

R. 3248

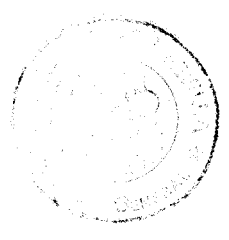
T-427

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA

FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA
FACULTAD DE FARMACIA
CALLE SANTIAGO COMES 25-590
TEL. 12-6-90
SEVILLA 18 de Junio de 1990
REVISOR DE...

ESTUDIO FARMACOLOGICO DE GENISTA TRIDENTATA L.:
ACCION DE GENISTEIN SOBRE LA MUSCULATURA LISA

Fin Huende

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

... del libro
106 ... 20 ...

El Jefe del Negociado de Tesis,
Anna Saffitte

Tesis Doctoral para aspirar al
grado de Doctora en Farmacia,
presentada por la Licenciada
Ma Dolores Herrera González.

Ma Dolores Herrera

Sevilla, Mayo de 1990

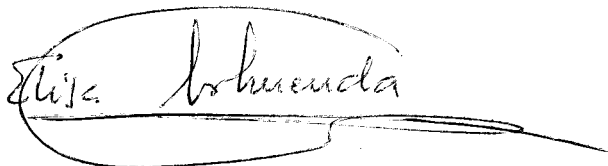
Elisa Marhuenda Requena , Catedrática del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "Estudio farmacológico de *Genista tridentata* L.: Acción de Genistein sobre la musculatura lisa", realizada por la Licenciada en Farmacia Ma Dolores Herrera González para optar al grado de Doctora, ha sido llevada a cabo bajo mi dirección.

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

Sevilla, 16 de Mayo de 1990

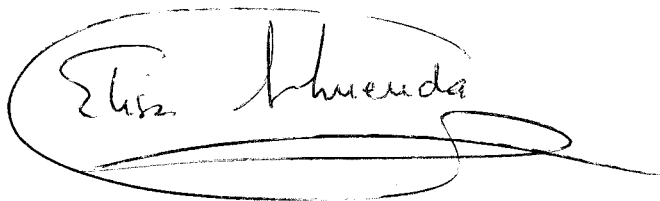
A handwritten signature in cursive script, reading "Elisa Marhuenda", enclosed within a large, hand-drawn oval. A long horizontal line extends from the right side of the oval.

Elisa Marhuenda Requena

ELISA MARHUENDA REQUENA, Catedrática de Farmacodinamia y Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la memoria de la Tesis para optar al grado de Doctora, presentada por la Licenciada D^a M^a Dolores Herrera González, ha sido dirigida por mí y realizada en el Laboratorio 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 dieciseis de Mayo de mil novecientos noventa.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature appears to read "Elisa Marhuenda" with a decorative flourish extending from the bottom right.

Mi agradecimiento a la Dra. Elisa Marhuenda Requena, quien con sus continuas ideas y consejos ha hecho posible la realización de este trabajo, brindándome su experiencia que de forma tan decisiva ha contribuido a mi formación.

 También quiero expresar mi agradecimiento a aquellas personas que de una forma u otra han colaborado en la elaboración de mi Tesis Doctoral. Especialmente al Dr. Alan Gibson, ofreciéndome su constante ayuda durante toda mi estancia en Londres, transmitiéndome día a día su inquietud por la Farmacología; a la Dra. Ma Teresa Sáenz Rodríguez y a mis compañeras de Departamento que tantas veces me han alentado durante todos estos años.

A mi familia

Sumario

I - OBJETO	1
II - REVISION BIBLIOGRAFICA	4
II.1 <u>ESTUDIO BOTANICO DE GENISTA TRIDENTATA L.</u>	5
II.1.1. SITUACION TAXONOMICA	5
II.1.2. DESCRIPCION DEL GENERO GENISTA	5
II.1.3. DESCRIPCION DE LA ESPECIE	6
II.1.3.1. <u>Distribución general</u>	8
II.1.3.2. <u>Sinonimias</u>	8
II.1.3.3. <u>Nombres vulgares</u>	8
II.2. <u>FITOQUIMICA Y EMPLEOS TERAPEUTICOS DEL GENERO GENISTA</u> .	9
II.2.1. ALCALOIDES	9
II.2.2. FLAVONOIDES	12
II.2.3. APLICACIONES TERAPEUTICAS DEL GENERO	16
II.3. <u>ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DE ISOFLAVONAS</u>	19
III - PARTE EXPERIMENTAL	31
A. <u>ENSAYOS FITOQUIMICOS</u>	
III.A.1. <u>MUESTRA</u>	32
III.A.2. <u>ENSAYOS GENERALES CUANTITATIVOS</u>	32
III.A.2.1. DETERMINACION DE HUMEDAD	32
III.A.2.1.1. <u>Resultados</u>	33
III.A.2.2. DETERMINACION DE CENIZAS	33

III.A.2.2.1. <u>Resultados</u>	33
III.A.2.3. DISCUSION DE RESULTADOS	36
III.A.3. <u>SCREENING FITOQUIMICO</u>	37
III.A.3.1. EXTRACCION	37
III.A.3.2. RENDIMIENTO	39
III.A.3.3. RESULTADOS	39
III.A.3.4. DISCUSION DE RESULTADOS	41
III.A.4. <u>ANALISIS CUALITATIVO DE ACIDOS FENOLES</u>	42
III.A.4.1. EXTRACCION	42
III.A.4.2. ESTUDIO CROMATOGRAFICO	44
III.A.4.2.1. <u>Cromatografia en Capa Fina</u>	44
III.A.4.2.2. <u>Cromatografia en Papel</u>	45
III.A.4.2.3. <u>Identificación mediante Patrones de</u> <u>Referencia</u>	46
III.A.4.2.4. <u>Resultados</u>	46
III.A.4.2.5. <u>Cromatografía Preparativa en Papel</u>	53
III.A.4.3. ESTUDIO ESPECTROSCOPICO	54
III.A.4.3.1. <u>Espectrofotometría U.V.</u>	54
III.A.4.3.1.1. Resultados	55
III.A.4.3.2. <u>Espectrometría de masas</u>	55
III.A.4.3.2.1. Resultados	56
III.A.4.4. DISCUSION DE RESULTADOS	62
III.A.5. <u>ANALISIS CUALITATIVO DE PRINCIPIOS FLAVONICOS</u>	63
III.A.5.1. EXTRACCION	63
III.A.5.2. ESTUDIO CROMATOGRAFICO	65

III.A.5.2.1. <u>Cromatografía en Capa Fina</u>	65
III.A.5.2.2. <u>Identificación mediante Patrones de Referencia</u>	66
III.A.5.2.3. <u>Resultados</u>	66
III.A.5.2.4. <u>Cromatografía Preparativa en Capa Fina</u> ..	68
III.A.5.3. ESTUDIO ESPECTROSCOPICO	69
III.A.5.3.1. <u>Espectrofotometría U.V.</u>	69
III.A.5.3.1.1. <u>Resultados</u>	70
III.A.5.3.2. <u>Espectrometría de masas</u>	74
III.A.5.3.2.1. <u>Resultados</u>	74
III.A.5.4. DISCUSION DE RESULTADOS	77

B. ENSAYOS FARMACODINAMICOS

III.B.1. <u>ENSAYOS GENERALES DE TOXICIDAD AGUDA</u>	79
III.B.1.1. <u>RESULTADOS</u>	80
III.B.1.2. <u>DISCUSION DE RESULTADOS</u>	80
III.B.2. <u>ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ESPASMOLITICA EN ORGANO AISLADO</u>	82
III.B.2.1. <u>EXTRACTO FLAVONICO</u>	82
III.B.2.1.1. <u>Resultados</u>	85
III.B.2.1.2. <u>Discusión de resultados</u>	92
III.B.2.2. <u>GENISTEIN</u>	94
III.B.2.2.1. <u>Acción frente a la Histamina y Cloruro de Bario</u>	94
III.B.2.2.1.1. <u>Resultados</u>	96

III.B.2.2.1.2. <u>Discusión de resultados</u>	96
III.B.2.2.2. <u>Efecto de Genistein en la inhibición de las contracciones inducidas por estimulación eléctrica de campo. Cálculo de su IC50</u>	104
III.B.2.2.2.1. <u>Resultados</u>	106
III.B.2.2.2.2. <u>Discusión de resultados</u>	106
III.B.2.2.3. <u>Efecto frente a contracciones producidas por Acetilcolina y 6-oxo-PGE1 en ileon aislado de cobaya</u>	110
III.B.2.2.3.1. <u>Resultados</u>	113
III.B.2.2.3.2. <u>Discusión de resultados</u>	117
III.B.2.2.4. <u>Efecto en la liberación de [3H]-Acetilcolina en Plexo mientérico de ileon de cobaya</u>	118
III.B.2.2.4.1. <u>Desarrollo de la experiencia</u>	120
III.B.2.2.4.2. <u>Resultados</u>	123
III.B.2.2.4.3. <u>Discusión de resultados</u>	124
III.B.2.2.5. <u>Efecto de Genistein en los niveles de nucleótidos cíclicos en ileon de cobaya</u>	129
III.B.2.2.5.1. <u>Resultados</u>	137
III.B.2.2.5.2. <u>Discusión de resultados</u>	138
 IV - <u>CONCLUSIONES</u>	 143
 IV - <u>BIBLIOGRAFIA</u>	 146



I. Objeto

El objetivo fundamental de la Farmacología es conseguir un mayor conocimiento de las acciones de los fármacos y una mejor comprensión de su mecanismo de acción.

Durante décadas se han hecho grandes esfuerzos por conocer cuales eran los procesos responsables que tenían lugar para conseguir un efecto determinado. En los últimos 50 años, el panorama es radicalmente distinto; el desarrollo científico nos permite aislar productos de fuentes naturales, conocer las acciones de estos principios, así como analizar las modificaciones que origina en la célula y que son capaces de iniciar actividades de particular importancia encaminadas a producir su efecto farmacodinámico.

La dilucidación del mecanismo de acción de un fármaco es el mayor desafío que se presenta para el investigador en Farmacología, ya que la información derivada de este estudio suministra la base realmente satisfactoria para el uso terapéutico racional de un fármaco por una parte, y para la creación de nuevos y superiores agentes químicos por otra.

De acuerdo con estas premisas, hemos planteado el estudio farmacológico de *Genista tridentata* L., especie localizada en nuestra región.

Tras un "screening" fitoquímico previo, procedimos al aislamiento e identificación de principios de naturaleza flavónica, que constituye una de las líneas de investigación de nuestro Departamento.

El estudio farmacológico se inició con un "screening" rápido, para asegurarnos de una actividad farmacológica que "a priori" siempre se le supone a los principios activos de esta naturaleza. En estas experiencias previas, logramos unos resultados que en parte nos desviaron del objetivo que habíamos propuesto, que estaba encaminado a determinar la actividad antihipertensora y centramos nuestro trabajo en la valoración de la actividad espasmolítica, profundizando especialmente, en la dilucidación de su mecanismo de acción.

II. Revision bibliografica

II.1. ESTUDIO BOTANICO DE *Genista tridentata* L.

II.1.1. SITUACION TAXONOMICA

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Papilionaceae
Tribu	Genisteae
Género	<i>Genista</i>
Especie	<i>Genista tridentata</i> L.

II.1.2. DESCRIPCION DEL GENERO GENISTA

Arbustos o matas. Tallos estriados o lisos, a veces alados.

Hojas simples o trifoliadas, sentadas o cortamente pecioladas, sin estípulas o con estípulas a veces espinosas.

Flores axilares frecuentemente geminadas, en racimos laterales cortos o en grupos terminales umbeliformes, pediceladas.

Cáliz tubuloso, bilabiado, normalmente con dos bracteolas en la base.

Corola con alas generalmente tan largas como el estandarte.

Legumbres con 1-12 semillas. Semillas con o sin estrofiolo.

II.1.3. DESCRIPCION DE LA ESPECIE

Mata sin hojas de 30-60 cm, inermes, rastreras o ascendentes.

Tallos recorridos en toda su longitud por dos alas de anchura mediana (3-7 mm), coriáceas, tridentadas en cada nudo, verde, sedoso-plateadas cuando jóvenes, rápidamente glabrescentes, con el margen ondulado, áspero y roído-denticulado. Ramificaciones laterales de longitud variable, de igual morfología que el tallo central y consideradas erróneamente como filodios.

Inflorescencias laterales y terminales, con 2-7 flores en fascículos o corimbos densos; pedicelos cortos, 1mm, algo gruesos, sedosos; brácteas linear-espátuladas u oblongo-lanceoladas, agudas, rojizas, plegadas, sedosas en el dorso y pestañosas marginalmente; bracteolas de 0-1 mm, estrechas, oblongo-espátuladas, rojizo-escarías, tan largas como el tubo calicino.

Cáliz de 5-6 mm, submembranáceo, sedoso-plateado, campaniforme, bilabiado, con tubo aproximadamente de la longitud de los labios; labio superior con dos dientes de ovados u ovado-trianguulares, oblicuos, obtusos, mucronados por prolongación del nervio central, casi tan largos como el tubo y poco más cortas que el labio inferior; éste subcuneiforme en su conjunto, hendido hasta 1/2 en tres laciniás agudas, casi de igual longitud, pero desiguales en la forma; la central linear o linear-lanceolada y las laterales triangulares y más anchas que aquélla.

Estandarte lampiño, de cerca de 10 mm, ovado-subróbico, obtuso, azafranado en la marchitez; alas apenas más cortas que el estandarte, oblongo-cuneiformes, obtusas, lampiñas (excepto el borde inferior, que es pubescente) y también cróceas al secarse; quilla (9-12 mm), tan larga o poco más que el estandarte, de la misma forma y anchura que las alas, exteriormente plateado-tomentosa.

Legumbre de 10-12 mm, oblonga, sericea, con 2-8 semillas sin estrofiolo.

Matorrales bajos y brezales, de un modo especial sobre suelos ácidos.

III.1.3.1. Distribución general

W de la Península Ibérica: Galicia, Asturias, ambas Castillas, Extremadura y Andalucía Occidental (Pedroches, Sierra Norte, Aracena, Andévalo, Algeciras).

NW de Africa (Marruecos).

II.1.3.2. Sinonimias

Genista tridentata L., Sp. Pl.: 710. 1753

Chamaespartium tridentatum (L.) P. Gibbs, Feddes Repert.
79: 54. 1968

Cytisus tridentatus (L.) Vuk., Rad. Jugoslav. Akad.
Znan. 31: 104. 1875

Genistella tridentata Samp., Man. Fl. Portug.: 221. 1911

Pterospartum lasianthum (Spach) Willk. in Willk. &
Lange, Prodr. Fl. Hispan. 3: 440. 1877

Pterospartum tridentatum (L.) Willk. in Willk. & Lange,
Prodr. Fl. Hispan. 3: 441. 1877

II.1.3.3. Nombres vulgares

Carqueja, Carquexa, Carquexia, Lavacuncas (Galicia y Asturias), Engordatoro (Málaga y Cádiz), Torogordo (Cádiz)

II.2. FITOQUIMICA Y EMPLEOS TERAPEUTICOS DEL GENERO GENISTA

II.2.1. ALCALOIDES

Sólo en 10 de las tribus más primitivas de la Subfamilia Papilionoideae se han encontrado alcaloides quinolizidínicos.

En la Tribu Genisteeae y más concretamente en el género Genista, se pueden distinguir:

- Alcaloides quinolizidínicos tipo Esparteina/Lupanina.
- Alcaloides tipo esteres de Esparteina/Lupanina.
- Bases quinolizidínicas Pyridona (PELLETIER, 1984).

A continuación exponemos un cuadro resumen con los más frecuentes alcaloides presentes en el género Genista.

ESPECIES

1. *Genista albida* Willd. (TOSUN, 1987b)
2. *Genista anatolica* Boiss. (TOSUN, 1986a)
3. *Genista aucheri* Boiss. (TOSUN, 1986b)
4. *Genista burdurensis* P. Gibbs (TOSUN, 1987a)
5. *Genista hungarica* A. Kerner (ADZET, 1973)
6. *Genista involucrata* Spach (TOSUN, 1987b)
7. *Genista libanotica* Boiss. (TOSUN, 1987c)
8. *Genista lucida* Camb. (ADZET, 1975)
9. *Genista ramossissima* (Desf.) Poiret (ADZET, 1975)
10. *Genista rumelica* Vel. (PEICHEV, 1982)
11. *Genista spartioides* Spach ssp. *retamoides* (Sp.) Pau (ADZET, 1975)
12. *Genista tinctoria* L. (GULUBOV, 1973; KNOEFEL, 1969)
13. *Genista valentina* (Willd.) Steud. (ADZET, 1975)

II.2.2. FLAVONOIDES

Estos compuestos químicos junto con los alcaloides, llenan la fitoquímica del género Genista, conocida hasta el momento.

A modo de resumen, mostramos a continuación los flavonoides encontrados en la revisión de Genista realizada.

FLAVONOIDES

ESPECIES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
APIGENINA					+										
APIGENINA-7-O-GLUCOSIDO					+										+
CYHAROSIDO				+	+		+			+		+	+	+	
COSMOSIN										+					
CYANOSIDO					+										
DAIDZEIN	+	+				+				+			+		+
DAIDZIN										+					
DIGITOFLAVONOSIDO													+		
FISETIN									+						+
FORMONONETIN	+							+							
GENISTEIN	+	+		+		+	+	+		+	+		+		
5-O-METILGENISTEIN	+				+	+				+					
GENISTIN				+	+	+	+			+			+		
ISORHAMNETIN	+														
ISORHOIFOLIN															+
KAEMPFEROL	+	+						+	+						+
KAEMPFEROL 4'-METILETER	+														
LUTEOLINA				+	+	+	+			+	+		+		
LUTEOLIN-5-GLUCOSIDO								+					+		
LUTEOLIN-7-GLUCOSIDO				+			+			+			+		
LUTEOLIN-7-DIGLUCOSIDO						+									

FLAVONOIDES

ESPECIES

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----

LUTEOLIN-5, 7-DIGLUCOSIDO
 ONONIN
 ORIENTIN-4'-D-GLUCOSIDO
 POPULNIN
 PRUNETIN
 PRUNETIN-GLUCOSIDO
 QUERCETIN
 SCOLYMOSIDO
 TAMARIXETIN

ESPECIES

1. *Genista aetnensis* (Biv.) DC. (ARTAMONOVA, 1988)
2. *Genista albida* Willd. (HARBORNE, 1969)
3. *Genista carinalis* Griseb. (NAKOV, 1978)
4. *Genista depressa* Bieb. (NAKOV, 1982)
5. *Genista januensis* Viv. (NAKOV, 1982; NAKOV, 1983)
6. *Genista lydia* Boiss. (ULUBELEN, 1974)
7. *Genista ovata* Waldst. & Kit. (NAKOV, 1982)
8. *Genista patula* Bieb. (OZIMINA, 1981)
9. *Genista ramosissima* (Desf.) Poiret (HARBORNE, 1969)
10. *Genista rumelica* Vel. (NAKOV, 1973; NAKOV, 1978; NAKOV, 1982; NAKOV, 1983)
11. *Genista spartioides* Spach (HARBORNE, 1969)
12. *Genista subcapitata* Pancic (NAKOV, 1982)
13. *Genista tinctoria* L. (NAKOV, 1982; PALAMARCHUK, 1976; ULUBELEN, 1971)
14. *Genista transcaucasica* Schischk. (ALIEVA, 1977)
15. *Genista valentina* (Willd. ex Sprengel) Steudel (HARBORNE, 1969)

II.2.3. APLICACIONES TERAPEUTICAS DEL GENERO

Los datos recogidos en bibliografía muestran que sólo tres especies del género Genista, tienen una aplicación práctica desde el punto de vista terapéutico.

Genista tinctoria L. (DUKE, 1986; GARNIER, 1961;
FONT QUER, 1976; HEYWOOD, 1985)

Fundamentalmente es conocida por su acción diurética, emética, laxante, purgante (flores), y sudorífica. También es aconsejado su uso contra la gota, cáncer, hepatitis, nefrolitiasis, nefrosis, reumatismo, esplenosis, hidropesía y quistes sebáceos.

Otros usos:

- Los capullos son preparados y servidos como condimentos.
- Las semillas son usadas como un sustituto del café.
- Antiguamente fue utilizada la planta entera, especialmente las flores para teñir, consiguiendo un buen tinte amarillo.
- Los Ibéricos hacen ropa de la fibra.
- Las vacas que toman como alimentación la planta, producen leche amarga.

- La planta enriquece los suelos pobres por la vía de fijación de Nitrógeno.
- Sus alcaloides son halucinógenos.

Genista tridentata L.

Su composición es desconocida. Produce la conocida como "esencia de carqueja" que es de color amarillo, ligeramente narcótica y de aroma canforáceo, no desagradable.

En Portugal, se utiliza para combatir la tos y como emoliente. En un folleto publicado en 1788 por el Padre Martin Sarmiento bajo el título "Disertación sobre las eficaces virtudes y uso de la planta llamada carquesa", detalla la virtud de la planta de limpiar la sangre por medio del sudor. También la recomienda para combatir la gota y la perlesia (FONT QUER, 1976).

G. tridentata (L.) P. Gibbs. subsp. *cantabricum* (Spach.) Riv.-Mart., Izco & Cost. es utilizada como antirreumática, tanto bajo la forma de infusión como en baños (baños de carqueixa) (MAYOR, 1977).

Genista rumelica Vel.

Destacan su actividad ulcero protectora y su acción vitamínica P (RAINOVA, 1978; RAINOVA, 1988).

Los extractos totales de G. rumelica así como el Rhombifolin, un alcaloide de la misma, reducen la capacidad de la glándula tiroide para retener y acumular yodo radioactivo. Además, ambos presentan un efecto estimulante, mejorando las reacciones reflejas y el tono muscular (PEICHEV, 1982).

La mezcla de los flavonoides totales muestran actividad estrogénica pero no androgénica, antiandrogénica o anabólica (ILARIONOV, 1982).

II.3. ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DE ISOFLAVONAS

Acción estrogénica

Las isoflavonas son débiles estrógenos y su presencia en las legumbres de forraje, tales como el trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*), han sido reconocidas como la causa de problemas de infertilidad en ovejas. Los compuestos no esteroides: Formononetin, Genistein y Biochanin A son las isoflavonas estrogénicas principales del trébol subterráneo.

Los principales productos de degradación de Genistein y Biochanin A son simples fenoles tales como el p-etilfenol, que ocasiona una pérdida de actividad estrogénica, mientras que la degradación de Formononetin produce los compuestos: equol y O-demetillangolensein que si son activos estrogénicamente (BATTERHAM, 1971). Este camino de inactivación para Genistein y Biochanin A, se desarrolla en el animal varios días después de la ingestión de pasto rico en estas isoflavonas. Formononetin, por otro lado, ejerce en oveja la actividad estrogénica en todo momento (LINDSAY, 1970). Originalmente, estos tres compuestos se encuentran implicados, pero hay una evidencia fuerte que sugiere que Formononetin por sí solo, es el principal factor involucrado en estos problemas de infertilidad (PATRONI, 1982).

Respecto a los cambios fisiológicos producidos por estos compuestos no esteroideos en animales caben destacar: distocia y prolapso del útero de ovejas preñadas, desarrollo de las mamas y secreción de leche en hembras que no se encuentran en período de crianza y secreción de leche e incremento en el peso de la vesícula seminal en ovejas machos castradas.

Noteboom (1963) realizó un estudio comparativo sobre el efecto de dos componentes no esteroideos, Genistein y Coumestrol con estradiol-17 β , en la estimulación de la incorporación de precursores marcados en proteínas, fosfolípidos y ác. ribonucleico en las células del útero de rata, llegando a la conclusión que ambos componentes son similares en su modo de acción al estradiol, difiriendo sólo en el grado de estimulación.

En relación a las características moleculares de los compuestos estrogénicos, se ha sugerido que la actividad estrogénica de una molécula depende de grupos funcionales oxigenados, capaces de formar puentes de hidrógeno, y a la presencia de por lo menos, un grupo fenólico funcional de alta capacidad para formar puentes de hidrógeno. Tanto Genistein como Coumestrol contienen grupos fenólicos, los cuales pueden satisfacer los requerimientos configuracionales y electrostáticos necesarios para una molécula estrogénica.

Otra serie de experimentos muestran los efectos de Genistein, Biochanin A y Estradiol en la síntesis de progesterona provocada por la adición de LH a cultivos de células granulosas bovinas. Se observó un efecto bifásico relacionado con la dosis, en la génesis de esteroides en el sistema de células granulosas bovinas aisladas (KAPLANSKI, 1981).

Respecto al mecanismo de acción de ciertas isoflavonas, no está claro si Genistein y otros compuestos relacionados son "proestrógenos", es decir, si son metabolizados a compuestos estrogénicos activos como propuso Biggers & Curnow (BIGGERS, 1954) o si ellos son débiles estrógenos los cuales pueden interactuar con potentes estrógenos inhibiendo su acción utero-vagino-tróficos, actuando de esta manera como antiestrogénicos como sugirió Folman & Pope (FOLMAN, 1966). Shutt llegó a la conclusión que la interacción entre Genistein y estradiol en el aparato reproductor del ratón, ocasiona una reducción de actividad estrogénica lo que lleva a pensar que Genistein es un débil estrógeno que puede desplazar al estradiol de sus receptores (SHUTT, 1967).

Acción antifúngica (Fitoalexinas)

Numerosas plantas, en respuesta a una infección viral, fúngica o bacteriana, sintetizan unos compuestos (fitoalexinas) con marcadas propiedades antifúngicas, que desempeñan un papel primario en la resistencia a la enfermedad. Diversas especies pertenecientes a las Leguminosas, producen frecuentemente fitoalexinas isoflavonoides.

Investigaciones orientadas hacia la producción de fitoalexinas por parte de la legumbre *Cajanus cajan* (L.) Millsp. en una suspensión de conidios de *Helminthosporium carbonum* Ullstrup dió origen a varias isoflavonas antifúngicas, entre las que se encontraba Genistein (INGHAM, 1976). Otras experiencias similares se han realizado con las hojas y tallos de *Dolichos biflorus* L. tras la inoculación con *Pseudomonas pisi* y *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, aislando gran número de fitoalexinas isoflavonoides (KEEN, 1980).

Estudios realizados sobre isoflavonoides del género *Phaseolus* (Leguminosae): *Phaseolus aureus* Roxb. (O'NEILL, 1983), *P. mungo* L. (ADESANYA, 1984) y *P. coccineus* L. (ADESANYA, 1985) permitieron aislar las isoflavonas Genistein y 2'-hidroxigenistein y la isoflavanona Kievitone, y como comprobar su acción antifúngica frente a *Cladosporium cucumerinum*.

Con respecto a la estructura del principio responsable de la acción, se ha visto la relación de la acción fungitóxica del isoflavonoide con un alto nivel de lipofilia y la presencia de 1 ó más funciones fenólicas en la molécula (ADESANYA, 1986), así como un aumento de su acción con la introducción de un sustituyente isopentenil en la estructura isoflavónica (SCHRÖDER, 1979).

Acción hipolipidémica

Las isoflavonas naturales poseen actividad hipolipidémica, provocando la disminución del colesterol y triglicéridos del suero sanguíneo, destacando en este último aspecto la acción de Genistein. Esta, se incrementa por la glucosilación en el C-4' y C-7 y la hidroxilación en el C-5 de la estructura isoflavónica (KAZAKOV, 1979).

Otros trabajos describen el efecto inhibitorio sobre la actividad lipasa del germen de trigo, así como escaso efecto contra la lipasa pancreática de cerdo. El orden de prelación en el efecto inhibitorio de los derivados isoflavónicos es el siguiente: Metil derivados > acetil derivados > agliconas > glucósidos (OHTA, 1981). También se ha observado que Genistein y su grupo de derivados, exhiben una mayor inhibición que el grupo de Daidzein (OHTA, 1982).

En un estudio realizado con Genistein (100 mg vía parenteral), se observaron los siguientes efectos: descenso en los

lípidos totales de la sangre, colesterol, lípido P y acetato así como un incremento en los ácidos grasos monoesterificados, acetona, ácido acetoacético y vitamina E (PALFII, 1980).

