

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA

FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

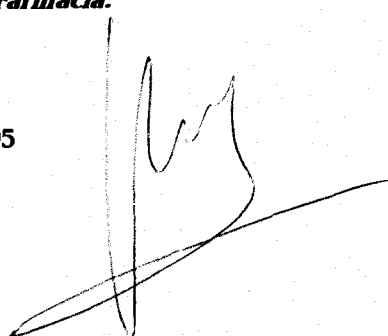
"ESTUDIO FARMACOQUIMICO DE *Erica*
andevalensis CABEZUDO-RIVERA"

Tesis Doctoral presentada por la Licenciada

Mariana Reyes Ruíz, para aspirar

al grado de Doctor en Farmacia.

Sevilla, Febrero de 1995



R-10760

T-877

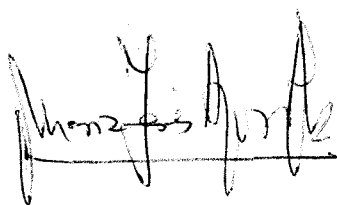
D^a M^a Victoria Toro Sáinz y D^a M^a Jesús Ayuso González, Profesoras Titulares del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN:

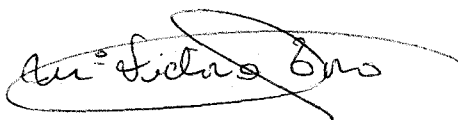
Que la Memoria titulada "**Estudio Farmacoquímico de *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera**", realizada por la Licenciada en Farmacia D^a Mariana Reyes-Ruíz para optar al grado de Doctor, ha sido llevada a cabo bajo nuestra dirección.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Sevilla, Febrero de 1995



M^a Jesús Ayuso González

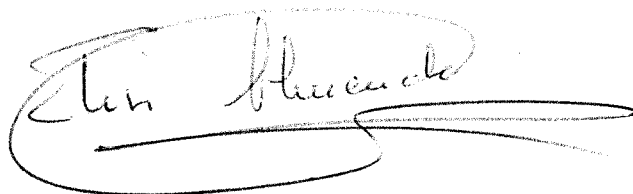


M^a Victoria Toro Sáinz

Elisa Marhuenda Requena, Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA: Que la Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor, presentada por
la Licenciada D^a Mariana Reyes Ruíz, ha sido dirigida por las Dras. D^a M^a
Victoria Toro Sáinz y D^a M^a Jesús Ayuso González y realizada en la Cátedra de
Farmacognosia y Farmacodinamia de esta Facultad, cumpliendo todos los requisitos
para ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla a catorce de febrero de mil
novecientos noventa y cinco.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elisa Marhuenda Requena', enclosed within a large, stylized oval flourish.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 206 número 212 del libro
correspondiente.

Sevilla, 22 FEB. 1995
El Jefe del Negociado de Tesis,

Luis Caffo

"Las plantas nos ofrecen gratuitamente más compuestos nuevos que todos los químicos del mundo podrían jamás sintetizar durante miles de años de esfuerzos... No solamente los compuestos elaborados por las plantas son infinitamente más variados que los que disponemos en la actualidad, sino que, generalmente, son mejor tolerados por el organismo, porque son el producto natural de una química de la vida".

Vernin.

SUMARIO

	Pág.
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
II. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	4
II.1. ASPECTOS ETNOFARMACOLOGICOS ACERCA DEL GENERO ERICA Y AFINES	5
II.2. ESPECIE EN ESTUDIO: <i>Erica andevalensis</i> Cabezudo-Rivera	29
II.2.1. <u>Botánica</u>	29
II.2.1.1. Situación taxonómica	29
II.2.1.2. Descripción de la especie	30
II.2.1.3. Ecología	31
II.2.1.4. Anatomo-histología de la hoja	33
II.2.2. <u>Fitoquímica</u>	33
II.2.4. <u>Actividad farmacológica</u>	33
III. <u>MATERIAL Y METODOS</u>	35
III.1. MUESTRAS	36
III.2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS EN ESTUDIO	36

	Pág.
III.3. METODOS GENERALES	39
III.3.1. <u>Hidrólisis</u>	39
III.3.2. <u>Técnicas cromatográficas</u>	39
III.3.2.1. Cromatografía en capa fina	39
III.3.2.2. Cromatografía en columna	41
III.3.3. <u>Técnicas instrumentales</u>	43
III.3.3.1. Determinación del punto de fusión .	43
III.3.3.2. Espectroscopía	43
III.3.4. <u>Actividad antiulcerosa gástrica</u>	44
III.3.4.1. Úlcera gástrica aguda inducida por inmovilización y frío	44
- Descripción y desarrollo de la técnica	
III.3.4.2. Úlcera gástrica aguda inducida por ligadura de píloro	48
- Descripción y desarrollo de la técnica	
III.3.4.3. Úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto	51
- Descripción y desarrollo de la técnica	

	Pág.
III.3.5. <u>Actividad sobre la permeabilidad</u>	
<u>vascular</u>	53
- Descripción y desarrollo de	
la técnica	
III.3.6. <u>Actividad sobre radicales libres</u>	56
- Descripción y desarrollo de la	
técnica	
III.3.7. <u>Actividad antimitótica</u>	
(Cultivo de células vegetales)	58
III.3.8. <u>Actividad antimicrobiana</u>	61
- Descripción y desarrollo de la	
técnica	
III.3.9. <u>Cálculo estadístico</u>	66
IV. <u>RESULTADOS</u>	67
IV.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS	68
IV.2. EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO	69
IV.2.1. <u>Fraccionamiento cromatográfico</u>	69
IV.2.2. <u>Identificación del compuesto M₁</u>	71
IV.2.2.1. Resultados	71
IV.2.2.2. Discusión de resultados	74

	Pág.
IV.2.3. <u>Actividad antiulcerosa gástrica</u>	82
IV.2.3.1. <u>Úlcera gástrica aguda inducida</u>	
por inmovilización y frío	82
IV.2.3.1.1. Resultados	82
IV.2.3.1.2. Discusión de resultados	91
IV.2.3.2. <u>Úlcera gástrica aguda inducida</u>	
por ligadura de píloro	92
IV.2.3.2.1. Resultados.....	92
IV.2.3.2.2. Discusión de resultados.....	99
IV.2.3.3. <u>Úlcera gástrica aguda inducida</u>	
por etanol absoluto	100
IV.2.3.3.1. Resultados.....	100
IV.2.3.3.2. Discusión de resultados.....	106
IV.2.4. <u>Actividad sobre la permeabilidad</u>	
<u>vascular</u>	107
IV.2.4.1. Resultados	107
IV.2.4.2. Discusión de resultados.....	107
IV.2.5. <u>Actividad sobre radicales libres</u>	111
IV.2.5.1. Resultados	112
IV.2.5.2. Discusión de resultados.....	114

	Pág.
IV.3. EXTRACTO ETereo.....	115
IV.3.1. <u>Fraccionamiento cromatográfico</u>	115
IV.3.2. <u>Identificación del compuesto M₂</u>	119
IV.3.2.1. Resultados	119
IV.3.2.2. Discusión de resultados	120
IV.3.3. <u>Identificación del compuesto M₃</u>	126
IV.3.3.1. Resultados	156
IV.3.3.2. Discusión de resultados	127
IV.3.4. <u>Actividad antiulcerosa gástrica</u>	133
IV.3.4.1. Úlcera gástrica aguda inducida por inmovilización y frío	133
IV.3.4.1.1. Resultados	133
IV.3.4.1.2. Discusión de resultados.....	141
IV.3.4.2. Úlcera gástrica aguda inducida por ligadura de píloro	142
IV.3.4.2.1. Resultados	142
IV.3.4.2.2. Discusión de resultados	149

	Pág.
IV.3.4.3. <u>Úlcera gástrica aguda inducida</u> por etanol absoluto	150
IV.3.4.3.1. Resultados	150
IV.3.4.3.2. Discusión de resultados	156
IV.3.5. <u>Actividad sobre la permeabilidad</u> <u>vascular</u>	157
IV.3.5.1. Resultados.....	157
IV.3.5.2. Discusión de resultados.....	161
IV.3.6. <u>Actividad sobre radicales libres</u>	162
IV.3.6.1. Resultados	162
IV.3.6.2. Discusión de resultados	164
IV.4. <u>EXTRACTO CLOROFORMICO</u>	165
IV.4.1. <u>Fraccionamiento cromatográfico</u>	165
IV.4.2. <u>Identificación del compuesto M₄</u>	167
IV.4.2.1. Resultados	167
IV.4.2.2. Discusión de resultados	168
IV.4.3. <u>Identificación del compuesto M₅</u>	173
IV.4.3.1. Resultados.....	173
IV.4.3.2. Discusión de resultados.....	174

	<i>Pág.</i>
IV.4.4. <u>Actividad antimitótica</u> (Cultivo de células vegetales).....	178
IV.4.4.1. Resultados.....	178
IV.4.4.2. Discusión de resultados.....	181
IV.4.5. <u>Actividad antimicrobiana</u>	184
IV.4.5.1. Resultados.....	184
IV.4.5.2. Discusión de resultados.....	187
V. <u>CONCLUSIONES</u>	188
VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	194

I . INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

En la actualidad, son numerosas las especies vegetales estudiadas desde el punto de vista químico y farmacológico; sin embargo, representan sólo un 10% de la totalidad de las existentes en la Tierra (NAVARRO, 1993). Estas investigaciones han supuesto un gran aporte en el campo de la Salud: de los 168 grupos terapéuticos que se establecen en los catálogos de especialidades farmacéuticas, 118 cuentan con la presencia de preparados cuyos componentes activos son de origen vegetal.

La familia Ericaceae comprende unas 1700 especies ampliamente difundidas por ambos hemisferios (DE BENITO, 1948). Algunas de ellas se utilizan como plantas ornamentales (azaleas), otras en alimentación (arándano) y otras, empíricamente a lo largo del tiempo, con fines terapéuticos (brezos) en el tratamiento de diversas afecciones. Esto nos motivó a realizar una revisión bibliográfica sobre la etnofarmacología de los géneros de Ericaceae de la Península Ibérica y Baleares.

De dicho estudio se deduce que *Arctostaphylus* y, sobre todo, *Vaccinium* han sido los más investigados. También son de destacar los géneros *Calluna* y *Erica* por sus efectos a nivel renal y de vías urinarias.

El interés de *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera ha sido puesto de manifiesto en nuestro laboratorio por sus actividades diurética, antimicrobiana y citostática (TORO et al., 1984, 1987, 1988*b*; PASCUAL et al., 1987; AUMENTE et al., 1988), habiéndose detectado la presencia de metabolitos secundarios, mayoritariamente principios polifenólicos (TORO et al., 1984).

Estos antecedentes han encauzado el objetivo principal de esta Memoria hacia el estudio fitoquímico de la especie, en función de cuyos resultados nos planteamos el estudio farmacológico.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1. ASPECTOS ETNOFARMACOLOGICOS ACERCA DEL GENERO ERICA Y AFINES

La familia Ericaceae abarca alrededor de 1700 especies de las cuales una tercera parte pertenece al género Erica que da nombre a la familia (GREUTER et al., 1986).

Muchas de ellas son utilizadas desde antiguo en medicina popular, fundamentalmente a nivel renal y de vías urinarias (LECLERC, 1966), (FERNANDEZ et al., 1982), (BEZANGER-BEAUQUESNE et al., 1986), (SAN MARTIN, 1977), si bien, su uso se extiende a otros campos de la terapéutica.

La constante investigación confirma alguno de estos usos tradicionales en muchas especies a la vez que va aportando nuevos datos sobre otras acciones farmacológicas de las que son portadoras.

Nuestra búsqueda etnofarmacológica se ha centrado en aquellos géneros de la Península Ibérica y Baleares:

Arbutus

Arctostaphylus

Calluna

Daboecia

Erica

Loiseleuria

Rhododendron

Vaccinium

No hemos encontrado ninguna referencia sobre actividades farmacológicas o usos populares para el género Daboecia.

Tabla 1

GENERO ERICA			
Especie	Aparato renal	Aparato digestivo	Otras
<i>E. arborea</i>	antiséptica urinaria (1,2) diurética (1)	litotriptica vesicular (1)	astringente (1,2)
<i>E. cinerea</i>	antiséptico urinaria (1,2,3,4,5,6,7) diurética (1,3,4,5,6) litotriptica (3,4)	antidiarreica (3,4)	astringente (1,4) antirreumática (3,4)
<i>E. vulgaris</i>	antiséptica urinaria (8) diurética (8) litotriptica (8)		antirreumatica (8) diaforética (8) sedante (8)

Tabla 2

GENERO ARBUTUS			
Especie	Aparato renal	Aparato digestivo	Otras
A. unedo	antiséptica urinaria (1,10,11,12, 19,61)	antidiarreica (10,19) espasmolítica (1)	antirreumática (34) astringente (12,61) narcótica (12)
A. andrachne			antifúngica (9,61)

Tabla 3

GENERO ARCTOSTAPHYLUS			
Especie	Aparato renal	Aparato digestivo	Otras
A. uva-ursi	antiséptica (1,2,4,6,7, 11,12,35,36, 37,38,39,41, 43,44,61) diurética (1,5,7,35,36, 38 a 44, 61)	antidiarreica (12) (42) colagoga (12,50)	alucinógena (54) antialérgica (55) antidiabética (12,53) anticancerosa (12) antifúngica (48,27) antihemorrágica (12) (42) antihemorroidal (12) antiinflamatoria (55,56,57,58) antimicrobiana (1,5,11,15,49) antitusiva (1,12,52,61) antiviral (41) astringente (2,4,6,7,12,35,36 39,40,42,44,61) cicatrizante (1,38) enzimática (51) moluscicida (1,41,61,62)
	litotriptica (44)		
A. viscida			antiviral (22,59) antitumoral (22,59) regulador del crecimiento (61)

Tabla 4

GENERO CALLUNA			
Especie	Aparato renal	Aparato digestivo	Otras

C. vulgaris	antiinflamatoria (10)	antidiarreica (3,4,13,14)	antileucémica (16)
	antilitiásica (44)		antimicrobiana (13,15)
	antiséptica urinaria (1 a 6, 14) 36,37,38, 43,44)		antioxidante (16)
			antirreumática (13,44)
	diurética (1,2,3,4,6)		antitusiva (37)
			astringente (1,2,4,6,44)
			depurativa (36,37)

Tabla 5

GENERO LOISELEURIA		
Especie	Aparato renal	Otras

L. procumbens

diurética
(1)

antimicrobiana
(1,11)

glicosúrica
(1)

Tabla 6

GENERO RHODODENDRON			
Especie	Aparato renal	S.N.	Otras

<i>R. anthopogonoides</i>			antibronquítica (17)
<i>R. arboreum</i>			oxitócica (1,18)
<i>R. aureum</i>			antiviral (1,11)
<i>R. ferugineum</i>	diurética (19)	diaforética (19)	antirreumática (1,11,19,39)
		sedante (11)	antitusiva (1)
			expectorante (1,11)
			hipotensora (1,11,19,39)
			insecticida (20)
			tóxica (1,2,39)
<i>R. molle</i>			insecticida (20)
<i>Rhododendron sp.</i>		analgésica (21)	
		antipirética (21)	

Tabla 7

GENERO VACCINIUM			
Especie	Aparato C.C.V.	Aparato digestivo	Otras

V. bracteatum			antimicrobiana (61,63)
V. genera			antioxidante (22)
V. uliginosum			antimicrobiana (5)
V. vitis-idaea		antidiarreico (5,37)	antimicrobiana (1,5,15) antiséptica urinaria (1,11,38) astringente (1) diurética (1) hipoglucemiante (37)

Tabla 8

GENERO VACCINIUM (cont.)			
Especie	Aparato C.C.V.	Aparato digestivo	Otras
V. myrtilus	angioprotectora (23,41)	antibacteriana (1,2,11)	antiaterogénica (27)
	antiagregante plaquetaria (1,5,11,27,28 29,30,41,45,61)	antidiarreica (1,2,4,6,11,37 44,61)	antiedematosa (5)
	antihemorrágica (4,6,11,38)	antiulcerosa (1,24,25,26,41)	antihelmíntico (10)
	antihemorroidal (5,44)		antiinflamatoria (1,4)
	antitrombótica (27)		antimicrobiana (1,2,10,36,61)
	vasodilatador coronario (26,33)		antioxidante (1,5,33)
	vasomotora arterial (17)		antiséptica urinaria (44)
	vasoprotectora (1,2,4,5,6,27,32,36, 38,41,61)		astringente (1,2,4,6,10,37, 41,46,61) carcinostática (1)
			hipoglucemiante (1,2,4,6,10,36,37, 41,46,61)
			hipolipemiante (22)
			tónica (37)

De la revisión realizada (Tablas 1-8), se deduce que la actividad de especies de Ericáceas se centra de una manera especial a nivel de los sistemas renal y urinario. Sus empleos más extendidos son como diuréticas y antisépticas en cistitis, uretritis, pielitis... La propiedad antiséptica, en la mayoría de las especies, se debe fundamentalmente al arbutósido (BEZANGER-BEAUQUESNE, et al. 1990), glucósido estable en las drogas gracias a los taninos, pero hidrolizado por las bacterias intestinales con liberación de la genina, hidroquinona, transformada en el hígado en derivados conjugados que son excretados por vía renal. Se requieren dos condiciones para la eficacia de la hidroquinona: asegurar a la orina una reacción alcalina capaz de descomponer los ésteres y administrar cantidad suficiente del glucósido (FROHNE, 1970).

Es de señalar, sin embargo, que la hoja de gayuba, la más utilizada con este fin, por su riqueza en taninos gálicos puede resultar irritante para la mucosa digestiva (VIGNEAU, 1985). Por otra parte, algunos autores (DUKE, 1986) hacen referencia a la toxicidad de la hidroquinona, que puede provocar colapso, convulsión, delirio, náuseas, tinnitus e incluso la muerte. Dosis excesivas en tratamientos prolongados pueden causar hepatotoxicidad.

Son numerosos los trabajos que han puesto de manifiesto tanto *in vitro* como *in vivo* la actividad antimicrobiana de varias especies (SIMERAY et al., 1981; HOLOPAINEM et al., 1988; CIPOLLINI et al., 1989; JAHODAR et al., 1985).

El arbutósido, además de ser responsable de la acción antiséptica urinaria en muchas especies, tiene también un efecto antitusivo (STRAPKOVA et al., 1991) que se lo confiere a algunas de ellas, mientras que en *Rhododendron ferrugineum* este efecto...debe a su contenido en hiperósido y quercetina (BEZANGER-BEAUQUESNE, et al. 1990).

Otra de las propiedades que se le han atribuido a algunas Ericáceas es la antilitiásica o litotriptica. El nombre Erica deriva del verbo griego "εἶχειν" (romper), aludiendo a la propiedad atribuida a algunas de sus especies de romper los cálculos urinarios (LECLERC, 1966).

Los taninos les confieren acciones astringente y antidiarreica a diversas especies pertenecientes a la mayoría de los géneros estudiados, siendo responsables también en la hoja de gayuba de la irritación de la mucosa digestiva que puede provocar, y de una actividad moluscicida (SCHAUFELBERGER et al., 1983) por lo que podría perturbar el ciclo de ciertas enfermedades tropicales.

Vaccinium myrtillus es quizás la especie más estudiada en la actualidad. Su fruto, apreciado en alimentación, es rico en antocianósidos que ejercen una acción beneficiosa sobre la microcirculación, disminuyendo la permeabilidad capilar.

Particular importancia tiene su efecto sobre los capilares de la retina, lo que se traduce en una regeneración de la púrpura retiniana y, por consiguiente, en un aumento de la agudeza visual y de la hemeralopia (BEZANGER-BEAUQUESNE et al., 1990) (PENSO, 1989) (ARTECHE, 1992).

Los antocianósidos les confieren además otras acciones: antiagregante plaquetaria, antirradicalaria, antiulcerosa gástrica, antiinflamatoria.

En el género *Rhododendron* varias especies se muestran tóxicas por la acción de un alcohol diterpénico tetracíclico, andromedotoxina (rodotoxina); abundante en las hojas, está también presente en el néctar y polen de las flores, lo que explica la toxicidad de las mieles de abeja (PARIS et al., 1971). Produce, a dosis excesiva, hipotensión, bradicardia y depresión respiratoria; también ejerce una acción irritante sobre la piel, debido a lo cual, el *Rhododendron* es empleado en Alemania Federal en preparaciones antirreumáticas (BEZANGER-BEAUQUESNE et al., 1990).

Destacamos también que muchas especies de *Ericaceae* pertenecientes al género *Erica*, poseen actividad alelopática:

Erica arborea L. (ALONSO et al., 1976; BALLESTER et al., 1979)

Erica australis L. (BALLESTER et al., 1979; CARBALLEIRA, 1980a y CARBALLEIRA et al., 1980b)

Erica cinerea L. (BALLESTER et al., 1971; VIEITEZ et al., 1972)

Erica umbellata L. (SALAS et al., 1973)

Erica vagans L. (ARINES et al., 1974)

El fenómeno de la alelopatía fue definido por MOLISCH (1937) como el proceso en que una planta libera al medio ambiente uno o varios compuestos químicos que inhiben el crecimiento de otras plantas que viven en el mismo hábitat o en uno cercano. Este proceso de inhibición bioquímica tiene gran importancia pues afecta, bien directamente o bien en conjunción con mecanismos competitivos, a la dinámica de las comunidades vegetales: distribución geográfica de especies, dominancia, sucesión, evolución, etc... (BALLESTER et al., 1978).

Una gran variedad de compuestos naturales han sido identificados como posibles agentes alelopáticos: ácidos orgánicos sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos, compuestos cianogenéticos, etc. (BALLESTER et al., 1977).

Parece ser que, en el caso de las distintas especies del género *Erica*, son los compuestos polifenólicos los que confieren esta actividad.

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 e inhiben la síntesis de proteínas o de enzimas específicos; es decir, actúan como auténticos herbicidas naturales (BALLESTER, 1980*a*).

El uso masivo de herbicidas para paliar el efecto devastador de las malas hierbas en la agricultura mundial ha originado, en ciertas ocasiones, malformaciones en niños y animales. Por ello, algunos autores, en un intento de imitar la naturaleza, indican la conveniencia de investigar herbicidas naturales; es decir, especies de cultivo que liberan 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 (BALLESTER et al., 1977; BALLESTER, 1980*b*).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) BEZANGER-BEAUQUESNE, L. ; PINKAS, M.; TORCK, M.; TROTIN, F.; *Plantes Médicinales des Régions Tempérées*. 2^a ed.; Ed. Maloine, París, 1990.
- (2) PARIS, R.R.; MOYSE, H.; *Précis de Matière Médicale*. Tomo III. Ed. Masson. París, 1971.
- (3) RUBIO, C.; MAZAGATOS, MC.; *Vademecum de Medicina Natural*; Ed. Gaia, Madrid, 1993.
- (4) ARTECHE, A.; *Fitoterapia. Vademecum de Prescripción*; Ed. Cita, Bilbao, 1992.
- (5) BRUNETON, J.; *Pharmacognosie*. 2^a ed.; Ed. Technique et Documentation-Lavoisier, París, 1993.
- (6) BEZANGER-BEAUQUESNE, L. ; PINKAS, M.; TORCK, M.; *Les Plantes dans la thérapeutique moderne*. 2^a ed., Ed. Maloine, París, 1986.
- (7) WALLIS, T.E.; *Manual de Farmacognosia*. Compañía Editorial Continental S.A.; México, 1966.
- (8) VAN HELLEMONT, J.; *Compendium de Phytothérapie*. Ed. APB, París, 1986.
- (9) SIMERAY, J.; CHAUMONT, J.P.; MARÉCHAL, G.; "Propriétés antagonistes de cent extraits de plantes supérieures vis-a-vis de vingt champignons parasites de l'homme ou des végétaux". *Plant. Méd. et Phytothér.*, 25, (3), 183-188, 1981.
- (10) MARTIN FERRERO, P.; *Las plantas medicinales de la provincia de Cádiz*. Diputación de Cádiz, 1983.
- (11) VIGNEAU. C.; *Plantes médicinales. Thérapeutique-Toxicité*. Collection de Médecine Légales et de Toxicologie Médicale. n° 129. Ed. Masson. París, 1985.
- (12) DUKE, J.A.; *Handbook of Medicinal Herbs*. Ed. CRC Press, Florida, 1986.
- (13) HALLARD, F.; *Phytothérapie*. Ed. Masson, París, 1988.

- (14) FERNANDEZ, M.; NIETO, A.; *Plantas medicinales*. Ed. EUNSA, Pamplona, 1982.
- (15) HOLOPAINEM, M.; JAHODAR, L.; SEPPANEM-LAAKSO, T.; LAAKSO, I.; KAUPPINEN, V.; "Antimicrobial activity of some Finnish Ericaceous plants". *Acta Pharm. Fenn.* 97, 197-202, 1988.
- (16) SIMON, A. ; NAJID, A.; CHULIA, A.J.; DELAGE, C.; RIGAUD, M.; "Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*)". *Biochim. Biophys. Acta*, 1125, 68-72, 1992.
- (17) ANON; "Anthonhododendrin in treatment of chronic bronchitis". *Chin. Med. J.*, 53, 711 - 713, 1973.
- (18) MIDDELKOOP, T.B.; LABADIE, R.P.; "In vitro examination of bark extracts from *Saraca asoca* (Roxb) de Wilde and *Rhododendron arboreum* Sm. for oxytotic activity". *Int. J. Crude Drug Res.*, 24, 41-44, 1986.
- (19) FONT QUER, P.; *Plantas medicinales*. 3^a ed.; Ed. Labor, Barcelona, 1990.
- (20) KLOCKE, J.A.; MEI-YING, H.U.; SHIN-FOON, Ch.; KUBO, I.; "Grayanoid diterpene insect antifeedant and insecticide from *Rhododendron molle*". *Phytochemistry*, 30 (6), 1797-1800, 1991.
- (21) DOBHAL, M.P.; JOSHI, Y.C.; JOSHI, P.; "Review on genus *Rhododendron*. Part 2". *Herbal Pol.* 37, 89-94, 1991.
- (22) COSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; RASTELLI, G.; BENVENUTI, S; "Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase". *Plant. Med.*, 58 (4), 342-344, 1992.

- (23) JONADET, M.; MEUNIER, M.T.; BASTIDE, J.; BASTIDE, P.; "*Anthocyanosides extraits de Vitis vinifera, Vaccinium myrtillus et de Pinus maritimus. I. Activités inhibitrices vis-à-vis de l'élastase in vitro. II. Activités angioprotectrices comparées in vivo*". J. Pharm. Belg., 38, 41-46, 1983.
- (24) MAGISTRETTI, M.J.; CONTI, M.; CRISTONI, A.; "*Antiulcer activity of an anthocyanidin from Vaccinium myrtillus*". *Arzneim Forsch*, 38, 686-690, 1988.
- (25) CRISTONI, A.; MAGISTRETTI, M.J.; "*Antiulcer and healing activity of Vaccinium myrtillus anthocyanosides*". *Farmaco. Ed. Prat.* 42, 29-43, 1987.
- (26) BETTINI, V.; ARGNO, R.; BETTINI, M.B.; BRAGGION, G.; CALORE, L.; MORIMANDO, I.; PENADA, G.; SABBION, P.; "*Facilitanting influence of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on the acetylcholine -induced relaxation of isolated coronary arteries role of the endothelium -derived relaxing factor*". *Fitoterapia*, 64 (1), 45-57, 1993.
- (27) PULLIERO, G.; MONTIN, S.; BETTINI, R.; MOGNO, C.; CASTRO, G.L.; "*Ex-vivo study of the inhibitory effects of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on human platelet aggregation*". *Fitoterapia*, 60 (1), 69-76, 1989.
- (28) FERNANDEZ, M.G.S.; ZARAGOZA, F.; ALVAREZ, P.; "*In vitro platelet aggregation effects of anthocyanosides of Vaccinium myrtillus L.*". *Ann. Real Acad. Farm.*, 49 (1), 79-90, 1983.
- (29) MORAZZONI, P.; MAGISTRETTI, M.J.; "*Activity of myrtocyan an anthocyanoside complex from Vaccinium myrtillus VMA on platelet aggregation and adhesiveness*". *Fitoterapia*, 61 (1), 13-22, 1990.

- (30) BOTTECCHIA, D.; BETTINI, V.; MARTINO, R.; CAMERRA, G.; "Preliminary report on the inhibitory effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on platelet aggregation and clot retraction". *Fitoterapia*, **58** (1), 3-8, 1987.
- (31) BETTINI, V.; MAYELLARO, F.; PILLA, I.; TON, P.; MARIN, V.T.W.; "Mechanical responses of isolated coronary arteries to barium in the presence of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides". *Fitoterapia*, **56** (1), 3-10, 1985.
- (32) ROBERT, A.M.; GODEAU, G.; MOATI, F.; MISKULIN, M.; "Action of anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* on the permeability of the blood brain barrier". *J. Med. (Westbury)*, **8** (5), 321-332, 1977.
- (33) MEUNIER, M.T.; DUROUX, E.; BASTIDE, P.; "Antiradical activity of procianidolic oligomers and anthocyanosides towards superoxide anion and lipid peroxidation". *Plant. Méd. Phytothèr.* **23** (4), 267- 274, 1989.
- (34) GONZALEZ-TEJERO, M.R.; "Investigaciones etnobotánicas en el municipio de Güejar-Sierra". Tesina de Licenciatura, Granada 1985.
- (35) EVANS, W.C.; *Farmacognosia TREASE-EVANS*. 13ª ed. Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill, México, 1991.
- (36) VALNET, J.; *Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes*. 4ª ed. Ed. Maloine, S.A., París, 1979.
- (37) SCHAUENBERG, P.; PARIS, F.; *Guide des plantes médicinales*. Ed. Delachaux & Niestlé. París, 1977.
- (38) PENSO, G.; *Piante medicinali nella terapia medica: Compendio di farmacognosia pratica per medici e farmacisti*. 2ª ed. OEMF spa, Milano, 1989.

- (39) VARRO, E., LYNN, R.; JAMES, E.; *Pharmacognosy*. 9ª ed. Ed. Lea & Febiger. Philidelphia, 1988.
- (40) ROMBI, M.; LECOME, A.; *Tratado de Fitomedicina*. Ed. Asociación de Medicinas Complementarias. Madrid, 1992.
- (41) ROMBI, M.; *100 Plantas medicinales*. Ed. Romart. Bergamo, Italia, 1991.
- (42) SAN MARTIN, R.; *Tratado de Farmacognosia*. Ed. Científico Médica, Barcelona, 1977.
- (43) MOATI, R.; FAURON, R.; DONADIEU, Y.; *La phytothérapie*. Ed. Maloine, París, 1983.
- (44) FERNANDEZ, J.; *Recetario de plantas medicinales*. Ed. Omega, Barcelona, 1992.
- (45) MORAZZONI, P.; MAGISTRETTI, M.J.; "*Effects of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on prostacyclin-like activity in rat arterial tissue*". *Fitoterapia*, 57 (1), 11-14, 1986.
- (46) CECCHINI, T.; *Enciclopedia de las hierbas y de las plantas medicinales*. Ed. De Vecchi, Barcelona, 1990.
- (47) ZARAGOZA, F.; IGLESIAS, I.; BENEDI, J.; "*Estudio comparativo de los efectos antiagregantes de los antocianósidos y otros agentes*". *Arch. Farmacol. Toxicol.*, 11, 183-188, 1985.
- (48) CIPOLLINI, M.L.; STILES, E.W.; "*Antifungal activity of ripe ericaceous fruits: Phenolic-acid interactions and palatability for dispersers*". *Farm. OBC*, 58, 349-354, 1989.

- (49) JAHODAR, L.; JILEK, P.; PATKOVA, M.; DVORAKOVA, V.; "Antimicrobial action of arbutin and the extract from the leaves of *Arctostaphylus uva-ursi* in vitro". *Cesk. Farm.* 34 (5), 174-178, 1985.
- (50) AZHUNOVA, T.A.; SAMBUEVA, Z.G.; NIKOLAEV, SM.; MATKHANOV, E.I.; NAGASLAEVA, L.A.; "Bile expelling effects of *Arctostaphylus uva-ursi* extract". *Farmatsiya-Moscow*, 37 (2), 41-43, 1988.
- (51) MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; SHIOMOTO, H.; TANAKA, T.; KUBO, M.; "Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylus uva-ursi* L. Spreng IV. Effect of 50 percent methanolic extract from *Arctostaphylus uva-ursi* L. Spreng bearberry leaf on melanin synthesis". *Yakugazu Zasshi*, 112 (4), 276-282, 1992.
- (52) STRAPKOVA, A.; JAHODAR, L.; NOSAL'OVA, G.; "Antitussive effect of arbutin". *Pharmazie*, 46 (8), 611-612, 1991.
- (53) WANSTON-FLATT, S.K.; DAY, C.; BAILEY, C.J.; FLATT, P.R.; "Evaluation of traditional plant treatments for diabetes studies in streptozotocin diabetic mice". *Acta Diabetol. Lat.*, 26 (1), 51-56, 1989.
- (54) FORNESS, M.; O'CONNELL, D.; "North American Indian hallucinogen use". *Northwest Anthropol. Res. Notes*, 15 (1), 65-66, 1981.
- (55) MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; TANAKA, T.; KUBO, M.; "Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylus uva-ursi* L. Spreng V. Effect of water extract from *Arctostaphylus uva-ursi* L. Spreng. Bearberry leaf on the antiallergic and antiinflammatory activities of dexamethasone ointment". *Yakugaku Zasshi*, 112 (9), 673-677, 1992.

- (56) MATSUDA, H.; TANAKA, T.; KUBO, M.; "Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng III. combined effect of arbutin and indomethacin on immuno-inflammation". Yakugaku Zasshi, 111 (4,5), 1991.
- (57) MATSUDA, H., NAKATA, H.; TANAKA, T.; KUBO, M.;"Pharmacological study on *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng II. combined effects of arbutin and prednisolone or dexamethasone on immuno inflammation". Yakugaku Zasshi, 110 (1), 68-76, 1990.
- (58) KUBO, M.; ITO, M.; NAKATA, H.; MATSUDA, H., "Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng I. combined effect of 50 percent methanolic extract from *Arctostaphylos uva-ursi* L. spreng. Bearberry leaf and prednisolone on immuno-inflammation". Yakugaku Zasshi, 110 (1), 59-67, 1990.
- (59) NAKANISHI, T.; INADA, A.; MURATA, H.; IINUMA, M.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, H.; KATO, M.; MIZUNO, M.; NAKANE, H.; ONO, K.; LANG, F.A.; MURATA, J.; "Antiviral and antitumoral activities of some western north American plants with surface exudates. I. Inhibitory effects of HIV-1 reverse transcriptase". Shoyakugaku Zasshi, 47 (3), 295-300, 1993.
- (60) FROHE, D.; "Urinary antiseptic effect of bearberry leaf extracts". Plant. Méd., 18, 1-25, 1970.
- (61) BEZANGER-BEAUQUESNE, L.; "Nouveaux aspects des plantes médicinales usuelles". Plant. Méd. Phytothèr., 19, 109-155, 1985.
- (62) SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTMANN, K.;"On the molluscicidal activity of tannin containing plants". Plant. Med., 48, 105-107, 1983.

(63) ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; TAKAGI, S.; "*Studies on iridois related compounds.*

II. Structure and antimicrobial activity of aglucone of galioside and gardenoside".

J. Nat. Prod., 46, 532-536, 1987.

II.2. ESPECIE EN ESTUDIO: *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera

II.2.1. Botánica

II.2.1.1. Situación taxonómica

Clase Magnoliosida

Subclase Dillenidae

Orden Ericales

Familia Ericaceae

Subfamilia Ericoideae

Género *Erica*

Especie *Erica andevalensis*

El género *Erica* está constituido por arbustos perennifolios, de pequeño a mediano tamaño. Hojas verticiladas, cortamente pecioladas, a menudo laminares, o aparentemente lineares debido a los márgenes revolutos (TUTIN et al., 1972), capaces de replegarse en mayor o menor grado dependiendo de la humedad. Este carácter, común a otras familias (Franquiaceae), se conoce botánicamente como hojas ericoideas (METCALFE et al., 1965). Flores vistosas rojas, verdes o blanquecinas dispuestas en umbelas, racimos terminales o auxiliares o en umbelas más o menos reunidas en panículos 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 (TUTIN et al., 1972).

II.2.1.2. Descripción de 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 laxos en el resto; las superiores lineares totalmente revolutas, las inferiores ovadas con la base truncada y débilmente 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 - 2 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, semillas numerosas de 4 mm. (CABEZUDO et al., 1980).

II.2.1.3. Ecología

La familia es prácticamente cosmopolita, teniendo dos áreas disyuntas con un máximo de representantes, una en Euroasia y parte de América del Norte y otra en la región del Cabo (S. Africa y Madagascar) (METCALFE et al., 1965).

El género *Erica* es abundante en el S.W. de Europa, siendo algunas de sus especies componentes importantes en los matorrales de la Península Ibérica conocidos por brezales (POLUNIN et al., 1977), principalmente localizados sobre sustrato ácido y clima atlántico (N., N.W., W. y S.W.).

Con el nombre de brezos y brezales se designan en España especies pertenecientes al género *Calluna* y *Daboecia* (DE BENITO, 1948).

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

Todas las especies europeas de la familia Ericaceae que han sido investigadas son micorrizales; es decir, sus raíces viven en asociaciones con los hongos del suelo, lo que supone un beneficio para ambos. En el caso de las Ericaceae 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 (CARBALLEIRA et al., 1980 *b*). Esta asociación favorece la supervivencia de las Ericaceae en hábitat bastante inhóspito, al aumentar la permeabilidad de sus raíces por efecto de las micorrizas.

En general, los seres asociados a hongos necesitan condiciones de acidez, de ahí el requerimiento de casi todas las Ericas por suelos ácidos turbosos para medrar. Si el suelo no es lo bastante ácido, el crecimiento será escaso y las hojas sufrirán decoloración. La mayoría de las especies de esta familia son calcífugas, si bien algunos híbridos y cultivares pueden crecer en suelos ricos en cal libre pero no en caliza sólida.

No son demasiado exigentes en lo que a suelos se refiere, debido, principalmente, a su enorme capacidad de evaporación, que le permite movilizar grandes cantidades de agua y obtener los nutrientes necesarios a partir de suelos muy oligotrofos. 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.2.1.4. Anatómo-histología de la hoja

El corte transversal de la hoja de *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera muestra estructura bifacial. La epidermis superior, monoestratificada, está constituida por células tabulares, con escasos pelos truncados, tectores unicelulares y glandulosos de pie unicelular.

El parénquima en empalizada posee una sola capa de células alargadas y el lagunar es esponjoso.

En la epidermis inferior se observan pelos tectores unicelulares de pared verrugosa y otros glandulosos de pie unicelular (de mayor o menor longitud) o pluricelular (muy escasos) y cabeza pluricelular.

Ambas epidermis están rodeadas por una cutícula que las protege (TORO et al., 1984).

II.2.2. Fitoquímica

Trabajos realizados en nuestro Departamento han puesto de manifiesto en *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera, un contenido en materias minerales del 4.58 % (TORO et al., 1984).

Se ha detectado la presencia de resinas, esteroides y triterpenos, azúcares, lactonas pentagonales insaturadas, pigmentos antocianicos y leucoantocianicos, flavonoides (AUMENTE et al., 1988), cumarinas, ácidos fenoles (p-cumárico, gentísico, p-hidroxibenzóico y vanílico) (PASCUAL et al., 1987) y sustancias tánicas, siendo mayoritarios los compuestos polifenólicos (TORO et al., 1984).

II.2.3. Actividad farmacológica

Es tradicional el uso de distintas especies del género *Erica* en medicina popular como diuréticas y antisépticas (CHAUVIN et al., 1956; LECLERC, 1966; BEZANGER-BEAUQUESNE et al., 1986; SAN MARTIN, 1977; FERNANDEZ et al., 1982).

También *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera posee actividad diurética (TORO et al., 1988) y antimicrobiana frente a microorganismos Gram +; a esta acción contribuyen los ácidos fenoles (TORO et al., 1987) y la miricetina (AUMENTE et al., 1988), jugando ésta última un papel importante en la actividad antifúngica de la droga. Así mismo, se ha puesto de manifiesto una actividad citostática *in vitro* en cultivos de células tanto vegetales (PASCUAL et al., 1987) como animales (TORO et al., 1984).

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. MUESTRAS

Las muestras, constituidas por las sumidades floridas de *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera, fueron recolectadas en el mes de Octubre en la comarca de El Andévalo (Huelva). La desecación se efectuó a la sombra a una temperatura entre 20-25°C.

III.2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS EN ESTUDIO

Material:

Extractor tipo Soxhlet

" líquido-líquido

Rotavapor

Reactivos:

Cloroformo -PRS

Metanol -PRS

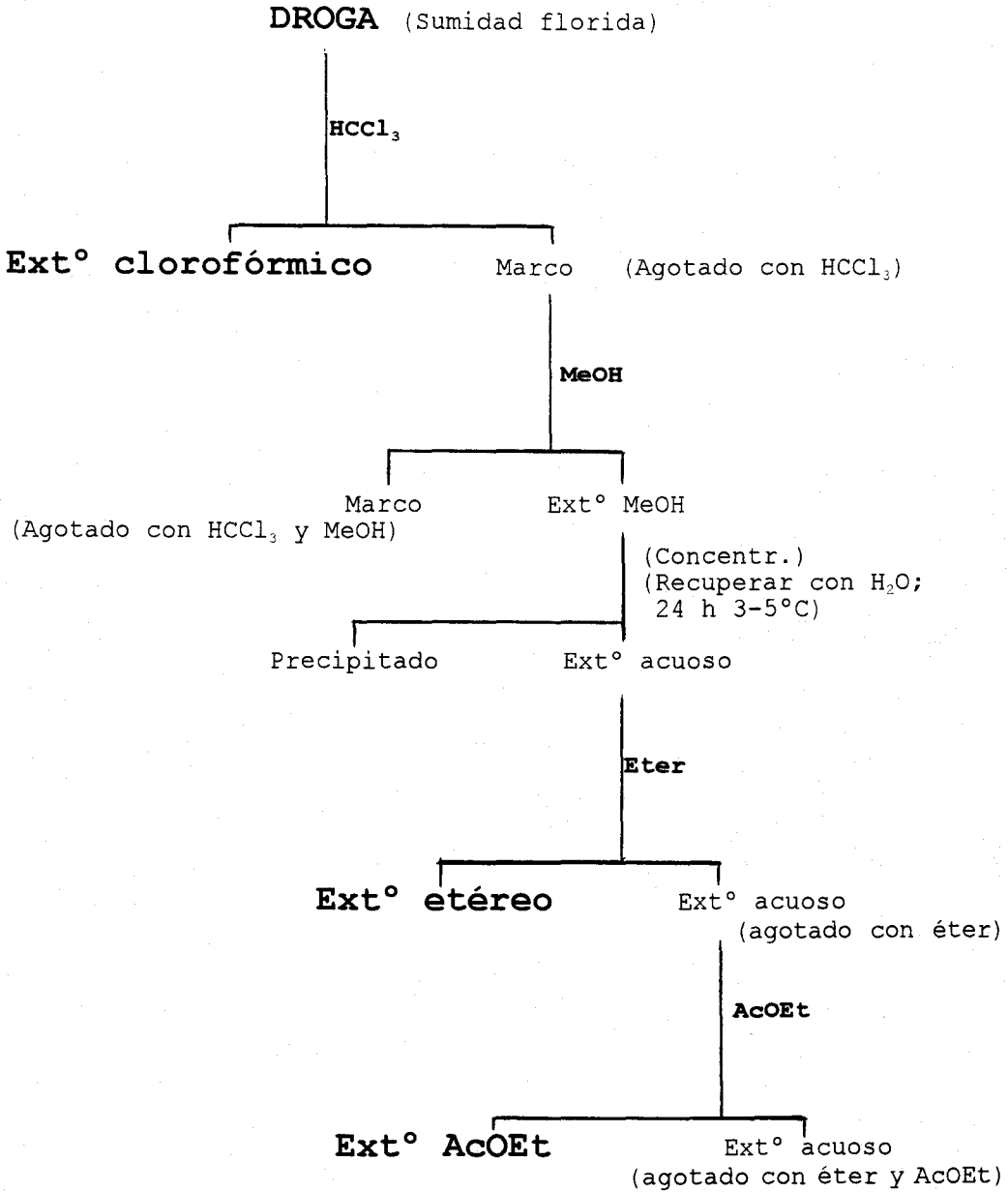
Acetato de etilo -PRS

Eter etílico-PRS

Método: Seguimos el proceso extractivo indicado por NETIEN-LEBRETON (1964) dada la riqueza en flavonoides de la especie en estudio (Fig. 1). Se partió de 1 Kg de droga desecada y convenientemente troceada y se trató con cloroformo, en extractor Soxhlet, con el fin de eliminar clorofilas, ceras y extraer otros compuestos de naturaleza lipofílica. Seguidamente, el marco se sometió a extracción con metanol, resultando el correspondiente extracto metanólico de fuerte reacción flavónica. Dicho extracto se concentró en rotavapor hasta consistencia siruposa, se recuperó con agua (500 mL por cada 500 g de droga) y se mantuvo en nevera 24 horas. El extracto acuoso se agotó sucesivamente (extracción líquido-líquido) con éter etílico y acetato de etilo.

