esclarecer las estructuras, tales como:

- Cloroioduro de zinc (43,44): reactivo de elección para la observación de estructuras celulósicas a las que tiñe de violeta, dándole a la vez un tinte azul oscuro a la fécula y amarillo a la lignina.
- Floroglucina clorhídrica (43): mezcla de floroglucina alcohólica y ClH a.a. que tiñe fuertemente de rojo a la lignina.
- Sudán III (45): tiñe de rojo anaranjado a los tejidos cutinizados y suberificados, así como a grasas y esencias.
- Reactivo universal de Steinmetz (46): dada su composición aclara y tiñe simultáneamente, por lo que resulta de mucha utilidad al darnos una orientación general cuando nos encontramos ante una estructura nueva.

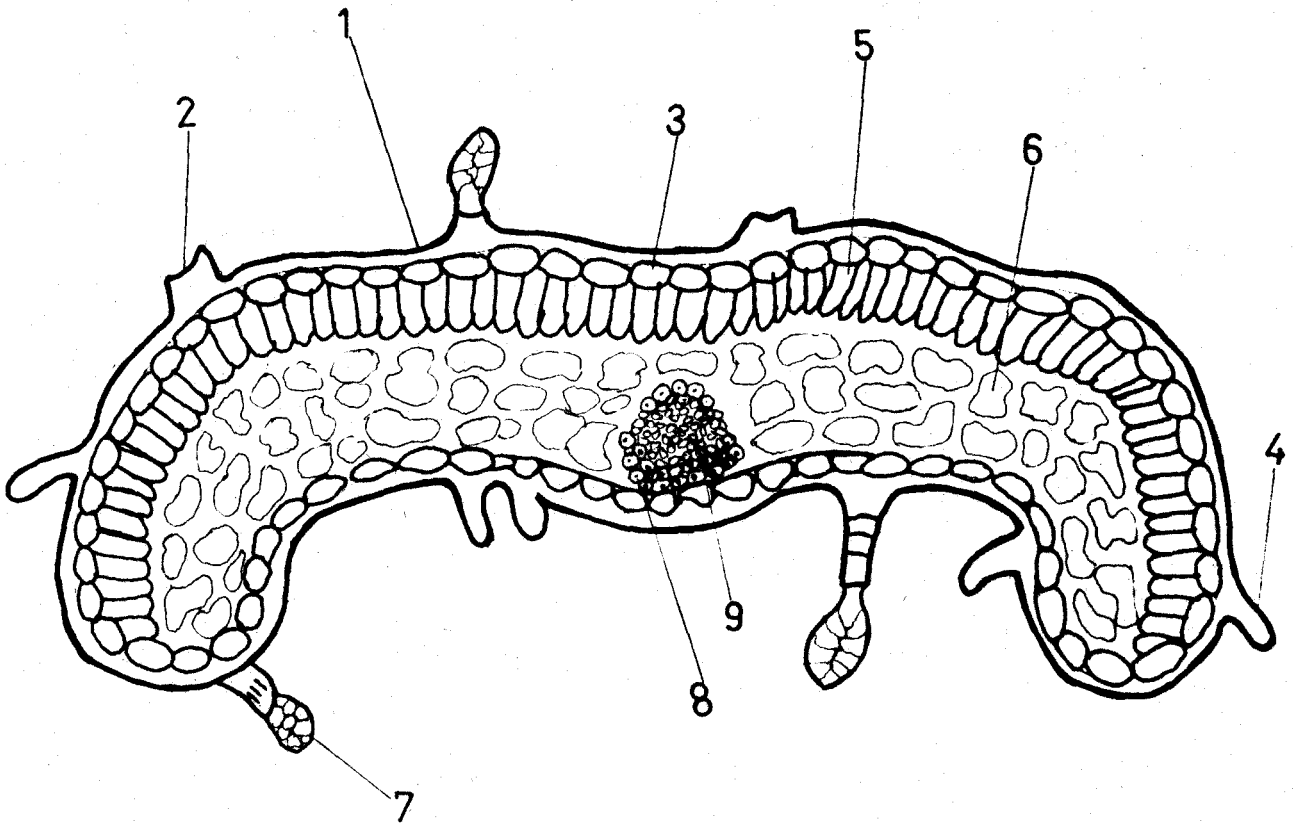
En un corte transversal de la hoja puede observarse las siguientes estructuras:

- Una capa de cutina cérea que rodea a ambas epidermis.
- Epidermis superior constituida por una sola fila de célu

las tabulares; aparecen escasos pelos truncados, tectores unicelulares y glandulosos de pie unicelular.

- Parénquima en empalizada constituido por una sola fila de células alargadas.
- Parénquima lagunar esponjoso
- Nervio central formado por haces conductores y rodeado por dos arcos de fibras de esclerénquima.
- Epidermis del envés con pelos tectores unicelulares de pared verrucosa y pelos glandulosos con pie unicelular (de mayor o menor longitud) o pluricelular (muy escasos) y cabeza pluricelular.

Incluimos a continuación un esquema anatomo-histológico de la hoja y algunas fotografías en las que se observan detalles de su estructura. Estas han sido realizadas mediante un equipo microfotográfico Olympus, modelo OM-1, adaptado al microscopio.

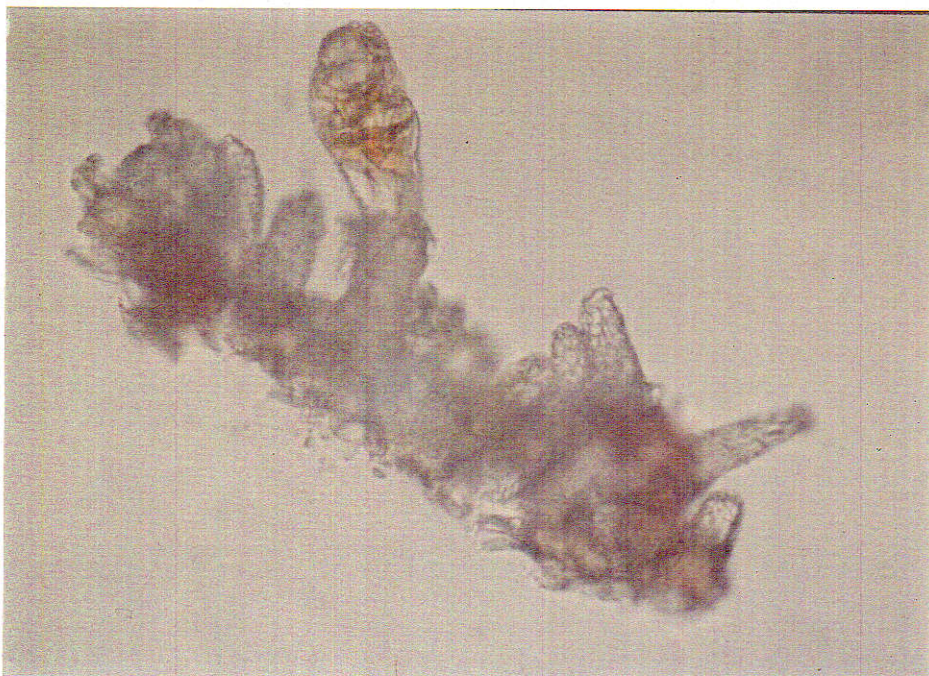


1) Cutícula    2) Pelo truncado    3) Epidermis

4) Pelo tector    5) Parénquima en empalizada

6) Parénquima lagunar    7) Pelo glanduloso

8) Esclerénquima    9) Nervio central



Pelo glanduloso y tectores

40 x 10 aumentos



Sección transversal de la hoja

20 x 10 aumentos





Corte transversal de la hoja  
Detalle del nervio medio  
20 x 10 aumentos

### III.3.- DETERMINACION DE LA HUMEDAD Y CENIZAS TOTALES

#### III.3.1.- HUMEDAD

Para la determinación del grado de humedad hemos seguido el método por deshidratación a 100°-105°C (método gravimétrico) (47).

##### Técnica

Se toman de 1 a 2 g de droga en polvo y se pesa al 0'001 g en pesa-sustancia previamente desecado y tarado, que se mantiene cerrado durante la pesada. Se lleva el pesa sustancia destapado a estufa de desecación a 100°-105°C y se mantiene a dicha temperatura dos o tres horas.

Se tapa y se enfría en desecador y se pesa nuevamente, repitiendo con intervalos de una hora aproximadamente, el calentamiento en estufa y enfriamiento sucesivo, hasta consecución de dos pesadas concordantes.

Se consideran pesadas concordantes las que difieren entre si en un peso no superior a 0'001 g. los resultados se expresan en: "humedad y sustancias volátiles, entre 100°-105° por 100".

##### Resultados

En nuestra experiencia hemos realizado la determinación de la humedad en tres muestras siendo el resultado medio obtenido de 11'48 %

### III.3.2.- CENIZAS TOTALES

#### Técnica

En crisol de porcelana se pesan de 1 a 2 g ( $\pm 0'001$ ) de droga seca. Se calienta primero suavemente, para ir quemando los gases que se desprenden, y se eleva después gradualmente la temperatura hasta llegar al rojo sombra (500-550°) (48)

Si las cenizas conservan partículas carbonosas se adicionan unos mililitros de agua destilada, o mejor agua oxigenada. Se lleva a estufa a unos 100°, para eliminar totalmente el agua y se calcina de nuevo.