En vacas adultas al administrar Genistein durante la fase folicular del ciclo ovárico, se detectó un descenso en las concentraciones de ácido acético, ácido propionico y ácido β -hidroxibutírico en sangre, así como un incremento en los niveles de ácidos grasos insaturados, especialmente los poliinsaturados. En general se puede decir que Genistein origina una estimulación del metabolismo lipídico (RIVIS, 1981).

Acción antiinflamatoria

Luteolin, luteolin 7-glucósido y genistin, flavonoides del género Genista, mostraron actividad antiinflamatoria frente al edema inducido en la pata de la rata con dextrano y levadura, así como frente al granuloma provocado por implantación de una bolita de algodón (ILARIONOV, 1979).

Genistein a la dosis de 50 mg/Kg animal inhibe el edema producido en la oreja de conejo por inyección de aceite de croton (GABOR, 1987).

Acción antiulcerosa

En un estudio sobre la acción antiulcerosa de algunos flavonoides del género Genista (Genistin), mostró una gran actividad frente a la úlcera provocada con reserpina y fenilbutazona (ILARIONOV, 1979).

En varios compuestos flavonoides aislados de Genista rumélica Vel. (mezcla total de flavonoides, luteolin-7-glucósido y genistin) se estableció la acción ulceroprotectora en ratas frente a cinco modelos de úlcera gástrica, siendo Genistin el más activo. Los principios estudiados no presentaron efecto antiácido, ni se observaron cambios de pH ni de actividad pepsinica en el jugo gástrico (RAINOVA, 1988).

Acción inhibidora de la proteína del gen nod D

Está descrito que las isoflavonas Daidzein y Genistein a concentraciones $\geq 5 \mu\text{M}$ inhiben fuertemente la activación del gen nod D que interviene en la nodulación de *Rhizobium leguminosarum* (FIRMIN, 1986).

Acción inhibidora de la peroxidasa

Genistein, con actividad estrogénica y antiestrogénica, inhibe directamente la peroxidasa uterina (SHORE, 1986).

En la determinación de la actividad antihemolítica conocida al medir la capacidad de prevenir la hemólisis peroxidativa de eritrocitos, se observó que presentaban diferente susceptibilidad según la procedencia de los eritrocitos; así Daidzein, muestra una actividad antihemolítica muy alta frente a eritrocitos de oveja y sólo Genistein se muestra capaz de prevenir en pequeña proporción la hemólisis de los eritrocitos de rata, sin mostrar actividad frente a los de conejo.

La potencia antioxidativa de isoflavonas se valoró por su capacidad de inhibición de la lipooxigenasa, viéndose una relación con el nº de grupos OH en la estructura isoflavónica así como una disminución de su actividad relacionada con la formación del heterósido correspondiente (NAIM, 1976).

Acción inmunosupresora

En el estudio de la actividad inmunosupresora frente a eritrocitos de oveja (4×10^8), Genistin a dosis de 5 mg/Kg de peso es capaz de inhibir en un 64.8 % la formación de anticuerpos (WATANABE, 1988).

Acción cardiovascular

En un estudio fitoquímico de *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi (OHSHIMA, 1988) se aislaron varios componentes isoflavónicos: Puerarin, Daidzein, Daidzin, Formononetin y Puerarol, a partir de los extractos de la raíz de *Pueraria*.

Estudios farmacológicos (FAN, 1975) de la fracción total de isoflavonas de la raíz de *Pueraria* pusieron de manifiesto su capacidad de incrementar la circulación coronaria y cerebral, disminuir el consumo de oxígeno del miocardio, incrementar el suministro de oxígeno de la sangre y disminuir la producción de ácido láctico en el músculo cardíaco deficiente en oxígeno. También se demostró una acción espasmolítica como la papaverina. Los componentes puros: Daidzein, Daidzin y Puerarin mostraron acciones farmacológicas similares a las de la fracción total de isoflavonas. Daidzein ha presentado la capacidad de aliviar los síntomas de la hipertensión incluyendo dolor de cabeza y mareo. Adicionalmente se mostraron eficaces en la angina de pecho, migraña y sordera repentina.

Acción antivirásica

Se ha examinado el efecto inhibitor de los isoflavonoides de *Wisteria brachybotrys* en la activación del virus de Epstein-Barr y en la incorporación de ³²P en fosfolípidos de

células HeLa.

Un estudio del extracto activo de la planta llevó al aislamiento y caracterización de Afromosin, Formononetin, Wistin y Ononin como principales inhibidores (KONOSHIMA, 1988).

Acción inhibidora de Protein-Kinasas de Tyrosina

En el estudio de inhibidores específicos para Tyrosina Kinasas, se ha aislado una isoflavona, Genistein, del crecimiento fermentativo de *Pseudomonas* sp. (OGAWARA, 1986).

La actividad protein-quinasa específica de Tyrosina es conocida por estar asociada con productos oncógenos. Esta actividad Kinasa está fuertemente relacionada con la capacidad de los retrovirus para transformar las células, y también se encuentra asociada con los receptores celulares para varios factores de crecimiento tales como el EGF. Por lo tanto, es posible que la fosforilación de la Tyrosina juegue un importante papel en la proliferación y transformación de la célula. Basados en esta hipótesis, un inhibidor específico para Tyrosina-kinasas podría ser un agente antitumoral. Se ha demostrado que Genistein es un alto inhibidor específico (AKIYAMA, 1987) pero apenas inhibe la actividad de Serina y Treonina Kinasas. Además Genistein fue revelado como inhibidor de la fosforilación de EGF (Factor de Crecimiento Epidermal) en células A431 cultivadas, siendo su ID50 de 0.7 µg/ml (OGAWARA, 1987).

Acción sobre la composición mineral de la sangre

La administración i.m. de Genistein (100 mg/día) durante 10 días a vacas, elevó los niveles de P y Na en eritrocitos y disminuyó los de P, Ca y K en el plasma sanguíneo. Similares efectos a los obtenidos con 10.000 U.I. de estrona (PALFII, 1986).

Acción inhibidora de β -galactosidasa

Daidzein, Daidzein 7- α -L-rhamnósido, Daidzein 4',7-di- α -L-rhamnósido, Genistein, Genistein 7- α -L-rhamnósido y Genistein 4',7-di- α -L-rhamnósido, fueron aislados de un cultivo de *Streptomyces xanthophaeus* y muestran actividad inhibidora β -galactosidasa (HAZATO, 1979).

Acción inhibidora de la DOPA-descarboxilasa

En un screening realizado a un filtrado de cultivos de hongos y *Streptomyces* se obtuvieron las siguientes isoflavonas: Psi-tectorigenin (I), Genistein (II), 3',4',5,7-tetrahidroxi-8-metoxiisoflavona (III), Orobol (IV) y 8-hidroxigenistein (V), mostrando III y IV la actividad más fuerte con respecto a la inhibición de la DOPA-descarboxilasa. Todas inhibieron la Histidin-descarboxilasa y la Catecol-O-metiltransferasa.

Orobol exhibió un significativo efecto hipotensor en ratas espontáneamente hipertensivas (UMEZAWA, 1975).

III. Parte experimental

A. ENSAYOS FITOQUIMICOS

III.A.1. MUESTRA

Se han utilizado las sumidades floridas de *G. tridentata* L., recolectadas en Higuera de la Sierra (Huelva) durante el periodo de floración de la planta.

La desecación se llevó a cabo sobre superficie seca a temperatura ambiente (20-25°C) y posteriormente se conservó en lugar seco, oscuro y cerrado.

El material ha sido determinado en el Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Sevilla (Facultad de Farmacia), quedando depositado un ejemplar en el Herbario de dicho Departamento.

III.A.2. ENSAYOS GENERALES CUANTITATIVOS

III.A.2.1. DETERMINACION DE HUMEDAD

El contenido en agua de una droga, nos permite saber si el tratamiento posterior a la recolección, ha sido o no adecuado.

Hemos utilizado el método gravimétrico, basado en la pérdida de peso de la droga mediante desecación en estufa a 100-105°C (FARMACOPEA ESPAÑOLA, 1954; FAUGERAS, 1965).

III.A.2.1.1. Resultados

Los valores obtenidos, expresados en porcentajes, figuran en la Tabla I.

III.A.2.2. DETERMINACION DE CENIZAS

La determinación de cenizas nos permite conocer el contenido mineral de la droga que puede, de una parte, influir en la actividad farmacológica y de otra, nos orienta hacia posibles adulteraciones.

Se determinó el contenido en cenizas totales por calcinación (FARMACOPEA ESPAÑOLA, 1954) en las muestras procedentes del ensayo de humedad.

III.A.2.2.1. Resultados

Los valores obtenidos, están recogidos en la Tabla II.

MUESTRAS	% HUMEDAD
A ₁	8.57%
A ₂	8.60%
A ₃	8.46%
\bar{A}	8.54%

Tabla I

VALORES DE HUMEDAD

RESIDUOS	% CENIZAS
A ₁	2.30%
A ₂	2.05%
A ₃	2.15%
\bar{A}	2.17%

Tabla II

VALORES DE CENIZAS TOTALES

III.A.2.3. DISCUSION DE RESULTADOS

La determinación del contenido en agua de la sumidad florida de *G. tridentata* L. utilizando el método gravimétrico, nos proporciona unos valores que no difieren de forma significativa con los encontrados en bibliografía para otras especies del mismo género (PARIS, 1981). Este hecho se hace extensible al determinar los valores de cenizas totales de las muestras ensayadas.

III.A.3. SCREENING FITOQUIMICO

El "screening" tiene como finalidad, proporcionar información sobre la naturaleza química de los principios activos de *G. tridentata* L.

III.A.3.1. EXTRACCION

Partimos de 20 g de Droga que se sometió a una extracción continua en Soxhlet (DOMINGUEZ, 1961; DIAZ CASADO, 1977) operando con tres disolventes de polaridad creciente: Eter de petróleo, alcohol de 96º y agua.

El proceso esquematizado queda recogido en la Figura 1.

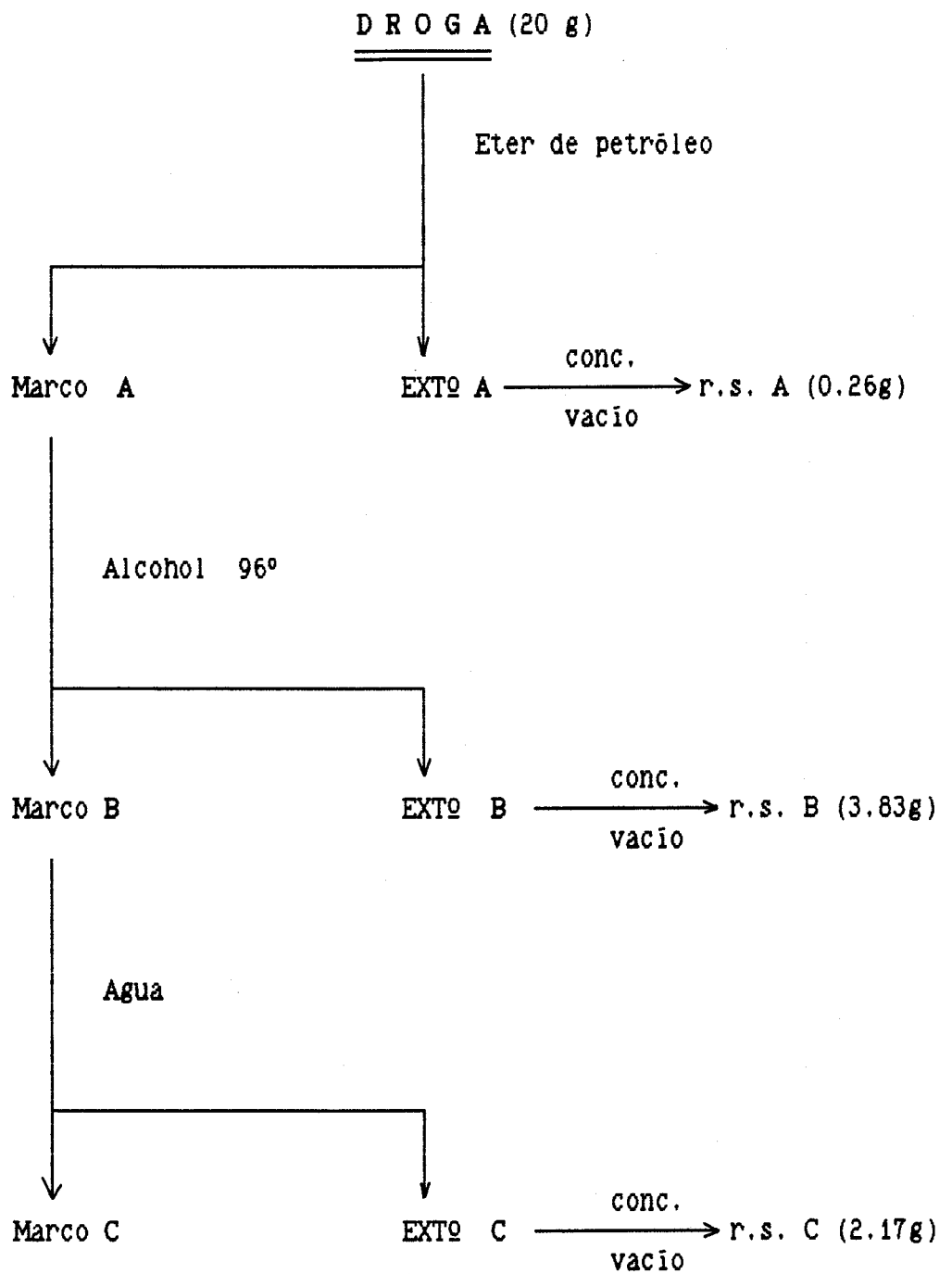


Fig. 1

ESQUEMA DEL PROCESO EXTRACTIVO

III.A.3.2. RENDIMIENTO

El rendimiento de la extracción expresado en gramos de residuo seco (r.s.) por 100 g de planta desecada ha sido el siguiente:

ESPECIE	EXTRACTO	RENDIMIENTO(%)
G. tridentata L.	A. Etéreo	1.30
	B. Alcohólico	19.15
	C. Acuoso	10.85

III.A.3.3. RESULTADOS

Los datos obtenidos en la serie de pruebas que constituyen el "Screening" quedan recogidos en la Tabla III.

La intensidad de las reacciones se expresan:

- *** fuertemente positiva
- ** positiva
- * debilmente positiva
- negativa

<u>GRUPOS QUIMICOS</u>	<u>EXTRACTOS</u>			<u>TECNICA</u>
	Etereo	Alcoh.	Acuoso	
Cuerpos grasos	***	***		(OTERO, 1946)
Fig. carotenoides	-	-		(PARIS, 1976)
Esterol. y triterp.	***	***		(DOMINGUEZ, 1973) (BOUGUET, 1975)
Fig. antociánicos	-	-		(TORRENT, 1976)
Fig. leucoantociánicos	-	-		
Taninos catêquicos		*	*	(TYLER, 1979)
Taninos pirogâlicos		**	*	
Flavonoides		***	*	(PARIS, 1976)
Glúcidos		***	*	(LITWACK, 1967) (PAVIA, 1976)
Alcaloides		-	-	(SAN MARTIN, 1977) (CABO-TORRES, 1974) (ADZET, 1975)
Lactonas pent. insat.		**	**	(DOMINGUEZ, 1973)
Quinonas libres	-	-	-	(TORRENT, 1976)
Quinonas combinadas	-	-	-	
Saponinas			-	(HERRERA, 1987)
Resinas			-	(PARIS, 1976)

Tabla III

RESULTADOS DEL "SCREENING" FITOQUIMICO

III.A.3.4. DISCUSION DE RESULTADOS

En el "screening" fitoquímico se han detectado cuerpos grasos, esteroides - triterpenos, glúcidos y flavonoides; menor proporción de lactonas pentagonales insaturadas y trazas de taninos.

No detectamos la presencia de alcaloides con las técnicas utilizadas, hecho que nos llama poderosamente la atención ya que todas las especies del género *Genista* poseen este tipo de principios. Quizás la explicación de este hecho, se encuentre en la dificultad que ha existido siempre a la hora de incluir desde el punto de vista botánico esta especie. Este taxón originalmente descrito por Linneo como *Genista tridentata* fue con posterioridad, debido al carácter marcado de sus alas, re combinado bajo otros géneros: *Cytisus* (1875) por Vukatinovic, *Pterospartum* (1877) por Willkomm, *Genistella* (1911) por Sampaio y *Chamaespartium* (1968) por Gibbs.

III.A.4. ANALISIS CUALITATIVO DE ACIDOS FENOLES

III.A.4.1. EXTRACCION

Se ha llevado a cabo por el método de Lescao y cols. (LESCAO y cols., 1972) ligeramente modificado (MARHUENDA Y GARCIA, 1985).

Se sometieron 20 g de planta a un cocimiento ácido al 10 %. El extracto acuoso obtenido se llevó hasta residuo seco que se recuperó posteriormente con agua ácida y se trató con éter etílico.

El extracto etéreo alcalinizado con bicarbonato sódico al 2%, permitió que los ácidos fenoles libres se solubilizaran al estado de sales sódicas. En una posterior acidificación con sulfúrico (10%) se liberan de sus combinaciones y de nuevo son tratados con éter etílico.

El extracto etéreo resultante lo concentramos hasta sequedad obteniéndose un residuo de ácidos fenoles que representa el 0.70 %, el cual lo recuperamos con etanol de 96º.

El proceso esquematizado se encuentra representado en la Figura 2.

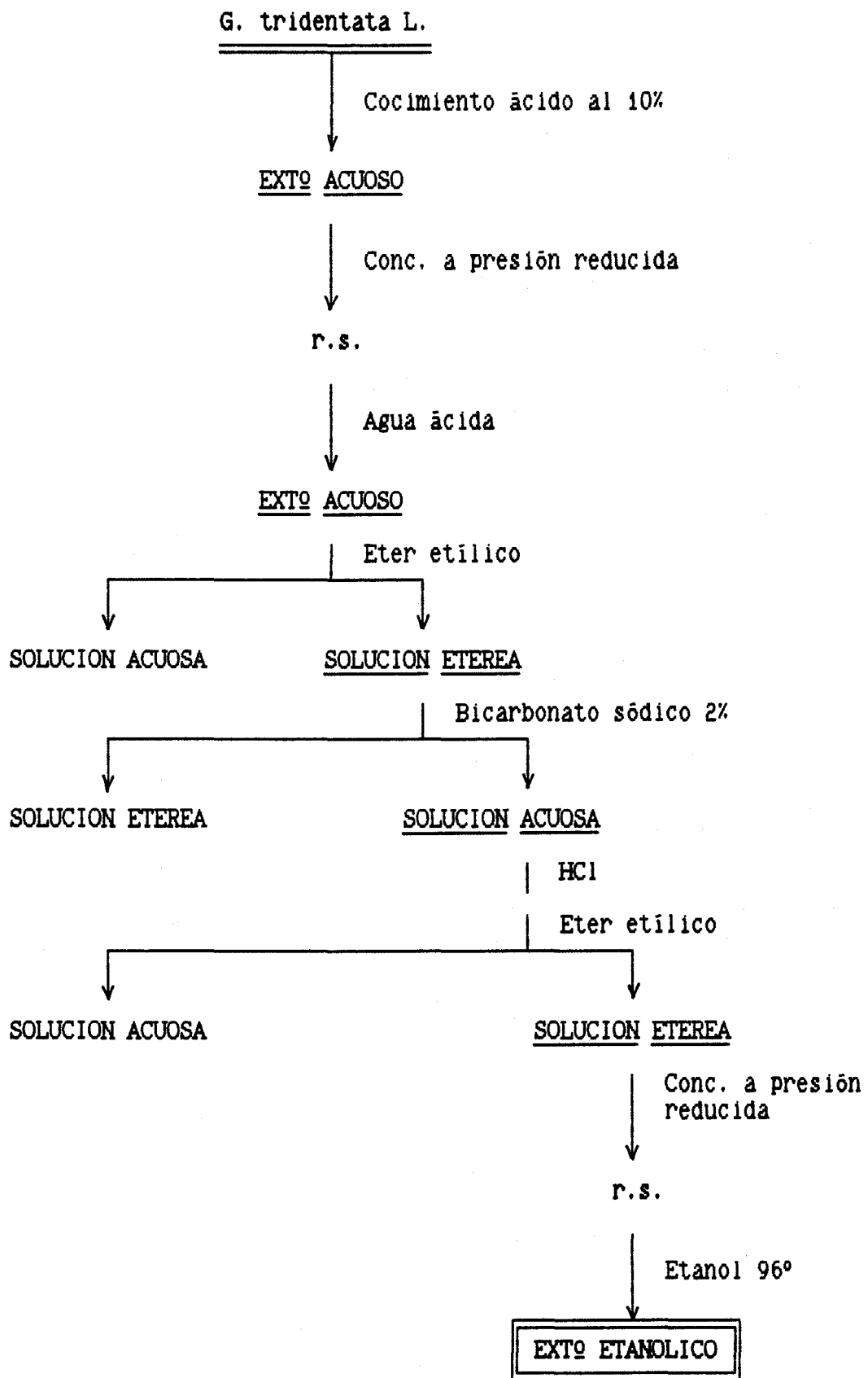


Fig. 2

III.A.4.2. ESTUDIO CROMATOGRAFICO

El extracto etanólico obtenido según el método detallado anteriormente, fue sometido a estudio cromatográfico.

III.A.4.2.1. Cromatografía en Capa Fina

Fases móviles (TORK, 1980; TORO, 1987)

Acido clorhídrico 0.1 N

Acido acético 2 %

Acido fórmico 2%

Benceno/ácido acético/agua (60:22:12)

Soporte (RANDERATH, 1974)

Celulosa microcristalina (Merck)

Grosor de la capa (STHAL, 1969)

0.25 mm

Reveladores (DIDRY, 1982; RIOS, 1986)

U.V. (254 nm)

p-nitroanilina diazotada

p-nitroanilina diazotada seguida de una segunda pulverización con Carbonato disódico al 15%.

Desarrollo

Monodimensional ascendente.

III.A.4.2.2. Cromatografía en Papel

Fases móviles

Acido acético 2%

Acido fórmico 2%

Benceno/ácido acético/agua (60:22:12)

Soporte

Papel Whatman nº 1

Reveladores

U.V. (254 nm)

p-nitroanilina diazotada

p-nitroanilina diazotada + Carbonato disódico (15%)

Desarrollo

Monodimensional descendente

III.A.4.2.3. Identificación mediante Patrones de Referencia

Tanto en los ensayos cromatográficos en capa fina como los realizados en papel, observamos la presencia de dos únicos componentes que presentan en ambos casos las mismas coloraciones al revelar con los reveladores específicos.

A fin de proceder a identificar ambos principios, acudimos al uso de productos puros, seleccionando:

- Ac. Vanillico
- Ac. p-hidroxibenzoico
- Ac. m-hidroxibenzoico
- Ac. Siringico

III.A.4.2.4. Resultados

Los valores medios de Rf y las coloraciones que aparecen con los distintos reveladores están recogidos en las Tablas IV, V, VI y VII.

Las Figuras 3 y 4 muestran algunas de las imágenes cromatográficas obtenidas en los distintos ensayos.

	Rf			
	F A S E S M O V I L E S			
	A	B	C	D
Compuesto I	0.48	0.53	0.52	0.76
Ac. Vanillico	0.50	0.55	0.57	0.76
Compuesto II	0.54	0.59	0.57	0.34
Ac. p-OH-Benzoico	0.56	0.61	0.60	0.35
Ac. m-OH-Benzoico	0.54	0.57	0.53	0.35
Ac. Siringico	0.36	0.43	0.43	0.74
A.- Acido clorhidrico 0.1N B.- Acido acético 2% C.- Acido fórmico 2% D.- Benceno/ac.acético/agua (60:22:12)				

Tabla IV
 VALORES MEDIOS DE Rf DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA
 CON LOS DISTINTOS PATRONES

C O L O R A C I O N E S			
R E V E L A D O R E S			
	A	B	C
Compuesto I	azul cobalto	naranja	morado
Ac. Vanillico	azul cobalto	naranja	morado
Compuesto II	morado	amarillo	rosa
Ac. p-OH-Benzoico	morado	amarillo	rosa
Ac. m-OH-Benzoico	morado	amarillo	rosa
Ac. Siringico	azul	naranja	azul

A.- U.V. (254 nm)
B.- p-nitroanilina diazotada
C.- p-nitroanilina diazotada + Carbonato disódico (15%)

Tabla V

COLORACIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA
CON LOS DISTINTOS PATRONES

	Rf		
	F A S E S M O V I L E S		
	A	B	C
Compuesto I	0.53	0.52	0.70
Ac. Vanillico	0.55	0.55	0.71
Compuesto II	0.58	0.57	0.38
Ac. p-OH-Benzolico	0.66	0.62	0.37
Ac. m-OH-Benzolico	0.65	0.60	—
Ac. Siringico	0.53	—	0.70

A.- Acido acético 2%
B.- Acido fórmico 2%
C.- Benceno/ac.acético/agua (60: 22: 12)

Tabla VI

VALORES MEDIOS DE Rf OBTENIDOS DE LA CROMATOGRAFIA EN PAPEL
CON LOS DISTINTOS PATRONES

C O L O R A C I O N E S			
R E V E L A D O R E S			
	A	B	C
Compuesto I	azul cobalto	naranja	morado
Ac. Vanillico	azul cobalto	naranja	morado
Compuesto II	morado	amarillo	rosa
Ac. p-OH-Benzoico	morado	amarillo	rosa
Ac. m-OH-Benzoico	morado	amarillo	rosa
Ac. Siringico	azul	naranja	azul
<p>A.- U.V. (254 nm)</p> <p>B.- p-nitroanilina diazotada</p> <p>C.- p-nitroanilina diazotada + Carbonato disódico (15%)</p>			

Tabla VII

COLORACIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFIA EN PAPEL
CON LOS DISTINTOS PATRONES

EXTO: Extracto etanólico

V: Acido Vanílico

PHE: Acido p-hidroxibenzoico

MHE: Acido m-hidroxibenzoico

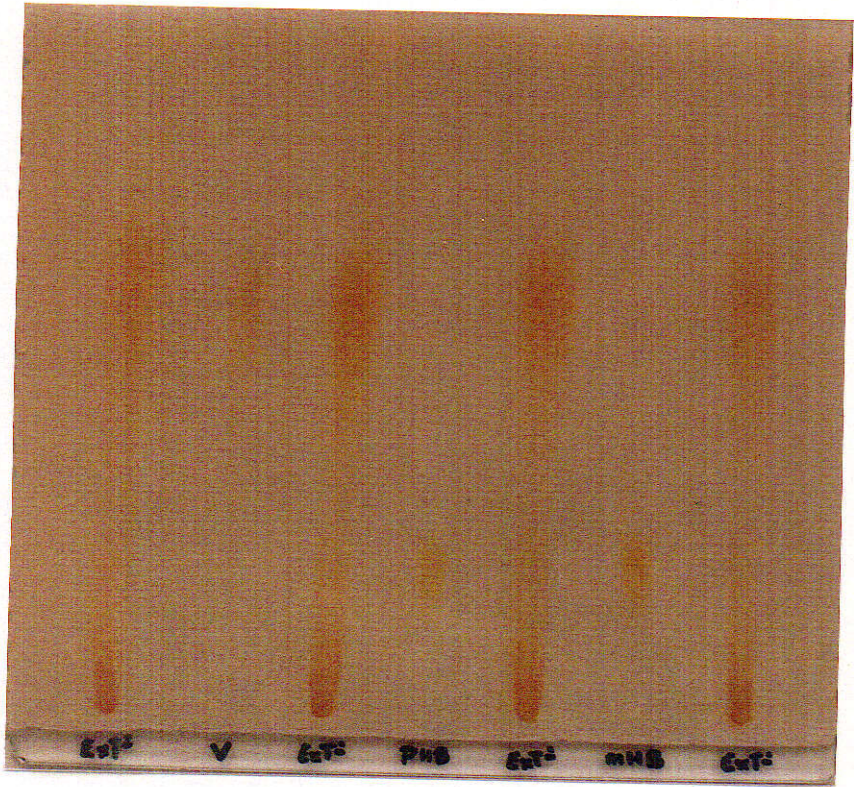
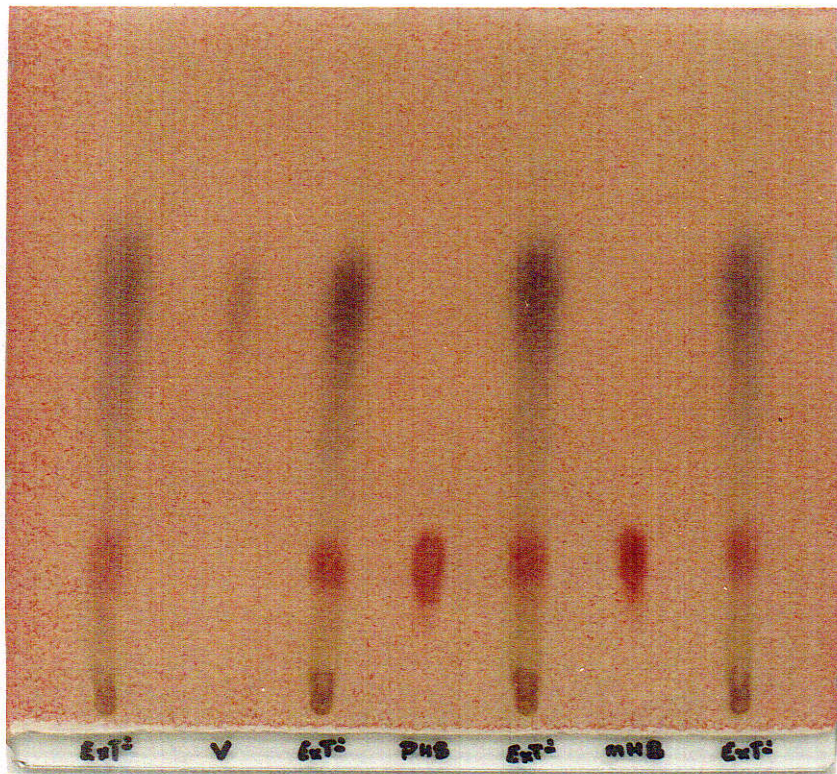


FIG. 3

FIG. 4



III.A.4.2.5. Cromatografía Preparativa en Papel

Para proceder al aislamiento de los dos componentes presentes en el extracto de ácidos fenóles, acudimos a la cromatografía preparativa, manteniendo las siguientes condiciones experimentales:

	<u>COMPUESTO I</u>	<u>COMPUESTO II</u>
Fase móvil	Ac. acético 2%	Benceno/ac.acético/agua (60:22:12)
Soporte	Papel Whatman nº 3	
Reveladores	U.V. p-nitroanilina diazotada + Carbonato disódico(15%)	
Desarrollo	Monodimensional descendente	

Las bandas correspondientes a los componentes a aislar, son eluidas con etanol de 96º y sometidas a un estudio cromatográfico en capa fina a fin de confirmar la existencia de compuestos puros en cada eluato.