Se calculó el rendimiento de los extractos, referidos al peso de la droga seca.

Figura 1. Proceso extractivo



III.3. METODOS GENERALES

III.3.1. Hidrólisis

A 1.2 mg de glicósido sólido se le añadió 0.5 mL de reactivo de Kiliani (3.5 mL de ácido acético, 5.5 mL de agua destilada y 1 mL de ácido clorhídrico). La mezcla fue calentada a 100°C en baño de aceite durante 2 horas. Una vez fría se vertió sobre 1 mL de agua destilada y se extrajo cuatro veces con acetato de etilo.

La solución acuosa se concentró a vacío en el rotavapor a 40°C y se silanizó con TRISIL.

III.3.2. Técnicas cromatográficas

III.3.2.1. Cromatografía en capa fina

Material

Cromatofolios Al de Silicagel 60 F₂₅₄, Merck

Cubetas cromatográficas de vidrio

Lámpara de luz U.V. de 366 nm y 254 nm.

Estufa de desecación

Pulverizador de aire a presión

Reactivos

n-Hexano-R.A.

Cloroformo-R.A.

Acetato de etilo-R.A.

Metanol-R.A.

Fases móviles

Cloroformo/Metanol (90:10; 50:50; 10:90)

n-Hexano/Acetato de etilo (90:10; 50:50; 10:90)

Acetato de etilo/Metanol (80:20; 70:30)

Acetato de etilo/Metanol/Agua (80:5:5; 80:10:5)

Reveladores

Luz U.V. (254 nm y 366 nm)

Oleum: ácido sulfúrico/ácido acético glacial/agua (2:40:8). Exposición a 120°C durante 5 minutos. Detecta: R. general (BERMEJO et al., 1968).

Lieberman-Burchard: Se mezclan 10 mL de una solución anhídrico acético / ácido sulfúrico (5:5) y 50 mL de metanol. Exposición a 110°C durante 10 minutos.

Detecta: Esteroides y Terpenos (KREBS et al., 1968).

Tricloruro de Aluminio al 2 % en etanol. Detecta: Flavonoides (KREBS et al., 1968).

Método

El desarrollo de los cromatofolios de Silicagel se realiza en cámaras previamente saturadas con las fases móviles. La técnica seguida es la propuesta por STHAL (1969), en su modalidad unidimensional ascendente de simple recorrido. Evaporado el disolvente de los cromatofolios desarrollados se observan a la luz U.V., revelándose a continuación y, una vez secos, se llevan a estufa o se observan de nuevo a la luz U.V., dependiendo del revelador utilizado.

III.3.2.2. Cromatografía en columna

A) Cromatografía sólido-líquido

Material

Columnas de vidrio de diversas longitudes y diámetros.

Colector de fracciones LKB 8070 ULTRORAC II

Rotavapor

Reactivos

Adsorbentes:

Silicagel 60 (0.063-0.2 mm)

Silicagel 60 (0.2-0.5 mm)

Eluyentes:

n-Hexano

n-Hexano/Acetato de etilo (95:5; 50:50; 20:80)

Cloroformo/Metanol (90:10; 50:50; 20:80)

Acetato de etilo/Metanol/Agua (80:5:5; 80:10:5; 80:20:5)

Metanol

Método

El empaquetamiento de la columna se realizó formando una suspensión de Silicagel (0.063-0.2 mm) en el eluyente correspondiente y se deja en reposo durante 24 horas. La razón peso de extracto / peso de adsorbente es 1:30.

Para formar la cabeza de la columna se utiliza Silicagel (0.2-0.5 mm).

El seguimiento de la columna se realizó mediante cromatografía en capa fina de Silicagel.

B) Cromatografía gaseosa

Para el estudio de los azúcares se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard mod. 5710A con detector de ionización de llama (FID), provisto de una columna capilar de BP1 (25m x 0.53 mm), usando Helio como gas portador. Las condiciones fueron las siguientes:

Tª inyector: 250°C

Tª detector: 300 °C

Programa de Tª: 100-240°C (2°C/ min)

III.3.3. Técnicas instrumentales

III.3.3.1. Determinación del punto de fusión

El punto de fusión se determinó en un microscopio Thermovar HT 1 B 11.

III.3.3.2. Espectroscopía

Para la determinación de los espectros de infrarrojo (IR) utilizamos un aparato Perkin Elmer mod.681 con registrador incorporado. Se emplearon comprimidos de KBr y células de NaCl de 0.1 mm.

Los espectros de ultravioleta (UV) se realizaron en un espectrofotómetro Lambda 3 Perkin-Elmer, con registrador incorporado, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor y de 3 mL de capacidad. El disolvente empleado fue metanol de máximo grado de pureza.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) se realizaron en un espectrofotómetro BRUKER AC TF (200 MHz), utilizando cloroformo deuterado y otros disolventes. En la exposición de los datos, los valores de los desplazamientos químicos se dan en ppm, usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los acoplamientos se describen como sigue: s, singlete; d, doblete; t, triplete; dt, doble triplete; dd, doble doblete y m, multiplete.

Los espectros de masas (EM) obtenidos mediante ionización química (CI), impacto electrónico(EI) o bombardeo con átomos ligeros (FAB) se registraron en un espectrómetro KRATOS, mod. MS-80-RFA. La temperatura de la fuente de ionización fue de 200°C y la energía de ionización 70 eV.

Introducción directa de las muestras sólidas.

III.3.4. Actividad antiulcerosa gástrica

III.3.4.1. Úlcera gástrica aguda inducida por inmovilización y frío

Descripción y desarrollo de la técnica

La elección de este modelo obedece a las siguientes razones:

- a) Alta incidencia de lesiones encontradas (90%).
- b) Simplicidad de la técnica y corta duración del experimento.
- c) Uniformidad de las lesiones, que facilita su evaluación y cuantificación.

Material

Jaulas individuales provistas de rejilla metálica

Cepos cilíndricos

Cámara frigorífica

Material quirúrgico

Espátulas

Fotocolorímetro

Baño de aceite

Sep-Pak C18

Homogenizador

Reactivos

HCl 1N

Acetilacetona -R.A.

Carbonato sódico -R.A.

PABA -R.A.

Alcohol etílico -R.A.

Método

En el experimento hemos reproducido el método de SENAY y LEVINE (1967), en el que se induce la ulceración gástrica aguda, utilizando dos situaciones estresantes: la inmovilización y el frío.

Los animales, ratas albinas de ambos sexos, de peso comprendido entre 180-250g, se someten a ayuno 36 horas antes de la experiencia. Tras este periodo se les administran, vía oral (1mg/100g animal), las dosis correspondientes del producto a ensayar, procediendo acto seguido a su inmovilización. Para ello se introducen en unos cepos cilíndricos de unos 25-30 cm de longitud y 4-5 cm de diámetro, que se cierran por sus extremos para evitar la fuga. Los animales así preparados, son colocados en cámara frigorífica a una temperatura de 3-5°C durante 3 horas.

Transcurrido este tiempo se sacrifican, se disecan los estómagos que se abren por su curvatura mayor y se lavan cuidadosamente con agua, recogiendo el moco gástrico. A continuación se procede a contabilizar las lesiones producidas.

La medida del grado de ulceración se calculó para cada animal y se expresó como índice de ulceración (IU).

El moco gástrico se recoge raspando la mucosa con espátula, e inmediatamente es homogeneizado en 4 mL de agua destilada. El peso del moco recogido se calcula por diferencia de pesada.

A las muestras recogidas se les realizaron los siguientes ensayos bioquímicos:

- Determinación de proteínas totales:

El contenido del moco (mg/mL) fue determinado mediante el método colorimétrico de LOWRY (1951). Las determinaciones analíticas fueron realizadas a 750 nm.

- Determinación de hexosaminas:

Hemos valorado la concentración de hexosaminas en el moco gástrico según el método descrito por BOAS (1953), modificado por BULBENA (1986). 2 mL del raspado mucoso homogeneizado es tratado con 2 mL de HCl 1N y mantenido en baño de aceite a 100°C durante

16 horas. Una vez filtrado el hidrolizado, se pasa a través de una microcolumna cromatográfica de fase reversa SepPak C18, que retiene sustancias cromógenas; posteriormente, se realiza sobre el eluato la reacción con acetilacetona al 2% en carbonato sódico y p-dimetilaminobenzaldehído al 2.69% en mezcla etanol-ácido clorhídrico concentrado 1:1. Ciertas sustancias no básicas son capaces de producir soluciones coloreadas al reaccionar con las hexosaminas. Las mediciones fueron realizadas en fotolorímetro a 530 nm.

Se han ensayado diferentes dosis de la fracción flavónica, comparándose los efectos producidos frente a dos grupos de referencia tratados con Ranitidina (50 mg/Kg animal) y Omeprazol (10 mg/Kg animal) y con otro grupo control, que sólo recibió agua destilada.

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

III.3.4.2. Úlcera gástrica aguda inducida por ligadura de píloro

Descripción y desarrollo de la técnica

Las razones en las que nos basamos para elegir el modelo descrito por SHAY (1945) son:

- Alto porcentaje de lesiones halladas (80-90%)
- Relativa sencillez operativa
- Posibilidad de analizar el jugo gástrico recogido.

Las bases de producción de este tipo de úlceras son la retención en el estómago de la abundante secreción gástrica (BRODIE, 1966) y los trastornos vasomotores causados por el trauma pilórico (ISHII, 1969).

Otros factores etiopatogénicos serían la disminución en la síntesis de ácidos nucleicos e hidratos de carbono y la posible interferencia en la absorción de electrolitos como consecuencia de la ligadura (ISHII, 1969; MOZSIK et al., 1969).

Material

Jaulas individuales provistas de rejillas metálicas

Material quirúrgico

Tubos de centrifuga graduados

pH-metro

Fotocolorímetro

Centrifugadora

Reactivos

NaOH 0.1N

Eter

Folin-Ciocalteu

Método

La administración de las muestras a ensayar se realizó, vía oral (1mL/100g animal), 1 hora antes de la intervención.

Los animales son anestesiados superficialmente con éter, previo ayuno de 36 horas, sometiéndolos a una incisión media abdominal a partir del apéndice xifoides de unos 3 cm de longitud. Esta práctica permite apreciar la primera porción del duodeno, el cual nos facilita el acceso al esfínter pilórico.

Procedemos a ligar el canal pilórico, excluyendo los vasos adyacentes. La cavidad abdominal se cierra mediante sutura continua por planos.

Los animales se depositan nuevamente en sus jaulas, sacrificándolos 6 horas más tarde. En este instante se abre el abdomen para ligar el esófago a nivel del diafragma, disecando el estómago a continuación.

El contenido gástrico se recoge en tubo de centrifuga graduado con objeto de poder determinar el volumen, acidez y contenido en pepsina.

Posteriormente se abren los estómagos por la curvatura mayor, lavándolos cuidadosamente con agua y procediendo a contabilizar las lesiones originadas.

La medida del grado de ulceración se calculó para cada animal y se expresó en índice de ulceración (IU).

Al jugo gástrico recogido se le realizaron los siguientes ensayos:

- Determinación analítica del contenido ácido:

El contenido gástrico fue centrifugado hasta obtener un fluido claro. En la muestra (1mL) se determinó la acidez libre y total.

Los valores de acidez se calcularon por valoración potenciométrica con NaOH 0.1N, expresándose en mEq/L.

- Determinación de pepsina:

La concentración de pepsina en muestras homogeneizadas de jugo gástrico fue determinada por el método colorimétrico de LOWRY (1951), de gran sensibilidad para la cuantificación de proteínas.

III.3.4.3. Úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto

Descripción y desarrollo de la técnica

El etanol absoluto, como otros agentes irritantes, produce lesiones necrosantes en la mucosa gástrica por su efecto tóxico directo. Reduce la secreción de bicarbonato y la producción de moco, alterando su composición glicoproteica y provocando una disminución del gradiente de pH a través de la capa mucosa. Desestabiliza las membranas lisosomiales de las células glandulares originando la lisis y facilitando la liberación de hidrolasas ácidas que, por diversos mecanismos, producen la lesión hística (GARCIA et al., 1984).

La acción citoprotectora de las PGs a dosis no antisecretoras, es independiente de la acción sobre la secreción clorhidropéptica. En consecuencia, el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto supone un método experimental especialmente aceptable para ensayar fármacos con acción citoprotectora sobre la mucosa gástrica.

Si el vaciado del estómago del animal es completo, la administración del etanol absoluto produce una serie de lesiones que ocupan 30-40% de la superficie total de la mucosa, con bandas hemorrágicas necróticas fundamentalmente localizadas en la zona del corpus del estómago. Este método es reproducible prácticamente en el 100% de los casos.

Material

Jaulas individuales provistas de rejilla metálica

Material quirúrgico

Espátulas

Homogeneizador

Fotocolorímetro

Baño de aceite

Sep-Pak C18

Reactivos

Alcohol etílico -R.A.

HCl 1N

Acetilacetona -R.A.

Carbonato sódico -R.A.

PABA -R.A.

Método

Seguimos el método descrito por ROBERT (1979). Las ratas, de peso comprendido entre 180-250 g, se mantienen en ayunas 36 horas con libre acceso al agua. Las muestras a ensayar se administran a diferentes dosis y tiempos de tratamientos. Cada animal recibe 1 mL de etanol mediante sonda intragástrica; 1 hora después se sacrifican, se extraen los estómagos, abriéndolos por la curvatura

mayor, lavándolos cuidadosamente con 4 mL de suero fisiológico y procediéndose a continuación a medir la superficie ulcerada.

El índice de ulceración calculado corresponde con la media de las medidas obtenidas para cada animal.

El moco recogido y posteriormente homogeneizado en 4 mL de agua destilada, es analizado para determinar su contenido en proteínas totales y hexosaminas:

- Determinación de proteínas totales:

Seguimos el protocolo descrito en el modelo de úlcera experimental por inmovilización y frío (Ap.III.3.4.1).

- Determinación de hexosaminas:

Seguimos el protocolo descrito para la determinación de hexosaminas en el modelo de úlcera experimental por inmovilización y frío (Ap. III.3.4.1).

III.3.5. Actividad sobre la permeabilidad vascular

Algunos flavonoides demuestran interesantes actividades sobre la pared de los más pequeños vasos sanguíneos y, particularmente, sobre el tejido perivascular, el llamado "periangio" o "vaina pericapilar mucopolisacáridica". Es por ello, que hemos ensayado la actividad de los extractos AcOEt y Etéreo, ricos en flavonoides, sobre la permeabilidad vascular.

Descripción y desarrollo de la técnica

La histamina inyectada intradérmicamente, incrementa la permeabilidad capilar a las proteínas plasmáticas. Colorantes como Azul de Evans, administrados por vía i.v., se unen a las proteínas plasmáticas, en particular a la albúmina, y colorea el área de piel en la que tiene lugar la extravasación de estas proteínas. Este es el fundamento del modelo experimental desarrollado por UDAKA (1970).

Material

Plantilla (6 cuadros 1cm x 1cm)

Tubos de ensayo

Gradillas

Material quirúrgico

Estufa de desecación

Fotocolorímetro

Reactivos

Pentobarbital sódico

Histamina diclorhidrato

Formamida

Agar-Agar

Método

Se han utilizado ratas Wistar macho de 170-200 g de peso, distribuidas en lotes de cinco animales cada uno y mantenidas en ayunas 24 horas antes de iniciar el ensayo. Son colocadas en decúbito dorsal, con la cara ventral rasurada.

Las muestras en estudio, o el vehículo empleado para suspenderlas (agar-agar al 0.25%), se administran por vía intraperitoneal. A continuación, los animales son anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/Kg animal) y sobre la piel de la cara ventral se marcan 6 cuadros de 1 cm de lado. Una hora después de la administración del compuesto en estudio se inyecta, a través de la femoral, 0.1 mL Azul de Evans, a la dosis de 60 mg /Kg. Tres minutos después, se administra intradérmicamente en 5 de los 6 cuadros marcados, 50 mg de histamina clorhídrica, en 0.1 mL de volumen. El sexto cuadro servirá de blanco al realizar la medida espectrofotométrica.

Al cabo de 20 minutos, se recorta la piel de cada pápula y es entonces prelavada y situada en tubos de ensayo con 4 mL de formamida. Se incuban a 65 °C durante 24 horas y a continuación se mide en fotocolorímetro la densidad óptica de la solución a 620 nm.

III.3.6. Actividad sobre radicales libres

Descripción y desarrollo de la técnica

Con este ensayo *in vitro*, consistente en la medida de la actividad antirradicalaria, se pretende poner de manifiesto la capacidad que poseen nuestros extractos para neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, responsables, cuando están dotados de un alto grado de reactividad, bien de la aparición de determinadas patologías, bien del agravamiento de las mismas (CILLARD et al., 1988)(ALCARAZ et al., 1991).

Material

Cámara frigorífica

Termómetro

Fotocolorímetro

Tubos de 5 mL, provistos de tapón

Reactivos

DPPH [1,1-Difenil-2-picrilhidrazil]

Acido ascórbico

Alcohol metílico

Alcohol etílico

Método

Para estos ensayos se ha seleccionado un radical libre ampliamente utilizado en la realización de estudios de actividad antirradicalaria *in vitro*: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (LAMAISON et al., 1990, 1991, 1993).

La solución metanólica de DPPH posee la característica de presentar una coloración azul-violeta intensa, que va desapareciendo como consecuencia de la reducción del radical.

Se han adicionado diferentes cantidades de los extractos, preparados a una dilución de 1mg/mL, a 2.5 mL de reactivo. A los 30 minutos, se mide la absorbancia a 517 nm.

Hemos validado el proceso, determinando la capacidad antirradicalaria manifestada por un patrón reductor de actividad conocida (ácido ascórbico), frente al DPPH, a una concentración de radical libre de 6×10^{-5} M en metanol. El ácido ascórbico se preparó en solución etanólica al 50% ($CE_{50} = 2.7 \mu\text{g/mL}$, $r=0.9993$).

La actividad antirradicalaria se expresa en concentración eficaz 50%, (CE_{50}): "concentración de droga, en mg/mL de medio reactivo, para la cual la disminución de la absorbancia alcanza el 50% de la de la solución blanco".

Las muestras problema se prepararon, al igual que la correspondiente al ácido ascórbico, en etanol del 50%, realizando cada ensayo por triplicado.

III.3.7. Actividad antimitótica. (Cultivo de células vegetales)

Descripción y desarrollo de la técnica

Hemos utilizado los meristemos apicales radicales de *Allium cepa* L. var. denominada *francesa*, debido a su fácil manejo, su gran producción de raíces y por presentar dichos meristemos un gran número de células en división.

Material

Bulbos de *Allium cepa* L. var. *francesa*

Tubos de vidrio 70 mL

Gradillas

Bomba de membrana Rena 101

Tubos oxigenadores

Pinzas

Vidrio de reloj

Mechero de alcohol

Porta y cubre objetos

Microscopio Olympus BH-2

Reactivos

Alcohol etílico absoluto

Acido acético glacial

Orceína

Acido clorhídrico 1N

Método

Seguimos el método descrito por DEYSSON, modificado por LEVAN y LOTFY (1949). Los bulbos, de peso comprendido entre 20-30 g, se cultivaron en tubos de vidrio de 70 mL de capacidad con agua filtrada, renovada cada 24 horas. Se hizo burbujear aire a través del mismo, utilizando una bomba de membrana Rena 101 con el fin de mantener el medio en nivel constante de oxígeno y en permanente agitación.

Todo el sistema de cultivo se aisló dentro de una cabina a una temperatura comprendida entre 20-25°C, consiguiéndose al mismo tiempo la oscuridad necesaria para el desarrollo de las raíces. Los bulbos se colocaron de tal manera que sólo sus bases permanecieron sumergidas en el agua, manteniéndose así hasta que sus raíces alcanzaron una longitud de 2-3 cm. En este momento los bulbos se trasladaron a otros frascos de cultivo conteniendo los compuestos a ensayar, donde se mantienen el tiempo de tratamiento indicado en cada caso (4, 8, 24, 48 y 72 horas). Transcurridos dichos tiempos tomamos, mediante pinzas, 3-4 raíces de cada bulbo

y se fijaron de inmediato en la solución Carnoy (etanol absoluto/ácido acético 3:1)(WILSON et al., 1971). Se procuró elegir raíces bien desarrolladas, sin anomalías morfológicas visibles.

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

La tinción fue efectuada mediante la técnica de TJIO y LEVAN (1950) con orceína acética clorhídrica: las raíces previamente fijadas, se colocan en un vidrio de reloj con la solución colorante hasta cubrirlas totalmente. A continuación se calienta a la llama de un mechero de alcohol, sujetándolo con pinzas espatuladas y haciéndolo girar suavemente alrededor de la llama hasta que la temperatura alcance 50°C aproximadamente; el control de la temperatura puede realizarse apoyando el vidrio de reloj sobre el dorso de la mano. Dejamos enfriar durante 5 minutos, repitiendo esta operación posteriormente dos veces más. Finalmente, se deja reposar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos antes de proceder al aplastamiento.

Una vez las raíces teñidas, una de ellas se coloca sobre un portaobjetos y se separa la parte correspondiente al meristemo apical radical con una lanceta, desechando el resto de la raíz (cofia y zona de diferenciación tisular). A continuación procedemos a la extensión del material, añadiendo unas gotas de solución colorante o bien de ácido acético glacial del 45% y con una lanceta efectuamos un

ligero troceado del mismo. Colocamos encima el cubreobjetos y, una vez extendido el material, se cubre la preparación con papel de filtro y se presiona suavemente con objeto de obtener un aplastamiento uniforme, procurando que la fuerza aplicada sea normal a la superficie del cubreobjeto. De esta manera, se consigue que las células meristemáticas queden distribuidas en un mismo plano (distribución en monocapa), haciendo posible un buen enfoque al microscopio. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio Olympus BH-2.

Se determinaron los índices mitótico (IM) y de fase (IF) calculados sobre un número determinado de células, que siempre fue superior a 2000.

III.3.8. Actividad antimicrobiana

Descripción y desarrollo de la técnica

Hemos ensayado la actividad antimicrobiana siguiendo la técnica de KYRBY y BAUER (1966).

Se han determinado los halos de inhibición que provocan diferentes dosis de los compuestos sobre el crecimiento de distintos microorganismos.

Material

Placas Petri

Hisopos estériles

Tubos estériles

Escobillones

Autoclave

Discos de papel

Mechero

Estufa de incubación

Pinzas

Micropipetas

Escalímetro

Fuente de luz

Microorganismos ensayados

Bacterias Gram (+)

Bacillus subtilis ATCC 6633

Bacillus megaterium ATCC 33085

Bacillus cereus ATCC 14579

Staphylococcus aureus ATCC 25925

Bacterias Gram (-)

Pseudomonas aeruginosa (aislado clínicamente)

Proteus mirabilis (aislado clínicamente)

Serratia marcescens ATCC 8100

Escherichia coli CCM 180

Salmonella thyphimonium ATCC 140028

Klebsiella neumoniae ATCC 13883

Hongos

Candida lusitaniae ATCC 34449

Candida obtusa CBS 1944

Saccharomyces uvarum ATCC 28097

Saccharomyces cerevisiae S 288 C

Schizosaccharomyces pombe PO 5

Reactivos

Agar Müeller-Hinton

Método

Se ha seleccionado como medio de cultivo standar el agar de Müeller-Hinton (SORIANO, 1976), debido a que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. La reacción final del medio a temperatura 25°C será de pH= 7 -4.

Una vez preparado, se vierte en placas estériles. Es importante que el medio alcance en la placa una altura uniforme de 4 mm; extensiones de menor grosor provocan un aumento de la difusión de las sustancias superficialmente, correspondiéndoles falsamente mayores zonas de inhibición; por el contrario, alturas superiores a 4 mm generan que la sustancia difunda hacia el interior del medio, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

El inóculo se ha preparado hasta conseguir que la turbidez del medio sea equivalente al standar nº0.5 de la escala de Mc Farland, lo que equivale a una concentración de 10×10^8 microorganismos/mL aproximadamente.

La falta de control en la concentración bacteriana del inóculo (SORIANO, 1976) puede producir significativas variaciones en el tamaño de las zonas de inhibición.

Una vez lograda la turbidez adecuada, sembramos con hisopo estéril la superficie de una placa de agar de Müeller-Hinton, dejando previamente que la placa tome la temperatura ambiente y manteniendo la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar.

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

Una vez seca, la placa está lista para la colocación de los discos impregnados con las muestras a ensayar. El diámetro de los discos ha sido en todos los casos de 5mm.

Para paliar la influencia de los disolventes en el crecimiento microbiano y, por tanto, en los halos de inhibición (MARHUENDA et al., 1985), los discos impregnados con los productos se llevaron a estufa a 60°C durante 30 minutos. Antes de ser colocados deben estar a temperatura ambiente.

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

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

Una vez las placas preparadas convenientemente, para la prueba de la susceptibilidad se colocan en una incubadora a 37°C durante 18 horas; este es el periodo en el que la reactividad entre los microorganismos en desarrollo y los efectos inhibidores de la sustancia son óptimos, siendo los bordes de las zonas de inhibición más nítidos. Transcurrido el tiempo de incubación, aparecen las zonas de inhibición alrededor de los discos impregnados con las muestras.

Los diámetros de estas zonas se miden cuidadosamente por la parte posterior de la placa, utilizando una fuente de luz brillante transmitida. Todas las mediciones se realizan con la aproximación de 1 mm.

III.3.9.- Cálculo estadístico

Los resultados han sido expresados como la media \pm el error standard. La significación de las diferencias entre los grupos ha sido evaluada mediante el test de la "t" de Student-Fisher y la significación del índice "U" de la prueba de Mann-Whitney.

IV. RESULTADOS

IV.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

El peso de los extractos y sus respectivos rendimientos expresados en porcentaje de droga seca son los siguientes:

Tabla 9

Extracto	Peso (g)	% (p/p)
Clorofórmico	114.90	11.49
Etéreo	40	4
Acetato de etilo	70.9	7.09

IV.2. EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

IV.2.1.- Fraccionamiento cromatográfico

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

Partimos de 7 g de residuo seco (r.s.), que una vez disuelto en acetato de etilo, fue mezclado con gel de sílice 0.2-0.5 mm, formando una cabeza que se montó en una columna de vidrio (120x4cm) empaquetada con silicagel 60 (0.063-0.2 mm). La elución se realizó con mezcla AcOEt/MeOH/H₂O (80:3:3). Se recogieron 156 fracciones, de aproximadamente 20 mL cada una, que se agruparon de acuerdo a su comportamiento en CCF. El revelado se realizó con oleum, solución de AlCl₃, así como con luz U.V. Los resultados se exponen en la Tabla 10 (Columna A).

Tabla 10. Fraccionamiento cromatográfico del Ext° AcOEt

COLUMNA A		
FRACCIONES	ELUYENTES	OBSERVACIONES
1-11	AcOEt/MetOH/H ₂ O (80:3:3)	Clorofilas
12-15	"	Mezclas
16-57	"	M1 + Mezclas
58-87	"	M1
88-156	"	M1 + Mezclas

IV.2.2. Identificación del compuesto M1

Reunidas las fracciones 58-87, se llevaron a pequeño volumen dejándolos a T^a ambiente. Al cabo de un tiempo, se obtuvieron cristales de color amarillo que fueron purificados por sucesivas recristalizaciones. A este compuesto, le denominamos "M₁".

IV.2.2.1. Resultados

Las fracciones 58-87 de la columna cromatográfica A (Tabla10) aporta un único compuesto por CCF; este compuesto daba positivas las reacciones características de flavonoides. Su identificación la realizamos por espectroscopía (UV, IR, ¹H-RMN y EM), determinándose también su P.F. (210 °C).

UV λ máx. (nm):

MeOH 362, 300_{sh}, 256

NaOMe 387_{desc.}, 312_{sh}, 267, 249_{sh}

AlCl₃ 422, 372_{sh}, 309

AlCl₃/HCl 400, 363, 309

IR δ máx (cm⁻¹), KBr:

3430, 1650, 1590, 1150

¹H-RMN (ppm), (200 MHz, MeOD):

5.22 (1H, d, J=8 Hz)

7.49 (1H, s)

7.40 (1H, d, J=10 Hz)

6.39 (1H, d, J=2 Hz)

6.19 (1H, d, J=2 Hz)

EM (FAB) m/z (%):

480 M⁺

EM (EI) m/z (%):

318 M⁺

EM (CI) m/z (%):

319 M⁺

Compuesto M₁ (Genina)

La genina se obtuvo por hidrólisis ácida a partir de 1.2 mg del compuesto glicosídico "M₁" (Apart. III.3.1).

En la fracción orgánica se identificó el flavonol miricetina comparándolo con una muestra patrón por CCF y ¹H-RMN.

Compuesto M₁ (Cadena azucarada)

El estudio de la cadena azucarada se realizó por CG, utilizando patrones puros.

La solución acuosa correspondiente al hidrolizado de "M₁" se concentró a vacío en Rotavapor a 40 °C y se silanizó con TRISIL. Las condiciones cromatográficas en las que se realizó la identificación figuran en el Apart. III.3.2.2.

La Fig.8 muestra el cromatograma obtenido para el hidrolizado de "M₁" que coincide con el del patrón Galactosa.

IV.2.2.2. Discusión de resultados

El espectro U.V. (Fig.3) muestra máximos de absorción a 1 características de un flavonol-3-hidroxi-sustituido. El desplazamiento batocrómico de la banda I, con descenso manifiesto en la intensidad por adición de NaOMe, nos indica la presencia de un sistema 3',4',5'-trihidroxilo. Con AlCl_3/HCl la banda I se desplaza 38 nm, indicativo de OH libre en la posición 5 y sustituido en la 3 (MABRY et al., 1970).

Su espectro IR presenta a 3430 cm^{-1} una fuerte absorción de grupos hidroxilos libres y a 1650 cm^{-1} la absorción característica de un grupo carbonilo α,β insaturado.

Los datos obtenidos del espectro $^1\text{H-RMN}$ en metanol (Fig. 4) revelan la presencia de un protón en 2' del anillo B del flavonoide, correspondiente a un singlete a 7.49 ppm. Aparece también una señal a 7.40 ppm del protón en 6' de dicho anillo. Dos protones aromáticos a 6.39 y 6.19 ppm como dos dobletes con $J=2\text{ Hz}$, que se corresponden, por tanto, con dos protones en posición meta. A 5.22 ppm se observa un doblete $J=8\text{ Hz}$ correspondiente al protón anomérico del azúcar.

El EM (FAB) (Fig. 5) muestra el ión molecular y pico base a $m/z\ 480$, mientras que el espectro obtenido por impacto electrónico (EI) lo exhibe a 318 (Fig. 6).

Por otra parte, la genina mediante CCF y $^1\text{H-RMN}$, se identificó con el flavonol miricetina y el estudio realizado por CG permitió identificar la fracción azucarada con la galactosa.

Teniendo en cuenta todos estos datos y consultada la bibliografía, se identificó el compuesto " M_1 " en estudio con el glicósido 3-O-mono-D-galactósido de la miricetina (3-GM).

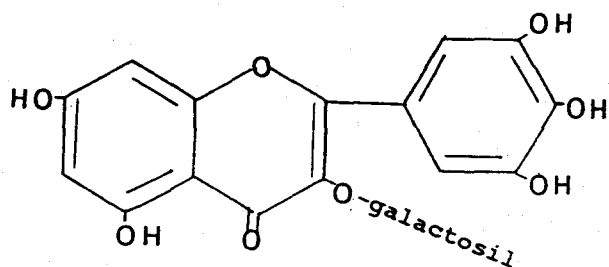


Figura 2. M_1 (3-O-mono-D-galactósido de la miricetina)

Figura 3. Espectro UV del compuesto M₁

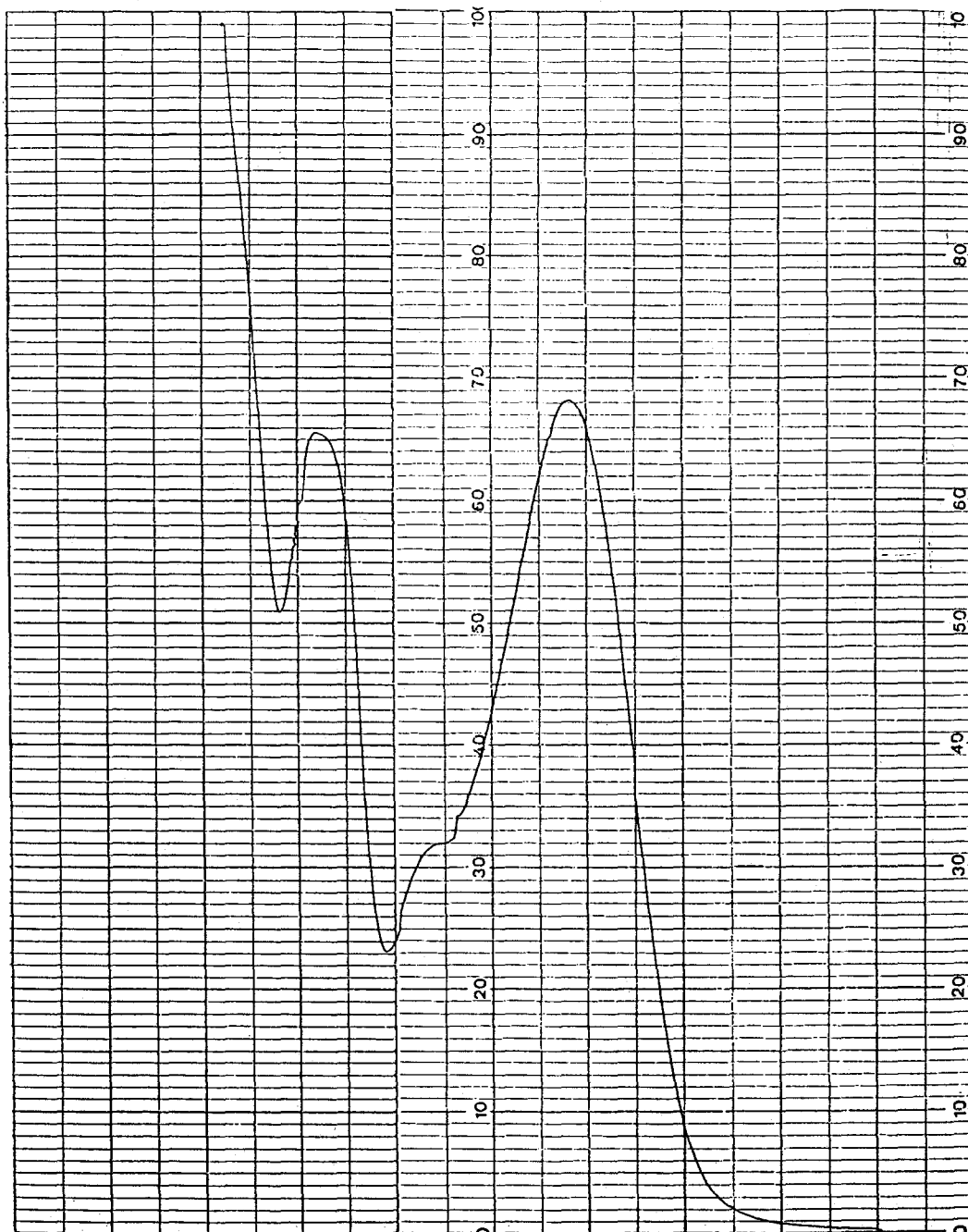


Figura 4. Espectro de ^1H -RMN del compuesto M_1

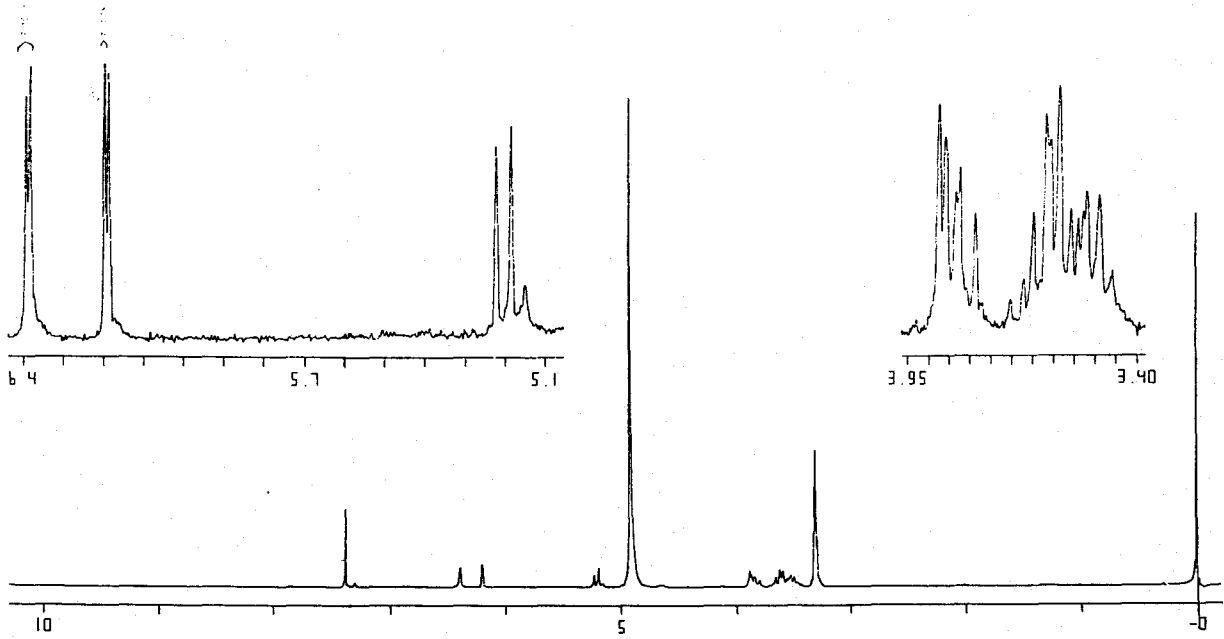


Figura 5. Espectro de Masas (FAB) del compuesto M,

D690 EXGFAB0008.24 RT= 02:11 +EI LRP 07/24/92 12:06
TIC= 14251260 100%= 103908 FARMA-78, TIO+INA.