Las cenizas así obtenidas deben tener coloración blanco grisáceo; se enfría en desecador y se pesa. Se repite la operación (calcinación, enfriamiento, pesada), varias veces, hasta conseguir dos pesadas concordantes, siguiendo el criterio establecido para la determinación de la humedad.

#### Resultados

Hemos procedido a la determinación de cenizas totales en las tres muestras utilizadas en la experiencia anterior.

Cenizas totales = 4'58 %

### III.4.- SCREENING FITOQUIMICO

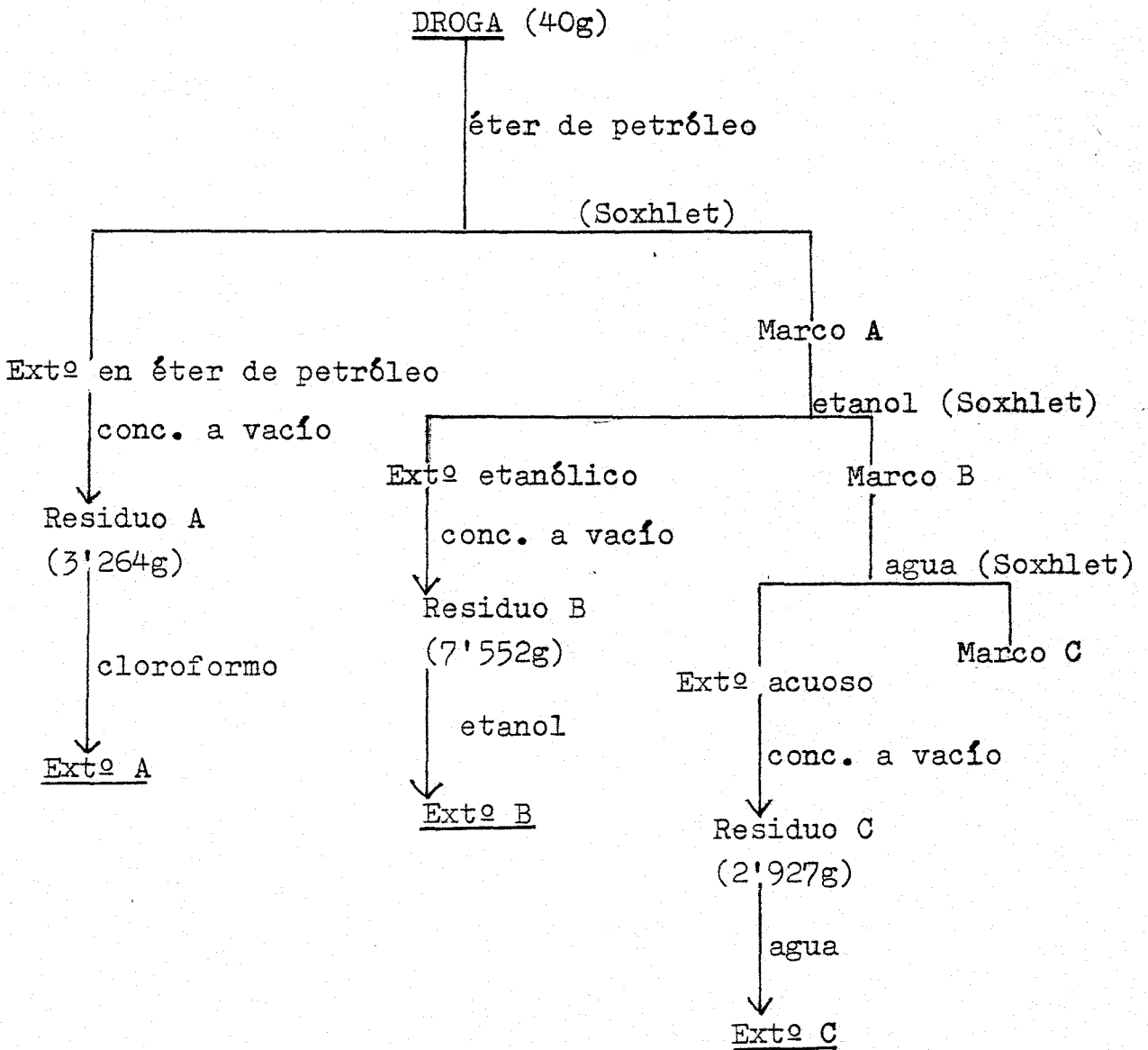
#### III.4.1.- EXTRACCION

A partir de las sumidades floridas de E. andevalensis Cabezudo-Rivera hemos llevado a cabo extracciones sucesivas en Soxlet, operando con tres disolventes de polaridad creciente: éter de petróleo, alcohol y agua, siguiendo el método ITESM A (49), en el que hemos introducido pequeñas modificaciones de acuerdo con la solubilidad de los productos obtenidos.

El siguiente esquema representa el proceso de obtención de los diferentes extractos.



## ESQUEMA DEL PROCESO EXTRACTIVO



Hemos utilizado como disolvente inicial éter de petróleo. Mantuvimos la droga en maceración durante 12 horas y posteriormente fue sometida a extracción en Soxhlet hasta agotamiento de la misma.

El extracto obtenido fue concentrado a sequedad en rotavapor, obteniéndose un residuo de color amarillo que representa el 8'16 % de la droga. Este residuo es muy poco soluble en etanol y totalmente soluble en cloroformo, disolvente que utilizamos para la obtención del extracto A.

El marco de la droga resultante de la extracción con éter de petróleo, fue tratado con etanol de 96° en las mismas condiciones señaladas anteriormente, obteniendo un 18'88 % de residuo que fue solubilizado en etanol, constituyendo el extracto B

La extracción acuosa se llevó a cabo a partir del marco resultante de las dos experiencias previas, en idénticas condiciones. El residuo obtenido representa el 7'32 % de la droga y la solubilizó en agua, dando lugar al extracto C

Se han realizado dos extracciones acuosas (maceración y cocción) por ser la forma más usual de consumo de plantas medicinales en Medicina Popular.

Cocción: Se ha llevado a cabo también hasta agotamiento de la droga. El residuo seco obtenido representa el

24'20 % de la droga.

Maceración: La droga es puesta en maceración en agua fría durante 24 horas, al cabo de las cuales se filtra y se le añade nuevamente agua. Esta operación se repitió hasta que el líquido extractivo no presentaba coloración. El extracto total fue concentrado en rotavapor hasta residuo seco (11'85 %).

En cada uno de los extractos obtenidos se ha investigado la presencia de los siguientes grupos de compuestos:

Extracto A : cuerpos grasos, resinas, pigmentos carotenoides, leucoantociánicos y antociánicos, cumarinas, quinonas libres, quinonas combinadas, esteroides y triterpenos, lactonas pentagonales insaturadas, alcaloides.

Extracto B : pigmentos leucoantociánicos y antociánicos, flavonoides, cumarinas, quinonas libres, quinonas combinadas, esteroides y triterpenos, lactonas pentagonales insaturadas, azúcares, taninos, alcaloides.

Extractos : pigmentos antociánicos, flavonoides, cumarina, acuosos quinonas libres, lactonas pentagonales insaturadas, azúcares, saponinas, taninos, alcaloides

Para el screening fitoquímico, los diferentes extractos obtenidos se han llevado a una concentración del 15 % expresado en droga.

### III.4.2.- CUERPOS GRASOS

Utilizamos el reactivo de Serger (0'1 g de molib dato sódico finamente pulverizado en 10 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado ).

#### Técnica

Se añade 1 ml de reactivo a los extractos, apareciendo en la capa inferior una coloración gris azulada en caso de existir grasas de origen vegetal (50).

#### Resultados

Extracto A . . . . . -

### III.4.3.- RESINAS

Se ha investigado su presencia en el extracto A, ya que son solubles en éter de petróleo.

#### Técnica

Para purificar los ácidos diterpénicos, el extracto A se lava con NaOH al 5% que extrae la fracción ácida. Las aguas de lavado se separan y acidifican con ClH diluido, tratándolas con éter de petróleo destinado a extraer los ácidos libres; estos son disueltos en 1 a 2 ml de cloroformo tras evaporar el éter de petróleo. Adicionándole 4 ml de anhídrido acético y algunas gotas de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  contrado dan coloración amarillo oro (51).

Resultado

Extracto A . . . . . +

## III.4.4.- PIGMENTOS CAROTENOIDES

Para su detección en el extracto A hemos utilizado las siguientes reacciones coloreadas (52):

Técnica A

Al tratar el extracto con solución clorofórmica saturada de tricloruro de antimonio aparece color azul-violeta bastante fugaz en caso de existir carotenoides.

Técnica B

Por acción del ácido sulfúrico concentrado los carotenoides originan coloración azul.

Resultados

En ambas técnicas el resultado ha sido negativo lo que nos indica la ausencia de pigmentos carotenoides en nuestra planta.

## III.4.5.- PIGMENTOS LEUCOANTOCIANICOS

Se ha investigado su presencia en los extractos A y B.

Técnica A

Tratados los extractos con ácido clorhídrico en caliente, dan coloración rojo violáceo intensa por forma\_

ción de una antocianidina (53).

#### Técnica B

Los pigmentos leucoantociánicos (compuestos incoloros) son transformados en antocianos coloreados (rojos) bajo la influencia del sulfúrico concentrado (54).