III.A.4.3. ESTUDIO ESPECTROSCOPICO

III.A.4.3.1. Espectrofotometría U.V.

Para confirmar los datos obtenidos en los ensayos cromatográficos y contribuir a la identificación de los compuestos aislados, realizamos un estudio espectrofotométrico al U.V. de cada uno de los eluatos obtenidos, operando frente a soluciones en etanol 95% para espectroscopia (Merck), de los patrones correspondientes a los ácidos fenoles identificados previamente.

Dichos compuestos presentan unos máximos de absorción característicos y estas absorciones pueden ser modificadas por la adición de diferentes reactivos, debido a la presencia de sustituyentes en posiciones determinadas de su estructura (MABRY, 1970).

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

Las condiciones experimentales fueron las siguientes (ALARCON DE LA LASTRA, 1988):

Velocidad de la carta: 60 mm/min

Sensibilidad: 0.0-1.0

λ máx: 500 nm

λ mín: 200 nm

III.A.4.3.1.1. Resultados

En la Tabla VIII se indican las bandas de absorción a las distintas λ máximas de los ácidos fenóles aislados como de los patrones utilizados; así como los cambios espectrales detectados con la adición de diferentes reactivos.

Los espectros U.V. en etanol correspondientes, aparecen en las figuras 5 y 6.

III.A.4.3.2. Espectrometría de masas

Los compuestos aislados por cromatografía preparativa e identificados por cromatografía en capa fina, papel y espectrofotometría U.V./VIS., se confirmaron por espectrometría de masas (SEIBL, 1973).

El espectrómetro de masas utilizado ha sido KRATOS-MS 80 RFA con ionización por bombardeo electrónico.

Condiciones de la experiencia

Temperatura máxima de la fuente de ionización: 2000 C

Energía de ionización: 70 E.V.

Resolución: 1000

Introducción de la muestra mediante una sonda para sólidos.

III.A.4.3.2.1. Resultados

A continuación se detallan los resultados obtenidos expresados en valores de masa/carga eléctrica (m/z), quedando indicadas entre paréntesis, las intensidades en %.

E.M. m/z (%)

COMPUESTO I

M+ 168(100), 153(56), 151(14), 138(5), 125(10), 121(6), 97(12),
51(5).

COMPUESTO II

M+ 138(88), 122(8), 121(100), 93(22), 65(15), 44(17), 40(18).

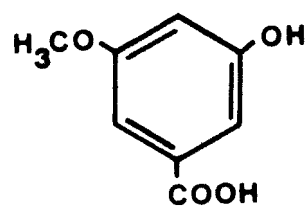
Las figuras 7 y 8 nos muestran los espectros obtenidos en cada caso.

ESPECTROS U.V. EN ETANOL

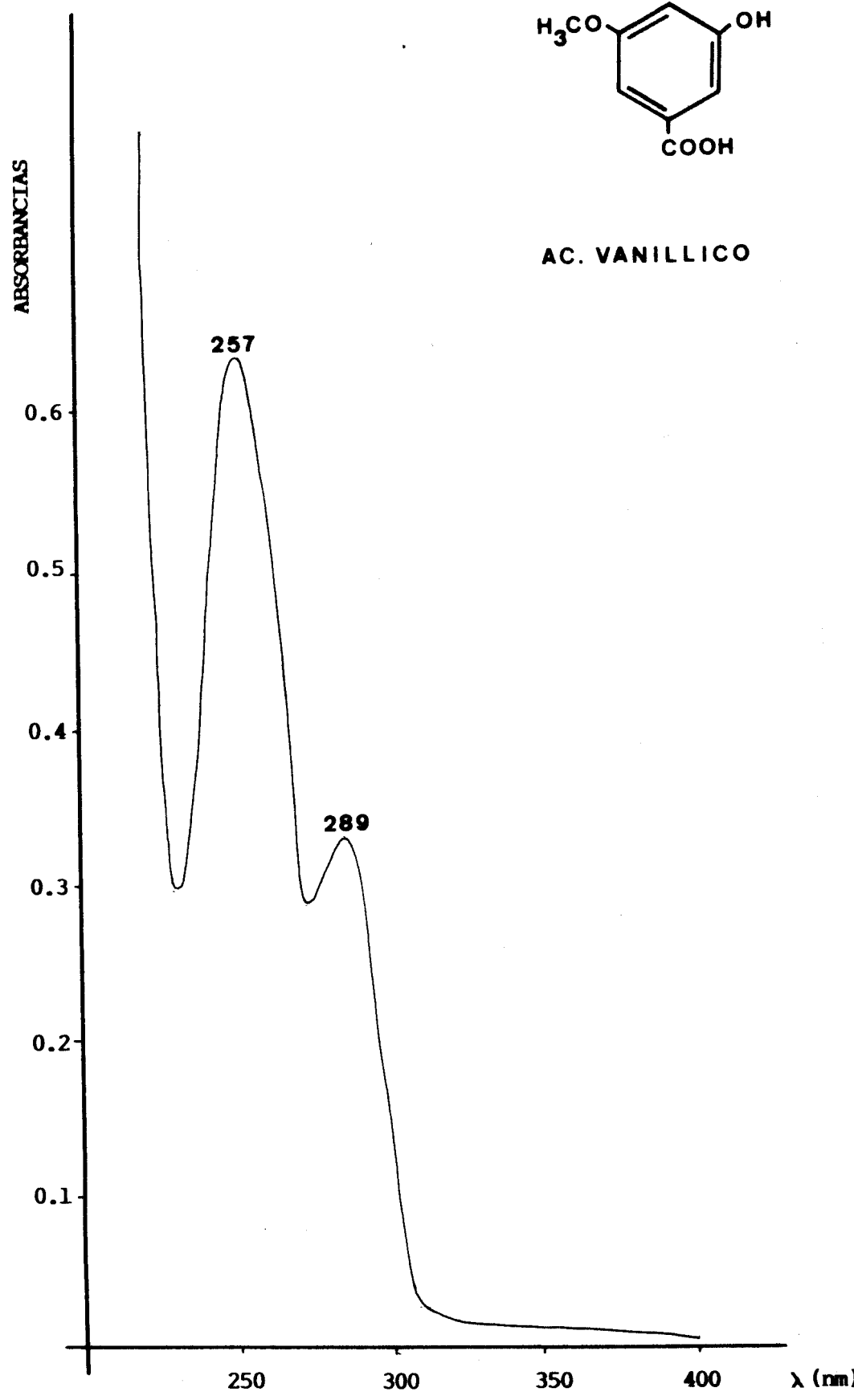
		R E A C T I V O S				
		NaNeO	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaOAc	NaOAc/H ₂ O
COMPUESTO I	250, 289	294	262, 359sh	257, 359sh	247, 282	248, 283
AC. VANILICO	257, 289	294	262, 359sh	258, 359sh	248, 283	249, 283
COMPUESTO II	251	274	254, 356sh	252, 358sh	244	244
AC. p-OH BENZOICO	251	276	256, 358sh	253, 360sh	244	244
AC. m-OH BENZOICO	294					

Tabla VIII

λ máx (nm) correspondientes a los eluatos problemas y soluciones patrones

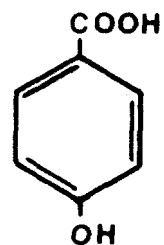


AC. VANILLICO



ESPECTRO DEL COMPUESTO I

FIG. 5



AC. P-HIDROXIBENZOICO

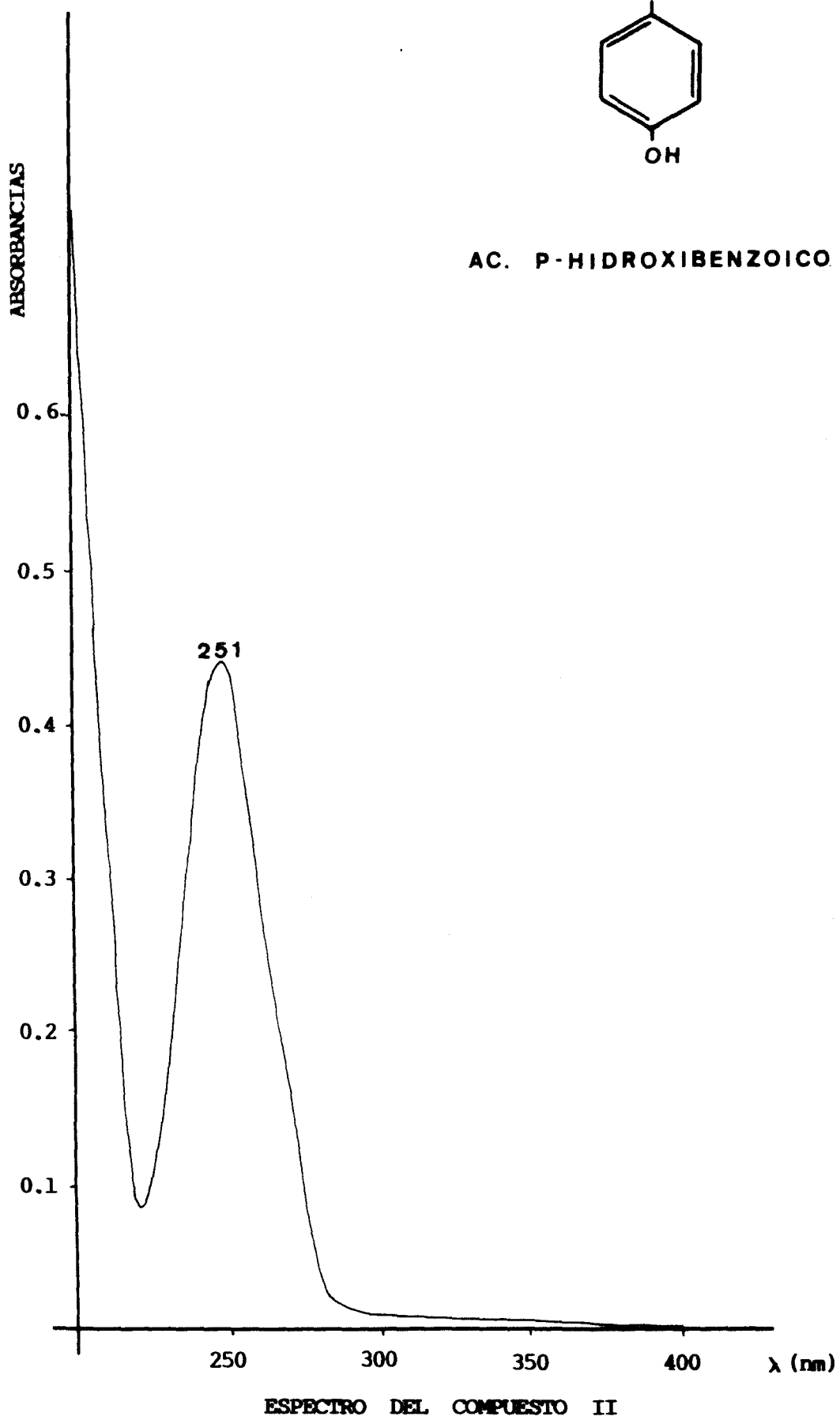


FIG. 6

DS90 FAP0020.39 RT= 02:59 +EI SLRP 10/20/89 11:23
TIC= 2976576 100%= 551200 MD HERRERA
100 168

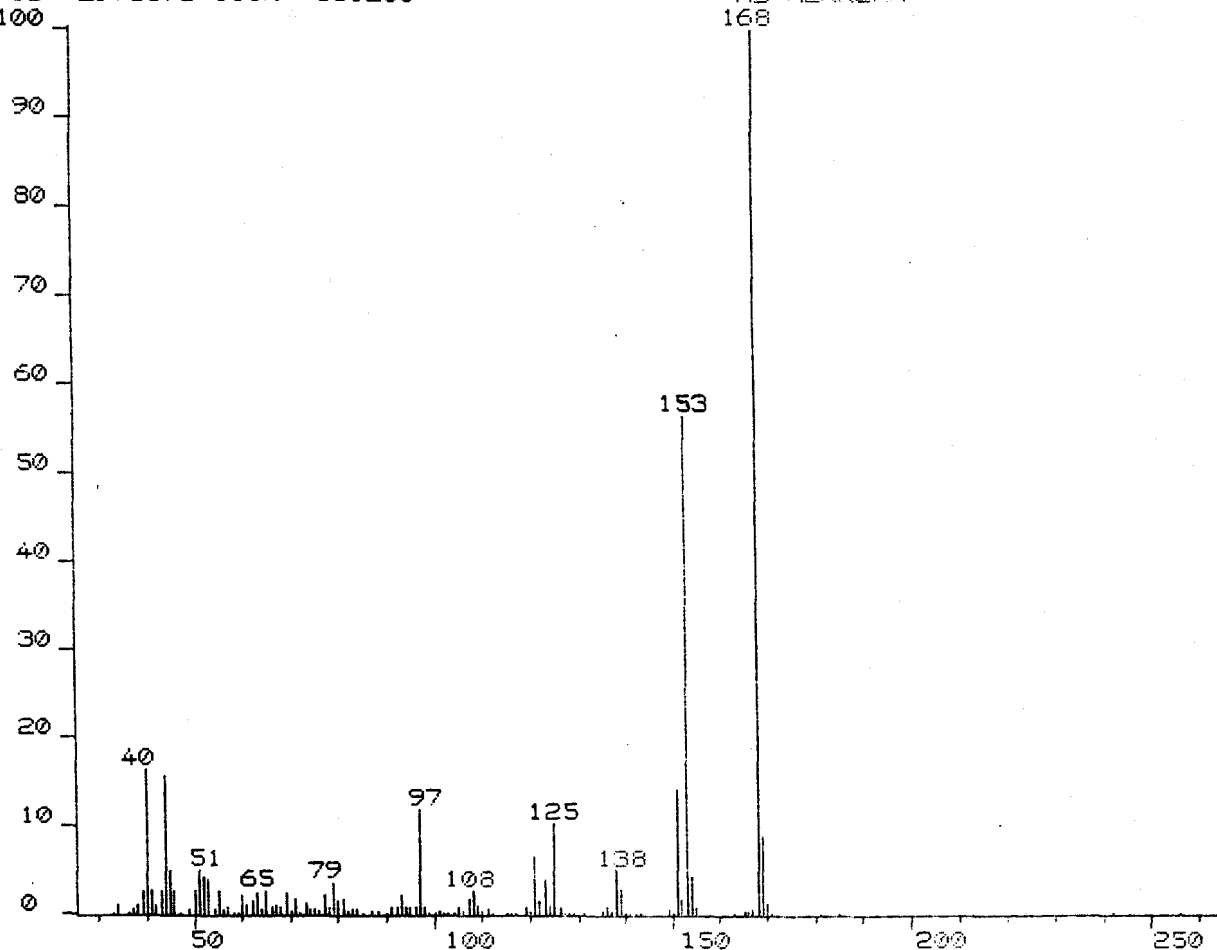


FIG. 7

ESPECTRO DE MASAS DEL COMPUESTO I

DS90 FAP0019.65 RT= 05:01 +EI SLRP 10/20/89 11:03
TIC= 2835864 100%= 509136

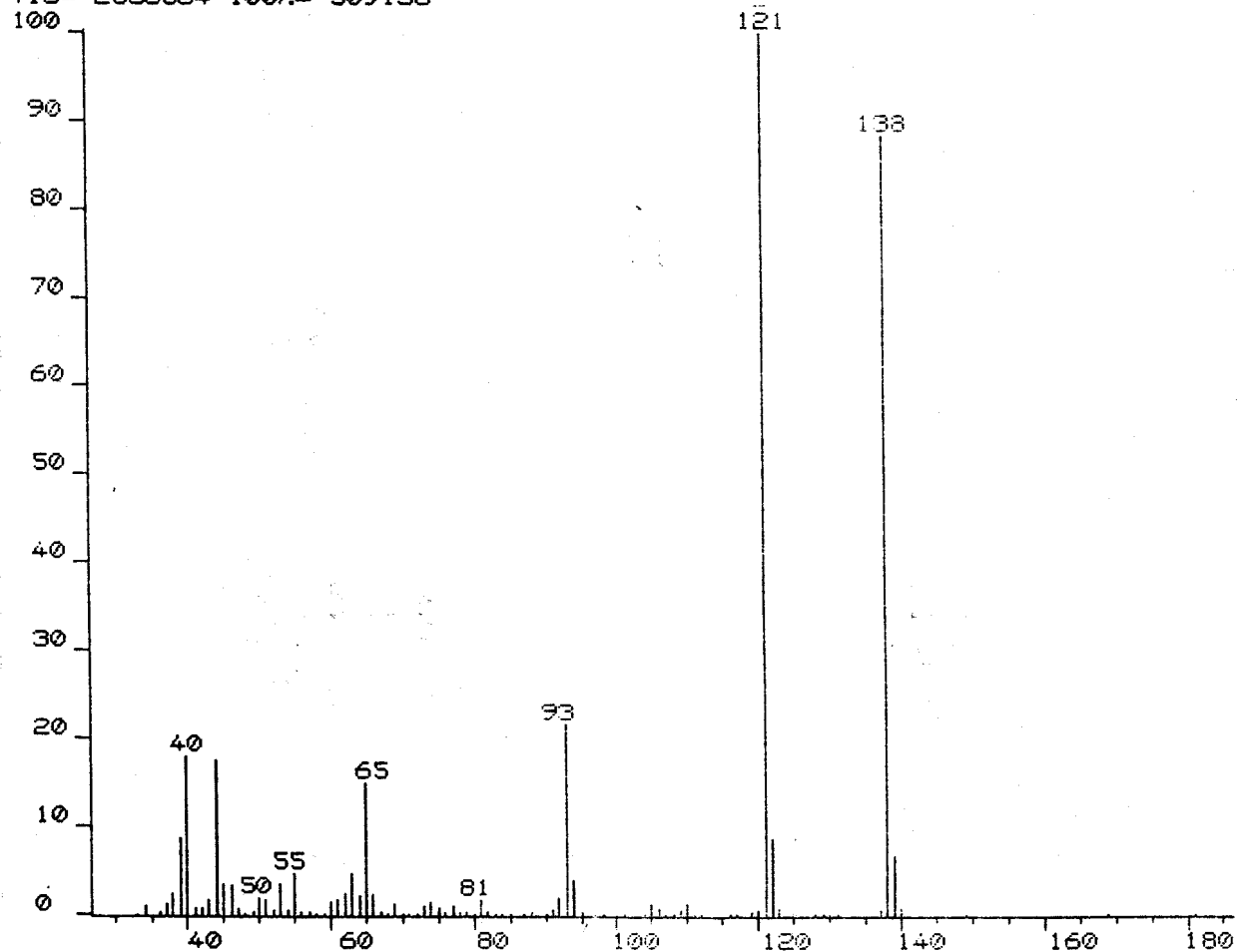


FIG. 8

ESPECTRO DE MASAS DEL COMPUESTO II

III.A.4.4. DISCUSION DE RESULTADOS

Los ensayos cromatográficos en capa fina y papel efectuados con el extracto etanólico nos orientan hacia la presencia de los ácidos vanílicico y p-hidroxibenzoico, de acuerdo con los valores de Rf y coloraciones obtenidas al revelar el cromatograma con los reveladores específicos.

Los resultados obtenidos por espectrofotometría U.V./VIS., nos ponen de manifiesto que los principios aislados por cromatografía preparativa, tienen el mismo comportamiento que los ácidos detectados en los ensayos cromatográficos; el espectro correspondiente al ácido vanílicico, muestra dos máximos a una λ de 258 y 289 nm que coinciden con el patrón, coincidencia que también se manifiesta con el ácido p-hidroxibenzoico y el patrón correspondiente, cuyos espectros muestran un máximo a una de 251 nm.

El análisis por espectrometría de masas nos confirma que los compuestos I y II se corresponden con los ácidos vanílicico y p-hidroxibenzoico respectivamente.

Sus espectros coinciden con los recogidos en la bibliografía (STENMAGEN, 1969; MARHUENDA, 1987), encontrándose un pico base a m/z 168 para el ácido vanílicico que corresponde al ión molecular, mientras que para el ácido p-hidroxibenzoico el máximo de intensidad corresponde al ión 121 que proviene probablemente de la pérdida de un OH.

III.A.5. ANALISIS CUALITATIVO DE PRINCIPIOS FLAVONICOS

III.A.5.1. EXTRACCION

La extracción se realizó según el método descrito por Netien-Lebreton (NETIEN, 1964) modificado por nosotros (Fig. 9).

Se partió de 30 g de planta, que fue sometida a extracción continuada (Soxhlet) utilizando cloroformo como disolvente a fin de poder eliminar clorofila y sustancias lipófilas.

El marco resultante le sometimos a una nueva extracción con metanol. El extracto es concentrado hasta sequedad y el residuo seco correspondiente se disolvió en agua hirviendo. Con este extracto acuoso se procedió después a una extracción líquido-líquido utilizando como disolventes sucesivos, éter etílico, acetato de etilo y butanol (MAKBOUL, 1984).

Los extractos así obtenidos se concentraron a presión reducida hasta residuo seco, obteniéndose los siguientes rendimientos:

Ext ^o clorofórmico (r.s. A)	4.42%
Ext ^o etéreo (r.s. B)	0.96%
Ext ^o acetato de etilo (r.s. C)	1.53%
Ext ^o butanólico (r.s. D)	6.67%
Ext ^o acuoso (r.s. E)	5.16%

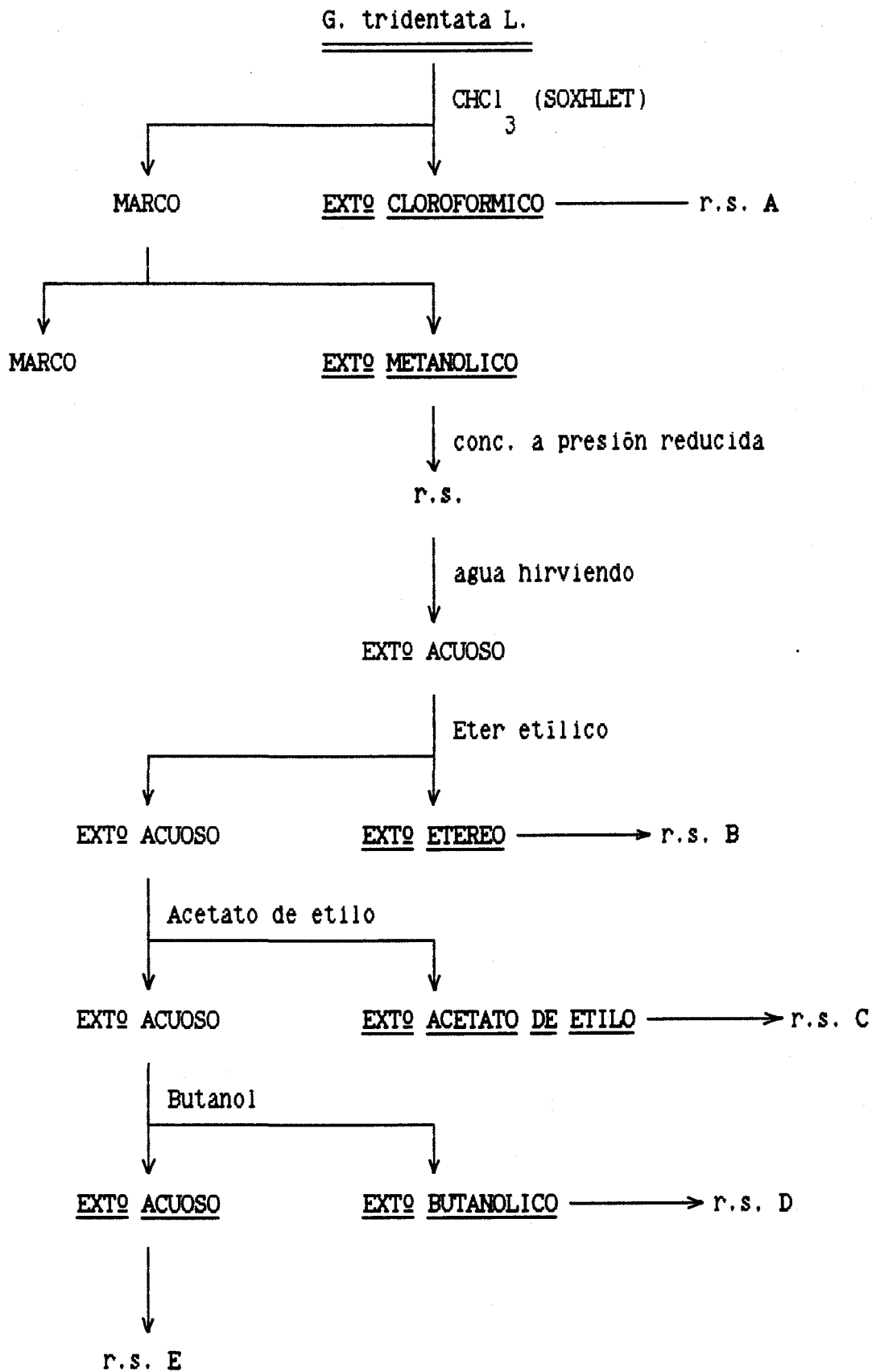


Fig. 9

III.A.5.2. ESTUDIO CROMATOGRAFICO

Los residuos A,B,C y D fueron redisoluertos en metanol (KOLAR, 1981) y sometidos a estudio cromatográfico a fin de conocer el número de principios presentes en cada extracto.

