

Curso 2006/07  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/28**  
I.S.B.N.: 978-84-7756-779-0

**CELIA XIOMARA BONKANKA TABARES**

**Evolución farmacológica  
de terpenos y flavonoides de origen vegetal**

**Directoras**

**ROSA RABANAL GALLEGO  
CANDELARIA DEL CARMEN SÁNCHEZ MATEO**



**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**

Parte de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, hasta el momento, han dado lugar a las siguientes comunicaciones a Congresos:

Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum grandifolium* Choisy in mice. Phytotherapy - The role of an ancient tradition in modern times. Funchal (Portugal). 1-5 Noviembre, 2005.

Antidepressant activity of some *Hypericum grandifolium* Choisy extracts in the forced swimming test in mice. Phytotherapy - The role of an ancient tradition in modern times. Funchal (Portugal). 1-5 Noviembre, 2005.

Analgesic and topical anti-inflammatory activity of terpenoids and flavonoids from species of the genus *Teucrium* and *Salvia* in mice. 54<sup>th</sup> Annual Congress on Medicinal Plant Research. Helsinki (Finlandia). 29 Agosto-2 Septiembre, 2006.

Evaluation of the central properties of Aethiopinone, an orthonaphthoquinone diterpene from *Salvia aethiopsis* roots, in mice. 28<sup>o</sup> Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Santiago de Compostela (España). 19-22 Septiembre, 2006.

Studies on the analgesic and topical anti-inflammatory effects of some *Hypericum grandifolium* Choisy sub-fractions in mice. 28<sup>o</sup> Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Santiago de Compostela (España). 19-22 Septiembre, 2006.

## ***AGRADECIMIENTOS***

Antes que nada, dar gracias a Dios, por haber puesto en mi camino a aquellos seres que han sido mi soporte durante todo este tiempo.

A la Universidad de La Laguna-CajaCanarias por la concesión de una Beca de Postgrado para la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis Directoras de Tesis, la Dra. Rabanal Gallego y la Dra. Sánchez Mateo, por la confianza que siempre han depositado en mí. Por todo ello tendrán siempre mi más sincera gratitud.

Al Dr. Benjamín Rodríguez del Instituto de Química Orgánica (CSIC) de Madrid, por la cesión de parte de los compuestos estudiados en esta Tesis.

Al Director del *Institute of Environmental Research (University of Dortmund)*, el Prof. Dr.Dr.h.c Michael Spiteller, a quien debo haber realizado una estancia tan grata y fructífera en tan prestigioso Instituto.

A todo el personal del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna y, en particular, a Begoña.

A la Música, a Carmen, Gonzalo y Pipe, por darme un motivo por el que levantarme de la cama demasiadas mañanas. Así también, al Dr. Juan Antonio Gallardo por su amistad y cooperación constantes, y por supuesto a Gregorio, por hacerme ver que siempre algo gané cuando perdí y no dejarme perder nunca la fe. Gracias por vuestra infinita generosidad.

Un agradecimiento muy especial a Bassy y a todos aquellos que han contribuido, directa o indirectamente, a la realización de este trabajo.

Agradecer hoy y siempre a mi familia por procurar en todo momento mi bienestar. En especial, a mis padres, a Clara, Mar, Montse, Víctor y Andrés, sin olvidar, a Pichu, Ale, JuanFe, Victoria y Pablito. Os adoro.

*A mi madre*

## ***ÍNDICE***

<b>Índice</b> .....	i
<b>Abreviaturas</b> .....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
2.1. INTERÉS FARMACOLÓGICO DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>HYPERICUM</i> .....	7
2.1.1. El género <i>Hypericum</i> en Canarias: <i>Hypericum grandifolium</i> Choisy.....	11
2.2. FLAVONOIDES.....	13
2.2.1. Actividad farmacológica.....	17
2.3. TERPENOS: DITERPENOS.....	21
2.3.1. Actividad farmacológica de los diterpenos.....	24
<b>3. MATERIAL Y METODOS</b> .....	29
3.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE <i>HYPERICUM GRANDIFOLIUM</i> CHOISY.....	31
3.1.1. Recolección y conservación de la droga.....	31
3.1.2. Productos químicos utilizados.....	31
3.1.3. Preparación de los extractos y fracciones.....	32
3.1.4. Técnicas de fraccionamiento e identificación estructural.....	33
3.1.4.1. Pruebas clásicas de identificación fitoquímica.....	33
3.1.4.2. Cromatografía clásica.....	35
3.1.4.3. Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas: CLAR-EM/EM y CLAR-EM-TF.....	36
3.2. OBTENCIÓN DE LA FLAVONA Y DITERPENOS AISLADOS DE DIFERENTES ESPECIES DE LOS GÉNEROS <i>TEUCRIUM</i> Y <i>SALVIA</i> .....	39
3.3. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA.....	41
3.3.1. Pruebas realizadas.....	41
3.3.2. Condiciones de los ensayos y expresión de los resultados.....	43
3.3.3. Fármacos y productos químicos utilizados.....	45
3.3.4. Estudio de la toxicidad aguda: Fijación de la DL <sub>50</sub> .....	45
3.3.5. Actividad analgésica.....	46
3.3.5.1. Efecto sobre los estiramientos inducidos por ácido acético.....	47
3.3.5.2. Efecto sobre la hiperalgesia inducida por formalina.....	48
3.3.5.3. Efecto sobre el tiempo de reacción en el test del <i>tail-flick</i> .....	49

3.3.6. Actividad antiinflamatoria.....	50
3.3.6.1. Efecto sobre el edema plantar inducido por carragenina en ratón.....	51
3.3.6.2. Efecto sobre el proceso inflamatorio inducido por tetradecanoil-forbol-acetato (TPA).....	52
3.3.7. Actividad sobre el sistema nervioso central.....	53
3.3.7.1. Efecto sobre la actividad motora espontánea.....	54
3.3.7.2. Efecto directo sobre la temperatura corporal: Determinación de la temperatura rectal.....	55
3.3.7.3. Actividad miorrelejante: Test de la tracción.....	56
3.3.7.4. Efecto sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico.....	56
3.3.7.5. Actividad antidepresiva.....	57
3.3.7.5.1. Antagonismo frente a los efectos inducidos por la tetrabenacina.....	58
3.3.7.5.2. Depresión por desesperación comportamental: Test de Porsolt en ratones.....	59
3.3.7.5.3. Efecto sobre la conducta inducida por el L-5-hidroxitriptófano (L-5-HTP).....	60
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
4.1. <i>HYPERICUM GRANDIFOLIUM</i> CHOISY.....	65
4.1.1. Estudio fitoquímico.....	65
4.1.1.1. Preparación de los extractos y fracciones.....	65
4.1.1.2. Pruebas clásicas de identificación fitoquímica.....	65
4.1.1.3. Fracción butanólica de <i>Hypericum grandifolium</i> .....	66
4.1.1.4. Fracción clorofórmica de <i>Hypericum grandifolium</i> : Obtención de subfracciones.....	66
4.1.1.5. Análisis fitoquímico mediante CLAR-ESI-EM/EM.....	67
4.1.1.6. Análisis fitoquímico mediante CLAR-ESI-EM-TF.....	68
4.1.2. Evaluación farmacológica.....	70
4.1.2.1. Actividad analgésica.....	70
4.1.2.1.1. Efecto sobre los estiramientos inducidos por ácido acético en ratón.....	70
4.1.2.1.2. Efecto sobre la hiperalgesia inducida por formalina.....	71
4.1.2.1.3. Efecto sobre el tiempo de reacción en el test del <i>tail-flick</i> .....	72

4.1.2.2.	Actividad antiinflamatoria.....	73
4.1.2.2.1.	Efecto sobre el edema plantar inducido por carragenina en ratón.....	73
4.1.2.2.2.	Efecto sobre el proceso inflamatorio inducido por el tetradecanoil-forbol-acetato (TPA).....	73
4.1.2.3.	Actividad sobre el sistema nervioso central.....	75
4.1.2.3.1.	Efecto sobre la actividad motora espontánea.....	75
4.1.2.3.2.	Efecto directo sobre la temperatura rectal.....	75
4.1.2.3.3.	Actividad miorrelajante: Test de la tracción.....	76
4.1.2.3.4.	Efecto sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico.....	77
4.1.2.3.5.	Antagonismo a la tetrabenacina.....	77
4.1.2.3.6.	Depresión por desesperación comportamental: Test de Porsolt.....	78
4.1.2.3.7.	Efecto sobre la conducta inducida por el L-5-hidroxitriptófano (L-5-HTP).....	79
4.2.	FLAVONOIDE Y DITERPENOS DE TIPO CLERODANO AISLADOS DE DIFERENTES ESPECIES DE LOS GÉNEROS <i>SALVIA</i> Y <i>TEUCRIUM</i> .....	80
4.2.1.	Determinación de la toxicidad aguda.....	80
4.2.2.	Actividad analgésica.....	81
4.2.2.1.	Efecto sobre los estiramientos inducidos por ácido acético en ratón.....	81
4.2.2.2.	Efecto sobre el tiempo de reacción en el test del <i>tail-flick</i> .....	81
4.2.3.	Actividad antiinflamatoria.....	82
4.2.3.1.	Efecto sobre el edema plantar inducido por carragenina en ratón.....	82
4.2.3.2.	Efecto sobre el proceso inflamatorio inducido por tetradecanoil-forbol-acetato (TPA).....	83
4.2.4.	Actividad sobre el sistema nervioso central.....	84
4.2.4.1.	Efecto sobre la actividad motora espontánea.....	84
4.2.4.2.	Efecto directo sobre la temperatura rectal.....	84
4.2.4.3.	Actividad miorrelajante: Test de la tracción.....	85
4.2.4.4.	Efecto sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico.....	85

4.3.	AETIOPINONA.....	86
4.3.1.	Efecto sobre la actividad motora espontánea.....	86
4.3.2.	Efecto directo sobre la temperatura rectal.....	87
4.3.3.	Actividad miorrelajante: Test de la tracción.....	87
4.3.4.	Efecto sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico.....	87
4.3.5.	Antagonismo a la tetrabenacina.....	87
4.3.6.	Depresión por desesperación comportamental: Test de Porsolt.....	88
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
5.1.	<i>HYPERICUM GRANDIFOLIUM</i> CHOISY.....	91
5.2.	FLAVONOIDE Y DITERPENOS DE TIPO CLERODANO AISLADOS DE DIFERENTES ESPECIES DE LOS GÉNEROS <i>SALVIA</i> Y <i>TEUCRIUM</i> .....	97
5.3.	AETIOPINONA.....	98
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>105</b>

## ***ABREVIATURAS***

5-LOX	5-lipoxigenasa
AcOEt	Acetato de etilo
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMP	Adenosín monofosfato
ANOVA	Análisis de la varianza
Ar	Anillo aromático
CCF	Cromatografía en capa fina
CI	Ionización química
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CLAR-EM	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
DE <sub>10</sub>	Dosis eficaz 10
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
ε	Error estándar
EI	Ionización por impacto electrónico
ej.	Ejemplo
EM	Espectrometría de masas
EM/EM	Espectrometría de masas en tándem
EM-TF	Espectrometría de masas por transformada de Fourier
ESI	Ionización por electrospray
FAB	Ionización por bombardeo con átomos rápidos
Fig.	Figura
FPP	Farnesilpirofosfato
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
Gal	Galactosa
GFPP	Geranilfarnesilpirofosfato
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato
Glc	Glucosa
GPP	Geranilpirofosfato
H-SRM	Monitorización de reacciones altamente selectiva
i.p.	Intraperitoneal (vía)
IL-6	Interleucina 6
IMAO	Inhibidores de monoaminoxidasa
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
L-5-HTP	L-5-hidroxitriptófano
MAO	Monoaminoxidasa
MeOH	Metanol
min	Minutos

$(m/z)$	Relación masa-carga
n	Animal, número de animales
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexano
NE	No ensayado
p	Significación estadística
pp.	Páginas
p.o.	<i>Per os</i> , administración oral
PAF	Factor activador de plaquetas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandinas
Rf	Factor de retención
Rha	Ramnosa
Secc.	Sección
SIDA	Síndrome inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SRM	Monitorización de reacciones selectiva
$t_x$	Tiempo de medida ( $x = 1, 2, 4, 6$ y 24 horas; $x = 30$ minutos; $x = 0$ , antes de la administración)
Ti	Tiempo de inducción al sueño; Tiempo de inmovilidad
Ts	Tiempo de sueño
T <sup>a</sup>	Temperatura
T <sub>n0</sub>	Valor de temperatura rectal antes de la administración de los productos para cada animal
T <sub>nt</sub>	Valor de la temperatura rectal para cada animal en el tiempo de medida
$\Delta T_x = T_{n0} - T_{nt}$	Variación de la temperatura para cada animal en el momento de la medida
TPA	Tetradecanoil-forbol-acetato
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
x	Media aritmética

## ***1. INTRODUCCIÓN***

A pesar del enorme progreso habido en los últimos años en el desarrollo de nuevos fármacos, la mayoría de ellos siguen presentando efectos secundarios, por lo que la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más eficaces y seguros sigue siendo una parte importante de la investigación farmacéutica. En este sentido, el reino vegetal continúa siendo una fuente interesante de nuevos agentes farmacológicos, ya que existen múltiples plantas medicinales que poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios con variadas aplicaciones, de los que hasta el momento sólo han sido investigados una pequeña parte.

Por este motivo, desde hace varios años los miembros de este equipo de trabajo han venido realizando un amplio estudio encaminado a poner de manifiesto las posibles actividades farmacológicas de diferentes especies vegetales utilizadas con fines medicinales, con el ánimo no sólo de avalar su uso popular sino también encontrar posibles moléculas con potencial actividad farmacológica que puedan resolver (aunque sea parcialmente) algunos de los problemas con que se enfrenta hoy la terapéutica.

Dentro de dicha línea de investigación podemos destacar el estudio llevado a cabo con diferentes especies del género *Hypericum* endémicas del Archipiélago Canario. La elección de este género no ha sido aleatoria, sino que se ha hecho en base a su amplio uso en medicina popular y al gran interés suscitado en los últimos años por la especie *Hypericum perforatum* L. que ha demostrado interesantes propiedades antidepresivas tanto en experimentación animal como clínica (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Butterweck y cols., 1997; Barnes y cols., 2001). Fruto de esta investigación han sido varias publicaciones donde se han puesto de manifiesto las propiedades antibacterianas, analgésicas, antiinflamatorias y antidepresivas de diferentes extractos y fracciones obtenidos de las sumidades floridas de *H. canariense*, *H. glandulosum* e *H. reflexum*, que corroboran algunos de los usos populares de estas plantas (Herrera y cols., 1996; Prado y cols., 2002; Rabanal y cols., 2002, 2005; Sánchez-Mateo y cols., 2002, 2005, 2006a, 2007).

Asimismo, la infusión y el extracto metanólico de las sumidades floridas de *Hypericum grandifolium* Choisy, especie endémica de la región Macaronésica, mostraron interesantes actividades antibacterianas y antidepresivas (Prado y cols., 2002; Rabanal y cols., 2002; Sánchez-Mateo y cols., 2002). Dado los interesantes resultados obtenidos con esta planta y el hecho de que las especies de este género sean ricas en flavonoides, una parte de la presente Tesis Doctoral continúa con esta línea de

investigación estudiando más en profundidad dicha especie tanto desde el punto de vista fitoquímico como farmacológico. Para ello se realizó un fraccionamiento bio-guiado del extracto metanólico, evaluándose sus acciones analgésicas y antiinflamatorias en diferentes modelos de experimentación animal, así como sus acciones a nivel del sistema nervioso central, con el propósito de avalar su uso popular y de localizar los principios responsables de dicha acción.

Por otro lado, siendo los terpenos y flavonoides dos importantes grupos de principios activos que han mostrado en numerosos trabajos tener notables propiedades farmacológicas de utilidad en terapéutica, hemos realizado en la presente Tesis Doctoral el estudio de las actividades analgésicas, antiinflamatorias y sobre el sistema nervioso central (SNC) de los diterpenos de tipo clerodano *teucrina A*, *19-acetilgnafalina*, *eriocefalina*, *teucvina* y *teuflina*, obtenidos de diferentes especies del género *Teucrium*, así como de la flavona *salvigenina* aislada del género *Salvia*.

Por lo que se refiere a la *aetiopinona*, naftoquinona diterpénica de tipo abietano aislada de las raíces de *Salvia aethiopsis* L., ha demostrado en trabajos anteriores poseer interesantes actividades antimicrobianas, citotóxicas, analgésicas y antiinflamatorias (Hernández-Pérez y cols., 1995, 1999; Benrezzouk y cols., 2001; De las Heras y cols., 2001; Rozalski y cols., 2006). En el presente trabajo, y con el fin de completar su perfil farmacológico, se evalúa su potencial actividad sobre el sistema nervioso central en diferentes modelos de experimentación animal.

En base a todo lo expuesto, el trabajo que recoge la presente memoria consta de tres partes diferenciadas:

1. Fraccionamiento del extracto metanólico obtenido de las sumidades floridas de *Hypericum grandifolium* Choisy: estudio fitoquímico y evaluación de sus potenciales actividades analgésicas, antiinflamatorias y sobre el sistema nervioso central.
2. Estudio de los efectos analgésicos, antiinflamatorios y sobre el sistema nervioso central de los diterpenos de tipo clerodano *teucrina A*, *19-acetilgnafalina*.
3. Estudio de las acciones sobre el sistema nervioso central de la *aetiopinona*.

## ***2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA***

## **2.1. INTERÉS FARMACOLÓGICO DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *HYPERICUM***

El género *Hypericum* pertenece a una familia, la Hypericaceae, de pocos géneros pero con casi 400 especies de hierbas y arbustos que se desarrollan desde zonas templadas hasta en montañas de los trópicos; la mayoría de estas tienen flores amarillas bastante vistosas. Esta familia se caracteriza por ser arbustos o hierbas con jugo resinoso, con hojas opuestas, simples, generalmente enteras, y, a menudo, con algunas glándulas. Las flores son generalmente terminales, solitarias o en cimas, hermafroditas, regulares, con 5 sépalos libres y 5 pétalos. Los estambres son numerosos, a menudo connatos en haces. Tienen el ovario súpero y los estilos libres o connatos, siendo el fruto en cápsula o baya (Kunkel, 1991; Bramwell y Bramwell, 2001). Las especies del género *Hypericum* están clasificadas en diferentes secciones (entre 30-50 según el autor), pudiendo ser diferenciadas en base a características morfológicas tales como el fenotipo de la planta, posición de las hojas, organización de las flores y número de estambres y carpelos, siendo el principal parámetro de diagnóstico para caracterizar el género, la presencia de estructuras secretoras (Tutin y cols., 1968; Avato, 2005).

Las especies del género *Hypericum* se llevan utilizando desde hace tiempo en medicina popular como remedio de heridas, infecciones urinarias y para aliviar los desórdenes del sistema nervioso (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Schulz y cols., 1998; Barnes y cols., 2001; Avato, 2005). Pero en los últimos años han recibido una atención especial debido a las propiedades antidepressivas encontradas tanto en experimentación animal como clínica para los extractos de hipérico o hierba de San Juan (*Hypericum perforatum* L.) (Butterweck y cols., 1997; Schulz y cols., 1998; Brenner y cols., 2000; Schulz, 2002). Estos extractos son útiles en el tratamiento de depresiones leves o moderadas y presentan un perfil favorable de efectos adversos, por lo que constituyen una valiosa alternativa a otros antidepressivos (Brenner y cols., 2000; Barnes y cols., 2001; Greeson y cols., 2001; Schulz, 2001, 2002; Rodríguez-Landa y Contreras, 2003).

Si bien el hipérico presenta menos efectos secundarios que los antidepressivos utilizados como referencia, puede producir efectos adversos, siendo los más frecuentes mareos, fatiga, confusión, estreñimiento y otros síntomas gastrointestinales (Barnes y cols., 2001; Greeson y cols., 2001; Schulz, 2001; Rodríguez-Landa y Contreras, 2003). Se ha descrito algún caso de fotosensibilidad (debido a las naftodiantronas), especialmente en personas de tez blanca, con dosis treinta veces superiores a las

indicadas o en tratamientos prolongados, por lo que debe evitarse la exposición directa al sol o a los rayos UVA si se toman dosis elevadas. Además el hipérico no causa somnolencia y no tiene influencia negativa sobre la capacidad de conducir y utilizar maquinaria (Buendía Sánchez, 2000; Barnes y cols., 2001; Schulz, 2001). Por todo ello, la hierba de San Juan se está transformando en el tratamiento de primera elección en la depresión leve o moderada, así como en estados de decaimiento y astenia, que cursan con pérdida de interés, cansancio y alteraciones del sueño (Di Carlo y cols., 2001; Paredes Salido y Roca Fernández, 2003; Vanaclocha y Cañigüeral, 2003).

No obstante, hay que señalar que el *H. perforatum* puede producir interacciones con distintos medicamentos. El interés y la trascendencia de este hecho quedan reflejados en las más de 50 comunicaciones que se han publicado en torno a ello en los últimos años (Madabushi y cols., 2006). Numerosas evidencias científicas indican que el *H. perforatum* es un potente inductor enzimático de ciertos isoenzimas del complejo enzimático del citocromo P<sub>450</sub> (particularmente CYP 3A4) y/o la glicoproteína P, implicados en la farmacocinética de numerosos fármacos (Biffignandi y Bilia, 2000; Barnes y cols., 2001; Greeson y cols., 2001; Izzo y Ernst, 2001; Schulz, 2001; Müller, 2003; Rodríguez-Landa y Contreras, 2003; Izzo, 2004; Madabushi y cols., 2006). Diferentes compuestos presentes en el extracto de hipérico han sido considerados responsables de esta interacción, destacando en este sentido la hiperforina (Cantoni y cols., 2003; Beerhues, 2006; Gutmann y cols., 2006; Madabushi y cols., 2006). Así, el tratamiento con extractos de hierba de San Juan puede reducir los niveles plasmáticos de diferentes fármacos como la digoxina, amitriptilina, ciclosporina, anticonceptivos orales, teofilina, warfarina, indinavir, nevirapina, irinotecán, fenprocumon, alprazolam, dextrometorfano, simvastatina, fexofenadina, metadona o tacrolimus entre otros, lo que conlleva implicaciones clínicas importantes, como es la pérdida del efecto terapéutico de los mismos (Izzo y Ernst, 2001; Izzo, 2004; Madabushi y cols., 2006). Por este motivo, se recomienda no iniciar o suprimir la administración de hipérico en caso de que se esté en tratamiento con alguno de estos fármacos sin consultar al facultativo. La suspensión del tratamiento con hierba de San Juan motivaría un aumento de los niveles sanguíneos del fármaco, con el consiguiente riesgo de toxicidad.

Igualmente, también se pueden presentar interacciones de tipo farmacodinámico con otros fármacos antidepresivos, como los inhibidores de la recaptación de la serotonina y los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO), pudiendo desarrollar un

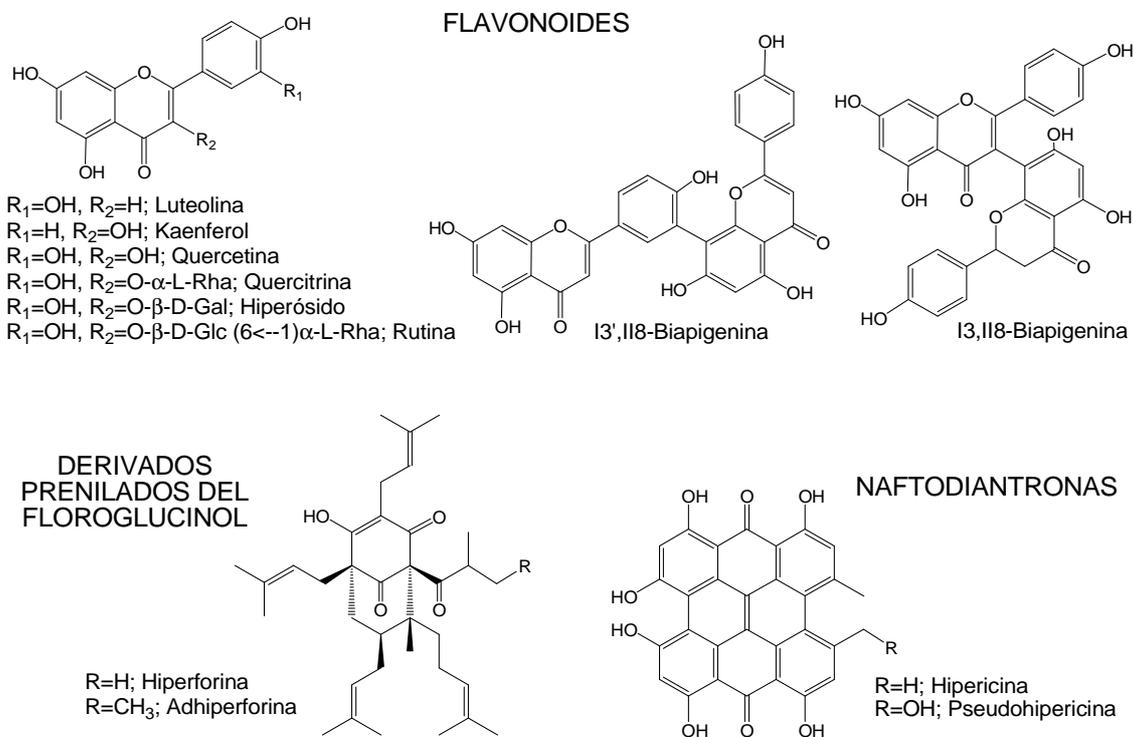
síndrome serotoninérgico por efecto aditivo (Biffignandi y Bilia, 2000; Barnes y cols., 2001; Greeson y cols., 2001; Izzo y Ernst, 2001; Schulz, 2001; Müller, 2003; Paredes Salido y Roca Fernández, 2003; Rodríguez-Landa y Contreras, 2003; Izzo, 2004).

Con respecto al mecanismo de acción del extracto de hipérico en el tratamiento de la depresión, no se conoce con exactitud cuál es, aunque se le atribuye la capacidad de provocar cambios en los niveles de neurotransmisores cerebrales. Se ha observado que inhibe la recaptación de serotonina, noradrenalina y dopamina, y, además, actúa sobre la neurotransmisión mediada por glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA). Asimismo, algunos componentes de la planta inhiben la MAO, pero sus concentraciones en el extracto parecen ser bajas. También se ha estudiado la influencia del extracto de hipérico sobre la expresión de las citocinas estimuladas en sujetos sanos y pacientes con depresión, observándose una marcada inhibición en la liberación de interleucina 6 (IL-6) estimulada, por lo que se cree que el mecanismo de acción podría deberse a una modulación inmunológica en los sistemas neurohormonales (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Barnes y cols., 2001; Greeson y cols., 2001; Gnerre y cols., 2001; Roz y cols., 2002; Müller, 2003; Rodríguez-Landa y Contreras, 2003).

Por lo que se refiere a su composición química, el extracto de hipérico tiene numerosos componentes con actividad biológica, como las naftodiantronas (principalmente hipericina y pseudohipericina), flavonoides libres (quercetina, kaenferol, luteolina), heterósidos de quercetina (rutina, hiperósido, quercitrina), biflavonoides (I3,II8-biapigenina y I3',II8-biapigenina), derivados prenilados del floroglucinol (como hiperforina y adhiperforina), trazas de xantonas, aceite esencial (siendo su principal constituyente el  $\alpha$ -pineno), taninos condensados en muy alta concentración, ácidos fenólicos, diterpenos, triterpenos, carotenoides y esteroides (Fig. 1) (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Nahrstedt y Butterweck, 1997; Schulz y cols., 1998; Buendía Sánchez, 2000; Barnes y cols., 2001; Paredes Salido y Roca Fernández, 2003; Vanaclocha y Cañigüeral, 2003).

De entre estos compuestos destaca la hipericina, que ha sido considerada durante mucho tiempo el compuesto activo de la hierba de San Juan, basándose la posología autorizada en el contenido en este ingrediente (dosis equivalente a 0.2-1 mg diarios de hipericinas totales). Hay que tener en cuenta que la cantidad de hipericina que contiene la planta varía según la parte y las condiciones de cultivo, por lo que los extractos

utilizados en terapéutica deben estandarizarse para contener al menos un 0.3% (Schulz y cols., 1998; Buendía Sánchez, 2000; Barnes y cols., 2001; Çirak y cols., 2007).



**Figura 1.** Compuestos de *Hypericum perforatum*

No obstante, estudios más recientes señalan que la acción del hipérico no sólo se puede explicar por su contenido en hipericina, sino que también otros componentes del hipérico, como los flavonoides y los derivados del floro-glucinol (especialmente la hiperforina) contribuyen a la acción antidepresiva (Butterweck y cols., 1997, 1998, 2000, 2003; Bhattacharya y cols., 1998; Chatterjee y cols., 1998; Barnes y cols., 2001; Nöldner y Schötz, 2002; Müller, 2003; Rodríguez-Landa y Contreras, 2003; Beerhues, 2006; Medina y cols., 2006).