#### Resultados

Extracto A . . . . .	-
Extracto B . . . . .	-

### III.4.6.- PIGMENTOS ANTOCIANICOS

#### Técnica

Se adicionan ClH al 20 % a los extractos y se agita con alcohol isoamílico, apareciendo una coloración rosa anaranjada en caso de resultado positivo (55,56).

#### Resultados

Extracto A . . . . .	-
Extracto B . . . . .	-
Extracto C . . . . .	-
Cocción . . . . .	-
Maceración . . . . .	-

### III.4.7.- FLAVONOIDES

Para la investigación de flavonoides hemos utili

zado la reacción de la cianidina (57).

#### Técnica

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

Extracto B . . . . .	+	+	+
Extracto C . . . . .	+		
Cocción . . . . .	+		
Maceración . . . . .	-		

### III.4.8.- CUMARINAS

#### Técnica

Al depositar los extractos en una tira de papel de filtro, la observación de fluorescencia a la luz U.V. indica la presencia de cumarinas (58).

Para resaltar la fluorescencia se pueden añadir una gota de sosa en cada uno de los puntos donde se depositaron los extractos.

#### Resultados

Extracto A . . . . .	-		
Extracto B . . . . .	-		
Extracto C . . . . .	+	+	
Cocción . . . . .	+	+	
Maceración . . . . .	+	+	



## III.4.9.- QUINONAS LIBRES

Técnica

Tras agitación con  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 50 % y posterior reposo debe aparecer una coloración rosa, roja, o violeta en caso de existir quinonas libres (56,59).

Resultados

Extracto A . . . . .	-
Extracto B . . . . .	-

## III.4.10.- QUINONAS COMBINADAS

Técnica

Tratados los extractos con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0'1 N se llevan a ebullición, agitándolos con benceno una vez enfriados. Separada la capa orgánica, debe dar coloración roja al tratarla con  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 50 % (56).

Resultados

Extracto A . . . . .	-
Extracto B . . . . .	-
Extracto C . . . . .	-
Cocción . . . . .	-
Maceración . . . . .	-

### III.4.11.- ESTEROLES Y TRITERPENOS

Hemos empleado las reacciones de Lieberman-Burchard y de Salkowski.

#### Reacción de Lieberman-Burchard

Cuando al adicionar este reactivo a los extractos hay formación de colores azul, verde, rojo, amarillo etc, que cambian con el tiempo, la prueba es positiva (60).

Hemos ensayado las modificaciones hechas a la técnica por diversos autores.

#### Técnica A

Se mezcla 1 ml de anhídrido acético con 1 ml de cloroformo, se enfrían a 0° y se le añade 1 gota de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado. El reactivo así preparado se adiciona a los extractos (60).

#### Resultados

Extracto A . . . . .	+
Extracto B . . . . .	-

#### Técnica B

Hemos adicionado a los extractos 1 gota de una disolución de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  en anhídrido acético helado (1 gota / 1 ml) (60).

#### Resultados

Extracto A . . . . .	+	+
Extracto B . . . . .	-	

Ante la posibilidad de que el color verde oscuro del extracto B pudiera enmascaramos un resultado positivo, hemos ensayado la siguiente modificación de la reacción.

### Técnica C

Se evapora en vidrio de reloj 1 ml del extracto, disolviendo el residuo en II gotas de anhídrido acético; la adición de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  conc. desarrolla, en presencia de compuestos esterólicicos o terpénicos, una coloración malva vi\_rando a verde (61).

### Resultados

Extracto A . . . . .	+	+	
Extracto B . . . . .	+	+	+

### Reacción de Salkowski

Además de la técnica que cita bibliografía (60) hemos ensayado una modificación de la misma similar a la técnica C de la reacción de Lieberman-Burchard.

### Técnica A

Se adicionan a 1 ml de extracto unas gotas de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  conc.

### Resultados

Extracto A . . . . .	+	+
Extracto B . . . . .	+	

### Técnica B

Evaporamos 1 ml de extracto en vidrio de reloj; sobre el residuo adicionamos unas gotas de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  conc.

Resultados

Extracto A . . . . .	+	+	
Extracto B . . . . .	+	+	+

## III.4.12.- LACTONAS PENTAGONALES INSATURADAS

Hemos ensayado la reacción de Baljet (62), específica de esta estructura.

Reactivos

Acido pícrico (sol. acuosa 1%). . . . .	95 ml
NaOH al 10% . . . . .	5 ml

Técnica

Al añadir a los extractos III-IV gotas del reactivo debe aparecer coloración rojo oscuro.

Resultados

Extracto A . . . . .	-	
Extracto B . . . . .	+	+
Extracto C . . . . .	-	
Cocción . . . . .	-	
Maceración . . . . .	-	

## III.4.13.- AZUCARES

Hemos utilizado las reacciones de Keller-Killiani (49), específica de 2-desoxiazúcares, de Molisch (63) y de Fehling (64); esta última es característica de azúcares

reductores.

Reacción de Keller-Killiani

Reactivos

Sol. I	(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> Fe <sub>2</sub> sol. acuosa al 5% . . . . .	1 ml
	ácido acético glacial . . . . .	99 ml
Sol. II	(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> Fe <sub>2</sub> sol. acuosa al 5% . . . . .	1 ml
	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> concentrado . . . . .	99 ml

Técnica

Se añade a los extractos 0'1 ml de solución I y, tras agitación, 1 gota de solución II. Después de agitar, la solución se colorea de azul o verde azulado en presencia de un 2-desoxiazúcar.

Resultados

Extracto B . . . . .	-
Extracto C . . . . .	-
Cocción . . . . .	-
Maceración . . . . .	-

Reacción de Molisch

Técnica

Se adicionan sobre los extractos solución de α-naftol; después se deja resbalar por las paredes 1 ml de sulfúrico. Si el resultado es positivo aparece un anillo en la interfase.

Resultados

Extracto B . . . . .	+
Extracto C . . . . .	+
Cocción . . . . .	++
Maceración . . . . .	++

Reacción de FehlingTécnica

Se adiciona el reactivo al extracto, calentando la mezcla a baño María durante dos minutos. La aparición de un precipitado rojo indica resultado positivo.

Resultados

Extracto B . . . . .	-
Extracto C . . . . .	+
Cocción . . . . .	+
Maceración . . . . .	+

## III.4.14.- SAPONINAS

Las saponinas tienen la propiedad de destruir las paredes celulares de los glóbulos rojos, liberándose de este modo la hemoglobina. Esta acción hemolítica se utiliza para investigar la presencia de saponinas, incluso en cantidades pequeñas (49).

Técnica

Tomamos 3 ml de sangre humana, y lavamos con sol.

salina fisiológica; la suspensión obtenida se centrifuga durante 5 minutos aproximadamente, y el sobrenadante se de secha cuantas veces sea necesario hasta que quede claro.

Las operaciones de centrifugado y decantado las hemos realizado cuatro veces, obteniéndose un sedimento de 1'5 ml.

Posteriormente diluimos al 3 % en sol. salina fi siológica el sedimento de G.R.. A continuación se colocan 1 ml de los extractos a ensayar en tubos de hemolisis y, siguiendo la técnica (62), se adiciona 1 ml de sol. salina al 1'8 % a cada muestra, para obtener una sol. isotónica con la sangre.

Sobre esta mezcla se añaden 3 ml de suspensión isotónica de G.R. al 3 % y se deja reposar durante 12 ho\_ ras; así mismo hemos preparado un patrón que nos permita llegar a unos resultados más precisos.

En la reacción negativa, aparece un sedimento y el líquido conserva su color inicial; en la fuertemente po sitiva, no hay sedimento y el líquido es rojo y transparen te, apareciendo entre ambos extremos una gama de coloracio\_ nes.

### Resultados

En nuestras experiencias hemos utilizado un ex\_ tracto de saponaria de referencia.

Extracto C	.	.	.	.	.	.	.	-
Cocción	.	.	.	.	.	.	.	-
Maceración	.	.	.	.	.	.	.	-

### III.4.15.- TANINOS

Hemos utilizado la reacción con cloruro férrico, típica de principios polifenólicos (65).

#### Técnica

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

#### Resultados

Extracto B	.	.	.	.	.	.	.	+	+	
Extracto C	.	.	.	.	.	.	.	+		
Cocción	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+
Maceración	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+

#### III.4.15.a.- Catéquicos

Hemos procedido a investigar la posible naturaleza catéquica de los taninos presentes en nuestra droga mediante la reacción de Stiasny (66).

#### Técnica

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



Resultados

Extracto B . . . . .	+	+
Extracto C . . . . .	+	
Cocción . . . . .	+	+
Maceración . . . . .	+	+

III.4.15.b.- PirogálicosTécnica

En los filtrados procedentes de la experiencia anterior tras separar los precipitados, se ha investigado la presencia de taninos pirogálicos por adición de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  (66).

Resultados

Extracto B . . . . .	-
Extracto C . . . . .	-
Cocción . . . . .	-
Maceración . . . . .	-

## III.4.16.- ALCALOIDES

Hemos ensayado una serie de reactivos de precipitación específicos de sustancias nitrogenadas y utilizados en la detección de alcaloides (67,68), tales como: Bouchardat, Dragendorf, Mayer y ácido pícrico. También se ha realizado el método Cabo Torres (69).