III.A.5.2.1. Cromatografía en capa fina

Tras la realización de numerosos cromatogramas monodimensionales ascendentes con distintas fases móviles, se han seleccionado las detalladas a continuación que son las que han mostrado un mayor poder resolutivo.

Fases móviles (AFCHAR, 1984)

Metanol/cloroformo (5: 95)

Acetato de etilo/metanol/agua (150: 10: 5)

Soporte

Silicagel 60 HF 254

Grosor de la capa

0.25 mm

Reveladores (RIBEREAU-GAYON, 1968)

U.V. (254 nm)

Tricloruro de aluminio (sol. alcohólica al 2%)

En el extracto etéreo hemos podido comprobar la presencia de un componente mayoritario al que denominamos compuesto I, y en el conseguido con acetato de etilo también aparece un principio mayoritario que le designamos como compuesto II.

III.A.5.2.2. Identificación mediante patrones de referencia

Los valores de Rf que presentaban los principios detectados en los correspondientes cromatogramas, así como la información bibliográfica, nos permitieron seleccionar como patrones de referencia, dos principios ya detectados en otras especies del género Genista: GENISTEIN y GENISTIN (EXTRASYNTHÈSE).

III.A.5.2.3. Resultados

Los valores medios de Rf y las coloraciones que aparecen con los distintos reveladores, quedan recogidos en la Tabla IX.

	Rf		Coloraciones	
	FASES MOVILES		REVELADORES	
	A	B	A	B
EXTº ETÉREO (Compuesto I)	0.58		Púrpura intenso	Amarillo pálido
GENISTEIN	0.59		Púrpura intenso	Amarillo pálido
EXTº ACETATO DE ETILO (Compuesto II)		0.54	Púrpura intenso	Amarillo pálido
GENISTIN		0.56	Púrpura intenso	Amarillo pálido
	A. MeOH/Cl ₃ CH (5:95) 3		A. U.V. (254 nm)	
	B. Acet. etilo/MeOH/ H ₂ O (150:10:5) 2		B. AlCl ₃ (2%) 3	

Tabla IX

VALORES MEDIOS DE Rf Y COLORACIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFIA
EN CAPA FINA CON LOS DISTINTOS PATRONES

III.A.5.2.4. Cromatografía preparativa en capa fina

El aislamiento del compuesto I y II lo hemos efectuado mediante cromatografía preparativa.

	EXTO ETereo (COMPUESTO I)	EXTO ACETATO DE ETILO (COMPUESTO II)
Fase móvil (BECK, 1964)	Metanol/cloroformo(1:9) (HARBONE, 1969)	Acetato de etilo/MeOH/agua (150:10:5)
Soporte (KEEN, 1980)	Silicagel 60 HF 254	
Grosor	0.50 mm	
Reveladores	U.V. (254 nm) Tricloruro de aluminio (2%)	

Las bandas obtenidas son diluidas en metanol siendo posteriormente filtradas hasta ausencia total de sílice y para confirmar la pureza del compuesto eluido, se procedió de nuevo a cromatografiarlo.

III.A.5.3. ESTUDIO ESPECTROSCOPICO

Hemos procedido al estudio espectroscópico de los principios aislados manteniendo las mismas condiciones operativas a las expuestas en el apartado III.A.4.3. (GELLERT, 1985; KAZAKOV, 1980)

III.A.5.3.1. Espectrofotometría U.V.

De acuerdo con los cambios espectrales producidos por ciertos reactivos, relacionados con la localización de grupos hidroxilos en compuestos de naturaleza flavónica (JURD, 1956), podemos inducir cambios similares para obtener información estructural útil en la serie de isoflavonas.

Estos compuestos suelen presentar un pico de absorción prominente en la región de 250-290 nm (Banda II) y solamente un hombro o pico de baja intensidad, representa a la banda I (MABRY, 1970).

Para la detección de un grupo hidroxilo libre en posición 7, utilizamos acetato de sodio ya que dicho grupo es lo suficientemente ácido como para ser ionizado por el reactivo, produciendo un cambio batocrómico de unos 10 nm en la banda principal de absorción. No se observan cambios significativos en los espectros cuando el hidroxilo no se encuentra libre. Esto, nos permite diferenciar isómeros tales como GENISTIN y SOPHORICOSIDO 7 y

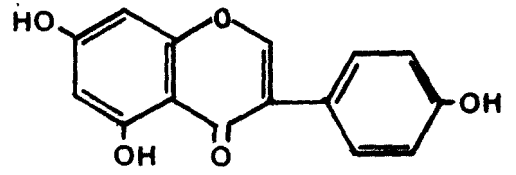
4' glucósido respectivamente de la aglicona GENISTEIN (5,7,4' trihidroxiisoflavona) con espectros en etanol virtualmente idénticos, mientras que en presencia de acetato de sodio, el de GENISTIN se mantiene y el de SOPHORICOSIDO difiere 13 nm (HOROWITZ, 1961).

Respecto al grupo hidroxilo en posición 5, las isoflavonas que lo poseen en forma libre, forman complejo con el tricloruro de aluminio y este complejo se manifiesta en un cambio batocrómico de 11-14 nm en su espectro (BRIGGS, 1959; DUNLAP, 1960).

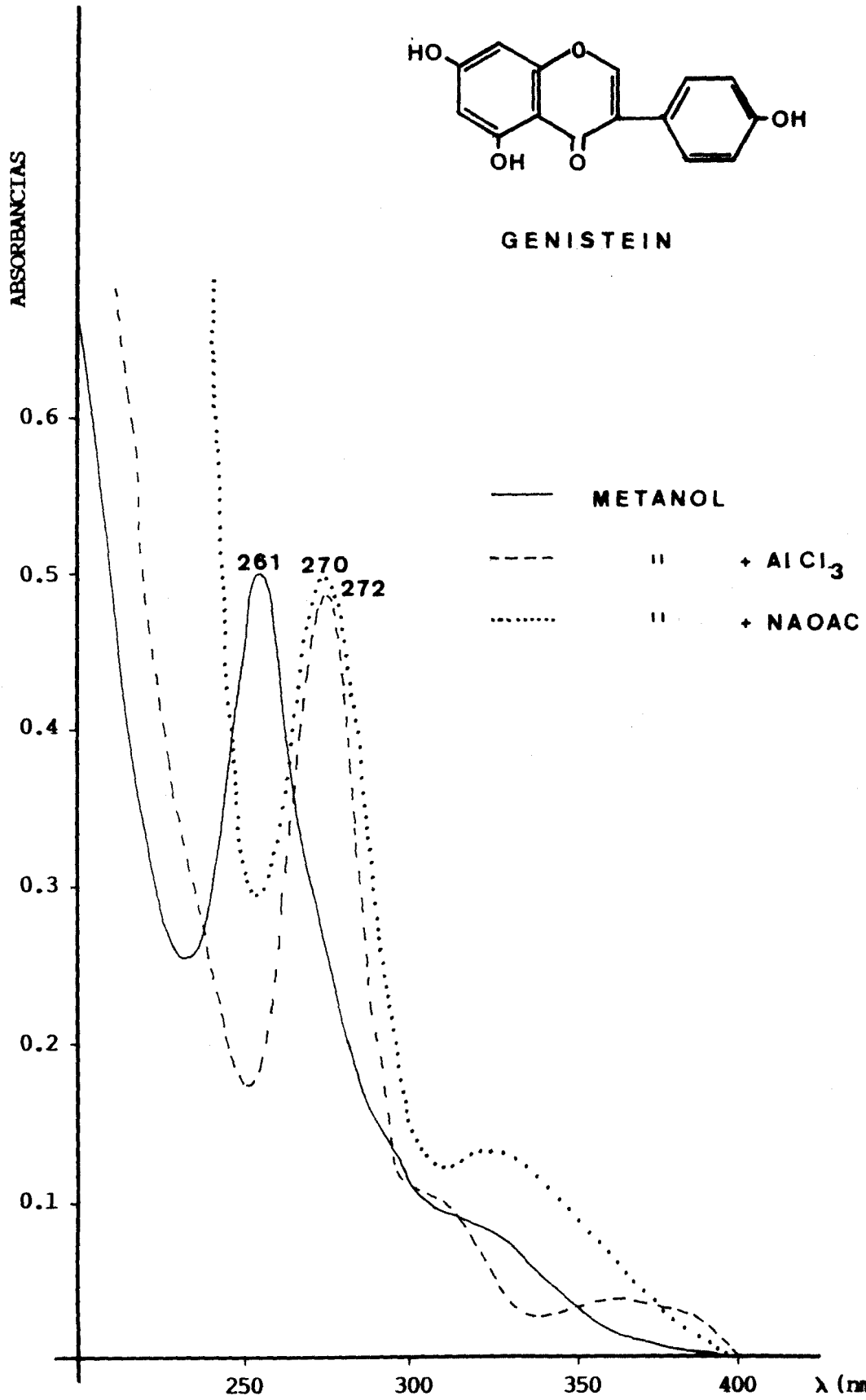
III.A.5.3.1.1. Resultados

Los espectros U.V. en metanol de las dos isoflavonas aisladas se muestran en las Figuras 10 y 11.

Los máximos de absorción presentados por los diferentes compuestos (problemas y patrones) quedan reflejados en las Tabla X.

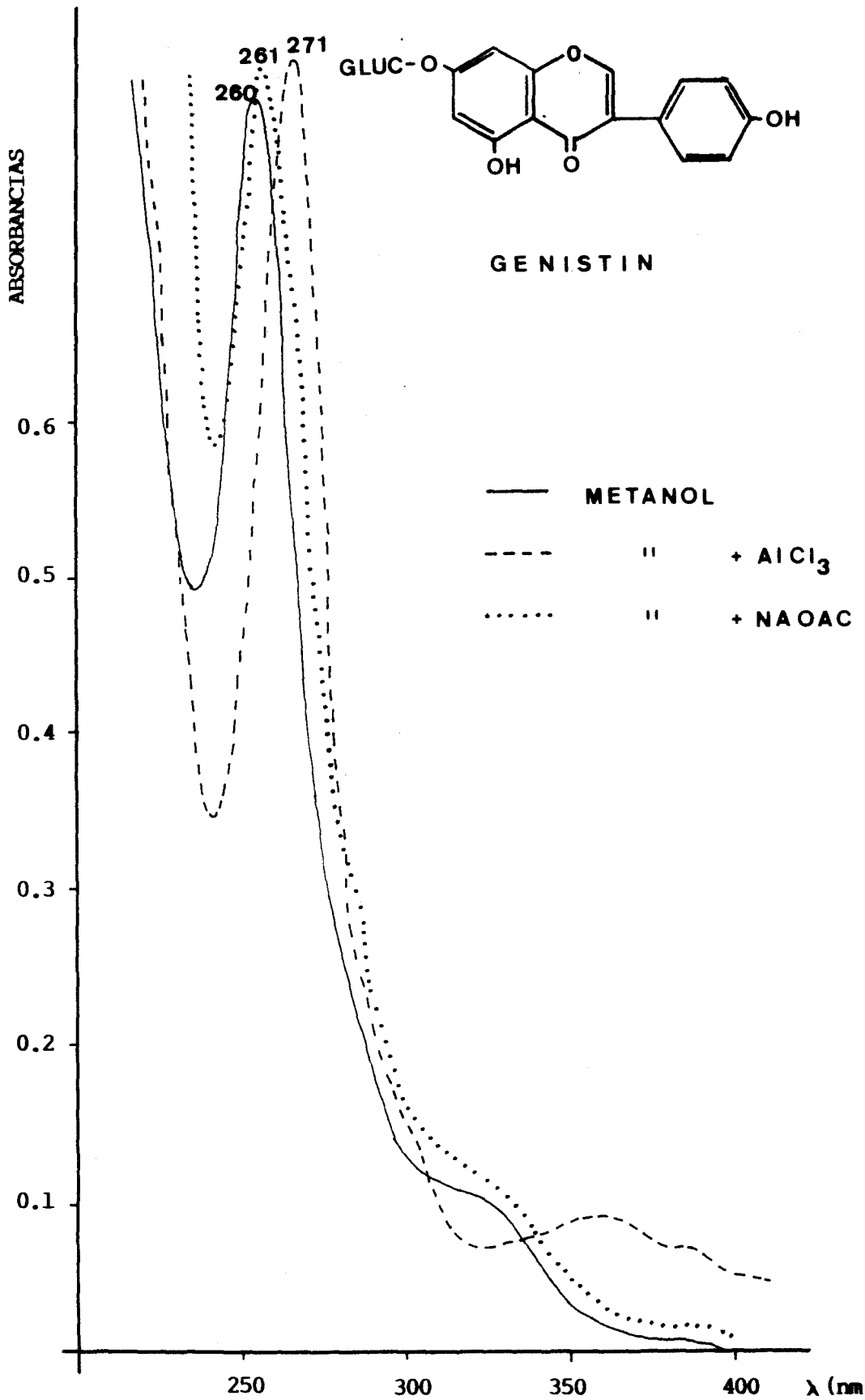


GENISTEIN



ESPECTRO DEL COMPUESTO I

FIG. 10



ESPECTRO DEL COMPUESTO II

FIG. 11

ESPECTROS U.V. EN METANOL

		R E A C T I V O S				
		NaMeO	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃
COMPUESTO I	261,328sh	277,327sh	272,307sh	273,309sh	270,325	262,326sh
GENISTEIN	260,327sh	278,327sh	272,307sh	272,310sh	270,327	261,335sh
COMPUESTO II	260,330s	270,353sh	271,373sh	271,373sh	261,331sh	260,328sh
GENISTIN	260,330sh	270,353sh	272,373sh	272,373sh	260,331sh	260,328sh

Tabla X

λ máx (nm) correspondientes a los eluatos problemas y soluciones patrones.

III.A.5.3.2. Espectrometria de masas

Los espectros de masa de los dos compuestos aislados se realizan en las mismas condiciones experimentales a las reseñadas en el apartado III.A.4.3.2.

III.A.5.3.2.1. Resultados

Los resultados obtenidos están expresados en valores de masa/carga eléctrica (m/z), indicando entre paréntesis, las intensidades en %.

E.M. m/z (%)

COMPUESTO I

M^+ 270(100), 153(35), 152(19), 135(7), 118(15), 70(9), 60(10).

COMPUESTO II

270(100), 153(32), 152(19), 135(7), 118(14), 98(12), 73(48), 60(70), 57(44).

Las Figuras 12 y 13 muestran los espectros obtenidos para cada compuesto.

DS90 FAP0021.62 RT= 04:46 +EI SLRP 10/20/89 12:49
TIC= 2309824 100%= 221444 G1 (MD. HERRERAGLEZ.) PM 270.25
100 270

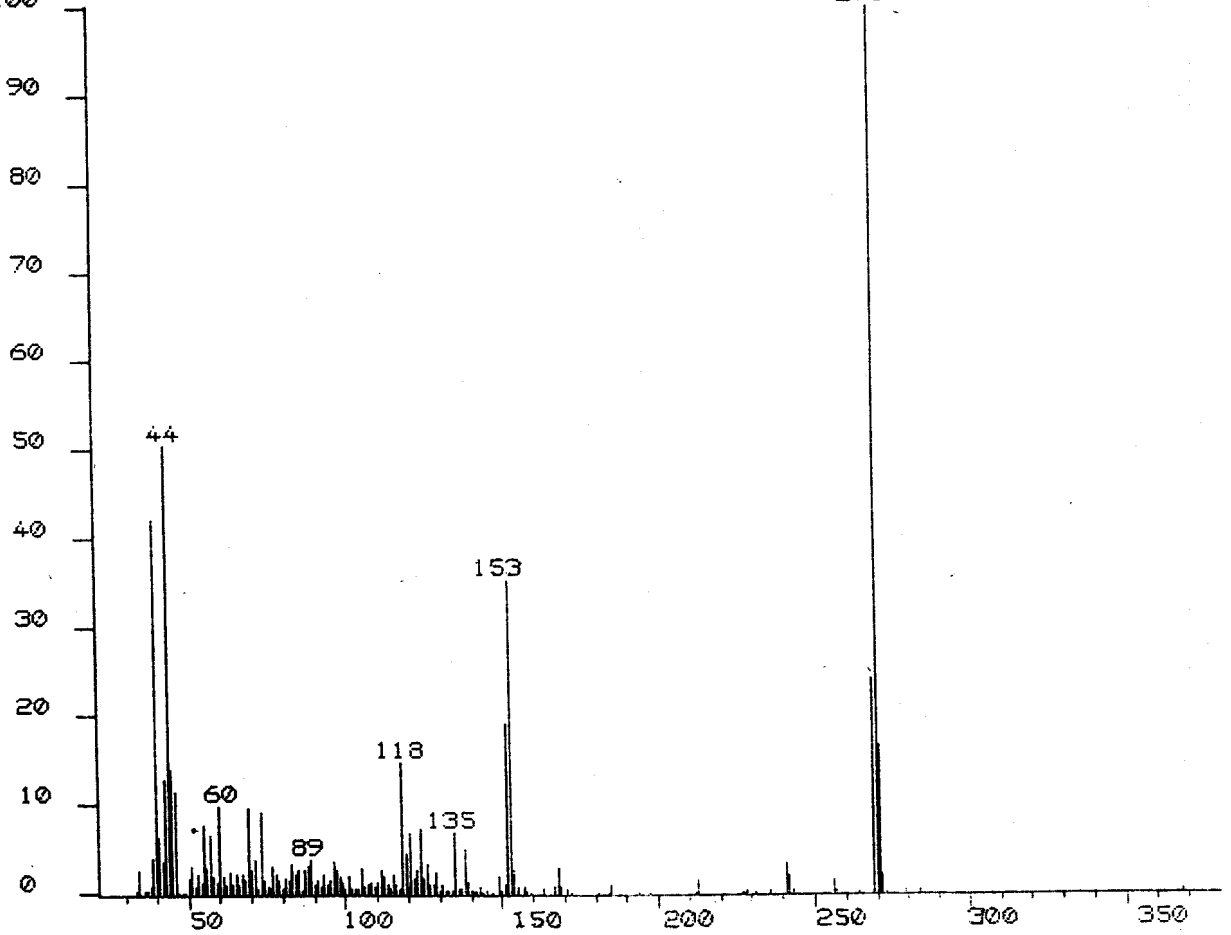


FIG. 12

ESPECTRO DE MASAS DEL COMPUESTO I

DS90 FAP0023.62 RT= 04:47 +EI SLRP 10/20/89 13:26
TIC= 4205056 100%= 306256 G2(MD HERRERA GLEZ.)
100

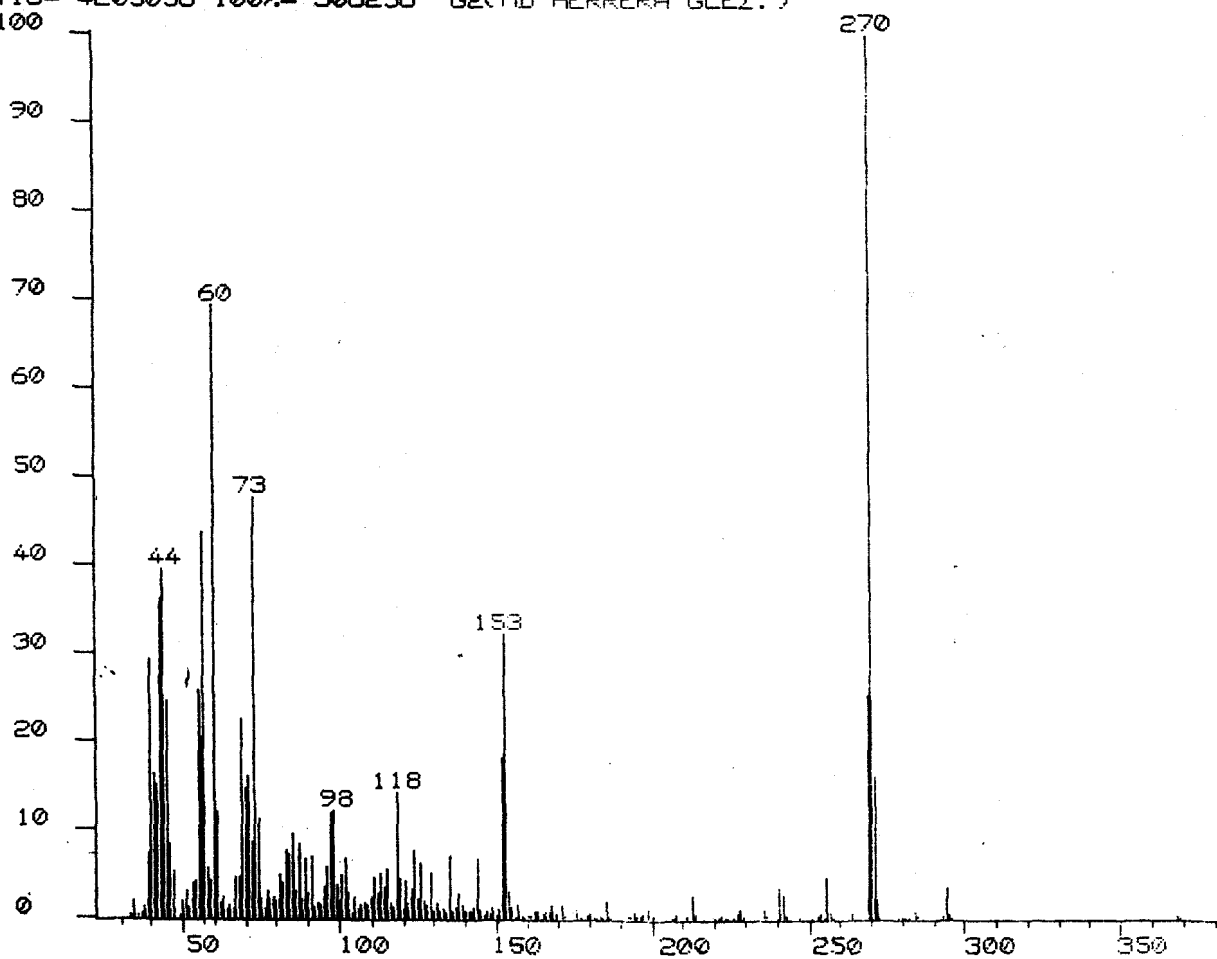


FIG. 13

ESPECTRO DE MASAS DEL COMPUESTO II

III.A.5.4. DISCUSION DE RESULTADOS

Para el aislamiento de los principios flavónicos hemos seleccionado el método de Netien-Lebreton y en la identificación, las técnicas espectroscópicas usuales.

De las fases móviles ensayadas se seleccionaron: Metanol/cloroformo (5:95) y acetato de etilo/MeOH/agua (150:10:5), ya que nos permiten obtener una mejor separación de los componentes.

Con todas ellas se ha evidenciado la coincidencia, tanto de color como de Rf, de los componentes mayoritarios de nuestros extractos problemas con patrones puros.

Los resultados obtenidos por espectrofotometría U.V./VIS. para los dos compuestos aislados nos confirman su naturaleza isoflavónica.

El cambio batocrómico resultante de la adición de clorhidrato de aluminio como reactivo tanto en el compuesto I como II nos muestra la presencia de un grupo OH en la posición 5, mientras que la ausencia de cambio en el compuesto II al añadir acetato de sodio, nos orienta hacia la existencia de un bloqueo del hidroxilo de la posición 7 a diferencia con el compuesto I que se encuentra en forma de OH libre.

Los espectros de masas coinciden con los recogidos en la bibliografía (INGHAM, 1976; O'NEILL, 1983) encontrándose en ambos un máximo de intensidad en el ión de masa 270 que corresponde al ión molecular de GENISTEIN.

Correspondiéndose por tanto, el compuesto I con GENISTEIN y el compuesto II con su heterósido GENISTIN.

B. ENSAYOS FARMACODINAMICOS

III.B.1. ENSAYOS GENERALES DE TOXICIDAD AGUDA

La determinación de la toxicidad aguda, es paso obligatorio en el estudio de la actividad de un fármaco. Hemos utilizado la técnica de Miller & Tainter (MILLER & TAINTER, 1944).

El ensayo se realizó con ratones Swiss de ambos sexos y las dosis administradas por vía intraperitoneal, fueron las siguientes:

LOTE I	2000 mg r.s.	cocimiento/Kg de animal
LOTE II	2500 mg r.s.	" " "
LOTE III	3000 mg r.s.	" " "

Tras realizar el recuento de animales vivos y muertos de cada lote, se construye un gráfico, en el que se representa el porcentaje de mortalidad transformado en probits, en función del logaritmo de las dosis correspondientes.

De esta forma, la representación obtenida es una línea recta, sobre la que deducimos el valor de la DL₅₀ (dosis letal

media) por la lectura directa de la dosis correspondiente al 50% de animales muertos (probits 5).

III.B.1.1. RESULTADOS

Los resultados obtenidos, se exponen en la Tabla XI.

Los síntomas observados al administrar las dosis ensayadas han sido: laxitud, somnolencia y leve taquicardia.

III.B.1.2. DISCUSION DE RESULTADOS

A la vista del comportamiento seguido por los animales de experimentación tras la administración de 2, 2.5 y 3 g r.s./Kg animal, se puede fácilmente deducir la práctica atoxicidad de *G. tridentata* L. ya que no sólo no se produce la muerte de ninguno de los animales de los lotes tratados, sino que tampoco aparecen reacciones adversas de consideración, teniendo en cuenta, que la máxima dosis equivale a \pm 20 g de planta y que la vía de administración ha sido la intraperitoneal.

<u>DOSIS</u> (mg r.s./Kg animal)	<u>EQUIVALENTE DROGA</u> (g)	<u>MORTALIDAD</u> (%)
2.000	12.86	0
2.500	16.08	0
3.000	19.29	0

Tabla XI

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

III.B.2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ESPASMOLITICA EN ORGANOS AISLADO

La técnica experimental empleada para estudiar la actividad espasmolítica, ha sido "in vitro", por constituir un modelo sencillo que permite demostrar la interacción fármaco-receptor directamente, eliminando factores farmacocinéticos. Nos permite además poner de manifiesto la relación dosis-efecto.

III.B.2.1. EXTRACTO FLAVONICO

La valoración de la actividad espasmolítica, se ha realizado sobre duodeno aislado de rata, siguiendo el método general de Magnus (MAGNUS, 1983), Van Rossum y Van der Brink (VAN ROSSUM, 1963).

Los órganos han sido obtenidos de ratas machos de raza Wistar de peso comprendido entre 200 y 250 g sacrificadas mediante un golpe en la nuca, procediendo posteriormente a la exsanguinización por corte de yugular y carótida.

La copa del baño de órganos, contiene 37 ml de solución nutritiva de Tyrode (ESPLUGUES, 1982) que se mantiene a 37°C de temperatura y con oxigenación constante.

Los efectos se han registrado en un Poligrafo LETI-GRAPH 2000 al que se encuentra acoplado un transductor isotónico LETICA 505, ajustado con una tensión inicial de 1 g.

Los agonistas empleados han sido, Cloruro de Acetilcolina (Merck) y Cloruro de Bario (Merck) a dosis comprendidas entre:

$4.65 \times 10^{-9} \text{ M}$	-	$2.38 \times 10^{-6} \text{ M}$	Cloruro de Acetilcolina
$8.85 \times 10^{-6} \text{ M}$	-	$1.42 \times 10^{-4} \text{ M}$	Cloruro de Bario

La solución problema ensayada es un extracto flavónico al 2% en solución hidroalcohólica (1:1):

<u>Dosis (mg)</u>	<u>Vol. (ml)</u>	<u>Concentración en baño</u>
4 mg r.s. Extº flavónico	0.2	0.1333 mg/ml

La preparación se mantiene en reposo, hasta conseguir una línea basal estable. A continuación procedemos a realizar la curva patrón con el agonista correspondiente.

Las curvas dosis-respuesta se han elaborado de acuerdo con el siguiente protocolo:

Experiencia A

Una vez estabilizado el músculo, se adiciona al baño la dosis seleccionada de problema y transcurridos 5 minutos se van añadiendo las dosis correspondientes del agonista (MARHUENDA, 1988).

Experiencia B

La adición al baño de órganos de la dosis de sustancia problema tiene lugar según esta modalidad, inmediatamente después de la última adición del agonista. Aguardamos 5 minutos y se procede al lavado de la preparación a fin de devolverle las condiciones iniciales (TORCK, 1971).