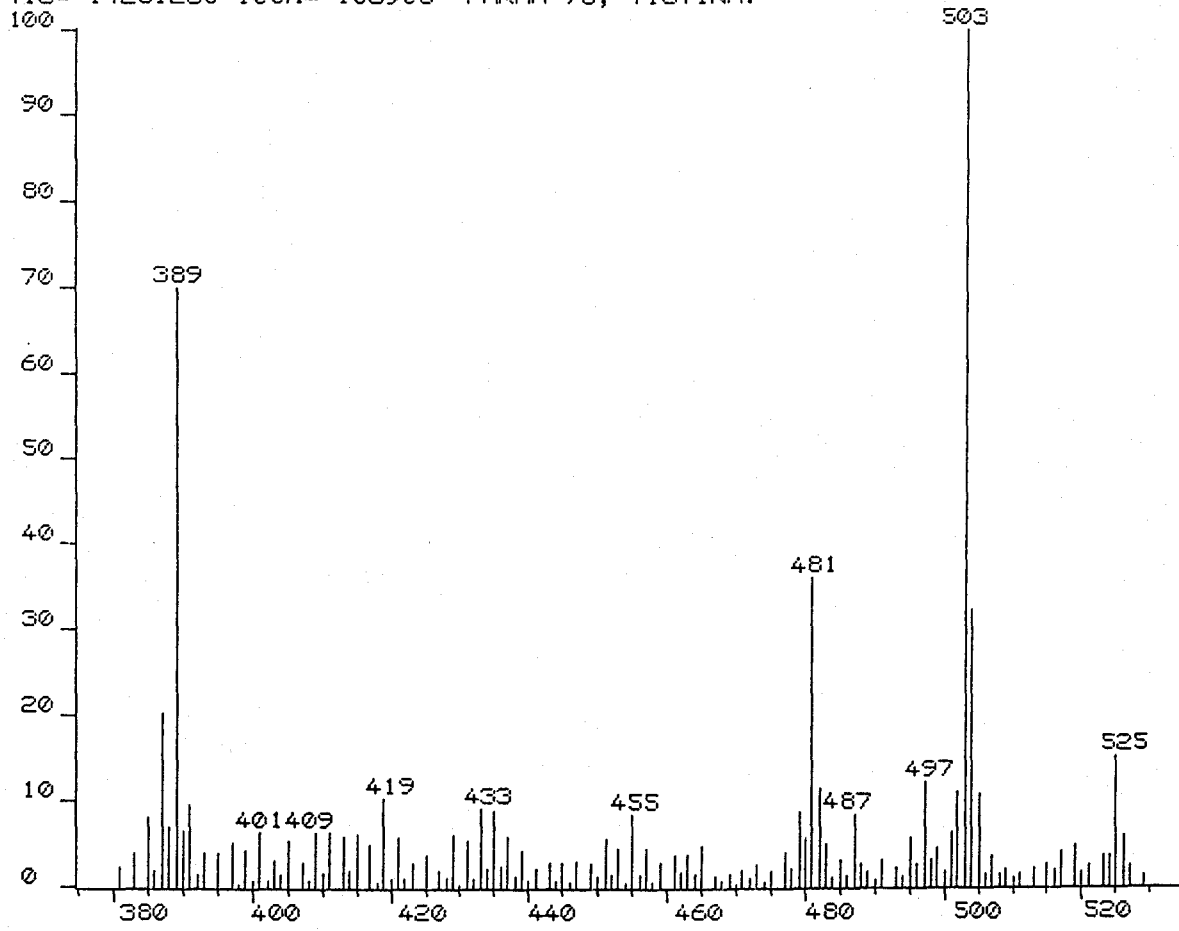


Figura 6. Espectro de Masas (EI) del compuesto M₁

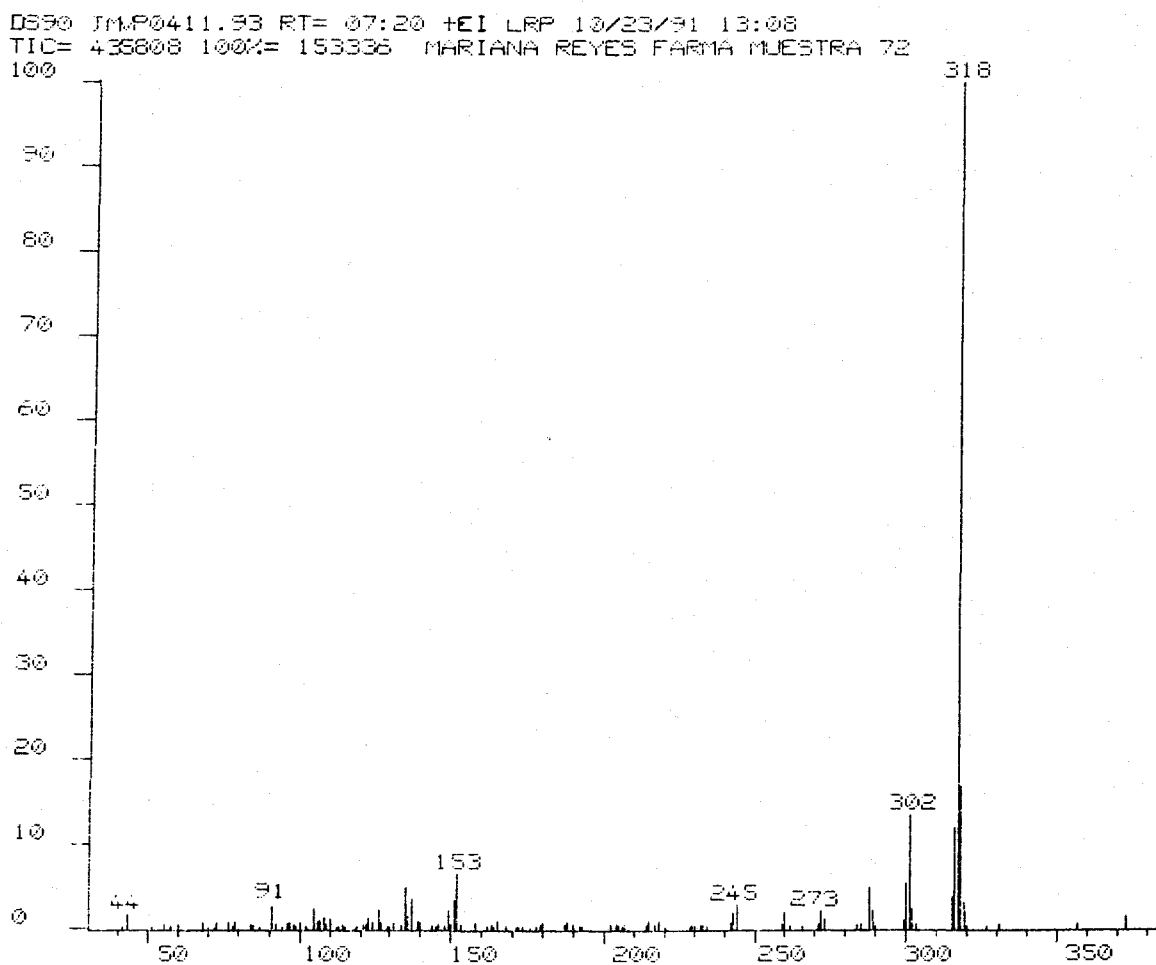


Figura 7. Espectro de Masas (CI) del compuesto M₁

D590 JMVFCI0082.80 RT= 06:18 +CI LRP 11/24/91 13:10
TIC= 3596608 100%= 35163 M. REYES MUESTRA 72

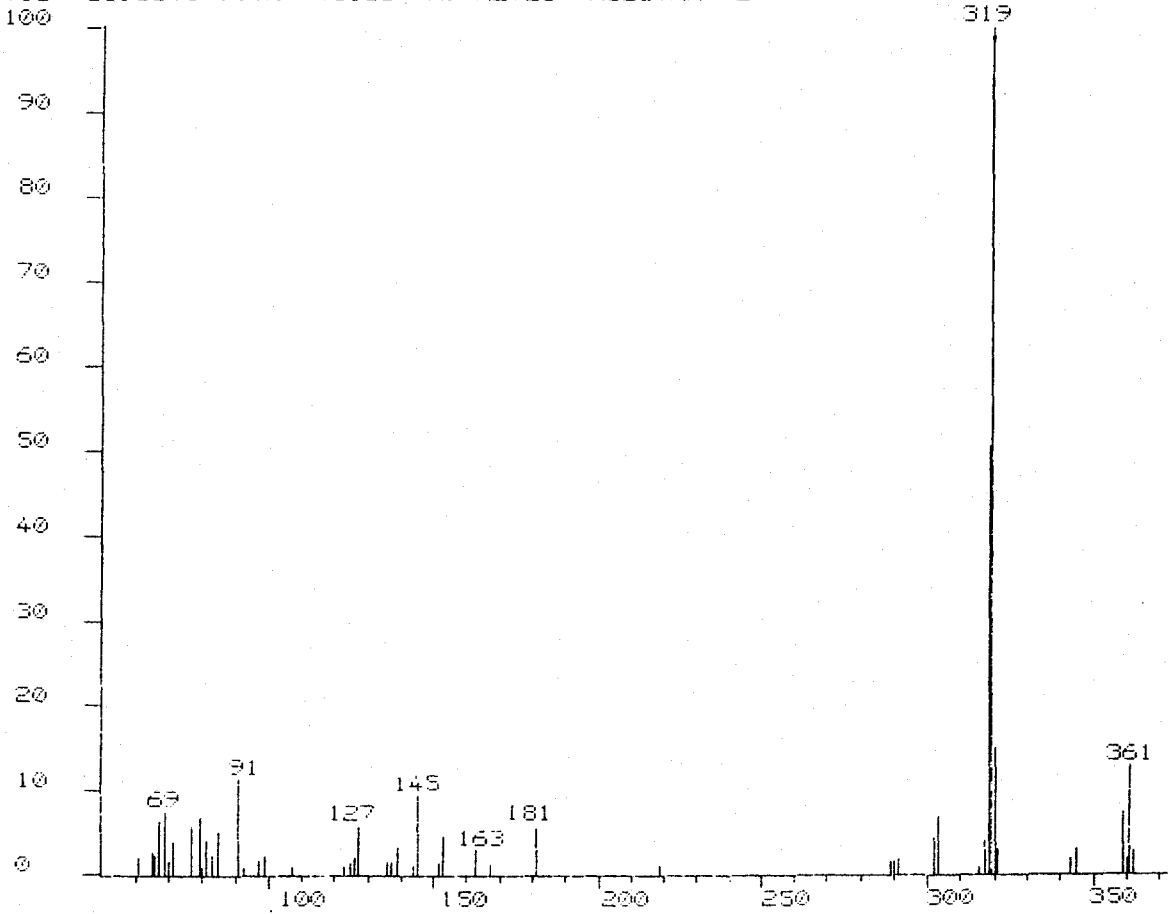
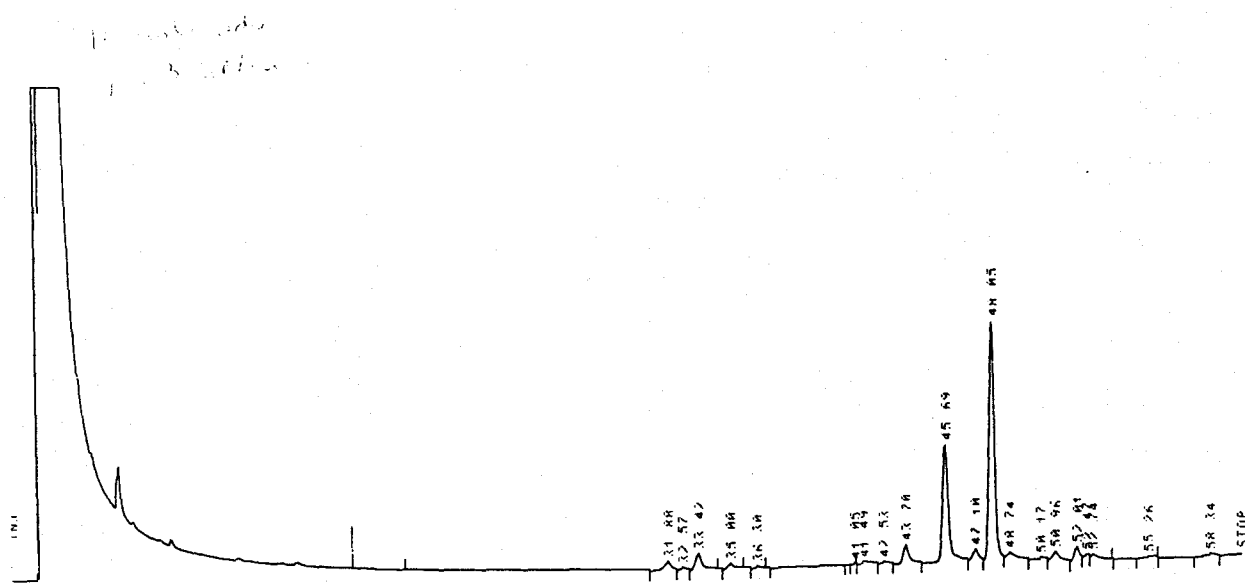


Figura 8. Cromatograma (CG) del compuesto M₁ (cadena azucarada)

057



IV.2.3. Actividad antiulcerosa gástrica

IV.2.3.1.- Ulcera gástrica aguda inducida por inmovilización y frío.

IV.2.3.1.1.- Resultados

En este modelo experimental, el extracto AcOEt a las dosis ensayadas (62.5, 125 y 250 mg/Kg) previno la incidencia ulcerosa de forma estadísticamente significativa, obteniendo unos valores de índice de ulceración (IU: 6.50 ± 1.24 , 6.33 ± 1.27 y $0.45 \pm 0.42 \text{ mm}^2$) que, a la dosis mayor, resultan del mismo rango que Omeprazol ($0.28 \pm 0.11 \text{ mm}^2$). Para el compuesto flavónico aislado de dicho extracto, 3-Galactosil Miricetina (3-GM), (25 mg/Kg), el IU obtenido fue de $2.42 \pm 0.0 \text{ mm}^2$, (Tabla 11) (Fig. 9).

La administración del extracto redujo el porcentaje de estómagos hemorrágicos, mostrándose más activo el flavonoide, con el que se alcanzó una reducción del 100%.

En relación a la secreción de moco gástrico, no se observaron incrementos notables con el extracto en todos los tratamientos ensayados (0.04 ± 0.01 , 0.06 ± 0.02 , $0.08 \pm 0.01 \text{ g}$) ni con el heterósido ($0.10 \pm 0.5 \text{ g}$) (Fig. 11). Sin embargo, se apreció, para las diferentes dosis del extracto, un destacado aumento en la

concentración de proteínas (4.52 ± 0.78 , 4.95 ± 0.78 y 4.10 ± 1.55 mg/mL) y hexosaminas (96.50 ± 9.13 , 102.56 ± 1.15 y 119.57 ± 7.79 $\mu\text{g/mL}$).

El flavonoide tuvo un comportamiento similar, obteniéndose unos resultados de 2.34 ± 0.32 mg/mL y 47.82 ± 1.57 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas y hexosaminas, respectivamente.

Estos resultados contrastan con los obtenidos tras la administración de Omeprazol, que no modifica significativamente el contenido ni la calidad del moco gástrico (Tabla 12) (Figs.11,12 y 13).

Tabla 11. Efecto del Ext° AcOEt, 3-Galactosil Miricetina (3-GM) y Omeprazol sobre la úlcera gástrica aguda inducida por inmovilización y frío.

Tratamiento	Número animales	%EU	%EH	IU (mm ²)
Control	6	100	70	39.16±0.62
Omeprazol 10 mg/Kg	6	50	0	0.28±0.01 ++
Ext° AcOEt 62.5 mg/Kg	6	100	45	6.50±1.24 ++
Ext° AcOEt 125 mg/Kg	6	100	47.5	6.33±1.27 ++
Ext° AcOEt 250 mg/Kg	6	100	50	0.45±0.42 ++
3-Galactosil Miricetina 25mg/Kg	6	60	0	2.42±0.0 ++

Test "U"-Mann Whitney : + p<0.05, ++ p<0.01, ns no significativo

% EU: Porcentaje de estómagos ulcerados

% EH: " de estómagos hemorrágicos

IU: Índice de ulceración

Figura 9. Efecto del Ext° AcOEt, 3-Galactosil Miricetina (3-GM) y Omeprazol sobre la úlcera gástrica aguda inducida por inmovilización y frío (IU).

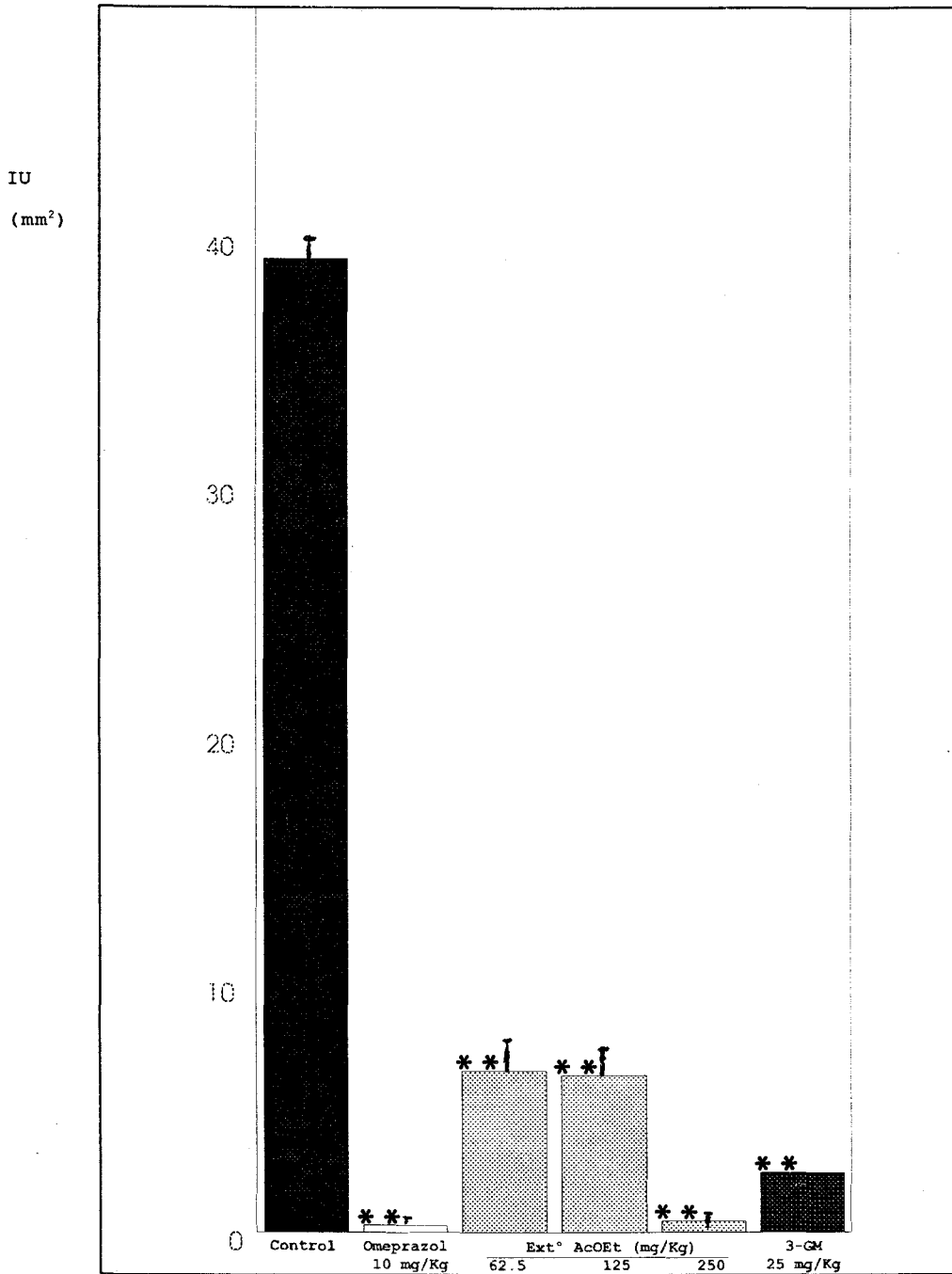


Figura 10. Efecto del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre la úlcera gástrica aguda inducida por inmovilización y frío (%EH).

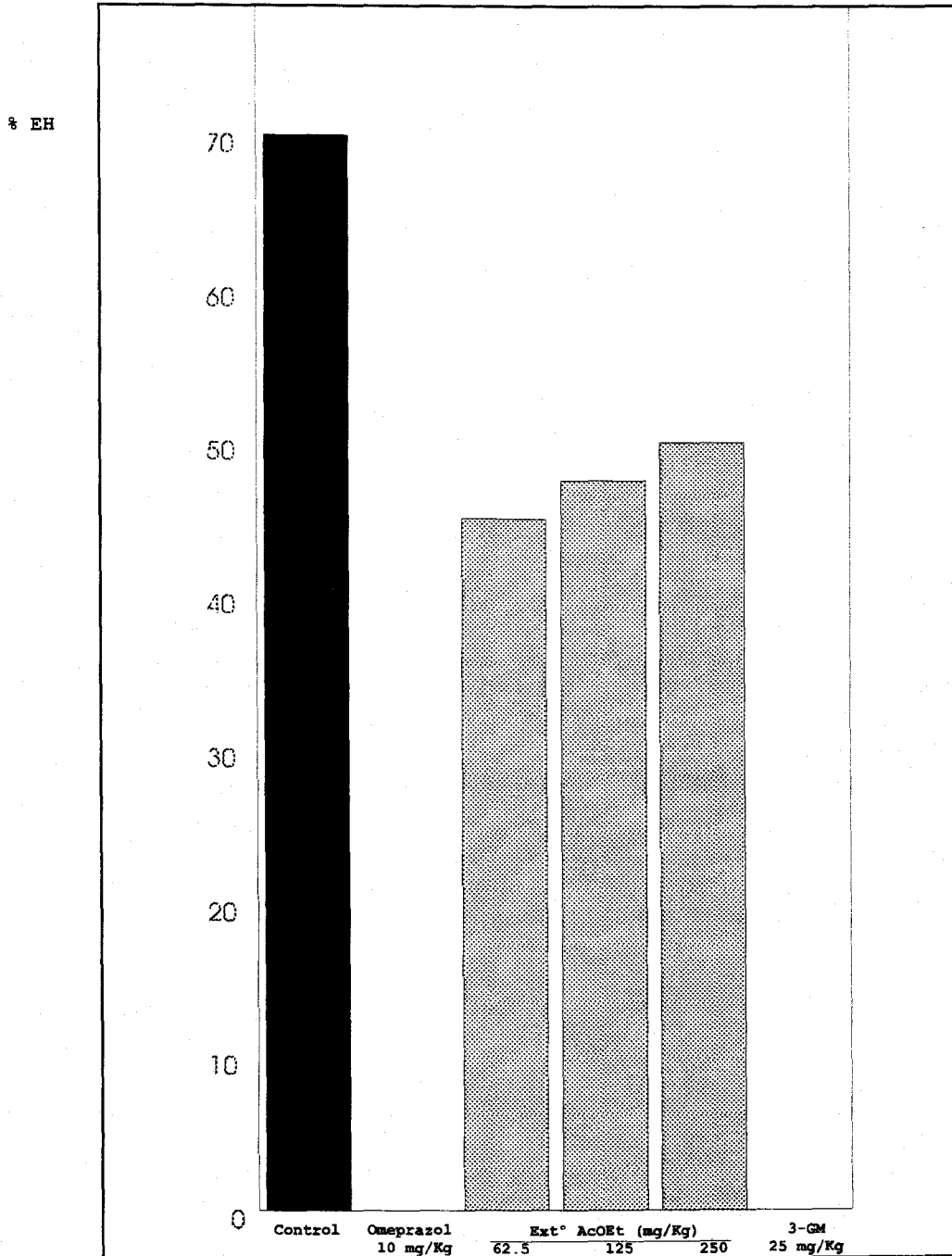


Tabla 12. Efecto del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre la secreción de moco gástrico y su contenido glicoproteico en la úlcera aguda inducida por inmovilización y frío.

Tratamiento	Número animales	Contenido moco (g)	Proteínas totales (mg/mL)	Hexosaminas (μ g/mL)
Control	6	0.07 \pm 0.00	0.43 \pm 0.03	20.87 \pm 2.76
Omeprazol 10 mg/kg	6	0.05 \pm 0.00 n.s.	0.21 \pm 0.06 n.s.	23.00 \pm 2.50 n.s.
Ext° AcOEt 62.5 mg/kg	6	0.04 \pm 0.00 n.s.	4.52 \pm 0.07 ***	96.50 \pm 9.13 **
Ext° AcOEt 125 mg/kg	6	0.06 \pm 0.00 n.s.	4.95 \pm 0.07 ***	102.56 \pm 1.15 ***
Ext° AcOEt 250 mg/kg	6	0.08 \pm 0.01 n.s.	4.10 \pm 0.01 ***	119.57 \pm 7.79 ***
3-Galactosil Miricetina 25 mg/kg	6	0.10 \pm 0.00 n.s.	2.34 \pm 0.03 ***	47.82 \pm 1.57 **

Test "t"-Student: ** p<0.005, *** p<0.001 , n.s. no significativo

Figura 11. Efecto del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre la secreción de moco gástrico en la úlcera aguda inducida por inmovilización y frío.

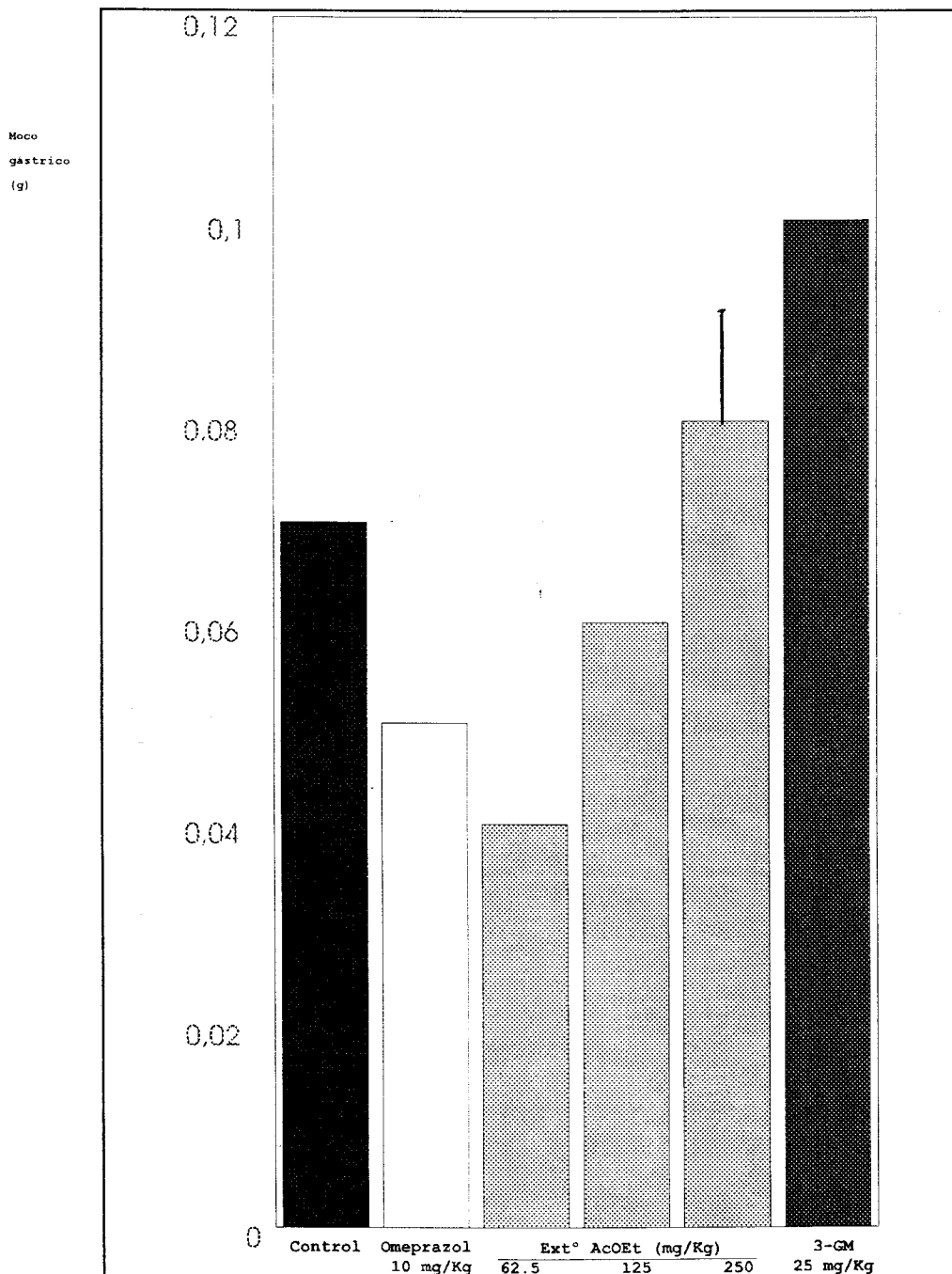


Figura 12. Efecto del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre el contenido de proteínas totales del moco gástrico en la úlcera aguda inducida por inmovilización y frío.

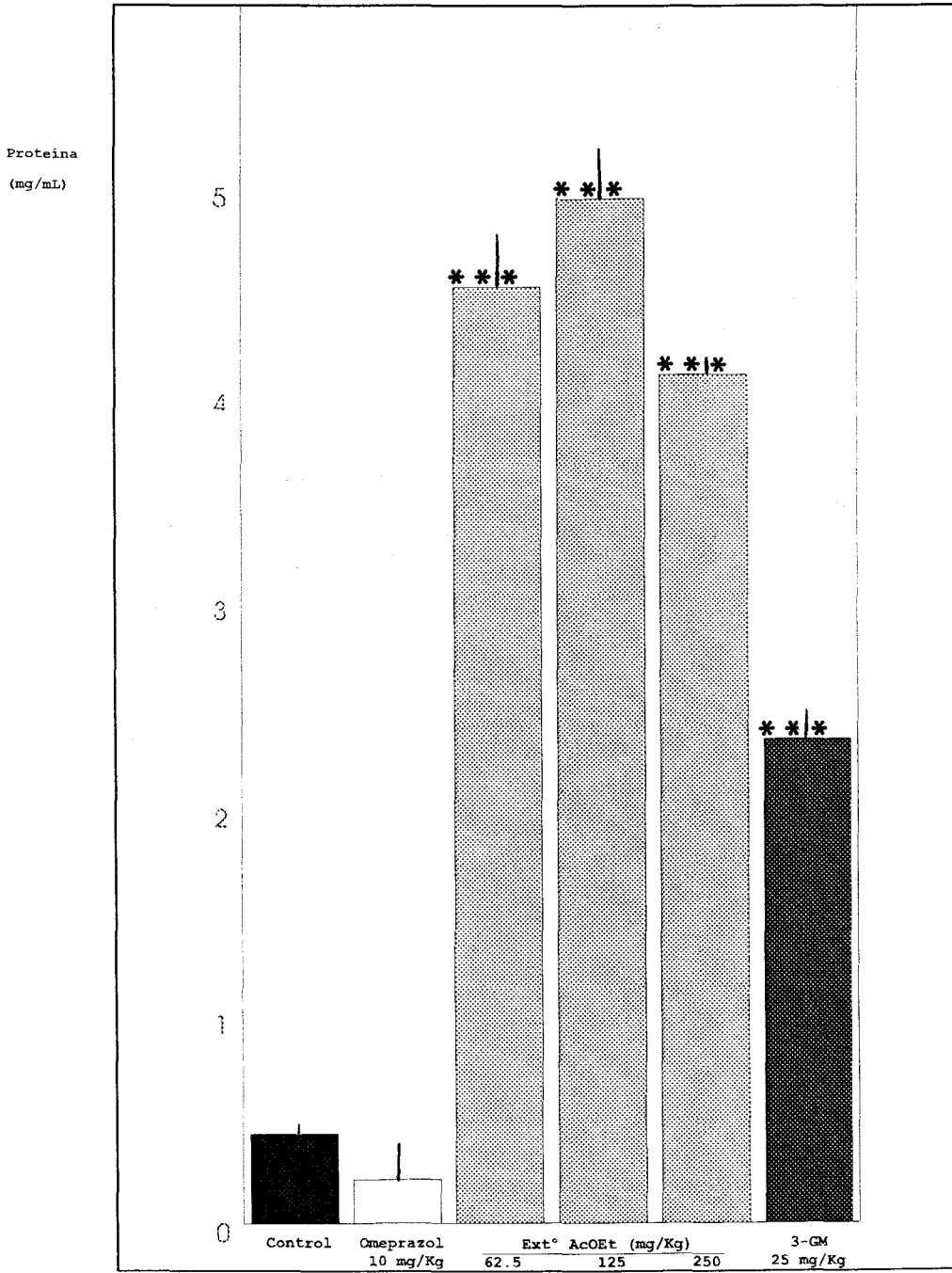
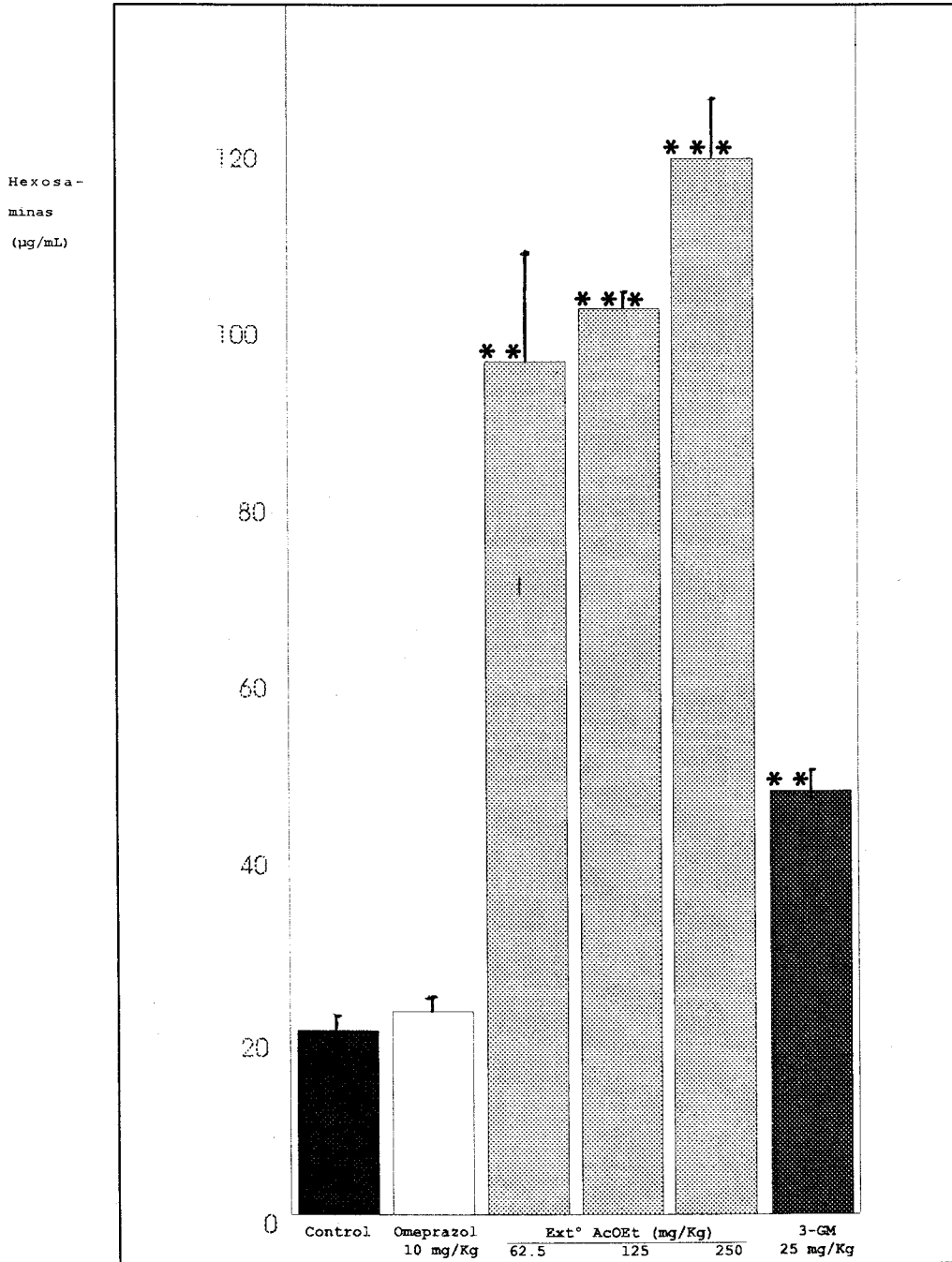


Figura 13. Efecto del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre el contenido en hexosaminas del moco gástrico en la úlcera aguda inducida por inmovilización y frío.



IV.2.3.1.2.- Discusión de resultados

Los resultados obtenidos tras someter a los animales a un estado de inmovilización y frío muestran, tanto para el extracto AcOEt como para la 3-Galactosil Miricetina (3-GM), un efecto protector gástrico determinado por los valores de los IU. Este efecto, a todas las dosis del extracto e incluso del principio activo aislado, no fue acompañado de un aumento en la cantidad del moco gástrico secretado, sin embargo, hubo un destacado incremento en la concentración de proteínas totales y hexosaminas.

En la fisiopatología de la úlcera péptica, el moco gástrico puede considerarse como un sistema de protección que actúa debido a sus propiedades físico-químicas. Gracias a la capacidad de las glicoproteínas que lo componen de secuestrar agua en sus intersticios, se dificulta la retrodifusión de iones hidrógeno. También presenta propiedades lubricantes, manteniendo una permeabilidad muy baja a determinadas moléculas, entre ellas la pepsina (BROOKS, 1985).

Diversos autores demuestran que el estrés produce en el animal de experimentación un descenso de la secreción de moco. Por ejemplo, TSUKADA et al. (1989) estudiaron la síntesis de glico-proteínas y pudieron confirmar que, en condiciones de tensión emocional, no sólo existe una menor síntesis de sus componentes, sino que además varía su calidad, afectándose la traslación, acilación

y glicosilación de los péptidos ribosómicos. En consecuencia, podríamos considerar la alta riqueza en proteínas y hexosaminas como uno de los factores implicados en la gastro-protección inducido por el extracto flavónico. En este sentido, resultados similares se han obtenido con otras fracciones de naturaleza flavónica aisladas de diferentes especies vegetales (ALARCON DE LA LASTRA et al., 1993, 1994).

IV.2.3.2. Ulcera gástrica aguda inducida por ligadura de píloro.

IV.2.3.2.1. Resultados

La administración oral del extracto AcOEt (62.5, 125 y 250 mg/mL) redujo significativamente la superficie ulcerada, observándose una relación dosis-efecto (13.87 ± 0.81 mm², 5.25 ± 1.60 y 2.04 ± 0.7 , mm²). Para el compuesto flavónico mayoritario, aislado de dicho extracto, 3-Galactosil Miricetina (25 mg/Kg), el IU obtenido fue de 4.20 ± 1.25 mm² (Tabla 13) (Fig. 14)

En todos los casos, con extracto y flavonoide, se aprecia una reducción notable en los valores de pepsina (11.94 ± 1.22 , 13.08 ± 0.45 y 14.57 ± 7.20 mg/mL) en relación al control (29.7 ± 2.3 mg/mL) (Tabla 14) (Fig 17); sin embargo, no modificaron el volumen de jugo gástrico ni los valores de acidez de forma estadísticamente significativa (Figs. 15 y 16).

Tabla 13. Efecto del Ext° ACOEt, 3-GM y Omeprazol sobre las lesiones y volumen de jugo gástrico en la úlcera aguda inducida por ligadura de piloro.

Tratamiento	Número animales	%EU	IU (mm ²)	Volumen jugo gástrico (mL)
Control	6	100	50.87±2.01	5.58±0.55
Omeprazol 10 mg/Kg	6	50	0.66±0.40 ++	5.55±0.20 n.s.
Ext° ACOEt 62.5 mg/Kg	6	100	13.87±0.81 +	6.10±0.09 n.s.
Ext° ACOEt 125 mg/Kg	6	83.3	5.25±1.60 ++	6.91±0.13 *
Ext° ACOEt 250 mg/Kg	6	66.6	2.04±0.7 ++	7.56±0.52 *
3-Galactosil Miricetina 25 mg/Kg.	6	100	4.20±1.25 ++	7.62±0.47 *

Test "U"-Mann Whitney : + p<0.05, ++ p<0.01, ns no significativo

Test "t"-Student: * p< 0.05, ns no significativo

% EU= Porcentaje de estómagos ulcerados

IU= Índice de ulceración

Figura 14. Efecto del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre la úlcera gástrica aguda inducida por ligadura de píloro (IU).

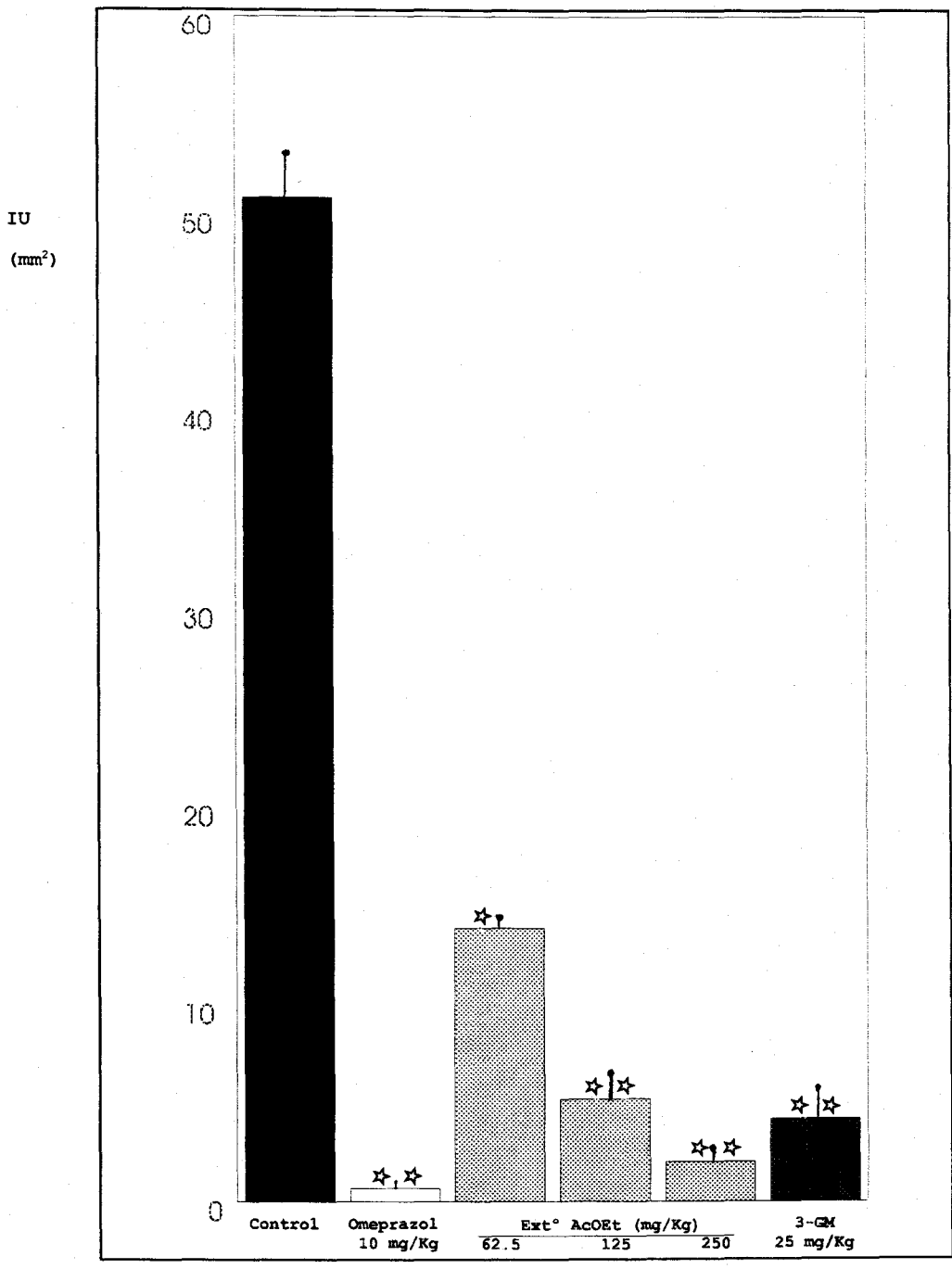


Figura 15 .Efecto del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre el volumen de jugo gástrico en la úlcera aguda inducida por ligadura de píloro.