## Reacciones de precipitación

### Técnica

Se añaden los reactivos sobre distintas fracciones de los extractos, debiendo hacerse gota a gota pues, de lo contrario, puede ocurrir que no sea claro el resultado debido a un exceso de los mismos.

Esta técnica ha sido utilizada para todos los extractos a excepción del extracto A, puesto que al ser cloroformico, no era miscible con los reactivos empleados. Por ello, los ensayos con este extracto se han realizado en vidrio de reloj sobre el residuo resultante de evaporación del disolvente.

### Resultados

<u>Reactivos</u>	<u>Extº A</u>	<u>Extº B</u>	<u>Extº C</u>	<u>Cocción</u>	<u>Maceración</u>
Bouchardat	-	-	-	-	-
Dragendorff	-	-	-	-	-
Mayer	-	+	-	-	-
Pícrico	-	+	-	-	-

Al no tratarse de reactivos específicos de alcaloides, los resultados obtenidos nos indican la presencia de compuestos nitrogenados en el extracto B, pero no nos asegura su naturaleza alcaloídica.

### Método de Cabo Torres

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-alquil-aminas.

#### Técnica

Se depositan los extractos en puntos concretos de una tira de papel de filtro y, tras evaporar el disolvente, se sumerge la tira en el reactivo de Dragendorff modificado para cromatografía, secandola después al aire.

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

#### Resultados

Extracto A . . . . .	-
Extracto B . . . . .	-
Extracto C . . . . .	-
Cocción . . . . .	-
Maceración . . . . .	-

Teniendo en cuenta que la solubilidad general de los alcaloides es distinta según se encuentren como bases o como sales (70) y que al operar en medio neutro se extraerán solo aquellos que, de acuerdo con su estado sean solubles en el disolvente empleado, hemos creído conveniente

realizar una extracción a pH ácido y otra a pH alcalino, con el fin de que todos los alcaloides que pudieran existir en la droga pasen a sales o bases respectivamente y sean extraídos como tales, con agua o disolvente orgánico, en un solo proceso. Pretendemos con ello que, de existir alcaloides sean agotados en una sola extracción y evitar que los reactivos empleados no tengan la suficiente sensibilidad para detectar un contenido mínimo.

Se ha realizado una extracción con agua ligeramente acidulada, calentando a B.M. (71); sobre distintas fracciones del filtrado obtenido se han ensayado los reactivos de precipitación indicados en este mismo apartado, obteniéndose un resultado ligeramente positivo.

Para la extracción de los alcaloides como bases, hemos alcalinizado la droga con amoníaco concentrado, utilizando como disolvente una mezcla de éter-cloroformo a.a. (72). Al extracto se le ha practicado la técnica de detección de alcaloides de Cabo Torres, siendo el resultado claramente negativo.

Se confirma, por tanto, la ausencia de alcaloides en *E. andevalensis* Cabezudo-Rivera.

## ESQUEMA CONJUNTO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Grupos químicos	Extº A	Extº B	Extº C	Cocción	Maceración
Grasas	-				
Resinas	+				
Pigmentos carotenoides	-				
Pigmentos leucoantocianicos	-	-			
Quinonas libres	-	-			
Esteroles y triterpenos	+ +	+ + +			
Flavonoides		+ + +	+	+	-
Azúcares		+	+	+ +	+ +
Taninos		+ +	+	+ + +	+ + +
Saponinas			-	-	-
Pigmentos antocianicos	-	-	-	-	-
Lactonas pentg. insaturadas	-	+ +	-	-	-
Quinonas combinadas	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	+ +	+ +	+ +
Alcaloides	-	-	-	-	-

### III.4.17.- DISCUSION DE RESULTADOS

De los resultados obtenidos se deduce la ausencia en la muestra en estudio de: grasas, pigmentos carotenoides, antociánicos y leucoantociánicos, quinonas, saponinas y alcaloides.

Hemos puesto de manifiesto: resinas, cumarinas, flavonoides, esteroides, triterpenos, lactonas pentagonales insaturadas y taninos catéquicos.

En relación con los ensayos de glúcidos, los resultados nos indican la existencia de azúcares reductores, no habiéndose detectado 2-desoxiazúcares.

### III.5.- TOXICIDAD AGUDA

#### Descripción del método

La toxicidad aguda se ha determinado por el método de Miller y Tainter (73). El procedimiento en general, consiste en la administración de dosis crecientes de la sustancia a estudiar, más una dosis de disolvente para el grupo patrón. Transcurrido el tiempo necesario según la vía de administración elegida, se hace recuento por dosis, de los animales vivos y muertos.

#### Desarrollo de la experiencia

Como animal de experimentación se han empleado ratones de raza swiss, de un peso comprendido entre 25 y 30 g, sometidos a ayuno durante 12 horas antes del comienzo de la experiencia. Los animales se han distribuido en lotes de 10.

Hemos investigado la toxicidad aguda de los extractos acuosos de la droga objeto de nuestro estudio (Cocción, Maceración y extracto C), a los que previamente se desproteinizó (74). Esta desproteización se ha realizado añadiendo 0'2 ml de ácido perclórico 3 M por cada ml de extracto; se centrifuga y recogemos el sobrenadante sobre el que adicionamos KOH al 20 % hasta pH fisiológico. Una vez enfriados durante una hora se filtran y concentran a sequedad en rotavapor

A partir de los residuos obtenidos, se prepararon las distintas dosis, que fueron administradas por vía intraperitoneal en un volumen de 0'25 ml.

### Resultados

Con los tres extractos se han ensayado dosis de hasta 1.500 mg de droga / Kg de animal, no habiéndose producido la muerte de ninguno de ellos.

### Discusión de resultados

De los resultados obtenidos se aprecia claramente la atoxicidad de la droga.



### III.6.- DIURESIS

Dado que algunas especies de Erica han sido desde siempre utilizadas como diuréticas en medicina popular (1), hemos creído interesante realizar estos ensayos con el fin de investigar la posible influencia de nuestra droga sobre la diuresis.

#### Descripción del método

Hemos utilizado el método de Lipschitz (75), con algunas modificaciones.

Los animales se dejan en ayunas (agua y comida) durante las 18 horas que preceden al ensayo, al cabo de las cuales se les administran las diferentes soluciones mediante sonda gástrica. Inmediatamente son colocados en jaulas de metabolismo, donde permanecen durante la experiencia.

En las cuatro horas siguientes se controló la diuresis horaria, realizando una última medida a las 24 horas del inicio de la experiencia.

La excreción urinaria (EU) se ha calculado mediante la fórmula (76):

$$EU = \frac{\text{Volumen recogido}}{\text{Volumen administrado}} \times 100$$

### Desarrollo de la experiencia

Hemos utilizado ratas wistar machos, de un peso comprendido entre 150 y 200 gramos, distribuidas en lotes de 6 animales.

Al grupo patrón se le ha administrado furosemida (20 mg / Kg de peso) y 50 ml / Kg de peso de solución fisiológica.

El grupo control solo recibió la solución fisiológica.

A los lotes problemas se les administraron 50 ml / Kg de peso de cada uno de los extractos acuosos utilizados en el screening fitoquímico, en una concentración del 10 % en droga.

### Cálculos estadísticos

#### Parámetros característicos

Cuando se trabaja con una muestra representativa de una población, es necesario calcular una serie de parámetros a partir de los resultados obtenidos, que permiten de una parte, tener información más concisa de la distribución y de otra el poder realizar los cálculos de test de comparación, imprescindibles para conocer la significación de los resultados obtenidos.

Los parámetros calculados han sido los siguientes

tes (77,78):

- La media

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- La desviación standard

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

- El error típico

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

### Comparación de medias

Para la comparación de las medias empleamos el procedimiento de la  $t$  de Student.

Para el cálculo de la  $t$  se aplica la siguiente fórmula (79):

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

$\sigma_1^2$  y  $\sigma_2^2$  son las varianzas obtenidas para cada una de las

muestras a comparar, calculadas según la fórmula:

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Consideramos que las diferencias entre las medias que estamos comparando no son significativas, cuando el valor de  $\underline{t}$  calculado por la fórmula anterior ( $\underline{t}$  experimental), es mayor que el valor de  $\underline{t}$  indicado en las tablas (80), para un margen de confianza del 95 % y  $(n_1 + n_2 - 2)$  grados de libertad. En caso contrario, se considera que las medias no son significativamente distintas.

### Resultados

Incluimos a continuación un grupo de tablas, detallando en ellas la solución administrada a cada lote de animales, los mililitros de orina excretados y los cálculos estadísticos de los resultados obtenidos.