III.B.2.1.1. Resultados

Experiencia A

Las curvas dosis-respuesta se obtienen disponiendo en ordenadas los valores medios correspondientes a los % de efecto ($E \times 100/EMT$) y en abscisas los logaritmos correspondientes a las concentraciones molares del agonista. De esta manera, podemos apreciar las variaciones que puede ocasionar el pretratamiento con la solución problema, de forma gráfica.

Los resultados se muestran en las Tablas XII y XIII en las que se recogen los valores de DE_{50} , $E_{m\acute{a}x}$ y pD_2 .

La significación estadística entre las medias de los valores obtenidos, fue determinada aplicando el test de Student.

Las figuras 14 y 15 muestran la representación gráfica.

Experiencia B

Los resultados quedan reflejados en la Tabla XIV como % de relajación producida después de la adición del agonista correspondiente. En la figura 16 se expone la representación gráfica en forma de histograma.

	DE 50	E máx	pD 2
Acetilcolina	1.82×10^{-7} M	100.0 ± 0.00	6.74
4 mg Extº flavónico	2.75×10^{-7} M	105.4 ± 7.39 n.s.	

Tabla XII

VALORES DE DE DE Y E OBTENIDOS CON EL EXTRACTO
50 máx

EN ESTUDIO FRENTE A ACETILCOLINA

	DE 50	E máx	pD 2
Cloruro de Bario	3.31×10^{-5} M	100.0 ± 0.00	4.48
4 mg Extº flavónico	2.82×10^{-5} M	82.1 ± 5.88	

* p < 0.025

Tabla XIII

VALORES DE DE Y E OBTENIDOS CON EL EXTRACTO
50 máx
EN ESTUDIO FRENTE A CLORURO DE BARIO.

Experiencia A (Extr. flav. + Ach)

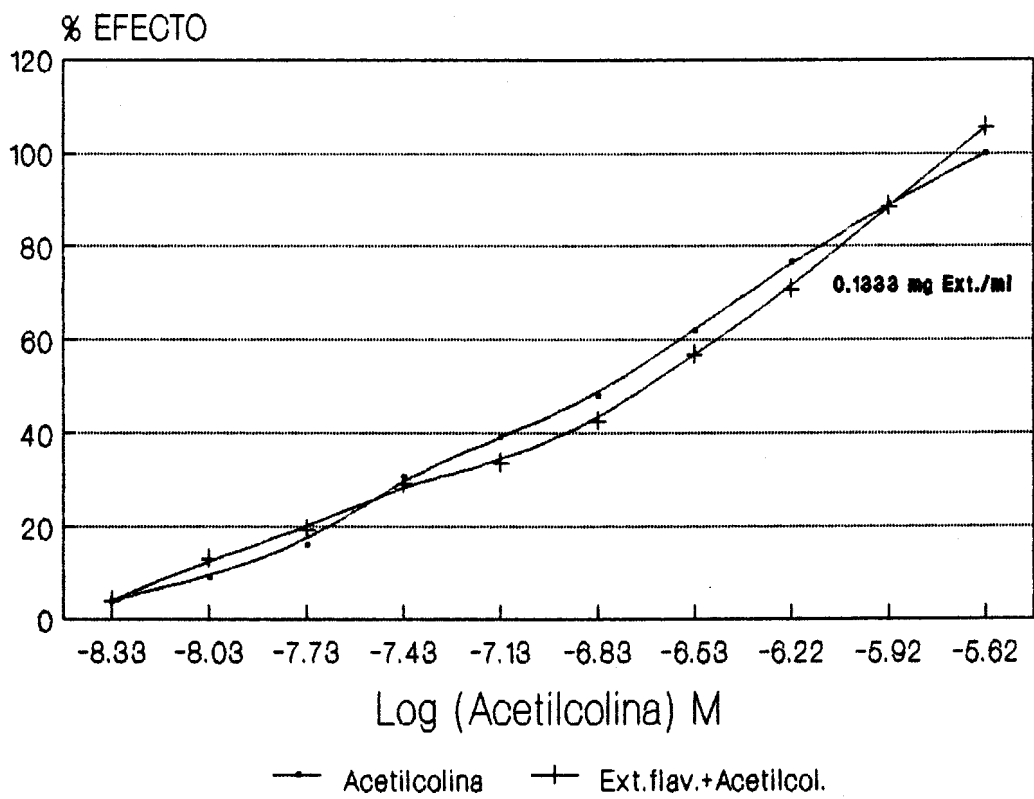


FIG. 14

Experiencia A (Extr. flav. + Cl₂ Ba)

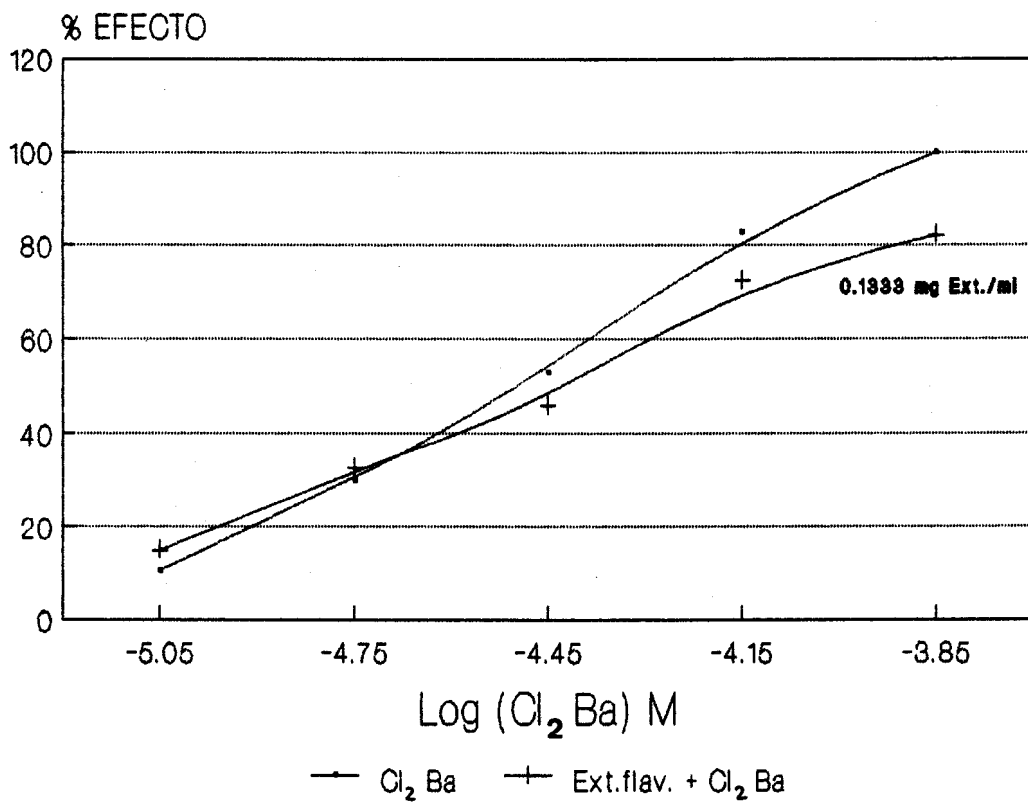


FIG. 15

AGONISTAS
(% relajación)

EXTO FLAVONICO		AGONISTAS (% relajación)	
		Acetilcolina	Cl Ba 2
<u>Vol.</u> (ml)	<u>Concentración</u> baño		
0.2	0.1333 mg/ml	60.05 ±3.25	81.95 ±5.85

Tabla XIV

EFECTO RELAJANTE DEL EXTO FLAVONICO DE *G. tridentata* L.
FRENTE A ACETILCOLINA Y CLORURO DE BARIO

Experiencia B (Agonista + Extr. flav.)

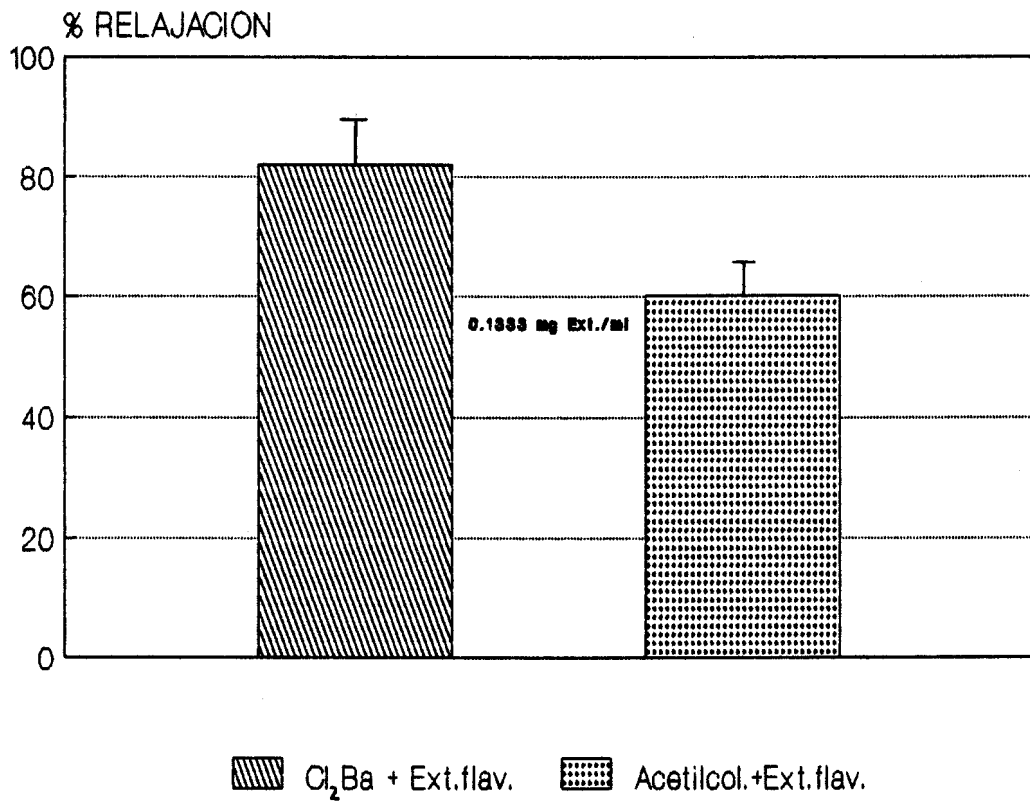


FIG. 16

III.B.2.1.2. Discusión de resultados

El screening farmacodinámico previo realizado con el extracto flavónico de la sumidad florida de *G. tridentata* L. nos puso de manifiesto su capacidad para relajar la musculatura de fibra lisa.

Determinamos la actividad de dicho extracto en duodeno aislado de rata, seleccionando como agonistas Cloruro de Acetilcolina y Cloruro de Bario.

Al elaborar las curvas dosis-respuesta de acuerdo con la modalidad A (adicionar al baño de órganos el extracto y a los 5 minutos el correspondiente agonista) observamos que dicho extracto no es capaz de modificar de forma significativa la curva dosis-respuesta conseguida con dosis acumulativas de Acetilcolina. Por el contrario, si tiene capacidad para variar el perfil cuando el agonista utilizado es el Cloruro de Bario.

En la experiencia B (adición al baño de órganos de dosis acumulativas del agonista y posteriormente el extracto), los resultados son de mucha más significación ya que los % de inhibición frente a los agonistas Cloruro de Acetilcolina y Cloruro de Bario superan el 50 % llegando a producir una disminución de la contracción máxima obtenida con el 29 de prácticamente un 82 %, es decir que en estos ensayos previos se puede observar una marcada

actividad espasmolítica y un ligero poder antiespasmógeno frente al Cloruro de Bario.

III.B.2.2. GENISTEIN

III.B.2.2.1. Acción frente a la Histamina y Cloruro de Bario

Utilizamos la técnica descrita en el apartado III.B.2.1.

Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

	<u>AGONISTAS</u>			
	<u>Cloruro de Bario</u>		<u>Clorh. Histamina</u>	
<u>Concentración baño (M)</u>	8.85×10^{-6}	5.66×10^{-4}	1.76×10^{-8}	5.64×10^{-7}
<u>Tejido</u>	Duodeno de rata		Ileon de cobaya	
<u>Oxigenación</u>	Aire atmosférico		Carbógeno	

Una vez realizadas las curvas patrón con el agonista correspondiente, son añadidas al baño las dosis de Genistein para valorar su efecto frente a la respuesta contractil del intestino, al adicionar los espasmógenos antes citados.

Las dosis administradas de la solución problema (Genistein) fueron las siguientes:

<u>Vol. (ml)</u>	<u>Concentración en baño (M)</u>
0.1	7.33×10^{-6}
0.2	1.47×10^{-5}
0.4	2.93×10^{-5}
0.6	4.40×10^{-5}

Genistein fue solubilizado en una solución hidroalcohólica (1:2).

III.B.2.2.1.1. Resultados

Los parámetros de acción que caracterizan las curvas medias dosis-respuesta de Cloruro de Bario y Clorh. de Histamina, así como las obtenidas después del pretratamiento con cada una de las dosis de Genistein (7.33×10^{-6} M, 1.47×10^{-5} M, 2.93×10^{-5} M, 4.40×10^{-5} M) quedan recogidos en las Tablas XV y XVI.

En las figuras 17 y 18 se muestran las curvas medias dosis-respuesta del agonista antes y después del tratamiento con cada una de las concentraciones de Genistein.

Los resultados obtenidos sobre la acción de Genistein al ser añadido inmediatamente después de la última dosis del agonista correspondiente, quedan recogidos en la Tabla XVII como % de relajación y representados en forma de histograma en la Figura 19.

III.B.2.2.1.2. Discusión de resultados

Para elaborar las curvas dosis-respuesta con Genistein hemos seguido el mismo protocolo descrito anteriormente, pero seleccionando como agonistas el Cloruro de Bario y la Histamina.

En la modalidad A cuando el agonista utilizado es el Cloruro de Bario se produce una modificación significativa de la curva dosis-respuesta al administrar una concentración de Genistein

de 4.4×10^{-5} M, pudiendo apreciar como hecho curioso una mayor actividad de la dosis 2ª (1.47×10^{-5} M) frente a la 3ª (2.93×10^{-5} M).

Este hecho se repite cuando utilizamos como agonista Histamina, ya que los valores de Efecto máximo disminuyen de forma significativa a la dosis de Genistein de 7.33×10^{-6} M; hay una menor actividad (aunque también significativa) de la dosis 2ª con respecto a ésta, mostrándose de nuevo intensamente activa la concentración de 2.93×10^{-5} M. El decremento conseguido con esta 3ª dosis es de 32.86% por lo que no se consideró oportuno seguir incrementándolas.

Los valores obtenidos de acuerdo con la modalidad B si muestran una clara relación dosis-efecto, tanto cuando el agonista es el Coruro de Bario como Histamina aunque se invierte la actividad con respecto a la modalidad A. En este caso, muestra una mayor capacidad espasmolítica frente al Cloruro de Bario originando a la dosis de 4.4×10^{-5} M un % de relajación de 95.57 sin que se evidencie ningún problema para la recuperación del tono muscular.

	DE ⁻⁴ (10 ⁻⁴ M) 50	E máx	pD 2
C L O R U R O D E B A R I O	1.3182	100.00 ± 0.00	3.88
G E N I S T E I N ⁻⁶ (7.33 x 10 ⁻⁶ M)	1.7783	95.61 ± 5.35 n.s.	
⁻⁵ (1.47 x 10 ⁻⁵ M)	1.2301	77.78 ± 6.91 *	
⁻⁵ (2.93 x 10 ⁻⁵ M)	1.3490	90.80 ± 5.87 n.s.	
⁻⁵ (4.40 x 10 ⁻⁵ M)	1.6982	60.80 ± 7.41 **	* p<0.025 ** p<0.005

Tabla XV

PARAMETROS DE ACCION DE LA CURVA MEDIA DOSIS-RESPUESTA DE CLORURO DE BARIO
EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GENISTEIN

	DE (10^{-7} M) 50	E m \bar{x}	pD 2
HISTAMINA	0.9550	100.00 \pm 0.00	7.02
GENISTEIN $(7.33 \times 10^{-6} \text{ M})$	1.5136	40.68 \pm 6.15 **	
$(1.47 \times 10^{-5} \text{ M})$	1.1749	63.75 \pm 8.15 *	
$(2.93 \times 10^{-5} \text{ M})$	2.0893	32.86 \pm 7.11 **	* p<0.005 ** p<0.001

Tabla XVI

PARAMETROS DE ACCION DE LA CURVA MEDIA DOSIS-RESPUESTA DE HISTAMINA
EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GENISTEIN

Modalidad A (Genistein + Cl₂Ba)

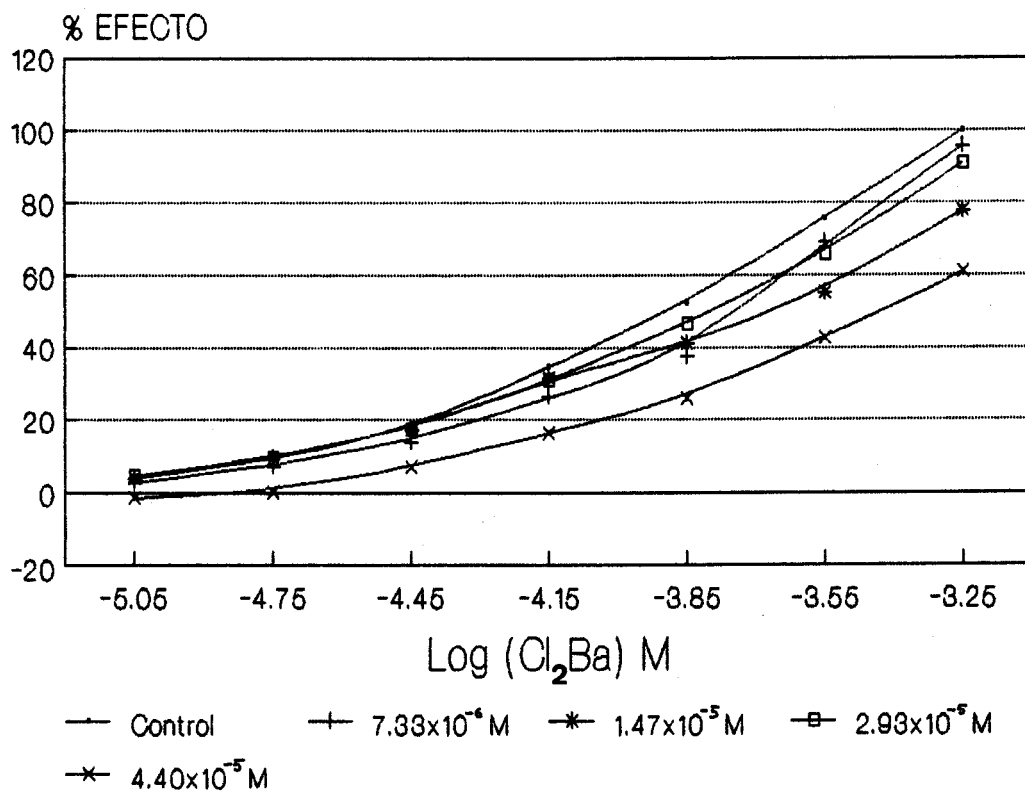


FIG. 17

Modalidad A (Genistein + Histamina)

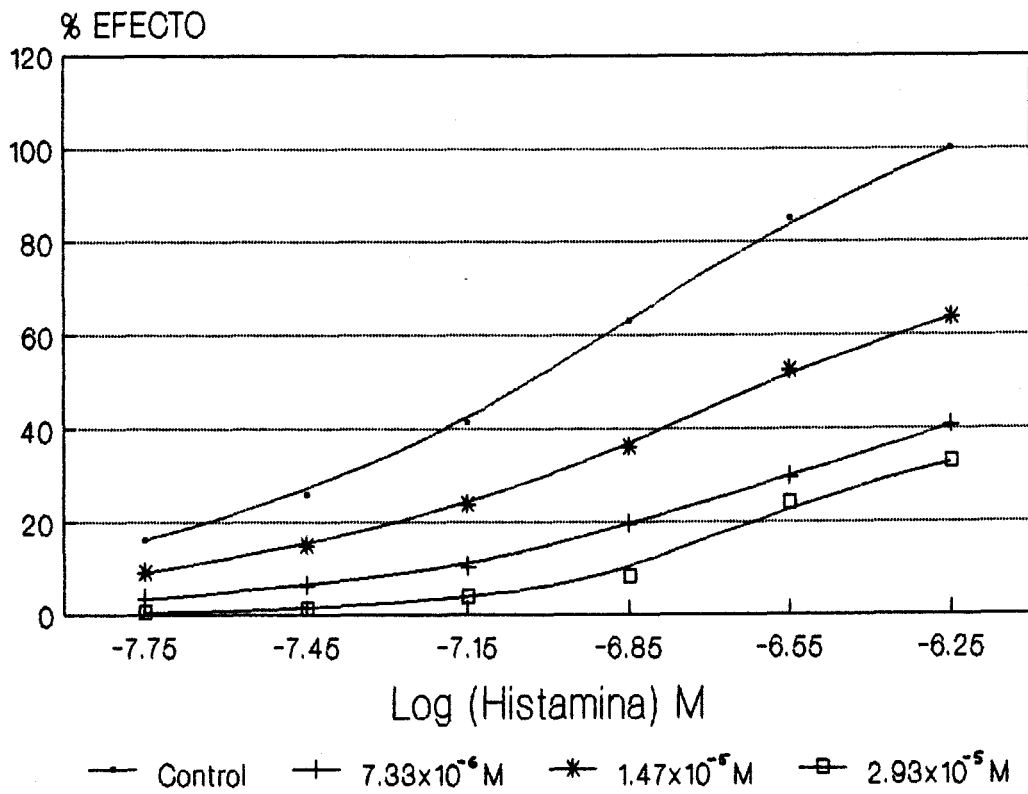


FIG. 18

AGONISTAS
(% relajación)

GENISTEIN		Cl Ba 2	Histamina
<u>Vol.</u> (ml)	<u>Concentración baño</u> (M)		
0.1	7.33×10^{-6}	40.45 ± 1.90	6.90 ± 1.12
0.2	1.47×10^{-5}	47.84 ± 3.41	14.58 ± 1.24
0.4	2.93×10^{-5}	61.33 ± 6.23	17.33 ± 1.14
0.6	4.40×10^{-5}	95.57 ± 3.44	

Tabla XVII

EFFECTO RELAJANTE DE GENISTEIN FRENTE A CLORURO DE BARIO E HISTAMINA

Modalidad B (Agonista + Genistein)

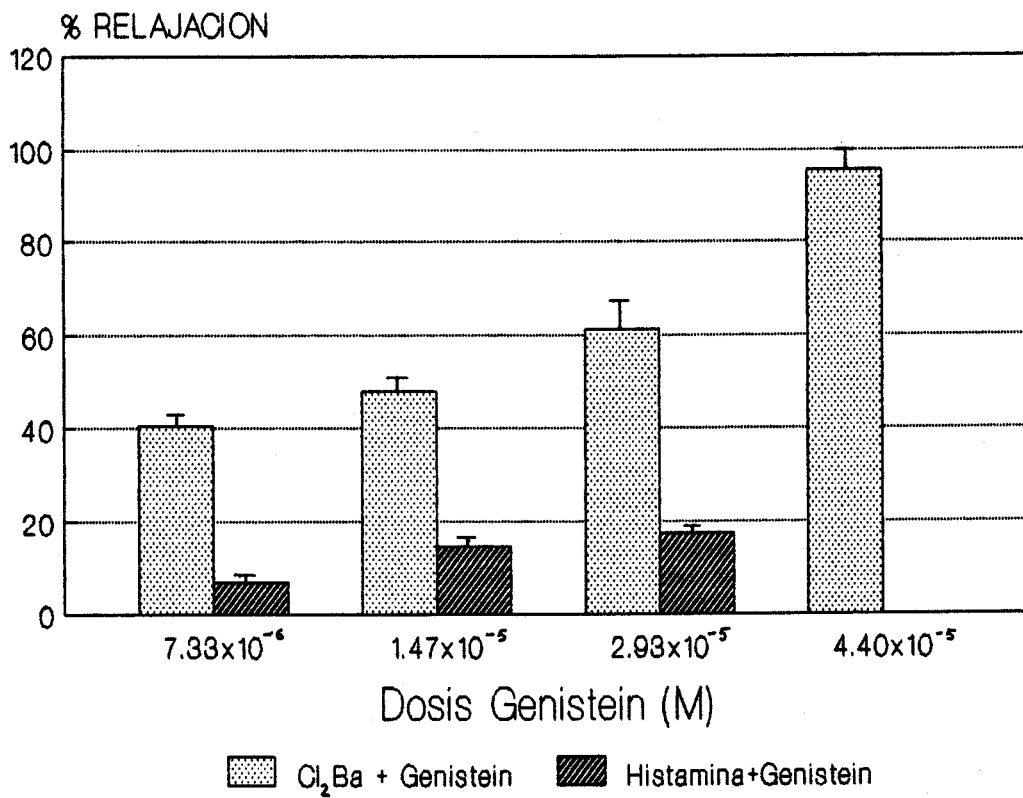


FIG. 19

III.B.2.2.2. Efecto de Genistein en la inhibición de las
contracciones inducidas por estimulación
eléctrica de campo. Cálculo de su IC .
50

Se han empleado cobayas machos de peso comprendido entre 300-350 g, que fueron sacrificados de un golpe en la nuca y exanguinizados.

Fueron utilizados segmentos de ileon de la porción terminal, descartando los 10 cm más cercanos de la unión ileocecal. Utilizamos un baño de órganos de 2 ml de capacidad conteniendo solución Krebs-Henseleit (RODRIGUEZ, 1986) a 37°C con burbujeo continuo de carbógeno (95% O₂ - 5% CO₂).

Los efectos obtenidos han sido recogidos en un quimógrafo GRAPHTEC (Linearcorder mark VII WR 3101) al que se encuentra acoplado un transductor isométrico HSE, ajustado con una tensión inicial de 1 g.

Después de un periodo de estabilización de 30 minutos, el ileon de cobaya fue sometido a una estimulación eléctrica de campo (0.1 Hz; 70 V.; 1 ms) mediante un estimulador GRASS S48.

Cuando las contracciones llegan a ser estables, se adicionan al baño dosis acumulativas de Genistein que una vez

finalizada la experiencia, fue retirada de la solución del baño mediante sucesivos lavados, para comprobar la reversibilidad de sus efectos (ABDALLA, 1986).

Las dosis administradas de la solución de Genistein (2.7×10^{-3} M) fueron las siguientes:

<u>Dosis</u>	<u>Vol. (µl)</u>	<u>Concentración baño (M)</u>
1a	5	6.8×10^{-6}
2a	10	2.0×10^{-5}
3a	20	4.7×10^{-5}
4a	40	1.0×10^{-4}

La potencia antiespasmódica fue evaluada por cálculo de la concentración de Genistein necesaria para producir una inhibición de la contracción del 50% -IC₅₀ - (TREBIEN, 1988).

50

III.B.2.2.2.1. Resultados

En la Figura 20 se expone un registro de los efectos de Genistein a las distintas dosis sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica de campo.

En la Tabla XVIII se recopilan los valores de % de inhibición de la contracción a las distintas dosis.

La representación gráfica se expone en la Figura 21, a partir de la cual se ha calculado la IC₅₀ de Genistein que se corresponde con una concentración en baño de 37.5 μM .

III.B.2.2.2.2. Discusión de resultados

En bibliografía hemos encontrado el valor de IC₅₀ de Genistein con respecto a la Protein Kinasa C dependiente de Calcio en cerebro de bovino. Dicho valor es de 35.3 μM (GOTO, 1987).

Antes de iniciar el estudio de Genistein frente a la Acetilcolina, procedemos a calcular este parámetro de inhibición resultando ser según nuestras experiencias en ileon de cobaya de 37.5 μM , utilizando dicha concentración para el posterior estudio.