Además de sus efectos a nivel cerebral, se ha estudiado la actividad antibacteriana del hipérico, confirmando su efecto antiséptico (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Barnes y cols., 2001). Asimismo, existe numerosa bibliografía científica sobre su acción citotóxica, antitumoral y antiviral, y sobre todo, la posible efectividad terapéutica de la hipericina en el tratamiento contra el SIDA. De hecho, la hipericina se ha mostrado efectiva en estudios *in vitro* en la inactivación o destrucción

de numerosos retrovirus, entre ellos, el VIH, precursor del SIDA (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Axarlis y cols., 1998; Barnes y cols., 2001). También el hipérico actúa como cicatrizante por vía tópica y ha mostrado acción ansiolítica, analgésica, antiinflamatoria, antiespasmódica y diurética (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Jakovljevic y cols., 2000; Barnes y cols., 2001; Albert y cols., 2002; Flausino y cols., 2002; Mattace Raso y cols., 2002; Šavikin y cols., 2007).

Aunque el *H. perforatum* es la especie medicinal más estudiada y la que tiene mayor interés en la actualidad al ser utilizada en terapéutica, existen otras especies de hipérico que están siendo investigadas, habiéndose encontrado propiedades antimicrobianas, antioxidantes, cicatrizantes, analgésicas, antiinflamatorias y/o antidepresivas para otras especies de *Hypericum*, como por ejemplo *H. androsaemum*, *H. barbatum*, *H. brasiliense*, *H. calycinum*, *H. caprifoliatum*, *H. cordatum*, *H. drummondii*, *H. empetrifolium*, *H. hircinum*, *H. hirsutum*, *H. hyssopifolium*, *H. patulum*, *H. richeri*, *H. rumeliacum* subsp. *apollinis*, o *H. triquetrifolium*, entre otras (Decosterd y cols., 1991; Jayasuriya y cols., 1991; Rocha y cols., 1995; Öztürk y cols., 1996, 2002; Apaydin y cols., 1999; Daudt y cols., 2000; Mukherjee y cols., 2000, 2001; Pistelli y cols., 2000; Gnerre y cols., 2001; Trovato y cols., 2001; Riel Mendes y cols., 2002; Cakir y cols., 2003; Couladis y cols., 2003; Heilmann y cols., 2003; Viana y cols., 2005; Šavikin y cols., 2007).

### **2.1.1. EL GÉNERO *HYPERICUM* EN CANARIAS: *HYPERICUM GRANDIFOLIUM* CHOISY**

En Canarias se localizan diferentes especies del género *Hypericum*, incluyendo varios endemismos. Varias especies de este género fueron introducidas en las Islas Canarias: *Hypericum perforatum* L. (Secc. *Hypericum*) e *Hypericum perforatum* L. (Secc. *Drosocarpium*), presentando ambas carácter invasor. Además, el *Hypericum humifusum* L. (Secc. *Oligostema*) también podría haber sido introducido (Robson, 1977; Kunkel, 1991). Entre las especies endémicas tenemos al *Hypericum canariense* L. (Secc. *Webbia*), el *Hypericum coadunatum* Chr. Sm. (Secc. *Adenosepalum*), *Hypericum glandulosum* Ait. (Secc. *Adenosepalum*) y el *Hypericum reflexum* L. fil. (Secc. *Adenosepalum*) (Robson, 1977; Kunkel, 1991; Bramwell y Bramwell, 2001).

Por lo que respecta al *Hypericum grandifolium* Choisy (Secc. *Androsaemum*), conocido popularmente como el “maljurado” o “malforado” (imagen 1), es un

endemismo de Madeira y Canarias que se encuentra en todas las islas de este archipiélago. Se trata de un pequeño arbusto glabro con ramas levantadas o colgantes que apenas sobrepasa 1 m de altura, sus hojas anchamente ovaladas y subsésiles miden hasta 8 cm de largo) y tiene vistosas flores terminales de color dorado-amarillo que alcanzan de 4 a 5 cm de diámetro (Robson, 1977; Kunkel, 1991; Bramwell y Bramwell, 2001).



*Imagen 1. Hypericum grandifolium Choisy*

En cuanto a sus usos populares, hay que señalar que las sumidades floridas, hojas y frutos de varias de estas especies del género *Hypericum* han sido utilizadas en la medicina popular canaria en forma de infusión, cataplasma o cocidas para el tratamiento de heridas externas así como sedantes, diuréticos, vermífugos, antihistéricos y antidepresivos. En concreto, la planta entera, las flores y el fruto del *Hypericum grandifolium* se han utilizado en zumo, infusión y cataplasma por sus propiedades cicatrizantes, sedantes, antihistéricas, hipocolesterolémicas y pectorales (Darias y cols., 1986, 1989; Pérez de Paz y Hernández-Padrón, 1999).

En anteriores estudios realizados por el grupo de investigación del que ahora formo parte se ha encontrado que los extractos metanólicos y las fracciones clorofórmicas y/o butanólicas obtenidas de la sumidades floridas de *H. canariense*, *H. glandulosum*, *H. grandifolium* e *H. reflexum* mostraron buena actividad antibacteriana frente a bacterias Gram (+), resultados que corroboran el uso popular de estas plantas como cicatrizantes (Herrera y cols., 1996; Rabanal y cols., 2002). Asimismo, se demostró que las infusiones y los extractos metanólicos de estas cuatro especies presentaban actividad antidepresiva en el test de Porsolt en ratones, sin producir sedación ni efectos anticolinérgicos (Prado y cols., 2002; Sánchez-Mateo y cols., 2002). Más recientemente, hemos podido evidenciar las propiedades antidepresivas de diferentes fracciones obtenidas del extracto metanólico de *H. canariense*, *H. glandulosum* e *H. reflexum* (Sánchez-Mateo y cols., 2005, 2007), así como las actividades analgésicas y antiinflamatorias de estas especies (Rabanal y cols., 2005; Sánchez-Mateo y cols., 2006a).

Con respecto a la fitoquímica de estas especies, hasta el momento no se han llevado a cabo estudios detallados. En estudios preliminares llevados a cabo en nuestro grupo se confirma la existencia de antraquinonas, flavonoides y taninos en *H. canariense*, *H. glandulosum*, *H. grandifolium* e *H. reflexum*. Asimismo dieron positivas las reacciones de identificación de saponinas para todos ellos, menos para *H. canariense* (Sánchez-Mateo y cols., 2006b).

## **2.2. FLAVONOIDES**

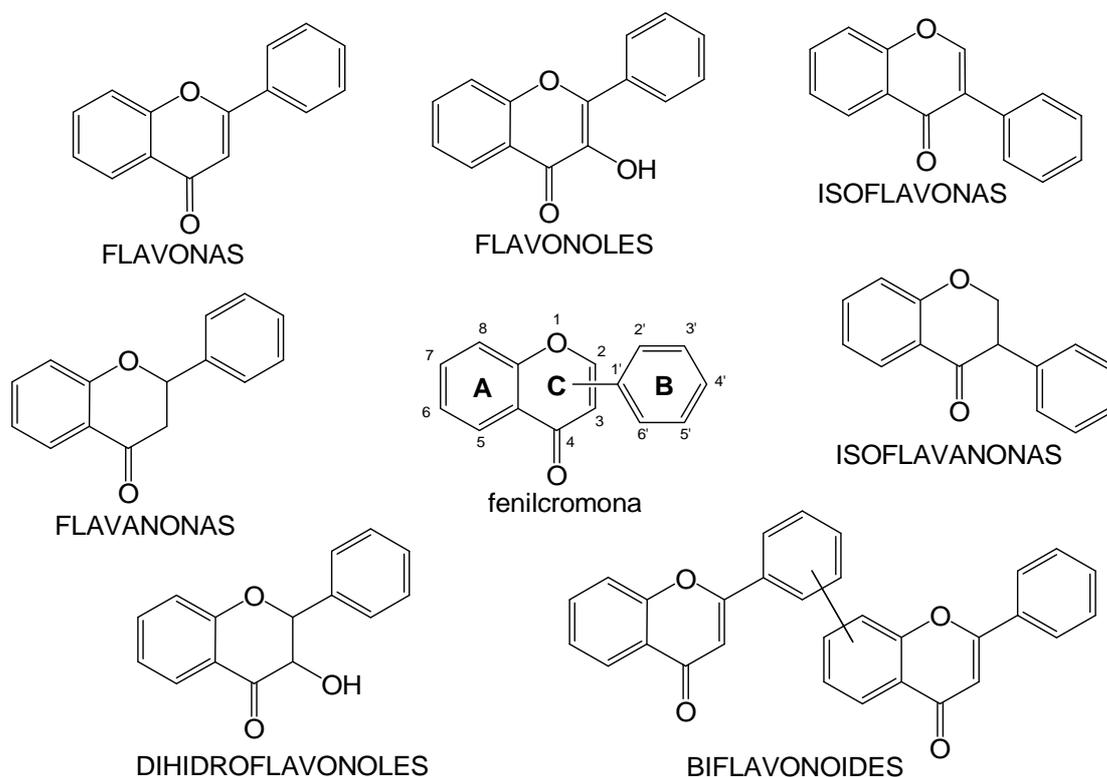
Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios que se distribuye en las plantas vasculares de manera ubicua (Di Carlo y cols., 1999), siendo las rutáceas, poligonáceas, asteráceas y apiáceas las principales familias que los contienen. Abundan, sobre todo, en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol ya que la luz solar favorece su síntesis (López Luengo, 2002). En los órganos en los que están presentes (frutos, hojas, flores y cortezas) actúan como copigmentos o como responsables directos de la coloración de los mismos (Bruneton, 2001a).

Se trata de compuestos polifenólicos que se caracterizan por poseer un mismo elemento estructural, conocido como encadenamiento diaril-propánico, fenilcromano o benzopiránico. Esta estructura es del tipo Ar-C<sub>3</sub>-Ar o bien C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, lo que viene a decir que: C<sub>6</sub> son anillos bencénicos (anillo A y anillo B) unidos entre sí a través de una

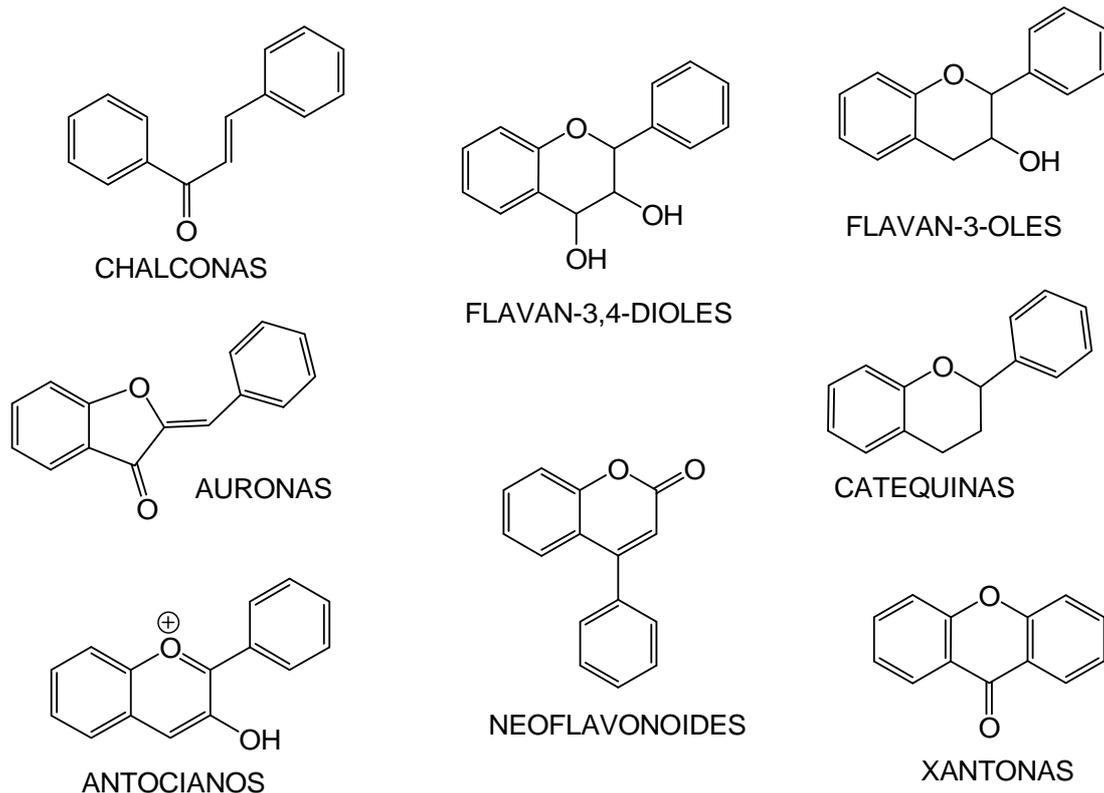
cadena de 3 átomos de carbono que puede formar o no un tercer anillo pirano o pirona (anillo C) (Fig. 2).

Atendiendo a lo anteriormente expuesto los compuestos flavónicos se pueden clasificar en dos grupos, los flavonoides “propriadamente dichos” y los compuestos relacionados con ellos. Los flavonoides propriadamente dichos se caracterizan por poseer un núcleo fenilcromona (fenil-benzo- $\gamma$ -pirona), y dependiendo de la posición del anillo fenólico B, se subdividen en compuestos 2-fenilcromona (flavonoides) y compuestos 3-fenilcromona (isoflavonoides) (Fig. 2). A su vez, estos compuestos dan origen a las flavanonas e isoflavanonas por hidrogenación del anillo C. Asimismo, la hidroxilación del carbono 3 en la serie de las 2-fenilcromonas da lugar a los flavonoles y a los flavanonoles (2,3-dihidroflavonoles) (Fig. 2).

Por otro lado, entre los compuestos relacionados a los flavonoides podemos incluir a las catequinas, flavan-3-oles, flavan-3,4-dioles, antocianos, chalconas, auronas, xantonas y los neoflavonoides (Fig. 3).



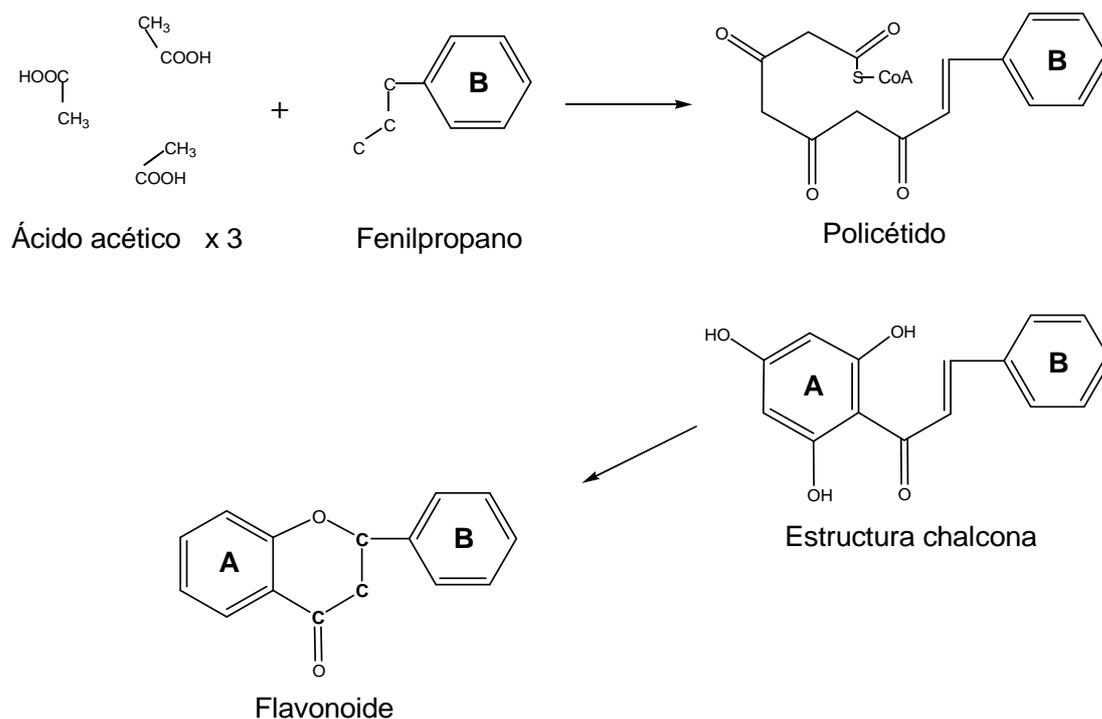
**Figura 2.** Estructura básica de los flavonoides “propriadamente dichos”



**Figura 3.** Estructura básica de los compuestos relacionados a los flavonoides

Estas estructuras pueden encontrarse en los vegetales tanto en forma libre (geninas o agliconas) como en forma de O- y C-heterósidos, que es lo más frecuente (López Luengo, 2002; Álvarez Castro y Orallo Cambeiro, 2003a). En los heterósidos la parte osídica puede ser mono-, di- o trisacáridica. Los monósidos se forman con D-glucosa, D-galactosa o D-alosa, con pentosas (D-apiosa, L-arabinosa, L-ramnosa, D-xilosa) o con los ácidos D-glucurónico y D-galacturónico. Asimismo, los flavonoides pueden unirse entre sí formando dímeros, conocidos como biflavonoides (Fig. 2). Estas uniones se producen sobre todo por sus carbonos C-6 o C-8, que son especialmente reactivos (Bruneton, 2001a).

Los flavonoides proceden de una ruta biosintética mixta: de los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos, mientras que el B y la unidad C<sub>3</sub> proceden de la ruta del ácido shikímico (Fig. 4) (López Luengo, 2002; Álvarez Castro y Orallo Cambeiro, 2003a). En todas las clases de flavonoides anteriormente mencionados, la biosíntesis justifica la frecuente presencia de al menos tres hidroxilos fenólicos en C-5, C-7 y C-4' de la genina. Sin embargo, alguno de ellos puede faltar (Bruneton, 2001a).



**Figura 4.** Biogénesis de los flavonoides

Por lo que respecta a sus características físico-químicas, se trata de sólidos cristalinos de color blanco o amarillento que presentan todos los matices de solubilidad. Generalmente, los flavonoides libres son solubles en disolventes orgánicos de distintas polaridades dependiendo de su grado de oxigenación y escasamente solubles en agua, mientras que sus heterósidos son solubles en agua caliente, alcoholes y disolventes orgánicos de alta polaridad. Cuando contienen fenoles libres se disuelven en disoluciones de hidróxidos alcalinos. La alta reactividad de estos grupos fenólicos permite el establecimiento de puentes de hidrógeno o uniones covalentes, su intervención en reacciones de oxidación y reducción como reductores o la formación de complejos con iones metálicos como el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) y el hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Bruneton, 2001a; López Luengo, 2002; Álvarez Castro y Orallo Cambeiro, 2003a).

Las propiedades físico-químicas arriba descritas afectan de manera trascendental a la extracción, caracterización, valoración y acción farmacológica de los flavonoides. En este sentido, los procesos extractivos seguidos para su obtención dependerán de la polaridad de los mismos. Para la caracterización de estos compuestos se utilizan técnicas basadas en la presencia de grupos fenólicos o en la presencia del núcleo fundamental de cromona. Los grupos fenólicos de los flavonoides hacen que al añadirles álcalis (NaOH, KOH) se produzca una coloración amarilla o la intensificación

del color de la disolución inicial de la droga. Igualmente, la adición de sales metálicas como  $\text{FeCl}_3$  o  $\text{AlCl}_3$  da lugar a una coloración verde o a una fluorescencia amarillo intensa a la luz ultravioleta, respectivamente. Dentro de las reacciones que caracterizan el anillo de cromona destaca la de la cianidina (Bruneton, 2001a).

En cuanto a los métodos clásicos de valoración de los flavonoides, éstos son, sobre todo, colorimétricos o espectrofotométricos (ej.: medida de la absorbancia después de la reacción con  $\text{AlCl}_3$ ). La cromatografía en capa fina con reveladores específicos también permite, en ciertos casos, conocer el perfil flavónico de un extracto, si bien es la cromatografía líquida de alta resolución quien ofrece en la actualidad la posibilidad de una valoración rápida y precisa de todos los flavonoides presentes en una droga (Wagner y cols., 1984; Bruneton, 2001a).

### **2.2.1. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA**

Los flavonoides destacan desde el punto de vista farmacológico por su baja toxicidad y por presentar numerosos efectos biológicos y actividades terapéuticas (López Luengo, 2002).

Desde el punto de vista de sus propiedades biológicas, numerosos estudios *in vitro* ponen de manifiesto que estos compuestos tienen efectos antioxidantes, reducen la formación de radicales libres, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas (López Luengo, 2002). Asimismo, estudios *in vivo* demuestran que los flavonoides potencialmente presentan numerosas actividades farmacológicas, destacando las acciones protectora vascular, antiaterogénica, antianginosa, antitumoral, analgésica, antiinflamatoria, antialérgica, antiulcerosa y hepatoprotectora, entre otras (Bruneton, 2001a; López Luengo, 2002; Zaragoza García y cols., 2002; Álvarez Castro y Orallo Cambeiro, 2003a, 2003b). En la tabla 1 se hace un resumen de algunos de los efectos farmacológicos mostrados por diferentes flavonoides en humanos y animales (Di Carlo y cols., 1999; Guardia y cols., 2001; Sánchez de Medina y cols., 2002; Ueda y cols., 2002; Das y cols., 2003; Morikawa y cols., 2003; Rotelli y cols., 2003; Comalada y cols., 2005; Kaur y cols., 2005; Meotti y cols., 2006; Orhan y cols., 2006).

En general, los flavonoides presentan una marcada actividad sobre el sistema vascular con efecto protector sobre la pared de los vasos, particularmente sobre la pared

de los capilares, produciendo una disminución de la permeabilidad y aumento de la resistencia de los mismos (López Luengo, 2002). Estudios llevados a cabo en humanos, demuestran que la citrina (mezcla de hesperidina y eriodictiol glucósido) es capaz de normalizar la resistencia vascular alterada por distintas patologías. Igualmente, el O-( $\beta$ -hidroxietil)-rutósido permite restaurar los parámetros hemorreológicos alterados por la insuficiencia venosa crónica. A pesar de que los mecanismos exactos de acción responsables de estos efectos continúan sin esclarecerse, se ha postulado que podrían deberse a la acción que ejercen algunos flavonoides sobre las plaquetas, leucocitos y enzimas de la coagulación sanguínea (Di Carlo y cols., 1999).

**Tabla 1.** Potenciales efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales

ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS	COMPUESTOS
<b>Analgésica</b>	Quercetina, hesperidina, miricitrina, 5,7-dimetoxi-flavanona-4'-O-[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopiranosido, 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona-4-O- $\beta$ -D-glucopiranosido
<b>Antialérgica</b>	Quercetina
<b>Antiaterogénica</b>	Quercetina
<b>Anticancerígena</b>	Baicaleína, epigallocatequina, kaenferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, nobiletina, quercetina, rutina, tangeretina, tricina, woogonina
<b>Antidiabética</b>	Quercetina
<b>Antidiarréica</b>	Apigenina, kaenferol, morina, miricetina, naringenina, quercetina, quercitrina
<b>Antihepatotóxica</b>	Gosipina, hispidulina, hidroxietilrutósido, kolavirona, quercetina, silimarina
<b>Antiinflamatoria</b>	Apigenina, crisina, gosipina, hibrifolina, hipolaetina-8- $\beta$ -D-glucósido, luteolina, miricetina, nepetina, quercetina, quercitrina, rutina, sidertoflavonona
<b>Antiosteoporótica</b>	Ipriflavona
<b>Antiespasmódica</b>	Apigenina, crisina, kaenferol, quercetina
<b>Antiulcerosa</b>	Hipolaetina-8-glucósido, kaenferol, quercetina, rutina, solona, naringina
<b>Protector Vascular</b>	Antocianidina, citrina, rutósido

Asimismo, ensayos *in vitro* realizados sobre arterias aisladas de animales de experimentación demuestran la existencia de flavonoides con acción relajante sobre el músculo liso vascular. Uno de ellos es la *salvigenina*, cuya actividad vasorrelajante se encuentra estrechamente relacionada con el endotelio, presumiblemente con la

liberación de óxido nítrico y prostaciclina (Álvarez Castro y Orallo Cambeiro, 2003b; Uydes-Dogan y cols., 2005). No obstante, conviene señalar que determinadas moléculas de estructura flavonoide han mostrado una acción bifásica sobre los vasos sanguíneos: vasoconstrictora a las concentraciones activas más bajas y vasodilatadora a concentraciones mayores. Este es el caso de aquellos compuestos con una triple sustitución hidroxílica en posiciones contiguas de los anillos A o B, como la baicaleína y la miricetina (Álvarez Castro y Orallo Cambeiro, 2003b).

También han sido descritas las propiedades antiagregantes plaquetarias de algunos de estos compuestos, como la apigenina, crisina y floretina, considerándose la inhibición de la ciclooxigenasa y el consiguiente aumento de los niveles intracelulares de AMP cíclico los principales mecanismos implicados en dicha actividad (Di Carlo y cols., 1999).

Por otra parte, muchos flavonoides poseen propiedades antiinflamatorias como consecuencia de sus interacciones *in vitro* con los polinucleares y los trombocitos o con el metabolismo del ácido araquidónico (Bruneton, 2001a). Este es el caso de la miricetina y la quercetina que, a concentraciones relativamente altas, son capaces de bloquear *in vitro* los mecanismos de acción de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, mientras que a concentraciones bajas inhiben sólo la acción de la lipoxigenasa (Di Carlo y cols., 1999). Estas propiedades antiinflamatorias también se han demostrado *in vivo* para numerosos flavonoides en distintos modelos de inflamación aguda y/o crónica. Entre ellos cabe mencionar: la nepetina, apigenina, rutina, quercetina, quercitrina y luteolina (Di Carlo y cols., 1999; Guardia y cols., 2001; Sánchez de Medina y cols., 2002; Ueda y cols., 2002; Das y cols., 2003; Morikawa y cols., 2003; Rotelli y cols., 2003; Comalada y cols., 2005).

Algunos flavonoides (como naringina y quercetina) no sólo presentan buena actividad antiinflamatoria sino que además protegen la mucosa gástrica frente a una gran variedad de agentes ulcerogénicos, combinación que resulta de interés terapéutico si recordamos que uno de los principales efectos secundarios de los fármacos antiinflamatorios convencionales es su actividad ulcerogénica (Martin y cols., 1993; Di Carlo y cols., 1999). Esta acción gastroprotectora puede ser explicada, en parte, mediante un complejo mecanismo no prostaglandino-dependiente que implicaría aumentos en el contenido de glicoproteína y de la viscosidad del gel mucosal gástrico

(Martin y cols., 1994). Otros mecanismos implicados en esta acción son: captación de radicales libres, actividad antioxidante, estimulación de prostaglandinas, inhibición de la producción de leucotrienos o del factor activador de plaquetas (PAF) (Alarcón de la Lastra y cols., 1994; Izzo, 1996). Asimismo, los flavonoides flavona, flavanona y quercetina inhiben el crecimiento de *Helicobacter pylori* y la formación de ácido por las células parietales en respuesta a la estimulación por histamina y dibutiril AMP cíclico (Beil y cols., 1995).

Por otro lado, algunos flavonoides, como quercetina, hesperidina y miricitrina, ejercen actividad analgésica en diversos modelos de experimentación animal, aunque el mecanismo de acción continúa sin esclarecerse (Di Carlo y cols., 1999; Kaur y cols., 2005; Meotti y cols., 2006). Asimismo, existen datos que señalan la capacidad de la quercetina para revertir el desarrollo de tolerancia y dependencia a la morfina mediante un mecanismo que podría estar mediado por la inhibición de la actividad óxido nítrico sintasa (Singh y cols., 2002; Naidu y cols., 2003).

En cuanto a sus efectos sobre el sistema nervioso central, experiencias realizadas con animales presentan a los flavonoides como posibles agentes neuroprotectores. Este efecto protector se ha asociado a sus propiedades antioxidantes, captadoras de radicales libres e inhibidoras de la peroxidación lipídica y de la xantina oxidasa (Zaragoza García y cols., 2002; Schmitt-Schillig y cols., 2005). También se ha demostrado que algunos flavonoides (como crisina, apigenina o cirsilinol) tienen actividad ansiolítica, observándose que no sólo actúan como ligandos de los receptores benzodiazepínicos sino que también dan resultados favorables en modelos animales (Paladini y cols., 1999). Asimismo se ha atribuido a la presencia de flavonoides, tales como el hiperósido, isoquercitrina y miquelianina, parte de la actividad antidepresiva mostrada por el hipérico (*Hypericum perforatum* L., Hipericaceae) (Butterweck y cols., 2000).