T A B L A I

## SOLUCION FISIOLOGICA

Animal	1º hora	2º hora	3º hora	4º hora	4 horas	24 horas
1	0'5	0'8	0'5	0'5	2'3	5'8
2	0	0	2'1	0	2'1	7'2
3	0	1	2	0	3	7'5
4	0	0'8	0	2	2'8	7'5
5	0	0'2	1	0	1'2	6'8
6	0	0'2	0'4	0	0'6	4'3
$\bar{x}$	0'08	0'50	1	0'41	2	6'50
$\sigma$	0'18	0'41	0'87	0'80	0'92	1'25
$\xi$	0'07	0'16	0'35	0'32	0'37	0'51

T A B L A I I

## FUROSEMIDA

Animal	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	4 horas	24 horas
1	7'2	4'1	3	0	14'3	18'7
2	3	3'1	0'8	0	6'9	11'3
3	7'1	5'9	0	0	13	18'2
4	2'3	4	1'8	0	8'1	10'8
5	6'9	8	0'3	0	15'2	18'6
6	6'5	6	0'3	0	12'8	15
$\bar{x}$	5'5	5'1	1	0	11'8	15'4
$\sigma$	2'19	1'61	1'28	0	1'59	3'64
$\epsilon$	0'82	0'65	0'52	0	0'65	1'63

T A B L A I I I

## EXTRACTO C

Animal	1 <sup>o</sup> hora	2 <sup>o</sup> hora	3 <sup>o</sup> hora	4 <sup>o</sup> hora	4 horas	24 horas
1	0	0'3	0	0'9	1'2	4'1
2	0	0'1	0'7	0'7	1'5	6'7
3	0	0'2	0	0'7	0'9	8'9
4	0	0'9	0	0'9	1'8	4'3
5	0	0'7	0	0'9	1'6	4'1
6	0	0'8	0'8	0'1	1'7	4
$\bar{x}$		0'50	0'25	0'70	1'43	5'35
$\sigma$		0'56	0'38	0'30	0'34	2'01
$\epsilon$		0'25	0'17	0'13	0'14	0'90

T A B L A I V

## COCCION

Animal	1º hora	2º hora	3º hora	4º hora	4 horas	24 horas
1	0	0'8	0	0	0'8	6'3
2	0	1	0'1	0'1	1'2	4'2
3	0	0'8	0	0'5	1'3	4'4
4	0	0'6	0'9	0	1'5	6
5	0	0'2	0'2	0'1	0'5	3'5
6	1	0'6	0'9	0	2'5	6'1
$\bar{x}$	0'16	1'68	0'42	0'14	1'30	5'08
$\sigma$	0'40	0'71	0'43	0'19	0'69	1'18
$\xi$	0'16	0'29	0'17	0'07	0'28	0'48



T A B L A V

## MACERACION

Animal	1º hora	2º hora	3º hora	4º hora	4 horas	24 horas
1	0	0'1	0'1	0'6	0'8	1'6
2	0	0'2	0	0'1	0'3	1'7
3	0	0'2	0	1	1'2	3'2
4	0	0	0	0'6	0'6	2
5	0	0'6	0	1	1'6	5
6	0	0'7	0'1	0'2	1	6'5
$\bar{x}$		0'26	0'03	0'58	0'91	3'3
$\sigma$		0'32	0'05	0'38	1'09	2'01
$\epsilon$		0'13	0'21	0'15	0'44	0'82

En la siguiente tabla se recoge un estudio comparativo de los volúmenes de orina excretados por los distintos grupos tratados y significación estadística entre ellos

T A B L A V I

Lotes	4 horas	24 horas
Solución fisiológica	2 ml $\pm$ 0'37	6'5 ml $\pm$ 0'51
Furosemida	11'8ml $\pm$ 0'65 * <0'001	15'4 ml $\pm$ 1'63 * <0'001
Extº C	1'4ml $\pm$ 0'14 * n.s. * * <0'001	5'3 ml $\pm$ 0'90 * n.s. * * <0'001
Cocción	1'3ml $\pm$ 0'28 * n.s. * * <0'001	5'0 ml $\pm$ 0'48 * n.s. * * <0'001
Maceración	0'9ml $\pm$ 0'44 * n.s. * * <0'001	3'3 ml $\pm$ 0'82 * <0'025 * * <0'001

\* Significación estadística de las diferencias entre los grupos tratados y el grupo control

\* \* Significación estadística de las diferencias entre los grupos tratados y el grupo patrón

ml de orina excretada

5'5  
5  
4  
3  
2  
1

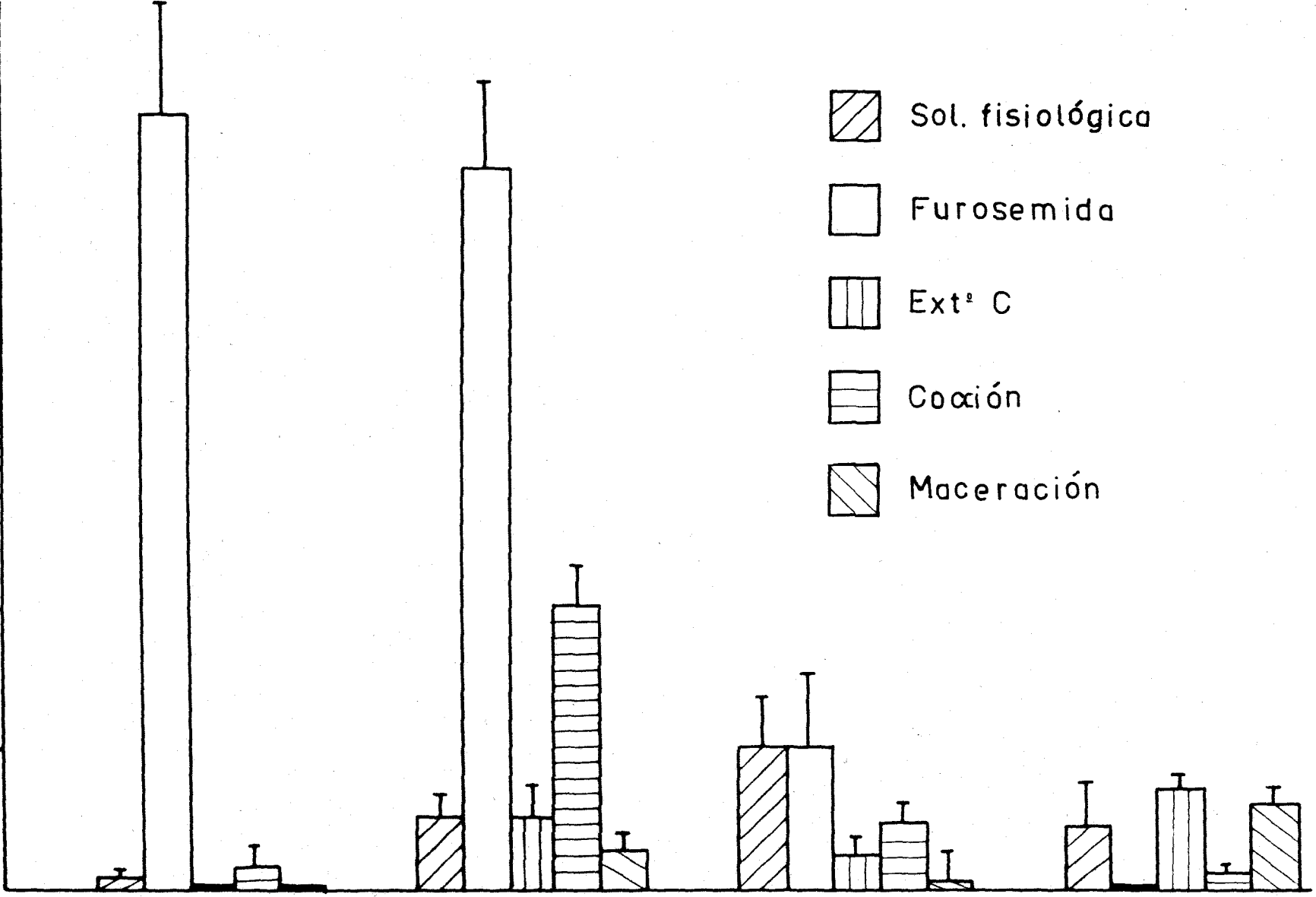
- Sol. fisiológica
- Furosemida
- Ext<sup>a</sup> C
- Cocci3n
- Maceraci3n