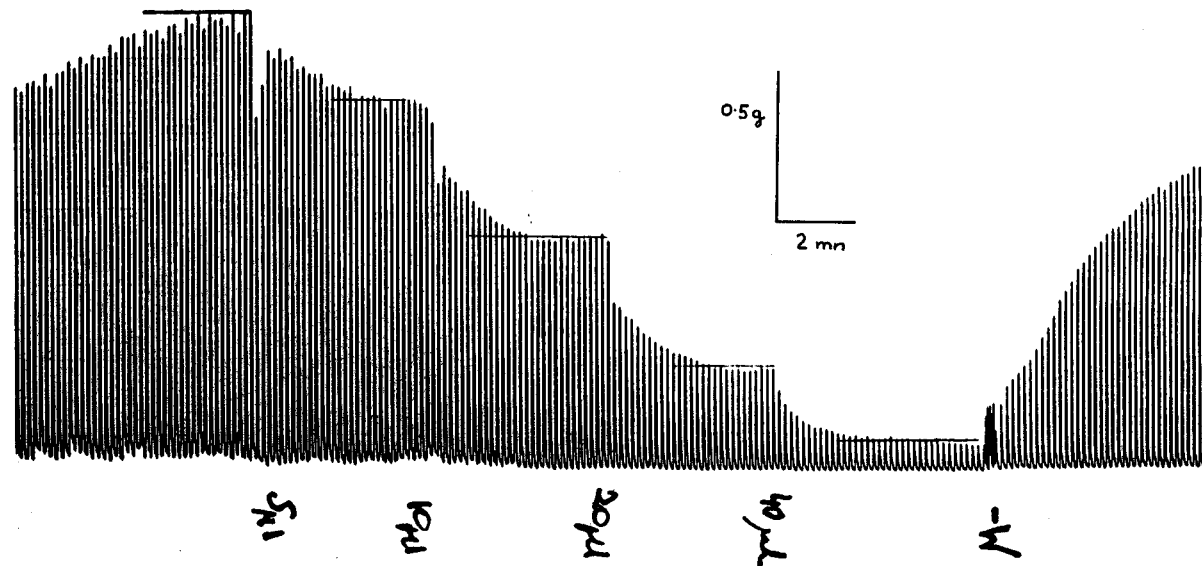


Fig. 20

REGISTRO DE LOS EFECTOS DE GENISTEIN SOBRE LAS CONTRACCIONES
INDUCIDAS POR ESTIMULACION ELECTRICA DE CAMPO

DOSIS	Conc. GENISTEIN en baño (M)	% INHIBICION DE LA CONTRACCION
1a	6.8×10^{-6}	9.2 ± 1.7
2a	2.0×10^{-5}	28.7 ± 3.9
3a	4.7×10^{-5}	62.9 ± 4.6
4a	1.0×10^{-4}	89.0 ± 2.7

Tabla XVIII

VALORES DE % DE INHIBICION DE LA CONTRACCION OBTENIDOS
CON LAS DIFERENTES DOSIS DE GENISTEIN

Genistein en la Inhibición de las
contracciones inducidas por estimulación
eléctrica de campo

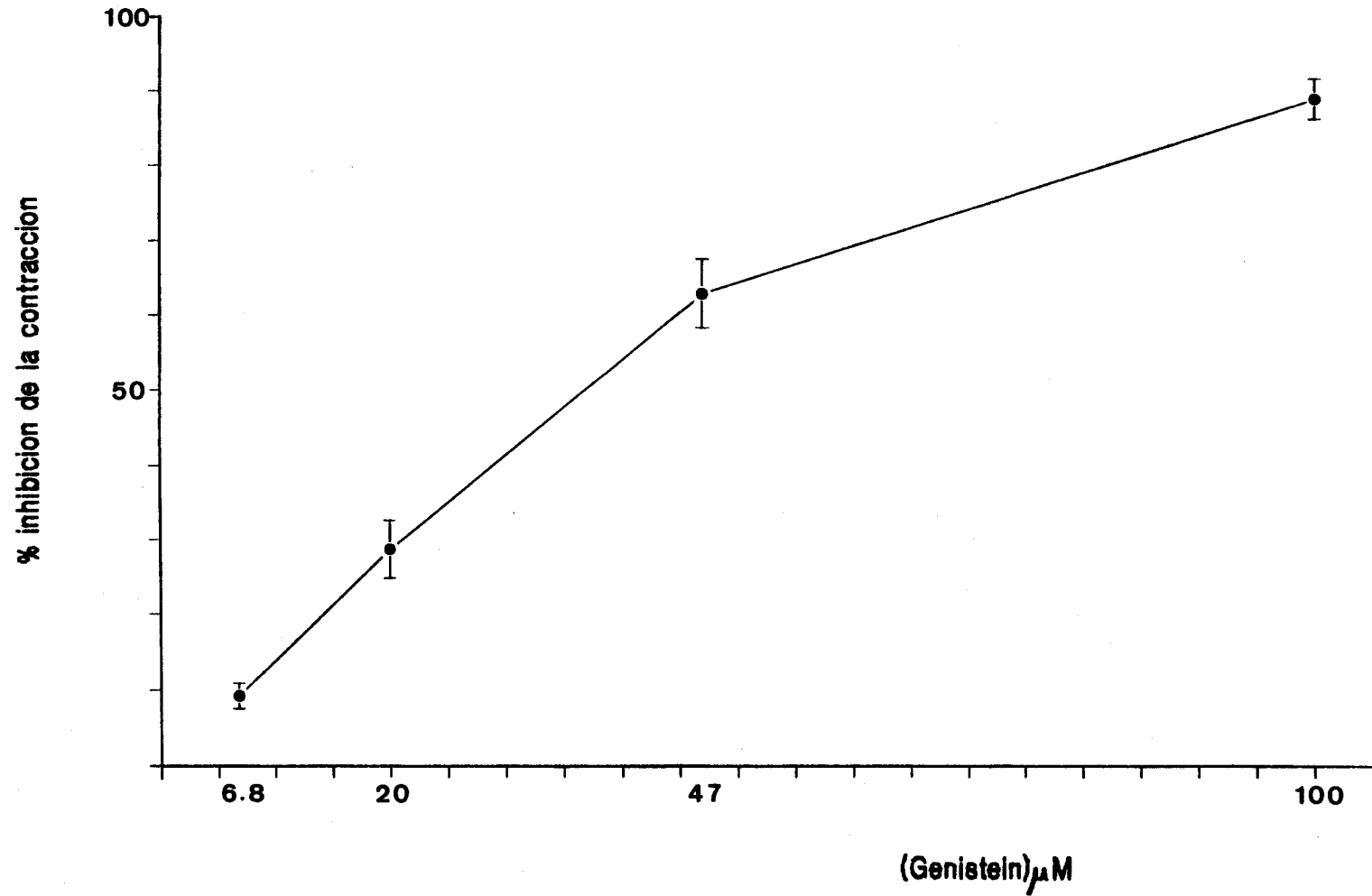


FIG. 21

III.B.2.2.3. Efecto frente a contracciones producidas por Acetilcolina y 6-oxo-PGE₁ en íleon aislado de cobaya.

La preparación del tejido y las condiciones de experimentación fueron idénticas a las de la experiencia anterior (ap. III.B.2.2.2).

Una vez transcurridos los 30 minutos de estabilización del órgano y conseguida una línea basal continua y persistente, se añaden al baño de órganos las soluciones del agonista correspondiente, empezando por la más diluida (solución I).

Entre dosis y dosis se esperan 5 minutos lavando repetidamente el músculo con idea de recuperar la originaria línea basal. Una vez conseguida la respuesta máxima se calcula la dosis de agonista que permite obtener una contracción que se corresponda con el 70% del efecto máximo (PATNAIK, 1987).

Cuando se obtienen contracciones constantes con el agonista, se añade al baño Genistein ($IC_{50} = 34\mu M$), dejando transcurrir 5 minutos antes de volver a adicionar el espasmógeno.

DOSIS ADMINISTRADAS

A. AGONISTAS

- Acetilcolina

<u>Dosis</u>	<u>Vol (µl)</u>	<u>Conc. en baño</u>
Sol. I (10 ⁻⁶ M)		
1a	10	5 x 10 ⁻⁹ M
2a	20	1 x 10 ⁻⁸ M
3a	40	2 x 10 ⁻⁸ M
Sol. II (10 ⁻⁵ M)		
4a	10	5 x 10 ⁻⁸ M
5a	20	1 x 10 ⁻⁷ M
6a	40	2 x 10 ⁻⁷ M

- 6-oxo-PGE₁

<u>Dosis</u>	<u>Vol (µl)</u>	<u>Conc. en baño</u>
Sol. I (200ng/ml)		
1a	10	1 ng/ml
2a	20	2 ng/ml
3a	40	4 ng/ml

Sol. II (2 μ g/ml)

4 \underline{a}	10	10 ng/ml
5 \underline{a}	20	20 ng/ml
6 \underline{a}	40	40 ng/ml

Sol. III (20 μ g/ml)

7 \underline{a}	10	100 ng/ml
8 \underline{a}	20	200 ng/ml
9 \underline{a}	40	400 ng/ml

B. GENISTEIN

	<u>Vol (μl)</u>	<u>Conc. en baño</u>
Sol. problema (2.7 x 10 ⁻³ M)	25	3.4 x 10 ⁻⁵ M

III.B.2.2.3.1. Resultados

El cálculo de la concentración de agonista capaz de producir un 70% de efecto se realiza a partir de las respectivas curvas medias dosis-respuesta que se muestra en la Figura 22.

Dichas dosis submaximales se corresponden con:

<u>Agonista</u>	<u>Dosis</u>	<u>Solución</u>	<u>Conc. en baño</u>
Acetilcolina	3a	I	2×10^{-8} M
6-oxo-PGE ₁	7a	II	100 ng/ml

Los resultados obtenidos con el agonista antes y después del pretratamiento con la dosis de Genistein (34 μ M), expresados como % de inhibición de la contracción, quedan recogidos en la Tabla XIX.

Las contracciones provocadas con el agonista en ausencia y presencia de Genistein se muestran en forma de histograma en la Figura 23.

Curva dosis-respuesta PGE1

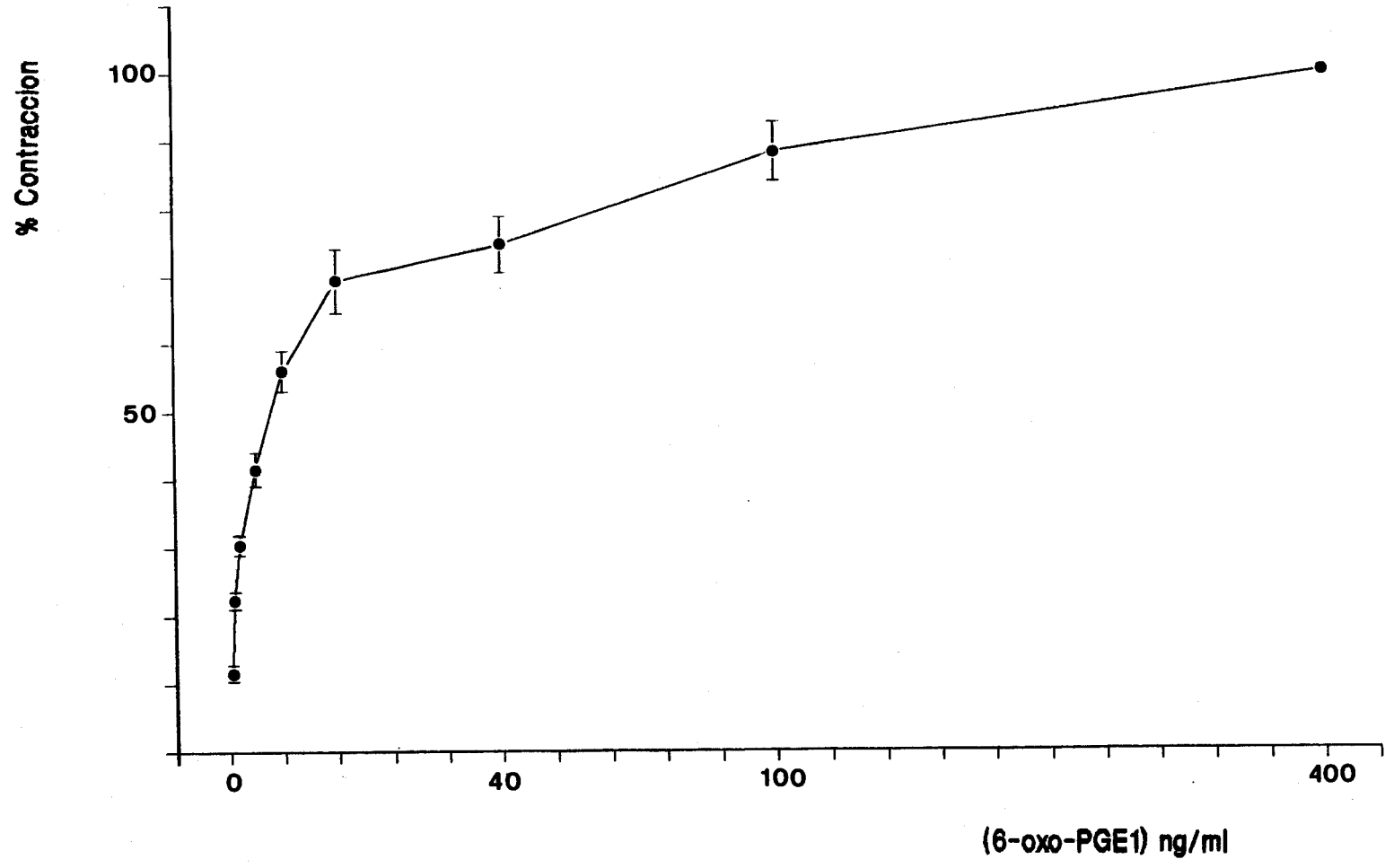


FIG. 22

AGONISTA	(GENISTEIN) baño	% INHIBICION DE LA CONTRACCION
Acetilcolina ⁻⁸ (2 x 10 ⁻⁸ M)	34 μM	52.35 ± 6.17 p < 0.005
6-oxo-PGE ¹ (100 ng/ml)	34 μM	70.78 ± 3.71 p < 0.001

Tabla XIX

EFEECTO DE GENISTEIN SOBRE LAS CONTRACCIONES PROVOCADAS
POR LOS AGONISTAS CORRESPONDIENTES

Genistein frente a Ach y 6-oxo-PGE1

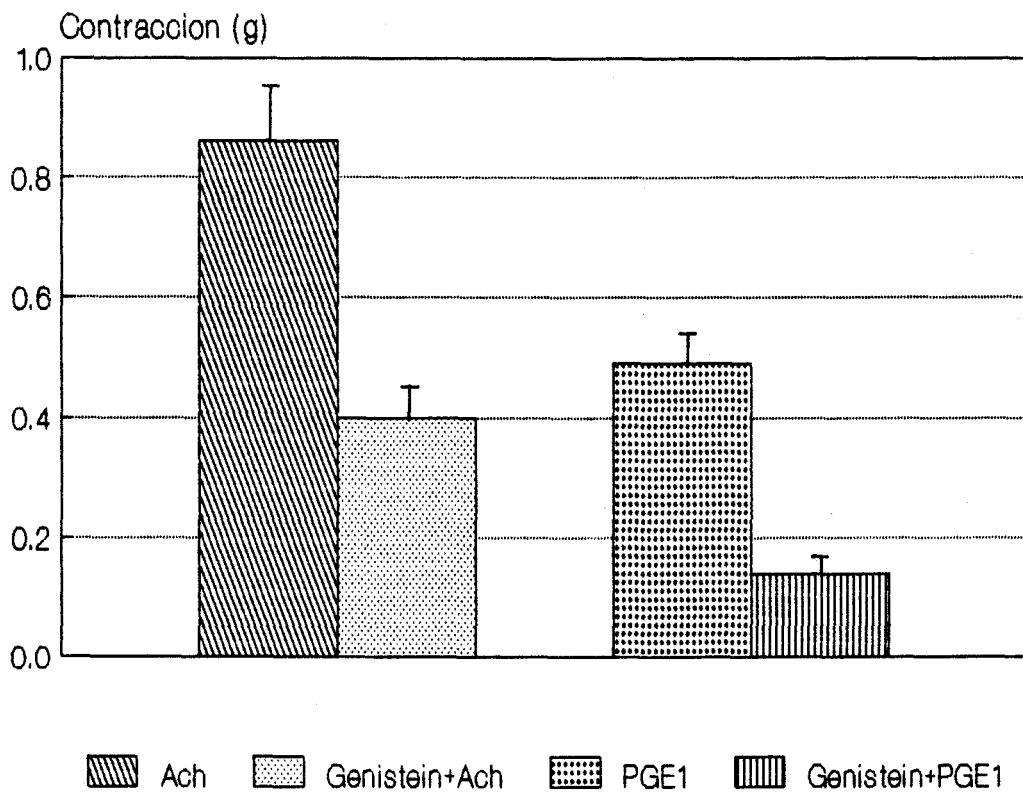


FIG. 23

III.B.2.2.3.2. Discusión de resultados

El paso previo para el cálculo del efecto de Genistein frente a las contracciones producidas por Acetilcolina y 6-oxo-PGE¹ fue la búsqueda de la dosis capaz de producir un 70 % de efecto. Esta resultó ser de 2×10^{-8} M para Acetilcolina y 100 ng/ml para 6-oxo-PGE¹, que coinciden con las encontradas en bibliografía (PATNAIK, 1987).

Al trabajar con la dosis seleccionada frente a los dos agonistas, obtuvimos unos resultados que superan el 50 % de inhibición de la contracción, lo que nos está indicando que no debe existir una interacción específica con el receptor muscarínico.

III.B.2.2.4. Efecto en la liberación de [3H]-Acetilcolina en Plexo mientérico de cobaya.

El músculo longitudinal de íleon de cobaya acompañado de plexo mientérico, es de gran utilidad ya que contiene aproximadamente, una cuarta parte de la acetilcolina de todo el íleon y es el responsable de una quinta parte de la producción de la misma, en respuesta a estimulación eléctrica (PATON, 1968).

La preparación, es de considerable interés porque algunas de las características de su inervación colinérgica difieren de las mismas terminaciones periféricas. Por ejemplo, la liberación espontánea de acetilcolina es mucho más grande desde el plexo mientérico (PATON, 1971) que desde el ganglio cervical superior (BIRKS, 1961).

Los efectos obtenidos tras la estimulación del íleon o de la preparación de músculo longitudinal-mientérico de cobaya son diferentes según se trabaje con baja o alta frecuencia. La estimulación de baja frecuencia produce una mayor liberación de acetilcolina que la de alta (KNOLL, 1971) y fármacos tales como noradrenalina y morfina, deprimen las contracciones y la liberación de acetilcolina producida por estimulación de baja frecuencia de forma mucho más relevante que la provocada por la de alta frecuencia (PATON, 1969).

Los resultados de las investigaciones sugieren la existencia de dos poblaciones de neuronas colinérgicas en el plexo mientérico: una, activada solamente por estimulación de alta frecuencia y la otra, por ambas.

Dichas preparaciones, incubadas con colina marcada radioactivamente, han sido utilizadas en estudios metabólicos de diafragma de rata (POTTER, 1970), corazón de gato (WALLACH, 1967), ganglio cervical superior de gato (COLLIER, 1969) y corteza cerebral de rata (RICHARDSON, 1974).

También, el plexo mientérico-músculo longitudinal de ileon de cobaya es uno de los modelos in vitro investigados más extensamente en la acción de opiáceos y sus antagonistas (KOSTERLITZ, 1975; LEES, 1973; PERT, 1973).

En trabajos relacionados con la formación y liberación de acetilcolina en plexo mientérico de ileon de cobaya, se deduce que la mayor parte de la formación de [3H]-acetilcolina parece ser debida al turnover intracelular de acetilcolina mientras que la liberación provocada de [3H]-acetilcolina parece ser originada desde una pequeña reserva (SZERB, 1975).

III.B.2.2.4.1. Desarrollo de la experiencia

Cobayas machos, de peso 400-450 g fueron decapitados. Se aisló el íleon, descartando aproximadamente 10 cm de la sección próxima al esfínter ileocecal y liberado del mesenterio.

Un fragmento de intestino, aproximadamente de 10 cm de longitud fue introducido en una pipeta de 7 mm de diámetro. Utilizando un escalpelo, cortamos ligeramente la superficie del íleon a cada lado de los vasos sanguíneos. Posteriormente, separamos suavemente con un pequeño trozo de algodón humedecido en Krebs, el músculo longitudinal con el plexo mientérico adherido, del músculo circular situado debajo (PATON, 1968).

Disponemos el músculo longitudinal (1.5 -2 cm) en una placa de petri con Krebs y colina ($1\mu\text{M}$), que acoplamos uniéndolo al soporte de dos electrodos de platino; se introduce en un baño de órganos con una capacidad de 2 ml que contiene Krebs-Henseleit (RODRIGUEZ, 1986) con clorhidrato de colina ($1\mu\text{M}$) a 37°C , burbujeado con carbógeno ($95\% \text{O}_2$ y $5\% \text{CO}_2$) para mantener el pH a 7.4 (BLATTNER, 1978).

El plexo mientérico - músculo longitudinal obtenido aproximadamente de 30-50 mg de peso, fue suspendido de un transductor isométrico HSE con una tensión de 1g mantenido para equilibración durante 45 minutos con varios cambios de solución (Fig.24).

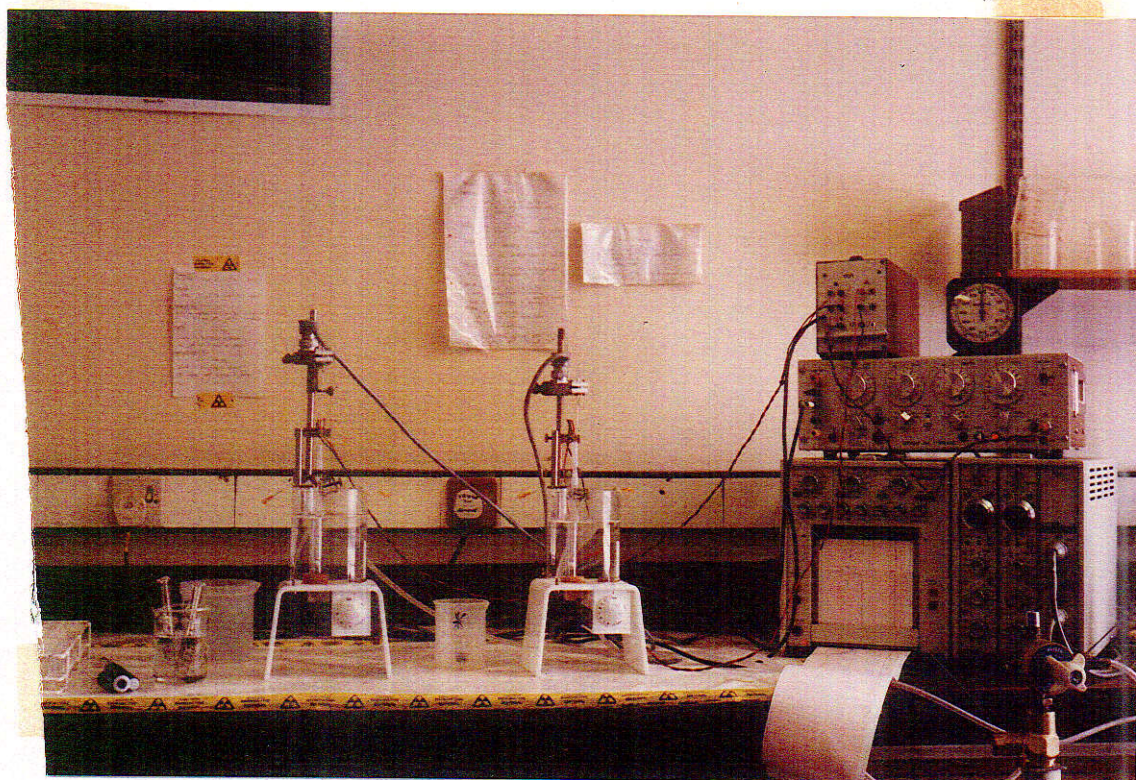


FIG. 24

MONTAJE DE LA PREPARACION DE PLEXO MIENTERICO

Las preparaciones fueron sometidas a estimulación eléctrica (0.2 Hz; 0.5 ms; 70 V) con un estimulador GRASS 48 (DOWN, 1980). Una vez transcurrido el periodo de equilibración se recoge una primera muestra.

De nuevo, sometemos a estimulación la preparación y añadimos al baño una dosis de 10 μ Ci de [3H]-colina, ([3H]metilcolina clorhidrato, 81.9 Ci/mmol, Amersham, UK) (WIKBERG, 1977).

Tras 20 minutos de estimulación continua, la preparación se lava tres veces consecutivas cada 10 minutos durante una hora con solución Krebs que contiene clorhidrato de colina (1 μ M) y Hemicolinio-3 (10 μ M) (SZERB, 1976). La finalidad de este periodo de lavado es la de eliminar el exceso de β radiación que pueda existir en el espacio extracelular ya que sólo nos interesa la liberada a partir del nervio.

Tres partes alicuotas de cada solución de baño de un volumen de 0.5 ml se recogieron 10 minutos después del último lavado, repitiendo la experiencia a los 20, 30 y 40 minutos. Posteriormente, las preparaciones se estimulan durante 10 minutos, recogiendo 3 nuevas alicuotas después de dicho tiempo.

Las muestras son transferidas a viales de contador de centelleos que contienen 5 ml de Liquiscint (solución contadora de centelleos para ejemplos radioactivos acuosos) (BRAY, 1960), y la radioactividad fue determinada por un medidor Beckman LS 6800.

Los fármacos patrón y problema se añaden 5 minutos antes de que reciba el músculo la última estimulación.

Las dosis administradas en cada caso fueron:

	<u>Vol. (µl)</u>	<u>Conc. en baño (M)</u>
GENISTEIN	25	3.4×10^{-5}
BITARTRATO DE ARTERENOL (Noradrenalina)	25	1.0×10^{-5}

III.B.2.2.4.2. Resultados

La cantidad de radioactividad liberada después de los últimos 10 minutos de estimulación, se determinó por substracción de la recogida en el periodo previo (KAPLITA, 1983).

En las Tablas XX, XXI y XXII quedan recogidos los valores de CPM obtenidos antes y después de someter a estimulación eléctrica el plexo mientérico, así como el % de incremento de liberación de [3H]-acetilcolina.

En la Figura 25 se expone en forma de histograma la representación gráfica.

III.B.2.2.4.3. Discusión de resultados

La determinación de Acetilcolina marcada nos permite conocer la influencia de Genistein en su liberación al espacio sináptico. Utilizamos como patrón Noradrenalina por ser un neurotransmisor con afinidad por receptores pre y post-sinápticos.

Los valores expresados en % de incremento de liberación de [3H]-acetilcolina evidencian claramente la ineficacia de Genistein sobre este mecanismo, ya que proporciona unos valores de incremento de liberación de 255.31 ± 4.76 frente al 290.15 ± 40.54 del control, mientras que Noradrenalina es capaz de moderar este incremento a valores de un 75.76 ± 7.09 .

CONTROL		
PREESTIMULACION (cpm)	POSTESTIMULACION (cpm)	% INCREMENTO LIBERACION(3H)Ach
739.3	2127.4	195.89
2787.0	7478.7	170.39
1005.6	4096.2	318.39
1499.4	8080.5	447.88
847.8	3333.9	304.82
1292.7	5118.5	303.56
		$\bar{X} \pm \epsilon$ 290.15 \pm 40.54

TABLA XX

G E N I S T E I N		
PREESTIMULACION (cpm)	POSTESTIMULACION (cpm)	% INCREMENTO LIBERACION(3H)Ach
1123.4	4715.5	328.98
1440.7	5738.1	304.58
860.1	3210.0	285.49
907.5	1951.1	118.94
1002.0	2201.0	124.54
1053.5	4794.6	369.34
		$\bar{X} \pm \epsilon$ 255.31 \pm 43.76

n.s.