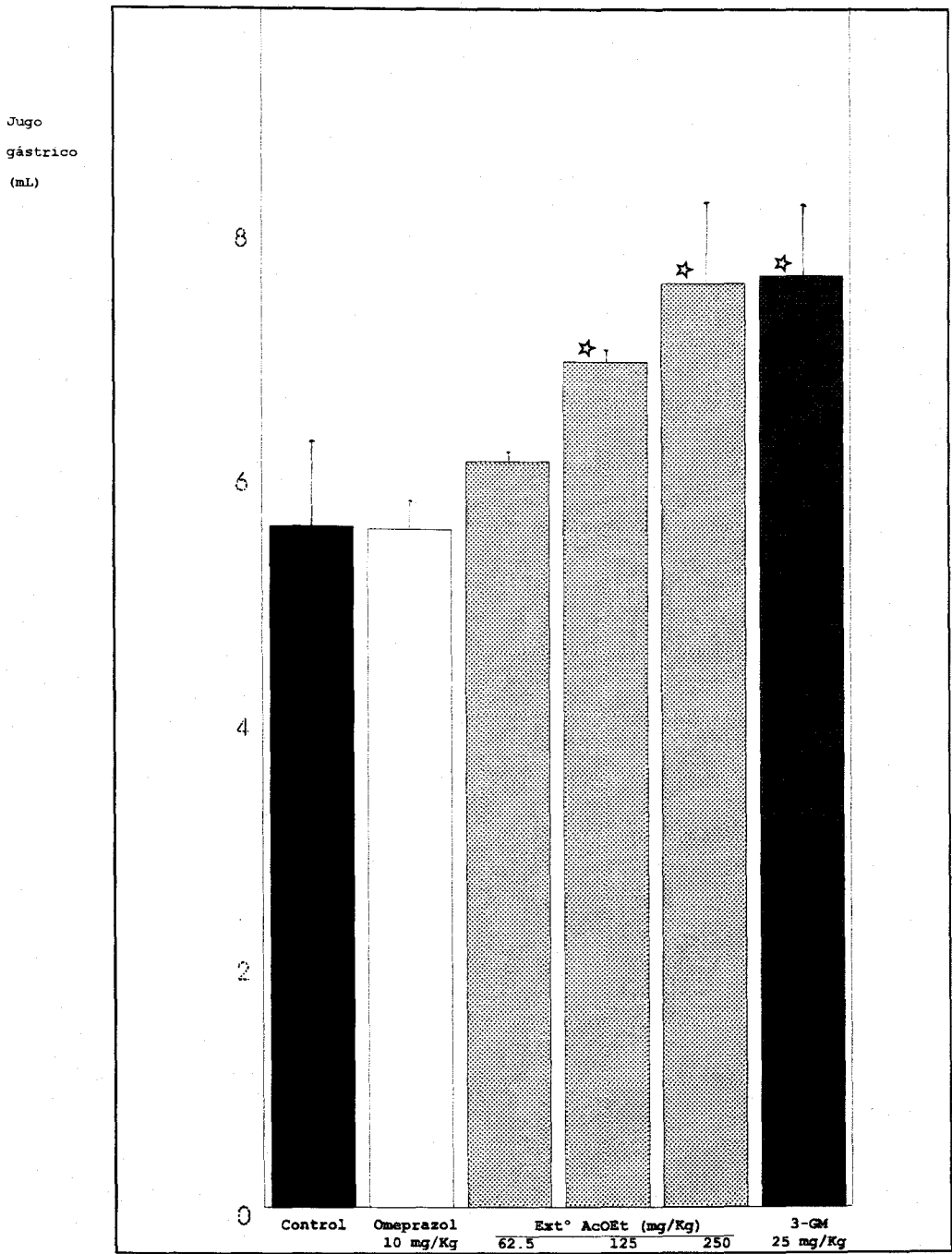


Tabla 14. Efectos del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre la acidez y secreción de pepsina en la úlcera gástrica aguda inducida por ligadura de píloro.

Tratamiento	Número animales	Acidez total (mEq/L)	Pepsina (mg/mL)
Control	6	44.20±0.75	29.70±2.30
Omeprazol 10mg/Kg	6	21.80±0.35 *	15.00±0.90 *
Ext° AcOEt 62.5 mg/Kg	6	38.10±0.20 n.s.	11.94±1.22 *
Ext° AcOEt 125 mg/Kg	6	39.10±0.73 n.s.	13.08±0.45 *
Ext° AcOEt 250 mg/Kg	6	29.01±0.48 n.s.	14.57±0.72 *
3-Galactosil Miricetina	6	30.94±0.92 n.s.	15.59±1.11 *

Test "t"-Student: * p< 0.05, ns no significativo

Figura 16. Efecto del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre la acidez del jugo gástrico en la úlcera aguda inducida por ligadura de píloro.

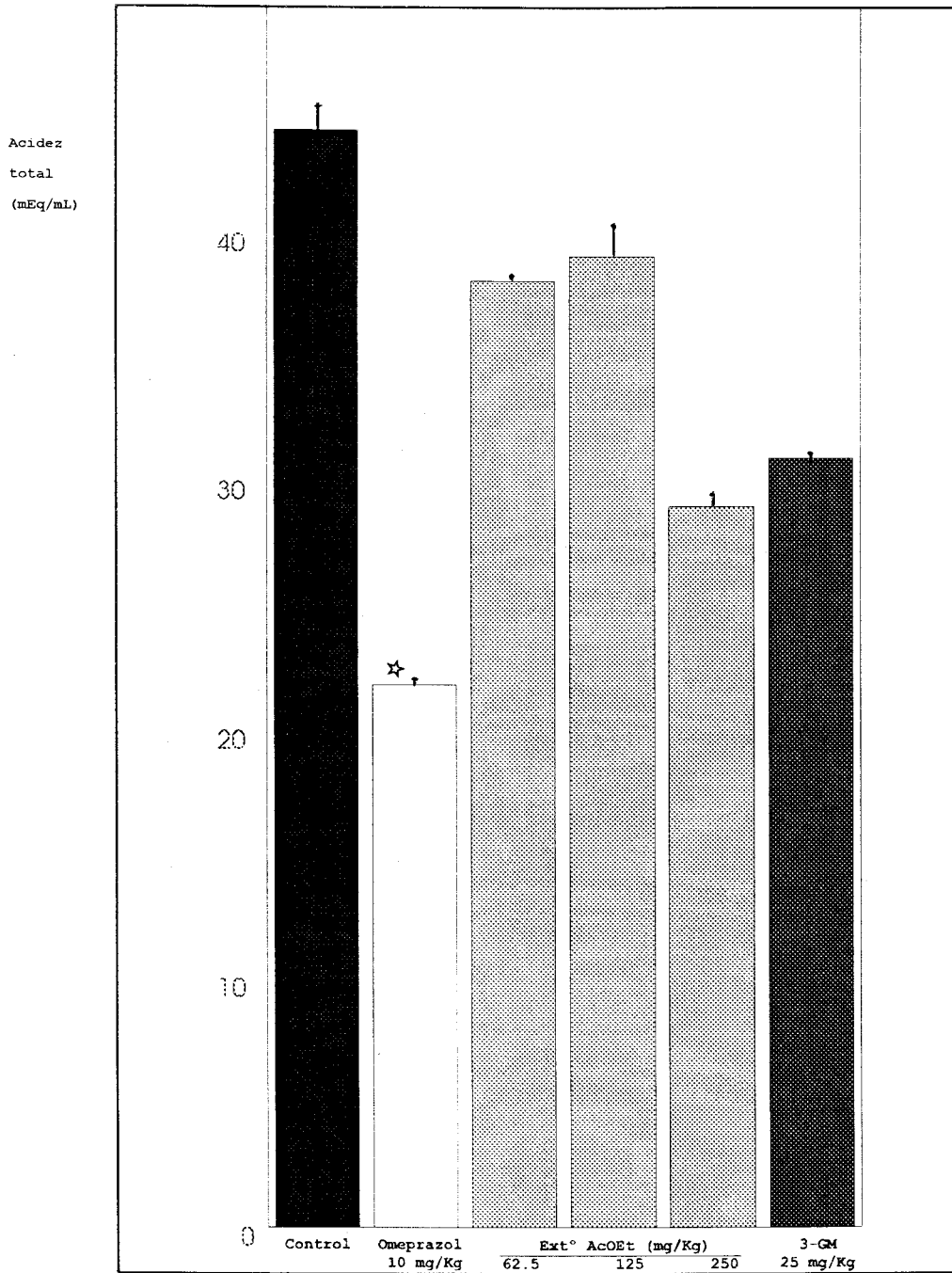
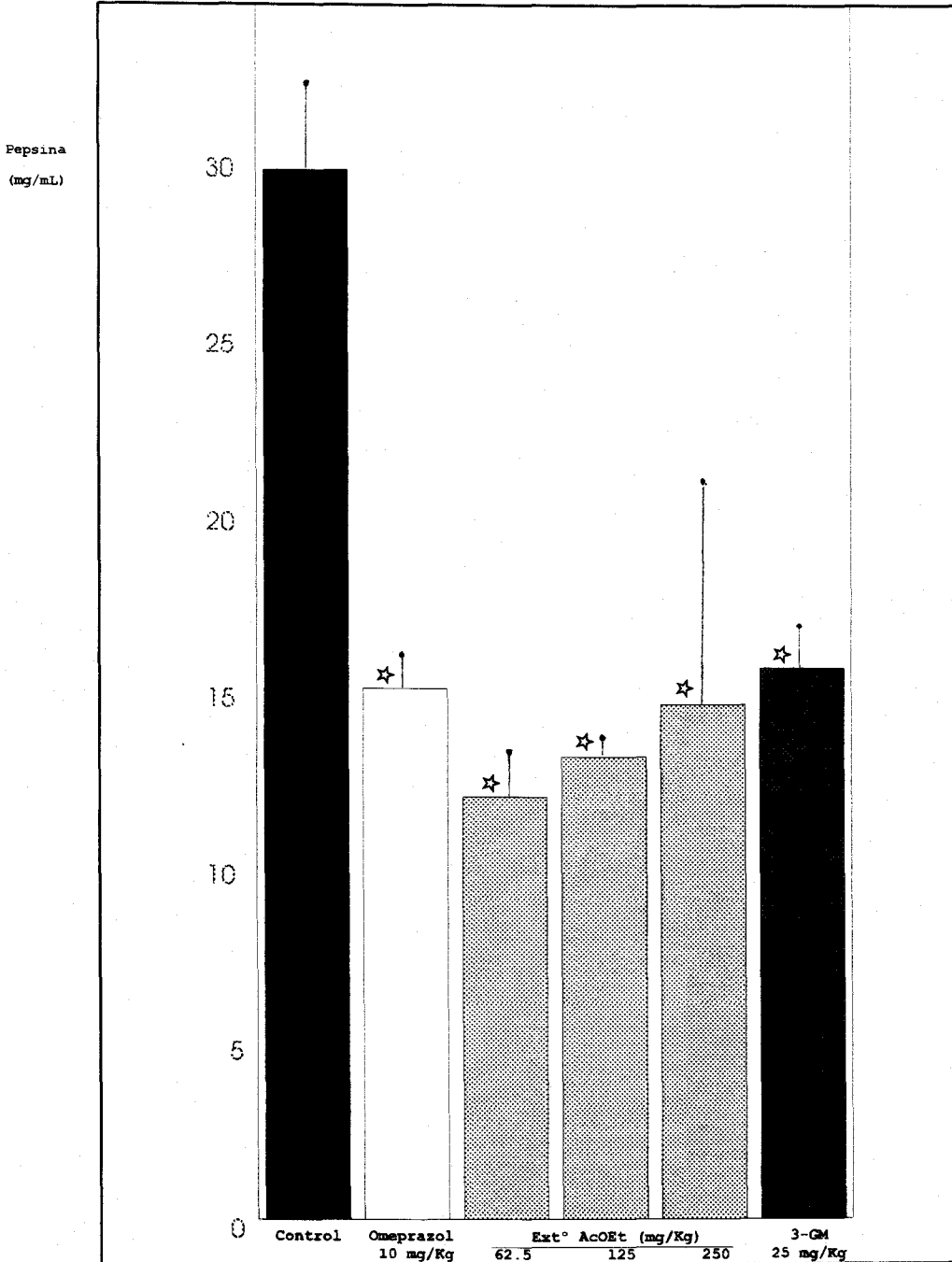


Figura 17. Efecto del Ext° AcOEt, 3-GM y Omeprazol sobre el contenido en pepsina en la úlcera aguda inducida por ligadura de píloro.



IV.2.3.2.2. Discusión de resultados

En el método de Shay, los mecanismos implicados en la producción de las lesiones son, entre otros, la autodigestión y distensión de la mucosa por el contenido gástrico como consecuencia de la ligadura, las alteraciones vasomotoras causadas directamente por el trauma pilórico y el incremento, tanto de la actividad vagal que conduce a una hiperclorhidria como de la desgranulación mastocitaria (BRODIE, 1966). Por todo ello, este modelo experimental es útil para investigar elementos ulcógenos tan relevantes como la secreción de ácidos y enzimas proteolíticas (pepsina). De éstos, el ácido tiene mayor importancia, ya que la actividad de las enzimas proteolíticas no deja de estar condicionada al pH del medio.

En este caso, el extracto AcOEt y el compuesto 3-Galactosil Miricetina, 3-GM, presentan actividad antiulcerosa que no parece ser debida a mecanismos dependientes de la secreción gástrica, ya que no viene acompañada de una reducción paralela de la acidez gástrica ni del volumen de jugo gástrico.

IV.2.3.3. Úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto

IV.2.3.3.1.- Resultados

Los valores obtenidos para el efecto protector del Ext^o AcOEt sobre la lesión gástrica inducida por etanol absoluto se muestran en la Tabla 15. La ingestión de 1 mL de alcohol absoluto en los animales que recibieron tratamiento, no indujo efectos ulcerativos de cuantía tras el pretratamiento con las dosis superiores del extracto (125, 250 mg/Kg) ni con el fármaco de referencia, consiguiéndose unos índices de ulceración de $112.48 \pm 20.81 \text{ mm}^2$, 95.40 ± 16.72 y $52.77 \pm 13.00 \text{ mm}^2$, respectivamente (Fig. 18).

Los grupos tratados no aumentaron la cantidad de moco gástrico significativamente (0.57 ± 0.95 , 0.51 ± 1.40 y 0.45 ± 0.03 , g), ni la concentración total de hexosaminas (59.04 ± 4.09 , 60.02 ± 4.13 y 63.76 ± 3.21 , $\mu\text{g/mL}$) del mismo, en comparación con el control (0.55 ± 0.18 g y $66.97 \pm 3.50 \mu\text{g/mL}$). No obstante, hubo un aumento en la concentración de proteínas en todos los grupos que recibieron tratamiento (Tabla 15) (Figs. 19, 20 y 21).

Tabla 15 . Efecto del Ext° AcOEt y Carbenoxolona sobre las lesiones gástricas, secreción de moco y su contenido glicoproteico en la úlcera aguda inducida por etanol absoluto.

Trata- miento	Número animales	IU (mm ²)	Contenido moco (g)	Proteínas totales (mg/mL)	Hexosaminas (µg/mL)
Control	10	305.60±6.70	0.55±0.01	5.74±0.6	66.97±3.50
Carbenoxolona 80mg/Kg	10	52.77±1.30 ++	1.02±0.03 **	11.03±1.2 **	73.06±5.42 **
Ext° AcOEt 62.5 mg/Kg	6	198.98±2.08 n.s.	0.57±0.09 n.s.	7.86±0.53 *	59.04±4.09 n.s.
Ext° AcOEt 125 mg/Kg	6	112.48±2.08 +	0.51±0.14 n.s.	7.38±0.42 *	60.02±4.13 n.s.
Ext° AcOEt 250 mg/Kg	6	95.40±1.67 +	0.45±0.03 n.s.	7.93±0.31 *	63.76±3.21 n.s.

Test "U"-Mann Whitney : + p<0.05, ++ p<0.01, ns no significativo

Test "t"-Student: * p< 0.05, ** p<0.005, ns no significativo

IU: Índice de ulceración

Figura 18. Efecto del Ext° AcOEt sobre la úlcera provocada por etanol absoluto (IU).

IU
(mm²)

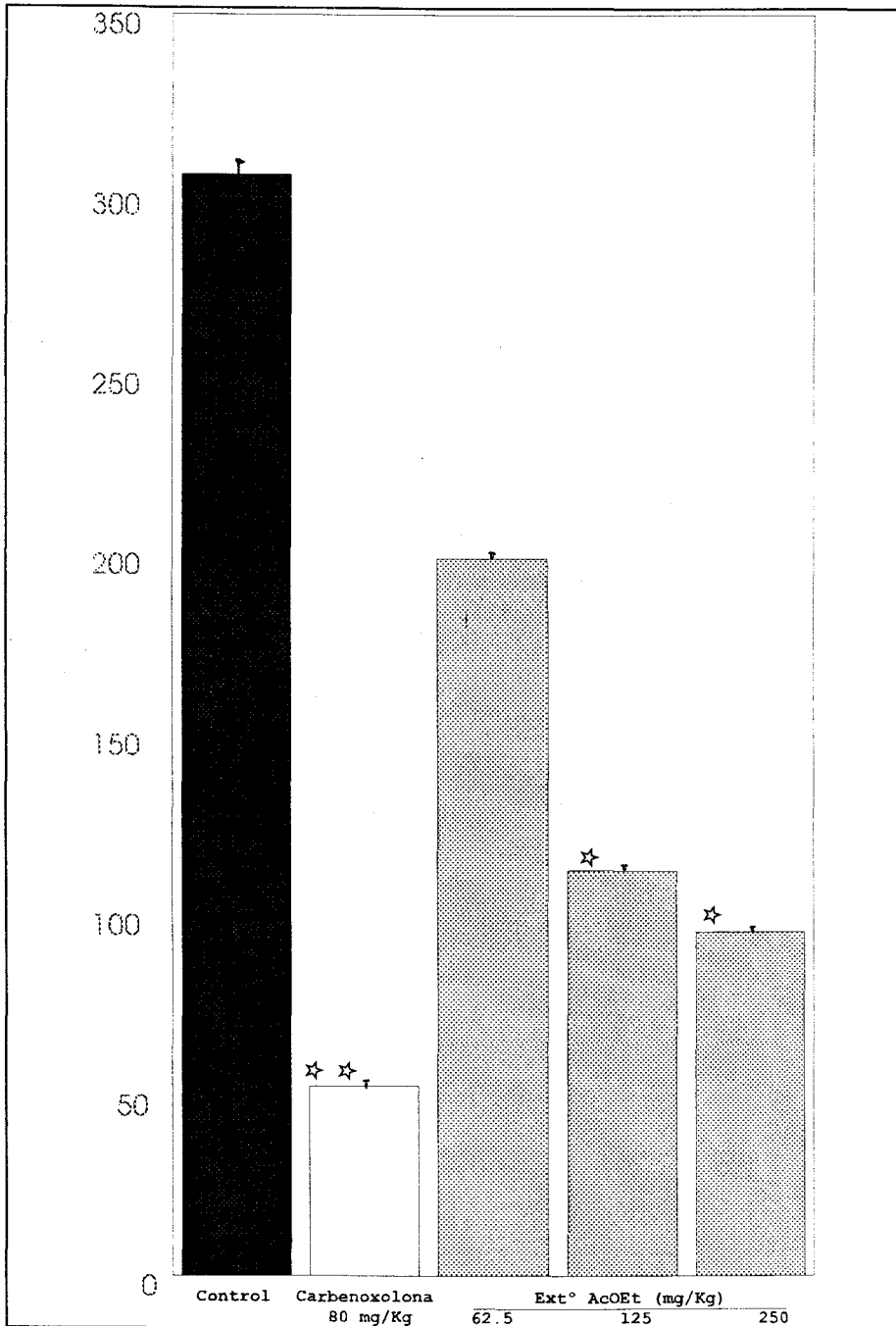


Figura 19. Efecto del Ext° AcOEt sobre el contenido en moco gástrico en la úlcera provocada por etanol absoluto.

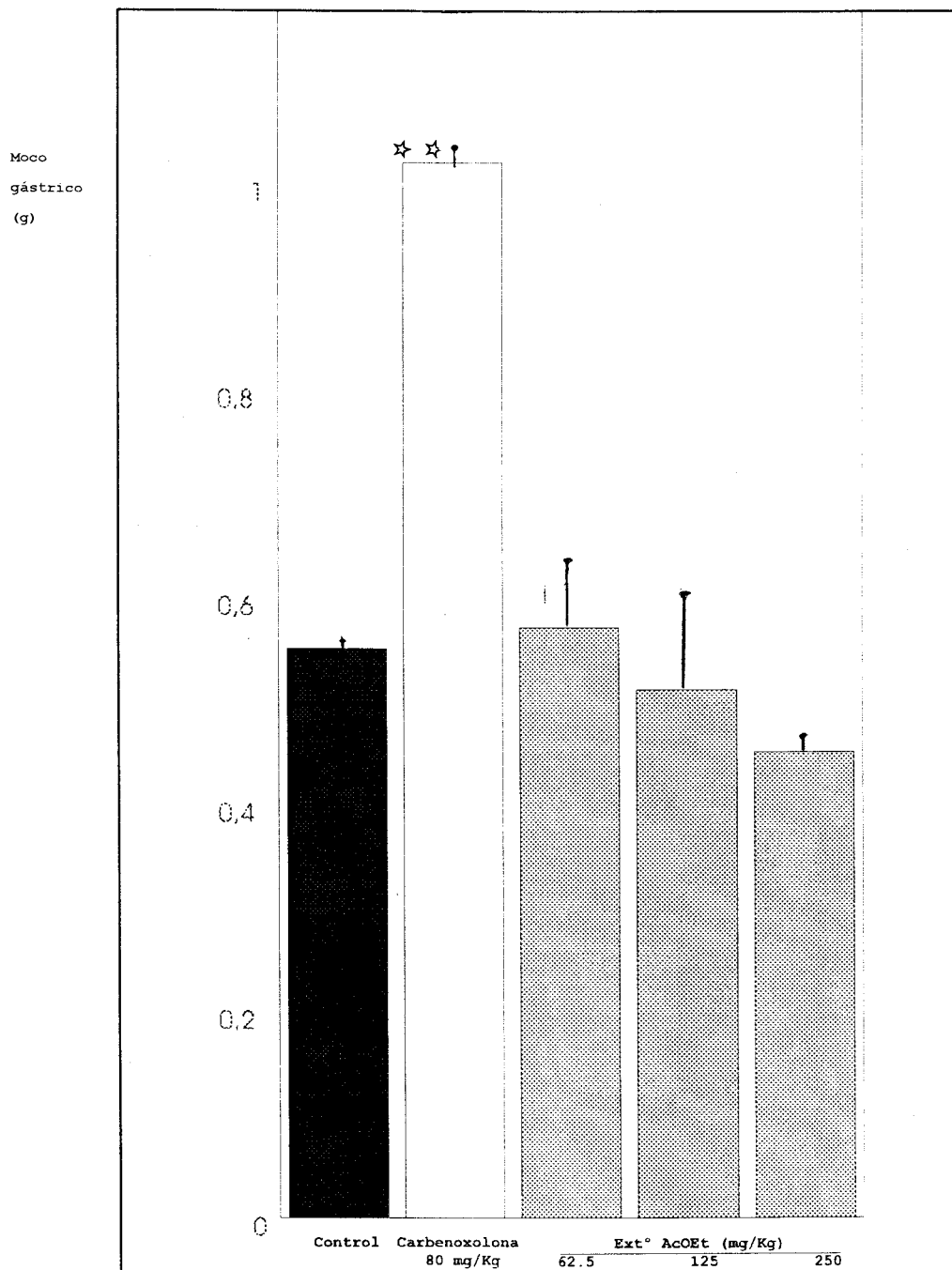


Figura 20. Efecto del Ext° AcOEt sobre el contenido en proteínas totales del moco gástrico en la úlcera provocada por etanol absoluto.

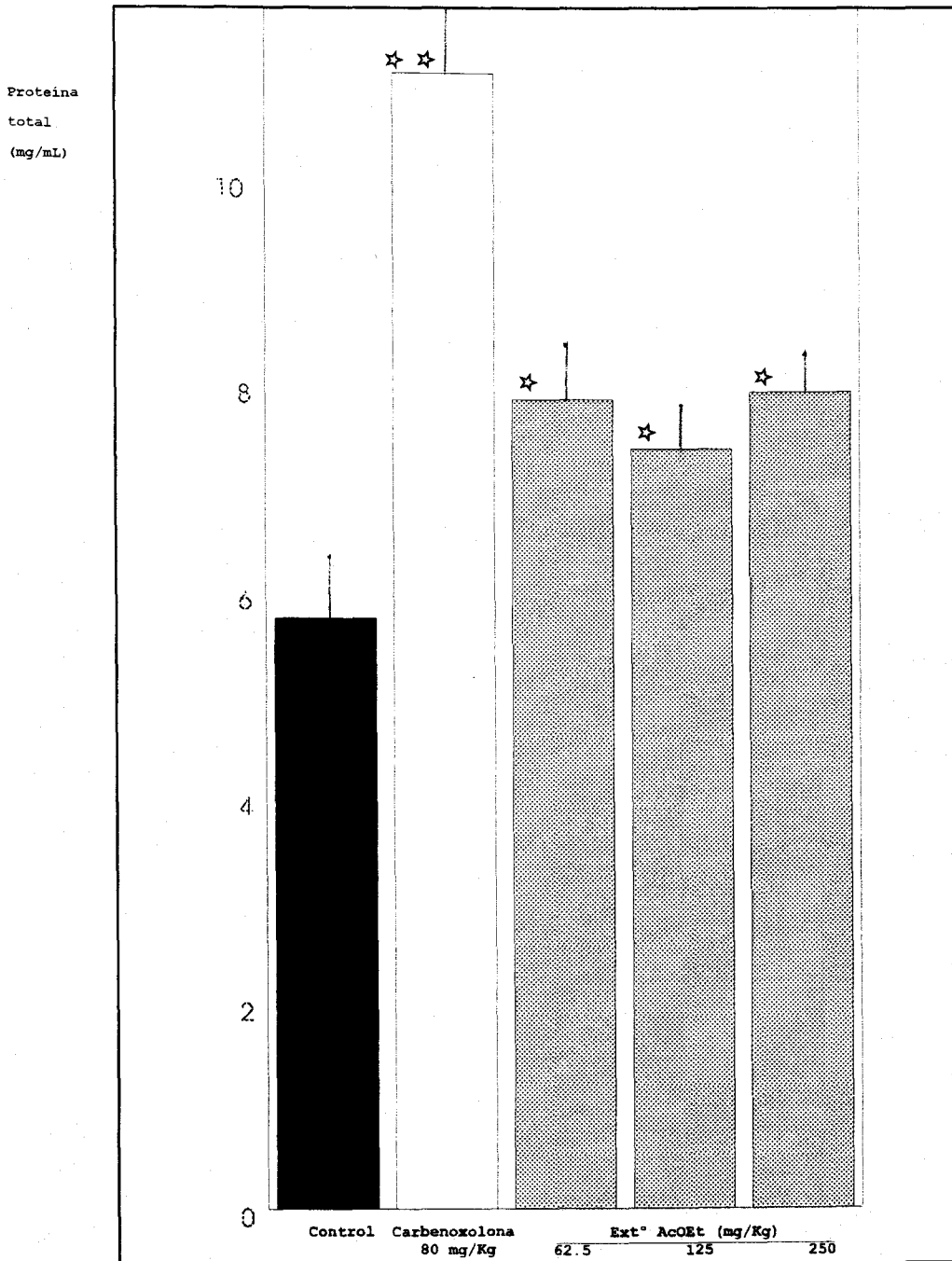
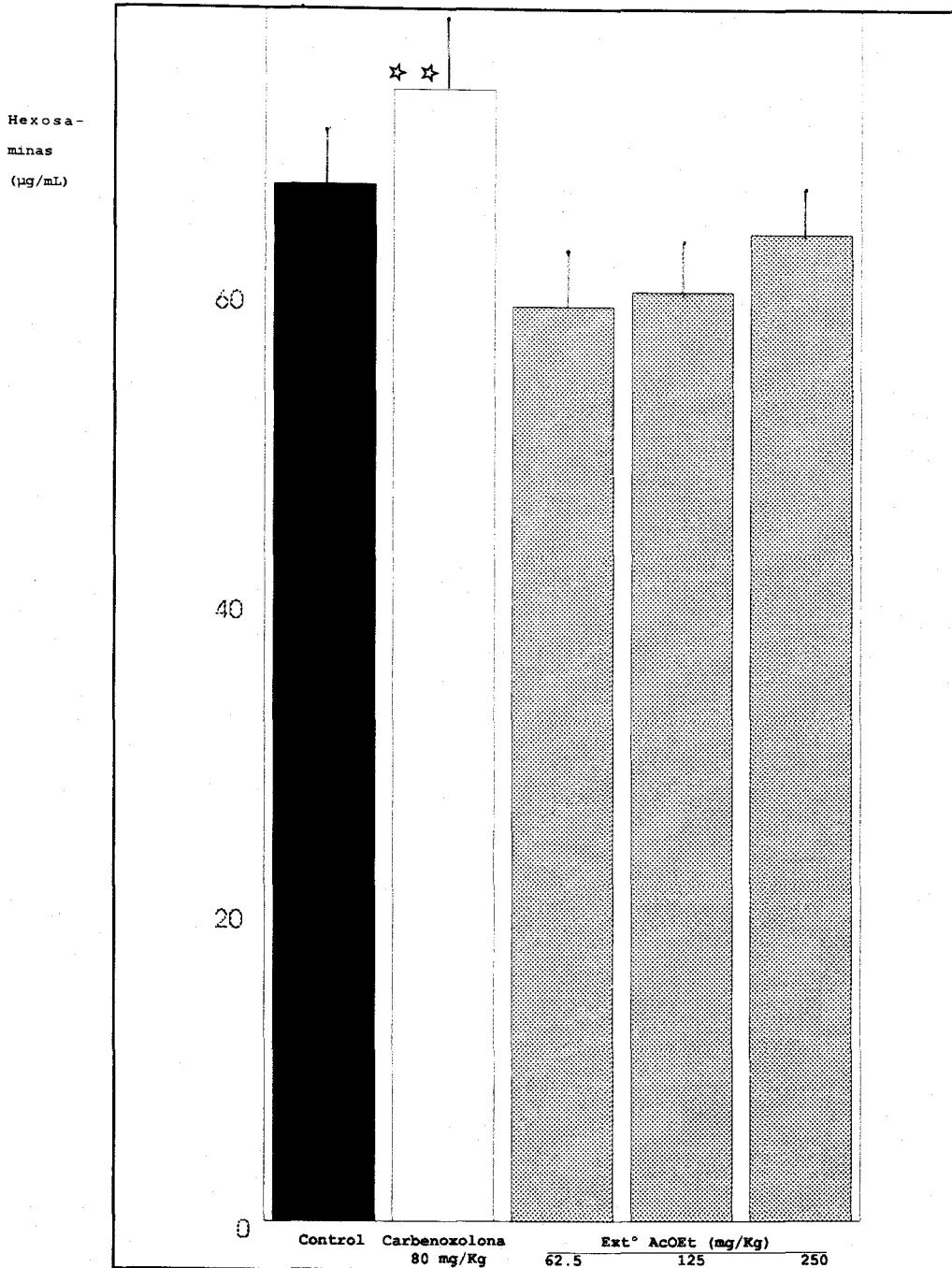


Figura 21. Efecto del Ext° AcOEt sobre el contenido en hexosaminas del moco gástrico en la úlcera provocada por etanol absoluto.



IV.2.3.3.2. Discusión de resultados

Al evaluar la acción antiulcerosa del extracto AcOEt frente al modelo de úlcera experimental inducida por la administración oral de etanol absoluto, se observa una clara actividad, ya que tras el pretratamiento con las dosis superiores ensayadas (125, 250 mg/Kg), se inhibe la ulceración de manera significativa. En este caso, los resultados obtenidos nos inclinan a descartar el prota-gonismo del moco gástrico en el mecanismo gastroprotector.

La aplicación tópica de etanol absoluto, ácidos, bases fuertes o soluciones hipertónicas, promueve lesiones severas con descamación de láminas enteras de células superficiales. Las lesiones pueden ser inducidas aparentemente por el efecto directo de penetración en el tejido estomacal y/o moduladas, indirectamente, por la liberación de productos vasoactivos de los masto-citos y otros tejidos o células sanguíneas (DATES et al., 1988). Estos ulcógenos incrementan la permeabilidad de la mucosa gastroduodenal a los iones y macromoléculas, aumentando la retrodifusión de hidrogeniones y la concentración luminal de sodio; el daño gástrico se hace entonces muy extenso y profundo (SZABO et al., 1990). La duración de la exposición repercute en la lesión de las células parietales y principales, descendiendo el flujo nutricio-mucoso; la isquemia resultante, induce a la acumulación de radicales libres de oxígeno (RLO) (GLAVIN et al., 1992).

IV.2.4.- Actividad sobre la permeabilidad vascular

IV.2.4.1.- Resultados

Los resultados obtenidos (Tabla 16) (Figs. 22 y 23) muestran el efecto de la administración de diferentes dosis del Ext^o AcOEt (62.5 a 500 mg/Kg) e Indometacina (5 mg/Kg) sobre el incremento de la permeabilidad vascular inducido por el mediador histamina (50 μ g). Los porcentajes de reducción o inhibición (47.1 ± 2.11 , 54.5 ± 1.92 y 84.0 ± 1.93) son superiores al del patrón utilizado (27.3 ± 1.41).

IV.2.4.2.- Discusión de resultados

En el ensayo sobre la permeabilidad vascular del extracto AcOEt se pone de manifiesto una marcada actividad, dosis-dependiente, frente al mediador proinflamatorio histamina; este efecto implica una mejora de la microcirculación en las alteraciones funcionales histaminérgicas, que podría contribuir al efecto antiulceroso de dicho extracto.

Tabla 16. Efecto del Ext^o AcOEt sobre el incremento de la permeabilidad vascular inducido por histamina.

Tratamiento	Número de animales	Azul de Evans (µg/mL)	%Inhibición
Control	10	8.81±0.26	0.0
Indometacina 5mg/Kg	5	6.40±0.12	27.3
Ext ^o AcOEt 62.5 mg/Kg	5	7.14±0.16 ***	18.7
Ext ^o AcOEt 125mg/Kg	5	4.67±0.19 ***	47.1
Ext ^o AcOEt 250mg/Kg	5	3.71±0.15 ***	54.5
Ext ^o AcOEt 500mg/Kg	5	1.42±0.17 ***	84.0

Test "t"-Student: * p< 0.05, ** p<0.005, ns no significativo

** p<0.001

Figura 22. Efecto del Ext° AcOEt sobre el incremento de la permeabilidad vascular inducido por histamina.
(Azul de Evans, mg/mL)

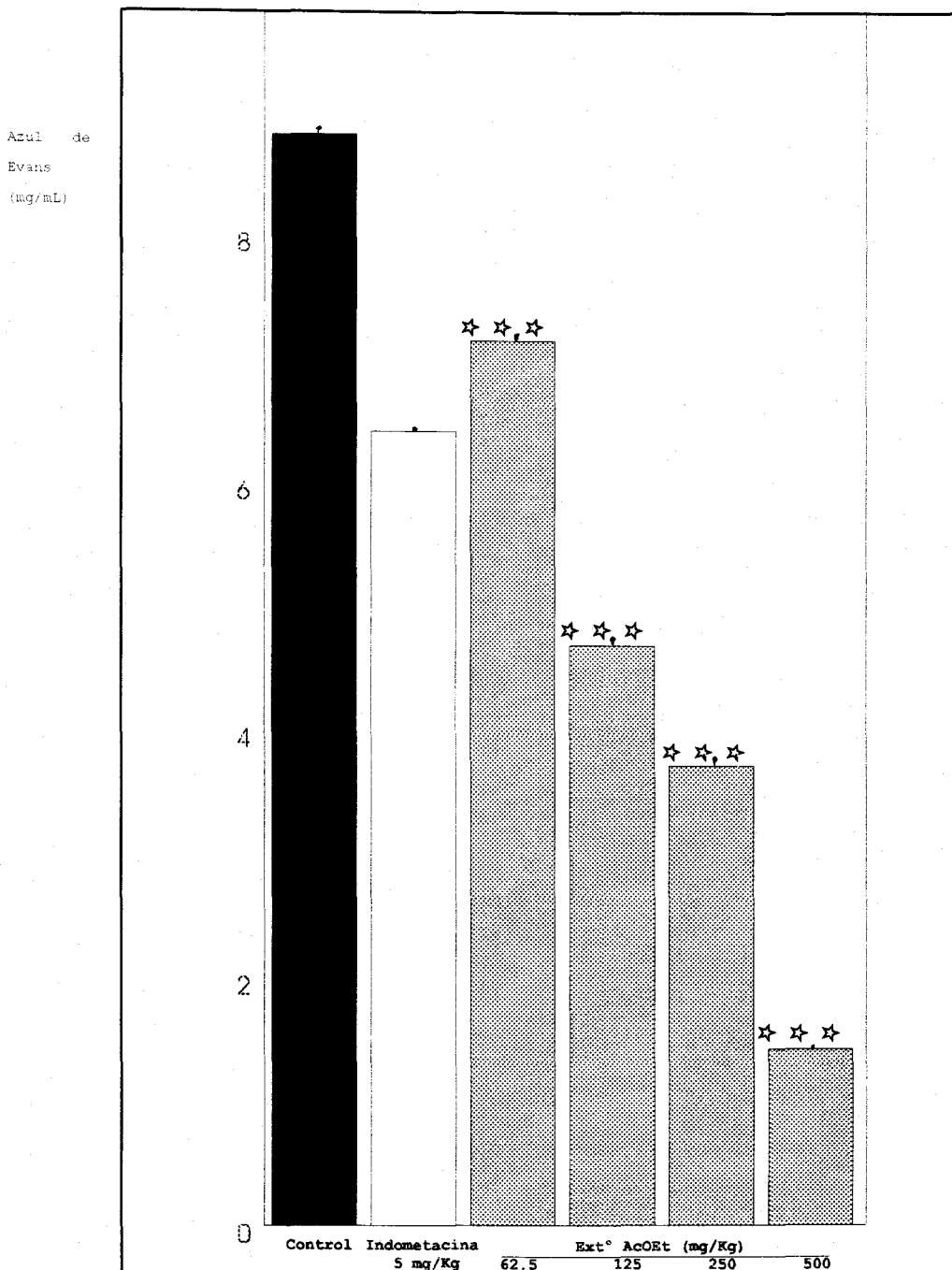
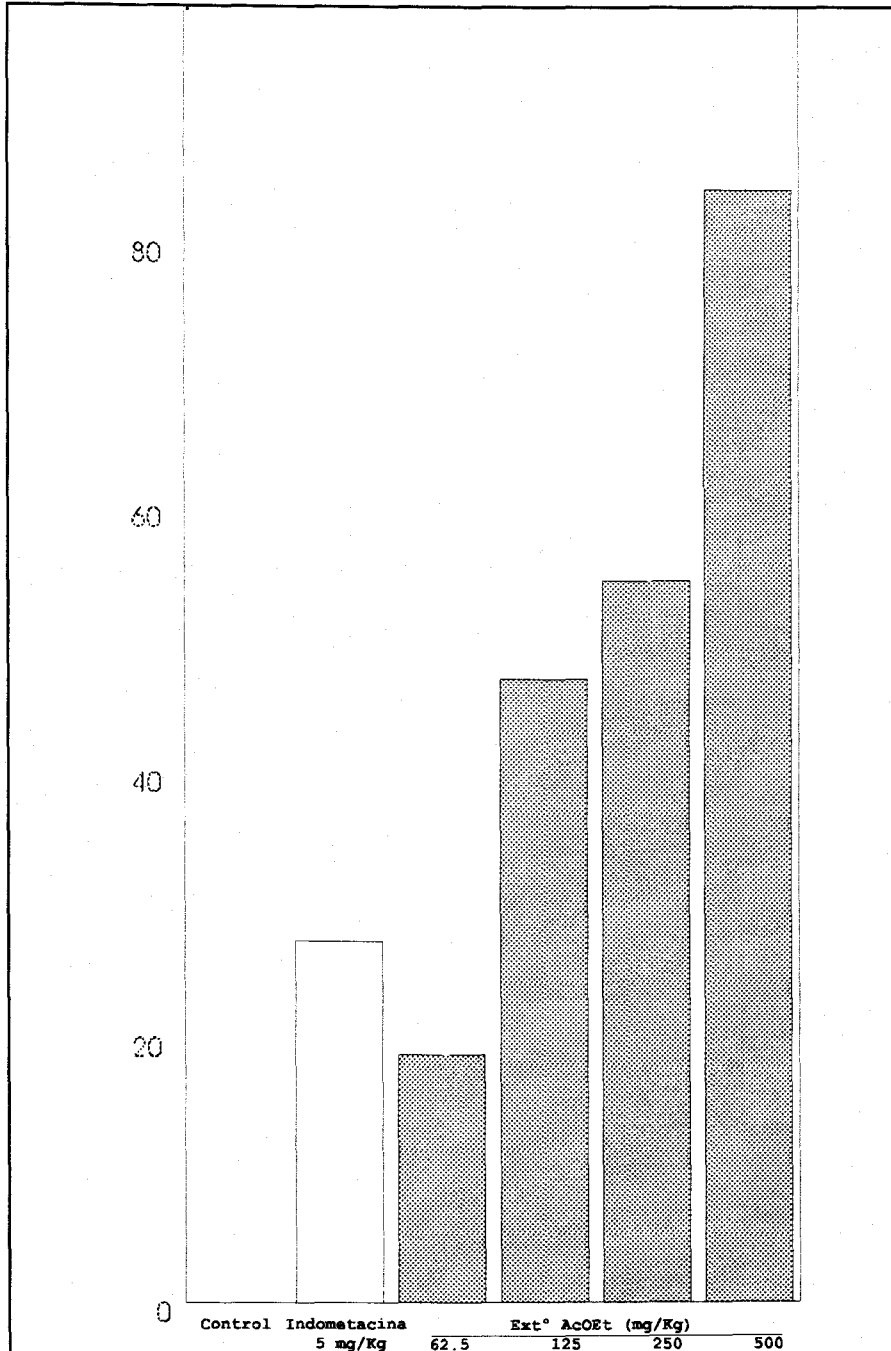


Figura 23. Efecto del Ext° AcOEt sobre el incremento de la permeabilidad vascular inducido por histamina. (% inhibición).

Inhibición



IV.2.5. Actividad sobre radicales libres

Es un hecho, que a nivel celular los RLO provocan alteraciones importantes que pueden desencadenar la muerte de la célula, ya que por su extrema reactividad atacan sus constituyentes fundamentales tales como ácidos nucleicos, proteínas o lípidos. También inducen la peroxidación de los lípidos de membrana lo que da origen a la formación de toda una serie de compuestos tóxicos, tales como epóxidos, aldehídos y nuevos radicales libres (DE LA CRUZ et al., 1990).

La heterogeneidad de las actividades antioxidantes de flavonoides han sido puestas de manifiesto en diferentes estudios (IIO et al., 1985), (FRAGA et al., 1987), (ROBAK et al., 1988), (MEUNIER et al., 1989), (GRUPE, 1991), (NEGRE-SALVAIRE et al., 1991) (LAMAISON et al., 1993). Comprobada la actividad antiulcerosa de nuestros extractos flavónicos, y dado que las lesiones ulcerosas se consideran como el resultado de la agresión de los radicales originados por los neutrófilos infiltrados en la mucosa digestiva (BARBERA, 1994), hemos valorado la actividad antirradicalaria determinando la concentración eficaz 50% (CE₅₀) frente a 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH).

IV.2.5.1.- Resultados

Para expresar los resultados, (Tabla 17) hemos aplicado la recta de regresión a los valores comprendidos entre 13 y 86%, calculando los valores medios (M_n) para el conjunto de las determinaciones de cada extracto, y las desviaciones standard correspondientes (δ_{n-1}), de manera que se aprecie la dispersión de los mismos.

La absorbancia de la solución de DPPH a la concentración de 6×10^{-5} , en metanol, fue 0,747.

La CE_{50} del extracto AcOEt resultó ser 7.03 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 17. Actividad antiradicalaria "in vitro" del Ext° AcOEt sobre DPPH.