1<sup>a</sup> hora

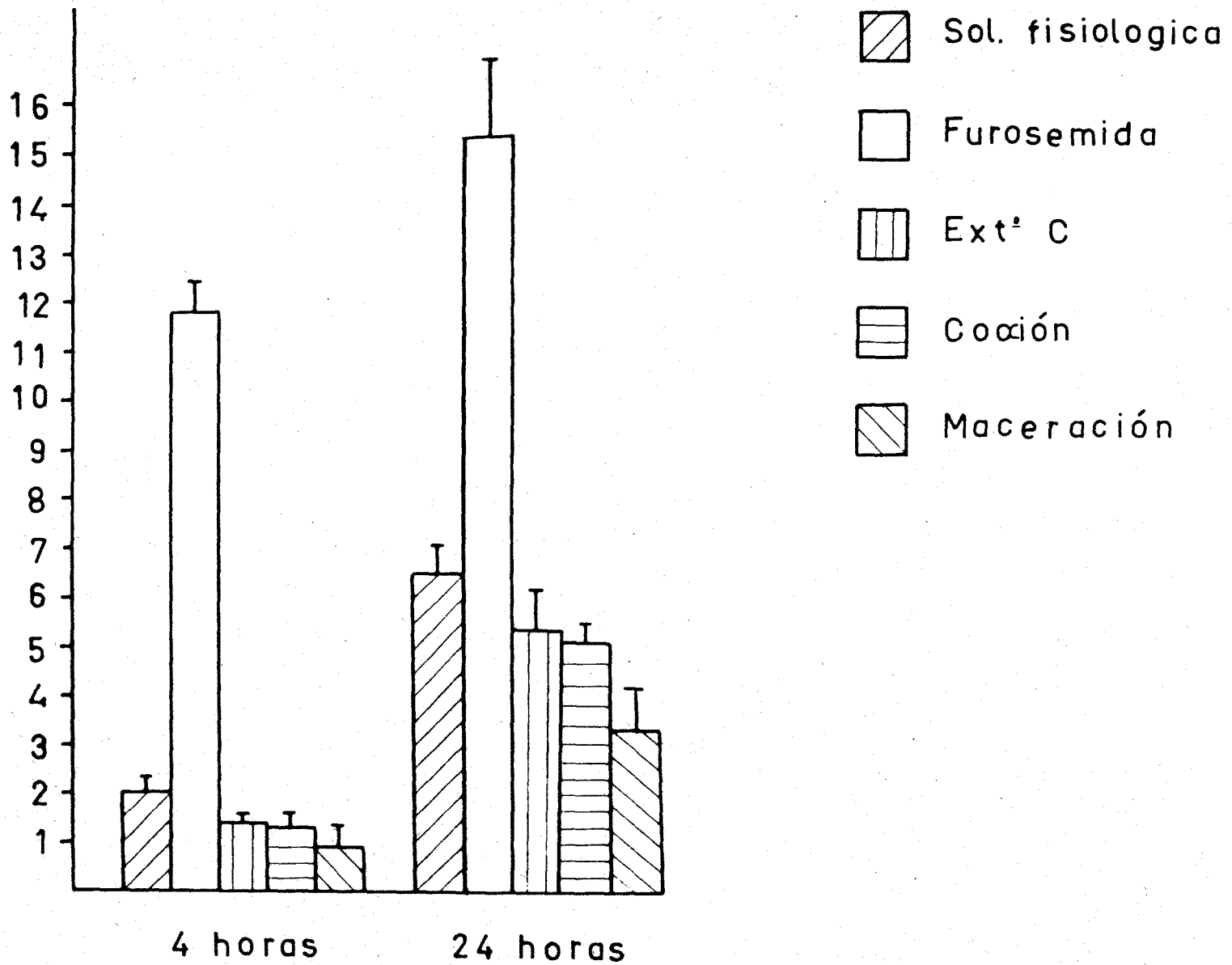
2<sup>a</sup> hora

3<sup>a</sup> hora

4<sup>a</sup> hora



ml de orina excretada



T A B L A VII

E U

Lotes	1º hora	2º hora	3º hora	4º hora	4 horas	24 horas
Solución fisiológica	0'52	3'28	6'57	2'69	13'5	42'7
Furosemida	34'61	31'67	6'39	0	73'29	95'83
Extracto C	0	3'64	1'82	5'10	10'43	39'05
Cocción	1'10	11'60	2'90	0'96	8'97	35'08
Maceración	0	1'98	0'22	4'42	6'94	25'19

## Discusión de resultados

Los extractos utilizados no muestran actividad diurética a las dosis ensayadas, ya que los tres lotes problema excretan menor cantidad de orina que el lote no tratado, tanto a las 4 como a las 24 horas de la experiencia. Las diferencias entre dichos lotes no son significativas.

Por el contrario, existe una gran diferencia entre los volúmenes de orina excretados por los lotes problema y el lote patrón tratado con furosemida (tabla VI).

Esto se confirma en la tabla VII donde se muestran los resultados de la excreción urinaria volumétrica.

### III.7.- DETERMINACION CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD

#### ANTIBACTERIANA

En diversas ocasiones ha sido puesta de manifiesto la actividad antibacteriana de algunas especies del género *Erica* sobre diferentes microorganismos (38, 39, 40).

Este hecho nos ha movido a llevar a cabo unas experiencias encaminadas a investigar el comportamiento de los distintos extractos de *E. andevalensis* Cabezudo-Rivera frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).

#### Microorganismos testigos

Se han utilizado las cepas:

<u>Proteus vulgaris</u>	.	.	.	.	.	A T C C	13315
<u>Escherichia coli</u>	.	.	.	.	.	A T C C	25922
<u>Bacillus subtilis</u>	.	.	.	.	.	A T C C	6633
<u>Staphylococcus aureus</u>	.	.	.	.	.	A T C C	25923

#### Medios de cultivo

- 1º Conservación de las cepas: agar glucosado en picadura
- 2º Preparación del inóculo: caldo glucosado
- 3º Determinación de sensibilidad: placas Mueller Hinton

#### Método

La técnica para el estudio de la actividad de los posibles principios antibacterianos en la especie *E.*

andevalensis Cabezudo-Rivera ha sido realizado mediante el método de Kirby-Bauer (81).

Una vez crecidos los microorganismos testigos en caldo glucosado, se siembran en la superficie de las placas Petri, utilizando escobillones estériles comerciales. Posteriormente se colocan encima discos de papel Whatman nº 3 impregnados con los diferentes extractos.

Las placas se mantienen a baja temperatura durante media hora, a fin de que los principios activos puedan difundir en el medio antes del inicio del crecimiento bacteriano. Posteriormente se someten a incubación en estufa de 37° C durante 24 horas, al cabo de las cuales se miden los halos de inhibición del crecimiento.

#### Desarrollo de la experiencia

En cada disco se ha depositado 30 µl de extracto en una concentración del 5 % en residuo seco.

Los resultados se han expresado basándose en el siguiente criterio (82):

No disminución del crecimiento

ni halo de inhibición	.	.	.	.	.	.	(-)
Halo menor de 7 mm	.	.	.	.	.	.	(m)
Halo mayor de 7 mm	.	.	.	.	.	.	(+)



Resultados

	<u>Extº A</u>	<u>Extº B</u>	<u>Extº C</u>	<u>Coción</u>	<u>Maceración</u>
<u>E. coli</u>	-	-	-	-	-
<u>B. subtilis</u>	-	-	-	-	-
<u>S. aureus</u>	-	-	m	+	-
<u>P. vulgaris</u>	-	-	-	+	-

La siguiente fotografía recoge uno de los ensayos realizados con los extractos acuosos frente a S. aureus



Microorganismo: S. aureus

C: Extº C

Co: Coción

M: Maceración

### Discusión de resultados

En los resultados obtenidos podemos observar una ligera actividad antibacteriana del extracto C frente a S. aureus, que se hace más patente en el caso de la cocción, mostrando también actividad este último extracto frente a P. vulgaris.

Esto nos conduce a pensar que los principios responsables de esta actividad son parcialmente solubles en agua, necesitando la ayuda del calor para su solubilización, lo que nos afirma además su carácter termoestable.

### III.8.- ACTIVIDAD CITOSTATICA

Ante el hecho de que algunas Ericaceas presenten actividad inhibitoria sobre el crecimiento de determinadas células (38), junto con que investigaciones llevadas a cabo en otras especies (83, 84, 85), señalan a los taninos (detectados en nuestra planta en el screening fitoquímico) como posibles responsables de la actividad citostática de las mismas, hemos creído interesante realizar unos ensayos con los extractos acuosos de *E. andevalensis* Cabezudo-Rivera frente a cultivos de distintas células.

#### Descripción del método

La actividad citostática de los extractos se ha ensayado en tres líneas celulares: Hela (86), Mc Coy y Vero, así como en un cultivo primario establecido a partir de células de embrión de rata (87, 88), midiendo el efecto inhibitor en el crecimiento de la monocapa(89).

Las células eran cultivadas en medio mínimo esencial suplementado con suero de ternera al 10 %; la concentración celular de siembra era aproximadamente de  $10^4$  células / ml. El extracto previa esterilización, se añadía al medio a la 72 horas de la siembra (cuando la concentración celular era alrededor de  $10^5$  células / ml), manteniendolo durante 24 horas.

El conteo de las células se realizó transcurri

da una semana de la siembra, utilizándose para ello eritrosina.

### Desarrollo de la experiencia

Hemos operado con los extractos acuosos de la droga por su contenido en taninos y por la inocuidad del disolvente para las células.

Cada una de las experiencias se ha realizado frente a dos controles, uno de los cuales era adicionado de un volumen de agua igual al extracto de la prueba problema. No se ha encontrado diferencias significativas entre ambos

### Resultados

Las dosis utilizadas se refieren a residuo seco añadido a los 10 ml de medio.

Los resultados están expresados en porcentaje de inhibición del crecimiento celular frente al control.

#### HELA

	dosis	inhibición
Extº C	12 mg	53'85 %
Coción	12 mg	86'15 %
Maceración	12 mg	45'28 %

A la vista de estos resultados realizamos una nueva experiencia con los extractos C y la maceración, utilizando en ambos casos una dosis de 24 mg, con el fin de observar si el aumento de la dosis repercutía proporcionalmente en la actividad de los extractos.

En estas condiciones, obtuvimos para el extº C una inhibición del crecimiento del 89'5 %, mientras que con la maceración, el efecto inhibitorio prácticamente no aumentó.

Dada la dificultad de esterilización del cocimiento y la maceración y teniendo en cuenta que pretendemos realizar un screening, por lo que cualquier técnica complicada queda excluida, hemos continuado las experiencias solamente con el extº C.

En el siguiente cuadro se muestra la relación dosis-efecto de dicho extracto frente a células Hela.