TABLA XXI

N O R A D R E N A L I N A		
PREESTIMULACION (cpm)	POSTESTIMULACION (cpm)	% INCREMENTO LIBERACION(3H)Ach
912.0	1647.6	83.75
949.8	1447.0	54.28
889.0	1519.8	73.55
1388.4	2164.1	57.15
1170.2	2174.0	88.42
687.5	1328.4	97.44
		$\bar{X} \pm \epsilon$ 75.76 \pm 7.09
		p < 0.005

TABLA XXII

Genistein en la liberacion de 3H-Ach

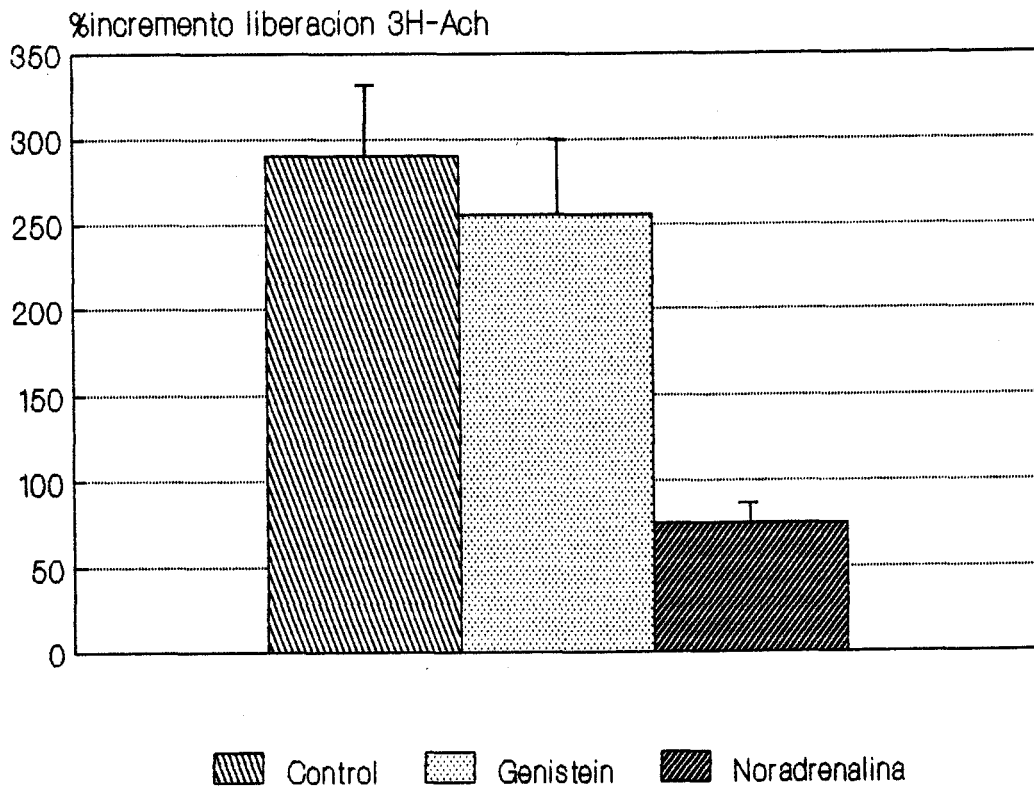


FIG. 25

III.B.2.2.5. Efecto de Genistein en los niveles de nucleótidos cíclicos en ileon de cobaya.

Hemos utilizado segmentos de ileon de cobaya de un peso húmedo aproximado entre 100 y 125 mg. Se disponen en baño de órganos de 2 ml de volumen conteniendo solución Krebs-Henseleit a 37°C, oxigenados con carbógeno y ajustado con una tensión de 1g.

Tras 15 minutos de equilibración, se añade al baño Genistein (34 μ M), Papaverina (20 μ M) o nada, dependiendo del lote con el que estemos trabajando.

Después de 5 minutos de contacto, el tejido muscular se retira rápidamente del baño y se introduce en un vial (sumergido en hielo picado), que contiene 1 ml de ácido tricloroacético al 6% durante 10 minutos. Para facilitar la acción del ácido, picamos el ileon con unas tijeras.

Posteriormente, centrifugamos y el sobrenadante se lava 5 veces con 2.5 ml de éter saturado de agua para extraer el ácido tricloroacético. El último paso es la eliminación por evaporación a baño María (60°C), de la capa acuosa restante.

La experiencia se ha realizado con tres lotes de 6 ejemplos cada uno, distribuidos de la siguiente forma:

<u>LOTE</u>	<u>TUBO Nº</u>
CONTROL	15-20
PATRON (Papaverina, 20 µM)	21-26
PROBLEMA (Genistein, 34 µM)	27-32

La medida de los niveles de AMPc presentes en el ileon se ha realizado con un KIT (Amersham, code TRK.432) conteniendo los siguientes reactivos:

1. Solución tampón Tris/EDTA, que una vez reconstruida con 25 ml de agua destilada se obtiene una solución a pH 7.5 conteniendo 50 mM Tris/HCl y 4 mM EDTA.
2. Proteína ligante de músculo bovino purificada (GILMAN, 1970; GREENGARD, 1972).
3. [8-3H]Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, 180 pmol (5µCi) disuelto en 10 ml de agua destilada (equivalente a 0.9 pmoles/50µl).
4. Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico standard, 1600 pmol en 5 ml de agua destilada (equivalente a 16 pmoles/50µl). Cuatro diluciones en serie de este reactivo, con equivalentes volúmenes de solución tampón proporcionará standards de calibración adicional conteniendo 8, 4, 2 y 1 pmol/50µl.
5. Carbón adsorbente.

El procedimiento es llevado a cabo por duplicado en pequeños tubos adecuados para centrifugación y mantenidos a 0°C en un baño con hielo.

En la Tabla XXIII, quedan recogidos los volúmenes de reactivos obtenidos en cada tubo tras el proceso.

El ensayo está basado en la competición entre el AMPc sin marcar y una cantidad fija de AMPc radioactivo, para ligar a una proteína, la cual tiene una alta especificidad y afinidad por el AMPc (ROBDELL, 1971; WELLER, 1972).

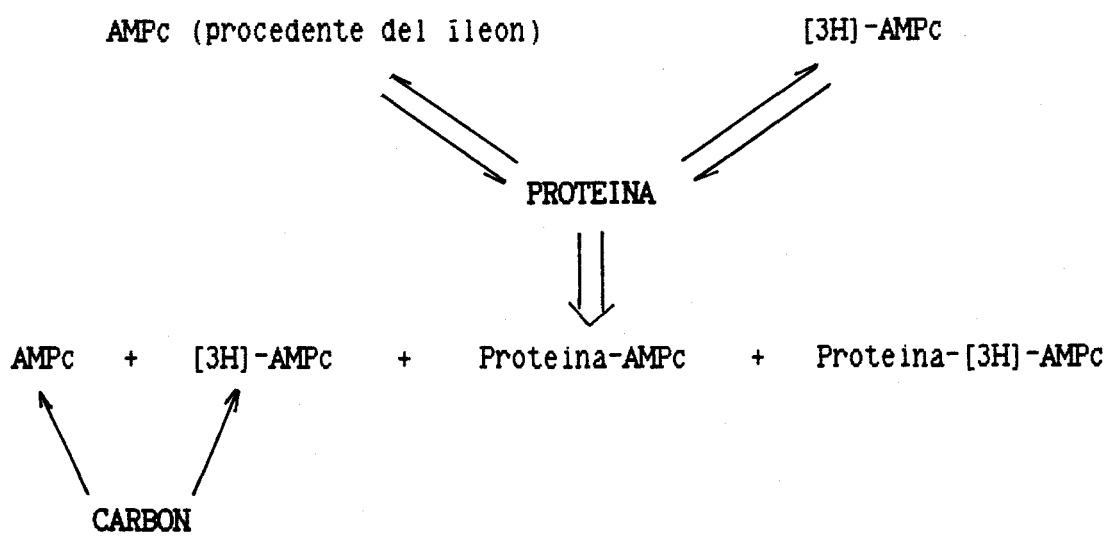
La cantidad de AMPc radioactivo ligado a la proteína es inversamente proporcional a la cantidad de AMPc no radioactivo presente en la muestra. La medida de la radioactividad del complejo anterior, permite conocer la cantidad de AMPc a calcular.

La separación de la proteína ligada a AMPc, del nucleótido desligado, se consigue por adsorción del nucleótido libre a carbón vegetal, seguido de centrifugación.

<u>Tubo nº</u>	<u>Reactivo 1</u> (sol. tampón)	<u>Standards</u>	<u>Desconocidos</u>	<u>Reactivo 3</u> [3H]AMPc	<u>Reactivo 2</u> (Prot. ligante)	
1, 2	150	-	-	50	-	Blanco Carbón
3, 4	50	-	-	50	100	Dosis cero
5, 6	-	50	-	50	100	1pmol standard
7, 8	-	50	-	50	100	2pmol standard
9, 10	-	50	-	50	100	4pmol standard
11, 12	-	50	-	50	100	8pmol standard
13, 14	-	50	-	50	100	16pmol standard
15, etc.	-	-	50	50	100	Desconocidos

Todos los volúmenes están expresados en microlitros.

TABLA XXIII



200 μ l del sobrenadante son a \acute adidos a viales de contador de centelleos que contienen 4 ml de Liquiscint (BRAY, 1960; PATTERSON, 1965).

La determinación de los niveles de GMPC se ha realizado con un KIT (Amersham, code TRK 500) poseedor de los siguientes reactivos:

1. Solución tampón Tris/EDTA que al ser disuelto en 25 ml de agua destilada obtenemos una solución 0.05 M a pH 7.5 conteniendo 4 mM EDTA.
2. Antisuero, específico para GMPC (STEINER, 1969; STEINER, 1972).
3. [8-3H]Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico, 80 pmol (1.6 μ Ci) disuelto en 7.5 ml de agua destilada (equivalente a 0.5 pmol/50 μ l).
4. Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico standard, 400 pmol al que se le añade 5 ml de agua destilada alcanzando una concentración de 8 pmol/100 μ l. Cuatro diluciones en serie de este reactivo son realizadas para proporcionar standards adicionales conteniendo 4, 2, 1, 0.5 pmol/100 μ l.
5. Reactivo blanco.
6. Sulfato de amonio que al ser disuelto en 150 ml de agua destilada estará con una saturación del 60%.

La experiencia es llevada a cabo por duplicado y la distribución de reactivos por tubos es recogida en la Tabla XXIV.

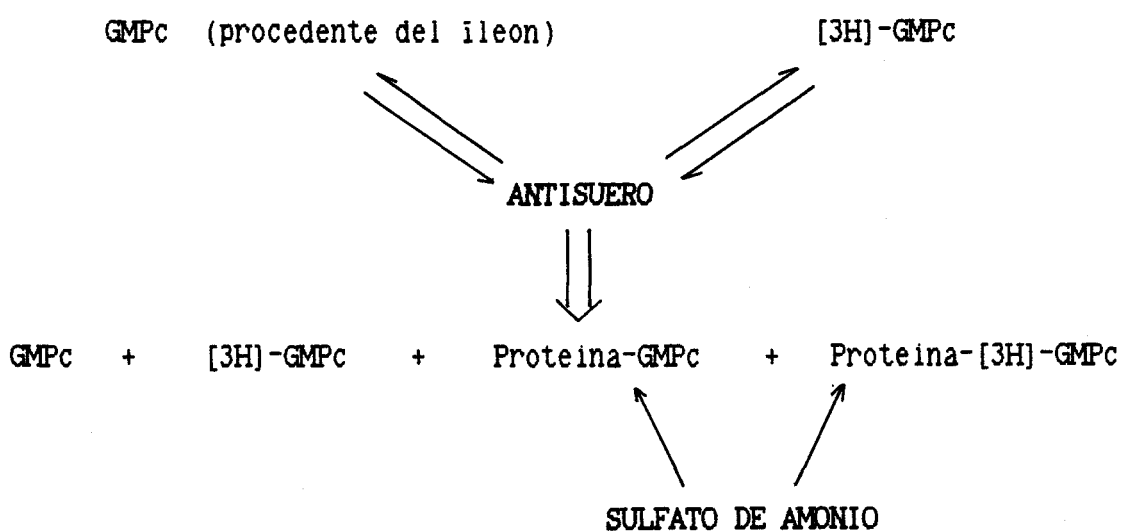
<u>Tubo nº</u>	<u>Reactivo 3</u> [3H]GMPc	<u>Reactivo 1</u> Sol. tampón	<u>Standard</u>	<u>Desconocidos</u>	<u>Reactivo 5</u> Blanco	<u>Reactivo 2</u> Antisuero	
1, 2	50	100	-	-	-	50	Dosis cero
3, 4	50	-	100	-	-	50	0.5pmol stand.
5, 6	50	-	100	-	-	50	1pmol stand.
7, 8	50	-	100	-	-	50	2pmol stand.
9, 10	50	-	100	-	-	50	4pmol stand.
11, 12	50	-	100	-	-	50	8pmol stand.
13, 14	50	-	-	-	100	50	Blanco
15, etc.	50	-	-	100	-	50	Desconocidos

Todos los volúmenes se expresan en microlitros

TABLA XXIV

La experiencia está basada en la competición de GMPC sin marcar y una cantidad fija de GMPC marcado para ligar a un antisuero, el cual tiene una alta especificidad y afinidad por el GMPC. La cantidad de GMPC radioactivo ligado al antisuero, es inversamente proporcional a la cantidad de GMPC presente en el ileon.

La medida de la radioactividad del anticuerpo ligado permite calcular la cantidad de GMPC procedente del ileon. La separación del anticuerpo ligado al GMPC del nucleotido desligado, se consigue con el sulfato de amonio por precipitación y posterior centrifugación.



El precipitado en el cual se encuentra el complejo anticuerpo ligado, se disuelve en agua y se añade a viales de contador de centelleos que contienen Liquiscint.

III.B.2.2.5.1. Resultados

La concentración de AMPc y GMPc no radioactivo se determina con una curva standard linear construida al representar Co/Cx frente a los pmoles de AMPc inactivo por tubo. Siendo:

Co: CPM de [3H]-AMPc ó [3H]-GMPc ligado, en la ausencia de [3H]-AMPc ó [3H]-GMPc .

Cx: CPM de [3H]-AMPc ó [3H]-GMPc ligado, en presencia de AMPc ó GMPc standard.

Una vez conseguida la curva, se calculan los pmoles de AMPc o GMPc a partir de ella conociendo Co/Cx de cada experiencia (TOVEY, 1974).

En las figuras 26 y 27 quedan recogidas las curvas de calibración linear del AMPc y GMPc a partir de las cuales hemos calculado los pmoles de nucleótidos cíclicos presentes en nuestro ensayo.

En las Tablas XXV y XXVI se muestran los valores de Co/Cx y pmoles de AMPc y GMPc /mg de músculo obtenidos a partir de las curvas standard construidas.

III.B.2.2.5.2. Discusión de resultados

En los ensayos encaminados a valorar las modificaciones que es capaz de provocar Genistein sobre los nucleótidos cíclicos, hemos seleccionado como patrón Papaverina a una concentración de 20 μ M que se corresponde aproximadamente con su IC₅₀.

Con respecto al AMPc se detecta un aumento de sus niveles con la misma significación para patrón y Genistein, lo que nos indica que debe existir un bloqueo de la fosfodiesterasa del AMPc.

Con las concentraciones seleccionadas no existe modificación significativa en los niveles de GMPc. Cabe pensar que al aumentar la dosis se podría observar algún cambio ya que existen datos bibliográficos de la actividad de Papaverina a mayor concentración sobre la fosfodiesterasa del GMPc (GIBSON, 1989).

Curva de calibracion AMPc

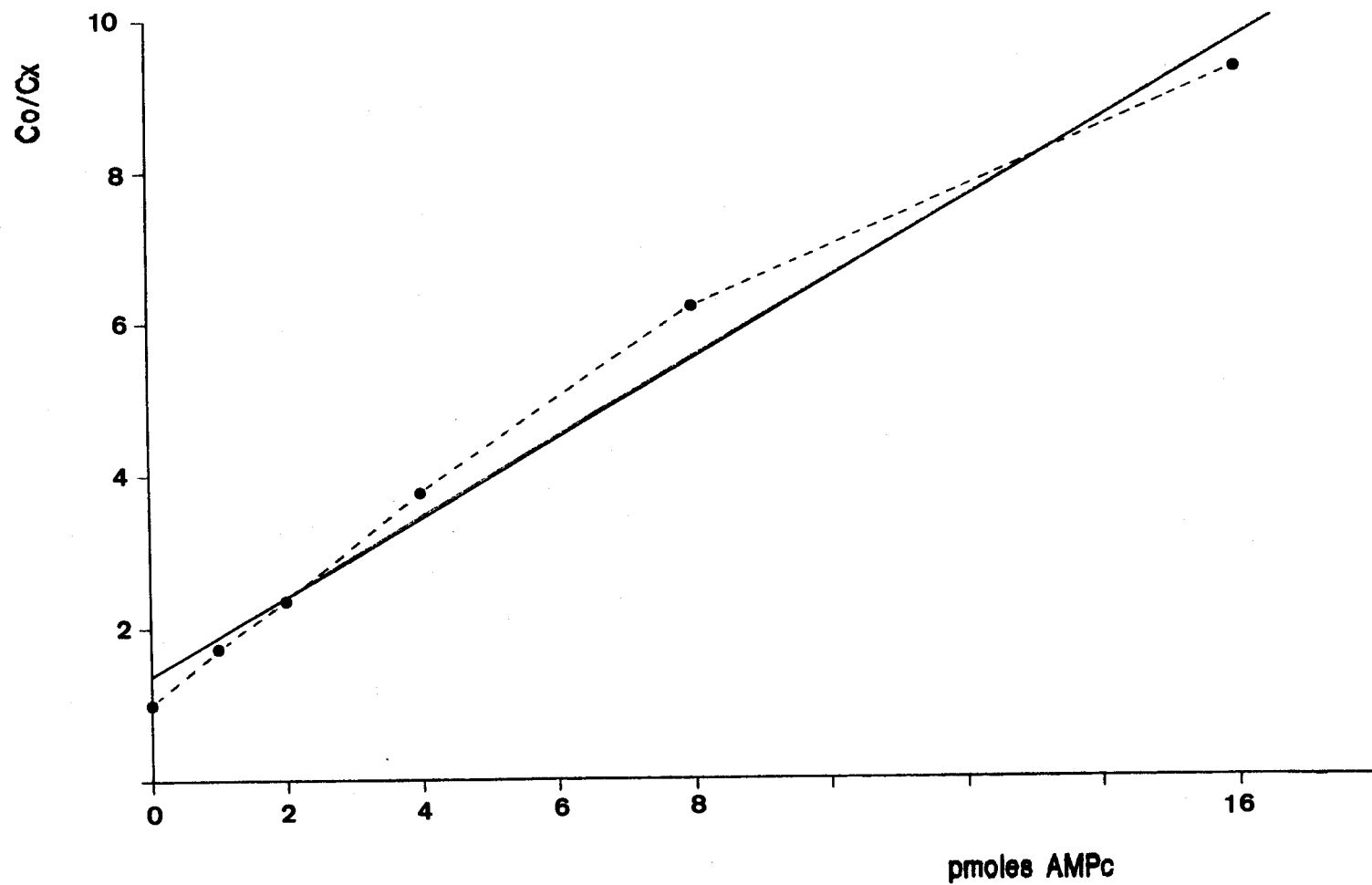


FIG. 26

Curva de calibracion GMPC

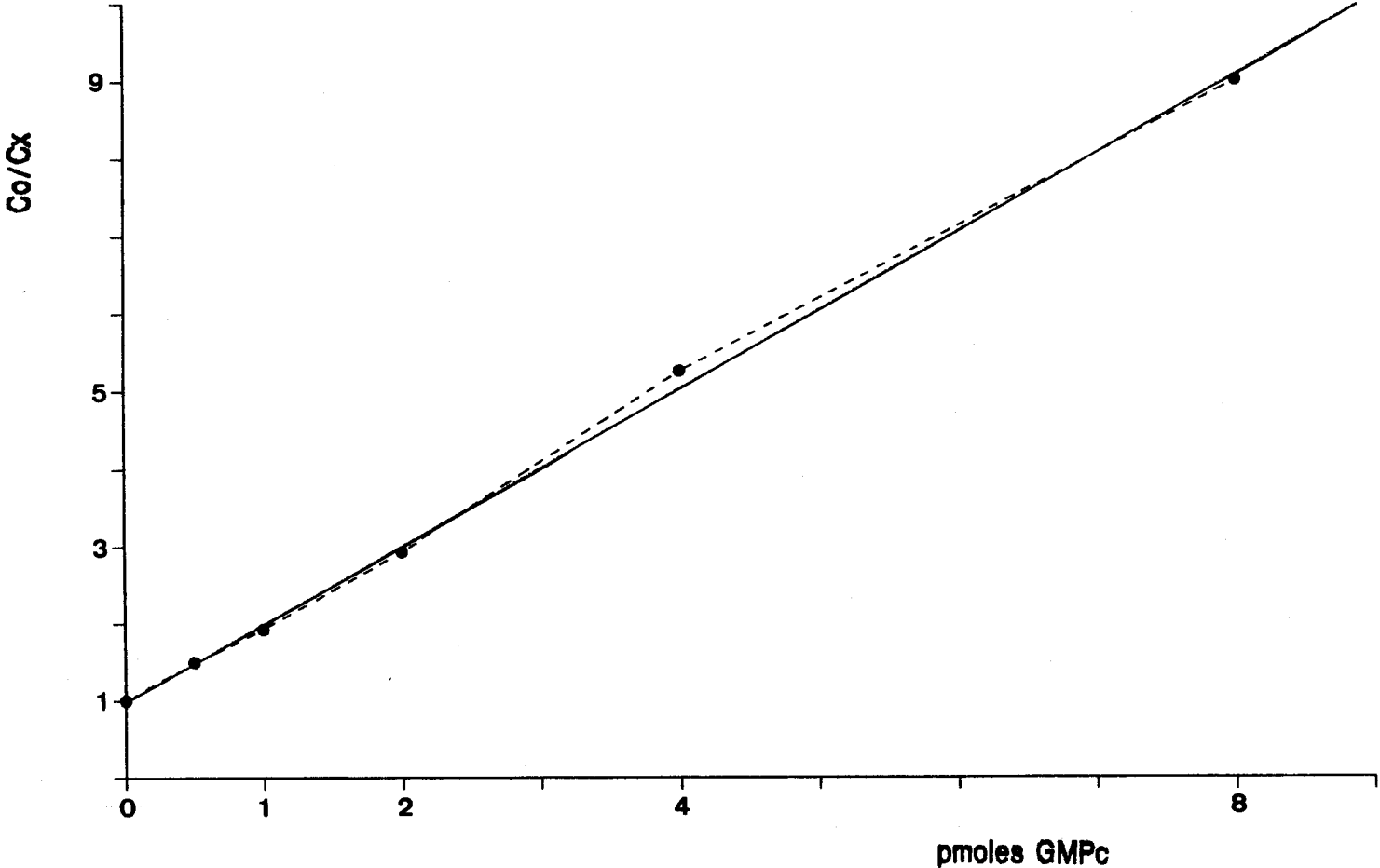


FIG. 27

	Co/Cx	pmol AMPc/mg	$\bar{X} \pm \epsilon$
CONTROL	5.01	0.1250	0.1824 \pm 0.0253
	4.93	0.1179	
	2.99	0.1362	
	5.19	0.2258	
	6.16	0.2482	
	4.87	0.2411	
GENISTEIN (34 μ m)	4.68	0.2234	0.2839 \pm 0.0230 p<0.025
	4.81	0.2612	
	5.11	0.3588	
	4.98	0.3304	
	4.97	0.3046	
PAPAVERINA (20 μ m)	4.29	0.2250	0.3030 \pm 0.0229 p<0.025
	4.78	0.2584	
	4.47	0.2488	
	6.31	0.3390	
	5.62	0.2738	
	5.57	0.3018	
	7.16	0.3961	

Tabla XXV

NIVELES DE AMPc PRESENTES EN ILEON DE COBAYA Y SU MODIFICACION
POR EL TRATAMIENTO CON GENISTEIN Y PAPAVERINA

	Co/Cx	pmol GMPC/mg	X ± €
CONTROL	2.91	0.0199	0.0416 ± 0.0068
	3.15	0.0216	
	3.17	0.0509	
	3.60	0.0466	
	4.27	0.0607	
	3.37	0.0499	
GENISTEIN (34 µm)	3.27	0.0461	0.0533 ± 0.0040 n.s.
	3.02	0.0458	
	2.71	0.0496	
	2.68	0.0468	
	3.47	0.0634	
PAPAVERINA (20 µm)	3.99	0.0682	0.0605 ± 0.0061 n.s.
	3.60	0.0589	
	4.66	0.0875	
	3.96	0.0627	
	3.38	0.0476	
	3.07	0.0462	
	3.83	0.0602	

Tabla XXVI

NIVELES DE GMPC PRESENTES EN ILEON DE COBAYA Y SU MODIFICACION
POR EL TRATAMIENTO CON GENISTEIN Y PAPAVERINA

IV. Conclusiones

- 1 - El contenido en agua y cenizas de la sumidad florida de *Genista tridentata* L. (8.54 % y 2.17 % respectivamente) no difieren significativamente de los descritos en otras especies del mismo género.

- 2 - El "screening" fitoquímico nos lleva a establecer la presencia mayoritaria de cuerpos grasos, esteroides, triterpenos, glúcidos y flavonoides. En una *Genista* es muy significativo la ausencia de alcaloides; esto quizás pueda explicar la falta de unanimidad desde el punto de vista botánico, ya que de Linneo (1753) a Gibbs (1968) se ha incluido en cinco géneros distintos.

- 3 - En el extracto etanólico se ha detectado por cromatografía (capa fina y papel) la presencia de ácido vanílico y p-hidroxibenzoico. Este resultado se ratificó por espectrofotometría UV/VIS y espectrometría de masas.

- 4 - Siguiendo la técnica descrita por Netien-Lebreton se aislaron dos compuestos flavónicos que por cromatografía, espectrofotometría UV/VIS y espectrometría de masas, resultaron ser las isoflavonas GENISTEIN y su heterósido GENISTIN.

- 5 - Los ensayos en órgano aislado (duodeno de rata) evidencian la capacidad del extracto flavónico para relajar la musculatura de fibra lisa frente a las contracciones provocadas por los agonistas Cloruro de Bario y Cloruro de Acetilcolina.

6 - El Genistein modifica de forma muy significativa en todas las experiencias las curvas dosis-respuesta elaboradas con los agonistas Cloruro de Bario e Histamina, sin que exista ningún problema en la recuperación del tono muscular.

-8

7 - A las dosis de 2×10^{-8} M de Acetilcolina y 100 ng/ml para 6-oxo-PGE₁ se produce una inhibición de la contracción superior al 50%, lo que nos indica que no existe una interacción específica con el receptor muscarínico.

8 - El Genistein no parece modificar la liberación de Acetilcolina al espacio sináptico. Estos valores expresados en porcentaje de incremento, están muy alejados de los del patrón Noradrenalina.

9 - A nivel de Nucleótidos cíclicos, utilizando como patrón Papaverina a concentración de 20 μ M, se observa un incremento de los niveles de AMPc, lo que nos indica que debe existir un bloqueo de su fosfodiesterasa.

10 - A la concentración indicada, ni Genistein ni Papaverina modifican de forma significativa los niveles de GMPc. Esto, debe ser problema de dosis y será motivo de nuevos trabajos ya que existen datos bibliográficos que constatan la actividad del patrón a mayor concentración sobre la fosfodiesterasa de GMPc.

V. Bibliografia

ABDALLA, S.S.; ABUZARGA, M.H. (1987).

"Effects of Cirsimaritin, a Flavone Isolated from *Artemisia judaica*, on Isolated Guinea-Pig Ileum", *Planta Med.* 53(4):322-324.

ADESANYA, S.A.; O'NEILL, M.J.; ROBERTS, M.F. (1984).

"Induced and Constitutive Isoflavonoids in *Phaseolus mungo* L. Leguminosae", *Z. Naturforsch.* 39c:888-893.

ADESANYA, S.A.; O'NEILL, M.J.; ROBERTS, M.F. (1985).

"Isoflavonoids from *Phaseolus coccineus*", *Phytochemistry* 24(11):2699-2702.

ADESANYA, S.A.; O'NEILL, M.J.; ROBERTS, M.F. (1986).

"Structure-related fungitoxicity of isoflavonoids", *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29(1):95-103.