Dosis $\mu\text{g/mL}$	DO			% Reducción DO	
				M_n	δ_{n-1}
20	0.049	0.049	0.050	93.40	0.07
18	0.053	0.054	0.056	92.73	0.20.
16	0.059	0.060	0.060	92.01	0.07.
14	0.100	0.101	0.102	86.48	0.13
12	0.117	0.118	0.118	84.25	0.08.
10	0.237	0.235	0.238	68.32	0.20.
8	0.304	0.302	0.302	59.48	0.16.
6	0.385	0.386	0.388	48.28	0.20.
4	0.506	0.504	0.502	32.53	0.27.
2	0.647	0.650	0.645	13.34	0.34.

DO = Densidad óptica de las diferentes muestras.

$$CE_{50} = 7.03 \mu\text{g/mL}$$

IV.2.5.2.- Discusión de resultados

El extracto AcOEt muestra una potente actividad anirradicalaria frente al DPPH, comparable a la del ácido ascórbico que, en las mismas condiciones, tiene una $CE_{50} = 2.7 \mu\text{g/mL}$ (LAMAISON et al. , 1988; 1993)

El contenido de este extracto en flavonoides, y especialmente en 3-galactosil-miricetina (componente mayoritario del mismo), puede justificar el resultado obtenido, ya que en flavonas y flavonoles, la actividad antiradicalaria se ve influenciada favorablemente por el doble enlace 2-3 y por los hidroxilos en 5 y 7 del anillo A, así como por el número de estos grupos sobre el núcleo B (anillo del cinamoil) (BAHORUN et al., 1994), no afectándose por la glicosilación de C₃ (CILLARD et al., 1988).

IV.3. EXTRACTO ETEREO

IV.3.1. Fraccionamiento cromatográfico

La separación de los diferentes componentes del extracto etéreo (10 g) se realizó por cromatografía en columna de gel de sílice (0.063-0.2 mm).

Los eluyentes utilizados han sido mezclas de acetato de etilo, metanol, agua (80/1/1) (80/5/5).

Se recogieron 137 fracciones de, aproximadamente, 15 mL cada una, que se agruparon de acuerdo a su comportamiento en CCF. El revelado se realizó con Oleum y solución de AlCl_3 . Esta cromatografía general se resume en la Tabla 18 y la hemos denominado columna B.

Tabla 18. Fraccionamiento cromatográfico del Ext° Etéreo.

Columna B

FRACCIONES	ELUYENTES	OBSERVACIONES
1-26	AcOEt/MetOH/H ₂ O (80:1:1)	Mezclas
27-43	"	Mezclas
44-69	"	Mezclas
70-84	AcOEt/MetOH/H ₂ O (80.5:5:5)	Mezclas
85-137	"	Mezclas

Las fracciones 27-43 (1.7g), por su riqueza en flavonoides, fueron recromatografiadas en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente cloroformo/metanol de polaridad creciente. Se recogieron 192 fracciones cuyos resultados figuran en la Tabla 19, denominada columna B₁.

Las cromatografías correspondientes en capa fina pusieron de manifiesto en las fracciones 41-70 la presencia de un solo compuesto "M₂" y en las fracciones 84-120 otro que llamamos "M₃".

Reunidas las fracciones 41-70 y 84-120 de la columna B₁, se llevaron a pequeño volumen dejándose a la temperatura ambiente. Al cabo de un tiempo se obtuvieron en ambos casos cristales amarillos, correspondientes a los productos puros denominados "M₂" y "M₃".

Tabla 19. Fraccionamiento cromatográfico del Ext° Etéreo

Columna B1

FRACCIONES	ELUYENTES	OBSERVACIONES
1-40	HCCl ₃ /MetOH (9:1)	Mezclas
41-70	"	M ₂
71-83	"	Mezclas M ₂ +M ₃
84-120	"	M ₃
121-192	HCCl ₃ /MetOH (8:2)	M ₃ +Mezclas

IV.3.2. Identificación del compuesto M₂

IV.3.2.1. Resultados

El compuesto "M₂" cristaliza en la mezcla cloroformo/metanol (fracciones 41-70) y da positiva la prueba de SHINODA (1928). Realizamos su identificación por espectroscopía UV, ¹H-RMN y EM.

UV	λ máx. (nm):
MeOH	371, 296, 255
NaOMe	330 _{desc} , 243
NaOAc	390, 272
NaOAc/H ₃ BO ₃	387, 303 _{sh} , 259
AlCl ₃	453, 270
AlCl ₃ /HCl	429, 361, 301 _{sh} , 265

¹ H-RMN	(ppm), (200 MHz, MeOD):
6.17	(1H, s, H-6)
6.38	(1H, s, H-8)
6.89	(1H, dd, J=8.7, H-5')
7.42	(1H, dd, J=8.7, H-6')
7.72	(1H, dd, J=0, H-2')

EM m/z (%):

302 M⁺

IV.3.2.2.- Discusión de resultados

El espectro UV del compuesto "M₂" (Fig.25) presenta máximos de absorción a $\lambda_{\text{máx}}$ de 371 y 255 nm, correspondientes a un flavonol.

Los cambios experimentados en la absorción con MeONa, medidos inmediatamente y después de intervalos diferentes de tiempo, indican la presencia de agrupamiento álcali sensible (3,3',4' hidroxilos libres).

La adición de AcONa, AcONa/BO₃H₃, Cl₃Al y Cl₃/ClH según MABRY et al. (1970) nos permiten deducir la existencia de hidroxilos libres en C₇ y C₅

Las señales del espectro ¹H-RMN del compuesto "M₂" en metanol (Fig. 26) corresponden a cinco protones aromáticos en posiciones 2', 5', 6', 6 y 8 del anillo flavonoide.

Por otra parte, los espectros de masas obtenidos mediante impacto electrónico (EI) y por ionización química (CI) (Figs. 27 y 28) nos revelaron un PM de 302 para dicho compuesto.

Todos estos resultados identificaban al compuesto "M₂" con el flavonoide 3,5,7,3',4' hidroxiflavona o quercetina, descrito con anterioridad para esta especie por AUMENTE (et al., 1988).

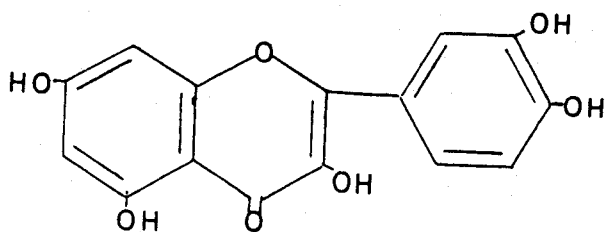


Figura 24. 3,5,7,3',4' hidroxiflavona o quercetina.

Figura 25. Espectro UV del compuesto M₂

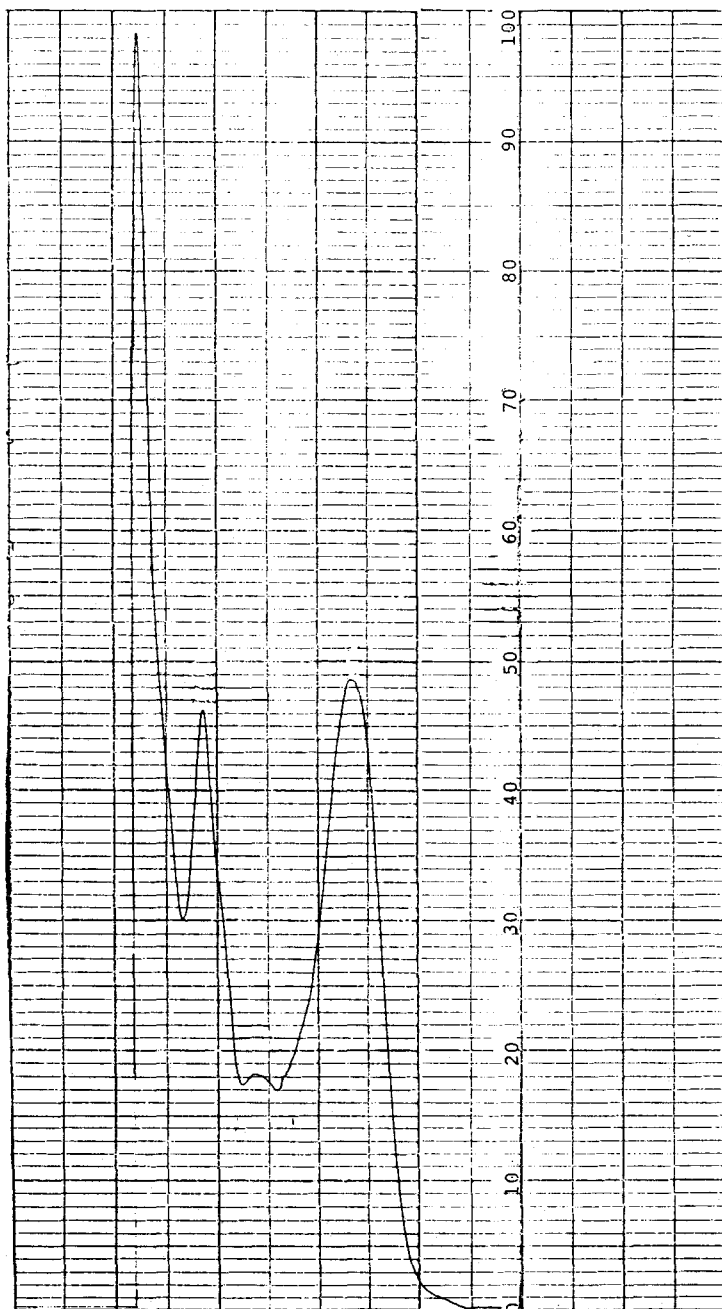


Figura 26. Espectro de ^1H -RMN del compuesto M_2

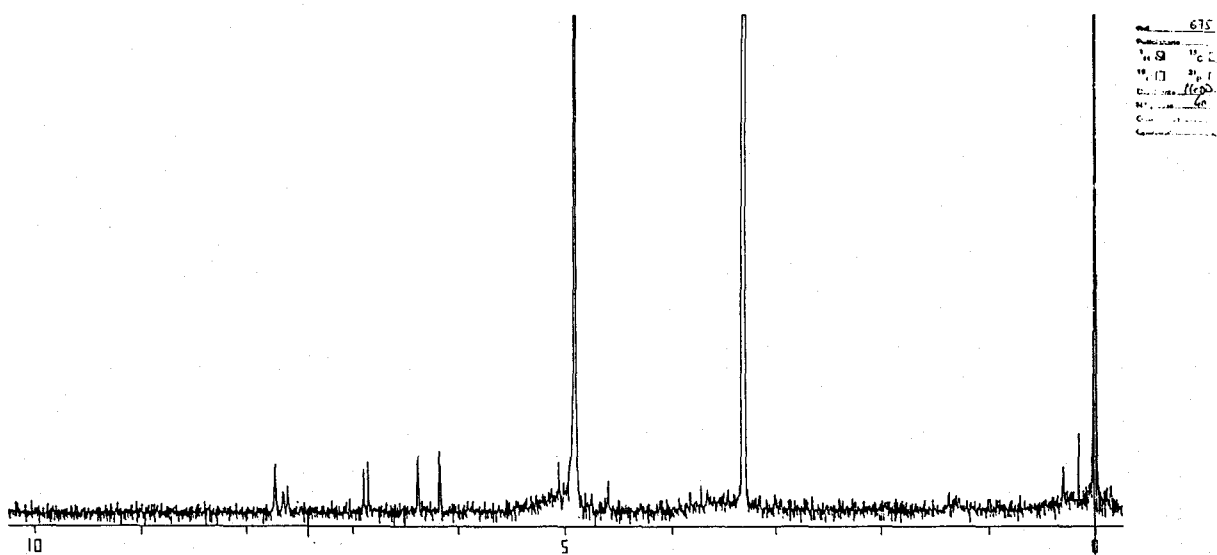


Figura 27. Espectro de Masas (EI) del compuesto M₂

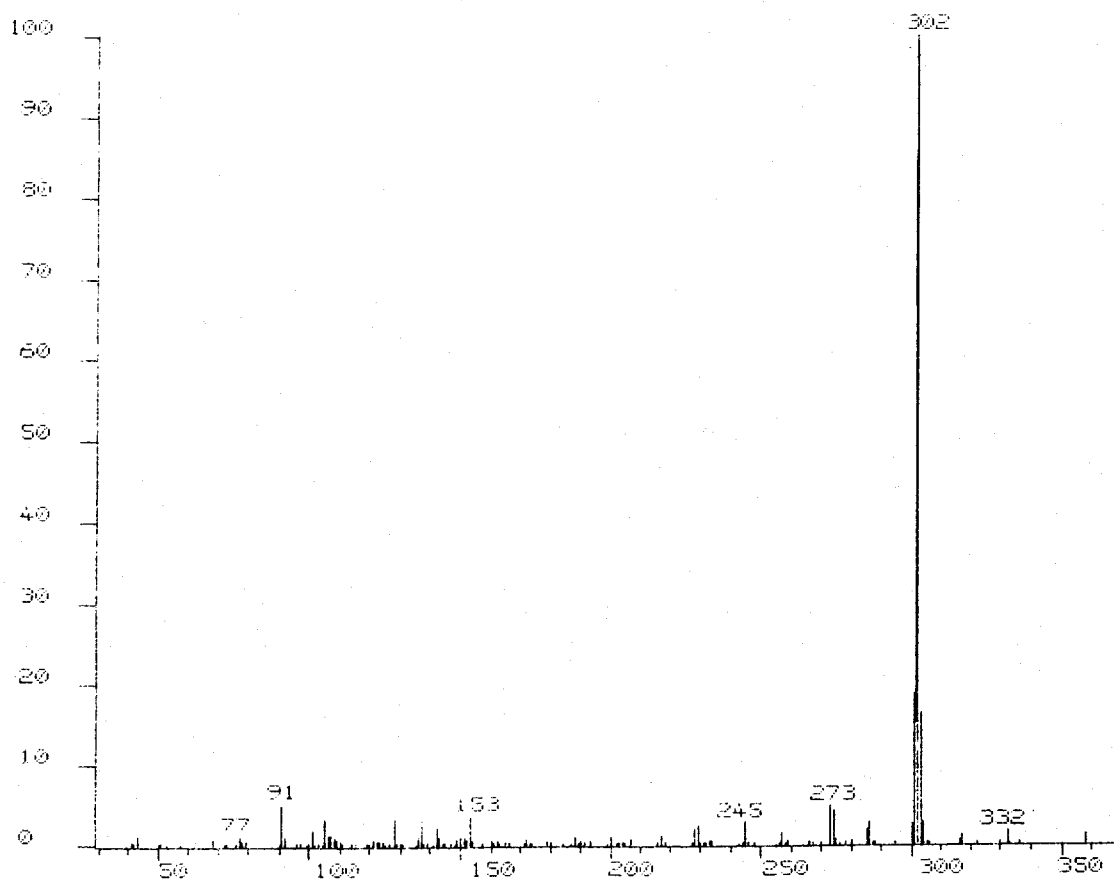
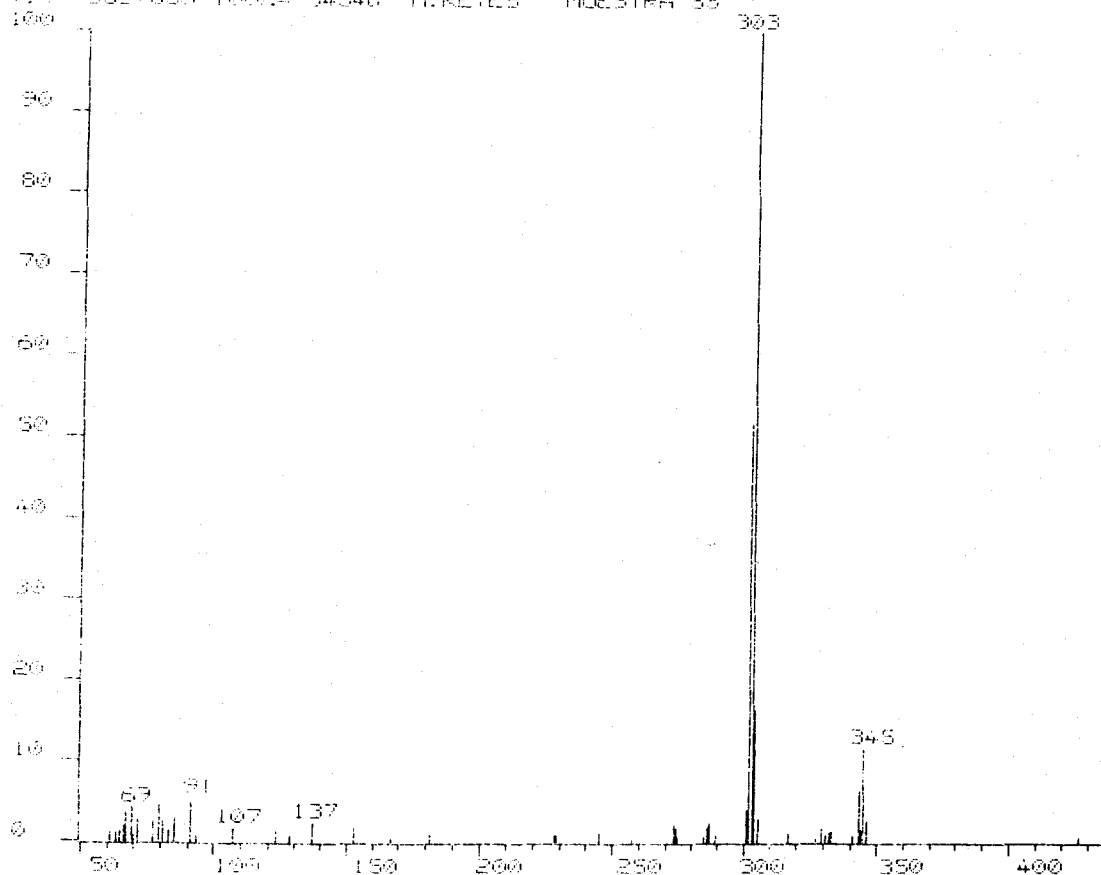


Figura 28. Espectro de Masas (CI) del compuesto M₂

IC50 / IMPC10081.55 R1= 04:18 +CI LRF 11/24/91.12:54
TIME 3637856 TIME= 54848 M.REYES MUESTRA 55



IV.3.3. Identificación del compuesto M₃

IV.3.3.1. Resultados

Este compuesto se obtiene de las fracciones 84-120 de la columna B, procedente del extracto etéreo.

El compuesto cristalizado, de color amarillo, dió positiva la prueba de SHINODA (1928). Se identificó por espectroscopía UV, ¹H-RMN y EM.

UV	λ máx. (nm) :
MeOH	376, 260, 252
NaOMe	320 _{desc} , 285
NaOAc	334 _{desc} , 327, 269
NaOAc/H ₃ BO ₃	390, 330, 280
AlCl ₃	450, 310, 269
AlCl ₃ /HCl	431, 360, 310, 266

¹ H-RMN	(ppm), (200 MHz, MeOD) :
6.17	(1H, d, J=1.9, H-6)
6.37	(1H, d, J=1.9, H-8)
7.33	(2H, s, J=2' y H-6')

EM m/z (%) :

318 M⁺

IV.3.3.2.- Discusión de resultados

El espectro UV del compuesto M_3 (Fig.30) presenta máximos de absorción a $\lambda_{\text{máx}}$ de 376 y 252 nm, característicos de un flavonol.

La adición de los reactivos MeONa, AcONa, AcONa/H₃BO₃, Cl₃Al y Cl₃Al/HCl según MABRY et al. (1970) nos pone de manifiesto -OH libres en C₃, C₅, C₇, C_{3'}, C_{4'}, C_{5'}.

Las señales del espectro ¹H-RMN del compuesto M_3 en metanol (Fig. 31) corresponden a cuatro protones aromáticos en 6, 8, 2' y 6'.

Los espectros de masas obtenidos mediante impacto electrónico (EI) y por ionización química (CI) (Figs. 32 y 33) revelaron un Pm de 318 para dicho compuesto.

Por todos estos resultados obtenidos se puede deducir, consultada la bibliografía, que la estructura del compuesto corresponde a 3,5,7,3',4',5' hidroxiflavona o miricetina, descrito anteriormente para esta especie por AUMENTE et al.(1988).

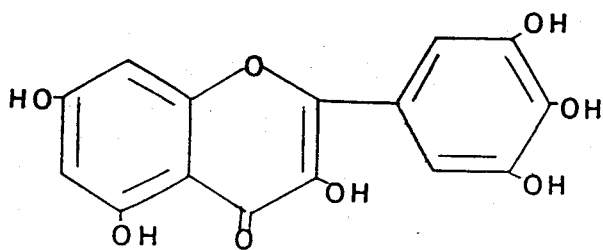


Figura 29. 5, 7, 3',4',5' hidroxiflavona o miricetina

Figura 30. Espectro UV del compuesto M₃

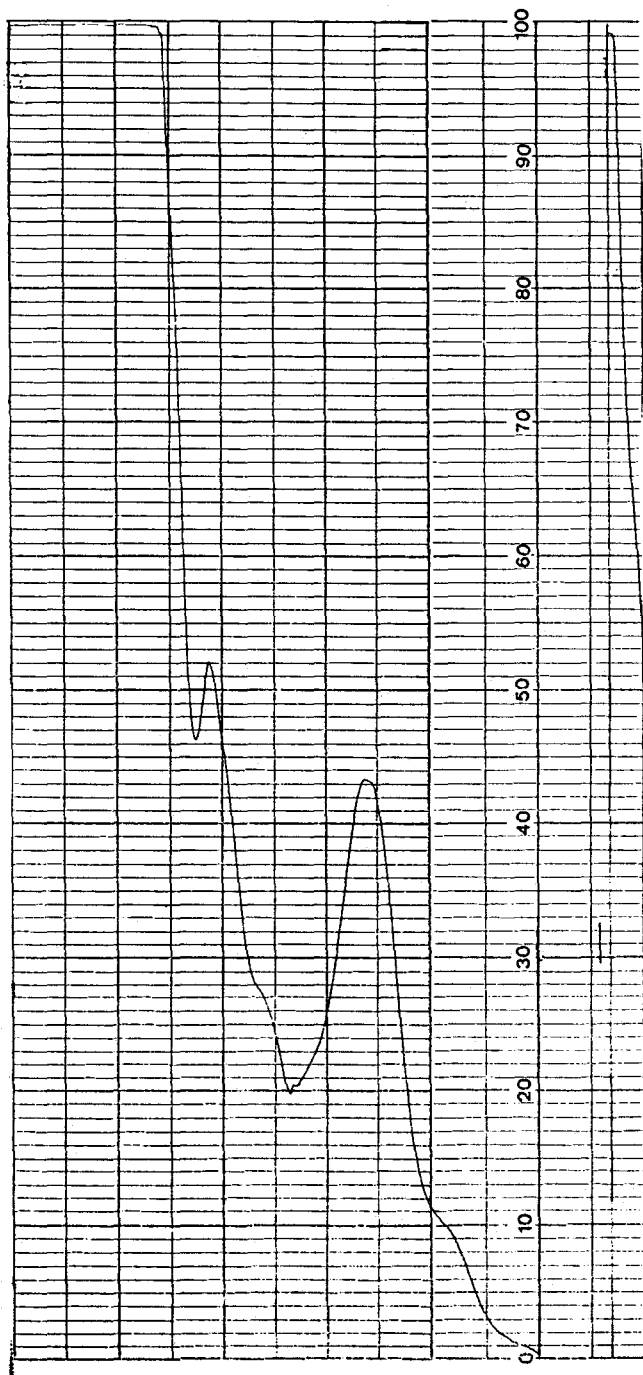


Figura 31. Espectro de ^1H -RMN del compuesto M_3

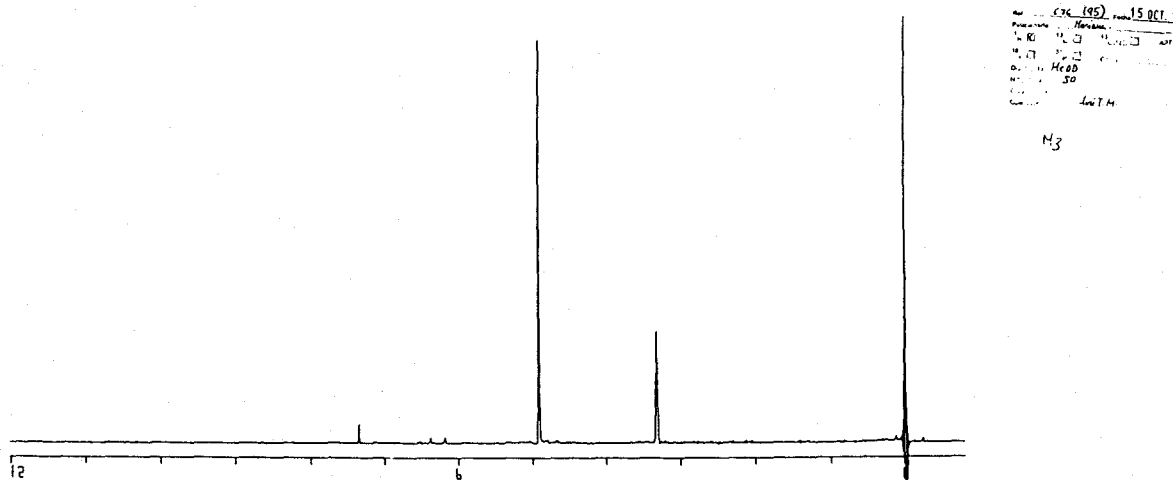


Figura 32. Espectro de Masas (EI) del compuesto M₃

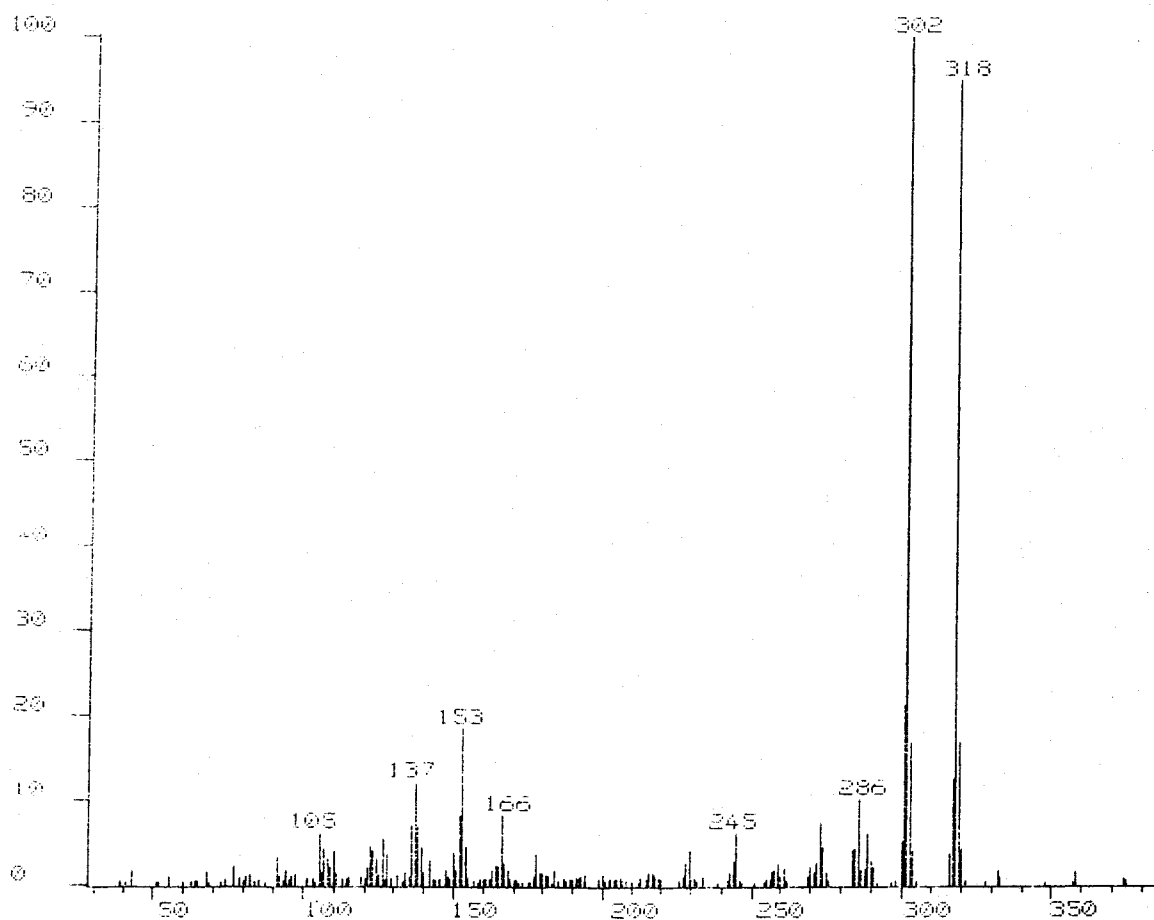
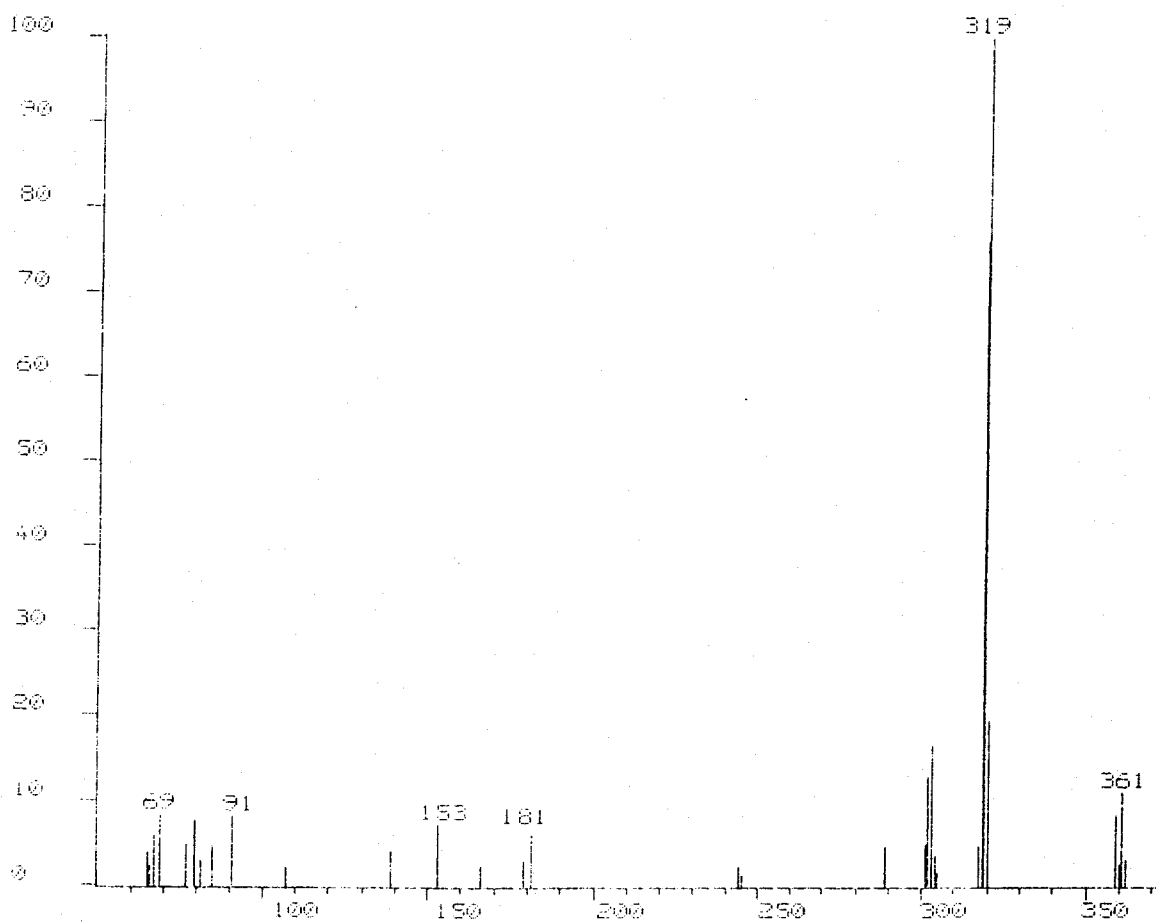


Figura 33. Espectro de Masas (CI) del compuesto M₃



IV.3.4. Actividad antiulcerosa gástrica

IV.3.4.1. Úlcera gástrica aguda inducida por inmovilización y frío

IV.3.4.1.1. Resultados

En este modelo experimental los animales tratados con el extracto flavónico etéreo presentaron una marcada reducción en la incidencia y severidad de las lesiones, disminuyendo estadísticamente los índices de ulceración (0.75 ± 0.28 , 0.70 ± 0.48 y $0.62 \pm 0.32 \text{ mm}^2$) con respecto al control ($39,16 \pm 6.24 \text{ mm}^2$), si bien no se observó una clara relación dosis-efecto. Estos valores fueron ligeramente superiores a los conseguidos tras la administración de Omeprazol. Con respecto al porcentaje total de estómagos ulcerados (% EU) no se apreciaron diferencias entre los grupos de animales que recibieron tratamiento (Tabla 20) (Figs. 34 y 35).

En relación a la secreción de moco gástrico, no se observaron incrementos notables en todos los tratamientos ensayados; sin embargo, sí se apreció un significativo aumento en la concentración de proteínas totales (1.33 ± 0.22 , 1.34 ± 0.39 y $1.54 \pm 0.10 \text{ mg/mL}$) y hexosaminas (51.73 ± 6.76 , 80.71 ± 2.88 y $84.63 \pm 1.41, \mu\text{g/mL}$) (Tabla 21) (Figs. 36, 37 y 38).

Tabla 20. Efecto del Ext^o Etéreo y Omeprazol sobre la úlcera gástrica aguda inducida por inmovilización y frío

Tratamiento	Número animales	% EU	% EH	IU (mm ²)
Control	6	100	70	39.16±0.62
Omeprazol 10 mg/Kg	6	50	0	0.28±0.01 ++
Ext ^o Etéreo 62.5 mg/Kg	6	50	44.5	0.75±0.02 ++
Ext ^o Etéreo 125 mg/Kg	6	50	37.3	0.70±0.04 ++
Ext ^o Etéreo 250 mg/Kg	6	50	20.2	0.62±0.03 ++

Test "U"-Mann Whitney : ++ p<0.01

% EU: Porcentaje de estómagos ulcerados

% EH: " de estómagos hemorrágicos

IU: Índice de ulceración.

Figura 34. Efecto del Ext° Etéreo sobre la úlcera provocada por inmovilización y frío (IU).

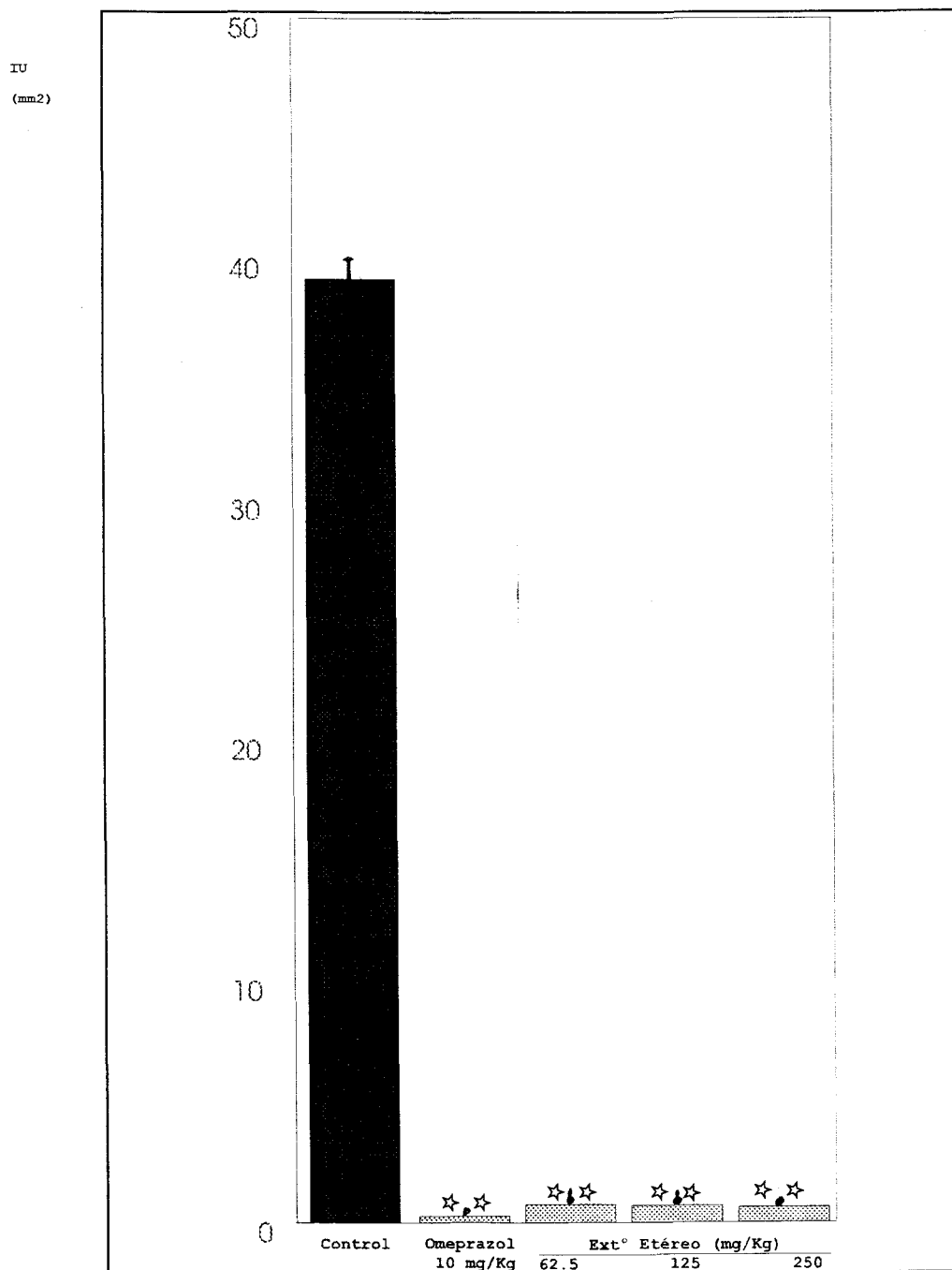


Figura 35. Efecto del Ext° Etéreo sobre la úlcera provocada por inmovilización y frío (%EH).

* EH

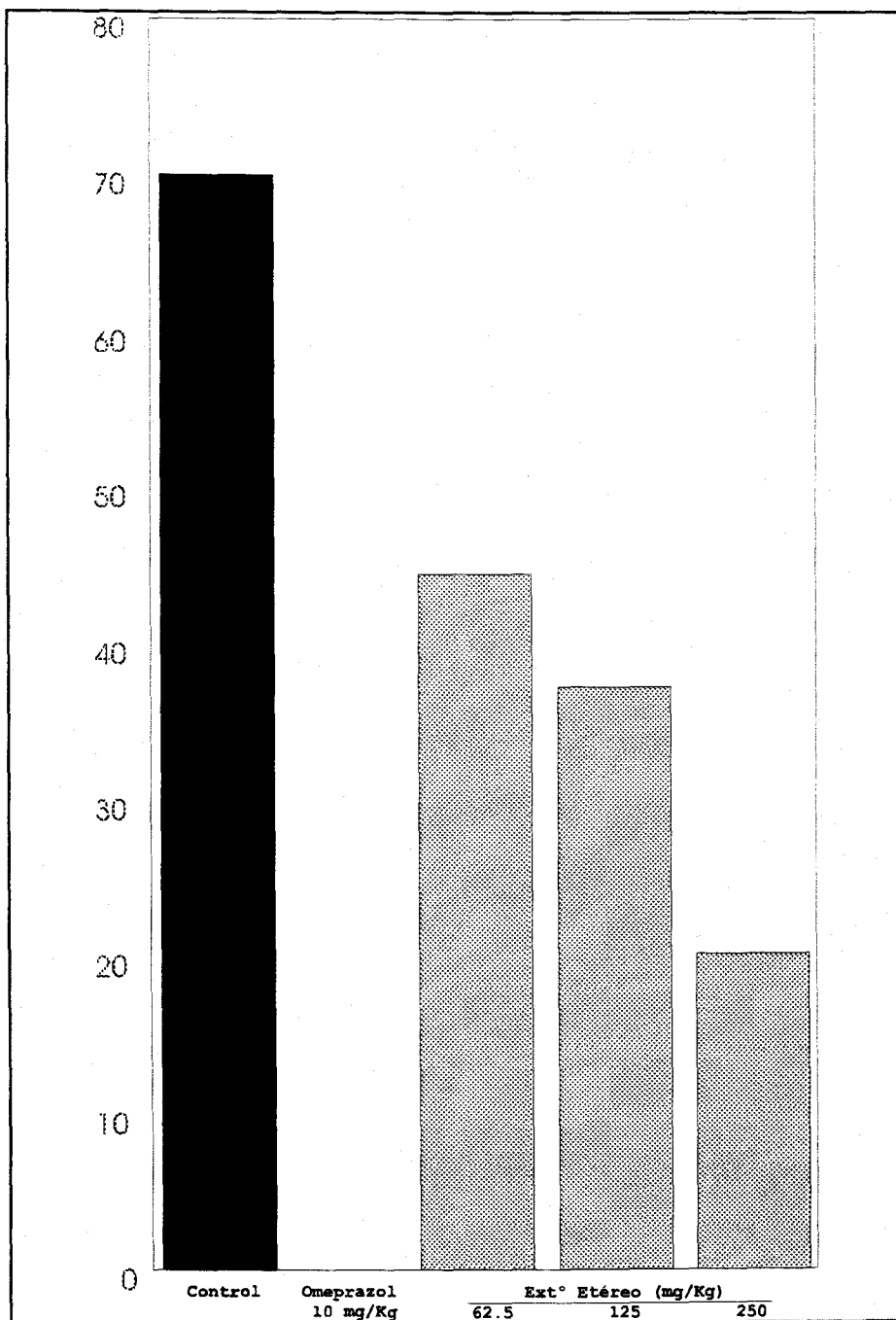


Tabla 21. Efecto del Extº Etéreo y Omeprazol sobre la secreción de moco gástrico y su contenido glicoproteico en la úlcera aguda inducida por inmovilización y frío.

Tratamiento	Número animales	Contenido moco (g)	Proteínas totales (mg/mL)	Hexosaminas (µg/mL)
Control	6	0.07±0.00	0.43±0.03	20.87±2.76
Omeprazol 10 mg/kg	8	0.05±0.00 *	0.21±0.06 n.s.	23.00±2.50 n.s.
Extº Etéreo 62.5 mg/kg	6	0.08±0.01 n.s.	1.33±0.22 **	51.73±6.76 **
Extº Etéreo 125 mg/kg	6	0.08±0.01 n.s.	1.34±0.39 **	80.71±2.88 **
Extº Etéreo 250 mg/kg	6	0.08±0.01 n.s.	1.54±0.10 ***	84.63±1.41 **

Test "t"-Student:

* p< 0.05, ** p<0.005, *** p<0.001 , ns no significativo

Figura 36. Efecto del Ext° Etéreo sobre el contenido en moco gástrico en la úlcera provocada por inmovilización y frío.