Además de las actividades anteriormente comentadas, se han encontrado otras propiedades para los flavonoides, como son: propiedades hepatoprotectoras (isobutrina, hispidulina, flavanolignanos, silimarina), antiespasmódicas (apigenina, quercetina, kaenferol), hipocolesterolemiantes (liquiritigenina), diuréticas (hesperidina), antibacterianas (quercetina, rutina, crisina, *salvigenina*), antivirales *in vitro* (rutina, dihidroquercetina, 3-hidroxi y 3-metoxiflavonas no heterosídicas), antitumorales *in vitro* (tangeretina, nobiletina), entre otras. Además, algunos estudios recientes sugieren que

las isoflavonas disminuyen los síntomas de la menopausia (sofocos, etc.) y disminuyen el riesgo de desarrollo de osteoporosis (Di Carlo y cols., 1999; Ragasa y cols., 1999; Narayana y cols., 2001; Bruneton, 2001a; Zaragoza García y cols., 2002).

Por último, hay que señalar que la inhibición que ejercen los flavonoides sobre numerosos enzimas (responsable de algunas de sus propiedades terapéuticas) también puede dar lugar a distintas interacciones farmacológicas. Así, los flavonoides modulan la actividad de las citocromo P<sub>450</sub> monooxigenasas, enzimas implicados en la farmacocinética de numerosos medicamentos. Por ello, no es de extrañar que con frecuencia se produzcan interacciones por la administración simultánea de flavonoides con fármacos que sufran este metabolismo, produciéndose un aumento de la toxicidad del propio fármaco o bien una disminución de su efecto terapéutico. Entre los flavonoides capaces de estimular al CYP 3A4 aparece la tangeretina, mientras que silimarina o la biapigenina actúan como inhibidores (Ho y Saville, 2001; Zaragoza García y cols., 2002).

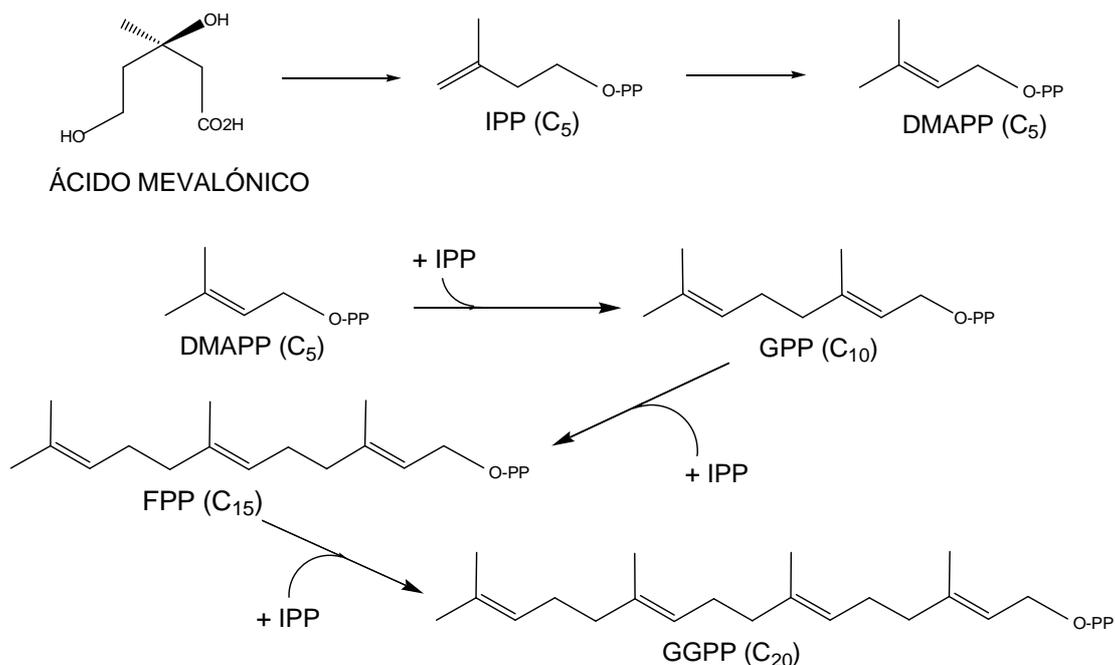
### **2.3. TERPENOS: DITERPENOS**

Los terpenos son un amplio grupo de compuestos que se caracterizan por estar formados por la unión de unidades pentacarbonadas ramificadas relacionadas con el 2-metil-1,3-butadieno (isopreno) (Bruneton, 2001b). Según formen parte de su esqueleto hidrocarbonado, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 8 unidades pentacarbonadas (C<sub>5</sub>), los terpenos se clasifican en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos y tetraterpenos, respectivamente (Wagner y Elmadfa, 2003).

Estos compuestos derivan biogénicamente del ácido mevalónico, el cual, mediante una serie de reacciones orgánicas clásicas catalizadas por enzimas, va a dar lugar a los precursores de los principales tipos de terpenos. Ejercen la función de precursores diferentes ésteres pirofosfóricos de alcoholes en (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, formados por la adición secuencial de una unidad en C<sub>5</sub>, el pirofosfato de isopentenilo (IPP), sobre una molécula estárter. El pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), formado a partir del IPP por isomerización, es el primer término de la serie. La condensación mediante unión “cabeza-cola” de estos dos últimos compuestos origina el geranilpirofosfato (GPP), precursor de monoterpenos. El acoplamiento al GPP de nuevas unidades de IPP origina moléculas de mayor peso molecular, incrementándose el número de carbonos de cinco

en cinco: sesquiterpenos, diterpenos y así sucesivamente. Como puede observarse en la figura 5, las sucesivas moléculas estérter son: el farnesilpirofosfato (FPP), precursor de sesquiterpenos, el geranilgeranilpirofosfato (GGPP), precursor de diterpenos y el geranilfarnesilpirofosfato (GFPP), precursor de sesterterpenos. Los triterpenos y tetraterpenos provienen del escualeno y del fitoeno, quienes a su vez provienen de la unión “cola-cola” de dos moléculas de FPP y dos moléculas de GGPP, respectivamente (Bruneton, 2001b).

No obstante, conviene recordar que existe un número reducido de casos en los que la regla isoprénica parece no ser respetada. Es el caso, por ejemplo, de los monoterpenos “irregulares”, los cuales son el producto del acoplamiento de dos unidades de DMAPP según un mecanismo análogo al que da lugar a triterpenos y carotenos (Bruneton, 2001b).



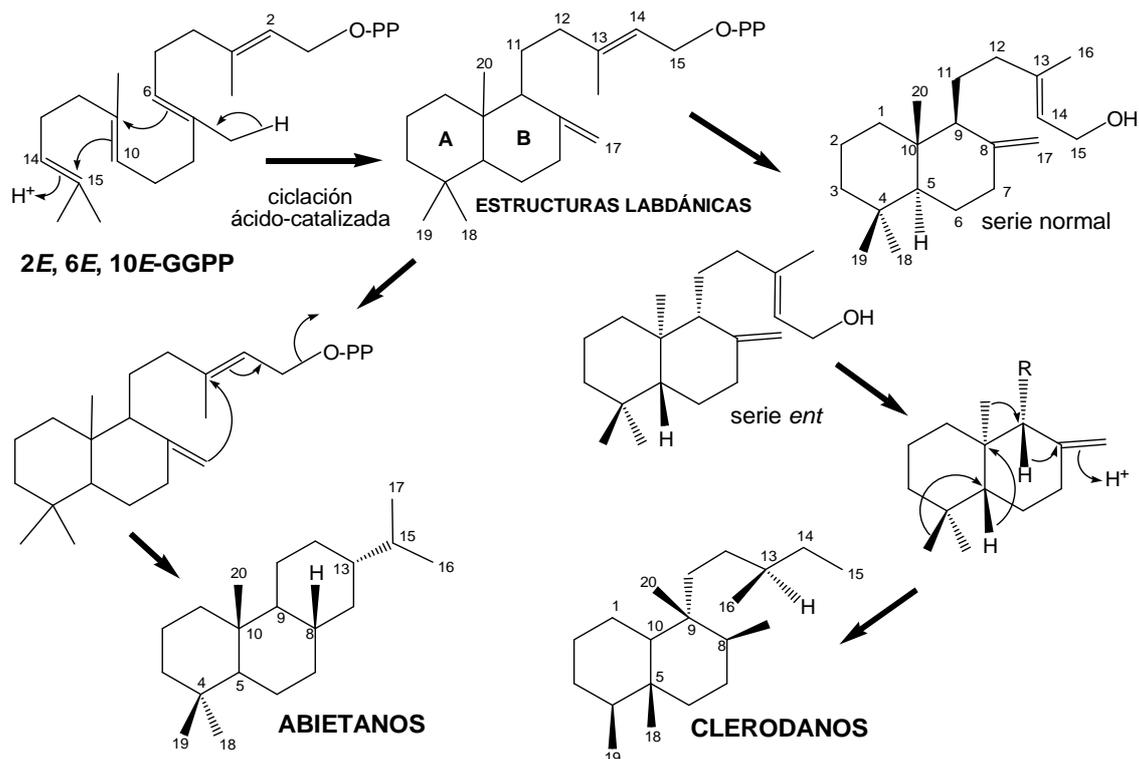
**Figura 5.** Formación de precursores de terpenos.

Aunque la inmensa mayoría de los terpenos son compuestos específicos del reino vegetal (metabolitos secundarios), también pueden encontrarse en los animales (como por ejemplo los diterpenos de organismos marinos). En la naturaleza, participan en casi todas las interacciones entre plantas y animales, plantas y plantas o plantas y microorganismos, actuando como fitoalexinas, antialimentarios de insectos o agentes de defensa (Bruneton, 2001b; Wagner y Elmadfa, 2003).

En la presente Tesis Doctoral, dentro del grupo de los compuestos terpénicos, se abordará exclusivamente la evaluación farmacológica de diterpenos con esqueleto *neo*-clerodano y abietano. Por ello, centraremos la atención en la descripción de este tipo de compuestos.

Los **diterpenos** son compuestos caracterizados por poseer una estructura básica de 20 carbonos y proceder del precursor *2E, 6E, 10E*-geranilgeranilpirofosfato (GGPP), presentando una gran variabilidad estructural. En una primera instancia, los diterpenos pueden dividirse en dos grandes grupos, compuestos acíclicos y compuestos ciclados (Bruneton, 2001b). Los compuestos acíclicos son los menos frecuentes, pudiendo ser lineales o poseer un ciclo lactónico o éter. Por su parte, los diterpenos ciclados son clasificados a su vez en: bicíclicos (labdanos y clerodanos), tricíclicos (pimaranos, isopimaranos, abietanos, casanos y rosanos), tetracíclicos (kauranos, atisiranos, beyeranos y giberelinas) y pentacíclicos (traquilobanos). También se incluyen en este grupo los diterpenos macrocíclicos como los cembrenos, casbenos o taxanos y los diterpenos miscelaneos briarano y vibsano (De las Heras y cols., 2003).

Esta establecido que tanto los clerodanos como los abietanos derivan de estructuras labdánicas formadas a través de una ciclación ácido-catalizada del GGPP (formación de los ciclos A y B) (Fig. 6). Este tipo de ciclación conduce a dos series enantioméricas que difieren por las configuraciones opuestas de los carbonos C-5, C-9 y C-10. La serie se llama “ent” (enantio) cuando la fusión de los ciclos A y B es antípoda a la de los esteroides y “normal” cuando es idéntica, aunque habitualmente se omite el prefijo “normal” (ej.: labdano y *ent*-labdano) (Bruneton, 2001b). Los clerodanos son el resultado de un reagrupamiento tipo *friedo* de estas estructuras labdánicas; en concreto, los *neo*-clerodanos son formados a partir de la serie *ent* de las mismas. En los abietanos, se produce la formación de un tercer ciclo y un reagrupamiento posterior (Bruneton, 2001b; Domínguez y cols., 1998) (Fig. 6).



**Figura 6.** Esquema de la biogénesis de los esqueletos de clerodano y abietano

Los diterpenos clerodánicos constituyen un grupo de sustancias aisladas de plantas superiores, de microorganismos y de organismos marinos. De los cerca de 900 diterpenos clerodánicos conocidos hasta ahora, unos 750 se han aislado de plantas superiores, especialmente de los géneros *Ajuga*, *Leonurus*, *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* y *Teucrium*, pertenecientes a la familia Labiatae (Merritt y Ley, 1992). En concreto, el género *Teucrium* es la fuente natural más abundante de diterpenoides *neo*-clerodanos y 19-*nor*-*neo*-clerodanos (Rodríguez y cols., 1994; Domínguez y cols., 1998).

Estos compuestos han atraído el interés en los últimos años por sus llamativas estructuras químicas y su actividad biológica frente a algunas plagas que causan importantes pérdidas económicas (Rodríguez y cols., 1996; Domínguez y cols., 1998; Klein Gebbinck y cols., 2002). Sin embargo y como a continuación veremos, también se les han atribuido interesantes actividades farmacológicas.

### 2.3.1. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LOS DITERPENOS

El interés farmacológico de los diterpenos está fuera de toda duda, si recordamos que dentro de este grupo se encuentran los diterpenos tricíclicos del género *Taxus* y sus derivados (paclitaxel o Taxol® y docetaxel o Taxotere®), utilizados actualmente en

terapéutica en el tratamiento de algunos tipos de cáncer por su acción antimetabólica (Bruneton, 2001b; Wagner y Elmadfa, 2003).

Además de estos compuestos, existen otros diterpenos que presentan interesantes actividades farmacológicas que los convierten en potenciales agentes terapéuticos. Así, podemos mencionar las propiedades antihipertensivas del ácido labd-8(17)-en-15-oico y de la forskolina, la antiagregante plaquetaria del carnosol y de los ácidos pimárico y levopimárico, así como el interés de las quinonas diterpénicas de *Salvia miltiorrhiza* Bunge en el tratamiento de diversas afecciones del miocardio (Bruneton, 2001b; Ambrosio y cols., 2006; Lee y cols., 2006; Lahlou y cols., 2007).

También se han encontrado otras propiedades farmacológicas para estos compuestos, entre las que destacan las propiedades antirretrovirales de la prostratina, antitumorales de la oridonina y la lasiokaurina (Bruneton, 2001b), antimicrobianas de la salvipimarona, antiparasitarias del ácido kaurenico frente al *Trypanosoma cruzi* (Ambrosio y cols., 2006), antiinflamatorias de numerosos diterpenos obtenidos de la familia Lamiaceae (como la tanshinona IIA y el borjatriol aislados de los géneros *Salvia* y *Sideritis*, respectivamente) (Alcaraz y cols., 1989; Jang y cols., 2006), además de las propiedades analgésicas y gastroprotectoras del ácido centipédico (Guedes y cols., 2002).

Con respecto a los **diterpenos de tipo clerodano**, algunos de ellos han presentado diversas actividades, destacando las propiedades antiulcerogénicas, antitumorales, citotóxicas y las antiinflamatorias (Alcaraz y Ríos, 1991; Lewis y Hanson, 1991). A continuación resumiremos algunas de estas acciones.

El cordatin ha mostrado tener efectos antiulcerogénicos en distintos modelos animales basados en la inducción de la lesión gástrica (Hiruma-Lima y cols., 2000). Por su parte, el *trans*-dehidrocrotonin, además de tener propiedades antiulcerogénicas (que parecen estar relacionadas con sus acciones antisecretoras y gastroprotectoras), posee actividad antitumoral y citotóxica frente a células de carcinoma de Ehrlich (Souza-Brito y cols., 1998; Grynberg y cols., 1999). El *trans*-crotonin se mostró como agente citotóxico en el mismo estudio (Grynberg y cols., 1999).

También se ha puesto de manifiesto que algunos de estos compuestos presentan acción antiinflamatoria, como la *teucrina A*, *19-acetilgnafalina* y *eriocefalina*, los

cuales manifestaron *in vitro* un efecto inhibitor de la enzima 5-lipoxigenasa (5-LOX) ya que redujeron de forma significativa la liberación de leucotrienos B<sub>4</sub>, sin modificar la actividad de la ciclooxigenasa ni la producción de óxido nítrico (De las Heras y cols. 2001).

Por último, se debe señalar que algunos diterpenos de tipo clerodano pueden producir efectos indeseables. Así, los diterpenos clerodanos de la especie *Teucrium chamaedrys* L., y en especial la *teucrina A*, son considerados responsables de la acción hepatotóxica de esta planta, atribuyéndose la responsabilidad directa de esta toxicidad a su anillo furánico, quien es oxidado por el isoenzima 3A4 del citocromo P<sub>450</sub> (CYP 3A4) a un epóxido reactivo capaz de estimular proteínas tales como la CYP 3A y la epóxido hidrolasa (Zhou y cols., 2004). Asimismo, se han puesto de manifiesto las marcadas acciones psicotomiméticas y disfóricas del *neo-clerodano* salvinatorina A, diterpeno activo de la especie *Salvia divinorum*, lo cual limita su posible utilidad como potente y selectivo agonista de receptores opioides  $\kappa$  (Yan y Roth, 2004; Prisinzano, 2005).

Por otra parte, también han sido evaluados farmacológicamente diferentes **diterpenos de tipo abietano**. Uno de ellos, el ferruginol, ha presentado propiedades antioxidantes, antitumorales, gastroprotectivas y cardioactivas (Ulubelen y cols., 2002; Iwamoto y cols., 2003; Schmeda-Hirschmann y cols., 2003; Rodríguez y cols., 2006). Otros compuestos presentan otras importantes actividades como las antimicrobianas y antiproliferativas mostradas por el coleon U y la 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxiroileanona (Gaspar-Marques y cols., 2002, 2006), las antiinflamatorias *in vitro* del 11,12-dihidroxi-6-oxo-8,11,13-abietatrieno (De las Heras y cols., 2001) o las antiplasmodiales y citotóxicas *in vitro* del (+)-8,11,13-totaratrieno-12,13-diol y el (+)-8,11,13-abietatrien-12-ol (Clarkson y cols., 2003).

Por lo que se refiere a la *aetiopinona*, diterpeno naftoquinónico de tipo abietano que ocupa nuestro estudio, numerosos trabajos han puesto de manifiesto que actúa como potencial agente terapéutico a diferentes niveles.

Hernández-Pérez y cols. (1995) demostraron que este compuesto exhibía efectos analgésicos a nivel periférico y central, así como efectos antiinflamatorios en el edema inducido por carragenina y tetradecanoil-forbol-acetato en roedores. En trabajos

posteriores se demostró que su actividad antiinflamatoria parece estar relacionada con la inhibición de la enzima 5-LOX (Benrezzouk y cols., 2001; De las Heras y cols., 2001).

Por otra parte, también se ha logrado evidenciar su actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+), así como su actividad citotóxica *in vitro* sobre células KB de carcinoma humano (Hernández-Pérez y cols., 1999). Recientemente, ha sido confirmada esta actividad citotóxica frente a células de leucemia HL-60 y NALM-6 normales y células HL-60 resistentes a los fármacos. Todo esto, unido a su capacidad de inducir la apoptosis de manera dependiente del tiempo y de la concentración, parece indicar que *aetiopinona* podría jugar un papel importante en el tratamiento de cánceres humanos, especialmente en casos de resistencia a fármacos (Rozalski y cols., 2006).

### ***3. MATERIAL Y MÉTODOS***

### **3.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *HYPERICUM GRANDIFOLIUM CHOISY***

#### **3.1.1. RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA DROGA**

Con el fin de que el estudio químico y farmacológico de un determinado material vegetal sea reproducible, dicho material debe ser sometido a una serie de operaciones preliminares. Estas operaciones incluyen la identificación botánica, selección de la parte del vegetal a extraer, evitar la transformación química de sus componentes, etc.

En el presente trabajo, se recogieron las partes aéreas en flor de la especie *Hypericum grandifolium* Choisy, en Pedro Álvarez (Tenerife) en su época de floración, depositándose una muestra de la misma en el Herbario del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia (TFC n 42213). El material vegetal fue desecado en una estufa a una temperatura de aproximadamente 40 °C con libre circulación de aire y sometido a posterior trituración en un molino para así facilitar la preparación de los diferentes extractos.

#### **3.1.2. PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS**

Para la obtención y estudio fitoquímico de los extractos, fracciones y subfracciones de *H. grandifolium* se utilizaron:

Acetato de etilo (FSA laboratory supplies, Reino Unido), acetato sódico (Ferosa, España), ácido acético glacial (Panreac Química S.A., España), ácido clorhídrico (Panreac Química S.A., España), ácido fórmico (Merck, Alemania), ácido sulfúrico (Panreac Química S.A., España), *n*-butanol (Prolabo, Francia), cloroformo (Scharlau Chemie S.A., España), cloroformo deuterado (Sigma Chemical Co., EEUU), cloruro férrico (Panreac Química S.A., España), cloruro sódico (Merck, Alemania), formol (solución formaldehído 36.5 %) (Scharlau Chemie S.A., España), gelatina (Panreac Química S.A., España), *n*-hexano (FSA laboratory supplies, Reino Unido), hidróxido sódico (Panreac Química S.A., España), metanol (Panreac Química S.A., España), vainillina (Sigma Chemical Co., EEUU).

En las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas se emplearon: hiperforina (Cayman Chemical, EEUU), hipericina (Biomol GmbH, Alemania), hiperósido (Merck, Alemania), pseudohipericina

(Calbiochem, Alemania), quercetina (ABCR GmbH & Co. KG, Alemania), quercitrina (Sigma, Alemania), rutina (Acros Organics, Bélgica). Tanto el acetato de amonio (Merck, Alemania) como el ácido acético glacial (Merck, Alemania), así como los disolventes acetonitrilo (Merck, Alemania), metanol (Merck, Alemania) y agua ultra-pura (Millipore, Alemania) que se emplearon, tenían un grado de pureza para análisis.

### 3.1.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES

El primer paso para llevar a cabo el estudio de los constituyentes químicos de un vegetal, correctamente desecado y triturado, es el desarrollo de procedimientos extractivos y el posterior fraccionamiento de los extractos obtenidos.

En nuestros estudios se han efectuado dos tipos de extracciones del material vegetal (Fig.7):

#### a) *Extracción por infusión*

La infusión se obtuvo a partir de 100 g de droga seca y pulverizada, a los que se añadió un litro de agua destilada a 100 °C. Este volumen fue posteriormente reducido hasta obtener una concentración de 1 g/ml, referido a peso de planta seca.

#### b) *Extracción con disolventes orgánicos*

Para ello, la materia vegetal seca y finamente triturada se extrajo mediante una maceración en metanol (MeOH) durante tres días, realizándose esta operación tres veces. Los respectivos extractos fueron filtrados y reunidos en uno solo y se concentraron hasta sequedad en un Rotavapor a presión reducida y temperatura inferior a 45 °C.

El residuo seco procedente del extracto metanólico se suspendió en agua y se extrajo tres veces con CHCl<sub>3</sub>. Los extractos clorofórmicos fueron reunidos, mientras que la fase acuosa se volvió a extraer con *n*-butanol (*n*-BuOH) hasta tres veces. Se obtuvieron así las correspondientes fracciones clorofórmicas, butanólicas y acuosas, las cuales fueron concentradas siguiendo el procedimiento habitual.

Este fraccionamiento ha sido llevado a cabo en base a los ensayos farmacológicos que se han realizado, intentando en cada caso ir acotando los posibles compuestos responsables de la acción farmacológica manifestada. De este modo, llegamos mediante diferentes técnicas cromatográficas a definir el contenido de la

fracción butanólica y a obtener las subfracciones F1, F2 y F3 a partir de la fracción clorofórmica (Fig. 7).

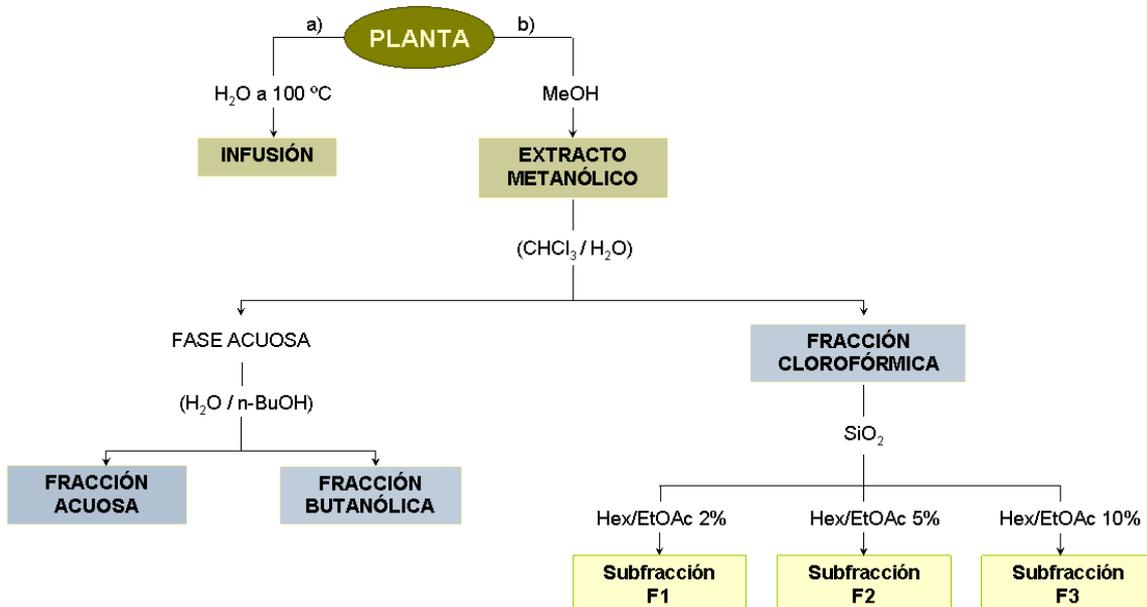


Figura 7. Extracción y fraccionamiento de *Hypericum grandifolium*

### 3.1.4. TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO E IDENTIFICACIÓN ESTRUCTURAL

Aquellos extractos o fracciones que mostraron interés a nivel de las pruebas farmacológicas realizadas fueron sometidos a análisis fitoquímico.

Para la realización de estos análisis se recurrió a ensayos físico-químicos cualitativos, técnicas cromatográficas clásicas, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem y espectrometría de masas por transformada de Fourier.

#### 3.1.4.1. Pruebas clásicas de identificación fitoquímica

Existen diferentes ensayos físico-químicos cualitativos que permiten identificar de forma rápida y sencilla la presencia de determinados constituyentes en una droga o extracto ya que éstos pueden dar reacciones coloreadas, de precipitación, fluorescencia, etc.

Mediante las reacciones de identificación descritas en la literatura (Domínguez, 1973; Alborno, 1980; Trease-Evans, 1991) se comprobó la presencia de las siguientes familias de compuestos: alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas y taninos.

Para la identificación de *alcaloides* se llevaron a cabo reacciones de precipitación realizadas en un medio acuoso ligeramente acidulado con un ácido mineral (HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 %). Los reactivos empleados fueron:

- a) Reactivo de Bouchardat (solución de yodo iodurada), que con los alcaloides da precipitados marrones.
- b) Reactivo de Mayer (solución de yodo mercuriato potásico), que origina un precipitado blanco-amarillo en caso positivo.
- c) Reactivo de Dragendorff (solución de yodo-bismutato potásico), que da precipitado naranja-rojizo en presencia de estos compuestos.

Para la detección de la presencia de *antraquinonas* se efectuó la reacción coloreada de Bornträger, en la cual se obtiene una coloración rojiza con soluciones alcalinas en caso de existencia de las mismas.

Para caracterizar *flavonoides* en extractos brutos se puede recurrir a numerosas reacciones coloreadas, entre las que destaca la de la cianidina. Esta reacción es positiva, si al añadir Mg (s) y unas gotas de alcohol/HCl se produce desprendimiento de calor y una coloración rojiza (naranja para flavonas, rojo-rojo cereza para flavonoles o rojo-violáceo para flavanonas).

La presencia de *saponinas* en el presente trabajo se ha determinado por la capacidad de las mismas de producir espuma abundante y relativamente estable por agitación de sus soluciones acuosas. Además, se ha llevado a cabo la reacción de Liebermann-Burchard, donde al añadir anhídrido acético en medio sulfúrico se producen reacciones coloreadas en los casos positivos.

Los *taninos* poseen la capacidad de precipitar proteínas y alcaloides, siendo esta propiedad aprovechada para su determinación en el laboratorio. Dentro de las reacciones de identificación de los taninos se han realizado las siguientes:

- a) Con gelatina salada (solución al 1 % de gelatina y al 10 % de NaCl en agua).  
Todos los taninos, hidrolizables y condensados, floculan y forman un

precipitado con esta proteína preparada. En caso positivo, se aprovecha el ensayo para confirmar la presencia o ausencia de catequinas libres (no precipitables por gelatina salada). Para ello, filtramos y añadimos al filtrado anterior el reactivo de Stiasny (formol/HCl) que forma con ellas precipitados rosados.

- b) Con reactivo de Stiasny. Es un reactivo específico de taninos condensados (o catéquicos) constituido por formol/HCl (2:1). Si aparece un precipitado floculoso tras añadir el reactivo de Stiasny y calentar, confirmamos la presencia de taninos condensados. Para saber si hay taninos hidrolizables, se realiza una filtración y el filtrado se trata con acetato sódico en polvo y unas gotas de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ . La aparición de coloración azul señala la existencia de taninos hidrolizables.