HELA

	dosis	inhibición
Extº C	12 mg	53'85 %
Extº C	24 mg	89'50 %
Extº C	58 mg	94'30 %

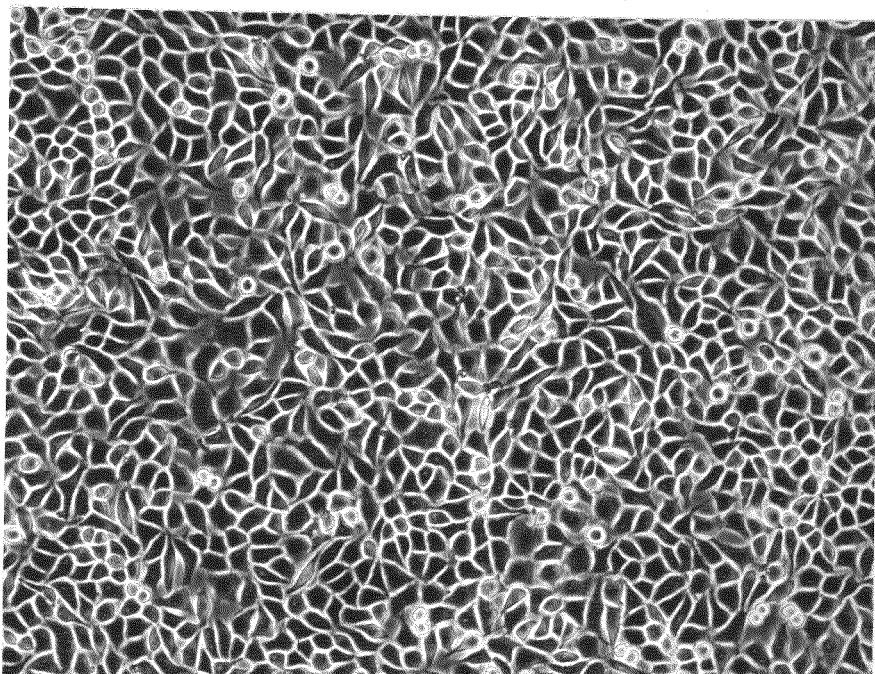
Se aprecia un elevado incremento en el porcentaje de inhibición del crecimiento al aumentar la dosis de 12 a 24 mg, mientras que con 58 mg el incremento es relativamente pequeño.

Debido a ello, para las experiencias con cultivos de otras células (Mc Coy, Vero y embrión de rata) hemos elegido la dosis de 24 mg.

EXTRACTO C (24 mg)

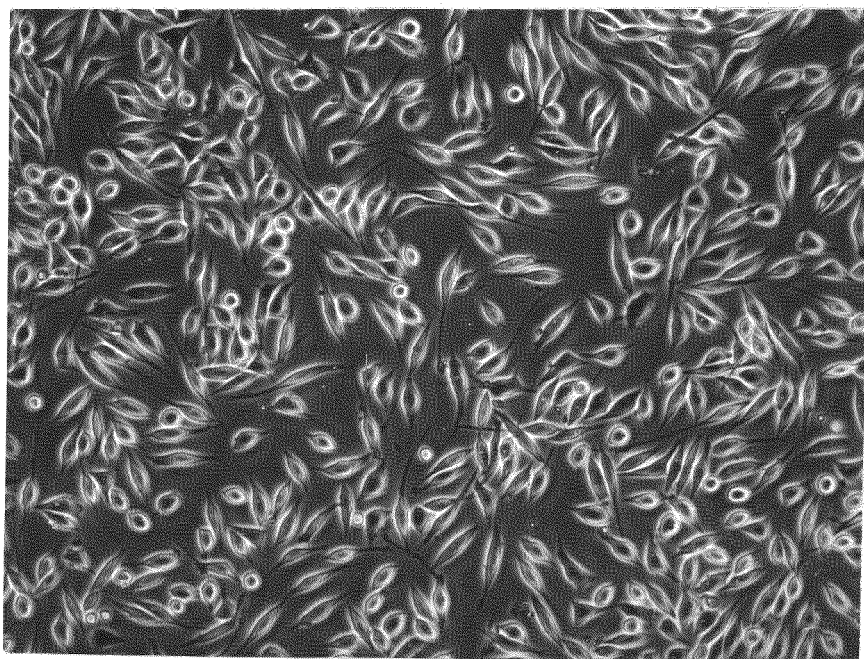
	inhibición
Mc Coy	59'60 %
Vero	43'86 %
Embrión de rata	90'00 %

En la siguiente página pueden observarse las fotografías donde se recogen algunos de los resultados obtenidos en una de las experiencias realizadas con células Mc Coy, observadas en contraste de fase.



Células Mc Coy (10 x 10)

Experiencia control



Células Mc Coy (10 x 10)

Experiencia problema (24 mg ext<sup>o</sup> C)



### Discusión de resultados

Los tres extractos estudiados muestran actividad citostática frente a células Hela, siendo el más activo de ellos la cocción.

Con el extº C, el porcentaje de inhibición frente a células embrionarias normales es superior al logrado frente a algunas células transformadas (Mc Coy y Vero), lo que puede ser debido a que las células cancerígenas presentan mayor resistencia que las normales a los extractos.



#### IV.- CONCLUSIONES

## IV.- CONCLUSIONES

- 1.- El estudio anatomo - histológico de la hoja nos muestra un mesofilo heterogéneo asimétrico.  
La epidermis del haz posee escasos pelos truncados, tectores unicelulares y glandulosos de pie unicelular.  
En la epidermis del envés destacan pelos tectores unicelulares de pared verrucosa y pelos glandulosos con pie uni o pluricelular y cabeza pluricelular.
- 2.- Los ensayos realizados dan para la droga una humedad de 11'48 % y un contenido en cenizas totales de 4'58 %.
- 3.- En el screening fitoquímico hemos detectado: resinas, esteroides y triterpenos, flavonoides, azúcares, taninos, lactonas pentagonales insaturadas y cumarinas.
- 4.- En los ensayos de toxicidad no se observa ninguna muerte con dosis de hasta 1.500 mg de droga / Kg de animal, lo que nos indica la atoxicidad de la misma.

5.- Los extractos utilizados no muestran actividad diurética a la dosis ensayada, ya que los lotes problema excretan menor cantidad de orina que el lote no tratado.

6.- Se observa una ligera actividad antibacteriana del extracto C frente a Staphylococcus aureus, que se hace más patente en el caso de la cocción, mostrando también actividad este último extracto frente a P. vulgaris.

La maceración y los extractos no acuosos no presentan actividad con ninguno de los microorganismos ensayados lo que nos conduce a pensar que los principios responsables de la actividad antibacteriana de la droga son parcialmente solubles en agua, necesitando la ayuda del calor para su solubilización.

7.- Los tres extractos estudiados (acuosos) muestran actividad citostática frente a células Hela, siendo el más activo de ellos la cocción.

Con el extracto C, el porcentaje de inhibición frente a células embrionarias normales es superior al logrado frente a algunas células transformadas (Mc Coy y Vero), lo que puede ser debido a que las

células cancerígenas presenten mayor resistencia que las normales a los extractos.

V.- BIBLIOGRAFIA

- (1) H. LECLERC (1.966). "Précis de Phytoterapie". 5ª ed, Ed Masson et Cie., Paris, p. 57
- (2) M. FERNANDEZ, A. NIETO (1.982). "Plantas Medicinales". Ed. EUNSA, Pamplona, p. 57
- (3) A. CARBALLEIRA (1980). "Phenolic inhibitors in *Erica australis* L. and in associated soil" *J. Chem. Ecol.*, 6, (3), 593-595
- (4) A. BALLESTER, A.M. VIEITEZ (1.977). "Estudio químico de compuestos alelopáticos presentes en Ericaceas". *Acta Química Compostelana*, 1, 69-75
- (5) A. BALLESTER (1980). "La alelopatía y su aplicación a la mejora de la producción agrícola". E.F.C.E. publication series, 1, (12), 283-288
- (6) B. CABEZUDO, J. RIVERA (1.980). "*Erica andevalensis* Cabezudo y Rivera, S.P. NOV.". *Lagasalia*, 9, (2), 223-226
- (7) P. FONT QUER (1.976). "Plantas Medicinales". 3ª ed., 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. 827

- (10) "Plantas y Flores" (1.980). Ed. Sarpe, 1, p. 164
- (11) O. POLUNIN, B. E. SMITHIES (1.977). "Guía del Campo de las Flores de España, Portugal y Sudoeste de Francia". Ed. Omega, Barcelona, p. 297
- (12) H. W. YOUNGKEN (1.951). "Tratado de Farmacognosia". Ed Atlante, México, p. 835
- (13) A. FAHN (1978). "Anatomía Vegetal". Ed. H. Blume, Madrid, p. 323
- (14) Ibid, p.324
- (15) Opus cit. (10), (113), p. 2.257
- (16) Opus cit. (10), p. 166
- (17) Opus cit. (9), p. 829
- (18) Ibid, p. 830
- (19) L. BEZANGER-BEAUQUESNE, M. PINKAS, M. TORCK (1.975). "Les Plantes dans la Thérapeutique Moderne". Ed. Maloine S.A., Paris, p. 214
- (20) R. R. PARIS, H. MOYSE (1.971). "Matière Médicale". Ed. Masson et Cie., Paris, III, p.8
- (21) E. VIEITEZ, A. BALLESTER (1.972). "Compuestos fenólicos y cumáricos en Erica cinerea". Anal. Inst. Bot. Cavanilles, XXIX, 129-142
- (22) A. BALLESTER, E. VIEITEZ (1971). "Estudio de sustancias de crecimiento aisladas de Erica cinerea L.". Acta Científica Compostelana, VIII, (2), 79-84