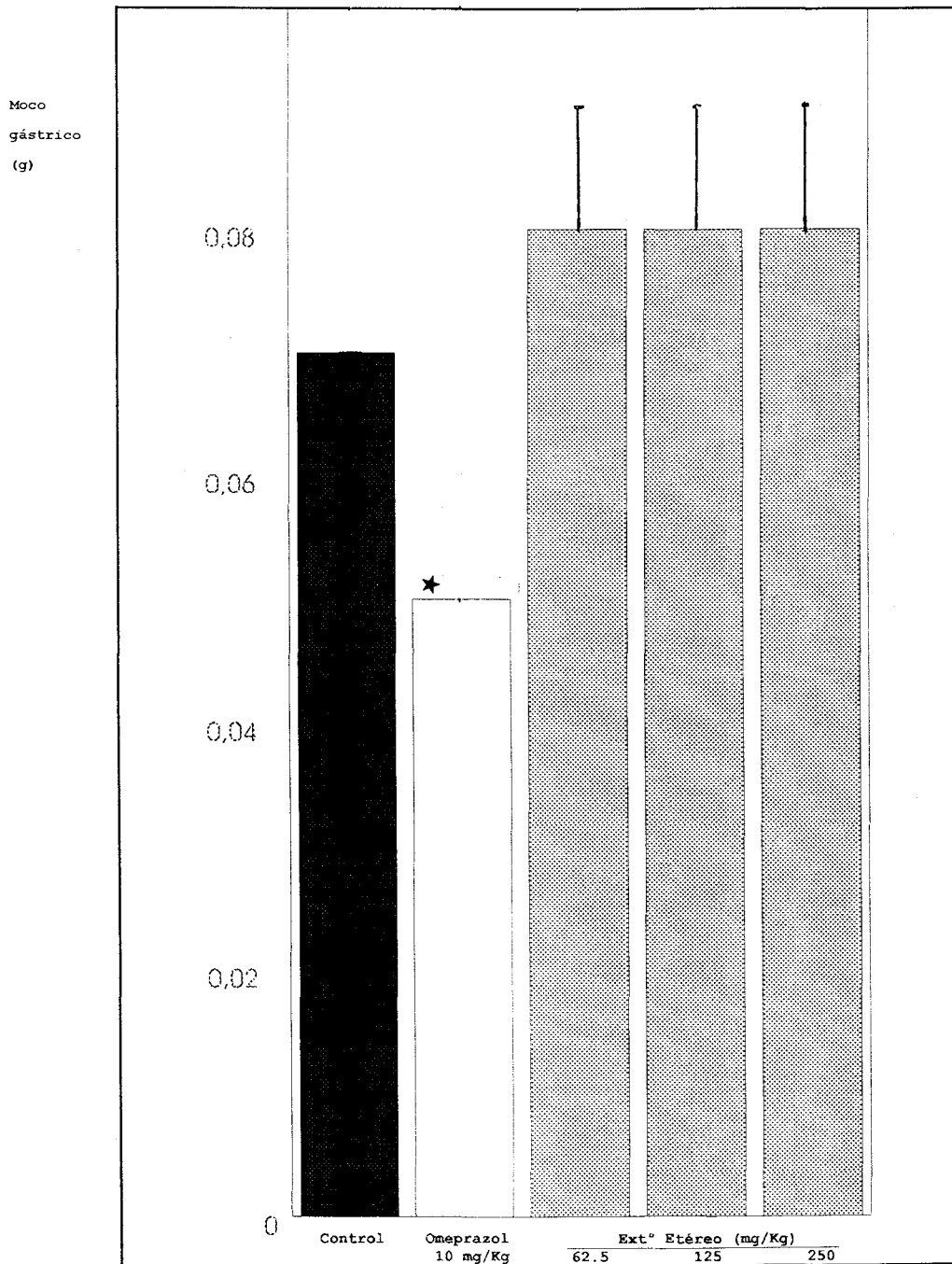


Figura 37. Efecto del Ext° Etéreo sobre el contenido en proteínas totales del moco gástrico en la úlcera provocada por inmovilización y frío.

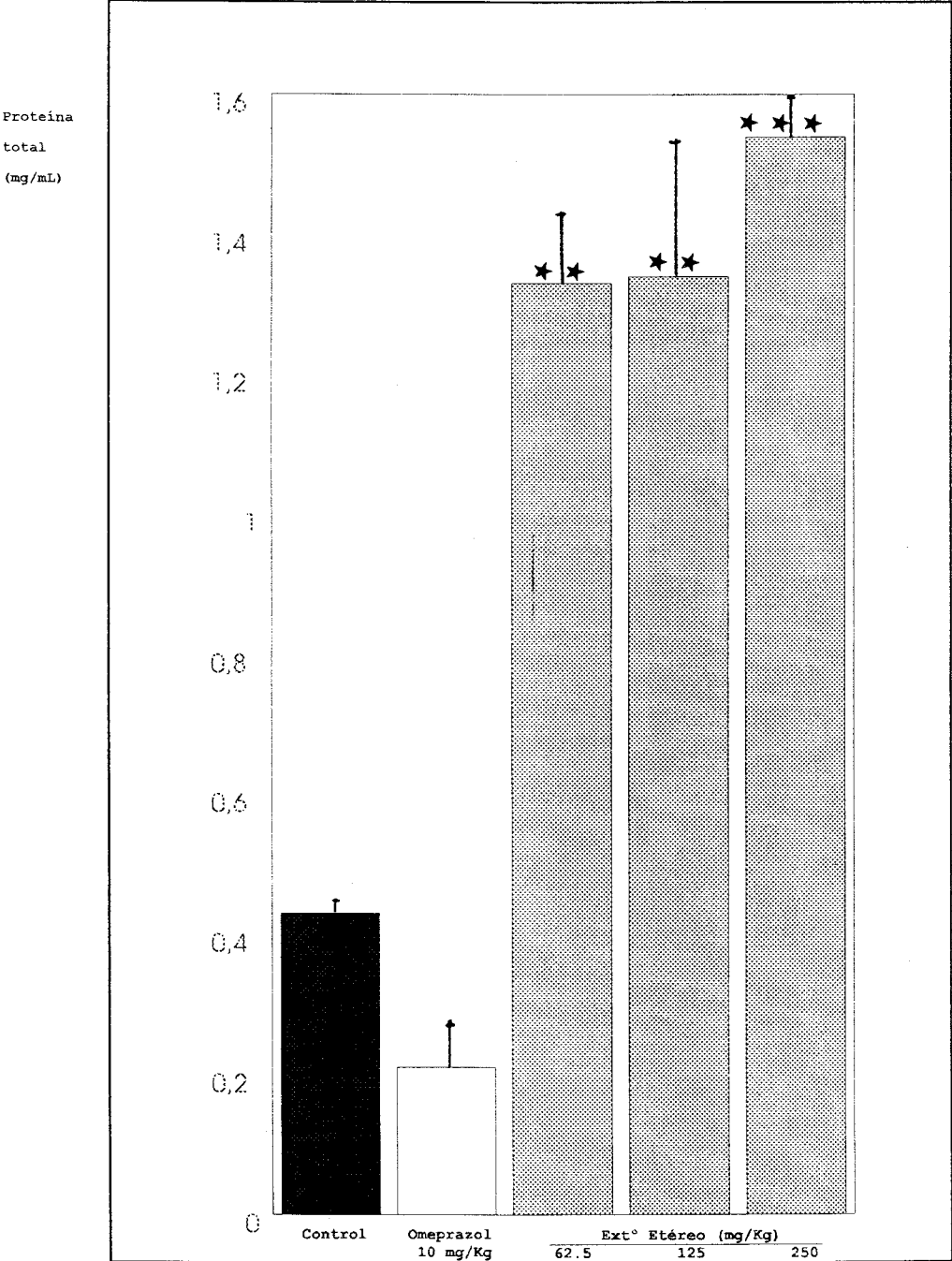
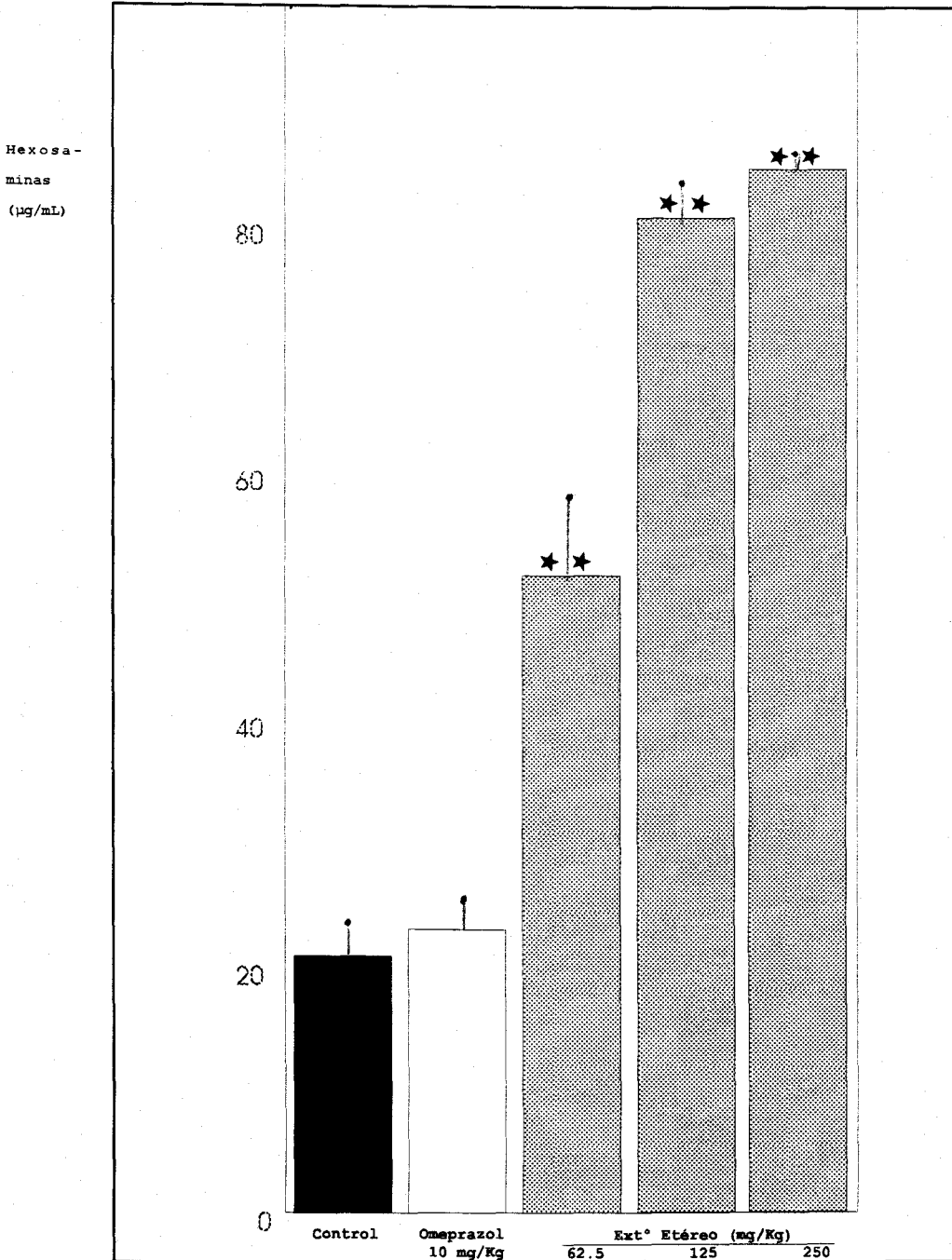


Figura 38. Efecto del Ext° Etéreo sobre el contenido en hexosaminas del moco gástrico en la úlcera provocada por inmovilización y frío.



IV.3.4.1.2. Discusión de resultados

En la úlcera gástrica por inmovilización y frío, los animales tratados con el extracto flavónico etéreo presentan una marcada reducción de la incidencia y severidad de las lesiones, disminuyendo estadísticamente los IU, siendo similares a los obtenidos con Omeprazol. Así mismo, con todas las dosis del extracto, aunque no se consiguen incrementos significativos en la cantidad de moco, sí se aprecia un aumento destacado del contenido glicoproteico, comportamiento similar al obtenido con el extracto AcOEt.

IV.3.4.2. Úlcera gástrica aguda inducida por ligadura de píloro

IV.3.4.2.1. Resultados

En el modelo experimental de úlcera aguda inducida por ligadura de píloro, todos los grupos de animales tratados con el extracto presentaron el 100% de estómagos ulcerados; sin embargo, todas las dosis ensayadas del extracto etéreo (62.5, 125 y 250 mg/Kg) muestran efectos antiulcerogénicos, disminuyendo significativamente los IU (17.66 ± 2.06 , 8.08 ± 1.26 y 4.25 ± 1.29 mm²), con respecto al control (50.87 ± 2.01 mm²), aunque con menor eficacia que el patrón utilizado (0.66 ± 0.40 mm²) (Tabla 22) (Fig. 39). Así mismo, no se observó un efecto antisecretor al no disminuir estadísticamente la acidez del jugo gástrico (Fig. 41). Lógicamente, tras la administración de Omeprazol se observó un efecto inhibitor de la secreción de ácido. Sin embargo, la concentración de pepsina decreció en todos los grupos sometidos a tratamiento (Tabla 23), (Fig 42).

Tabla 22. Efecto del Extº Etéreo y Omeprazol sobre las lesiones y volumen de jugo gástrico en la úlcera aguda inducida por ligadura de píloro.

Tratamiento	Número animales	%EU	IU (mm ²)	Volumen jugo gástrico (mL)
Control	6	100	50.87±2.01	5.58±0.55
Omeprazol 10mg/Kg	6	50	0.66±0.40 ++	5.55±0.20 n.s.
Extº Etéreo 62.5 mg/Kg	6	100	17.66±2.06 +	6.41±0.20 n.s.
Extº Etéreo 125 mg/Kg	6	100	8.08±1.26 ++	6.28±0.16 n.s.
Extº Etéreo 250 mg/Kg	6	100	4.25±1.29 ++	7.56±0.62 *

Test "U"-Mann Whitney : + p<0.05, ++ p<0.01, ns no significativo

Test "t"-Student: * p< 0.05, ns no significativo

% EU: Porcentaje de estómagos ulcerados

IU: Índice de ulceración.

Figura 39. Efecto del Ext° Etéreo sobre la úlcera provocada por ligadura de píloro (IU).

IU
(mm²)

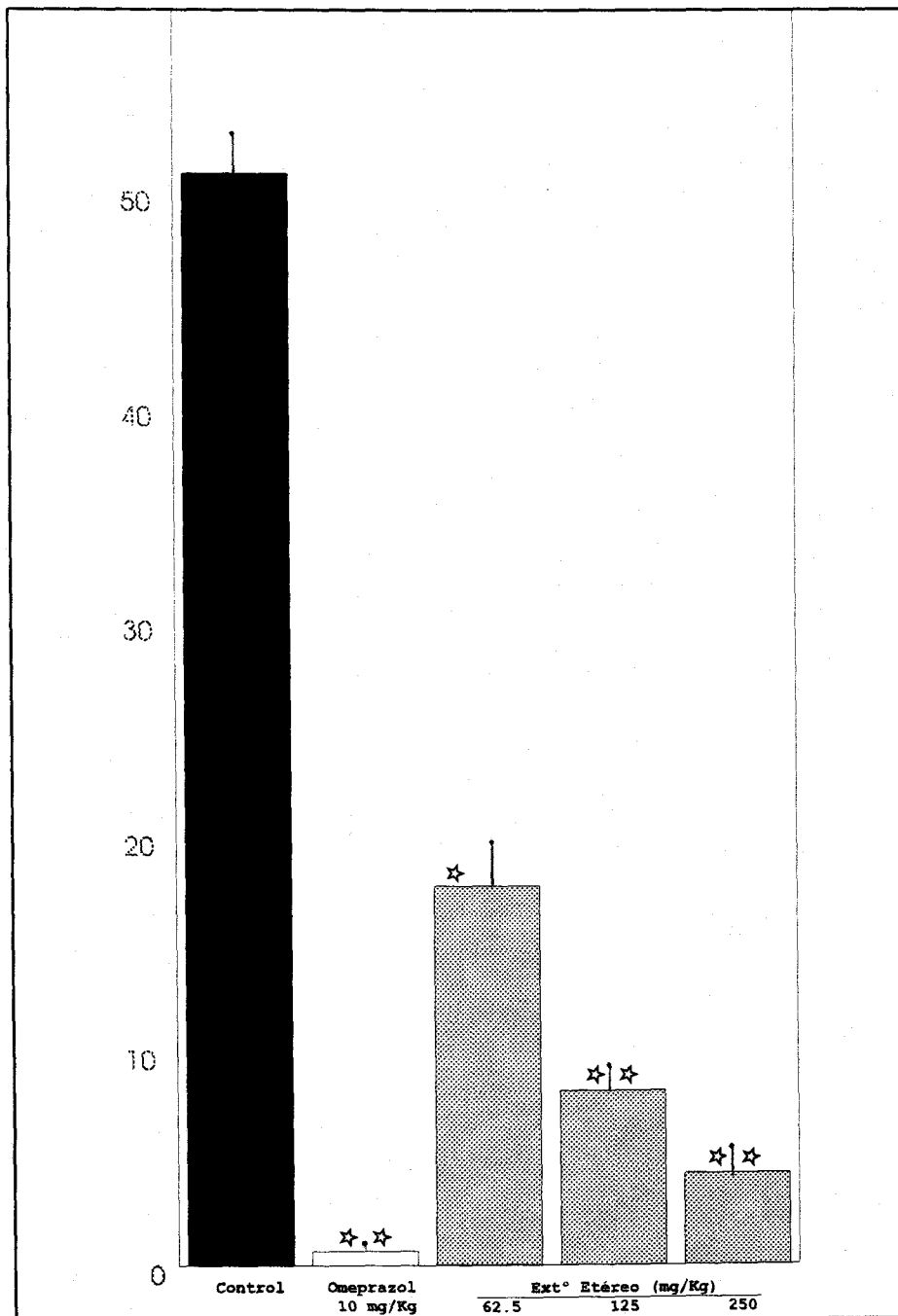


Figura 40. Efecto del Ext° Etéreo sobre el volumen de jugo gástrico provocada por ligadura de píloro.

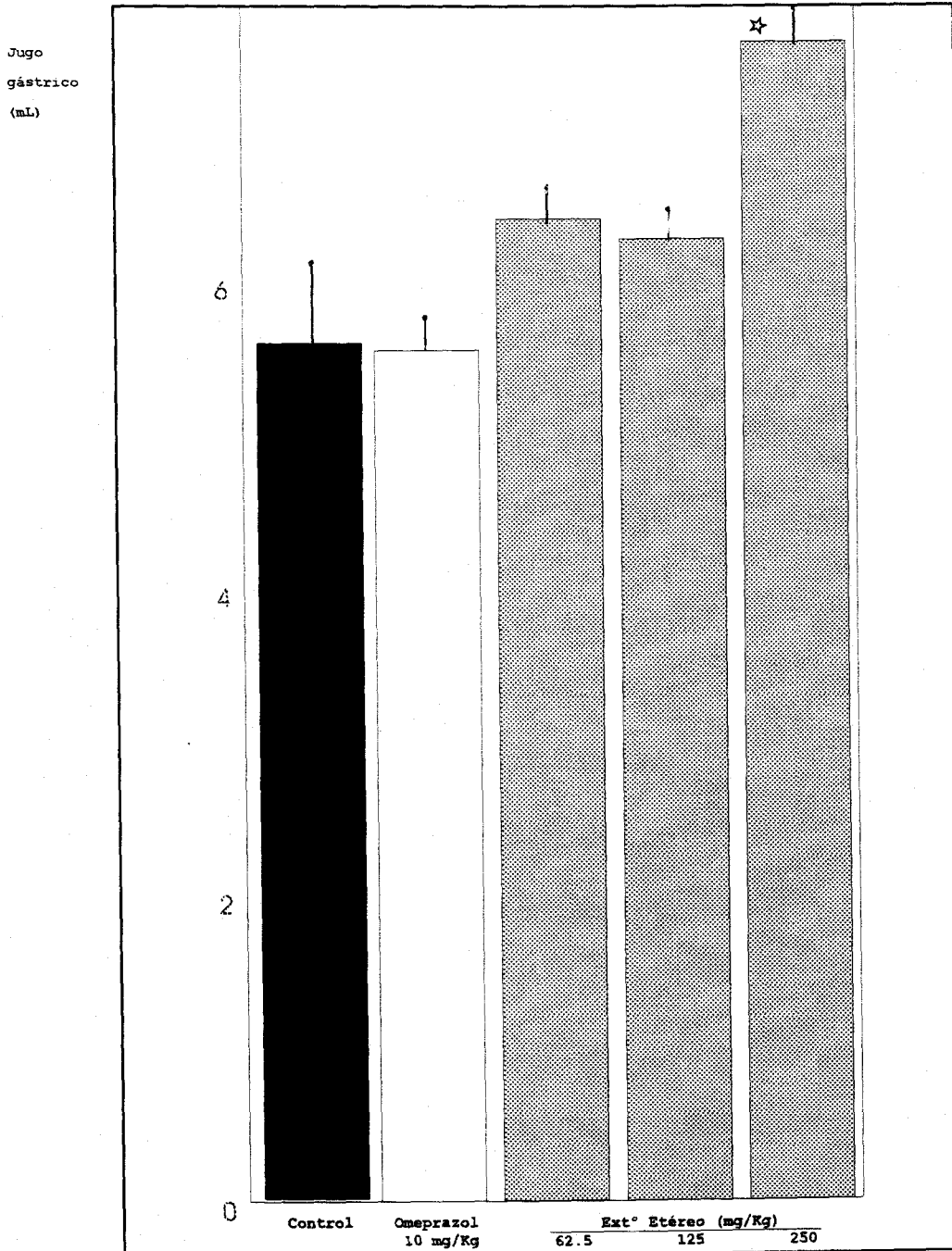


Tabla 23. Efecto del Ext^o Etéreo y Omeprazol sobre la acidez y secreción de pepsina en la úlcera gástrica aguda inducida por ligadura de píloro.

Tratamiento	Número animales	Acidez (mEq/L)	Pepsina (mg/mL)
Control	6	44.20±0.75	29.70±2.30
Omeprazol 10mg/Kg	6	21.80±0.35 *	15.00±0.90 *
Ext ^o Etéreo 62.5 mg/Kg	6	34.92±0.49 n.s.	11.94±0.01 *
Ext ^o Etéreo 125 mg/Kg	6	36.26±0.69 n.s.	15.46±0.00 *
Ext ^o Etéreo 250 mg/Kg	6	30.30±0.79 n.s.	14.33±1.98 *

Test "t"-Student: * p< 0.05, ns no significativo

Figura 41. Efecto del Ext° Etéreo sobre la acidez del jugo gástrico provocada por ligadura de píloro.

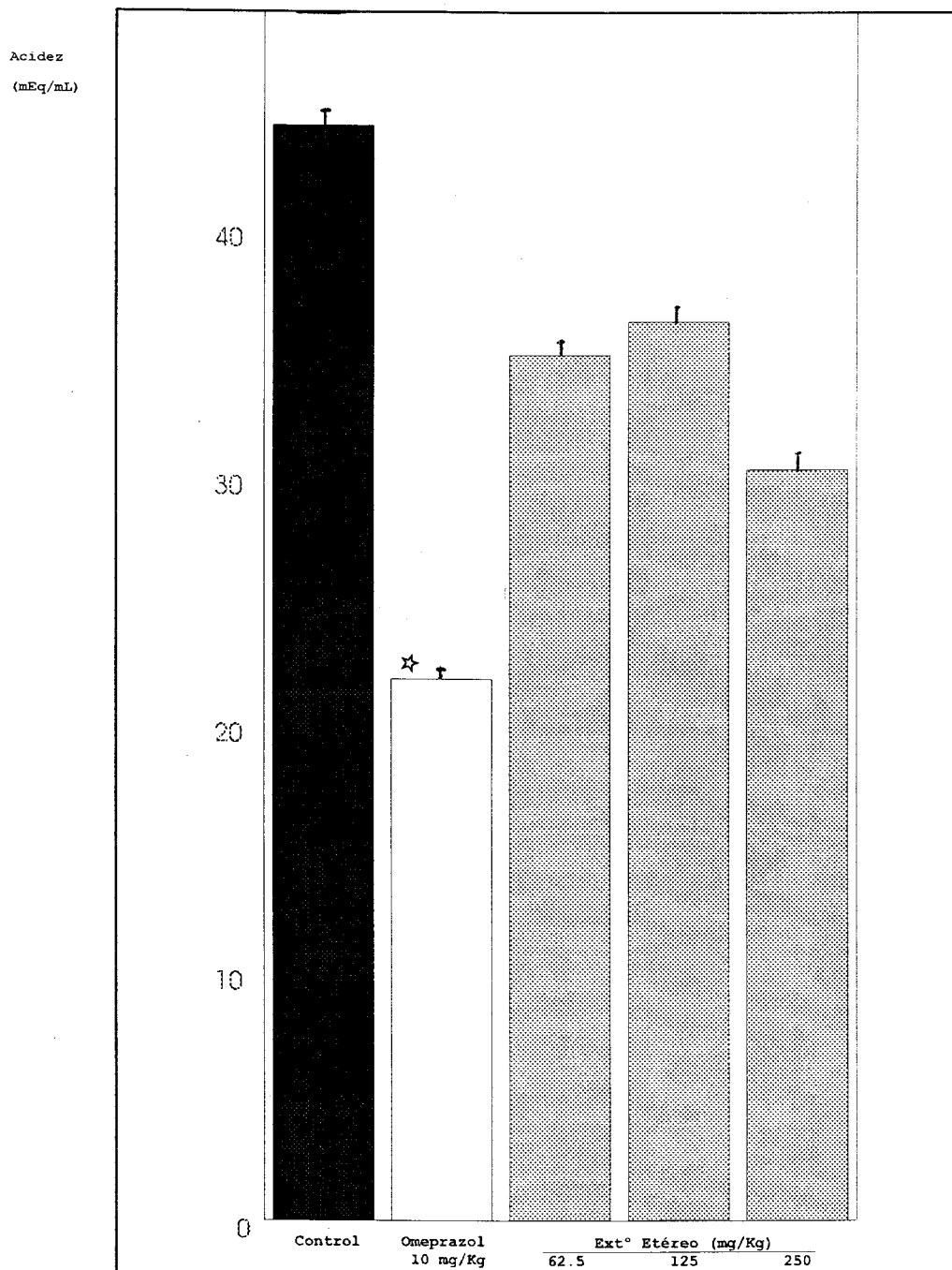
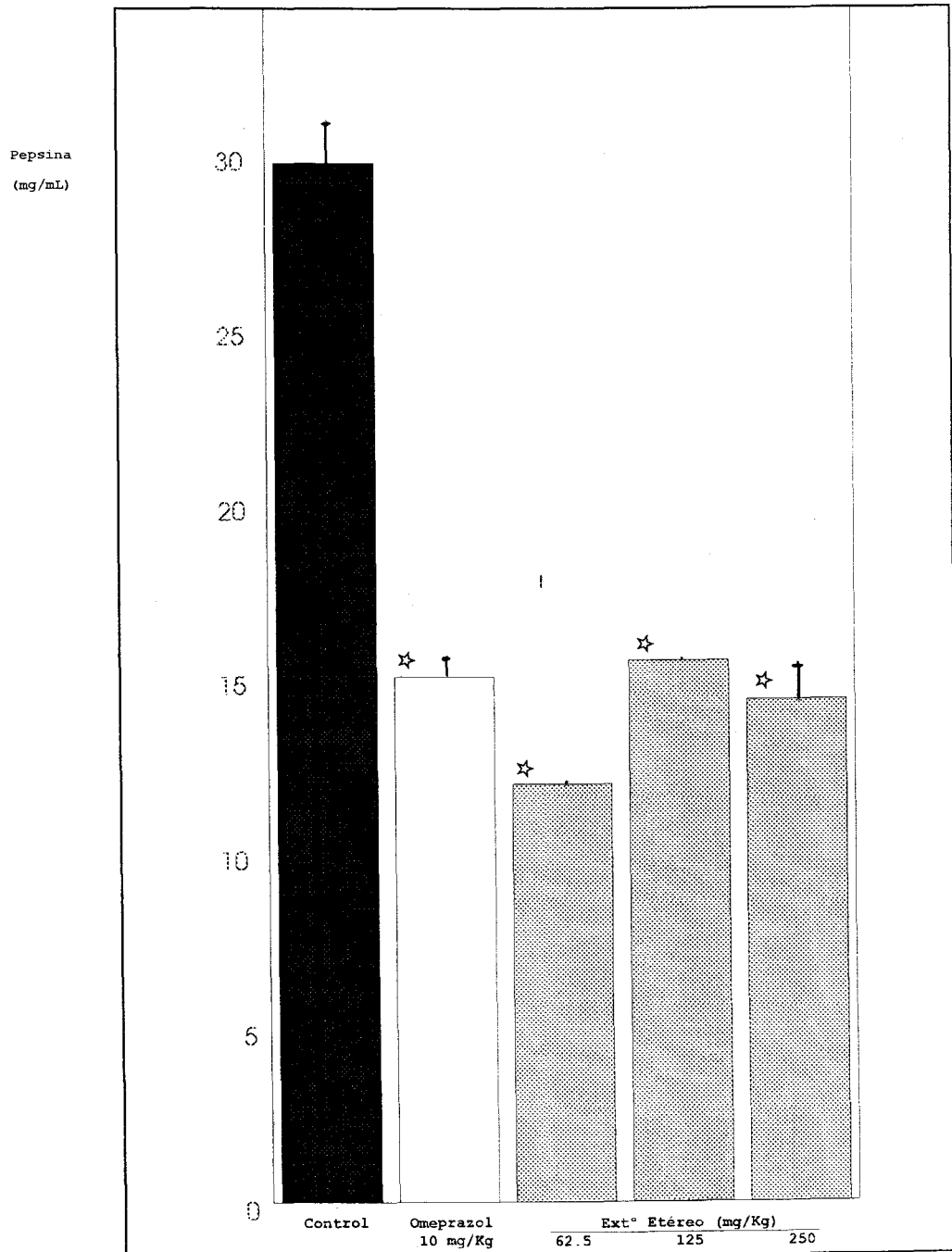


Figura 42. Efecto del Ext° Etéreo sobre el contenido en pepsina del jugo gástrico en la úlcera provocada por ligadura de píloro.



IV.3.4.2.2. Discusión de resultados

El extracto etéreo, a todas las dosis ensayadas previene la ulcerogénesis, si bien, con menor eficacia que el AcOEt. Este efecto protector, como para el caso del AcOEt, tampoco viene acompañado de una reducción paralela de la acidez ni del volumen gástrico. En consecuencia, estos resultados sugieren mecanismos antiulcerosos diferentes a los antisecretores.

IV.3.4.3. Úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto

IV.3.4.3.1. Resultados

En este modelo experimental únicamente se mostraron efectivos los tratamientos con 250 mg/Kg de extracto, al disminuir considerablemente el índice de ulceración ($55.80 \pm 14.65 \text{ mm}^2$). Con el resto de las dosis ensayadas, los IU obtenidos, aunque fueron inferiores al control, no resultaron estadísticamente significativos (Fig. 43). En relación a la cantidad de moco gástrico, no se observó aumento destacado del mismo, ni tampoco de su contenido glicoproteico con todas las dosis ensayadas del extracto (Tabla 24),(Figs. 44, 45 y 46).

Tabla 24. Efecto del Ext° Etéreo y Carbenoxolona sobre las lesiones gástricas, secreción de moco y su contenido glicoproteico en la úlcera aguda inducida por etanol absoluto.

Tratamiento	Número animales	IU (mm ²)	Contenido moco (g)	Proteína totales (mg/mL)	Hexosaminas (µg/mL)
Control	10	305.60±6.70	0.55±0.01	5.74±0.60	66.97±3.50
Carbenoxolona 80mg/Kg	10	52.77±1.30 ++	1.02±0.03 **	11.03±1.20 **	73.06±5.42 **
Ext° Etéreo 62.5 mg/Kg	6	199.00±2.81 n.s.	0.70±0.25 n.s.	6.88±0.43 n.s.	55.04±4.80 n.s.
Ext° Etéreo 125 mg/Kg	6	151.40±2.14 n.s.	0.61±0.35 n.s.	6.92±0.51 n.s.	57.63±5.79 n.s.
Ext° Etéreo 250 mg/Kg	6	55.80±1.46 ++	0.52±0.07 n.s.	5.03±0.42 n.s.	65.67±3.79 n.s.

Test "U"-Mann Whitney : ++ p<0.01, ns no significativo

Test "t"-Student: ** p<0.005, ns no significativo

Figura 43. Efecto del Ext° Etéreo sobre la úlcera provocada por etanol absoluto (IU).

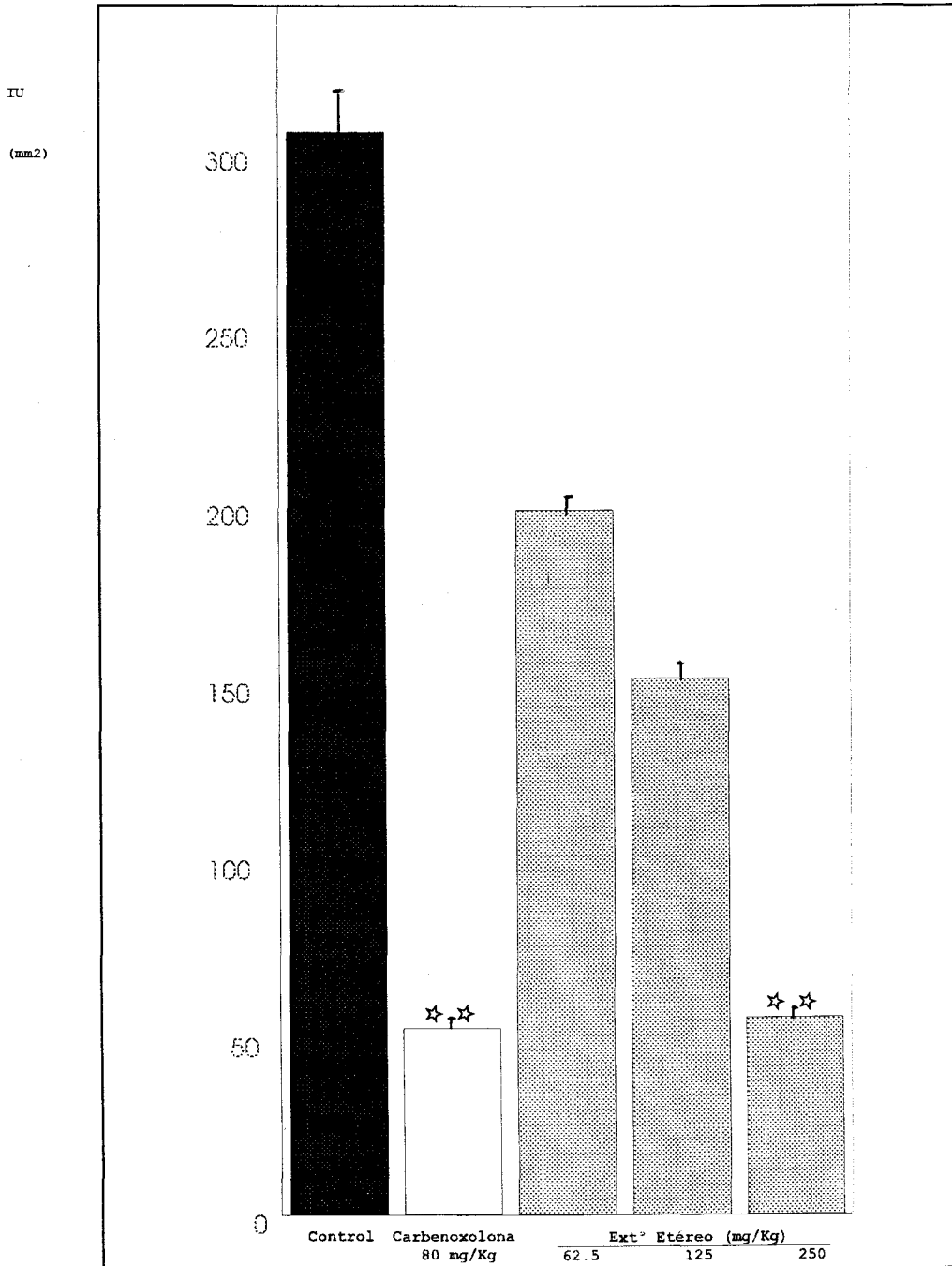


Figura 44. Efecto del Ext° Etéreo sobre el contenido en moco gástrico en la úlcera provocada por etanol absoluto.

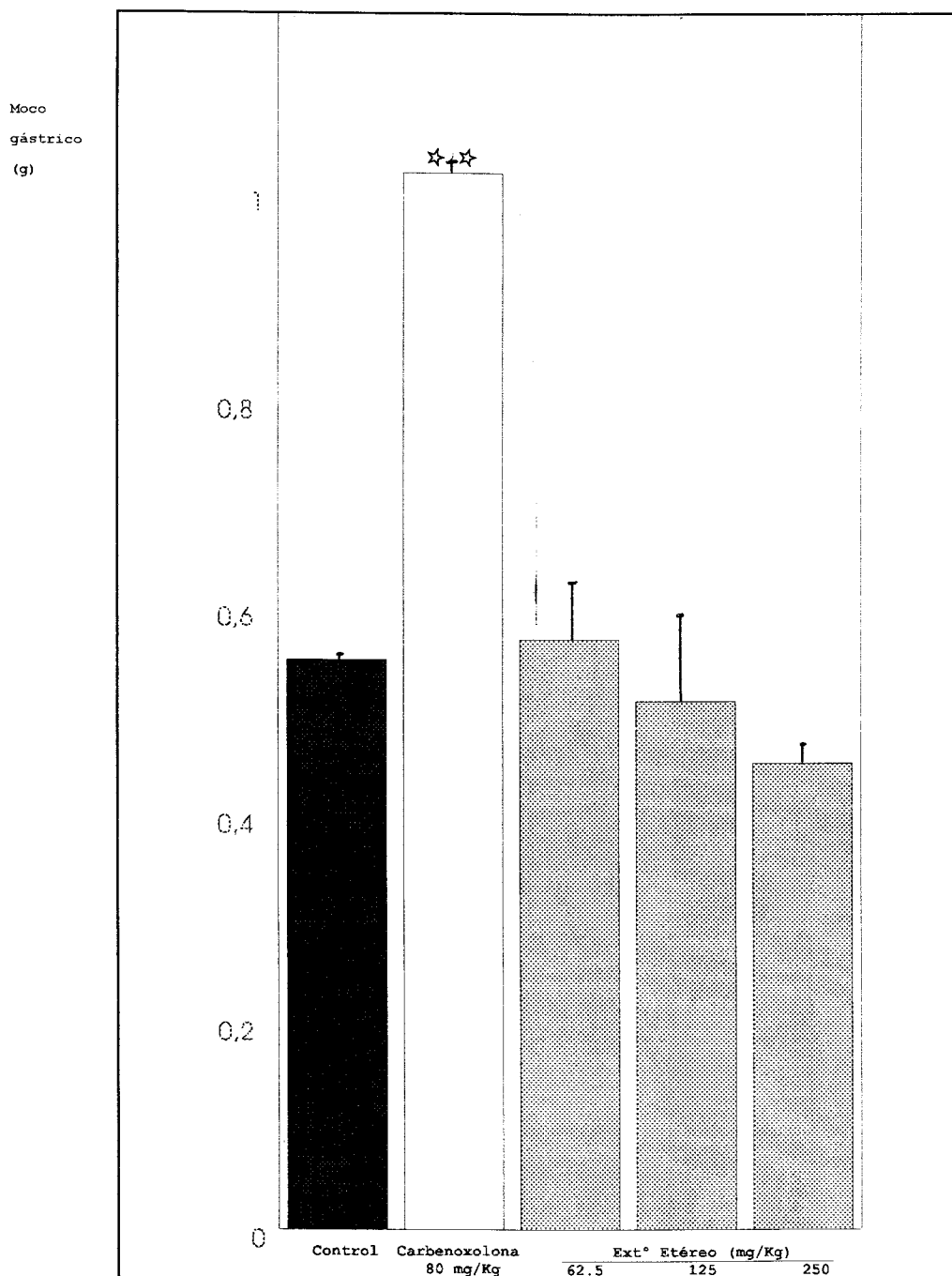


Figura 45. Efecto del Ext° Etéreo sobre el contenido en proteínas totales en la úlcera provocada por etanol absoluto.