#### 3.1.4.2. Cromatografía clásica

Para la cromatografía clásica en columna se utilizaron columnas de silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck, 9385). Como sistemas eluyentes aquellos previamente seleccionados por cromatografía en capa fina: *n*-hexano/acetato de etilo al 2, 5 y 10 %.

La cromatografía en capa fina (CCF) se utilizó estrictamente con fines analíticos, para ello se emplearon cromatoplasmas cuyo adsorbente fue Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck, 5548). Para el seguimiento de la cromatografía en columna se utilizaron como eluyentes mezclas de *n*-hexano (*n*-Hex) y acetato de etilo (AcOEt), mientras que para la detección de distintos flavonoides se utilizó acetato de etilo/ácido acético/ácido fórmico/agua (100:11:11:27) como sistema eluyente (Wagner y cols., 1984).

La visualización de las cromatoplasmas se realizó con luz visible y a la luz UV ( $\lambda = 254, 366 \text{ nm}$ ), con o sin la aplicación de un reactivo revelador. Como agentes reveladores utilizamos agua/ácido sulfúrico/ácido acético (32:8:160) y posterior calentamiento a 100 °C, o bien, el reactivo de Godin y posterior calentamiento a 105 °C durante 10 minutos. El Reactivo de Godin es un agente cromogénico característico de derivados del floroglucinol, formado por la mezcla a partes iguales de dos soluciones A y B, siendo la solución A:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10 % en metanol y la solución B: vainillina al 1 % en metanol (Godin, 1954; Rocha y cols., 1995; Viana y cols., 2005).

### 3.1.4.3. Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas: CLAR-EM/EM y CLAR-EM-TF

La espectrometría de masas es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican utilizando el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa-carga ( $m/z$ ). Esta técnica, brinda información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de materiales tanto inorgánicos como orgánicos.

Las técnicas de ionización más empleadas son el impacto electrónico (EI) y la ionización química (CI), sin embargo, su principal limitación consiste en que es necesario que las muestras objeto de estudio se encuentren en estado gaseoso, lo que obliga a derivatizar aquellas moléculas que no lo sean, hecho que provoca en muchas ocasiones una gran dificultad en la preparación de la muestra, así como la posibilidad de que se destruyan o modifiquen los compuestos a estudiar. Este problema ha podido ser resuelto mediante las técnicas de bombardeo con átomos rápidos (FAB) o por electrospray (ESI), que nos permiten el análisis de las muestras sin necesidad de una derivatización química.

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas mediante electrospray (CLAR-ESI-EM), surge como una técnica que combina la capacidad de separación física de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con la capacidad de elucidación estructural que ofrece la espectrometría de masas (EM).

Dentro de la técnica de CLAR-ESI-EM, el empleo de la *espectrometría de masas en tándem* (CLAR-ESI-EM/EM) permite obtener información estructural, o la “huella dactilar” de los compuestos, gracias a su capacidad de aislar el ión padre de todos los coeluyentes antes de la fragmentación. El desarrollo de este procedimiento analítico permite el trabajo simultáneo, tanto en modo de iones positivos como negativos, así como varios modos de barrido (barrido completo o *full scan*, monitorización de reacciones selectiva (SRM), monitorización de reacciones altamente selectiva (H-SRM), iones precursores, iones producto, pérdidas neutras, etc.) para una cuantificación e identificación de moléculas y productos de transformación, de amplio rango de polaridades y clases químicas.

En el presente trabajo se utilizaron técnicas CLAR-ESI-EM/EM para la determinación (cuantificación e identificación) de naftodiantronas, derivados del floroglucinol y flavonoides, por tratarse de los principales grupos de compuestos dentro del género *Hypericum*. El análisis de las naftodiantronas hipericina y pseudohipericina, así como el de la hiperforina, fue llevado a cabo bajo las condiciones descritas en el apartado CLAR-ESI-EM/EM I, mientras que para los flavonoides rutina, hiperósido, quercitrina y quercetina se utilizaron las del apartado CLAR-ESI-EM/EM II.

*CLAR-ESI-EM/EM I.* Para el análisis mediante CLAR del extracto metanólico de *H. grandifolium*, así como el de sus fracciones y subfracciones, se utilizó un sistema CLAR Survior (Thermo Finnigan, EEUU). Los compuestos fueron separados en una columna Luna C18 100 Å (50 x 2 mm, tamaño de partícula 3 µm) de Phenomenex (Torrance, EEUU). Como fase móvil se empleó una mezcla a proporciones variables de las soluciones A y B (solución A: 10 mM de acetato de amonio ajustados hasta pH 5 con un *buffer* mediante la adición de ácido acético glacial; solución B: mezcla (1:1) de acetonitrilo y metanol). El gradiente de elución fue obtenido utilizando el siguiente gradiente de disolventes: desde 90A/10B hasta 80A/20B durante 10 minutos, hasta 10A/90B durante 25 minutos y finalmente hasta 100B durante 5 minutos; cada elución fue precedida por un periodo de equilibrado de 10 minutos. El volumen de inyección fue de 3 µl, la velocidad de flujo fue de 0.3 ml/min y todos los experimentos fueron llevados a cabo a una temperatura de 30 °C. El espectro de masas fue obtenido utilizando un espectrómetro de masas TSQ Quantum ultra AM (Thermo Finnigan, EEUU) dotado de una fuente de ionización ESI (Ion Max) operando tanto en modo positivo como negativo. Se usó nitrógeno tanto como secante como gas nebulizante.

*CLAR-ESI-EM/EM II.* El análisis mediante CLAR de las muestras bajo estudio fue llevado a cabo utilizando un sistema CLAR Surveyor, dotado de un procesador de muestras automático y detección por fotiodo (Thermo Finnigan, EEUU). Las separaciones fueron realizadas en una columna Phenosphere next 5µ C18 100 Å (150 x 2 mm, tamaño de partícula 5 µm) de Phenomenex (Torrance, EEUU). La fase móvil empleada fue una mezcla a proporciones variables de las soluciones A y B (siendo la solución A igual a la descrita en el apartado anterior y la solución B una mezcla (9:1) de acetonitrilo y metanol). El gradiente de elución fue obtenido utilizando el siguiente gradiente de disolventes: desde 95A/5B hasta 75A/25B durante 8 minutos, hasta 50A/50B durante 10 minutos y hasta 100B durante 12 minutos; cada elución fue

precedida por un periodo de equilibrado de 10 minutos. El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{l}$ , la velocidad de elución de 0.25 ml/min y todos los experimentos fueron llevados a cabo a 24 °C. El espectro de masas fue obtenido utilizando un espectrómetro de masas TSQ 7000 (Thermo Finnigan, Alemania) dotado de una fuente ESI.

Para el calibrado externo se usaron soluciones estándar de concentraciones 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 30  $\mu\text{g/ml}$  para pseudohipericina, hipericina e hiperforina, mientras que para los flavonoides rutina, hiperósido, quercetina y quercitrina las concentraciones fueron de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$ . Estas soluciones fueron almacenadas en ausencia de luz a -20 °C.

Para llevar a cabo el análisis de las muestras, éstas se disolvieron en una mezcla de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (8:2), determinándose la desviación estándar relativa del método analítico mediante 8 inyecciones de una misma muestra. Todos los ensayos fueron llevados a cabo protegidos de la luz.

Por otra parte, también fueron desarrollados experimentos de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas por transformada de Fourier (CLAR-ESI-EM-TF). La *espectrometría de masas por transformada de Fourier* (EM-TF) es el método a elegir para la determinación de masas exactas. Es también el método de elección cuando la complejidad de la mezcla impide una separación cromatográfica suficiente, problema que su muy alta resolución permite resolver.

En el presente trabajo, los espectros ESI-EM-TF fueron obtenidos con un espectrómetro LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific, EEUU). El espectrómetro, operado tanto en modo positivo como negativo, se encontraba equipado con un sistema Dionex micro-CLAR Ultimate 3000 formado por una bomba, un detector UV ( $\lambda = 265 \text{ nm}$ ), un regulador de flujo y un procesador de muestras automático (volumen de inyección 500 nl). El nitrógeno fue utilizado como gas protector (5 unidades arbitrarias), mientras que el helio se utilizó como gas de colisión. Las separaciones fueron llevadas a cabo utilizando una columna Phenomenex Gemini C18 (3  $\mu\text{m}$ , 0.3 x 150 mm) (Torrance, CA, EEUU) con un flujo de gradiente formado por una mezcla constituida por las soluciones A y B (A: agua/ácido fórmico (0.1 %) y B: acetonitrilo/ácido fórmico (0.1 %)), con un flujo de elución de 4  $\mu\text{l min}^{-1}$ . Las muestras fueron analizadas utilizando el siguiente

programa de gradiente: 85 % A isocrático durante 1 minuto, en gradiente lineal hasta 100 % B durante 20 minutos, 100 % B isocrático durante 18 minutos, el sistema volvió a su condición inicial (100 % A) en 1 minuto, y fue equilibrado durante 9 minutos.

### 3.2. OBTENCIÓN DE LA FLAVONA Y DITERPENOS AISLADOS DE DIFERENTES ESPECIES DE LOS GÉNEROS *TEUCRIUM* Y *SALVIA*

Para el presente estudio fueron seleccionados un flavonoide (*salvigenina*) y seis compuestos diterpénicos (*teucrina A*, *19-acetilgnafalina*, *eriocefalina*, *teucvina*, *teuflina* y *aetiopinona*), aislados con anterioridad de diferentes especies de los géneros *Teucrium* y *Salvia*.

Los diterpenos *19-acetilgnafalina* y *eriocefalina* (Fig. 8) fueron aislados a partir de diferentes especies del género *Teucrium* (Fayos y cols., 1979; Savona y cols., 1979, 1982; Bruno y cols., 1985).

Los compuestos *19-acetilgnafalina* y *eriocefalina* son diterpenos *neo-clerodánicos* que se asemejan estructuralmente en la presencia de un anillo furánico, un epóxido en posiciones 4 $\alpha$ ,18, un acetoxilo en C-19 y una cetona en C-6. Sin embargo, la *eriocefalina* presenta un grupo hidroxilo en C-7 $\alpha$  y un hemiacetal acetilado (carbonos C-9, C-11, C-12 y C-20), en lugar de la  $\gamma$ -lactona de la *19-acetilgnafalina* (Fig. 8).

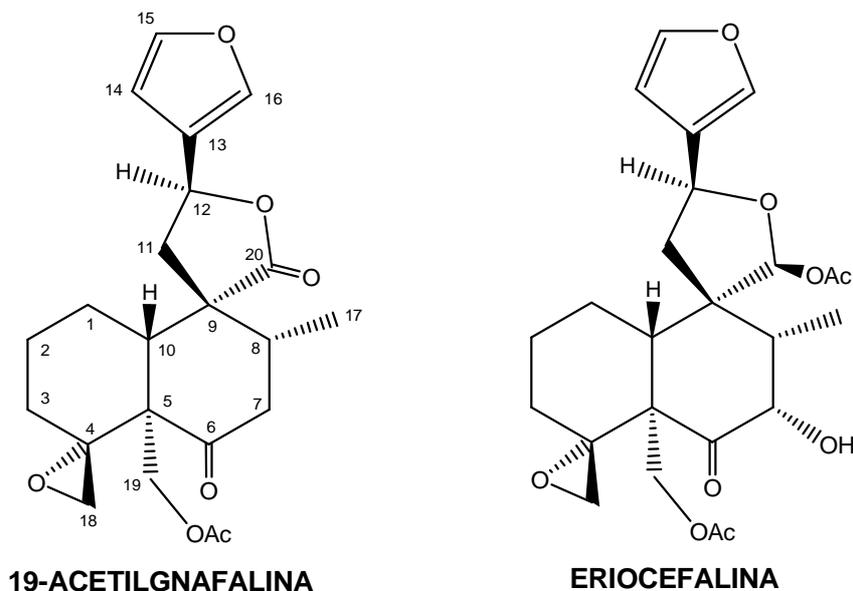
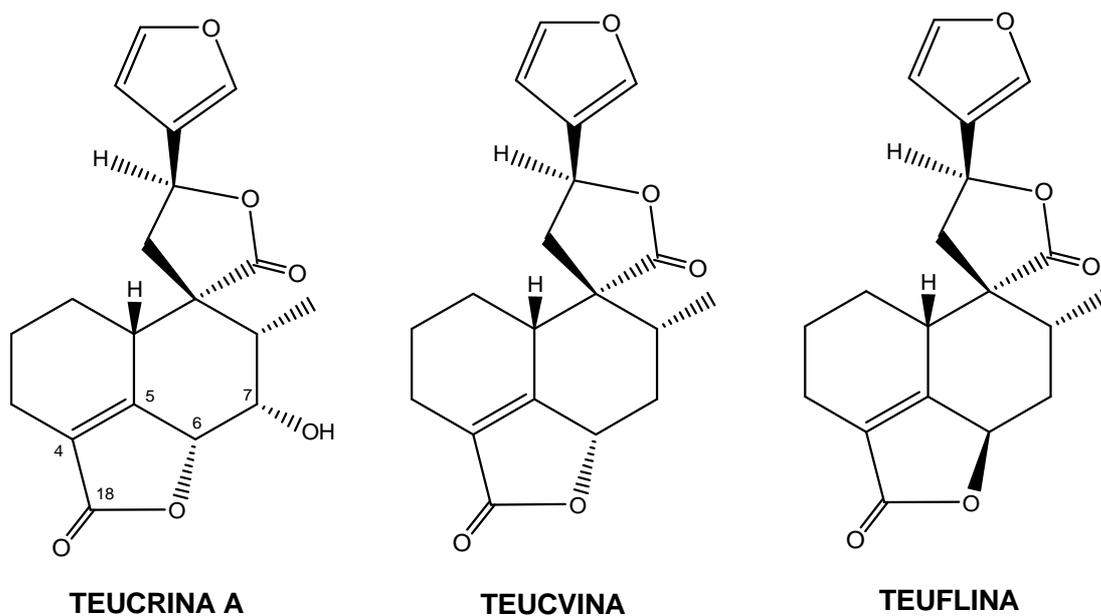


Figura 8. Diterpenos neo-clerodanos: *19-acetilgnafalina*, *eriocefalina*

Los diterpenos 19-nor-*neo*-clerodanos *teucrina A*, *teucvina* y *teuflina* (Fig. 9) fueron aislados de diferentes especies del género *Teucrium* (Fayos y cols., 1979; Savona y cols., 1979, 1982; Bruno y cols., 1985).

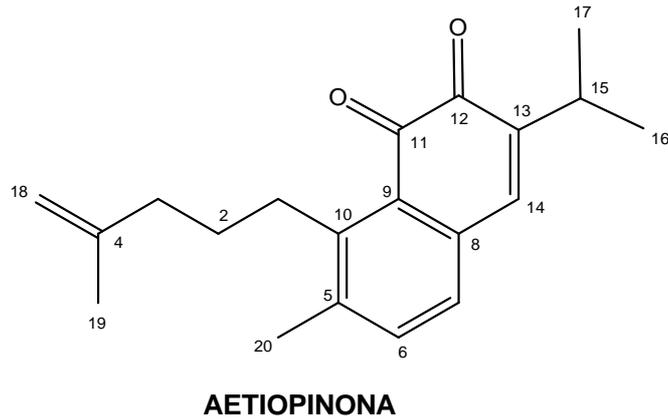
Estos tres compuestos, caracterizados por poseer únicamente 19 átomos de carbono, presentan similitudes estructurales con los anteriores (un anillo furánico unido a una  $\gamma$ -lactona en las mismas posiciones que la *19-acetilgnafalina* y la *eriocefalina*) pero difieren de estos en que poseen una  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada en la que los átomos de carbono C-4, C-5, C-6 y C-18 del núcleo *neo*-clerodano están implicados (Fig. 8 y 9).

*Teuflina* y *teucvina* son epímeros entre sí, mientras que *teucrina A* tiene un grupo hidroxilo en C-7, vecino a la 18,6- $\gamma$ -lactona (Fig. 9).



**Figura 9.** Diterpenos 19-nor-*neo*-clerodanos: *teucrina A*, *teucvina*, *teuflina*

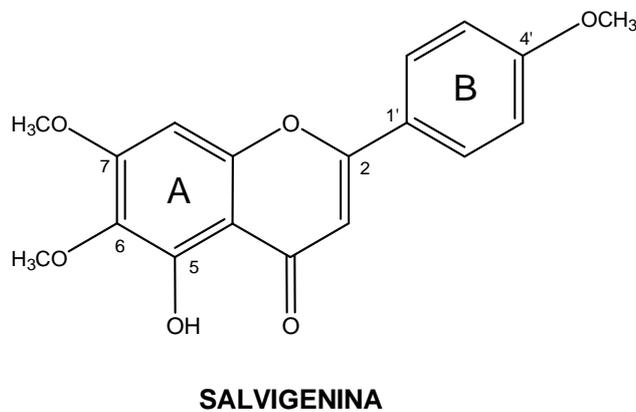
La *aetiopinona* es un diterpeno abietano *o*-naftoquinónico (Fig. 10) que fue aislado a partir del extracto acetónico de las raíces de *Salvia aethiopis* L. (Boya y Valverde, 1981; Rodríguez y cols., 1984).



*Figura 10. Diterpeno abietano o-naftoquinónico: aetiopinona*

El flavonoide *salvigenina* (5-hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona) (Fig. 11) utilizado en este trabajo fue aislado de especies del género *Salvia*, de las que es un componente habitual (Topcu y cols., 1995). Sin embargo, también ha podido ser aislada en algunos géneros de la familia *Lamiacea* (especies de *Sideritis*, *Ocimum*, *Nepeta* y *Coleus*) (Uydes-Dogan y cols., 2005).

Se trata de una flavona, cuyo ciclo A se encuentra trisustituido por un hidroxilo en posición C-5 del anillo aromático y dos grupos metoxilos en C-6 y C-7. El ciclo B, posee un grupo metoxilo en posición C-4'.



*Figura 11. Hidroximetoxiflavona: Salvigenina*

### 3.3. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

#### 3.3.1. PRUEBAS REALIZADAS

En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio de las actividades analgésicas y antiinflamatorias de diferentes extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* Choisy, así como el efecto sobre el sistema nervioso central de

las fracciones y subfracciones de esta especie. La acción sobre el sistema nervioso central de la infusión y el extracto metanólico fue evaluada en trabajos anteriores, ofreciendo resultados muy alentadores (Prado y cols., 2002; Sánchez-Mateo y cols., 2002). Igualmente, fueron ensayadas las acciones analgésicas, antiinflamatorias y sobre el sistema nervioso central de una flavona y cinco diterpenos de tipo clerodano aislados de especies de los géneros *Salvia* y *Teucrium*: *salvigenina*, *teucrina A*, *19-acetilgnafalina*, *eriocefalina*, *teucvina* y *teuflina*. También se llevó a cabo el estudio de las acciones sobre el sistema nervioso central de la *aetiopinona*, un diterpeno naftoquinónico aislado de las raíces de *Salvia aethiopsis* L., que en un trabajo anterior mostró importantes acciones analgésicas y antiinflamatorias en roedores (Hernández-Pérez y cols., 1995).

Como paso previo y obligado antes de iniciar un estudio farmacológico de cualquier compuesto nuevo, se determinó la toxicidad aguda mediante el cálculo de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), que actualmente se acepta como el valor más representativo para caracterizar la toxicidad de una sustancia (Turner, 1965a). Sólo realizamos esta prueba con la flavona y los diterpenos de tipo clerodano aislados de especies de los géneros *Salvia* y *Teucrium*, puesto que ya se había realizado para los extractos de la especie *H. grandifolium* y la *aetiopinona* en trabajos anteriores, dando valores de DL<sub>50</sub> superiores a 2 g/kg por vía oral (p.o.) para el extracto metanólico y de 8 g/kg p.o. para la infusión de *H. grandifolium* (Prado y cols., 2002; Sánchez-Mateo y cols., 2002), y un valor de 838.17 mg/kg p.o. para la *aetiopinona* (Hernández-Pérez y cols., 1995).

Por otro lado, dado que no existe un modelo animal único que cubra todos los aspectos del dolor y de la inflamación, se seleccionaron varias pruebas para determinar su potencial acción analgésica y antiinflamatoria en ratones albino Swiss (Turner, 1965b; Williamson y cols., 1996). Asimismo, fueron realizadas una serie de pruebas para determinar su acción sobre el sistema nervioso central, centrándonos sobre todo en su potencial actividad antidepresiva, utilizando tanto pruebas basadas fundamentalmente en la interacción aguda del nuevo producto con un agente químico y comparar los efectos producidos con productos antidepresivos de reconocida eficacia terapéutica (como el test de la tetrabenacina) como pruebas conductuales en las que se administran las sustancias en estudio a animales a los que por varios procedimientos se

les induce estados de comportamiento que se consideran típicos de la depresión humana (test de Porsolt) (Bourin, 1990; Willner, 1994).

Por tanto, las pruebas realizadas fueron las siguientes:

- Estudio de la toxicidad aguda (DL<sub>50</sub>).
- Actividad analgésica:
  - Efecto sobre los estiramientos inducidos por ácido acético en ratón.
  - Efecto sobre la hiperalgesia inducida por formalina.
  - Efecto sobre el tiempo de reacción en el test del *tail-flick*.
- Actividad antiinflamatoria:
  - Efecto sobre el edema plantar inducido por carragenina.
  - Efecto sobre el proceso inflamatorio inducido por tetradecanoil-forbol-acetato (TPA).
- Actividad sobre el sistema nervioso central:
  - Efecto sobre la actividad motora espontánea.
  - Efecto directo sobre la temperatura corporal: Determinación de la temperatura rectal.
  - Actividad miorrelajante: Test de la tracción.
  - Efectos sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico.
- Actividad antidepresiva:
  - Antagonismo a la tetrabenacina.
  - Depresión por desesperación comportamental: Test de Porsolt en ratones.
  - Efecto sobre la conducta inducida por el L-5-hidroxitriptófano (L-5-HTP).

### **3.3.2. CONDICIONES DE LOS ENSAYOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS**

Con el fin de evitar las variaciones entre los diferentes ensayos, se ha intentado mantener constantes los siguientes parámetros:

a) Como animales de experimentación se utilizaron ratones albinos Swiss con peso comprendido entre 20-30 g que se mantuvieron con dieta comercial y agua *ad libitum*, salvo en aquellas pruebas en que la vía de administración fue la oral, en cuyo caso fueron mantenidos sin comida pero con agua 16 horas antes de iniciar las experiencias.

b) Para favorecer la adaptación de los animales a las condiciones del ensayo, se colocaron los mismos en el lugar de trabajo al menos tres días antes de comenzar las experiencias. Todas las pruebas se realizaron en una habitación cerrada, insonorizada y termostaticada a  $22 \pm 1$  °C, a excepción del test de interacción con pentobarbital sódico en que la temperatura fue de  $27 \pm 1$  °C. Del mismo modo, los test se llevaron a cabo con luz artificial manteniéndose un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (7.00 a.m. - 7.00 p.m.), realizándose aproximadamente a las mismas horas del día.

c) En todas las pruebas se realizaron ensayos en blanco, ensayos del patrón y ensayos de los productos problema.

d) Salvo que el método indique lo contrario, la vía de administración utilizada para los extractos, fracciones y subfracciones de *H. grandifolium*, así como para la *aetiopinona* fue la oral (p.o.), mientras que para la flavona y diterpenos de tipo clerodano aislados de especies de los géneros *Salvia* y *Teucrium* fue la intraperitoneal (i.p.), siendo en todos los casos el volumen administrado 0.5 ml/20 g de peso de ratón.

e) Los extractos y fracciones de *H. grandifolium* fueron suspendidos en una solución de Tween al 2 %, mientras que la infusión fue disuelta en agua destilada. Por su parte, la *aetiopinona* fue suspendida en una solución de etanol/Tween 80/agua (0.5: 7: 92.5), mientras que la flavona y diterpenos de tipo clerodano aislados de especies del género *Salvia* y *Teucrium* fueron suspendidas en Tween al 1%. Con respecto a la administración tópica en el test del TPA, los vehículos empleados para los diferentes productos estudiados se especificarán en la descripción del método.

f) Con los resultados obtenidos en las diferentes pruebas se procedió a la determinación de la media aritmética ( $\bar{x}$ ) con su correspondiente error estándar ( $\epsilon$ ). Para el cálculo de la significación estadística se empleó el análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de Student para grupos de datos independientes, tomándose como significación estadística una  $p < 0.05$ . Se utilizó el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) cuando se compararon porcentajes de actividad, y el de Mann-Whitney para datos no

paramétricos. En los correspondientes métodos se especificará el procedimiento aplicado (Tallarida y Murray, 1987).

### **3.3.3. FÁRMACOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS**

La procedencia de los fármacos y productos químicos utilizados en las pruebas experimentales es la siguiente:

Acetona (Prolabo, Francia), ácido acético glacial (Panreac Química S.A., España), ácido tartárico (Merck, Alemania), carragenina lambda tipo IV (Sigma-Aldrich Co., EEUU), clorpromacina clorhidrato (Rodia, España), dexametasona (Sigma Chemical Co., EEUU), diclofenaco sódico (Cayman Chemical Company, EEUU), diclorometano (FSA laboratory supplies, Reino Unido), etanol absoluto (May & Baker Ltd., Reino Unido), fluoxetina clorhidrato (Lilly Indiana, España), formalina (solución formaldehído 36.5 %) (Scharlau Chemie S.A., España), ibuprofeno (Liade, España), imipramina clorhidrato (Impex, España), indometacina (Cayman Chemical Company, EEUU), L-5-hidroxitriptófano (Serva, España), morfina clorhidrato (Braun Medical S.A., España), pentobarbital sódico (Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios, España), petidina clorhidrato (Bayer Hispania S.A., España), tetrabenacina pura (Fluka Chemie, Suiza), 12-O-tetradecanoil-forbol 13-acetato (Sigma Chemical Co., EEUU), Tween 80 (Ferosa, España).

### **3.3.4. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA: FIJACIÓN DE LA DL<sub>50</sub>**

La toxicidad aguda es la propiedad que posee una sustancia de provocar, en unas condiciones determinadas, la muerte de una parte o de la totalidad de un lote de animales, bajo el efecto de una dosis única (Pafet y Barnes, 1964).

Se ha demostrado que la dosis de una sustancia capaz de matar al 50 % de un grupo de animales, es un dato que puede determinarse con gran precisión por métodos estadísticos, obteniéndose resultados completamente reproducibles si las condiciones experimentales están perfectamente estandarizadas. Esta dosis representa la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), que actualmente se acepta como el valor más representativo para caracterizar la toxicidad de una sustancia. El valor de la DL<sub>50</sub> varía no solamente con la sustancia utilizada, sino también con la especie animal sobre la que se opera, con la vía de administración, y con las condiciones ambientales (Pafet y Barnes, 1964).

Es imposible determinar directamente la  $DL_{50}$  a partir de un solo lote de animales, por ello, se utiliza un procedimiento indirecto que consiste en administrar a diferentes grupos de animales dosis crecientes de la sustancia a ensayar de manera que el porcentaje de mortalidad varíe entre el 0 y el 100 % (Turner, 1965a).

### ***Protocolo experimental***

La toxicidad aguda fue establecida mediante la determinación de la  $DL_{50}$  aproximada, para lo cual, se utilizaron lotes de 5 ratones tanto machos como hembras a los que se les administró por vía intraperitoneal diferentes dosis de los productos problema (flavona y diterpenos de tipo clerodano aislados de especies de los géneros *Salvia* y *Teucrium*). Se cuantificó la mortalidad encontrada en los tres días siguientes de la administración empleando el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

### **3.3.5. ACTIVIDAD ANALGÉSICA**

Se puede definir el dolor como una experiencia perceptiva sensitiva emocional subjetiva desagradable que se asocia a una lesión tisular real o potencial, o que es vivida como tal daño, y cuya función biológica es alertar a la conciencia de esta alteración. Es un mecanismo adaptativo de defensa que indica que algo no funciona, a la vez que puede ser, en algunos casos, un mecanismo que estimula la curación y la recuperación (Vázquez André y cols., 2004). Sin embargo, en algunas circunstancias el dolor pierde su carácter benéfico para el organismo y se convierte en sí mismo en una patología que puede y debe ser suprimida para garantizar nuestro bienestar.

Las sustancias analgésicas son aquellas que disminuyen la percepción de la sensación dolorosa por depresión selectiva de los mecanismos nociceptivos. Estos fármacos se pueden clasificar atendiendo al lugar y mecanismo de acción en analgésicos cuya acción se realiza sobre el SNC (analgésicos narcóticos), y aquellos en que su actividad se manifiesta a nivel de las terminaciones sensitivas periféricas (analgésicos no narcóticos). Los primeros se caracterizan por poseer gran influencia en la anulación del componente psíquico del dolor, no afectar la temperatura corporal y no modificar un edema, mientras que los segundos influyen sobre la temperatura corporal y la reducción del edema (Turner, 1965b; Thompson, 1990a).