ADZET, T.; MASSO, J.L. (1973).

"Chemotaxonomy of the Papilionacea, genus *Genista*. *Genista hungarica* alkaloids", *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* 33(3):349-54.

ADZET, T.; MASSO, J.L. (1975).

"Alkaloid esters of some Mediterranean brooms", *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* 35(3):237-44.

AFCHAR, D.; CAVE, A.; VAQUETTE, J. (1984).

"Etude des réglisses d'Iran. II. Flavonoïdes de *Glycyrrhiza glabra* L. Var. *Glandulifera* Waldst. et Kit. et de *Glycyrrhiza glabra* L. Var. *Violacea* Boiss.", *Plant. Med. et Phytother.* 18(2):55-61.

AKIYAMA, T. et al. (1987).

"Genistein, a specific inhibitor of Tyrosine-specific Protein Kinases", J. Biol. Chem. 262(12):5592-95.

ALARCON DE LA LASTRA, C.; MARTIN, M.J.; DELGADO, F.; MARHUENDA, E.; MENENDEZ, M. (1988).

"Isolement des acides phénols caféique et chlorogénique et de l'orcinol de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. Etude de l'activité antimicrobienne", Plant. Med. et Phytother. 22 (1):11-16.

ALIEVA, S.A. (1977).

"Flavonoids of *G. transcaucasica*", Khim. Prir. Soedin. 1:113-14. En C.A. 87:50195j (1977).

ARTAMONOVA, N.A.; NIKONOV, G.K.; NUSIPBEKOVA, K.; NOSUL'CHAK, V.A. (1987).

"Flavonoids in seeds of *Genista aetnensis*", Khim. Prir. Soedin. 5:756-7. En C.A. 108:147120w (1988).

BATTERHAM, T.J. et al. (1971).

"Metabolism of intraruminally administered (4-¹⁴C)-biochanin A in sheep", Aust. J. Agr. Res. 22(1):131-8.

BECK, A.B. (1964).

"The estrogenic isoflavones of subterranean clover", Australian J. Agr. Res. 15(2):223-30.

BIGGERS, J.D. & CURNOW, D.H. (1954).

"Estrogenic activity of subterranean clover. I. Estrogenic

activity of Genistein", *Biochem. J.* 58:278-82. "II. Isolation of Genistein from subterranean clover and methods of quantitative estimation", *Ibid.* 283-7.

BIRKS, R.I.; MAC INTOSH, F.C. (1961).

"Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion", *Can. J. Biochem. Physiol.* 39: 787-827.

BLATTNER, R.; CLASSEN, H.G.; DEHNERT, H.; DÖRING, H.J. (1980).

"Experiments on isolated smooth muscle preparations", Hugo Sachs Elektronik KG, Stuttgart.

BOUQUET, A.; FOURET, A. (1975).

"Recherches chimiques preliminaires sur les plantes medicinales du Congo-Brazeville", *Fitoterapia* 46:175.

BRAY, G.A. (1960).

"A simple, efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter", *Anal. Biochem.* 1:279-285.

BRIGGS, L.H.; CEBALLO, T.P. (1959).

"Isolation of Genistein from *Podocarpus spicatus* and the constitution of podospicatin", *Tetrahedron* 6:145.

CABO-TORRES, J.; PARDO, P. (1974).

"Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia", 4ª ed., Ediciones gráficas del Sur, Granada.

COLLIER, B.; MAC INTOSH, F.C. (1969).

"The source of choline for acetylcholine synthesis in a sympathetic ganglion", *Can. J. Physiol. Pharmac.* 47:127-135.

DIAZ CASADO, V. (1977).

"Estudio sobre el *Rosmarinus eriocalix*", Tesina de Licenciatura, Granada.

DIDRY, N.; PINKAS, M.; TORCK, M. (1982).

"Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne de feuilles de diverses espèces de *Grindelia*", *Plant. Med. et Phytother.* 26(1):7-15.

DOMINGUEZ, X.A. (1973).

"Métodos de investigación fitoquímica", Ed. Limusa, México.

DOWN, J.A.; SZERB, J.C. (1980).

"Kinetics of Morphine-sensitive [³H]-Acetylcholine Release from the Guinea-Pig Myenteric Plexus", *Br. J. Pharmac.* 68:47-55.

DUKE, J.A. (1986).

"Handbook of Medicinal Herbs", CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

DUNLAP, W.J.; WENDER, S.H. (1960).

"Purification and identification of flavanone glycosides in the peel of the sweet orange", *Arch. Biochem. Biophys.* 87:228.

ESPLUGUES, J.; MORCILLO, E. (1982).

"Desarrollo de nuevos fármacos. II. Evaluación en el laboratorio"

en ESPLUGUES, J. "Farmacología General", Fundación García Muñoz, Sección Saber, Valencia.

FAN, L.L. et al. (1975).

"Pharmacological effects of isoflavones of *Pueraria lobata* on coronary circulation, myocardial hemodynamics and myocardial metabolism in dogs", National Medical Journal of China 55:724.

FARMACOPEA ESPAÑOLA (1954).

Vol. I, IX ed., Estates, Madrid.

FAUGERAS, G.; LAVENIR, R. (1965).

"Guide de travaux pratiques d'essai des drogues vegetales", Masson, Paris.

FIRMIN, J.L.; WILSON, K.E.; ROSSEN, L.; JOHNSTON, A.W.B. (1986).

"Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants", Nature 324:902.

FOLMAN, Y. & POPE, G.S. (1966).

"The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, Genistein and other uterovaginitrophic compounds of low potency", J. Endocrin. 34:215-225.

FONT GUER, P. (1976).

"Plantas medicinales. El Dioscórides renovado", 3ª ed., Ed. Labor S.A., Barcelona.

GABOR, M.; ENGI, E. (1987).

"Effect of natural and semisynthetic flavonoids on croton

oil-induced rabbit ear edema", Kiserl. Orvostud. 39(6): 433-42.
En C.A. 108:161075s (1988).

GARNIER, G.; BEZANGER-BEAUQUESNE, L.; DEBRAUX, G. (1961).

"Ressources médicinales de la Flore Française", Vol.II, Vigot
Frères Editeurs, Paris.

GELLERT, M.; SZENDREI, K.; DINYA, Z.; REPASI, J. (1985).

"Characteristic constituents of the cherry peduncle extract
novicardin: HPLC Fingerprint", Flavonoids and Bioflavonoids
23: 279-86.

GIBBS, P.E. (1968).

Chamaespartium Adanson, en TUTIN T.G. & cols. (eds.). "Flora
Europaea", 2:100. Cambridge University Press, Cambridge, London.

GIBSON, A. (1989).

Comunicación oral. Dpto. Farmacología. King's College London,
London.

GILMAN, A.G. (1970).

"A Protein Binding Assay for Adenosine 3',5'-Cyclic
Monophosphate", Proc. nat. Acad. Sci. 67(1):305-312.

GOTO, J.; MATSUDA, Y.; ASANO, K.; KAWAMOTO, I.; YASUZAMA, T.;
SHIRAHAT, K.; SANO, H.; KASE, H. (1987).

"K-254-I (Genistein), a new inhibitor of Ca²⁺ and Calmodulin-
Dependent Cyclic-Nucleotide phosphodiesterase from
Streptosporangium vulgare", Agr. Biol. Ch. 51(11):3003-9.

GREENGARD, P.; ROBINSON, G.A. (1972).

Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vol. II, Raven Press, New York.

GULUBOV, A.; VENKOV, A. (1973).

"Alkaloid composition of *Genista tinctoria*", Biol. 11(1):87-9.
En C.A. 80:143028c (1974).

HARBORNE, J.B. (1969).

"Chemosystematics of the Leguminosae. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe Genisteae", Phytochemistry 8:1449-56.

HAZATO, T. et al. (1979).

" β -Galactosidase-inhibiting new isoflavonoids produced by actinomycetes", J. Antibiot. 32(3):217-22.

HERRERA, M.D. (1987).

"Contribución al estudio farmacodinámico de *Pycnocomon rutifolium* (Vahl.) Hoffmanns. & Link", Tesis de Licenciatura, Sevilla.

HEYWOOD, V.H. (1985).

"Las plantas con flores", Ed. Reverté S.A., Barcelona.

HOROWITZ, R.M.; JURD, L. (1961).

"Spectral studies on flavonoid compounds. II. Isoflavones and flavanones", J. Org. Chem. 26:2446-9.

ILARIONOV, I.; RAINOVA, L.; NAKOV, N. (1979).

"Antiinflammatory and antiulcer effect of some flavonoids isolated from the genus *Genista*", Farmatsiya 29(6):39-46.

ILARIONOV, I. (1982).

"Pharmacological study of the effect of a total flavonoid mixture from the plant *Genista rumelica* L. on the sexual system", *Farmatsiya* 32(2):52-8.

INGHAM, J.L. (1976).

"Induced isoflavonoids from Fungus-Infected stems of Pigeon Pea", *Z. Naturforsch.* 31c:504-8.

JURD, L.; GEISSMAN, T.A. (1956).

"Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds", *J. Org. Chem.* 21:1395-1401.

KAPLANSKI, O.; SHEMESH, M.; BERMAN, A. (1981).

"Effects of phyto-oestrogens on progesterone synthesis by isolated bovine granulosa cells", *J. Endocr.* 89(3):343-8.

KAPLITA, P.V.; TRIGGLE, D.J. (1983).

"Actions of Ca²⁺ antagonists on the Guinea-Pig ileal myenteric plexus preparation", *Biochem. Pharmac.* 32(1):65-68.

KAZAKOV, A.L. (1979).

"Study of the hypolipidemic activity of natural isoflavones", *Khim. Farm. Zh.* 13(1):58-60. *En C.A.* 90:179910e (1979).

KAZAKOV, A.L.; BANDYUKOVA, V.A.; OZIMINA, I.I.; KOKOVKIN-SHCHERBAK, N.I. (1980).

"Methods for the analysis of isoflavonoids", *Farm. Zh.* 3:70.

KEEN, N.T.; INGHAM, J.L. (1980).

"Phytoalexins from *Dolichos biflorus*", *Z.Naturforsch.* 35c:923-26.

KNOEFEL, D. (1969).

"Tinctarine, a new alkaloid from *Genista tinctoria*", *Biochem. Physiol. Alkaloide, Int. Symp.*, 4th 1969, 477-80.

KNOLL, J.; VIZI, E.S. (1971).

"Effect of stimulation on the inhibition by noradrenaline on the acetylcholine output from parasympathetic nerve terminals", *Br. J. Pharmacol.* 42:263-272.

KOLAR, L. (1981).

"Isolation of estrogenic genistein from *Lupinus polyphyllus* Lindl", *Rada Biol.* 19(1):17-27.

KONOSHIMA, T.; OKAMOTO, E.; KOZUKA, M.; NISHINO, H. (1988).

"Studies on inhibitors of skin tumor promotion, III. Inhibitory effects of isoflavonoids from *Wisteria brachybotrys* on Epstein-Barr Virus activation", *J. Nat. Prod.* 51(6):1266-1270.

KOSTERLITZ, H.W.; WATERFIELD, A.A. (1975).

"In vitro models in the study of structure activity relationships of narcotic analgesics", *A. Rev. Pharmac.* 15:29-48.

LEES, G.M.; KOSTERLITZ, H.W.; WATERFIELD, A.A. (1973).

"Characteristics of Morphine-Sensitive Release of Neurotransmitter Substances. In KOSTERLITZ, H.W. "Agonist and Antagonist actions of narcotic analgesic drugs", University Park Press, Baltimore.

LESCAO, F.; FAUGERAS, G.; PARIS, R. (1972).

"Sur divers constituant phénoliques (acides phénols, flavonoids)

de l'*Osyris alba*", *Plant. Med. et Phytother.*, 16(3):216.

LINDSAY, D.R. & KELLY, R.W. (1970).

"Metabolism of phytoestrogens in sheep", *Aust. Vet. J.* 46(5):219-22.

LITWACK, G. (1967).

"Bioquímica experimental. Un manual de laboratorio", Ed. Omega, Barcelona.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; TOMAS, M.B. (1970).

"The systematic identification of flavonoids", Springer-Verlag, New York.

MAGNUS, R. En: ARRAGIE, M.; METZNER, J.; BEKEMEIER, H. (1983).

"Antiespasmotic effect of *Hagenia abyssinica*", *Planta Med.* 47:240-241.

MAKBOUL, A.M.; ABDEL-BAKY, A.M. (1984).

"Flavonoids from *Sophora secundiflora*", *Fitoterapia* 55(2): 105-6.

MARHUENDA, E. & GARCIA, M.D. (1985).

"Mise en évidence des propriétés antimicrobiennes des sommités fleuries d'*Ononis natrix* L. Identification de l'acide férulique", *Plant. Med. et Phytother.*, 19(3):163-172.

MARHUENDA, E.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; GARCIA, M.D. (1987).

"Mise en évidence des propriétés antibactériennes des acides phénols de *Thymus carnosus* Boiss. Isolement des acides caféique, vanillique, p-coumarique, p-hydroxy-benzoïque et syringique",

Plant. Med. et Phytother. 21(2):153-159.

MARHUENDA, E.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; MARTIN, M.J. (1988).

"Actividad espasmolítica de la fracción flavónica de *Thymus carnosus* Boiss."

MILLER, LL.C. & TAINTER, M.L. (1944).

"Stimulation of the DL50 and its error by means of logarithmic probit graphaper", Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 57:261-3.

MAYOR, M. & DIAZ, T.E. (1977).

"La Flora Asturiana", Ayalga ediciones, Asturias.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; BONDI, A.; BIRK, Y. (1976).

"Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones", J. Agric. Food Chem. 24(6):1174-7. En C.A. 85:175748g (1976).

NAKOV, N.; SARMOVA, T.; AKHTARDZHIEV, Kh. (1973).

"Flavonoid content of *Genista rumelica*", Pharmazie 28(10):680.

NAKOV, N.; TOLKACHEV, O.N.; AKHTARDZHIEV, Kh. (1978a).

"Flavonoid content of *Genista carinalis* Grsb.", Pharmazie 33(7):463.

NAKOV, N.; AKHTARDZHIEV, Kh.; ELNAIN-VOITASHEK, M.; KOVALEUSKI, Z. (1978b).

"Flavonoid composition of *Genista ovata* Wald.", Probl. Farm. 6:65-69. En C.A. 89:193855b (1978).

NAKOV, N.; AKHTARDZHIEV, H.; TOLKACHEV, O. (1978c).

"Flavonoid composition of *Genista rumelica* Vel. Part II",
Farmatsiya 28(4):27-8.

NAKOV, N.; AKHTARDZHIEV, Kh. (1982).

"Flavonoid content of some representatives of the genus *Genista*
in Bulgaria", *Probl. Farm.* 10:46-42. *En C.A.* 98:68820w (1983).

NAKOV, N.; AKHTARDZHIEV, Kh. (1983a).

"Flavonoids in *Genista januensis* Viv.", *Pharmazie* 38(3):202.

NAKOV, N. (1983b).

"Flavonoid composition of *Genista rumelica* Vel.", *Farmatsiya*
33(3):18-21.

NETIEN, G. ; LEBRETON, P. (1964).

"Sur les flavonoides et autres substances polyphenoliques du
Millepertuis hypericummmularium L.", *Ann. Pharm. franç.* 22:69.

NOTEBOOM, W.D. & GORSKI, J. (1963).

"Estrogenic effect of Genistein and Coumestrol diacetate",
Endocrinology 73(6):736-9.

OGAWARA, H.; AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; WATANABE, S.; SUZUKI, K.
(1986).

"A specific inhibitor for tyrosine protein-kinase from
Pseudomonas", *J. Antibiot.* 39(4):606-8.

OGAWARA, H.; AKIYAMA, T.; NAKAGAWA, S.; WATANABE, S. (1987).

"Mechanism of action of Genistein, a specific inhibitor for
Tyrosine protein-kinase", *J. Pharm. Sci.* 76(11):191.

OHTA, N.; MIKUMO, K.; IKEDA, R.; WATANABE, T. (1981).

"Effect of soybean isoflavones on lipase activity", Kumamoto Joshi Daigaku Gakujutsu Kiyo 33:56-60. En C.A. 95:110824r (1981).

OHTA, N.; MIKUMO, K. (1982).

"Effect of soybean isoflavones on lipase activity of soybean sprouts", Kumamoto Joshi Daigaku Gakujutsu Kiyo 34:73-77. En C.A. 97:143336c (1982).

O'NEILL, M.J.; ADESANYA, S.A.; ROBERTS, M.F. (1983).

"Antifungal Phytoalexins in Phaseolus aureus Roxb.", Z. Naturforsch. 38c:693-7.

OTERO, E. (1946).

"Análisis de grasas, ceras y sus mezclas comerciales", Dossat S.A., Madrid.

OZIMINA, I.I. (1981).

"Flavonoid compounds of Genista patula", Khim. Prir. Soedin. 2:242-3. En C.A. 95:76862q (1981).

PALAMARCHUK, A.S.; BONDARENKO, V.E. (1976).

"Antimicrobial activity and chemical composition of Genista tinctoria", Rastit. Resur. 12(2):229-32.

PALFII, F. Yu.; VAS'KOVICH, Ya.V.; RIVIS, I.F. (1980).

"Effect of some steroid hormones on the lipid metabolism and vitamin F and E status in cows", S-Kh. Biol. 15(1):74-7. En C.A. 92:209359t (1980).

PALFII, F.Yu.; KOLISNYK, A.V.; MALIK, O.G. (1986).

"Alteration of mineral elements in blood of cows by estrogenic compound in feeds", S-Kh. Naukim. V.I. Lenina 2:32-4. En C.A. 104:167407r (1986).

PATNAIK, G.K.; BANAUDHA, K.K.; KHAN, K.A.; SHOEB, A.; DHAWAN, B.N. (1987).

"Spasmolytic activity of Angelicin: A coumarin from *Heracleum thomsoni*", *Planta Med.* 53(6):517:520.

PATON, W.D.M.; ZAR, A.M. (1968).

"The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strips", *J. Physiol.* 194:13-33.

PATON, W.D.M.; VIZI, E.S. (1969).

"The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip", *Br. J. Pharmacol.* 35:10-28.

PATON, W.D.M.; VIZI, E.S.; ZAR, M.A. (1971).

"The mechanism of acetylcholine released from parasympathetic nerves", *J. Physiol.* 215:819-48.

PATRONI, J.J.; COLLINS, W.J.; STERN, R. (1982).

"Quantitative analysis of the isoflavone phyto-oestrogens genistein, formononetin and biochanin A in subterranean clover leaves by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.* 247:366-68.

PATTERSON, M.S.; GREENE, R.C. (1965).

"Measurement of low energy beta-emitters in aqueous solution by scintillation counting of emulsions", Anal. Chem. 37:854-57.

PARIS, R.R. & MOYSE, H. (1976).

"Matière Médicale", Vol.I, Masson, Paris.

PARIS, R.R. & MOYSE, H. (1981).

"Matière Médicale", Vol.II, 2^a ed., Masson, Paris.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. (1976).

"Química orgánica experimental. Productos naturales. Compuestos de interés farmacológico e industrial", Eunibar, Barcelona.

PERT, C.B.; SNYDER, S.H. (1973).

"Opiate receptor: demonstration in nervous tissue", Science 179:1011-1014.

POLUNIN, O. & SMYTHIES, B.E. (1977).

"Guía de campo de las flores de España", Ed. Omega S.A., Barcelona.

POTTER, L.T. (1970).

"Synthesis, storage and release of [14C]-acetylcholine in isolated rat diaphragm muscles", J. Physiol. 206:145-166.

RAINOVA, L. & GAHNIAN, R. (1978).

"Changes in the capillary resistance of rats under the effect of flavonoids isolated from Genista L.", Farmazia 28:37.

RAINOVA, L.; NAKOV, N.; BOGDANOVA, S.; MINKOV, E.; STANEVA-STOYTCHIEVA, D. (1988).

"Ulceroprotective activity of the flavonoids of *Genista rumelica* Vel.", *Phytotherapy Res.* 2(3):137-9.

RANDERATH, K. (1974).

"Cromatografía de capa fina", Ediciones Urmo S.A., Bilbao.

RIBEREAU-GAYON, P. (1968).

"Les composés phénoliques des végétaux", Dunod, Paris.

RICHARDSON, I.W.; SZERB, J.C. (1974).

"The release of labelled acetylcholine and choline from cerebral cortical slices stimulated electrically", *Br. J. Pharmacol.* 52: 499-507.

RIOS, J.L.; SIMEON, S.; JIMENEZ, F.J.; ZAFRA-POLO, M.C.; VILLAR, A. (1986).

"Reagents for screening Medicinal Plants by TLC. A Review", *Fitoterapia* 57(3):153-162.

RIVIS, I.F.; MALIK, O.G.; PALFII, F. Yu. (1981).

"Effect of estrone and genistein on lipid metabolism and reproductive capacity of mature heifers", *S-Kh. Biol.* 16(4):589-92. *En C.A.* 95:162719e (1981).

RODBELL, M. (1971).

"In vitro assays of Adenyl cyclase", *Acta Endocrinol. Suppl.* 153:337.

RODRIGUEZ, R.; LASHERAS, B.; CENARRUZABEITIA, E. (1986).

"Pharmacological activity of *Prunus spinosa* on isolated tissue preparations", *Planta Med.* 52(4):256-9.

SAN MARTIN CASAMADA, R. (1977).

"Tratado de Farmacognosia", Ed. Cientifico Médica, Barcelona.

SCHRÖDER, G. & colbs. (1979).

"Biosynthesis of antifungal isoflavonoids in *Lupinus albus*. Enzymatic prenilation of genistein and 2'-hydroxygenistein", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 194(2):635-6.

SEIBL, J. (1973).

"Espectrometria de masas", Ed. Alhambra, Madrid.

SHORE, L.S.; LYTTLE, C.R. (1986).

"Interactions of isoflavones, zearalenone and DES with rat uterine peroxidase enzyme", *Prog. Clin. Biol. Res.* 213:253-6.

SHUTT, D.A. (1967).

"Interaction of genistein with oestradiol in the reproductive tract of the ovariectomized mouse", *J. Endocrin.* 37:231-2.

STEINER, A.L.; KIPNIS, D.; UTIGER, R.; PARKER, C.W. (1969).

"Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate", *Proc. nat. Acad. Sci.* 64(1):367-73.

STEINER, A.L.; PAGLIARA, A.S.; CHASE, L.R.; KIPNIS, D.M. (1972).

"Radioimmunoassay for cyclic nucleotides II. Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian

tissues and body fluids", J. Biol. Chem. 247:1114-1120.

STENMAGEN, E.; ABRAHAMSSON, S.; McLALFERTY, F.W. (1969).

"Atlas of Mass Spectral Data", Interscience publishers, New York.

STHAL, E. (1969).

"Thin Layer Chromatography", Springer-Verlag, New York.

SZERB, J.C. (1975).

"Endogenous acetylcholine release and labelled acetylcholine formation from [3H]-choline in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum", Can. J. Physiol. Pharmacol. 53:566-574.

SZERB, J.C. (1976).

"Storage and release of labelled acetylcholine in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum", Can. J. Physiol. Pharmacol. 54:12-22.

TORCK, M.; BEZANGER-BEAUGUESNE, L.; ROBELET, A. (1971).

"Recherches sur les flavonoïdes des Légumineuses. II. Etude pharmacologique", Ann. Pharm. franç. 29(4):297-304.

TORCK, M.; PINKAS, M. (1980).

"Sur quelques polyphénols de *Medicago arborea* L.", Plant. Med. et Phytother. 14(1):20-25.

TORO, M.V.; GARCIA, M.D.; PSACUAL, M. (1987).

"Isolement et identification des acides phénols chez *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera: leur contribution à l'activité antimicrobienne de l'espèce", Ann. Pharm. franç. 45(5):401-7.

TORRENT, M.T. (1976).

"Algunos aspectos farmacológicos y farmacodinámicos de *Lippia citriodora*", Rev. B. Acad. de Barcelona 14: 39-41.

TOSUN, A.; TANKER, M.; ÖZDEN, T.; TOSUN, F. (1987).

"Alkaloids of *Genista libanotica*", Planta Med. 5: 500.

TOSUN, F.; TANKER, M.; ÖZDEN, T.; TOSUN, A. (1986a).

"Alkaloids of *Genista anatolica*", Planta Med. 3: 242-3.

TOSUN, F. (1986b).

"Alkaloids of *Genista aucheri* Boiss.", Eczacilik Fak. Derg. 3(2): 99-103. En C.A. 107: 151188w (1987).

TOSUN, F.; TOSUN, A.; TANKER, M.; ÖZDEN, T. (1987a).

"Alkaloids of *Genista burdurensis*", Planta Med. 1: 119.

TOSUN, F.; TANKER, M.; ÖZDEN, T.; TOSUN, A. (1987b).

"Alkaloids of *Genista involucrata* and *Genista albida*", Planta Med. 5: 499-500.

TOVEY, K.C.; OLDHAM, K.G.; WHELAN, J.A.M. (1974).

"A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique", Clin. Chim. Acta 56: 221-234.

TREBIEN, H.A.; NEVES, P.C.A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (1988).

"Evaluation of pharmacological activity of a crude hydroalcoholic extract from *Jatropha elliptica*", Phytother. Res. 2(3): 115-8.

TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E. (1979).

"Farmacognosia", 2ª ed., El Ateneo, Madrid.

UBERA, J.L. (1987).

Genista L. en VALDES, B. & colbs. "Flora Vasculare de Andalucía Occidental", 2:155-161, Ketres, Barcelona.

ULUBELEN, A.; CETIN, E.T.; GURAN, A.; IYENGAR, M.A. (1971).

"Flavonoids of Genista tinctoria", Lloydia 34(2):258-9.

ULUBELEN, A.; DOGUC, T. (1974).

"Flavonoid compounds from flowers of Genista lydia", Planta Med. 25(1):39-42.

UMEZAWA, H. et colbs. (1975).

"Isolation of isoflavones inhibiting DOPA decarboxylase from fungi and Streptomyces", J. Antibiot. 28(12):947-52.

VAN ROSSUM, J.M.; VAN DER BRINK, F.G. (1963).

"Cumulative dose-response curves II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters", Arch. Int. Pharmacodyn. 143:299-330.

VICIOSO, C. (1953).

"Genisteas Españolas", Vol. I, Ministerio de Agricultura, Madrid.

WALLACH, M.B.; GOLDBERG, A.M.; SHIDEMAN, F.E. (1967).

"The synthesis of labelled acetylcholine by the isolated cat heart and its release by vagal stimulation", Int. J. Neuropharmac. 6:317-323.

WATANABE, S.; KABORI, M.; ITO, T.; OGAWARA, H. (1987).

"Use of isoflavone derivatives as immunosuppressants", Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 62:106. En C.A. 108:622c (1988).

WELLER, M.; RODNIGHT, R.; CARRERA, D. (1972).

"Determination of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in cerebral tissues by saturation analysis", Biochem. J. 129:113-21.

WIKBERG, J. (1977).

"Release of [3H]-acetylcholine from isolated guinea-pig ileum. A radiochemical method for studying the release of the cholinergic neurotransmitter in the intestine", Acta physiol. scand. 101:302-317.

DOLORS HERRERA GONZALEZ

ESTUDIO FARMACOLOGICO DE GENISTA TRIDENTADA L.:
ACCION DE GENISTEIN SOBRE LA MUSCULATURA LISA

APTO "CON LAUDE"

18

Junio

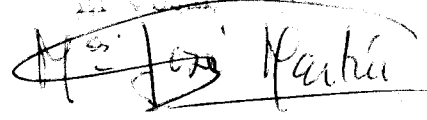
1990



A large, stylized handwritten signature, possibly reading 'Herrera', written in dark ink.

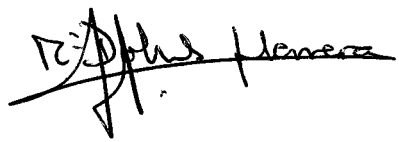


A handwritten signature, possibly 'Catalina', written in dark ink.



A handwritten signature, possibly 'Dolores Herrera', written in dark ink.

Catalina Alarcón



A handwritten signature, possibly 'Dolores Herrera', written in dark ink.