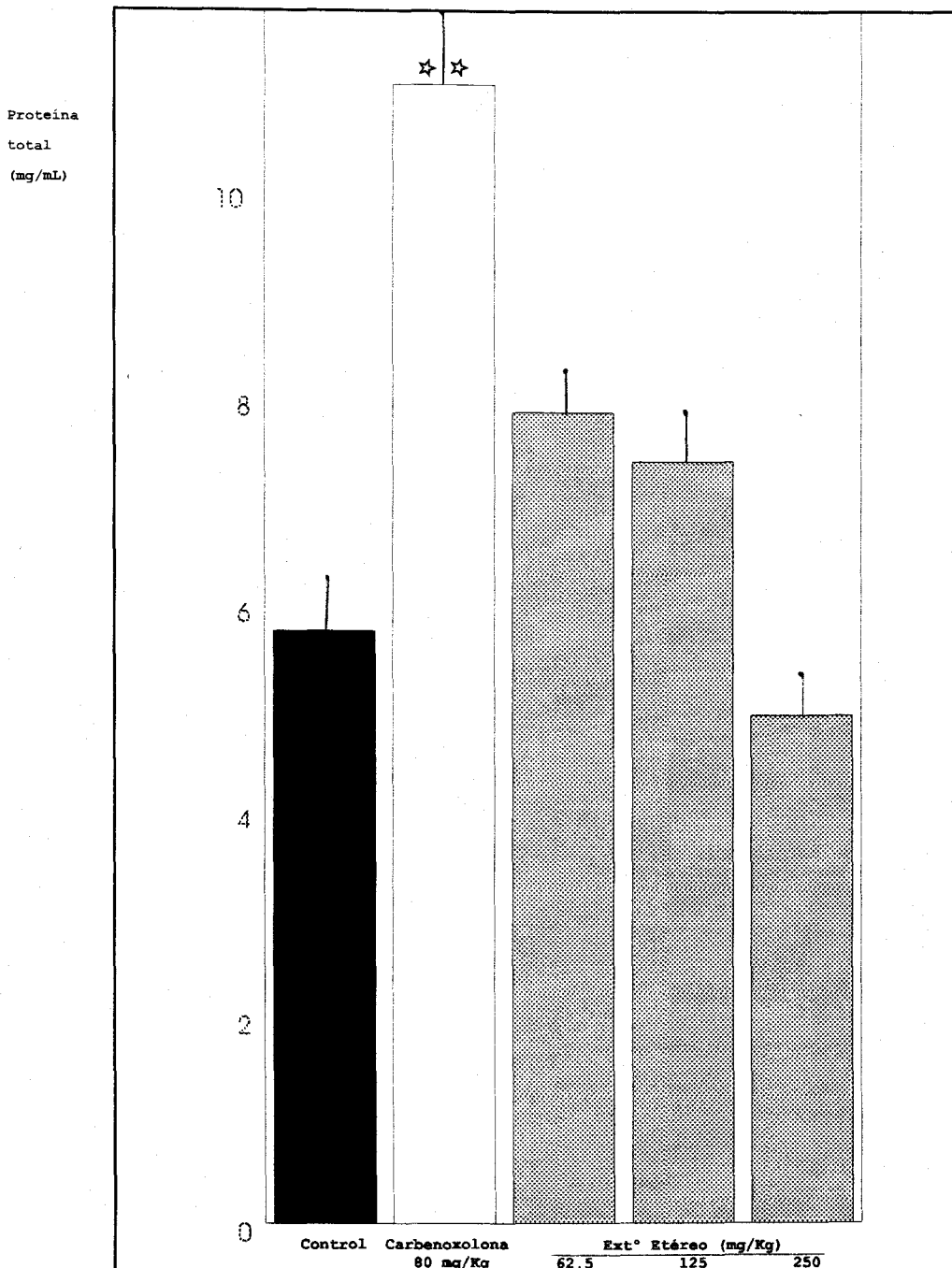
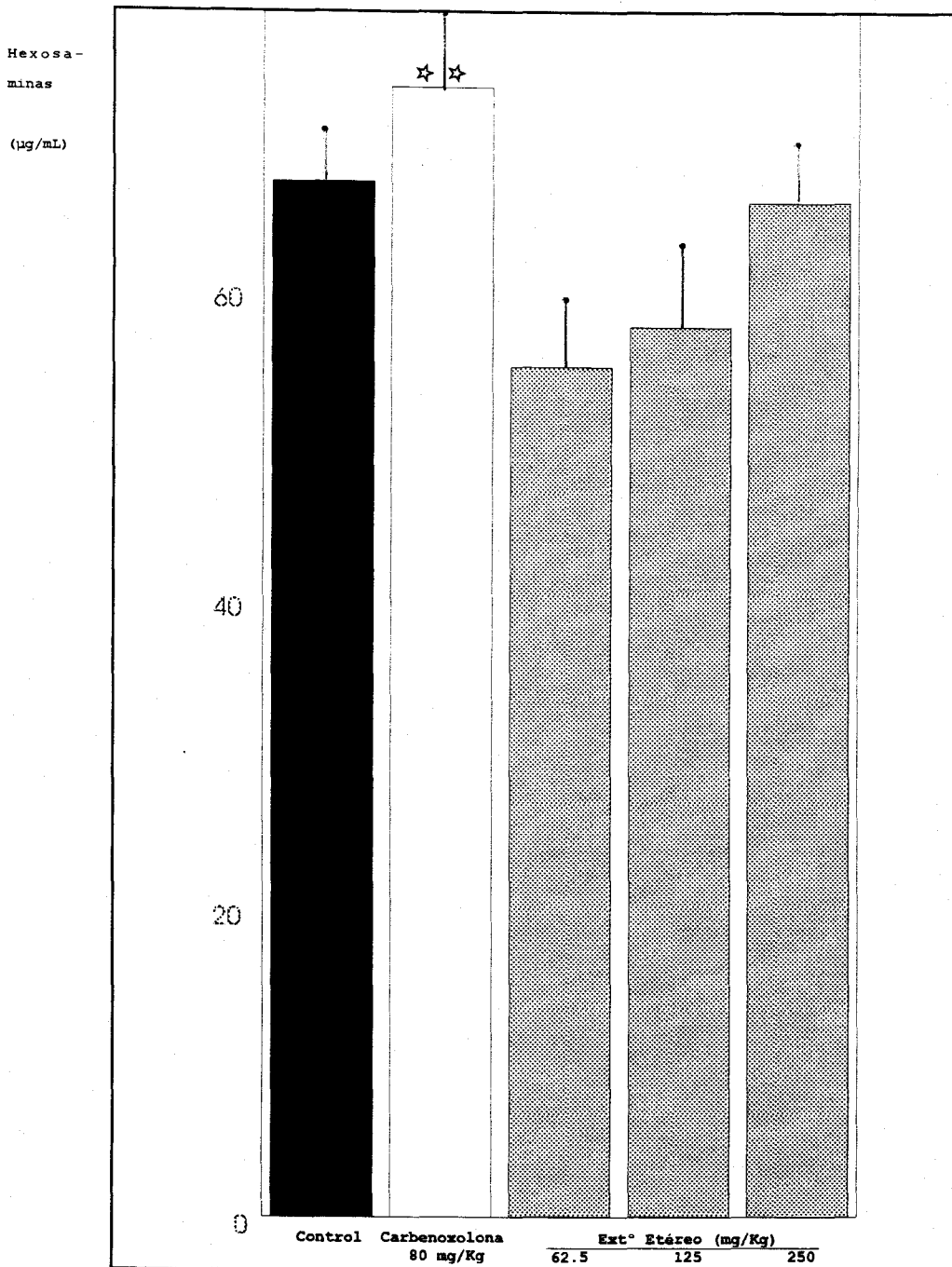


Figura 46. Efecto del Ext° Etéreo sobre el contenido en hexosaminas en la úlcera provocada por etanol absoluto.



IV.3.4.3.2. Discusión de resultados

En la úlcera aguda inducida por etanol absoluto, únicamente la dosis superior del extracto (250 mg/Kg animal) previno la incidencia ulcerosa.

No puede establecerse relación directa entre peso de moco/contenido glicoproteico y protección gástrica.

Pudiera ser que la posible actividad antioxidante del extracto etéreo participara activamente en el reforzamiento de los mecanismos fisiológicos mucosales defensivos.

IV.3.5. Actividad sobre la permeabilidad vascular

IV.3.5.1. Resultados

Los resultados obtenidos con el Extracto Etéreo nos ponen de manifiesto que las dosis superiores (250 y 500 mg/Kg) reducen significativamente el incremento de la permeabilidad vascular inducido por el mediador histamina (37.13 ± 1.28 % y 57.83 ± 2.68 %) (Tabla 25) (Figs. 47 y 48).

Tabla 25. Actividad del Extº Etéreo sobre el incremento de la permeabilidad vascular inducido por histamina.

Tratamiento	Número de animales	Azul de Evans ($\mu\text{g/mL}$)	%Inhibición
Control	10	8.81 \pm 0.26	0.0
Indometacina 5 mg/Kg	5	6.40 \pm 0.12	27.3
Extº Etéreo 125 mg/Kg	5	8.21 \pm 0.10 n.s.	6.62
Extº Etéreo 250 g/Kg	5	5.54 \pm 0.11 ***	37.13
Extº Etéreo 500mg/Kg	5	3.72 \pm 0.24 ***	57.83

Test "t"-Student: ** p<0.005, ns no significativo

** p<0.001

Figura 47. Efecto del Ext° Etéreo sobre el incremento de la permeabilidad vascular inducido por histamina.

(Azul de Evans, mg/mL)

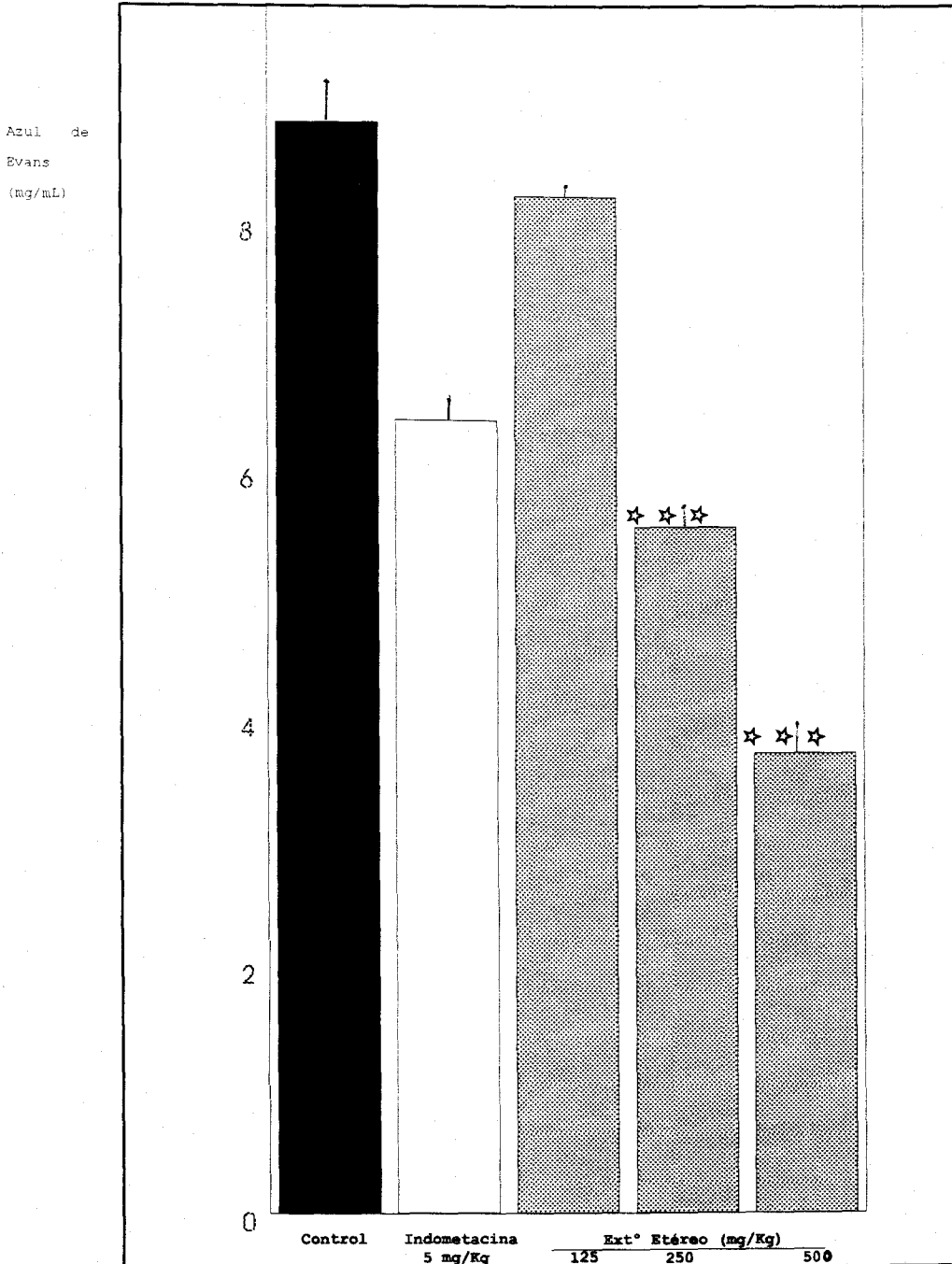
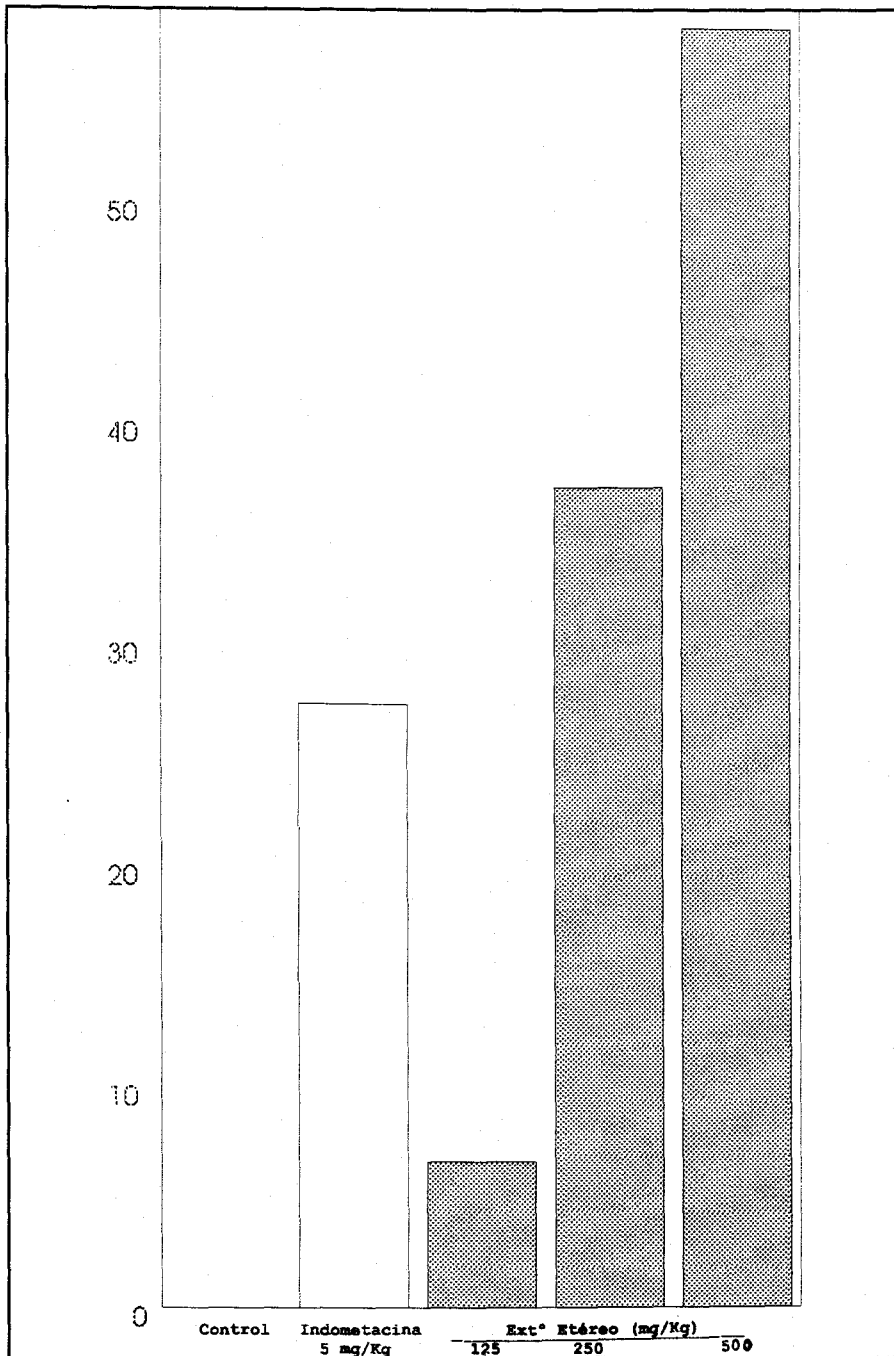


Figura 48. Efecto del Ext° Etéreo sobre el incremento de la permeabilidad vascular inducido por histamina.
(% Inhibición)

Inhibición



IV.3.5.2. Discusión de resultados

El efecto vasoprotector del Extracto Etéreo, conseguido frente al incremento de la permeabilidad vascular por histamina, no muestra una clara relación dosis-efecto, observándose una menor actividad que la obtenida con el extracto AcOEt anteriormente estudiado, en el que 250 mg/Kg producen una inhibición de 54.5%.

IV.3.6. Actividad sobre radicales libres

IV.3.6.1. Resultados

Para expresar los resultados (Tabla 26) hemos aplicado la recta de regresión a los valores comprendidos entre 12 y 86 %, calculando los valores medios (M_n) para el conjunto de las determinaciones de cada extracto y las desviaciones standard correspondientes (δ_{n-1}), de manera que se aprecie la dispersión de los mismos.

La absorbancia de la solución de DPPH a la concentración de 6×10^{-5} , en metanol, fue 0,747.

La CE_{50} para el extracto Etéreo resultó ser $9.72 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 26. Actividad antiradicalaria in vitro del Ext° Etéreo sobre DPPH.

Dosis μg/mL	DO			%Reducción DO	
				M _n	δ _{n-1}
20	0.080	0.080	0.078	89.38	0.16
18	0.101	0.104	0.100	86.39	0.28
16	0.167	0.169	0.165	77.64	0.26
14	0.222	0.223	0.225	70.10	0.20
12	0.287	0.287	0.289	61.49	0.16
10	0.346	0.344	0.346	53.77	0.16
8	0.422	0.422	0.424	43.46	0.08
6	0.491	0.489	0.492	34.32	0.20
4	0.576	0.575	0.578	22.85	0.20
2	0.660	0.658	0.658	11.82	0.15

DO= Densidad óptica de las diferentes muestras

$$CE_{50} = 9.72 \mu\text{g/mL}$$

IV.3.6.2. Discusión de resultados

El Extracto Etéreo posee una actividad antioxidante frente a DPPH ligeramente inferior a la del Extracto AcOEt, pero comparable también a la del ácido ascórbico (2.7 µg/mL).

Su riqueza en flavonoides puede conferirle estas propiedades, ya que, si bien a estos compuestos en general se les atribuye actividad antirradicalaria, los más activos son los flavonoles (CILLARD et al., 1988), especialmente aquellos con sustituyentes en 5 y 7 del anillo A (BAHORUN, 1994), en 3', 4' del anillo B y, sobre todo, con tres grupos hidroxilos en posiciones 3', 4', 5' (LARSON, 1988); así, tanto quercetina como miricetina, presentes en el extracto Etéreo, muestran actividad a muy bajas concentraciones en diferentes sistemas *in vitro* (SALAH, et al., 1985)(LARSON, 1988)(TOREL et al., 1986) (FRAGA et al., 1987)(ALCARAZ et al., 1991).

IV.4. EXTRACTO CLOROFORMICO

IV.4.1. Fraccionamiento cromatográfico

El extracto clorofórmico, obtenido en sistema Soxhlet, fue estudiado por CCF para la posterior separación de sus componentes por CC de gel de sílice.

Partimos de 4g de r.s., utilizando como eluyentes mezclas de n-Hexano/AcOEt. Se recogieron 132 fracciones de, aproximadamente, 20 mL cada una, que se agruparon de acuerdo a su comportamiento en CCF. El revelado se realizó con Oleum, así como luz UV.

Esta columna la denominamos C y está resumida en la tabla 27.

Tabla 27. Fraccionamiento cromatográfico del Ext° Clorofórmico

Columna C

FRACCIONES	ELUYENTES	OBSERVACIONES
1-20	n-Hexano	Clorofilas
21-47	n-Hexano/AcOEt 80:20	Mezclas
48-55	"	M ₄
56-76	n-Hexano/AcOEt 75:25	M ₄ + Mezclas
77-90	"	Mezclas
91-111	n-Hexano/AcOEt 60:40	Mezclas + M ₅
112-115	"	M ₅
116-123	"	M ₅ + Mezclas
124-132	n-Hexano/AcOEt 50:50	Mezclas

IV.4.2. Identificación del compuesto M₄

IV.4.2.1. Resultados

Reunidas las fracciones 48-55 de la Columna C, se llevaron a pequeño volumen dejándose a T^a ambiente. Al cabo de un tiempo se obtuvieron cristales de color blanco, que fueron purificados por sucesivas recristalizaciones en n-Hexano. Su identificación la realizamos por IR, ¹H-RMN y EM. Se determinó también su PF.

IR δ máx (cm⁻¹), KBr:

3376, 2800, 1642

¹H-RMN (ppm), (200 MHz, CDCl₃):

5.14 (1H, t)

1.03 (3H, s)

0.96 (6H, s)

0.87 (12H, s)

0.83 (3H, s)

EM m/z (%):

426 M⁺

P.F.

286 °C

IV.4.2.2. Discusión de resultados

De su estudio por cromatografía en capa fina (polaridad y coloración al revelar con Oleum), se dedujo la naturaleza triterpénica del compuesto "M₄".

Su espectro IR (Fig. 50) muestra una fuerte absorción a 3376, característica del grupos -OH, y a 2800 cm⁻¹, tensión de vibración de enlaces C-H.

En su espectro de ¹H-RMN (Fig. 51), se observan en la zona de los metilos, ocho señales comprendidas entre 0.83 y 1.03 ppm de los ocho metilos del compuesto. La señal correspondiente al protón vinílico aparece a 5.14 ppm como un triplete.

Su EM (Fig. 52) muestra un ión molecular a 426 y los iones característicos a 203 y 218 m/z de compuestos triterpénicos. La comparación de este espectro con los obtenidos de la librería informatizada coinciden con los de la α-amirina.

Por todos estos resultados, y teniendo en cuenta su PF (286°C), identificamos al compuesto "M₄" con α-amirina.

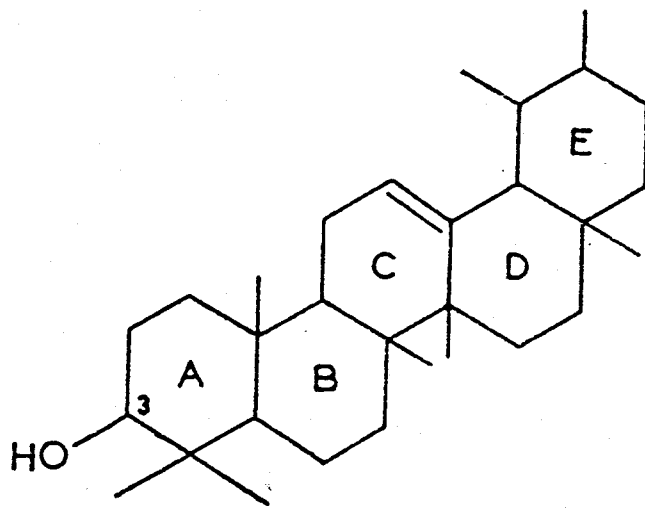


Figura 49. Estructura química de M₄ (α -amirina)

Figura 50. Espectro de IR del compuesto M₄

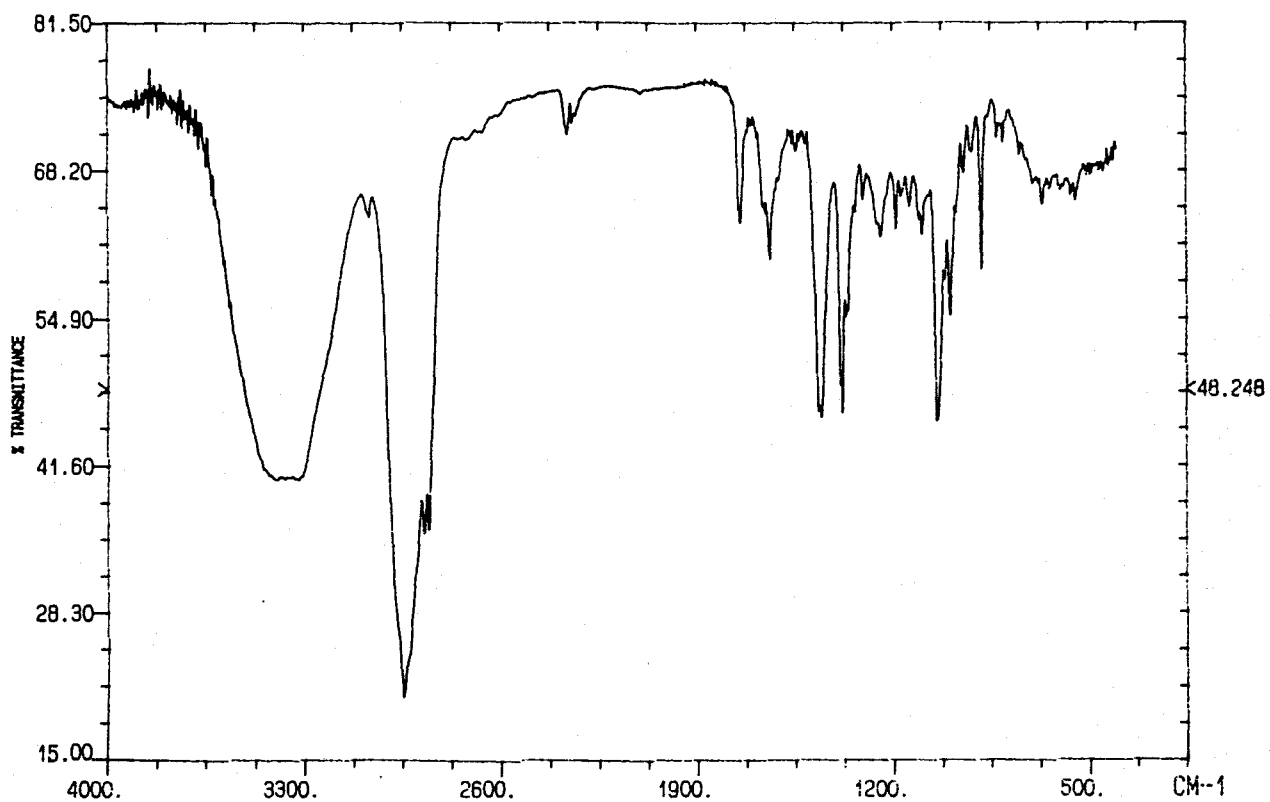


Figura 51. Espectro de ^1H -RMN del compuesto M_4 .

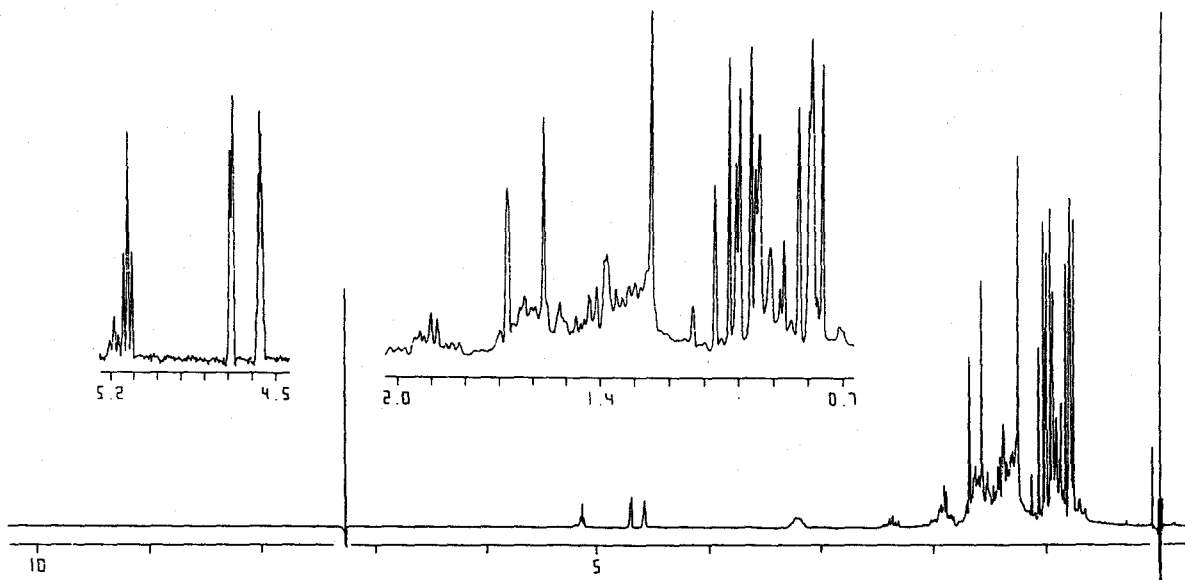
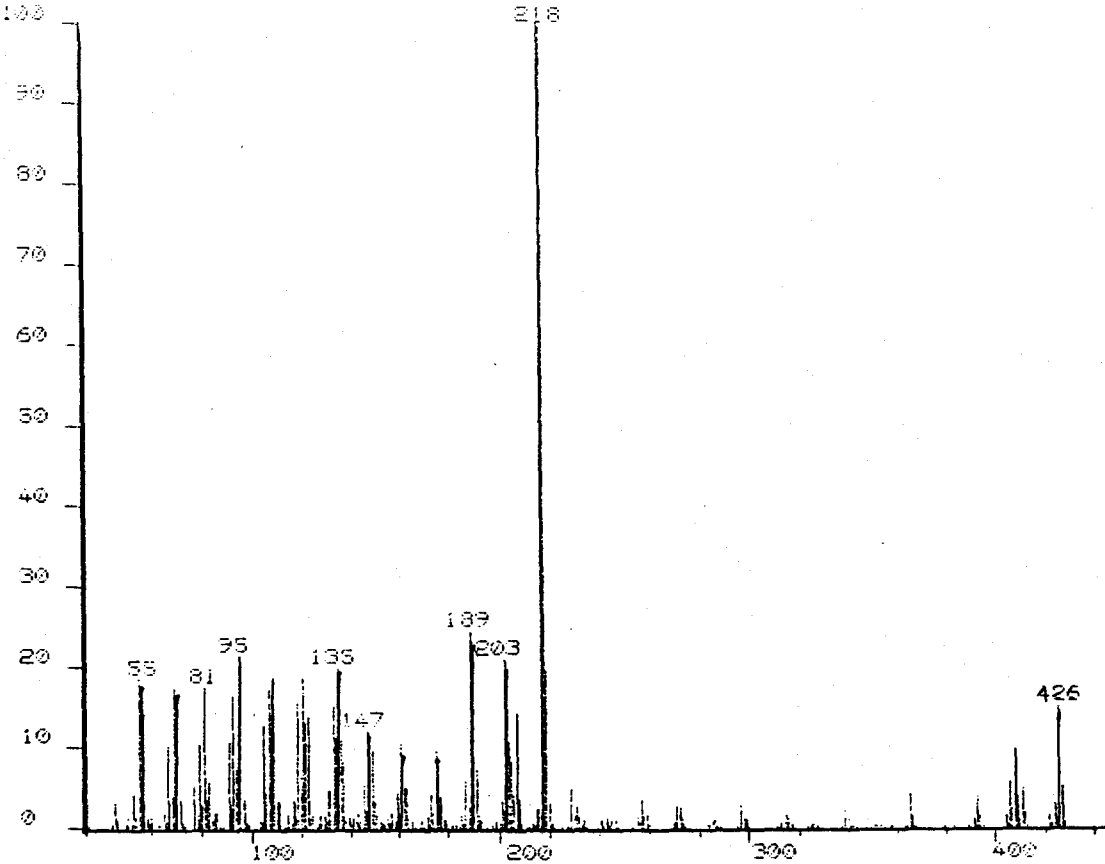


Figura 52. Espectro de EM del compuesto M₄



IV.4.3. Identificación del compuesto M₅

Este compuesto "M₅", sólido amorfo, se obtiene de las fracciones 112-115 de la columna C correspondiente al extracto clorofórmico.

IV.4.3.1. Resultados

La identificación del compuesto "M₅" se realizó por ¹H-RMN y EM, determinándose su P.F.

¹H-RMN (ppm), (200 MHz, MeOD):

5.25 (1H, t)

0.99 (3H, s)

0.95 (3H, s)

0.92 (3H, s)

0.87 (3H, s)

0.84 (3H, s)

0.78 (3H, s)

EM m/z (%):

456 M⁺

P.F.

186 °C

IV.4.3.2. Discusión de resultados

El compuesto "M₅" daba en capa fina una coloración característica de triterpenos al ser revelado con Oleum.

En su espectro ¹H-RMN (Fig. 54) se observaron, en la zona de los metilos, siete señales comprendidas entre 0.78 y 0.99 ppm de los siete metilos que posee este compuesto. La señal correspondiente al protón vinílico aparece a 5.25 ppm como un triplete.

Su EM muestra un ión molecular a 456 y los iones característicos a 203 y 248 m/z de un compuesto triterpénico. Por otra parte, comparando este espectro con los contenidos en el banco de datos de la librería, coincide con el del ácido ursólico.

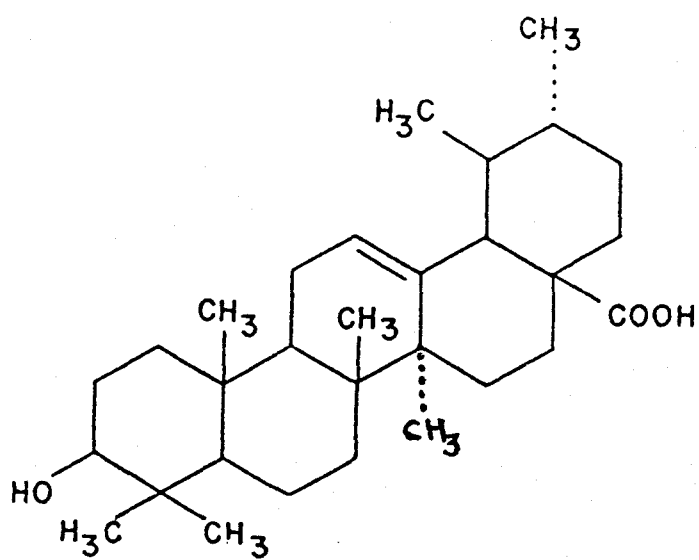


Figura 53. Estructura química del compuesto M₅ (ácido ursólico)

Figura 54. Espectro de ^1H -RMN del compuesto M_5

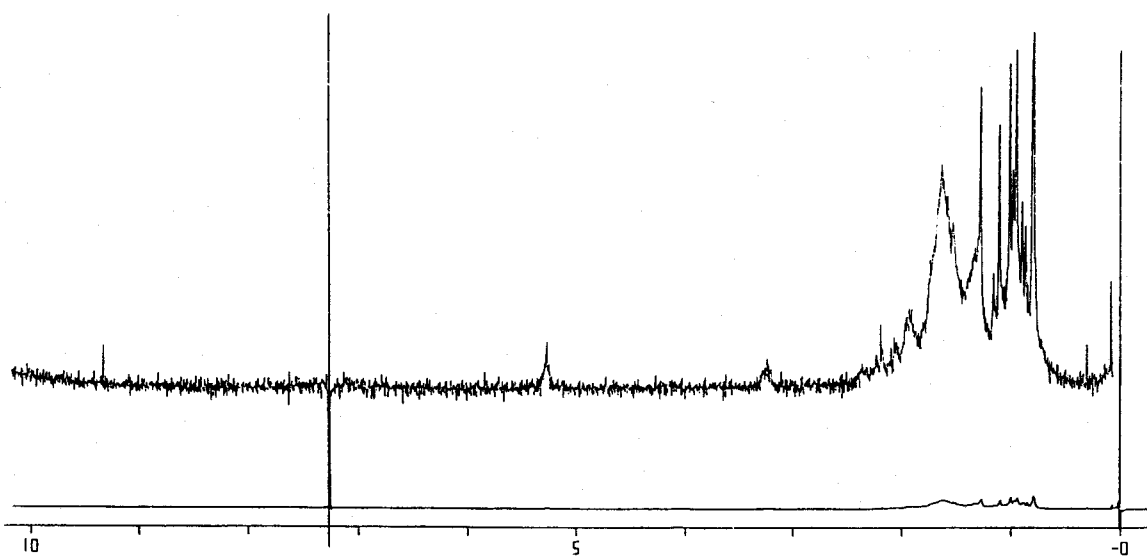
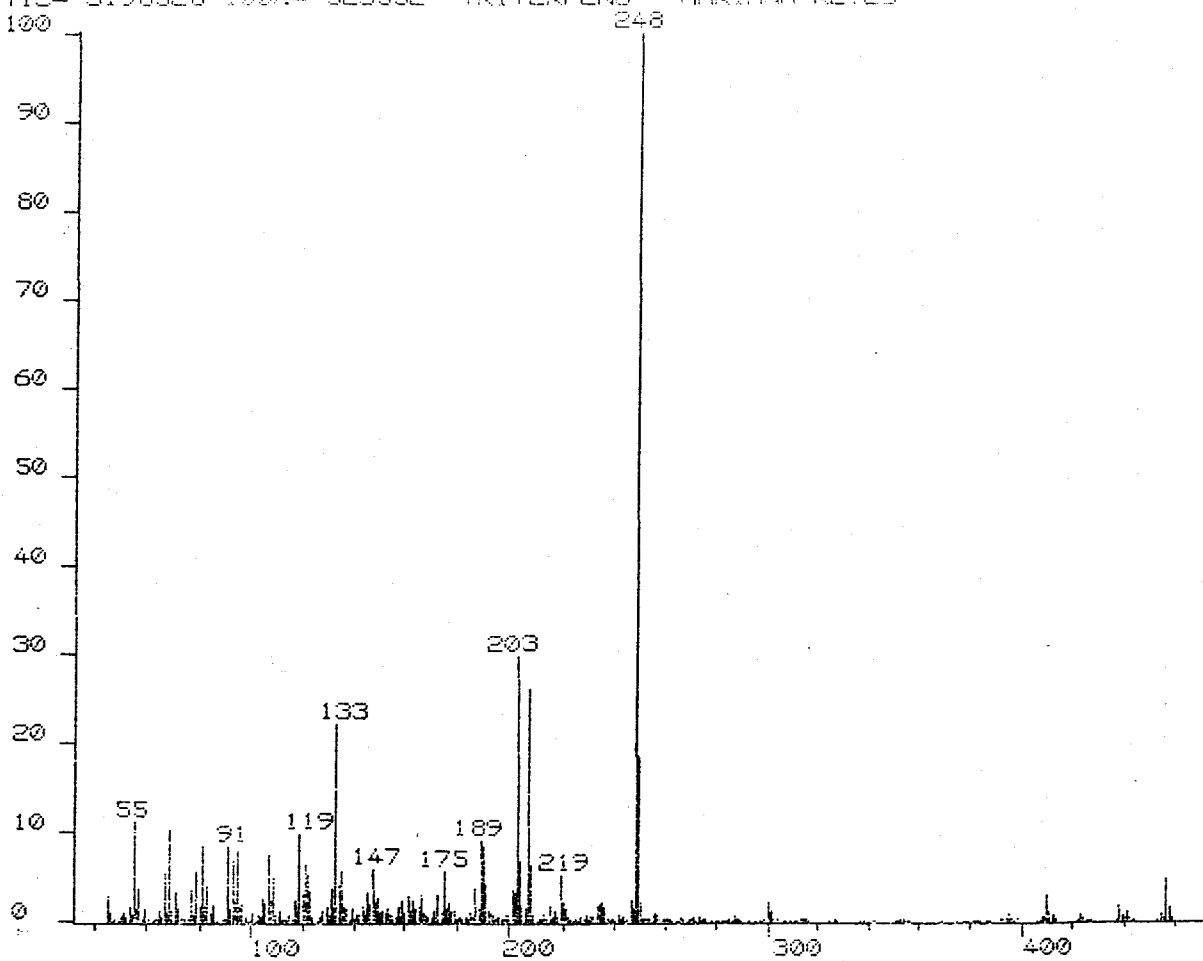


Figura 55. Espectro de EM del compuesto M₅

1690 REYES02.99 RT= 07:03 +EI SLRP 02/02/90 13:50 SLE
TIC= 3198928 100K= 523552 TRITERPENO MARIANA REYES



IV.4.4. Actividad antimitótica (Cultivo de células vegetales)

El hecho de que el ácido ursólico se muestre citotóxico (LEE et al., 1988) (FANG et al, 1989) (SIMON et al., 1991), justifica el ensayo de antimitóticos en cultivo de células vegetales con los componentes triterpénicos aislados del extracto clorofórmico (α -amirina y ácido ursólico).

IV.4.4.1. Resultados

El estudio de la actividad antimitótica de los compuestos α -amirina y ácido ursólico aislados del extracto clorofórmico, se realizó con bulbos de *Allium cepa* L según la metodología descrita en el apartado III.7.

Los valores de los correspondientes índices mitótico y de fase, a la dosis de 250 mg, figuran en las Tablas 28 y 29 y Figs. 56 y 57.

Tabla 28. Valores de IM e IF a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes a M₄ (α-amirina)

Tiempos Tratam.	n° células totales	n° células división	Indice mitótico	Prof.	Indice Fases		Telof.
					Met.	Anaf.	
Control	2005	172	8.57	52.90	12.20	9.99	25.00
4 h	2069	98	4.74	47.96	16.33	9.18	27.55
8 h	2298	114	4.96	40.35	19.30	11.40	28.95
24 h	2196	116	5.28	38.79	22.41	13.79	25.00
48 h	1998	85	4.25	48.24	11.76	5.88	34.12
72 h	2109	100	4.74	38.00	29.00	5.00	28.00

Tabla 29. Valores de IM e IF, a diferentes tiempos de tratamiento, correspondientes M₅ (ácido ursólico)

Tiempos Tratam.	n° células totales	n° células división	Indice mitótico	Prof.	Indice Fases Met.	Anaf.	Telof.
Control	2005	172	8.57	52.90	12.20	9.88	25.00
4 h	2018	101	5.00	45.54	16.83	6.93	30.69
8 h	2011	95	4.72	14.74	14.74	9.47	24.21
24 h	2070	71	3.43	47.89	18.31	8.45	25.35
48 h	2185	72	3.30	34.72	20.83	11.11	34.33
72 h	1988	81	4.04	35.80	19.75	16.05	28.40

IV.4.4.2. Discusión de resultados

Como puede observarse en la Fig. 56, después de 4h de tratamiento con amirina, el IM descendió claramente en relación al control. Este valor obtenido, prácticamente se mantiene durante las 72h del experimento. No se produce detención ni alteraciones apreciables en ninguna fase de la mitosis.

El tratamiento con ácido ursólico produjo un efecto mitodepresivo aunque, como en el ensayo anterior, no se consiguió una completa inhibición de la mitosis de las células meristemáticas a los diferentes tiempos establecidos (Fig. 57). Tampoco se apreciaron alteraciones celulares significativas.