Para estudiar la actividad analgésica de una sustancia existen diversos modelos experimentales en animales basados en la aplicación de un estímulo externo doloroso en

condiciones determinadas y la aparición de cambios observables en la conducta animal, en el sentido de escapar de la situación experimental. Los estímulos nociceptivos pueden ser de varios tipos: mecánico (como la aplicación de una pinza en la raíz de la cola de un ratón), térmico (como el método del *tail-flick* (o sacudida de la cola) o el de la plancha caliente), eléctrico (como la aplicación de un estímulo eléctrico en forma de choques a la cola del ratón) o químico (como la inyección intraperitoneal de una sustancia irritante como fenilquinona o ácido acético que producen un síndrome de contorsión), los cuales darán lugar a las diferentes clases de analgesia (Turner, 1965b; Williamson y cols., 1996; Thompson, 1990a).

Dado que no existe una sola prueba ideal para la evaluación de nuevos productos con actividad analgésica, se suele utilizar una combinación de varias de ellas, lo que permite aumentar considerablemente la potencia de discriminación y eliminar muchos falsos positivos o negativos. En nuestro trabajo, para evidenciar la posible actividad analgésica que pudieran presentar los extractos, fracciones o productos en estudio se realizaron tres modelos de nocicepción aguda: dos basados en estímulos químicos (estudio de los efectos sobre los estiramientos inducidos por ácido acético y sobre la hiperalgesia inducida por formalina) y uno basado en estímulos térmicos (el test del *tail-flick*) (Turner, 1965b; Williamson y cols., 1996; Feria, 2005).

#### **3.3.5.1. Efecto sobre los estiramientos inducidos por ácido acético**

Este método está basado en la aplicación de un estímulo doloroso de tipo químico mediante la inyección intraperitoneal de una solución acuosa de ácido acético. Esta sustancia irritante produce dolor e inflamación de la cavidad peritoneal que se manifiesta por retorcimiento del animal, estiramientos de las patas traseras y encorvamiento del torso, de manera que la valoración de la respuesta al estímulo nociceptivo se lleva a cabo contando el número de veces que se expresa esta conducta en el tiempo. El número de estiramientos es reducido por los fármacos que presentan actividad analgésica tanto periférica como central (Collier y cols., 1968; Turner, 1965b; Williamson y cols., 1996).

#### ***Protocolo experimental***

Utilizamos lotes de 6 ratones hembra a los que se les administró vía oral o intraperitoneal las dosis correspondientes de los extractos, fracciones o productos

problema, las sustancias patrones y el vehículo en el que estos fueron disueltos. Transcurridos 60 minutos de la administración oral (o 30 para la administración i.p.), los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis de 10 ml/kg de una solución acuosa de ácido acético al 0.7 %. Inmediatamente después de la administración del compuesto álgico se colocaron los animales en compartimentos individuales para una mejor observación y se contabilizó durante 20 minutos el número de estiramientos.

Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para ver si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student. Se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente proporción: (valor medio del grupo control - valor medio del grupo estudiado) x 100 / valor medio del grupo control).

### **3.3.5.2. Efecto sobre la hiperalgesia inducida por formalina**

El estímulo doloroso se induce por la inyección subcutánea de un agente químico (formalina) en la pata trasera derecha del ratón, lo cual produce un dolor tónico que se manifiesta mediante la lamida o mordisqueo de la pata inyectada, conducta diferente al aseo normal. En el test se distinguen dos fases: fase I, indicativa de dolor neurogénico (primeros 5 minutos) y fase II, indicativa de dolor inflamatorio (15 a 30 minutos después de la administración de la formalina) (Hunskaar y Hole, 1987; Tjolsen y cols., 1992).

#### ***Protocolo experimental***

A lotes de 6 ratones hembra se les administró vía oral las dosis correspondientes de los extractos o fracciones estudiadas, los patrones y los vehículos. Transcurridos 60 minutos de la administración oral, aplicamos el estímulo doloroso mediante la inyección subcutánea de 20 µl de formalina al 2.5 % (preparada diluyendo formaldehído al 37.5 % en suero fisiológico estéril) en la aponeurosis plantar de la pata trasera derecha del ratón.

Inmediatamente después de la administración de la formalina se colocaron los animales en cámaras de observación separadas (cilindros de vidrio de 20 cm de diámetro elevados sobre su base). Para facilitar la observación de la conducta

nociceptiva se colocaron debajo de dichas cámaras sendos espejos a un ángulo de 45 grados.

Se consideró como indicador de la respuesta dolorosa el tiempo (segundos) durante el cual el animal se lame o muerde la pata entre los 0-5 minutos y los 15-30 minutos después de la inyección de formalina, que corresponden a la fase I y fase II, respectivamente.

Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para ver si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente proporción: (valor medio del grupo control - valor medio del grupo estudiado) x 100 / valor medio del grupo control).

### **3.3.5.3. Efecto sobre el tiempo de reacción en el test del *tail-flick***

Este método se basa en la aplicación de un estímulo térmico a la punta de la cola del ratón sumergiéndola (2-3 cm) en un baño de agua caliente a una temperatura de  $54 \pm 1$  °C, lo que provoca un dolor que se manifiesta por una reacción inmediata del animal consistente en movimientos violentos y sacudidas de la cola (*tail-flick*) cuando se alcanza un umbral determinado. Se trata de un reflejo puramente espinal, al menos bajo condiciones de estimulación intensas, que persiste tras una sección espinal. Este test es de gran utilidad para determinar la potencia analgésica de sustancias de naturaleza narcótica (agonistas opioides) (Turner, 1965b; Ramabadran y cols., 1989; Williamson y cols., 1996; Feria, 2005).

### ***Protocolo experimental***

Tras seleccionar previamente aquellos animales que reaccionaban al estímulo térmico en menos de 3 segundos, se usaron lotes de 6-8 ratones hembra a los que se administró por vía oral o intraperitoneal las dosis correspondientes de los extractos, fracciones o productos en estudio, la sustancia patrón y el vehículo. A los 60 y 120 minutos de la administración oral, o 30, 60 y 120 minutos en el caso de la intraperitoneal, se midió el tiempo de reacción frente al estímulo térmico, para lo cual se sumergió 3 cm de la parte terminal de la cola del animal en el baño de agua caliente.

Con el fin de evitar daños en los tejidos por repetida exposición al estímulo doloroso, la cola se retiraba del baño si el animal no respondía en 6 segundos.

Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para ver si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student.

### **3.3.6. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA**

La inflamación es una reacción local, especialmente del tejido conectivo y vascular, producida por microorganismos o sustancias irritantes, que tiende a localizar y destruir, como defensa, al agente patógeno que produce daño celular. Constituye uno de los procesos más comunes en la enfermedad y se trata de una reacción elemental frente a una agresión al organismo que es necesaria para la supervivencia. Sin embargo, en muchas ocasiones dicha reacción puede ser excesiva y producir un daño a veces mayor que el generado por el agente productor, siendo necesario frenar el proceso inflamatorio. Los fármacos antiinflamatorios detienen estos procesos actuando sobre el foco inflamatorio, llegando al mismo después de ser absorbidos (antiinflamatorios generales o sistémicos) o bien por aplicación directa a dicho foco (antiinflamatorios locales) (Litter, 1986; Rang y cols., 2004).

Existen diferentes modelos experimentales que, aunque no reproducen realmente los procesos inflamatorios y degenerativos humanos, sí permiten valorar los componentes individuales de la respuesta inflamatoria, como son: el eritema, el edema, los cambios en la permeabilidad vascular, la quimiotaxis y migración leucocitaria o la fagocitosis por polimorfonucleares. Por lo general, en estos modelos se provoca, por aplicación de un agente irritante apropiado, una reacción inflamatoria que se trata de reducir o inhibir por la administración de los productos en estudio (Litter, 1986; Williamson y cols., 1996). En este trabajo, se han seleccionado dos modelos empíricos de acuerdo con su respuesta a fármacos de reconocida actividad antiinflamatoria, el test de la carragenina y el del tetradecanoil-forbol-acetato (Levy, 1969; De Young y cols., 1989).

### 3.3.6.1. Efecto sobre el edema plantar inducido por carragenina en ratón

En este método se induce el edema en el tejido subcutáneo de la pata del animal por inyección del agente inflamatorio carragenina. Se prefirió la carragenina ante otros irritantes porque el edema que se produce está menos modificado por factores ajenos a los propiamente característicos de la inflamación. Además, la actividad antiinflamatoria obtenida mediante este procedimiento guarda una buena correlación con la actividad antiinflamatoria mostrada en clínica (Levy, 1969).

La carragenina produce una reacción inflamatoria de tipo bifásico en la que intervienen diferentes mediadores de la inflamación. La primera fase (durante las dos primeras horas después de la inyección de carragenina) está relacionada con la liberación de los mediadores histamina y serotonina, mientras que la segunda fase (entre 3 y 5 horas después de su administración) intervienen las kininas y las prostaglandinas (Di Rosa y cols., 1971; Doherty y Robinson, 1975; Hernández-Pérez y cols., 2004).

#### *Protocolo experimental*

Se usaron lotes de seis ratones hembra a los que se les administró por vía oral o intraperitoneal las dosis correspondientes de los extractos, fracciones o productos en estudio, la sustancia patrón y el vehículo en el que fueron disueltos. Transcurrida una hora en el caso de la administración oral y 30 minutos para la intraperitoneal, se administró subcutáneamente en la aponeurosis plantar de la pata derecha de cada ratón 50 µl de una suspensión de carragenina al 1.5 % en suero fisiológico.

A las cuatro horas de la inducción del edema, se provocó la muerte del animal por dislocación cervical y las patas de cada animal fueron cortadas a la altura de la articulación. Las patas contralaterales fueron utilizadas como control y sus pesos se restaron al obtenido para las patas tratadas, obteniéndose así un peso del edema.

Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para ver si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente proporción:  $(\text{valor medio del grupo control} - \text{valor medio del grupo estudiado}) \times 100 / \text{valor medio del grupo control}$ .

### 3.3.6.2. Efecto sobre el proceso inflamatorio inducido por tetradecanoil-forbol-acetato (TPA)

En este ensayo inducimos el edema en la oreja del animal mediante el contacto de la misma con el agente irritante 12-o-tetradecanoil-forbol-acetato (llamado TPA por sus siglas en inglés), agente flogístico de probada acción, la cual perdura durante un período de 7 horas tras su administración (Carlson y cols., 1985; De Young y cols., 1989).

Los ésteres del forbol inducen el edema a través de la síntesis de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>). El TPA estimula la producción de grandes cantidades de PGE<sub>2</sub>, pero pequeñas cantidades de productos 5-lipoxigenasa, de ahí que el edema inducido por este sea especialmente sensible a fármacos antiinflamatorios inhibidores principalmente de la ciclooxigenasa o inhibidores de ambas ciclooxigenasa/lipoxigenasa (Carlson y cols., 1985; De Young y cols., 1989).

Para llevar a cabo este método, exclusivamente las orejas derechas de cada animal recibieron el TPA, además del patrón y sustancias a probar. La oreja izquierda se tomó como control, recibiendo únicamente el vehículo empleado para la disolución de los extractos, fracciones o productos administrados en su respectiva oreja derecha.

Una de las ventajas de este test reside en la pequeña cantidad de muestra que requiere, debido a la acción local del flogógeno, aspecto muy importante a tener en cuenta en el ámbito de los productos naturales.

#### *Protocolo experimental*

Los animales fueron distribuidos en grupos de seis. La aplicación en la oreja del ratón se realizó con micropipeta, depositando 10 µl a cada lado del pabellón de la misma, de tal modo que la oreja derecha de cada ratón recibió una cantidad final de 2.5 µg de TPA disueltos en 20 µl de acetona, mientras que la oreja izquierda recibió 20 µl de acetona. Inmediatamente después de esta administración a cada lote de animales, las muestras ensayadas o la sustancia patrón fueron administrados en la oreja derecha, recibiendo la oreja izquierda 20 µl del vehículo empleado para su disolución. El extracto metanólico y las fracciones de *H. grandifolium* fueron disueltos en etanol/agua (8:2), sus subfracciones en diclorometano y la infusión en agua destilada. Por su parte, la

flavona y diterpenos aislados de especies de los géneros *Salvia* y *Teucrium* fueron disueltos en diclorometano.

Es importante hacer constar que durante toda la experiencia la disolución de TPA se mantuvo en un recipiente opaco y a una temperatura inferior a 0 °C.

A las cuatro horas de la administración del agente irritante, se provocó la muerte del animal por dislocación cervical y con un sacabocados de 6 mm de diámetro se cortó el círculo central de cada oreja y se pesó. El peso del edema fue obtenido restando el peso de la oreja derecha (oreja tratada) al de la izquierda (control).

Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para ver si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente proporción:  $(\text{valor medio del grupo control} - \text{valor medio del grupo estudiado}) \times 100 / \text{valor medio del grupo control}$ .

### **3.3.7. ACTIVIDAD SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

En psicofarmacología no es fácil predecir, a partir de datos obtenidos en animales, la potencialidad terapéutica de un fármaco en el hombre, puesto que no existen modelos animales definitivos de enfermedad mental humana. No obstante, los científicos han conseguido modelos de gran utilidad, puesto que con ellos se ha logrado seleccionar un gran número de moléculas que han demostrado con el tiempo ser buenos psicoactivos (Micó, 1990).

Los fármacos activos sobre el sistema nervioso central producen muchos efectos diferentes sobre el comportamiento de los animales de experimentación, requiriéndose una elaborada batería de pruebas para evaluar el perfil de actividad de cada compuesto. En el presente trabajo han sido realizadas una serie de pruebas generales (efecto sobre la actividad motora, temperatura rectal o sueño inducido por barbitúricos, entre otras), así como pruebas más específicas para determinar la actividad antidepresiva (test de la tetrabenacina o de Porsolt), que son comentadas a continuación.

### 3.3.7.1. Efecto sobre la actividad motora espontánea

La actividad motora es un parámetro que refleja el estado fisiológico global del animal y su respuesta al entorno, que nos revela con cierta certeza el estado de excitación, depresión o normalidad del animal. Por ello, es innegable su medida en el *screening* farmacológico de nuevos agentes estimulantes y depresores; además, los cambios de dicha actividad pueden tener consecuencias importantes en la medida de todos los aspectos del comportamiento (Fatehyab Ali y cols., 1980; Nohria, 1983).

A lo largo del tiempo se han utilizado diversas técnicas para medir la actividad motora de los animales. En la presente Tesis Doctoral para realizar su medida se han empleado actógrafos circulares de células fotoeléctricas, registrándose en un contador el número de veces que el ratón cortaba el haz de luz. La interrupción del haz sobre la fotocélula no supone más que un avance en el contador, ya que tal fotocélula no queda capacitada para otra respuesta hasta que otra colindante no ha sido disparada (Sturgeon y cols., 1979).

Dado que la actividad motora varía con las condiciones ambientales (temperatura, luz, ruidos, etc.), ésta fue evaluada en las condiciones más constantes posibles, tal y como se expresa en el apartado 3.3.2.

#### *Protocolo experimental*

Fueron utilizados lotes de 5 ratones machos a los que se les administró oral o intraperitonealmente, según conveniencia, las dosis correspondientes de los extractos, fracciones o productos en estudio, así como las sustancias patrones y el vehículo. A los 60 minutos de la administración oral, o 30 en el caso de la administración i.p., los animales fueron introducidos en los actógrafos circulares, donde permanecieron durante 15 minutos, transcurridos los cuales, se anotó el número de pasos dados por cada uno de los animales durante ese tiempo. Se realizó una segunda medida a las dos horas de la administración oral (o a la hora de la intraperitoneal) operando del mismo modo que antes.

Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para ver si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student.

### 3.3.7.2. Efecto directo sobre la temperatura corporal: Determinación de la temperatura rectal

Una amplia gama de psicofármacos altera la temperatura corporal de los animales de experimentación, por lo que la medida de tal parámetro se utiliza extensivamente como método de *screening*. La variación en la temperatura corporal es un parámetro objetivo que puede ser fácilmente medido y que puede ayudarnos no sólo a asignar un potencial hiper o hipotérmico a las distintas muestras ensayadas, sino también a determinar el pico hiper o hipotérmico (por medida regular de la temperatura rectal a distintos intervalos de tiempo) y la duración de la hipotermia (Thompson, 1990b).

En este test cabe destacar la importancia que tiene el hecho de que los animales se mantengan en una habitación termostatizada al menos tres días antes de comenzar las experiencias tal y como se indica en el apartado 3.3.2.

#### *Protocolo experimental*

Se utilizaron lotes de 5 ratones machos, seleccionándose previamente aquellos que tenían una temperatura rectal inicial ( $T_0$ ) comprendida entre 36 y 38 °C. A continuación se les administró vía oral o intraperitoneal, según conveniencia, las correspondientes dosis de vehículo, patrones y extractos, fracciones o productos problema. La temperatura se volvió a medir al cabo de una hora ( $T_1$ ), dos horas ( $T_2$ ), cuatro horas ( $T_4$ ), seis horas ( $T_6$ ) y veinticuatro horas ( $T_{24}$ ) después de la administración.

La temperatura rectal fue determinada con la ayuda de una sonda rectal YSI Co., Inc. n° 402. En todos los casos, las variaciones de temperatura de cada medida se expresaron con respecto a su valor inicial ( $T_0$ ) mediante la siguiente expresión:

$$\Delta T_X = T_{n0} - T_{nt}$$

Siendo:

$\Delta T_X$ : la variación de la temperatura para cada animal (n) en el momento de la medida t (las medidas efectuadas a la hora, dos, cuatro, seis y veinticuatro horas se corresponden respectivamente con  $\Delta T_1$ ,  $\Delta T_2$ ,  $\Delta T_4$ ,  $\Delta T_6$ ,  $\Delta T_{24}$ ).

$T_{n0}$ : el valor de la temperatura rectal antes de la administración del vehículo, productos patrones, extractos, fracciones o productos en estudio para cada animal n.

$T_{nt}$ : el valor de la temperatura rectal para cada animal n en el momento de medida t (1, 2, 4, 6 y 24 horas).

Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para comprobar si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student.

### **3.3.7.3. Actividad miorrelajante: Test de la tracción**

El test de la tracción se considera predictivo de una actividad relajante muscular de origen central (Boissier y cols., 1961).

En esta prueba los ratones fueron suspendidos por sus patas delanteras de un hilo metálico tenso y horizontal situado entre dos soportes. Para la interpretación de los resultados se asumió que en condiciones normales el ratón trata de tocar el hilo metálico con las patas traseras en menos de 5 segundos, cosa que no sucede cuando previamente se administra un relajante muscular.

#### ***Protocolo experimental***

Tras la administración oral o intraperitoneal a lotes de 5 ratones machos de las correspondientes dosis de los extractos, fracciones o productos a estudiar, las sustancias patrones y los vehículos, se anotó el tiempo que tardaban los animales en poner sus patas posteriores sobre el hilo metálico. Esta medida se realizó a los 60 y 120 minutos en el caso de la administración oral, y a los 30 y 60 minutos en el de la intraperitoneal. Se consideró como fracaso el hecho de que el ratón tardara en realizar esta operación más de cinco segundos.

Los resultados se expresaron como porcentaje de fracasos respecto al blanco, empleándose el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para el cálculo de la significación estadística.

### **3.3.7.4. Efecto sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico**

Las sustancias capaces de producir sedación e inducir el sueño suelen producir en los animales de experimentación una serie de efectos tales como ataxia, pérdida del

reflejo de enderezamiento, disminución de la actividad locomotora espontánea y sueño. El hecho de que alguno de estos efectos pueda ser observado fácilmente nos permite su utilización como método de valoración de la actividad sedante-hipnótica (Thompson, 1990c).

En este trabajo se ha seleccionado como método de evaluación de la sedación, la medida de la prolongación del sueño inducido por una dosis hipnótica de pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.). Para ello, se consideró que un ratón está dormido cuando al colocarlo en posición decúbito-dorsal permanece en dicha posición más de 30 segundos por tener abolido el reflejo de retorno (De Angelis, 1979; Sánchez-Mateo y cols., 2002).

### ***Protocolo experimental***

Se utilizaron lotes de 8-10 ratones hembra a los que se les administró oral o intraperitonealmente los extractos, fracciones o productos a estudiar, las sustancias patrones y los vehículos a las dosis correspondientes. Transcurridos 60 minutos, o 30 en el supuesto de la administración i.p., recibieron una dosis de 40 mg/kg de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal y se anotó el tiempo que tardaron en dormirse ( $t_1$ ), así como el tiempo que permanecieron dormidos ( $t_2$ ).

Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para ver si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student.

### **3.3.7.5. Actividad antidepresiva**

En experimentación se han utilizado numerosos modelos animales que permiten predecir la actividad antidepresiva de nuevos compuestos, estando la mayoría de ellos basados en la implicación de las monoaminas en los cambios de humor y en la observación empírica de que los antidepresivos clásicos, como los inhibidores de monoaminoxidasa (IMAO) y los antidepresivos tricíclicos, son activos en dichas pruebas (Bourin, 1990).

En este trabajo, los extractos, fracciones o productos en estudio han sido sometidos a una serie de pruebas basadas en la inducción de un estado depresivo en los animales de experimentación. Este estado depresivo fue inducido mediante

interacciones farmacológicas (interacción de los nuevos productos con agentes químicos que inducen un estado particular y comparar los efectos producidos con productos antidepressivos de reconocida eficacia antidepressiva) o bien a través de cambios conductuales (se induce un comportamiento particular por procedimientos no farmacológicos). Dado que no existe un modelo único y definitivo para considerar una molécula como antidepressivo, el análisis del conjunto de resultados obtenidos en los distintos ensayos permite determinar su potencial actividad antidepressiva.

#### ***3.3.7.5.1. Antagonismo frente a los efectos inducidos por la tetrabenacina***

Uno de los métodos clásicos referidos a la búsqueda de nuevas sustancias con potencial actividad antidepressiva consiste en el antagonismo a los efectos inducidos por la tetrabenacina. Este fármaco produce ptosis profunda, depresión de la actividad locomotora o exploratoria e hipotermia en los animales de experimentación (Smith y Vernier, 1978; Bourin, 1990); el hecho de que estos efectos puedan ser observados fácilmente nos permite su empleo como método de valoración.

#### ***Protocolo experimental***

A lotes de 5 ratones macho, cuya temperatura rectal inicial ( $T_0$ ) estuviera comprendida entre 36 y 38 °C, se les administró por vía oral las dosis correspondientes de los extractos, fracciones o productos en estudio, los productos patrones y el vehículo. Transcurrida una hora de la administración, recibieron vía intraperitoneal una inyección de 32 mg/kg de tetrabenacina pura disuelta en una solución de ácido tartárico 0.1 M que fue llevada a pH 6 con NaOH al 10 %.

Treinta minutos después de su administración, se colocaron los animales en un disco de 20 cm de diámetro donde se midió la actividad locomotora durante 10 segundos, en tres ocasiones consecutivas. Se consideró que un ratón no presentaba depresión locomotora cuando caminaba hacia el borde del disco y seguidamente miraba hacia un lado, o bien, movía la cabeza 90° en un sentido e inmediatamente después movía la cabeza en sentido contrario (Sánchez-Mateo y cols., 2002). Se calculó el porcentaje de actividad motora, empleándose el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para el cálculo de la significación estadística.

La medida de la ptosis se realizó de manera subjetiva 30 minutos después de la administración de la tetrabenacina, utilizando para su valoración la siguiente escala:

- 0: apertura parpebral normal.
- 1: párpados cerrados en  $\frac{1}{4}$ .
- 2: párpados cerrados en  $\frac{1}{2}$ .
- 3: párpados cerrados en  $\frac{3}{4}$ .
- 4: párpados totalmente cerrados.

Con los resultados obtenidos se realizó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para el cálculo de la significación estadística se empleó el test de Mann-Whitney para datos no paramétricos.

Asimismo, se midió la temperatura rectal a los 60 minutos después de la administración de la tetrabenacina, expresándose las variaciones de temperatura respecto a su valor inicial. Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con el correspondiente error estándar. Para ver si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student.

#### ***3.3.7.5.2. Depresión por desesperación comportamental: Test de Porsolt en ratones***

El método se basa en la observación de un ratón con alteraciones conductuales inducidas por estrés, lo que hace que el animal se quede quieto y simule la reducción de actividad que presenta una persona deprimida. Consiste en observar al animal cuando es obligado a nadar en un espacio restringido del cual no puede escapar. Después de un período inicial de vigorosa actividad natatoria, cesa todo movimiento activo realizando únicamente los necesarios para mantener la cabeza fuera del agua, adoptando una postura característica. Los fármacos antidepresivos reducen el tiempo de inmovilidad del ratón (Porsolt y cols., 1977).

#### ***Protocolo experimental***

Para la ejecución de este test, se utilizó una caja de vidrio en la que se introdujeron dos cilindros de plexiglás transparente de 10 cm de diámetro y 25 cm de altura, entre los que se colocó un panel opaco para evitar que los ratones pudieran verse entre sí. La caja fue llenada con agua a 24-26 °C hasta una altura de 10 cm.

Se administró por vía oral las correspondientes dosis de los extractos, fracciones o productos a estudiar, las sustancias patrones y los vehículos, a lotes de 8 ratones macho. Transcurridos 60 minutos de la administración, se colocó cada animal en el interior de cada cilindro, manteniéndolos en el mismo durante seis minutos. Los dos primeros minutos son de gran movilidad, por lo que se contabilizaron los segundos de inmovilidad durante los cuatro minutos siguientes.

Con los resultados obtenidos se calculó la media aritmética con su correspondiente error estándar. Para ver si la diferencia entre los valores medios de dos grupos era significativa o no se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student.

#### ***3.3.7.5.3. Efecto sobre la conducta inducida por el L-5-hidroxitriptófano (L-5-HTP)***

La administración de L-5-hidroxitriptófano (L-5-HTP) induce en los animales de experimentación un síndrome cuyos síntomas más destacados son sacudidas de cabeza, movimiento repetitivo dorso-ventral de pisada de las patas delanteras y postura extendida con el abdomen en contacto con el suelo. Estos efectos se han utilizado ampliamente como modelo para estudiar la activación de los receptores centrales de la serotonina (Jacobs, 1976; Van Dijk y cols., 1978).

En este trabajo, se estudió la posible potenciación de los efectos inducidos por una dosis de 75 mg/kg i.p. de L-5-HTP (que es aproximadamente la dosis eficaz 10, DE<sub>10</sub>). Es bien sabido que estos efectos son potenciados por los fármacos inhibidores de la monoaminoxidasa o aquellos que, preferente o selectivamente, inhiben la recaptación de serotonina (Shank y cols., 1987).

#### ***Protocolo experimental***

Las correspondientes dosis de los extractos, fracciones o productos a ensayar, las sustancias patrones y los vehículos fueron administrados oralmente a lotes de 5 ratones hembra. A la hora de la administración, recibieron intraperitonealmente L-5-HTP a una dosis de 75 mg/kg (DE<sub>10</sub>). Posteriormente, los ratones fueron colocados en recipientes de vidrio individuales y se anotó el número de sacudidas de cabeza para cada ratón en cinco intervalos de 2 minutos, comenzando 14 minutos después de la administración del L-5-HTP (es decir, en los intervalos entre 14-16, 24-26, 34-36, 44-46 y 54-56 minutos).

## ***4. RESULTADOS***

#### **4.1. *HYPERICUM GRANDIFOLIUM CHOISY***

##### **4.1.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO**

###### **4.1.1.1. Preparación de los extractos y fracciones**

El rendimiento obtenido para el extracto metanólico fue de un 24 % referido a planta seca. Parte de dicho extracto metanólico, se suspendió en agua y se hizo un reparto consecutivo con cloroformo y butanol, obteniéndose las fracciones clorofórmicas, butanólicas y acuosas, con un rendimiento del 33, 39 y 28 %, respectivamente.

###### **4.1.1.2. Pruebas clásicas de identificación fitoquímica**

Las pruebas que se citan a continuación se realizaron sobre el extracto metanólico de *H. grandifolium*.

Mediante las pruebas de identificación cualitativa descritas en el apartado 3.1.4. se estableció el tipo de principios que forman parte de la composición de esta especie vegetal. Las familias de compuestos analizadas fueron: alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas y taninos.

Para determinar la presencia de *alcaloides* se utilizaron los siguientes reactivos: reactivo de Bouchardat, reactivo de Mayer y reactivo de Dragendorff. No se obtuvo precipitado con ninguno de ellos, por lo que consideramos que no existen alcaloides en la muestra.

La identificación de las *antraquinonas* se realizó mediante la reacción de Bornträger, en la que se hace uso de la propiedad de estos compuestos de pasar a su forma enólica en medio básico (NaOH al 10 %). La observación de una coloración roja intensa confirmó su presencia.