- (23) A. R. MCLELLAN (1977). "Minerals carbohydrates and aminoacids of pollen from some woody and herbaceous plants". *Ann. Bot.*, 41, (176), 1.225-32. A través C. A. 1.978, 88, 186086c
- (24) H. KINZEL, O. HORAK (1969). "Comparative physiology of Ericaceae". *Oestern Bot. Z.*, 116, (1-5), 112-18. A través C. A. 1969, 71, 67934s
- (25) 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), 243-51. A través de C. A. 1.980, 93, 146286q
- (26) J. ARINES, J.L.G. MANTILLA, E. VIEITEZ (1.974). "Compuestos fenólicos en *Erica vagans* L.". *Anal. Edafol. Agrobiol.*, XXXIII, (9-10), 891-899
- (27) Ma C. SALAS, A. BALLESTER, E. VIEITEZ (1973). "Estudio biológico y químico de *Erica umbellata* L.". *Anal. Edafol. Agrobiol.*, XXXII, (9-10), 808-814
- (28) A. BALLESTER, A. M. VIEITEZ, E. VIEITEZ (1979). "The allelopathic potential of *Erica australis* L. and *Erica arborea* L.". *Bot. Gaz.*, 140, (4), 433-436
- (29) J. L. ALONSO, F. LANDA, E. VIEITEZ (1.976). "Inhibidores fenólicos de la germinación". *Anal. Edafol. Agrobiol.*, XXXV, (3-4), 367-375



- (30) A. BALLESTER, A. VERWEY, J. C. OVEREEM (1.975). "2-Hydroxyphenyl acetic acid and 2,4-dihydroxyphenyl acetonitrile from *Erica scoparia*". *Phytochem.*, 14, 1667-1668
- (31) J. B. HARBONE, C.A. WILLIAMS (1.973). "A chemotaxonomic survey of flavonoids and simple phenols in leaves of the Ericaceae". *Bot. J. Linn. Soc.*, 66, (1), 37-54
- (32) J. B. HARBONE (1.969). "Occurrence of flavonol 5-methyl ethers in higher plants and their systematic significance". *Phytochem.* 8, 419-423
- (33) J. B. HARBONE (1.969). "Gossypetin and herbacetin as taxonomic markers in higher plants". *Phytochem.*, 8, 177-183
- (34) E. P. WHITE (1970). "4-Methoxyphenethylamine, an alkaloid of *Erica lusitanica* Rud". *N. Z. J. Sci.*, 13, (3), 359-361
- (35) A. BALLESTER (1.980). "Hacia el uso de herbicidas naturales". *Las Ciencias*, XLV, (2-3), 218-220
- (36) A. CARBALLEIRA, A. CUERVO (1.980). "Seasonal variation in allelopathic potential of soils from *Erica australis* L. heathland". *Acta Ecol./ Ecol. Plant.*, 1, (4), 345-353
- (37) R. SAN MARTIN CASAMADA (1.977). "Farmacognosia con Farmacodinamia". Ed. Científico Médica, Barcelona, p. 218

- (38) T. WATANABE, T. ARAKI, K. OGATA, M. GOTO, H. ITO  
(1.956). "Antibiotic components of plants". Ann. Repts.  
Takeda Research Lab. 14, 92-111. A través C. A. 1.956,  
50, 5987b
- (39) G. H. CONSTANTINE, Jr., P. CATOFOLMO, 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
- (40) R. CHAUVIN, P. LAVIE (1.956). "Antibiotic substance of  
pollen". Ann. Inst. Pasteur, 90, 523-7. A través de C.  
A., (1.956), 50, 12191b
- (41) J. GLEE-COEFÉ, J. M. SENET (1.982). "Etude de l'influence  
d'extraits aqueuse de végétaux supérieurs sur la  
multiplication de *Trichomonas vaginalis* en culture ax  
xénique in vitro ". Pl. Méd. Phyt., XVI, (1), 39-45
- (42) Opus cit. (1), p. 58
- (43) J. CABO TORRES, P. PARDO GARCIA (1.974). "Prácticas de  
Farmacognosia y Farmacodinamia". 4ª ed., Granada, p.17
- (44) E. STAHL (1.970). "Analyse chromatographique et microscop  
copique des drogues". Ed. Entreprise moderne, Stuttg  
gart, p. 231
- (45) R. SOUGES (1.932). "Analyse micrographique". Ed. Vig  
got Frères, Paris, p.9
- (46) Opus cit (43), p. 18
- (47) Ibid, p. 215

- (48) Ibid, p. 225
- (49) X. A. DOMINGUEZ (1.961). "Análisis fitoquímico ". Cien  
cia, 21, 126
- (50) E. OTERO AENLLE (1946). "Análisis de grasas, ceras y  
sus mezclas comerciales". Ed. Dosset S.A., Madrid,  
p. 10
- (51) N. DIDRY, N. PINKAS, M. TORCK (1.982). "Sur la composi  
cion chimique et l'activité antibactérienne des feui  
lles de diverses espèces de Grindelia". Pl. méd. Phyt.  
XVI, (1), 10
- (52) Opus cit. (20), I, p. 97
- (53) Ibid, p. 110
- (54) Opus cit. (20), II, p. 363
- (55) Opus cit. (52), p. 111
- (56) M. T. TORRENT MARTI (1.976). "Algunos aspectos farma  
cognósticos y farmacodinámicos de Lippia citriodora  
H.B.K.". Rev. B. Acad. de Barcelona, (14), 39
- (57) X. A. DOMINGUEZ (1.973). "Métodos de investigación fi  
toquímica" Ed. Limusa S.A., México, p. 84
- (58) Opus cit. (52), p. 103
- (59) Opus cit. (54), p. 59
- (60) Opus cit. (57), p. 141
- (61) A. BOUQUET (1.975). "Recherches chimiques preliminai  
res sur les plantes medicinales du Congo-Brazzaville"  
Fit., 46, 175

- (62) Opus cit. (43), p. 256
- (63) Opus cit. (57), p. 204
- (64) A.I. VOGEL (1.966). "Qualitative organic analysis". 2<sup>o</sup> ed, Ed. Longmans, II, p. 190
- (65) Opus cit. (43), p. 91
- (66) Ibid, p. 92
- (67) Ibid, p. 104
- (68) Opus cit. (52), p. 162
- (69) Opus cit. (43), p. 110
- (70) Opus cit. (52), p. 161
- (71) Opus cit. (43), p. 105
- (72) Ibid, p. 111
- (73) J. WEPIERRE (1.977). "Abregé de Pharmacodinamie générale". Ed. Masson, Paris, p. 159
- (74) MA V. DIAZ CASADO (1977). "Estudio sobre el Rosmarinus eriocalix" Tesina, Granada
- (75) C. BARESTEGUI ALMAGRO (1.976). "Esquemas y prácticas de Farmacología" Ed. Espaxs, Barcelona, p. 217
- (76) Ibid, p. 218
- (77) Opus cit. (73), p. 145
- (78) R. R. SOKAL, F. J. ROHLF (1.979). "Biometria", Ed. Blume, Madrid, p. 66
- (79) R. F. MOULD (1.979). "Introducción a la estadística médica" Ed. EUNSA, Pamplona, p. 95

- (80) J. M. DOMENECH I MASSONS (1.980). "Bioestadística, métodos estadísticos para investigadores". Ed. Herder, Barcelona, p. 617
- (81) A. W. BAUER, W.M. M. KIRBY, J. C. SHERRIS, M. TURCK (1.966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized simple disc method". American Journal of Clinical Pathology, 45, 493-6
- (82) J. CABO TORRES, J. JIMENEZ, M. MIRO, M. V. TORO (1978). "Determinación de la actividad antimicrobiana de los componentes de la esencia de *Thymus zygis* L.". Pharm. Med., 12, I, p. 393-399
- (83) M. E. WALL, H. TAYLOR, L. AMBROSIO, K. DAVIS (1.969). "Plant antitumor agents III: A convenient separation of tannins from other plant constituents". J. Pharm. Sci., 58, (7), 839-41
- (84) H. H. S. FONG, W. BHATTI, N. R. FARNSWORTH (1.972). "Antitumor activity of certain plants due to tannins" J. Pharm. Sci, 61, (11), 1.818
- (85) W. D. LOUB, H. H. S. FONG, M. THEINER, N. R. FARNSWORTH (1.973). "Partial characterization of antitumor tannin isolated from *Calycogonium squamulosum* (Melastomataceas)". J. Pharm. Sci, 62, (1), 149-50
- (86) G. O. GEY, W. D. COFFMAN, M. T. KUBICEK (1.952). Cancer Res. ,12, 264

- (87) L. HAYFLICK (1.973). "Tissue culture. Methods and applications". Ed. Kruse and Paterson, Academic Press, New York, p. 43
- (88) J. PAUL (1.975). "Cell and tissue culture". 5<sup>a</sup> ed., Ed Churchill Livingstone, London, p. 191
- (89) Ibid, p. 232