Figura 56. Efecto de α -amirina sobre el Índice Mitótico a diferentes tiempos de tratamiento

IM

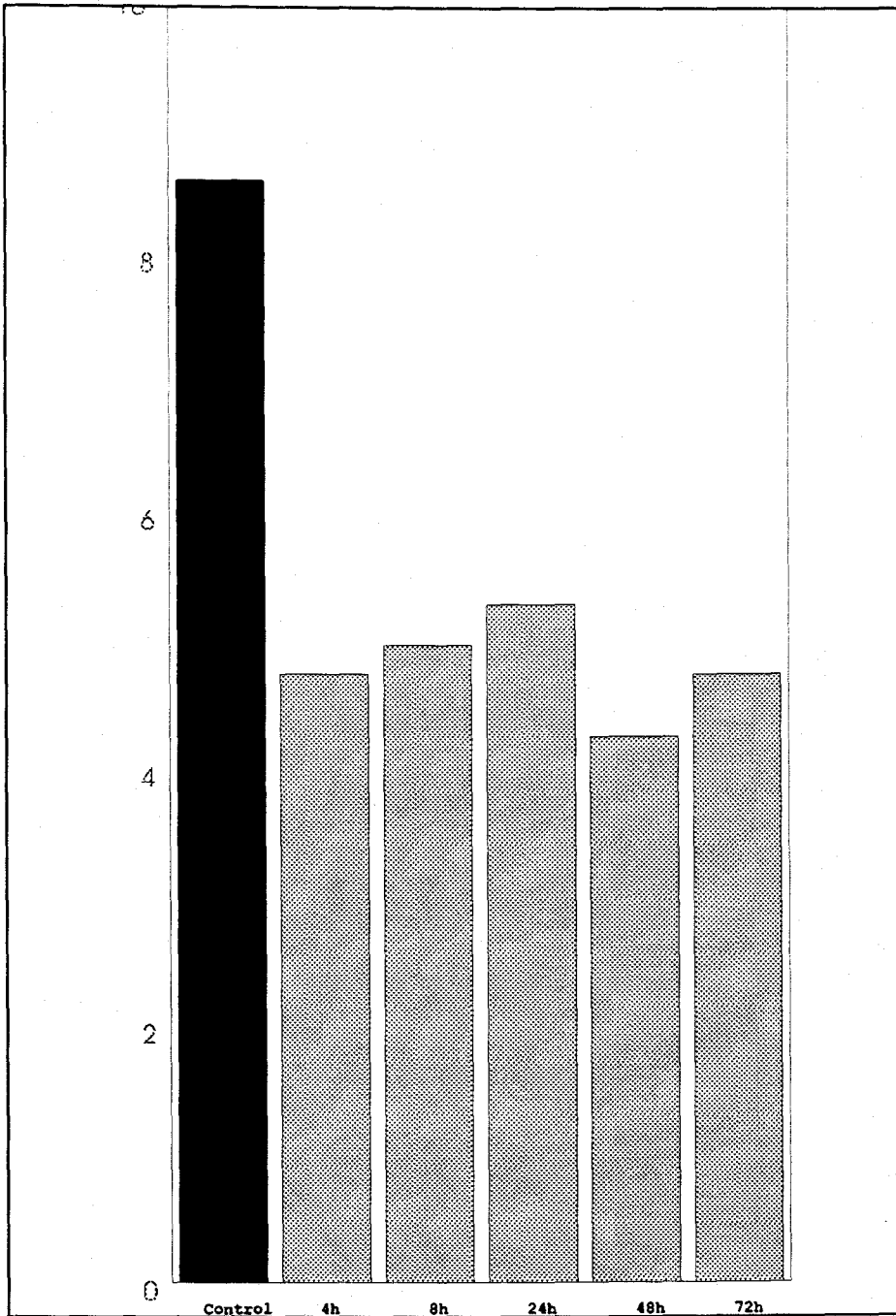
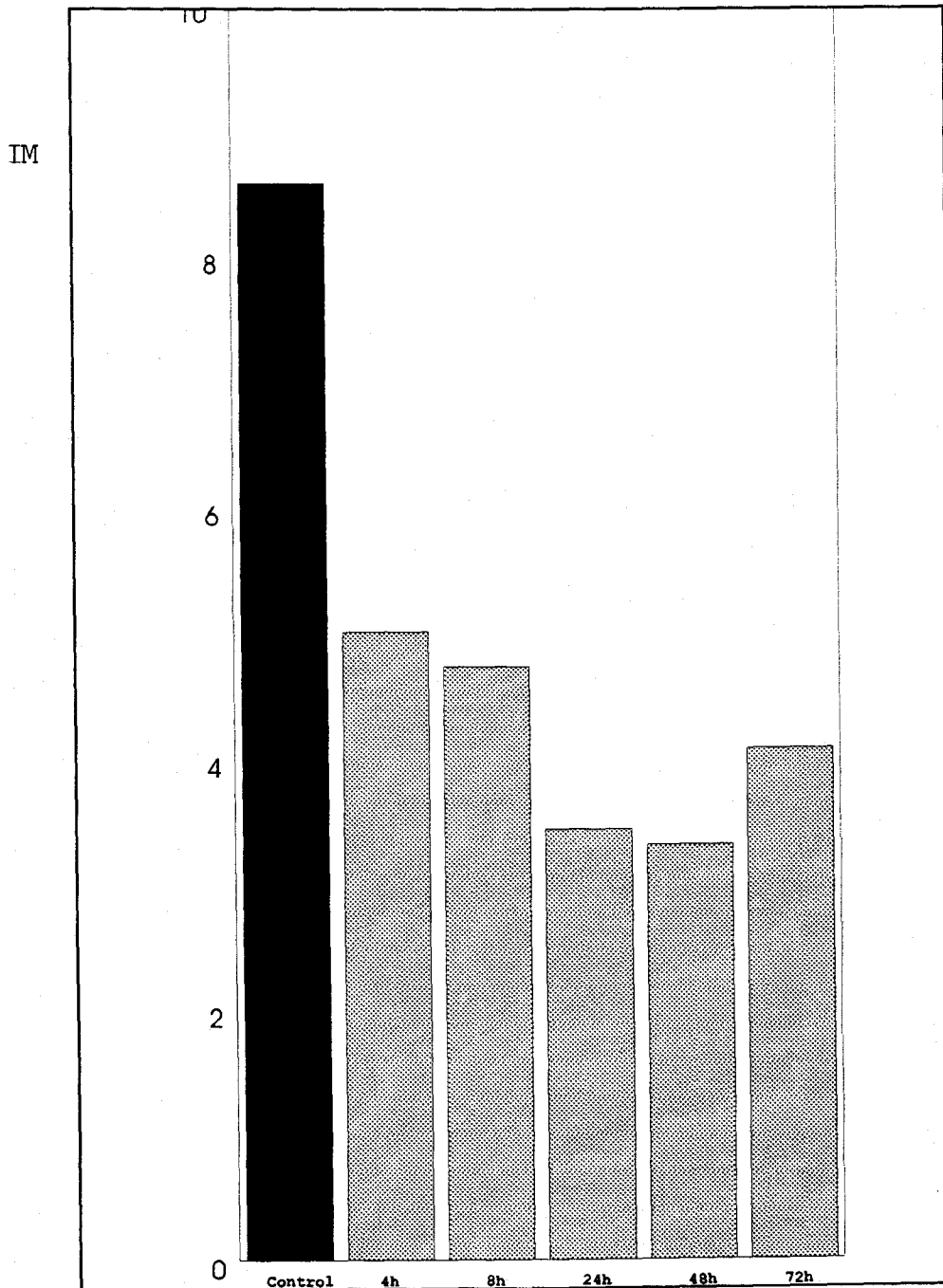


Figura 57. Efecto del ácido ursólico sobre el Índice Mitótico a diferentes tiempos de tratamiento



IV.4.5. Actividad antimicrobiana

Con objeto de conocer los principios que contribuyen a la actividad antimicrobiana detectada con anterioridad para esta especie (TORO et al., 1984; 1987)(AUMENTE et al., 1988), hemos ensayado con los compuestos triterpénicos "M₄" y "M₅" aislados del extracto Clorofórmico.

IV.4.5.1. Resultados

El estudio de la actividad antimicrobiana de los compuestos "M₄" y "M₅" aislados del extracto clorofórmico se realizó según metodología descrita en el apartado III.8

Los valores de los correspondientes halos de inhibición (mm) figuran en la Tabla 30.

Tabla 30. Halos de inhibición (mm) obtenidos con M₄ α-amirina

	Dosis (r.s., mg)		
	0.25	0.50	1
Bacterias Gram (+)			
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 33085	6	6	7
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	6.3	6.3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	5.3	5.6	6.3
Bacterias Gram (-)			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> *	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> CCM 180	-	-	-
<i>Salmonella thyphimonium</i> ATCC 140028	-	-	-
<i>Klebsiella neumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-
Hongos			
<i>Candida lusitaniae</i> ATCC 34449	-	-	-
<i>Candida obtusa</i> CBS 1944	-	-	-
<i>Saccharomyces uvarum</i> ATCC 28097	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S 288 C	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> PO 5	-	-	-

* aislado clínicamente

Tabla 31. Halos de inhibición (mm) obtenidos con M₅ ácido ursólico

	Dosis (r.s., mg)		
	0.25	0.50	1
Bacterias Gram (+)			
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 33085	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	-	-	-
Bacterias Gram (-)			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> *	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> CCM 180	-	-	-
<i>Salmonella thyphimonium</i> ATCC 140028	-	-	-
<i>Klebsiella neumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-
Hongos			
<i>Candida lusitaniae</i> ATCC 34449	-	-	-
<i>Candida obtusa</i> CBS 1944	-	-	-
<i>Saccharomyces uvarum</i> ATCC 28097	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S 288 C	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> PO 5	-	-	-

IV.4.5.2. Discusión de resultados

Ninguno de los principios en estudio se muestra activo frente a las bacterias Gram (-) ensayadas. Con las Gram (+), sólo la α -amirina presenta actividad, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.50 mg para *Bacillus cereus* e inferior a 0.25 mg para *B. megaterium* y *Staphylococcus aureus*. Ambos compuestos fueron inactivos frente a los hongos ensayados.

Es de destacar el distinto comportamiento de los dos principios, a pesar de derivar ambos del núcleo del ursano, hecho que podría ser debido a la presencia del grupo carboxílico, lo que no concuerda con la opinión de otros autores (BEZANGER-BEAUQUESNE, 1990) que atribuyen una mayor actividad a los ácidos orgánicos.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA:

A partir de la sumidad florida de *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera (Ericaceae) han sido obtenidos, por el método de Netien-Lebreton, los extractos **Clorofórmico** (caracterizado por la presencia mayoritaria de compuestos triterpénicos), **Etéreo** y **Acetato de Etilo** (ambos de gran riqueza en flavonoides).

SEGUNDA:

Del extracto Acetato de Etilo (AcOEt) se aisló el compuesto **M₁**, que se identificó por métodos espectroscópicos, como un heterósido flavonoide. Los estudios realizados sobre las fracciones resultantes de la hidrólisis ácida, nos mostraron que la cadena osídica estaba constituida por una molécula de galactosa y que la genina correspondía al flavonol miricetina; por tanto, el compuesto en estudio se identificó con **3-O-mono-D-galactósido de la miricetina (3-GM)**.

TERCERA :

La eficacia del extracto AcOEt y 3-GM frente a diferentes modelos experimentales de úlcera gástrica, pone de manifiesto un claro perfil antiulceroso para ambos. Los resultados obtenidos tras someter a los animales a un estado de inmovilización y frío, nos muestran tanto para el extracto como para el flavonoide aislado un comportamiento muy similar, en relación al nivel de protección gástrica; no se consiguen incrementos notablemente significativos en la cantidad de moco, aunque sí se aprecia aumento destacado del contenido glicoproteico. En el modelo por ligadura de píloro, también previenen la ulcerogénesis; si bien, este efecto protector no viene acompañado de una reducción paralela de la acidez ni del volumen de jugo gástrico; en consecuencia, se sugiere mecanismos antiulcerosos diferentes a los antisecretores. Tras la administración oral de etanol absoluto, se observa una cierta actividad del extracto AcOEt, ya que el pretratamiento con las dosis superiores ensayadas inhibe la ulceración de manera significativa; en este caso, descartamos el protagonismo del moco gástrico en el mecanismo gastroprotector.

CUARTA :

Los resultados obtenidos tras la administración del extracto AcOEt, en relación al porcentaje de inhibición del incremento de la permeabilidad vascular inducido por histamina, nos ponen de manifiesto una marcada actividad vasoprotectora; esta actividad podría participar en los mecanismos gastroprotectores de dicho extracto.

QUINTA:

El extracto AcOEt muestra una potente actividad antirradicalaria frente a DPPH. Su contenido en flavonoides, especialmente en 3-GM, puede justificar el resultado obtenido; es posible que dicha actividad antioxidante participe activamente en el reforzamiento de los mecanismos fisiológicos mucosales defensivos.

SEXTA:

El extracto Etéreo de *Erica andevalensis*, con miricetina y quercetina como compuestos mayoritarios, produjo también una reducción de la incidencia y severidad de las lesiones gástricas agudas inducidas por diferentes agentes ulcerogénicos. Los resultados obtenidos tras someter los animales a un estado de inmovilización y frío, pusieron de manifiesto un marcado nivel de protección gástrica, similar al conseguido con Omeprazol y mayor que con el extracto AcOEt; no hubo incremento significativo en la cantidad de moco, aunque su contenido glicoproteico aumentó de forma destacada. En el modelo por ligadura de píloro, el extracto Etéreo previno la ulceración, si bien, de manera menos eficaz que el extracto AcOEt. Frente a la úlcera aguda inducida por la administración oral de etanol absoluto, el extracto Etéreo sólo manifestó actividad a la dosis más alta, no pudiendo establecerse, como para el extracto AcOEt, una relación directa entre peso de moco/contenido glicoproteico y protección gástrica.

SEPTIMA:

El estudio sobre la permeabilidad vascular del extracto Etéreo también mostró actividad vasoprotectora, aunque la inhibición de la exudación plasmática fue menor que la conseguida para el extracto AcOEt.

OCTAVA:

El extracto Etéreo posee una actividad antioxidante frente a DPPH ligeramente inferior a la del extracto AcOEt, pero comparable también a la del patrón de ácido ascórbico.

NOVENA:

Las anteriores conclusiones referentes a las propiedades vasoprotectora y antioxidante del extracto Etéreo, nos llevaron a su vez a concluir su relación con la capacidad citoprotectora del mismo.

DECIMA:

Del extracto Clorofórmico, de gran riqueza en compuestos triterpénicos, se aislaron los compuestos M_4 y M_5 . El primero, de P.F. 286°C, se identificó por métodos espectroscópicos con la α -amirina y el M_5 , de P.F. 186°C, correspondía con el ácido ursólico, característico y frecuente en Ericaceae y aislado por primera vez de dicha familia.

UNDECIMA :

El ensayo de antimitóticos en cultivo de células vegetales (bulbos de *Allium cepa* L.) de los compuestos **M₄** y **M₅**, nos puso de manifiesto que ambos son portadores de dicha actividad, aunque en ningún caso se consiguió una completa inhibición de las células meristemáticas a los diferentes tiempos establecidos.

DUODECIMA :

Del estudio de la actividad antimicrobiana de los compuestos **M₄** y **M₅**, sólo el primero, α -amirina, se mostró eficaz frente a bacterias Gram (+).

VI . BIBLIOGRAFIA

ALARCON DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; LOPEZ, A.; "Gastroprotection by flavonoids from *Dittrichia viscosa* W. Greuter. Role of endogenous prostaglandins and mucus secretion". *Plant. Med.*, 59, 485-578, 1993.

ALARCON DE LA LASTRA, C.; MARTIN, M^a J.; MOTILVA, V.; "Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin. A gross and histologic study". *Pharmacology*, 48, 56-62, 1994 (a).

ALARCON DE LA LASTRA, C.; MARTIN, M^a J.; MOTILVA, V.; LA CASA, C.; "Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Bidens aurea* (Aiton) Sherff: Comparison with ranitidine and omeprazol". *J. Ethnopharmacol.*, 42, 161-168, 1994(b).

ALCARAZ, M. J. ; MAS, J. A. ; UBEDA, A. ; MAÑEZ, S.; "Scavenging of hydroxyl radicals by antiperoxidative flavonoids". *Planta Med.*, 57, Supplement Issue 2, 1991.

ALONSO, J. L.; DE LANDA, F.; VIEITEZ, E.; "Inhibidores fenólicos de la germinación de *Erica arborea* L". *Ann. Edafol. Agrobiol.*, 35 (3-4), 367-375, 1976.

ANON; "Anthrordodendrin in treatment of chronic bronchitis". *Chin. Med. J.*, 53, 711-713, 1973.

ARINES, J.; MANTILLA, J.L.G.; VIEITEZ, E.; "Compuestos fenólicos en *Erica vagans* L." *Ann. Edafol.*, 33 (9-10), 891-899, 1974.

ARTECHE, A. ; *Fitoterapia. Vademecum de prescripción*. Ed. Cita, Bilbao, 1992.

AUMENTE, M^a D.; AYUSO, M^a J.; GARCÍA, M^a D.; TORO, M^a V.; "*Les flavonols isolés d'Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera: contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'espèce". Plant. Méd. Phytothér., 22 (2), 113-118, 1988.

AZHUNOVA, T.A.; SAMBUENA, Z.G.; NIKOLAEV, S.M.; MATKHANOV, E.I.; NAGASLAEVA, L.A.; "*Bile expelling effects Arctostaphyllum uva-ursi extract*". Farmatsiya-Moscow, 37 (2), 41-43, 1988.

BAHORUN, T.; TROTIN, F.; POMMERY, J.; VASSEUR, J.; PINKAS, M.; "*Antioxidant activities of Crataegus monogyna extracts*"

BALLESTER, A.; VIEITEZ, E.; "*Estudio de sustancias de crecimiento aisladas de Erica cinerea L.*" Acta Científica Compostelana, 8, (2) 79-84, 1971.

BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M.; "*Estudio químico de compuestos alelopáticos presentes en Ericáceas*". Acta Química Compostelana, 1, 69-75, 1977.

BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M.; "*Estudio de potenciales alelopáticos en comunidades vegetales*". Ann. Inst. Bot. J.A. Cavanilles, 34 (2), 715-722, 1978.

BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M.; VIEITEZ, E.; "*The Allelopathic potential of Erica australis L. and Erica arborea L.*" Bot. Gaz., 140 (4), 433-436, 1979.

BALLESTER, A.; "*La alelopatía y su aplicación a la mejora de la producción agrícola*". Acta del III Congreso Nacional de Química Agrícola y Alimentaria, EFCE Publication Series, 12 (1), 283-288, 1980a.

BALLESTER, A.; "*Hacia el uso de herbicidas naturales*". Las Ciencias, 45 (2-3), 218-220, 1980b.

BANK, S.; BIELE, D.; "The stomach". en: Current Gastroenterology vol. 11 (gastric Ed.). Mosby. New York, 52-53, 1990.

BARBERA, J.A.; "*Los radicales libres*". P. A. M., 18 (177), 477-478, 1994.

BERMEJO, J.; BRETON, J.L.; GONZALEZ, A.G.; VILLAR, A.; "*Terpenoides de los Sonchus. VII Lactonas Sesquiterpénicas de Sonchus hierrensis (Pit). Svent. Stat. Nov. var. benehoavensis. Svent. var. nova*". Ann. Real Soc. Esp. Fís. Quím., 54 893-898, 1.968.

BETTINI, V.; MAYELLARO, F.; PILLA, I.; TON, P.; MARIN, V. T. W.; "*Mechanical responses of isolated coronary arteries to barium in the presence of Vaccinium myrtillus anthocyanosides*". Fitoterapia, 56 (1), 3-10, 1.985.

BETTINI, V.; ARGNO, R.; BETTINI, M. B.; BRAGGION, G.; CALORE, L.; MORIMANDO, I.; PENADA, G.; SABBION, P.; "*Facilitating influence of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on the acetylcholine-induced relaxation of isolated coronary arteries: role of the endothelium derived relaxing factor*". Fitoterapia, 64 (1), 47-57, 1.993.

BEZANGER-BEAUQUESNE, L.; "*Nouveaux aspects des plantes médicinales usuelles*". Plant. Méd. Phytothér., 19 (2), 109-155, 1985.

BEZANGER-BEAUQUESNE, L.; PINKAS, M.; TORK, M.; *Les plantes dans la thérapeutique moderne*. Ed. Maloine, S.A., París, 1.986.

BEZANGER-BEAUQUESNE, L.; PINKAS, M.; TORK, M.; TROTIN, F.; *Plantes médicinales des régions tempérés*. 2ª ed.; Ed. Maloine, París, 1990.

BOAS, N.F.; "*Method for the determination of hexosamines in tissues*". J. Biol. Chem., 204, 553-563, 1.953.

BOTTECCHIA, D.; BETTINI, V.; MARTINO, R.; CAMERRA, G.; "Preliminary report on the inhibitory effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on platelet aggregation and clot retraction". *Fitoterapia*, 58 (1), 3-8, 1.987.

BRODIE, D.A.; "The mechanism of gastric hyperacidity produced by pyloric ligation in the rat". *Am. J. Dig. Dis.*, 11, 231-241, 1.966.

BROOKS, F.P.; *Fisiopatología de la úlcera péptica*. Revisión en: *Úlcera péptica*. Brooks, F.P., Cohen, S.; Soloway, L.D.; (Eds.). Churchill Livingstone, New York, 1985.

BRUNETON, J.; *Pharmacognosie*. 2ª ed. Ed. Technique et Documentation-Lavoisier, París, 1993.

BULBENA, O.; ESCOBAR, G.; ESPLUGUES, J.V.; MARTI-CABRERA, M.; ESPLUGUES, J.; "Efectos del acexamato de zinc sobre la síntesis de moco gástrico en la úlcera por estrés. Estudio comparativo con otros fármacos". *Rev. Farmacol. Clin. Exp.*, 3, 105-109, 1.986.

CABEZUDO, B.; RIVERA, J.; "*Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera, S. P. NOV". *Lagasalia*, 9 (2), 223-226, 1.980.

CARBALLEIRA, A.; "Phenolic inhibitors in *Erica australis* L and associated soil". *J. Chem. Ecol.*, 6 (3), 593-596, 1.980a.

CARBALLEIRA, A.; CUERVO, A.; "Seasonal variation in allelopathic potential of soils from *Erica australis* L. heathland". *Ecol. Plant.*, 1 (15), nº4, 345-353, 1.980 (b).

CECCHINI, T.; *Enciclopedia de las hierbas y plantas medicinales*. Ed. De Vecchi, Barcelona, 1990.

CHAUVIN, R.; LAVIE, P.; "*Antibiotic substance of pollen*". Ann. Inst. Pasteur, 90, 523-527, 1.956.

CHO, C.H.; OGLE, C.W.; "*Modulatory action of adenosine on gastric function and ethanol-induced mucosal damage in rats*". Dig. Dis., 35, 1334-9, 1990,

CHO, C.H.; KOO, M.; GARG, G.P.; OGLE, C.W.; "*Stress-induced gastric ulceration: actiology and clinical implications*". Scand. J. Gastroenterol., 27, 257-62 , 1992

CILLARD, J.; CILLARD, P.: "*Composés phénoliques et radicaux libres*". S.T.P. Pharma, 4, (7), 592-596, 1988.

CIPOLLINI, M.L.; STILES, E.W.; "*Antifungal activity of ripe ericaceous fruits: Phenolic-acid interactions and palatability for dispersers*". Farm. OBC, 58, 349-354, 1989.

CONSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; RASTELLI, G.; BENVENUTI, S.; "*Activity of Polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase*". Planta Med., 58 (4), 342-344, 1.992.

CRISTONI, A.; MAGISTRETTI, M. J.; "*Antiulcer and healing activity of Vaccinium myrtillus anthocyanosides*". Farmaco. Ed. Prat, 42, 29-43. 1.987.

DATES, P.; HAKKINEN, J.P.; "*Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats*". Gastronterology, 94, 10-21, 1988.

DE BENITO, N.; "*Brezales y brezos*". Ministerio de Agricultura. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid, 19 (39), 1948.

DE LA CRUZ, J.P.; SANCHEZ DE LA CUESTA, F.; "Radicales libres derivados del oxígeno: Implicaciones tisulares y posible prevención farmacológica". En: Marín Jastraque, L.E.; Avances en cardiopatía isquémica. Ed. Salvat, Barcelona, 1990.

DOBHAL, M.P.; JOSHI, Y.C.; YOSHI, P.; "Review on genus *Rhododendron*. Part 2". Herbal Pol., 37 (2), 89-94, 1991.

DUKE, J.A.; *Handbook of Medicinal Herbs*. Ed. CRC Press, 1986.

EVANS, ; *Farmacognosia. Trease-Evans*. 13ª ed., Ed. Interamericana. Ed. Mc Graw-Hill. Madrid, 1991.

FANG, P.; McLAUGHIN, J.L.; "Ursolic acid, a cytotoxic component of the berries of *Ilex verticillata*". Fitoterapia, 61 (1), 176-7 (1990)

FERNANDEZ, M.; NIETO, A.; *Plantas Medicinales*. Ed. Eunsa, Pamplona, 1982.

FERNANDEZ, M.G.S.; ZARAGOZA, F.; ALVAREZ, P.; "In vitro platelet aggregation effects of anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* L". Ann. Real Acad. Farm., 49 (1), 79-90, 1983.

FERNANDEZ, J.; *Recetario de plantas medicinales*. Ed. Omega, Barcelona, 1992.

FONT QUER, P.; "Plantas medicinales", 3ª ed.; Ed. Labor, Barcelona, 1990.

FORNESS, M.; O'CONNELL, D.; "North american indian hallucinogen use". Northwest Anthropol. Res. Notes, 15 (1), 65-66, 1981.

FRAGA, C.G.; MARTINO, V.S.; FERRARO, G.E.; COUSSIO, J.D.; BOVERIS, A.; "*Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence*". *Biochem. Pharmacol.*, 36 (5), 717-720, 1987.

FROHNE, D.; "*Urinary antiseptic effect of bearberry leaf extracts*". *Planta Med.*, 18, 1-25, 1970.

GARCIA, A.M.; ROS, E.; *Fisiopatología*. En: *Úlcera Péptica Gastroduodenal*, Vilar-Bonet J. (Eds.), Ediciones Doyma, Barcelona, pp. 14-44, 1984.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S.; "*Experimental gastric mucosal impiry laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies*". *FASEB J.*, 6, 825-831, 1992.

GONZALEZ-TEJERO, M.R.; "*Investigaciones etnobotánicas en el municipio de Güejar-Sierra*". Tesina de Licenciatura, Granada, 1985.

GREUTER, W.; VURDET, H.M.; LONG, G.; *Med-Checklist*. III. Ed. Optima. Genève, 1986.

GRUPE, R.; "*Influence of cyclooxygenase-(COX-) and lipoxygenase- (LOX-) inhibition on the degranulation of activated peritoneal rat mast cells (pRMC) in vitro*". *Agents and Actions*, 2, 1-2, 1.991.

HALLARD, F.; "*Phytothérapie*", Ed. Masson, París, 1988.

HOLOPAINEN, M.; JAHODAR, L.; SEPPANEN-LAKKSO, T.; LAKKSO, I.; KAUPPINEN, V.; "*Antimicrobial activity of some finnish Ericaceous plants*". *Acta Pharm. Fenn.*, 97 (4). 197-202. 1.988.

IIO, M.; MORIYAMA, A.; MATSUMOTO, Y.; TAKAKI, N.; FUKUMOTO, M.; "Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids". *Agric. Biol. Chem.*, 49 (7), 2173-2176, 1985.

ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; TAKAGI, S.; "Studies on iridois related compounds. II. Structure and antimicrobial activity of aglucone of galioside and gardenoside". *J. Nat. Prod.*, 532-536, 1983.

ISHII, Y.; "Critical studies of the pylorus ligated rat. (Shay rat)". *Jap. J. Pharmacol.*, 19, 125-133, 1969.

JAHODAR, L.; JLEK, P.; PATKOVA, M.; DVORAKOVA, V.; "Antimicrobial action of arbutin and the extract from the leaves of *Arctostaphylos uva-ursi* in vitro". *Cesk-Farm*, 34 (5), 174-178, 1985.

JONADET, M.; MEUNIER, M.T.; BASTIDE, P.; "Anthocyanosides extraits from *Vitis vinifera*, *Vaccinium myrtillus* and *Pinus maritimus*. Part. 1. Elastase inhibiting activities in vitro. Part. 2. Compared angioprotective activities in vivo". *J. Pharm. Belg.*, 38, 41-46, 1983.

KLOCKE, J.A.; MEI-YING, H.U.; SHIN-FOON, CH.; KUBO, I.; "Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticide from *Rhododendron molle*". *Phytochemistry*, 30, (6), 1797-1800, 1991.

KUBO, M.; ITO, M.; NAKATA, H.; MATSUDA, H.; "Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng I. combined effect of 50 percent methanolic extract from *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng. Bearberry leaf and prednisolone on immunoinflammation". *Yakugaku Zasshi*, 110 (1) 59-67, 1990.

KREBS, K.G.; HEUSSER, D.; WIMMER, H.; "Spray reagents" en Sthal, E., *Thin-layer chromatography*, 2^a Ed., Springer-Verlag, Berlin, 854-909, 1968.

KYRBY, W.M.; BAUER, A.W.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M.; "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc methods". Am. J. Clin. Pathol., 45, 493, 1966.

LAMAISON, J.L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A.P.; CARNAT, A. "Activités antiradicalaires in vitro d'huiles essentielles" Plant. Méd. Phytothér., 22 (4), 231-234, 1988.

LAMAISON, J.L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; "Dérivés hydroxycinnamiques et flavonoïdes dans le genre *Prunella* (Lamiaceae): Activités antioxydantes et intérêt chimiotaxonomique". Plant. Méd. Phytothér., 24 (3), 150-151, 1990 (a).

LAMAISON, J.L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A.; "Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées médicinales". Ann. Pharm. Fr., 48, (2), 103-108, 1990.

LAMAISON, J.L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A.; "Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivative contents and antioxidant activity of medicinal Apiaceae, Borraginaceae and Lamiaceae". Ann. Pharm Fr., 48, 103-108, 1990 (c).

LAMAISON, J.L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A.; "Lamiacees médicinales á propriétés antioxydantes, sources potentielles d'acide rosmarinique". Pharm. Acta Helv., 66, (7), 185-188, 1991.

LAMAISON, J.L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; DUKE, J.A.; WALKER, J.; "Hydroxycinnamic derivate levels and antioxidant activity in North American Lamiaceae". Plant. Méd. Phytothér., 26 (2), 143-148, 1993 (a).

LAMAISON, J.L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A.; "Teneurs en polyphénols et activités antioxydantes chez les geraniaceae françaises". Plant. Méd. Phytothér., 26 (2), 130-134, 1993(b).

LARSON, R.A.; " *The antioxidants of higher plants*". Review Article Number 30. *Phytochemistry*, 27 (4), 969-978, 1988.

LECLERC, H.; "*Précis de Phytothérapie*", 5^a ed., Ed. Masson et Cie., Paris, 1.966.

LEE, K.; LIN, Y.; WU, T.; ZHANG, D.; YAMAGISHI, T.; HAYASHI, T.; HALL, I.; CHANG, J.; WU, R.; YANG, T.; "*The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens* and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives*". *Plant. Méd.*, 54 (4), 308-311, 1988.

LEVAN, A.; LOTFY, T.H.; "*Naphthalenacetic acid in the Allium test*". *Hereditas*, 35, 336-374, 1.949.

LOWRY, D.H.; ROSEBROUG, N.J.; FAAR, A.L.; RANDALL, R.J.; "*Protein measurement with the phenol reagent*"; *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1.951.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B.; "*The systematic identification of flavonoids*", Springer-Verlag, Berlín, 1970.

MAGISTRETI, M.J.; CONTI, M.; CRISTONI, A.; "*Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus**". *Arzneim-Forsch*, 38 (5), 686-690, 1988.

MARHUENDA, E.; GARCÍA, M.D.; "*Mise en évidence des propriétés antimicrobiennes des sommités fleuries d'*Ononis natrix* L. Identification de l'acide férulique*". *Plant. Méd. Phytothér.*, 19 (3), 163-172, 1.985.

MARTIN FERRERO, P.; "*Las plantas medicinales de la provincia de Cádiz*". Diputación de Cádiz, 1983.

MATSUDA, H.; NAKATA, H.; TANAKA, T.; KUBO, M.; "*Pharmacological study on *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng II. Combined effects of arbutin and prednisolone or dexamethasone on immuno-inflammation*". *Yakugaku Zasshi*, 110 (1), 68-76, 1990.

MATSUDA, H.; TANAKA, T.; KUBO, M.; " *Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva ursi* L. spreng III. Combined effect of arbutin and indomethacin on immuno-inflamation* ". *Yakugaku Zasshi*, 111 (4-5), 253-258, 1.991.

MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; SHIOMOTO, H.; TANAKA, T.; KUBO, M.; "*Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos-uva-ursi* L. Spreng IV. effect of 50 percent methanolic extract from *Arctostaphylos-uva-ursi* L.Spreng bearberry leaf on melanin*". *Yakugaku Zasshi*, 112 (4), 276-282 1.992 (a).

MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; TANAKA, T.; KUBO, M.; " *Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos-uva-ursi* L.spreng. V.effect of water extract from *Arctostaphylos-uva-ursi* L.spreng. bearberry leaf on the antiallergic and antinflammatory activities of dexamethasone ointment*". *Yakugaku Zassh*, 112 (9), 673-677, 1.992 (b).

METCALFE, C.R.; CHALK, L.; "*Anatomy of the Dicotyledons*". Ed. Oxford at the Claredons Press, 2, Oxford, 1965.

MEUNIER, M. T.; DUROUX E.; BASTIDE P.; "*Activité antiradicalaire d'oligomères procyanidoliques et d'anthocyanosides vis-à-vis de l'anion superoxyde et vis-à-vis de la lipoperoxydation*". *Plant. Méd. Phytothér.*, 23 (4), 267-274, 1989.

MIDDELKOOP, T.B.; LABADIE, R.P.; "*In vitro examination of bark extracts from *Saraca asoca* (Roxb.) de Wilde and *Rhododendron arboreum* Sm. for oxytocic activity*". *Int. J. Crude Drug Res.*, 24, 41-44, 1986.

MOATI, R.; FAURON, R.; DONADIEU, Y.; *La phytothérapie*. Ed. Maloine, Paris, 1983.

MOLISCH, H.; "*Der einfluss einer planze auf die anderree-allelopathie*". Gustav Fischer, Jena, 1937.

MORAZZONI, P.; MAGISTRETTI, M J.; "*Effects of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on prostacyclin-like activity in rat arterial tissue*". *Fitoterapia*, 57, (1), 11-14, 1.986.

MORAZZONI, P.; MAGISTRETTI, M J.; "*Activity of mystocyan an anthocyanoside complex from Vaccinium myrtillus VMA on platelet agregation and adhesivennes*". *Fitoterapia*, 61, 13-22, 1.990.

MOZSIK, G.Y.; KISS, B.; DRAUSZ, M.; "*A biochemical cellular morphological explanation of the development of gastric ulcer in Shay rats*". *Scand. J. Gastroenterol.*, 4, 633-640, 1.969.

NAVARRO, C.; *El Mundo Vegetal, nuestro aliado*. Facultad de Farmacia. Granada, 1993

NAKANISHI, T.; INADA, A.; MURATA, H.; IINUMA, M.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, H.; KATO, M.; MIZUNO, M.; NAKANE, H.; ONO, K.; LANG, F. A.; MURATA, J.; "*Antiviral and anti tumour activities of some western north American plants whith surface exudates (1) inhibitory effects of HIV-1 reserve transcriptase*". *Shoyakugaku Zasshi*, 47 (3), 295-300, 1.993.

NEGRE-SALVAYRE, A.; AFFANY, A.; HARITON, C.; SALVAYRE, R.; "*Addition Antilipoperoxidant Activities of Alpha-Tocopherol and Ascorbic Acid on Membrane-Like Systems Are Potentiated by Rutin*". *Pharmacology*, 42, 262-272, 1991.

NETIEN, G.; LEBRETON, P.H.; "Sur les flavonoïdes et autres substances polyphénoliques du *Millepertuis hypericum nummularium L.*" Ann. Pharm. Fr., 22, 69, 1.964.

PARIS, RR.; MOYSE, H.; *Précis de matière médicale*. Tomo III. ed. Masson. París, 1971.

PASCUAL, M.; GARCIA, M.D.; TORO, M.V.; SAENZ, M.T.; "Actividad antimutagénica del extracto acuoso ácido y de la fracción de ácidos fenólicos de *Erica andevalensis Cabezudo-Rivera*". Il Farmaco, 4, 111-115, 1.987.

PENSO, G.; *Piante medicinali nella terapia medica: Compendio di farmacognosia pratica per medici e farmacisti*. 2ª ed. OEMF spa, Milano, 1989.

POLUNIN, O.; SMITHIES, B.E.; *Guía de Campo de las Flores de España. Portugal y Sudeste de Francia*. Ed. Omega, Barcelona, 1.977.

PULLIERO, G.; MONTIN, S.; BETTINI, V.; MARTINO, R.; MOGNO, C.; CASTRO, G L.; "Ex vivo study of the inhibitory effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on human platelet aggregation". Fitoterapia, 60 (1), 69-76, 1.989.

ROBAK, J.; SHRIDI, F.; WOLBIS, M.; KROLIKOWSKA, M.; "Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation". Pol. J. Pharmacol. Pharm., 40, 451-458, 1988.

ROBERT A.; "Cytoprotection by prostaglandins". Gastroenterology, 77, 761-767, 1979.

ROBERT, A. M.; GODEAU G.; MOATI F.; MISKULIN M.; " *Action of anthocyanosides of Vaccinium myrtillus on the permeability of the blood brain barrier*". J. Med. (Westbury), 8, (5), 321-332, 1.977.

ROMBI, M.; *100 Plantes Médicinales*. Ed. Romart, Bergamo, Italia, 1991.

ROMBI, M.; LECOME, A.; *Tratado de Fitomedicina*. Ed. Asociación de Medicinas Complementarias. Madrid, 1992.

RUBIO C.; MAZAGATOS, M^a C.; " *Vademecum de medicina natural*", Ed. Gaia. Madrid, 1993.

SALAH, E.; MAHGOUB, O.; BERTRAM, ; HUDSON, J.F.; " *Inhibition of the Pro-Oxidant Activity of Copper by Primary Antioxidants in Lard*". Food Chemistry, 16, 97-101, 1985.

SALAS, C.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, E.; " *Estudio biológico y químico de Erica umbellata L.*". Ann. Edafol. Agrobiol., 32 (9-10), 807-814, 1.973.

SAN MARTÍN CASAMADA, R.; " *Tratado de Farmacognosia*". Ed. Científico Médica, Barcelona, 1.977.

SCHAUENBERG, P.; PARIS, F.; *Guide des plantes médicinales*. Ed. Delachaux & Niestlé. París, 1977.

SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTMANN, K.; " *On the molluscicidal activity of tannin containing plants*". Planta Med., 48, 105-107, 1983.

SENAY, E.C.; LEVINE, R.J.; "*Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcer in rats*"; Proc. Soc. Exp. Biol. 124, 1221-1223, 1.967.

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D.; GRUSTEIN, M.; SIMPLER, H.; "*A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat*". Gastroenterology, 5, 43-61, 1.945.

SHINODA, J.; J. Pharm. Soc. Japan, 48, 214 (1928) en K. VENKATARAMAN." The Chemistry of flavonoid compounds". Ed. T.A. Geissman, Pergamon-Press, Oxford, 1962,.

SIMERAY, J.; CHAUMONT, J.P.; MARECHAL, G.; "*Propriétés antagonistes de cent extraits de plantes supérieures vis-a-vis de vingt champignons parasites de l'homme ou des végétaux*". Plant. Méd. Phytothér., 25 (3), 183-188, 1981.

SIMON, A.; NAJID, A.; CHULIA, A.J.; DELAGE, C.; RIGAUD, M.; "*Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (Calluna vulgaris)*". Biochim. Biophys. Acta, 1125 (1), 68-72, 1992.

SORIANO, F.; "*Manual de bacteriología (Recopilación de técnicas)*". Laboratorios Difco , Madrid, 1.976.

STHAL, E.; "*Thin layer chromatography*", 2ª Ed., Springer-Verlag, Berlín, 1.969.

STRAPKOVA, A.; JAHODAR, L.; NOSAL'OVA, G.; "*Antitussive effect of arbutin*". Pharmazie, 46 (8), 611-612, 1.991.

SZABO, S. ; GOLDBERG, I.; "*Experimental patogenesis: Drugs and chemical lesions in the gastric mucosa*". Scand. J. Gastroenterol., 25 (174), 1-8, 1990.

TAKAGI, K., OKABE, S.; "*Studies on the mechanism involved in the production of stress and stress-atropinc ulcers in rats*". Eur. J. Pharmacol., 10, 378-84, 1970.

TJIO, J.H.; LEVAN, A.; "*The use of oxiquinoline in chromosome analysis*", Ann. Estac. Exp. Aula Dei, 2, 21-64, 1.950.

TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P.; "*Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical*". Phytochemistry., 25, (2), 383-385, 1986.

TORO, M.V.; RIQUELME, M.J.; "*Iniciación al estudio de Erica andevalensis Cabezudo-Rivera*". Pharm. Med., 379-391, 1.984.

TORO, M.V.; GARCIA, M.D.; PASCUAL, M.; "*Isolement et identification des acides phénols chez Erica andevalensis Cabezudo-Rivera: leur contribution á l'activité antimicrobienne de l'espèce*". Ann. Phar. Fr., 45 (5), 401-407, 1.987.

TORO, M.V.; GARCIA, M.D.; AUMENTE, M.D.; "*Étude de l'activité diurétique d'Erica andevalensis Cabezudo-Rivera*". Plant. Méd. Phytothér., 22 (3), 171-174, 1.988.

TSUKADA, H.; SEIND, Y.; VEDA, S.; UCHIND, H.; SAKAI, M.; "*Influence of water-immersion stress on synthesis of mucus glycoprotein in the rat gastric mucosa*". Scand. J. Gastroenterol., 24, 19-22, 1989

TUTIN, T.G.; HEYWOOD, V.H.; "*Flora Europea*". Ed. University Press Cambridge, 3, 1.972.

UDAKA, K.; TAKEUCHI, Y.; MOVAT, H.C.; "*Simple method for quantification of enhanced vascular permeability*". Proc. Soc. Experimenth. Biol. Med., 33, 1384-87, 1.970.

VALNET, J.; *Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes*. 4^a ed. Ed. Maloine, S.A., París, 1979.

VAN HELLEMONT, J.; *Compendium de Phytothérapie*. Ed. APB, París, 1.986.

VARRO, E.; LYNN, R.; JAMES, E.; *Pharmacognosy*. 9^aed. Ed. Lea&Febiger. Philadelphia, 1988.

VEITEZ, E.; BALLESTER, A.; "*Compuestos fenólicos y cumáricos en Erica cinerea L.*". Ann. Inst. Bot. A.J. Cavanilles, 29, 129-142, 1.972.

VIGNEAU, C.; *Plantes médicinales. Thérapeutique-Toxicité*. Collection de Médecine Légales et de Toxicologie Médicale. n° 129. Ed. Masson. París, 1985.

WALLIS, T.E.; *Manual de Farmacognosia*. Compañía editorial Continental, S.A., México, 1966.

WANSTON-FLATT, S.K.; DAY, C.; BAILEY, C.J.; FLATT, P.R.; "*Evaluation of traditional plant treatments for diabetes studies in streptozotocin diabetic mice*". Acta Diabetol. Lat., 26 (1),51-56, 1989.

WILSON, G.B.; MORRISON, J.H.; "*Citología*", 1^a Eed., C.E.C.S.A., Barcelona, 276, 1.971.

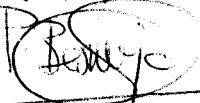
ZARAGOZA, F.; IGLESIAS, I.; BENEDI, J.; "*Estudio comparativo de los efectos antiagregantes de los antocianósidos y otros agentes*" Arch. Farmacol. y Toxicol., 11, 183, 1985.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

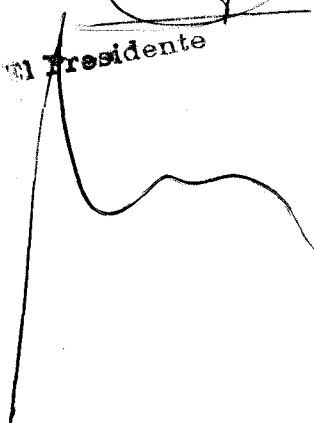
Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. Melanie Reyes Ruiz
titulada Estudio Farmacognosico de *Epilobium andivale* L.f.
Labrado - Ruiz
acordó otorgarle la calificación de Apto Cum Laude

Sevilla, 18 de Abril 1997

El Vocal,



El Presidente




El Vocal,



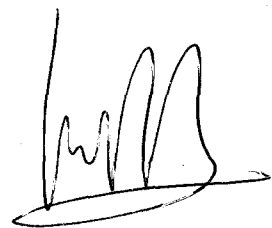
El Secretario,

teteine claus

El Vocal,



El Doctorado,



X