La identificación de los *flavonoides* se ha realizado en base a su reactividad en presencia de hidrógeno. Para ello se utilizó la reacción de la cianidina, que dio positiva al observarse coloración rosa-rojo.

En cuanto a la identificación de *saponinas*, al añadir agua tibia y agitar se formó una espuma persistente, lo que junto a la coloración observada en la reacción de Liebermann-Burchard permite afirmar que *H. grandifolium* sí contiene saponinas.

Para determinar la presencia de *taninos* se han realizado las siguientes reacciones de identificación:

Con gelatina salada todos los taninos, hidrolizables y condensados, forman un precipitado floculoso. Como dio positivo, añadimos al filtrado anterior el reactivo de Stiasny que permitió confirmar, además, la presencia de catequinas libres al formarse un precipitado rosado.

Para determinar el tipo de tanino existente: hidrolizable, catéquico o ambos, añadimos el reactivo de Stiasny y calentamos. La aparición de un precipitado floculoso confirmó la existencia de taninos catéquicos. Para saber si además había taninos hidrolizables, se realizó una filtración y el filtrado fue ensayado con acetato sódico en polvo y unas gotas de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , apareciendo una coloración azul que confirmó la existencia de taninos hidrolizables.

En base a estos resultados, podemos afirmar que en *H. grandifolium* existen antraquinonas, flavonoides, saponinas, taninos hidrolizables, condensados y catequinas libres.

#### **4.1.1.3. Fracción butanólica de *Hypericum grandifolium***

Los flavonoides hiperósido (Rf, 0.6) y quercitrina (Rf, 0.8) fueron identificados en esta fracción empleando técnicas cromatográficas en capa fina, utilizando para ello muestras comerciales de estos productos y acetato de etilo/ácido acético/ácido fórmico/agua (100:11:11:27) como sistema eluyente (Wagner y cols., 1984). La rutina (Rf, 0.4), flavonoide ampliamente extendido en este género, no pudo ser identificada por esta técnica. Por su parte, la quercetina fue eluída junto con el frente del disolvente y fue identificada eluyéndola con  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  25% y comparándola con un patrón (Rf, 0.6).

#### **4.1.1.4. Fracción clorofórmica de *Hypericum grandifolium*: Obtención de subfracciones**

La cromatografía analítica en capa fina mostró que el sistema eluyente más adecuado para separar los productos de esta fracción clorofórmica era Hex/AcOEt al 10 %, por lo que se preparó una columna cromatográfica que fue eluída sucesivamente con Hex/AcOEt al 2, 5 y 10 %. Como fase estacionaria se utilizó silicagel Kieselgel 60 (230-400 mesh ASTM) de la casa Merck desactivada al 13 %.

Los eluatos recogidos fueron concentrados y analizados por CCF y, en base a ello, fueron reunidos y clasificados en diferentes subfracciones de acuerdo con su composición. Estas subfracciones fueron llamadas F1, F2 y F3 por orden de polaridad creciente (tabla 2).

**Tabla 2.** Obtención de subfracciones a partir de la fracción clorofórmica de *Hypericum grandifolium*

Subfracciones	Eluyente	Rendimiento	Observaciones
F1	Hex / AcOEt 2 %	17.8 %	Mezcla compleja
F2	Hex / AcOEt 5 %	11.3 %	Mezcla compleja
F3	Hex / AcOEt 10 %	8.8 %	Mezcla compleja

El análisis por CCF con el agente revelador reactivo de Godin, indica que las subfracciones F1, F2 y F3 contienen derivados del floriglucinol, tal y como sucede con otras especies de este género (Godin, 1954; Rocha y cols., 1995; Viana y cols., 2005).

#### 4.1.1.5. Análisis fitoquímico mediante CLAR-ESI-EM/EM

El *screening* fitoquímico realizado mediante técnicas CLAR-ESI-EM/EM sobre el extracto metanólico de *H. grandifolium* reveló su contenido en hiperforina y algunos flavonoides (hiperósido, quercetina y quercitrina), mientras que las naftodiantronas (hipericina, pseudohipericina, protohipericina, protopseudohipericina), el ácido clorogénico o los flavonoides dihidroquercitrina, I2,II8-biapigenina y rutina no fueron detectados en el mismo.

El contenido del extracto metanólico en siete compuestos característicos de este género se muestra en la tabla 3, expresado con respecto a la planta seca (mg/g material vegetal). Las concentraciones en las que han sido encontrados los compuestos hiperforina, hiperósido, quercetina y quercitrina (mg/g) en el extracto metanólico y sus fracciones, así como en las subfracciones clorofórmicas, son dadas en la tabla 4.

**Tabla 3.** Contenido en quercetina, quercitrina, rutina, hiperósido, hipericina, pseudohipericina e hiperforina (mg/g material vegetal) en *Hypericum grandifolium*

Quercetina	Quercitrina	Rutina	Hiperósido	Hipericina	Pseudohipericina	Hiperforina
7.6	6.2	-	1.7	-	-	< 0.1

**Tabla 4.** Concentración en metabolitos secundarios (mg/g) del extracto metanólico, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium*

	Quercetina	Quercitrina	Hiperósido	Hiperforina
Extracto metanólico	31.7	26.0	7.1	< 0.5
Fracción Acuosa	< 0.5	< 0.5	< 0.5	-
Fracción butanólica	82.0	58.1	15.9	< 0.5
Fracción clorofórmica	6.0	1.1	< 0.5	-
F1	< 0.5	< 0.5	-	-
F2	< 0.5	< 0.5	-	-
F3	< 0.5	< 0.5	-	-

Los tiempos de retención, precursores y productos iónicos, junto con las energías de colisión de los compuestos estándar estudiados, se muestran en la tabla 5. Los coeficientes de correlación alcanzados en la curvas de calibrado fueron de 0.997 para pseudohipericina, 0.995 para hipericina, 0.993 para hiperforina, 0.998 para rutina, 0.997 para hiperósido, 0.996 para quercetina y 0.998 para quercitrina. La desviación estándar relativa de los compuestos investigados osciló entre 1.7-5.2 %.

**Tabla 5.** Tiempos de retención, precursores iónicos, productos iónicos y energías de colisión para los compuestos analizados: pseudohipericina, hipericina, hiperforina, rutina, hiperósido, quercitrina y quercetina

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Precursor iónico (m/z) [M-H] <sup>+</sup>	Producto iónico (m/z)	Energía de colisión (eV)
Pseudohipericina <sup>a</sup>	14.6	519.3	487.0	52
Hipericina <sup>a</sup>	16.0	503.2	405.0	57
Hiperforina <sup>a</sup>	15.0	535.5	313.1	40
Rutina <sup>b</sup>	15.3	609.2	300.0	40
Hiperósido <sup>b</sup>	15.6	463.0	300.0	34
Quercitrina <sup>b</sup>	16.0	447.1	300.0	32
Quercetina <sup>b</sup>	17.0	300.9	151.0	30

a = Compuestos analizados bajo las condiciones CLAR-ESI-EM/EM-I.

b = Compuestos analizados bajo las condiciones CLAR-ESI-EM/EM-II.

#### 4.1.1.6. Análisis fitoquímico mediante CLAR-ESI-EM-TF

El *screening* fitoquímico realizado sobre las subfracciones F1, F2 y F3 mediante análisis CLAR-ESI-EM-TF, revela la presencia de un compuesto con fórmula molecular  $C_{38}H_{50}O_4$  (570.36413 m/z) en la subfracción F1, de los compuestos  $C_{33}H_{42}O_4$  (502.30124 m/z),  $C_{33}H_{42}O_5$  (518.29638 m/z) y  $C_{33}H_{44}O_6$  (536.30675 m/z) en la

subfracción F2, y de  $C_{35}H_{52}O_5$  (552.37469  $m/z$ ),  $C_{33}H_{42}O_4$  (502.30124  $m/z$ ) y  $C_{33}H_{42}O_5$  (518.29638  $m/z$ ) en la subfracción F3 (tabla 6).

**Tabla 6.** Datos espectrales ESI-EM-TF de los compuestos presentes en las subfracciones obtenidas de la fracción clorofórmica de *Hypericum grandifolium*

Subfracciones	( $m/z$ ) ([M-H])	Composición elemental	Error (ppm)
F1	569.36413	$C_{38}H_{50}O_4$	0.872
F2	535.30675	$C_{33}H_{44}O_6$	0.443
F2 y F3	501.30124	$C_{33}H_{42}O_4$	0.412
F2 y F3	517.29638	$C_{33}H_{42}O_5$	0.835
F3	551.37469	$C_{35}H_{52}O_5$	2.191

Cuando se operó en modo positivo, los compuestos con fórmula molecular  $C_{38}H_{50}O_4$ ,  $C_{33}H_{42}O_5$  y  $C_{33}H_{42}O_4$  dieron un ion cuya  $m/z$  fue 105 ( $C_6H_5CO^+$ ), sugiriendo la presencia en sus moléculas de una fenil cetona no sustituida. El compuesto de fórmula molecular  $C_{33}H_{42}O_5$  podría ser un derivado poliprenilado del benzoilfloroglucinol, que podría tratarse de una de las sampsonionas (B, G o L), presentes en *H. sampsonii* (Hu y Sim, 2000), o del 8-benzoil-4 $\alpha$ -(1-hidroxi-1-metiletil)-7, 7-dimetil-1,3-di (3-metil-2-butenil) triciclo [4.3.1.1<sup>3,8</sup>] undecano-2, 9, 11-triona, encontrado en *Clusia obdeltifolia* (Cruz y Teixeira, 2004). El compuesto de fórmula molecular  $C_{33}H_{44}O_6$  es probablemente el 7 $\alpha$ -H-1-benzoil-4-hidroxi-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-6,6,13,13-tetrametil-11-(3-metil-2-butenil)-5-oxatetraciclo [7.3.1.0<sup>3,7,0<sup>4,11</sup></sup>] tridecano-2,12-diona, encontrado en *C. obdeltifolia* (Cruz y Teixeira, 2004). Asimismo, existe la posibilidad de que los compuestos  $C_{38}H_{50}O_4$ ,  $C_{33}H_{42}O_4$  y  $C_{35}H_{52}O_5$  sean también derivados benzofenónicos.

## 4.1.2. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

### 4.1.2.1. Actividad analgésica

#### 4.1.2.1.1. Efecto sobre los estiramientos inducidos por ácido acético en ratón

La administración intraperitoneal de ácido acético en ratón produce una serie de constricciones abdominales con los consecuentes estiramientos de las extremidades posteriores. Como puede observarse en la tabla 7, los extractos y fracciones estudiados, con la excepción de la infusión, redujeron significativamente el número de estiramientos producidos por el ácido acético en los animales de experimentación, presentando entre un 28 y 50 % de inhibición. Debemos destacar en este sentido el valor encontrado para la fracción clorofórmica a la dosis de 500 mg/kg p.o. (50 %), el cual está próximo al obtenido para el ibuprofeno (fármaco utilizado como referencia, 65 %).

**Tabla 7.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* sobre los estiramientos inducidos por ácido acético en ratones

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	Número de estiramientos (x ± ε)	% Inhibición
Control	-	49.20 ± 3.39	-
Infusión	2500	54.82 ± 7.92	0.00
Extracto metanólico	500	34.36 ± 5.28 *	30.16
	1000	35.57 ± 4.77 *	27.70
Fracción acuosa	500	30.57 ± 4.65 **	37.86
Fracción butanólica	500	31.44 ± 4.58 **	36.10
Fracción clorofórmica	500	24.58 ± 2.87 **	50.04
Ibuprofeno	50	17.40 ± 1.51 **	64.63
Control	-	49.25 ± 2.98	-
F1	45	43.67 ± 4.05	11.33
F2	45	31.83 ± 3.59 **	35.37
F3	45	35.42 ± 3.36 **	28.08
Diclofenaco	45	19.17 ± 2.05 **	61.07

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student).  
Los resultados están expresados como la media ± error estándar (n = 12-20 animales).

Los interesantes resultados obtenidos nos llevaron a realizar esta prueba en tres subfracciones obtenidas de esta fracción, encontrándose que sólo las subfracciones F2 y F3 produjeron una disminución significativa de los estiramientos, con porcentajes de inhibición de 35 y 28, respectivamente, que como puede observarse son claramente inferiores a los mostrados por la fracción clorofórmica de la que se obtuvieron.

#### 4.1.2.1.2. Efecto sobre la hiperalgesia inducida por formalina

La inyección de formalina en la pata del ratón produce una irritación celular a nivel local, ocasionando una sensación de ardor o quemazón que lleva al ratón a lamerse la pata afectada. El efecto doloroso se presenta en el ratón unos segundos después de administrada la formalina, denominándose al período que se da en los primeros cinco minutos fase primera, que se caracteriza principalmente por la activación a nivel de nociceptores. Aproximadamente 15-30 minutos después de la administración de formalina el ratón vuelve a sentir dolor y comienza a lamerse nuevamente la pata, denominándose a este período fase segunda, en la que participan mediadores proinflamatorios como PGE<sub>2</sub>, entre otros (Hunskaar y Hole, 1987).

**Tabla 8.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* sobre la nocicepción inducida por formalina en ratón

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	Duración de la respuesta dolorosa (s)		% Inhibición	
		Primera fase (0-5 min) (x ± ε)	Segunda fase (15-30 min) (x ± ε)	Primera fase	Segunda fase
Control	-	113.20 ± 5.90	215.64 ± 13.29	-	-
Infusión	2500	114.65 ± 4.32	174.69 ± 15.38	0.00	18.99
Extracto metanólico	1000	93.25 ± 6.64 *	158.39 ± 22.74*	17.62	26.55
Fracción acuosa	500	104.21 ± 8.64	184.58 ± 21.64	7.94	14.40
Fracción butanólica	500	99.51 ± 7.65	174.05 ± 15.03	12.09	19.29
Fracción clorofórmica	500	72.86 ± 5.31**	101.29 ± 15.86 **	35.64	53.03
Morfina <sup>a</sup>	10	55.60 ± 8.61**	50.40 ± 20.66 **	50.88	76.63
Control	-	111.64 ± 5.40	211.68 ± 14.80	-	-
F1	45	99.48 ± 4.94	171.03 ± 17.24	10.89	19.20
F2	45	97.26 ± 8.33	147.64 ± 16.42 **	12.88	30.25
F3	45	92.87 ± 6.01*	166.82 ± 15.32*	16.81	21.19
Diclofenaco	45	106.40 ± 9.30	140.67 ± 19.72 **	4.69	33.54
Petidina <sup>b</sup>	25	75.75 ± 12.99 **	40.57 ± 19.32 **	32.15	80.83

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student); n = 12-18 animales.

<sup>a</sup> La morfina fue ensayada a la dosis de 10 mg/kg i.p. y administrada 30 min antes de la inyección de la formalina.

<sup>b</sup> La petidina fue ensayada a la dosis de 25 mg/kg i.p. y administrada 30 min antes de la inyección de la formalina.

Tras la realización de la prueba de la formalina, se encontró que sólo el extracto metanólico (1000 mg/kg p.o.) y la fracción clorofórmica (500 mg/kg p.o.) inhibieron significativamente tanto la primera (fase de respuesta neurogénica) como la segunda fase (fase de respuesta inflamatoria) del efecto doloroso producido después de la administración de la formalina, si bien destaca el efecto de la fracción clorofórmica con

un 36 y 53 % de inhibición (tabla 8). Cuando se ensayaron las subfracciones, se observó que la F3 inhibió significativamente ambas fases, la subfracción F2 sólo inhibió la segunda fase, mientras que la F1 no afecta a ninguna de las fases. Como era de esperar, la morfina (opiáceo utilizado como referencia) reduce ambas fases, mientras que el diclofenaco (AINE de referencia) sólo afecta significativamente a la fase segunda.

#### 4.1.2.1.3. Efecto sobre el tiempo de reacción en el test del tail-flick

Los resultados obtenidos en el test del *tail-flick* (sacudida de la cola), prueba útil para determinar el posible efecto analgésico central de estos productos, se muestran en la tabla 9. Como puede observarse, tanto la fracción clorofórmica como la subfracción F3 aumentaron significativamente el tiempo de reacción en los animales de experimentación en esta prueba, destacando en este sentido la subfracción F3 que a la dosis ensayada alcanzó significación estadística tanto a los 60 como a los 120 minutos de la administración. No obstante, en ninguno de los casos los valores encontrados fueron superiores a los mostrados por la petidina, analgésico narcótico utilizado como referencia.

**Tabla 9.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* en el test del tail-flick

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	t <sub>0</sub> (s) (x ± ε)	t <sub>1</sub> (s) (x ± ε)	t <sub>2</sub> (s) (x ± ε)
Control	-	2.41 ± 0.14	2.47 ± 0.16	2.79 ± 0.15
Extracto metanólico	1000	2.41 ± 0.17	2.48 ± 0.21	3.33 ± 0.28
Fracción acuosa	500	1.95 ± 0.20	2.07 ± 0.17	2.03 ± 0.19*
Fracción butanólica	500	2.18 ± 0.15	2.75 ± 0.28	3.09 ± 0.41
Fracción clorofórmica	500	2.28 ± 0.15	3.27 ± 0.35 *	3.11 ± 0.30
Petidina	50	2.65 ± 0.16	3.68 ± 0.36 **	3.92 ± 0.31**
Control	-	2.33 ± 0.12	2.51 ± 0.13	2.41 ± 0.13
F1	45	2.40 ± 0.11	2.99 ± 0.28	2.85 ± 0.23
F2	45	2.40 ± 0.12	2.88 ± 0.28	2.91 ± 0.22
F3	45	2.48 ± 0.90	3.18 ± 0.16 **	3.14 ± 0.20**
Petidina +	40	2.55 ± 0.14	4.62 ± 0.35 **	4.02 ± 0.42**

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student); n = 10 animales.

t<sub>x</sub> = tiempo que tarda el ratón en sacudir la cola antes (t<sub>0</sub>), a la hora (t<sub>1</sub>) y a las 2 horas (t<sub>2</sub>) de la administración.

+ La petidina fue ensayada a la dosis de 40 mg/kg i.p.

#### 4.1.2.2. Actividad antiinflamatoria

##### 4.1.2.2.1. Efecto sobre el edema plantar inducido por carragenina en ratón

Según se observa en la tabla 10, todos los extractos, fracciones y subfracciones estudiados administrados por vía oral, con excepción de la F3, inhibieron significativamente, aunque de forma moderada, el edema inducido por carragenina en la pata del ratón a la 4ª h después del estímulo inflamatorio, con valores entre el 18 y el 31 % de inhibición. El efecto antiinflamatorio de estos extractos estudiados ha sido equivalente al observado después del tratamiento con diclofenaco e indometacina a la dosis de 50 mg/kg p.o. (27 y 40 %, respectivamente).

**Tabla 10.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* sobre el edema inducido por carragenina en ratón

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	Peso de edema (4ª h) (x ± ε) (mg)	% Inhibición
Control	-	80.23 ± 3.29	-
Infusión	2500	65.47 ± 4.05**	18.39
Extracto metanólico	1000	58.14 ± 3.81**	27.53
Fracción acuosa	500	61.17 ± 4.24**	23.76
Fracción butanólica	500	57.10 ± 3.20**	28.82
Fracción clorofórmica	500	55.62 ± 4.76**	30.67
Diclofenaco	50	58.43 ± 3.25**	27.17
Indometacina	50	48.32 ± 3.05**	39.77
Control	-	76.94 ± 3.58	-
F1	45	59.65 ± 4.80*	22.47
F2	45	55.57 ± 3.65**	27.77
F3	45	68.02 ± 4.12	11.59
Indometacina	50	56.15 ± 3.97**	27.02

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con control (ANOVA seguido del test de Student).  
Los resultados están expresados como la media ± error estándar (n = 6-12 animales).

##### 4.1.2.2.2. Efecto sobre el proceso inflamatorio inducido por el tetradecanoil-forbol-acetato (TPA)

Los datos obtenidos de esta prueba se recogen en la tabla 11. Vemos que la administración vía tópica de todos los extractos, fracciones y subfracciones ensayadas, con excepción de la infusión, produjo una disminución significativa del edema ocasionado en oreja por el TPA, destacando el extracto metanólico, la fracción clorofórmica, así como las subfracciones F2 y F3, que a la dosis de 1 mg/oreja

alcanzaron un nivel de protección superior al 60 %. Es de señalar que la inhibición presentada por las subfracciones F2 y F3 (1 mg/oreja) ha sido muy similar a la mostrada por la fracción clorofórmica a la misma dosis. Por otra parte, el compuesto de referencia dexametasona produce, como era de esperar, a la dosis de 0.1 mg/oreja una marcada inhibición del edema (80 %), mientras que la indometacina a la dosis de 1 mg/oreja produjo una inhibición del 33 %.

**Tabla 11.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* sobre el edema inducido por aplicación tópica de TPA en ratón

Tratamiento	Dosis mg/oreja	Peso de edema (mg) ( $\bar{x} \pm \epsilon$ )	% Inhibición
Control	-	8.30 $\pm$ 0.47	-
Infusión	1.00	8.23 $\pm$ 0.85	0.84
Extracto metanólico	0.25	7.68 $\pm$ 0.68	7.47
	0.50	3.09 $\pm$ 0.61 **	62.77
	1.00	2.87 $\pm$ 0.39 **	65.42
Dexametasona	0.10	1.16 $\pm$ 0.25 **	86.02
Control	-	9.87 $\pm$ 0.44	-
Fracción acuosa	0.50	10.56 $\pm$ 0.75	0.00
	1.00	6.78 $\pm$ 0.63 **	31.31
Fracción butanólica	0.25	4.06 $\pm$ 0.42 **	58.86
	0.50	6.00 $\pm$ 0.67 **	39.21
	1.00	5.72 $\pm$ 0.73 **	42.05
Fracción clorofórmica	0.25	6.53 $\pm$ 0.85 **	33.84
	0.50	6.12 $\pm$ 1.02 **	37.99
	1.00	3.57 $\pm$ 0.63 **	63.83
Indometacina	1.00	6.61 $\pm$ 2.92 **	33.03
Control	-	10.92 $\pm$ 0.40	-
F1	0.50	9.10 $\pm$ 0.51	16.69
	1.00	6.63 $\pm$ 0.67 **	39.28
F2	0.50	6.74 $\pm$ 0.75 **	38.28
	1.00	3.55 $\pm$ 0.55 **	67.49
F3	0.50	6.08 $\pm$ 0.95 **	44.32
	1.00	4.25 $\pm$ 0.60 **	61.08
Dexametasona	0.10	2.17 $\pm$ 0.60 **	80.13

\*\* p < 0.01 comparado con control (ANOVA seguido del test de Student).

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  error estándar (n = 12 –18 animales).

### 4.1.2.3. Actividad sobre el sistema nervioso central

#### 4.1.2.3.1. Efecto sobre la actividad motora espontánea

Los resultados obtenidos en el estudio de los posibles efectos sobre la actividad motora espontánea se muestran en la tabla 12. En ella se observa que las fracciones y las subfracciones en estudio ejercieron un efecto escaso sobre dicha actividad, ya que no modificaron de forma significativa el número de pasos a la dosis ensayada, a excepción de la fracción butanólica que produjo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la actividad motora en un 23 % a los 60 minutos de la administración. No obstante, en ningún caso los valores obtenidos alcanzaron el grado de depresión motora mostrado por la clorpromacina (entre un 70 y un 80 %), fármaco utilizado como referencia.

**Tabla 12.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* sobre la actividad motora espontánea

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	Número de pasos ( $\bar{x} \pm \epsilon$ )	
		60 min	120min
Control	-	221.90 $\pm$ 12.51	152.55 $\pm$ 14.72
Fracción acuosa	500	230.20 $\pm$ 21.51	142.00 $\pm$ 29.02
Fracción butanólica	500	170.40 $\pm$ 19.03 *	132.40 $\pm$ 15.99
Fracción clorofórmica	500	198.40 $\pm$ 18.58	127.55 $\pm$ 17.83
Clorpromacina	5	42.05 $\pm$ 8.52 **	26.95 $\pm$ 6.62 **
Control	-	242.17 $\pm$ 22.03	134.67 $\pm$ 23.49
F1	45	220.37 $\pm$ 18.63	121.87 $\pm$ 29.00
F2	45	204.50 $\pm$ 17.95	99.87 $\pm$ 19.11
F3	45	224.33 $\pm$ 25.37	102.33 $\pm$ 19.80
Clorpromacina	5	69.75 $\pm$ 15.66 **	32.28 $\pm$ 7.43 **

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student); n = 8-10 animales.

#### 4.1.2.3.2. Efecto directo sobre la temperatura rectal

En la tabla 13 se observan los resultados obtenidos en esta experiencia. En conjunto, podemos observar que las fracciones y subfracciones en estudio no ejercieron un efecto significativo sobre la temperatura rectal, a excepción de la fracción clorofórmica que produjo una ligera, pero significativa, hipotermia a la hora de la administración, pero sin alcanzar los valores obtenidos para la clorpromacina (fármaco

de referencia), que ocasionó una hipotermia significativa que se mantuvo hasta la 4<sup>a</sup> hora de la administración.

**Tabla 13.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* sobre la temperatura rectal (°C)

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	$\Delta T_1$ (x $\pm$ $\epsilon$ )	$\Delta T_2$ (x $\pm$ $\epsilon$ )	$\Delta T_4$ (x $\pm$ $\epsilon$ )	$\Delta T_6$ (x $\pm$ $\epsilon$ )	$\Delta T_{24}$ (x $\pm$ $\epsilon$ )
Control	-	1.15 $\pm$ 0.20	1.38 $\pm$ 0.22	1.96 $\pm$ 0.24	0.98 $\pm$ 0.29	0.99 $\pm$ 0.25
Fracción acuosa	500	1.74 $\pm$ 0.20	1.56 $\pm$ 0.77	2.22 $\pm$ 0.22	0.99 $\pm$ 0.34	1.80 $\pm$ 0.26*
Fracción butanólica	500	0.69 $\pm$ 0.24	1.74 $\pm$ 0.26	$\pm$ 0.37 1.30	1.34 $\pm$ 0.42	0.55 $\pm$ 0.21
Fracción clorofórmica	500	2.06 $\pm$ 0.28*	1.66 $\pm$ 0.20	$\pm$ 0.22* 1.09	0.87 $\pm$ 0.32	0.81 $\pm$ 0.25
Clorpromacina	5	5.42 $\pm$ 0.68**	6.20 $\pm$ 0.82**	$\pm$ 1.47** 6.12	0.62 $\pm$ 0.36	0.40 $\pm$ 0.36
Control	-	0.14 $\pm$ 0.20	0.27 $\pm$ 0.15	$\pm$ 0.15 0.51	0.57 $\pm$ 0.13	0.19 $\pm$ 0.38
F1	45	0.59 $\pm$ 0.23	0.75 $\pm$ 0.18	$\pm$ 0.09 0.52	0.94 $\pm$ 0.11*	0.21 $\pm$ 0.20
F2	45	0.17 $\pm$ 0.20	0.34 $\pm$ 0.11	$\pm$ 0.13 0.87	0.72 $\pm$ 0.09	0.12 $\pm$ 0.25
F3	45	0.59 $\pm$ 0.29	0.24 $\pm$ 0.14	$\pm$ 0.18 0.62	0.58 $\pm$ 0.16	0.21 $\pm$ 0.28
Clorpromacina	5	2.67 $\pm$ 0.35**	3.77 $\pm$ 0.70**	$\pm$ 0.31** 1.57	1.42 $\pm$ 0.12**	0.32 $\pm$ 0.23

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student); n = 8-10 animales.

$\Delta T_x = T_{n0} - T_{nt}$ ;  $T_{n0}$  = valor de T<sup>a</sup> rectal antes de la administración de los productos para cada animal n;  $T_{nt}$  = valor de la T<sup>a</sup> rectal para cada animal n en el tiempo de medida t (1, 2, 4, 6 y 24 horas).

#### 4.1.2.3.3 Actividad miorrelajante: Test de la tracción

Para evidenciar el posible efecto miorrelajante, las fracciones y subfracciones en estudio fueron sometidas al test de la tracción.

Tras la realización de esta prueba se encontró que no produjeron efectos de esta naturaleza a la dosis ensayada (datos no mostrados por ser nulos), a diferencia de la clorpromacina, cuya actividad relajante muscular es perfectamente conocida, que logró un 100 % de fracasos.

#### 4.1.2.3.4. Efecto sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico

Una de las pruebas clásicas de interacción central consiste en cuantificar la interacción con un barbitúrico de acción corta como es el pentobarbital sódico. Los datos obtenidos en esta experiencia se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.)

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o	Ti (x ± ε)(min)	Ts (x ± ε)(min)
Control	-	3.37 ± 0.10	39.99 ± 2.75
Fracción acuosa	500	3.49 ± 0.29	33.49 ± 4.00
Fracción butanólica	500	3.43 ± 0.40	45.22 ± 4.12
Fracción clorofórmica	500	3.04 ± 0.12*	67.55 ± 4.04 **
Clorpromacina	5	2.88 ± 0.53 **	105.58 ± 8.77 **
Control	-	3.88 ± 0.21	52.49 ± 5.29
F1	45	3.87 ± 0.58	72.55 ± 8.39
F2	45	3.33 ± 0.46	67.51 ± 7.46
F3	45	3.66 ± 0.41	67.42 ± 3.47 *
Clorpromacina	5	2.48 ± 0.37 **	130.58 ± 14.74 **

Ti = tiempo de inducción al sueño; Ts = tiempo de sueño.

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student); n = 10-16 animales.

Se observa en ella que sólo la fracción clorofórmica potencia la acción del barbitúrico, alargando significativamente el tiempo que los animales permanecen dormidos y acortando de forma significativa el tiempo de inducción del sueño, al igual que la clorpromacina, fármaco utilizado como referencia, de conocido efecto sedante. Además, cuando se ensayaron las subfracciones obtenidas de esta fracción, se encontró que sólo la F3 aumentó de forma significativa la duración del sueño, si bien no alcanzó los valores obtenidos para la fracción clorofórmica ni para la clorpromacina.

#### 4.1.2.3.5. Antagonismo a la tetrabenacina

Los resultados obtenidos tras la realización de esta prueba clásica para evidenciar actividad antidepresiva se recogen en la tabla 15. En ella observamos que ninguna de las fracciones y subfracciones ensayadas antagonizaron significativamente los efectos inducidos por la tetrabenacina en los animales de experimentación, con excepción de la fracción clorofórmica que a la dosis ensayada sólo antagonizó

significativamente ( $p < 0.01$ ) la ptosis inducida por dicha sustancia. Se ha observado que los productos que antagonizan sólo la ptosis parecen tener un efecto alfa-adrenérgico o serotoninérgico (Bourin, 1990). Como era de esperar, la imipramina (antidepresivo tricíclico clásico utilizado como referencia) antagonizó significativamente todos los efectos inducidos por la tetrabenacina (ptosis, depresión motora e hipotermia).

**Tabla 15.** Interacción de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* con la tetrabenacina

Tratamiento	Dosis	Ptosis	Actividad locomotora	Variación de la temperatura
	mg/kg p.o.	( $x \pm \epsilon$ ) (30 min)	(%) (30 min)	( $x \pm \epsilon$ ) (°C) (60 min)
Control	-	3.58 $\pm$ 0.12	0.00	6.30 $\pm$ 0.36
Fracción acuosa	500	3.00 $\pm$ 0.30	30.00	5.48 $\pm$ 0.42
Fracción butanólica	500	3.20 $\pm$ 0.25	30.00	6.26 $\pm$ 0.46
Fracción clorofórmica	500	2.36 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	14.28	6.20 $\pm$ 0.29
Imipramina	25	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	100.00 <sup>b</sup>	0.96 $\pm$ 0.20 **
Control	-	4.00 $\pm$ 0.00	0.00	7.20 $\pm$ 0.70
F1	45	3.83 $\pm$ 0.17	16.67	7.90 $\pm$ 0.55
F2	45	3.50 $\pm$ 0.22	33.33	6.07 $\pm$ 0.54
F3	45	3.67 $\pm$ 0.21	16.67	5.45 $\pm$ 0.82
Imipramina	25	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	100.00 <sup>b</sup>	1.05 $\pm$ 0.32 **

<sup>a</sup>  $p < 0.01$  comparado con el control (test de Mann-Whitney); <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparado con el control (test de  $\chi^2$ ).

\*\*  $p < 0.01$  comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student);  $n = 10$  animales.

#### 4.1.2.3.6. Depresión por desesperación comportamental: Test de Porsolt

El test de Porsolt es una prueba conductual clásica para detectar productos con posible actividad antidepresiva, que se basa en la observación de un ratón cuando es obligado a nadar en una situación de la que no puede escapar; después de un período inicial de vigorosa actividad natatoria, cesa todo movimiento activo, realizando únicamente los movimientos necesarios para mantener la cabeza por encima del agua, adoptando una postura característica (Porsolt y cols., 1977; Bourin, 1990). Los antidepresivos reducen el tiempo en el cual el ratón permanece inmóvil.

Como se puede observar en la tabla 16, todas las fracciones estudiadas resultaron ser activas en este test, puesto que redujeron significativamente el tiempo de inmovilidad, destacando los valores encontrados para la fracción clorofórmica (500

mg/kg p.o.), que son muy próximos a los mostrados por la imipramina (30 mg/kg p.o.), antidepresivo utilizado como referencia.

**Tabla 16.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* en el test de Porsolt

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	Tiempo de inmovilidad (x ± ε) (s)	% Variación
Control	-	166.30 ± 5.56	-
Fracción acuosa	500	145.12 ± 9.81 *	-12.74
Fracción butanólica	500	134.93 ± 8.60 **	-18.86
Fracción clorofórmica	500	115.00 ± 5.84 **	-30.85
Imipramina	30	114.20 ± 8.49 **	-31.33
Control	-	182.95 ± 6.59	-
F1	45	145.05 ± 7.43 **	-20.72
F2	45	153.24 ± 8.22 **	-16.24
F3	45	158.40 ± 8.04 *	-13.42
Imipramina	45	116.53 ± 9.02 **	-36.30

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student); n = 16-20 animales.

Asimismo, las subfracciones F1, F2 y F3 obtenidas de la fracción clorofórmica lograron entre un 13 y un 21 % de reducción significativa del tiempo de inmovilidad, aunque sin alcanzar los valores obtenidos por la fracción clorofórmica y la imipramina. Esto nos sugiere que es necesaria la sinergia de los diferentes componentes para manifestarse la actividad antidepresiva.

Debemos comentar que la reducción del tiempo de inmovilidad observada para las fracciones y subfracciones no se relaciona con efectos estimulantes, ya que estas no modificaron significativamente o disminuyeron la actividad motora a las dosis activas en dicha prueba (Bourin, 1990; Sánchez-Mateo y cols., 2002, 2005).

#### **4.1.2.3.7. Efecto sobre la conducta inducida por el L-5-hidroxitriptófano (L-5-HTP)**

El test de potenciación del L-5-HTP se utilizó para evaluar la actividad *in vivo* de los productos en estudio sobre la serotonina. Los síntomas del síndrome serotoninérgico resultante de la administración a roedores de una dosis umbral de L-5-HTP (75 mg/kg i.p.) pueden ser potenciados por inhibidores de la MAO o de la recaptación de serotonina (Shank y cols., 1987).

Tras la administración del L-5-HTP se encontró que sólo la fracción butanólica potenció significativamente las sacudidas de cabeza a la dosis de 500 mg/kg p.o. (tabla 17), aunque sin alcanzar los valores mostrados por la fluoxetina (100 mg/kg p.o.), fármaco antidepresivo utilizado como referencia que inhibe preferentemente la recaptación de serotonina.

**Tabla 17.** Efecto de los extractos, fracciones y subfracciones de *Hypericum grandifolium* sobre la conducta inducida por L-5-HTP (75 mg/kg i.p.) en ratón

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	Nº de sacudidas de cabeza (x ± ε)	Síndrome <sup>a</sup> (x ± ε)
Control	-	0.36 ± 0.17	0.28 ± 0.16
Fracción butanólica	500	2.90 ± 0.97 **	1.70 ± 0.47 <sup>b</sup>
Fracción clorofórmica	500	0.20 ± 0.20	0.20 ± 0.20
Fluoxetina	100	23.33 ± 2.88 **	24.53 ± 0.19 <sup>c</sup>

\*\* p < 0.01 comparado con control (test de Student).<sup>b</sup> p < 0.05 comparado con control (test de Mann-Whitney).<sup>c</sup> p < 0.01 comparado con control (test de Mann-Whitney); n = 10 animales.

<sup>a</sup> Se anotó para cada ratón en 5 intervalos de 2 minutos, comenzando 14 minutos después de la administración de L-5-HTP, la presencia o ausencia de los siguientes síntomas: sacudidas de cabeza, temblor de todo el cuerpo, abducción de las patas traseras, movimiento repetitivo dorso-ventral de pisada de las patas delanteras y postura extendida con el abdomen en contacto con el suelo (la puntuación máxima posible para cada ratón es 25).

Teniendo en cuenta que algunos efectos que aparecen por activación del receptor serotoninérgico, como el temblor o la conducta estereotipada, pueden enmascarar la expresión de otros, tales como las sacudidas de cabeza, se realizó el recuento simultáneo de varias conductas para obtener una indicación más cuantitativa de la activación de dicho receptor (Koek y cols., 1992). Al considerar el síndrome en su conjunto vemos en la tabla 17 que sólo la fracción butanólica manifestó significativamente dicho síndrome, si bien los valores obtenidos son claramente inferiores a los encontrados con la fluoxetina que presentó el síndrome en toda su extensión.

## **4.2. FLAVONOIDE Y DITERPENOS DE TIPO CLERODANO AISLADOS DE DIFERENTES ESPECIES DE LOS GÉNEROS SALVIA Y TEUCRIUM**

### **4.2.1. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA**

Tras la realización de esta prueba, encontramos que todos los compuestos estudiados presentaron valores de dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) superiores a 25 mg/kg i.p. Las dosis empleadas en las pruebas realizadas posteriormente fueron aproximadamente la tercera parte de la DL<sub>50</sub> de los productos en estudio.

## 4.2.2. ACTIVIDAD ANALGÉSICA

### 4.2.2.1. Efecto sobre los estiramientos inducidos por ácido acético en ratón

Los resultados obtenidos tras la realización de esta prueba se muestran en la tabla 18. En conjunto, podemos observar que todos los productos ensayados produjeron una disminución significativa de los estiramientos inducidos por la administración intraperitoneal del ácido acético en ratón, con porcentajes de inhibición entre el 28 y el 51 %. En este sentido destacan los compuestos *19-acetilgnafalina* y *teucrina A* que presentaron a la dosis de 10 mg/kg i.p. una actividad analgésica (51 y 49 % de inhibición, respectivamente) comparable a la mostrada por la indometacina a la dosis de 25 mg/kg i.p. (65 % de inhibición), fármaco utilizado como referencia.

**Tabla 18.** Efecto del flavonoide y diterpenos de tipo clerodano aislados de los géneros *Salvia* y *Teucrium* sobre los estiramientos inducidos por ácido acético en ratones

	Dosis mg/kg i.p.	Número de estiramientos ( $\bar{x} \pm \epsilon$ )	% Inhibición
Control	-	33.33 $\pm$ 3.05	-
Salvigenina	10	22.58 $\pm$ 2.21**	32.25
Teucrina A	10	17.08 $\pm$ 2.06 **	48.75
19-acetilgnafalina	10	16.25 $\pm$ 1.37 **	51.24
Eriocefalina	10	22.42 $\pm$ 2.17 **	32.73
Teucvina	10	23.50 $\pm$ 2.47 *	29.49
Teuflina	10	23.92 $\pm$ 2.69 *	28.23
Indometacina	25	11.83 $\pm$ 3.09 **	64.51

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student);  $n = 12$  animales.

### 4.2.2.2. Efecto sobre el tiempo de reacción en el test del *tail-flick*

Para evidenciar el posible efecto analgésico central de estos productos se realizó esta prueba, cuyos resultados se recogen en la tabla 19. Se observa en ella que ninguno de los compuestos estudiados aumentó significativamente el tiempo de reacción de los animales de experimentación, a excepción de la *teucrina A* que sólo lo aumentó significativamente tras 60 minutos de su administración. No obstante, el valor encontrado no fue superior al mostrado por la petidina, analgésico con acción central utilizado como referencia, que prolongó significativamente el tiempo de reacción tanto a los 30 minutos como a los 60 minutos de la administración.

**Tabla 19.** Efecto del flavonoide y diterpenos de tipo clerodano aislados de los géneros *Salvia* y *Teucrium* en el test del tail-flick

Tratamiento	Dosis mg/kg i.p.	t <sub>0</sub> (s) (x ± ε)	t <sub>30</sub> (s) (x ± ε)	t <sub>1</sub> (s) (x ± ε)	t <sub>2</sub> (s) (x ± ε)
Control	-	2.25 ± 0.11	2.39 ± 0.17	2.47 ± 0.19	2.31 ± 0.16
Salvigenina	10	2.20 ± 0.11	2.49 ± 0.21	2.75 ± 0.29	2.41 ± 0.26
Teucrina A	10	2.45 ± 0.16	2.87 ± 0.20	3.48 ± 0.36*	2.72 ± 0.23
19-acetilgnafalina	10	2.60 ± 0.15	2.58 ± 0.23	2.95 ± 0.21	2.21 ± 0.15
Eriocefalina	10	2.34 ± 0.12	2.58 ± 0.12	2.96 ± 0.22	2.53 ± 0.24
Teucvina	10	2.41 ± 0.11	2.43 ± 0.24	2.44 ± 0.19	2.32 ± 0.17
Teuflina	10	2.52 ± 0.09	2.73 ± 0.18	2.94 ± 0.26	2.65 ± 0.25
Petidina	25	2.64 ± 0.18	4.18 ± 0.57**	3.95 ± 0.52**	2.06 ± 0.12

t<sub>x</sub> = tiempo que tarda el ratón en sacudir la cola antes (t<sub>0</sub>), a la media hora (t<sub>30</sub>), a la hora (t<sub>1</sub>) y a las 2 horas (t<sub>2</sub>) de la administración.

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student); n = 10 animales.

### 4.2.3. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

#### 4.2.3.1. Efecto sobre el edema plantar inducido por carragenina en ratón

En la tabla 20 se recogen los resultados obtenidos tras la realización de esta prueba. Se encontró que todos los productos presentaron una reducción significativa (entre un 17 y un 42 %) del edema inducido por carragenina en la pata del ratón a la 4<sup>a</sup> hora de su administración. Destaca entre ellos el compuesto *19-acetilgnafalina* que a la dosis de 10 mg/kg i.p. alcanzó valores de inhibición (42 %) ligeramente superiores a los mostrados por los fármacos antiinflamatorios utilizados como referencia, la indometacina y el diclofenaco (41 y 35 %, respectivamente).

**Tabla 20.** Efecto del flavonoide y diterpenos de tipo clerodano aislados de los géneros *Salvia* y *Teucrium* sobre el edema inducido por carragenina en ratón

Tratamiento	Dosis mg/kg i.p.	Peso de edema (4 <sup>a</sup> h) (x ± ε) (mg)	% Inhibición
Control	-	89.46 ± 1.61	-
Salvigenina	10	67.50 ± 3.94**	24.55
Teucrina A	10	67.68 ± 2.59**	24.35
19-acetilgnafalina	10	51.60 ± 2.91**	42.32
Eriocefalina	10	74.43 ± 3.00**	16.80
Teucvina	10	66.93 ± 4.84**	25.18
Teuflina	10	72.02 ± 3.83**	19.49
Indometacina	25	52.54 ± 4.20**	41.27
Diclofenaco	10	57.78 ± 6.20**	35.41

\*\* p < 0.01 comparado con control (ANOVA seguido del test de Student); n = 12 animales.

#### 4.2.3.2. Efecto sobre el proceso inflamatorio inducido por tetradecanoil-forbol-acetato (TPA)

Los posibles efectos antiinflamatorios sobre el edema inducido en oreja por TPA se muestran en la tabla 21. Los resultados obtenidos mostraron que todos los productos administrados tópicamente redujeron significativamente, a las dos dosis ensayadas, el edema ocasionado en la oreja del ratón por el TPA, con valores comprendidos entre un 13 y un 70 %. Entre ellos sobresalen los productos *salvigenina*, a las dos dosis ensayadas, y *teuflina* a la dosis de 0.5 mg/oreja que lograron una reducción del edema del orden de 59-70 %, valores próximos o superiores a los mostrados por la indometacina a la dosis de 1mg/oreja (64 %). Asimismo debemos resaltar al producto *teucrina A* que mostró a las dos dosis ensayadas valores de inhibición superiores al 45 %.

No obstante, en ningún caso se observó una actividad antiinflamatoria tópica como la ejercida por la dexametasona a la dosis de 0.1 mg/oreja (94 % de inhibición).

**Tabla 21.** Efecto del flavonoide y diterpenos de tipo clerodano aislados de los géneros *Salvia* y *Teucrium* sobre el edema inducido por aplicación tópica de TPA en ratón

Tratamiento	Dosis mg/oreja	Peso de edema ( $\bar{x} \pm \varepsilon$ ) (mg)	% Inhibición
Control	-	10.70 $\pm$ 0.39	-
Salvigenina	0.5	3.20 $\pm$ 0.75**	70.09
Teucrina A	0.5	5.44 $\pm$ 0.81**	49.16
19-acetilgnafalina	0.5	9.33 $\pm$ 0.40*	12.80
Eriocefalina	0.5	6.84 $\pm$ 0.23**	36.07
Teucvina	0.5	7.32 $\pm$ 0.55**	31.59
Teuflina	0.5	4.40 $\pm$ 1.22**	58.89
Dexametasona	0.1	0.68 $\pm$ 0.12**	93.64
Control	-	11.20 $\pm$ 0.63	-
Salvigenina	1	4.32 $\pm$ 0.60**	61.43
Teucrina A	1	6.10 $\pm$ 0.30**	45.53
19-acetilgnafalina	1	7.01 $\pm$ 1.13**	37.41
Eriocefalina	1	6.41 $\pm$ 0.64**	42.77
Teucvina	1	6.72 $\pm$ 0.95**	40.00
Teuflina	1	6.79 $\pm$ 0.56**	39.37
Indometacina	1	4.07 $\pm$ 0.87**	63.66

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  comparado con control (ANOVA seguido del test de Student);  $n = 6$  animales a la dosis de 0.5 mg/oreja y 12 animales a la dosis de 1 mg/oreja).

#### 4.2.4. ACTIVIDAD SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

##### 4.2.4.1. Efecto sobre la actividad motora espontánea

Tras la realización de esta prueba se encontró que tres de los productos estudiados (*teucrina A*, *teucvina* y *teuflina*) redujeron significativamente el número de pasos dados por los animales de experimentación a los 30 minutos de la administración en un 52, 24 y 32 %, respectivamente (tabla 22). Sin embargo, tras 60 minutos de la administración, sólo la *teuflina* produjo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la actividad motora (66 %), si bien en ningún caso se alcanzaron los valores encontrados para la clorpromacina (superior al 90 % de inhibición), fármaco utilizado como referencia.

**Tabla 22.** Efecto del flavonoide y diterpenos de tipo clerodano aislados de los géneros *Salvia* y *Teucrium* sobre la actividad motora espontánea

Tratamiento	Dosis mg/kg i.p.	Número de pasos ( $\bar{x} \pm \epsilon$ )	
		30 min	60 min
Control	-	188.83 $\pm$ 18.34	58.00 $\pm$ 1.53
Salvigenina	10	171.50 $\pm$ 25.88	46.67 $\pm$ 9.06
Teucrina A	10	91.33 $\pm$ 22.19**	35.50 $\pm$ 9.54
19-acetilgnafalina	10	179.83 $\pm$ 24.00	37.83 $\pm$ 9.59
Eriocefalina	10	167.17 $\pm$ 17.59	57.33 $\pm$ 0.71
Teucvina	10	144.17 $\pm$ 7.60*	30.83 $\pm$ 5.35
Teuflina	10	128.50 $\pm$ 15.94*	19.83 $\pm$ 3.96*
Clorpromacina	5	4.83 $\pm$ 1.83**	5.17 $\pm$ 1.87**

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student);  $n = 6$  animales.

##### 4.2.4.2. Efecto directo sobre la temperatura rectal

Según se muestra en la tabla 23, ninguno de los productos en estudio ejerció un efecto significativo sobre la temperatura rectal a la hora de la administración. Sin embargo, tras 2 horas de la administración, los compuestos *teucrina A*, *teucvina* y *teuflina* produjeron una reducción significativa de la temperatura que se mantuvo hasta la 4ª hora, en el caso de la *teucvina* y *teuflina*, y hasta la 6ª h en el caso de la *teucrina A*. Debemos comentar también que el compuesto *eriocefalina* sólo redujo de forma significativa la temperatura a la 4ª h de administración. No obstante, en ninguno de los casos se encontraron los valores obtenidos para la clorpromacina (fármaco utilizado

como referencia), la cual mostró un efecto hipotermizante desde la 1ª h y que se mantuvo hasta la 6ª h de la administración.

**Tabla 23.** Efecto del flavonoide y diterpenos de tipo clerodano aislados de los géneros *Salvia* y *Teucrium* sobre la temperatura rectal (°C)

Tratamiento	Dosis mg/kg i.p.	$\Delta T_1$ (x ± ε)	$\Delta T_2$ (x ± ε)	$\Delta T_4$ (x ± ε)	$\Delta T_6$ (x ± ε)	$\Delta T_{24}$ (x ± ε)
Control	-	0.17 ±0.16	0.30± 0.17	0.55±0.17	0.97 ±0.21	0.17 ±0.10
Salvigenina	10	0.10 ±0.24	0.45± 0.19	0.83±0.11	0.85 ±0.18	0.08 ±0.27
Teucrina A	10	0.53 ±0.16	1.00± 0.19*	1.45±0.29*	2.32 ±0.44*	0.37 ±0.20
19-acetilgnafalina	10	0.12 ±0.23	0.32± 0.07	0.93 ±0.18	0.68 ±0.13	0.25 ±0.19
Eriocefalina	10	0.38 ±0.07	0.68± 0.24	1.28±0.09**	0.92 ±0.04	0.58 ±0.22
Teucvina	10	0.23 ±0.10	1.03± 0.25*	1.55±0.15**	1.52 ±0.17	0.20 ±0.13
Teuflina	10	0.02 ±0.04	0.97± 0.16*	1.42±0.14**	0.62 ±0.15	0.50 ±0.14
Clorpromacina	5	5.25 ±0.66**	5.83± 0.22**	4.15±1.06**	2.43 ±0.56*	0.15 ±0.21

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student); n = 6 animales.

$\Delta T_x = T_{n0} - T_{nt}$ ;  $T_{n0}$  = valor de  $T^a$  rectal antes de la administración de los productos para cada animal n;  $T_{nt}$  = valor de la  $T^a$  rectal para cada animal n en el tiempo de medida t (1, 2, 4, 6 y 24 horas).

#### 4.2.4.3. Actividad miorrelajante: Test de la tracción

Ninguno de los productos en estudio produjo efectos miorrelajantes en el test de la tracción (datos no presentados por ser nulos), a diferencia de la clorpromacina (neuroléptico cuya actividad miorrelajante muscular es claramente conocida) que logró a la dosis de 5 mg/kg i.p. un 100 % de fracasos tanto a los 30 como a los 60 minutos de su administración.

#### 4.2.4.4. Efecto sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico

Los resultados obtenidos tras la realización de esta prueba se recogen en la tabla 24. Podemos observar que ninguno de los compuestos potencia la acción del barbitúrico, ya que ni alargan significativamente el tiempo de sueño ni acortan el tiempo de inducción del mismo, a diferencia de la clorpromacina, fármaco utilizado como referencia de conocida acción sedante. Por el contrario, los compuestos *teucrina A* y *19-acetilgnafalina* aumentaron de forma significativa (p < 0.05) el tiempo de inducción al sueño pero sin modificar significativamente el tiempo que los ratones permanecen dormidos.

**Tabla 24.** Efecto del flavonoide y diterpenos de tipo clerodano aislados de los géneros *Salvia* y *Teucrium* sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.)

Tratamiento	Dosis	Ti	Ts
	mg/kg i.p	( $\bar{x} \pm \epsilon$ )(min)	( $\bar{x} \pm \epsilon$ )(min)
Control	-	3.92 $\pm$ 0.21	52.81 $\pm$ 4.03
Salvigenina	10	4.35 $\pm$ 0.18	54.14 $\pm$ 2.08
Teucrina A	10	5.51 $\pm$ 6.78*	44.39 $\pm$ 3.01
19-acetilgnafalina	10	5.66 $\pm$ 0.89*	49.39 $\pm$ 2.20
Eriocefalina	10	3.72 $\pm$ 0.33	59.25 $\pm$ 1.76
Teucvina	10	3.69 $\pm$ 0.20	42.41 $\pm$ 3.49
Teuflina	10	3.49 $\pm$ 0.17	40.69 $\pm$ 5.69
Clorpromacina	5	2.42 $\pm$ 0.15**	133.99 $\pm$ 6.84**

Ti = tiempo de inducción al sueño; Ts = tiempo de sueño.

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student); n = 6 animales.

### 4.3. AETIOPINONA

#### 4.3.1. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA ESPONTÁNEA

En la tabla 25 se recogen los resultados obtenidos tras la realización del estudio de los posibles efectos sobre la actividad motora espontánea. En ella podemos observar que si bien la *aetiopinona* a la dosis ensayada produjo una disminución del movimiento espontáneo de los animales de experimentación en aproximadamente un 13 % a la primera hora y un 24 % en la segunda hora de la administración, esta reducción no llega a alcanzar significación estadística. Por el contrario, la clorpromacina, fármaco utilizado como referencia, disminuyó de forma significativa e intensa la actividad motora tanto a la primera como a la segunda hora de la administración.

**Tabla 25.** Efecto de la *aetiopinona* sobre la actividad locomotora y sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico en ratón

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	ACTIVIDAD LOCOMOTORA		PENTOBARBITAL SÓDICO	
		Número de pasos ( $\bar{x} \pm \epsilon$ )		Ti	Ts
		60 min	120 min	( $\bar{x} \pm \epsilon$ )	( $\bar{x} \pm \epsilon$ )
Control	-	198.00 $\pm$ 11.87	103.80 $\pm$ 14.59	4.80 $\pm$ 0.49	43.93 $\pm$ 2.50
Aetiopinona	100	170.60 $\pm$ 16.63	78.40 $\pm$ 12.43	4.66 $\pm$ 0.63	47.61 $\pm$ 3.51
Clorpromacina	5	22.80 $\pm$ 5.42**	29.60 $\pm$ 12.08**	3.86 $\pm$ 0.31	89.16 $\pm$ 10.63**

Ti = tiempo de inducción al sueño; Ts = tiempo de sueño.

\*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student).

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  error estándar (n = 10-12 animales).

### 4.3.2. EFECTO DIRECTO SOBRE LA TEMPERATURA RECTAL

Los datos de esta experiencia se recogen en la tabla 26, observándose que la *aetiopinona* a la dosis ensayada no modifica de forma significativa la temperatura rectal de los animales de experimentación. Por su parte, la clorpromacina, fármaco utilizado como referencia, produjo una reducción significativa de la temperatura corporal hasta la segunda hora de la administración.

**Tabla 26.** Efecto de la *aetiopinona* sobre la temperatura rectal (°C)

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	$\Delta T_1$ ( $x \pm \epsilon$ )	$\Delta T_2$ ( $x \pm \epsilon$ )	$\Delta T_4$ ( $x \pm \epsilon$ )	$\Delta T_6$ ( $x \pm \epsilon$ )	$\Delta T_{24}$ ( $x \pm \epsilon$ )
Control	-	0.20 $\pm$ 0.36	0.82 $\pm$ 0.27	1.14 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.29	0.10 $\pm$ 0.15
Aetiopinona	100	0.61 $\pm$ 0.38	0.92 $\pm$ 0.35	1.12 $\pm$ 0.21	0.77 $\pm$ 0.36	0.17 $\pm$ 0.31
Clorpromacina	5	3.38 $\pm$ 0.57**	3.75 $\pm$ 0.63**	2.28 $\pm$ 0.69	0.37 $\pm$ 0.31	0.06 $\pm$ 0.19

\*\*  $p < 0.01$  comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student).

$\Delta T_x = T_{n0} - T_{nt}$ ;  $T_{n0}$  = valor de  $T^a$  rectal antes de la administración de los productos para cada animal  $n$ ;  $T_{nt}$  = valor de la  $T^a$  rectal para cada animal  $n$  en el tiempo de medida  $t$  (1, 2, 4, 6 y 24 horas).

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  error estándar ( $n = 10$  animales).

### 4.3.3. ACTIVIDAD MIORRELAJANTE: TEST DE LA TRACCIÓN

Tras la realización del test de la tracción, prueba utilizada para evidenciar el posible efecto miorrelajante de este producto, se encontró que la *aetiopinona* no produjo ningún fracaso en los animales de experimentación, a diferencia de la clorpromacina, fármaco de reconocida acción miorrelajante.

### 4.3.4. EFECTO SOBRE EL SUEÑO INDUCIDO POR PENTOBARBITAL SÓDICO

Los resultados obtenidos en el estudio de los posibles efectos sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico se muestran en la tabla 25. En ella se observa que la *aetiopinona* a la dosis ensayada no modificó de forma significativa ni el tiempo de inducción ni el tiempo que los animales permanecen dormidos, a diferencia de la clorpromacina, que a la dosis de 5 mg/kg p.o. alargó significativamente el tiempo de sueño más de un 100 %.

### 4.3.5. ANTAGONISMO A LA TETRABENACINA

Para estudiar los posibles efectos antidepresivos de la *aetiopinona* se realizó esta prueba clásica, cuyos resultados se muestran en la tabla 27. En ella vemos que la *aetiopinona* sólo antagonizó significativamente ( $p < 0.05$ ) la ptosis inducida por la tetrabenacina, lo que nos podría sugerir un cierto efecto alfa-adrenérgico o

serotoninérgico (Bourin, 1990). Por el contrario, la imipramina, como era de esperar al ser un antidepresivo tricíclico clásico, antagonizó todos los efectos inducidos por la tetrabenacina en los animales de experimentación.

No hay que olvidar, no obstante, que este test no es específico y puede ser sensible a moléculas que no tienen acción antidepresiva, por lo que hay que confirmar los resultados con otras pruebas complementarias.

#### 4.3.6. DEPRESIÓN POR DESESPERACIÓN COMPORTAMENTAL: TEST DE PORSOLT

En la tabla 27 se muestran los resultados obtenidos tras la realización de esta prueba conductual clásica utilizada para evidenciar actividad antidepresiva. Se encontró que la *aetiopinona* a la dosis ensayada (100 mg/kg p.o.) redujo significativamente el tiempo de inmovilidad en un 24 %, lo que nos indicaría un efecto antidepresivo para dicho producto. No obstante, el valor obtenido es inferior al mostrado por la imipramina a la dosis de 50 mg/kg p.o. (35 %), antidepresivo utilizado como referencia.

Es interesante resaltar que la actividad observada en esta prueba no se relaciona con efectos psicoestimulantes, ya que la *aetiopinona* a la dosis ensayada en esta prueba no modifica significativamente la actividad motora de los animales de experimentación.

**Tabla 27.** Actividad antidepresiva de la *aetiopinona*

Tratamiento	Dosis mg/kg p.o.	INTERACCIÓN CON LA TETRABENACINA			TEST DE PORSOLT	
		Ptosis (x ± ε)	Actividad locomotora (%)	Δ T (°C) (x ± ε)	Ti (s) (x ± ε)	% Variación
Control	-	3.60 ± 0.16	0.00	2.59 ± 0.39	161.80 ± 5.03	-
Aetiopinona	100	2.70 ± 0.30 <sup>a</sup>	20.00	3.01 ± 0.51	123.65 ± 8.43**	-23.58
Imipramina	25	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	90.00 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.23**	NE	
Imipramina	50	NE	NE	NE	105.65 ± 7.25**	-34.70

ΔT= variación de la temperatura a los 60 min de la administración; Ti = tiempo de inmovilidad; NE = no ensayado.

<sup>a</sup> p < 0.05, <sup>b</sup> p < 0.01 comparado con el control (test de Mann-Whitney); <sup>c</sup> p < 0.05 comparado con el control (test de  $\chi^2$ ).

\*\* p < 0.01 comparado con el control (ANOVA seguido del test de Student).

Los resultados están expresados como la media ± error estándar o porcentaje de actividad (n = 10 animales para el test de la tetrabenacina y 20 animales para el test de Porsolt).

Durante esos intervalos se registró también la presencia o ausencia de los siguientes síntomas: temblor, abducción de las patas traseras, movimiento repetitivo dorso-ventral de pisada de las patas delanteras y postura extendida con el abdomen en contacto con el suelo. Se asignó un punto por cada estereotipia observada para cada uno de los animales durante cada período de 2 minutos (considerando también dentro del síndrome, las sacudidas de cabeza), siendo la puntuación máxima posible de 25, para cada ratón. Obteniéndose, por tanto, dos series de datos; por un lado, el número de sacudidas de cabeza y, por otro, los efectos sobre el síndrome.

Con los resultados obtenidos se realizó en cada caso la media con su correspondiente error estándar, empleándose para el cálculo de la significación estadística el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student para el número de sacudidas de cabeza y el test de Mann-Whitney para datos no paramétricos en el caso del síndrome.

Si el grupo control al que se le administró L-5-HTP a la dosis de 75 mg/kg (DE<sub>10</sub>) no respondió como se esperaba, el experimento fue considerado nulo.

## ***5. DISCUSIÓN***

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio fitoquímico y farmacológico de diferentes extractos, fracciones y subfracciones de la especie *Hypericum grandifolium* Choisy, el estudio de las acciones analgésicas, antiinflamatorias y centrales de una flavona y cinco diterpenos de tipo clerodano aislados de diferentes especies de *Salvia* y *Teucrium*, así como el estudio farmacológico de las acciones sobre el sistema nervioso central de la *aetiopinona*. Por ello, vamos a hacer una discusión de los resultados obtenidos para cada uno de estos apartados por separado.

### **5.1. HYPERICUM GRANDIFOLIUM CHOISY**

Para evaluar la potencial actividad analgésica de esta especie, se llevó a cabo en la presente Tesis Doctoral el estudio del efecto de los diferentes extractos, fracciones y subfracciones de la misma sobre tres modelos experimentales de nocicepción en roedores, dos basados en estímulos químicos (estudio de los efectos sobre los estiramientos inducidos por ácido acético y sobre la hiperalgesia inducida por formalina) y uno basado en estímulos térmicos (test del *tail-flick*).

Comenzamos por el estudio de los efectos sobre los estiramientos inducidos por ácido acético, test que es muy poco específico pero muy sensible y predictivo de la potencia de ciertos analgésicos en la clínica. Como es bien sabido, el ácido acético es un agente irritante que produce la nocicepción gracias a la liberación de numerosas sustancias que excitan las terminaciones nerviosas dolorosas, siendo un método sensible para detectar la posible actividad analgésica tanto central como periférica de nuevas sustancias (Collier y cols., 1968). En nuestro trabajo, el extracto metanólico así como las fracciones acuosa, butanólica y clorofórmica de la especie en estudio redujeron significativamente el número de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético en los ratones, lo que nos indica que presentan actividad analgésica a las dosis ensayadas. Dado que la fracción clorofórmica fue la que presentó un porcentaje de inhibición mayor, con valores próximos a los obtenidos para el ibuprofeno (fármaco utilizado como referencia), se continuó fraccionando con el objetivo de encontrar las sustancias responsables de dicha actividad. Tras los resultados obtenidos podemos comentar que, si bien la actividad analgésica se concentró en las subfracciones F2 y F3, ninguna de ellas alcanzó el grado de inhibición obtenido por la fracción clorofórmica, lo que nos sugeriría la existencia de sinergismo entre los diferentes componentes químicos.

Cuando se llevó a cabo el estudio de los efectos sobre el modelo de dolor inducido por formalina, encontramos que sólo el extracto metanólico y la fracción clorofórmica fueron activos en este test, inhibiendo tanto la fase de respuesta neurogénica (que se caracteriza principalmente por la activación a nivel de nociceptores) como la fase de respuesta inflamatoria (en la que participan mediadores proinflamatorios como PGE<sub>2</sub>), lo que nos indicaría que tienen un efecto analgésico central, al igual que la morfina y la petidina (analgésicos opiáceos utilizados como referencia). Efectos similares se obtuvieron para la subfracción F3, sugiriéndonos que en ella se concentran las sustancias con actividad analgésica central. Por su parte, la subfracción F2, al igual que el diclofenaco (AINE utilizado como referencia), sólo inhibió significativamente la fase de respuesta inflamatoria, la cual se ha relacionado con la producción de prostaglandinas como mediadores (Hunnskaar y Hole, 1987). La subfracción F1, al igual que ocurrió en el test del ácido acético, no presentó actividad.

Tras la realización del test del *tail-flick* (sacudida de la cola), un método selectivo para compuestos con actividad analgésica central (como la petidina) y en el cual se considera que la sacudida de la cola ante el estímulo nociceptivo térmico es un reflejo espinal (Ramabadran y cols., 1989; Srinivasan y cols., 2003), comprobamos que tanto la fracción clorofórmica como la subfracción F3 son activas en esta prueba, confirmándose su acción analgésica central. No obstante, serían necesarias pruebas complementarias para conocer exactamente el mecanismo responsable de esta acción.

Por otra parte, el hecho de que la subfracción F2 no modificara significativamente el tiempo de reacción de los ratones sometidos al test del *tail-flick* nos hace pensar que el efecto analgésico observado en el test del ácido acético no es de origen central, sino que está mediado principalmente por un mecanismo periférico, ya sea por interferir con la reacción local causada por el irritante o por inhibir la síntesis, liberación y/o antagonizar la acción de los mediadores del dolor en los sitios diana (Collier y cols., 1968; Srinivasan y cols., 2003; Rabanal y cols., 2005).

Por otro lado, se llevó a cabo el estudio de la posible actividad antiinflamatoria tanto oral como tópica de los diferentes extractos de *H. grandifolium* mediante la inhibición del edema inducido en ratones por carragenina o TPA.

En el edema plantar por carragenina en ratón, se observó que la administración oral de todos los extractos, fracciones y subfracciones estudiados, con excepción de la subfracción F3, produjo una modesta aunque significativa inhibición del edema a la 4<sup>a</sup> hora de la inyección de la carragenina, siendo un hecho conocido que el edema producido en este intervalo de tiempo se relaciona con la inhibición de kininas y prostaglandinas (Doherty y Robinson, 1975; Hernández-Pérez y cols., 2004).

Este efecto antiinflamatorio ha sido corroborado por vía tópica en el modelo de edema inducido en oreja por aplicación tópica de TPA en ratón, encontrándose que todos los extractos, fracciones y subfracciones con excepción de la infusión fueron activos en esta prueba. Debemos comentar que la inflamación en el modelo del TPA parece estar relacionada o ser dependiente de los procesos de liberación y metabolismo del ácido araquidónico, la cual puede ocurrir simultáneamente con la interacción del TPA con el receptor de la proteína kinasa C (Just y cols., 1998). Los inhibidores de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, ciclooxigenasa y lipoxigenasa así como los corticoides son efectivos en este modelo (Carlson y cols., 1985; De Young y cols., 1989), lo que nos sugiere que los extractos de la especie estudiada interferirían de alguna manera con alguno de estos mediadores que participan en la respuesta inflamatoria al inhibir el edema inducido por TPA.

Es interesante destacar que si bien la actividad antiinflamatoria encontrada para los extractos, fracciones y subfracciones estudiados cuando fueron administrados por vía oral fue moderada, por vía tópica mostraron una actividad mayor. Esta diferencia en los resultados puede ser debida a que los agentes flogísticos usados (TPA o carragenina) tienen un mecanismo diferente de producción del edema o bien a que, en general, la administración tópica es una vía más efectiva ya que con ella se pueden conseguir concentraciones mayores del producto en el lugar de la inflamación (Carlson y cols., 1985).

Los resultados que hemos obtenido con los preparados de *H. grandifolium* coinciden con otros estudios realizados en animales que muestran efectos analgésicos y antiinflamatorios para otras especies del género *Hypericum* (Apaydin y cols., 1999; Barnes y cols., 2001; Trovato y cols., 2001; Mattace Raso y cols., 2002; Öztürk y cols., 2002; Rabanal y cols., 2005; Sánchez-Mateo y cols., 2006a; Savikin y cols., 2007),

siendo éstos los primeros estudios realizados sobre la acción analgésica y antiinflamatoria de esta especie.

Tras el estudio fitoquímico llevado a cabo, se han detectado en el extracto metanólico de esta especie diversos flavonoides (hiperósido, quercetina, quercitrina), compuestos poliprenilados derivados del benzoilfloroglucinol, así como una pequeña cantidad de hiperforina. Puesto que se han encontrado efectos analgésicos y antiinflamatorios para muchos flavonoides (Wagner, 1989; Calixto y cols., 2000; Guardia y cols., 2001; Morikawa y cols., 2003; Rotelli y cols., 2003), es posible que una parte de los efectos observados en el presente estudio pudieran deberse también a la presencia de estos compuestos en el extracto metanólico.

Con respecto a la fracción clorofórmica, que fue la que presentó la actividad analgésica y antiinflamatoria más prometedoras, y sus subfracciones F1, F2 y F3, la actividad encontrada puede ser debida a los derivados poliprenilados del benzoilfloroglucinol detectados como componentes mayoritarios.

Por otro lado, continuando con la evaluación farmacológica de esta especie, se sometieron los diferentes extractos en estudio a una batería de pruebas para evidenciar sus efectos sobre el sistema nervioso central, poniendo especial atención en el estudio de su potencial actividad antidepresiva. Es bien sabido que ninguno de los modelos animales utilizados para el *screening* de nuevos fármacos antidepresivos es por sí mismo suficiente para predecir actividad antidepresiva en clínica (Bourin, 1990; Willner, 1994), por lo que se hace necesario la combinación de varios de ellos. En la presente Tesis Doctoral se han realizado dos tipos de pruebas experimentales: unas son pruebas farmacológicas en las que se hace interaccionar el extracto o molécula en estudio con un determinado fármaco que induce un estado particular (como la interacción con la tetrabenacina o con el L-5-HTP), y otras son pruebas conductuales en las que se administra el extracto o producto en estudio a animales en los que se ha inducido un comportamiento particular por procedimientos no farmacológicos, como por ejemplo la depresión por desesperación comportamental (test de Porsolt).

Así, al considerar el conjunto de resultados obtenidos al realizar las diferentes pruebas podemos comentar que, en general, todas las fracciones y subfracciones ensayadas ejercieron en mayor o menor medida efectos antidepresivos en el test de

Porsolt, sobresaliendo entre ellos la fracción clorofórmica (500 mg/kg p.o.) que presentó valores próximos a los mostrados por el antidepresivo de referencia (imipramina a 30 mg/kg p.o.). Como en un trabajo anterior (Sánchez-Mateo y cols., 2002) se encontró que el extracto metanólico redujo significativamente en un 20 % el tiempo de inmovilidad en el test de Porsolt, los resultados de la presente Tesis indican que la mayor parte de la actividad antidepresiva del extracto metanólico se concentra en la fracción clorofórmica (que presentó un 31% de inhibición).

Asimismo, es interesante resaltar que ninguna de las subfracciones obtenidas de la fracción clorofórmica lograron en esta prueba un porcentaje de inhibición del tiempo de inmovilidad superior al de la fracción de la que se partió, lo que nos sugiere que existe una sinergia entre los diferentes componentes químicos, hecho que está en consonancia con otros estudios realizados con especies de este género (Butterweck y cols., 1998, 2003; Williamson, 2001).

Es interesante resaltar que los psicoestimulantes como la cafeína también disminuyen el tiempo de inmovilidad, pero a diferencia de los fármacos antidepresivos causan una marcada estimulación motora, indicando que sus efectos no son específicos (Porsolt y cols., 1977; Bourin, 1990). En nuestro caso debemos comentar que la actividad mostrada por las fracciones y subfracciones en el test de Porsolt no es debida a efectos psicoestimulantes, ya que a las dosis activas en esta prueba no modificaron o disminuyeron la actividad motora de los animales de experimentación.

También debemos comentar que sólo la fracción clorofórmica mostró efectos significativos en el test de la tetrabenacina, antagonizando la ptosis inducida por este fármaco, lo que suele evidenciar una cierta actividad alfa-adrenérgica o serotoninérgica (Bourin, 1990). Asimismo, se observó que la fracción butanólica fue la única que potenció las sacudidas de cabeza y el síndrome inducido por el L-5-hidroxitriptófano, indicando que puede ser un inhibidor de la 5-hidroxitriptamina o de la monoaminoxidasa (Shank y cols., 1987). Estos resultados confirman los obtenidos por Sánchez-Mateo y cols. (2002) para el extracto metanólico, que también fue activo sólo en antagonizar la ptosis inducida por tetrabenacina y en potenciar las sacudidas de cabeza inducidas por el L-5-HTP.

Por otro lado, estas fracciones mostraron nulos efectos miorrelajantes en el test de la tracción y, con excepción de la fracción clorofórmica, no modificaron de forma significativa la temperatura corporal de los animales de experimentación ni el tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico.

Con respecto a los principios activos responsables de la actividad antidepresiva observada en esta especie, conviene resaltar que no se han detectado naftodiantronas (hipericina y pseudohipericina) en el análisis fitoquímico llevado a cabo en el extracto metanólico de esta especie. Como es bien sabido, las naftodiantronas son los marcadores quimiotaxonómicos más importantes del género *Hypericum*, y han sido asociadas con la mayoría de las acciones farmacológicas de esta especie, en particular con la actividad antidepresiva (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Butterweck y cols., 1997, 1998; Schulz y cols., 1998; Barnes y cols., 2001). De acuerdo con una clasificación infragenérica de Robson (1977), *H. grandifolium* pertenece a la sección *Androsaemum*, junto con *H. androsaemum*, *H. foliosum* e *H. hircinum*. Hasta el momento, la sección *Androsaemum* ha destacado por la ausencia de hipericina y pseudohipericina (Mathis y Ourisson, 1963; Kitanov, 2001; Avato, 2005), lo cual está en consonancia con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral.

Por ello, y en ausencia de naftodiantronas, podemos sugerir que los flavonoides encontrados en el estudio fitoquímico de esta especie son responsables, al menos en parte, de la actividad antidepresiva observada, ya que estos compuestos han mostrado efectos antidepresivos en trabajos de investigación llevados a cabo con la especie *Hypericum perforatum* (Butterweck y cols., 2000, 2003; Nöldner y Schötz, 2002). Asimismo, la interesante actividad antidepresiva encontrada para la fracción clorofórmica podría ser debida, en parte, a los compuestos poliprenilados derivados del benzoilfloroglucinol encontrados en la misma.

En definitiva, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que los diferentes extractos y fracciones ensayados del *Hypericum grandifolium* tienen propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antidepresivas en roedores, mostrando nula o ligera acción sedante, siendo responsables de dichas acciones los compuestos polifenólicos (flavonoides y derivados poliprenilados del beonzilfloroglucinol) detectados en la misma. Estos resultados evidencian el potencial terapéutico de esta especie y confirma algunos de usos en la medicina popular.

## **5.2. FLAVONOIDE Y DITERPENOS DE TIPO CLERODANO AISLADOS DE DIFERENTES ESPECIES DE LOS GÉNEROS SALVIA Y TEUCRIUM**

En la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo el estudio de las propiedades analgésicas y antiinflamatorias en ratones de una flavona y cinco diterpenos de tipo clerodano aislados de especies de los géneros *Salvia* y *Teucrium*, así como unas pruebas preliminares para ver sus posibles efectos sobre el sistema nervioso central.

De los resultados obtenidos podemos deducir que todos los compuestos estudiados mostraron propiedades analgésicas de interés cuando se llevó a cabo el test de los estiramientos inducidos por ácido acético en ratones, ya que redujeron significativamente el número de estiramientos producidos por esta sustancia en los animales de experimentación, destacando entre todos ellos los compuestos *19-acetilgnafalina* y *teucrina A*, que presentaron valores de inhibición próximos a los mostrados por la indometacina (fármaco de referencia).

Por otro lado, sólo la *teucrina A* mostró una ligera acción analgésica central en el test de *tail-flick*, ya que aumentó significativamente el tiempo de reacción en los animales de experimentación en esta prueba, si bien no alcanzó los valores obtenidos para la petidina (analgésico narcótico). Como el resto de los compuestos no mostraron actividad en esta prueba podemos sugerir que la actividad analgésica observada en el test del ácido acético no es de origen central, sino que está mediada principalmente por un mecanismo periférico (Collier y cols., 1968; Ramabadran y cols., 1989; Srinivasan y cols., 2003; Rabanal y cols., 2005).

Con respecto a la actividad antiinflamatoria, podemos deducir de los resultados obtenidos, que la mayoría de los productos mostraron una importante actividad antiinflamatoria tanto por vía intraperitoneal (test de la carragenina) como tópica (test del TPA), destacando los productos *salvigenina* y *teuflina*, cuya administración tópica produjo un porcentaje de inhibición superior al 58 %, valor próximo al mostrado por la indometacina (fármaco utilizado como referencia).

En este caso, al igual que ocurrió con los extractos y fracciones del *Hypericum grandifolium*, los productos en estudio mostraron en general mayor actividad antiinflamatoria por vía tópica que por vía intraperitoneal, pudiendo explicarse estos resultados por el diferente mecanismo de producción del edema de los agentes

flogísticos usados (TPA o carragenina) o a que, en general, la administración tópica es una vía más efectiva por conseguirse concentraciones mayores del producto en el lugar de la inflamación (Carlson y cols., 1985).

Hay que comentar que la acción antiinflamatoria obtenida para tres de estos compuestos (*teucrina A*, *19-acetilgnafalina* y *eriocefalina*) parece estar mediada principalmente por la inhibición de la actividad de la 5-lipoxigenasa, puesto que en un estudio *in vitro* realizado con anterioridad con estos compuestos sobre diversos parámetros del proceso inflamatorio se encontró que sólo afectaban la actividad de esta enzima sin modificar la actividad de la ciclooxigenasa ni la producción de óxido nítrico (De las Heras y cols., 2001).

Por otro lado, el análisis de los datos tras el estudio de los posibles efectos sobre el sistema nervioso central puso en evidencia que los compuestos en estudio no presentaron actividad miorrelajante en el test de la tracción ni hipnótica sobre el sueño inducido por pentobarbital sódico, aunque algunos de ellos produjeron una ligera hipotermia y una disminución de la actividad motora espontánea.

Vemos pues, que los productos estudiados presentaron propiedades analgésicas y antiinflamatorias de interés, sin mostrar acción sedante ni miorrelajante, si bien es difícil establecer una posible relación estructura química-actividad farmacológica. No obstante, son necesarias pruebas complementarias para conocer exactamente el mecanismo responsable de estas acciones.

### **5.3. AETIOPINONA**

En trabajos anteriores se ha demostrado que la *aetiopinona*, un diterpeno naftoquinónico aislado de las raíces de *Salvia aethiopsis* L., mostraba actividades antimicrobianas, citotóxicas, analgésicas en el test del ácido acético y el *tail-flick*, así como efectos antiinflamatorios en el edema inducido por carragenina y TPA en roedores, jugando un papel importante en su acción antiinflamatoria la inhibición de la enzima 5-lipoxigenasa (Hernández-Pérez y cols., 1995, 1999; Benrezzouk y cols., 2001; De las Heras y cols., 2001).

En esta Tesis Doctoral se llevó a cabo el estudio de la actividad sobre el sistema nervioso central de este producto natural, encontrándose que presentó actividad

antidepresiva en el test de Porsolt a la dosis de 100 mg/kg p.o., puesto que redujo significativamente en un 24 % el tiempo en el cual el ratón permanece inmóvil, siendo esta actividad específica ya que a la dosis ensayada no modifica significativamente la actividad motora de los animales de experimentación (Bourin, 1990; Sánchez-Mateo y cols., 2002, 2005). Este compuesto, además, antagonizó la ptosis inducida por tetrabenacina, sugiriéndonos que podría presentar un cierto efecto alfa-adrenérgico o serotoninérgico (Bourin, 1990).

Debemos comentar que la *aetiopinona* mostró una actividad antidepresiva de interés, sin producir efectos sedantes, hipotérmicos o miorelajantes. No obstante, se necesitan pruebas complementarias para perfilar mejor el mecanismo de dicha acción.

## ***6. CONCLUSIONES***

1. Tras el estudio fitoquímico de la especie *Hypericum grandifolium* Choisy se ha visto que esta especie contiene diversos flavonoides (hiperósido, quercetina, quercitrina), compuestos poliprenilados derivados del benzoilfloroglucinol y una pequeña cantidad de hiperforina.
2. Conviene resaltar que no se han detectado naftodiantronas (hipericina, pseudohipericina) en el extracto metanólico de *Hypericum grandifolium*, marcadores quimiotaxonómicos más importantes del género *Hypericum*. Este hecho está en consonancia con otros trabajos en los que no se encuentra este tipo de compuestos en especies de este género pertenecientes a la sección *Androsaemum* (como es el caso de *H. grandifolium*).
3. En general, los extractos ensayados de esta especie poseen una interesante actividad analgésica en roedores, destacando en este sentido el extracto metanólico y la fracción clorofórmica que presentaron acción analgésica tanto a nivel periférico como central.
4. Con respecto a la actividad antiinflamatoria podemos decir que la mayoría de los extractos ensayados de esta especie poseen una interesante actividad, similar en algunos casos a la mostrada por los fármacos de referencia, destacando igualmente la fracción clorofórmica.
5. En los ensayos realizados sobre el sistema nervioso central, todas las fracciones y subfracciones estudiadas de esta especie ejercieron efectos antidepresivos en el test de Porsolt, sin modificar de forma significativa la actividad locomotora, la temperatura corporal ni el tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico.
6. Asimismo debemos destacar que la fracción clorofórmica antagonizó la ptosis inducida por la tetrabenacina, mientras que la fracción butanólica potenció los efectos inducidos por el L-5-hidroxitriptófano.
7. Los compuestos polifenólicos (flavonoides y derivados poliprenilados del benzoilfloroglucinol) parecen ser los responsables de las acciones analgésicas, antiinflamatorias y sobre el sistema nervioso central encontradas para la especie *Hypericum grandifolium* Choisy.
8. Por otro lado, la flavona *salvigenina* y los diterpenos de tipo clerodano *teucrina A*, *19-acetilgnafalina*, *eriocefalina*, *teucvina* y *teuflina* aislados de diferentes

especies de los géneros *Salvia* y *Teucrium* mostraron todos, en general, una interesante actividad analgésica y antiinflamatoria *in vivo*, destacando los compuestos *19-acetilgnafalina* y *teucrina A* en la actividad analgésica y los compuestos *salvigenina* y *teuflina* en la actividad antiinflamatoria, los cuales tienen un interesante potencial como antiinflamatorios al haber presentado en las pruebas realizadas una actividad similar a la mostrada por los fármacos utilizados como referencia.

9. Igualmente los compuestos arriba mencionados poseen, en general, escasos efectos a nivel del sistema nervioso central, si bien algunos de ellos produjeron una ligera hipotermia y una disminución de la actividad locomotora de los animales de experimentación.
10. Finalmente, el análisis global de los resultados obtenidos tras realización de los ensayos sobre el sistema nervioso central del diterpeno naftoquinónico *aetiopinona* nos permite concluir que este compuesto presenta actividad antidepresiva en el test de Porsolt y en el de la tetrabenacina en ratones, sin producir efectos sedantes, hipotérmicos o miorelajantes.

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***

- Albert, D., Zündorf, I., Dingermann, T., Müller, W.E., Steinhilber, D., Werz, O., 2002. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology* 64 (12), 1767-1775.
- Alarcón de la Lastra, C., Martín, M.J., Motilva, V., 1994. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: A gross and histologic study. *Pharmacology* 48 (1), 56-62.
- Albornoz, A.M., 1980. *Productos Naturales. Sustancias y drogas extraídas de plantas.* Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Alcaraz, M.J., Jiménez, M.J., Valverde, S., Sanz, J., Rabanal, R.M., Villar, A., 1989. Anti-inflammatory compounds from *Sideritis javalambrensis* n-hexane extract. *Journal of Natural Products* 52 (5), 1088-1091.
- Alcaraz, M.J., Ríos, J.L., 1991. Pharmacology of diterpenoids. En: J.B. Harborne y F.A. Tomás Barberan (Eds.), *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, Clarendon Press, New York.
- Álvarez Castro, E., Orallo Cambeiro, F., 2003a. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm* 22 (10), 130-140.
- Álvarez Castro, E., Orallo Cambeiro, F., 2003b. Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *Offarm* 22 (11), 102-110.
- Ambrosio, S.R., Tirapelli, C.R., da Costa, F.B., de Oliveira, A.M., 2006. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. *Life Sciences* 79 (10), 925-933.
- Apaydin, S., Zeybek, U., Ince, I., Elgin, G., Karamenderes, C., Öztürk, B., Tuğlular, I., 1999. *Hypericum triquetrifolium* Turra. extract exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Journal of Ethnopharmacology* 67 (3), 307-312.
- Avato, P., 2005. A survey on the *Hypericum* genus: Secondary metabolites and bioactivity. En: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 30. *Bioactive Natural Products (Part K)*, Elsevier, pp. 603-634.
- Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A.L., Marselos, M., Malamas, M., 1998. Antiviral *in vitro* activity of *Hypericum perforatum* L. extract on the human cytomegalovirus (HCMV). *Phytotherapy Research* 12 (7), 507-511.
- Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., 2001. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53 (5), 583-600.
- Beerhues, L., 2006. Hyperforin. *Phytochemistry* 67 (20), 2201-2207.

- Beil, W., Birkholz, C., Sewing, K.F., 1995. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. *Arzneimittel Forschung/Drug Research* 45 (6), 697-700.
- Benrezzouk, R., Terencio, M.C., Ferrandiz, M.L., Hernández-Pérez, M., Rabanal, R.M., Alcaraz, M.J., 2001. Inhibition of 5-lipoxygenase activity by the natural anti-inflammatory compound aethiopinone. *Inflammation Research* 50 (2), 96-101.
- Bhattacharya, S.K., Chakrabarti, A., Chatterjee, S.S., 1998. Activity profiles of two hyperforin-containing *Hypericum* extracts in behavioural models. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl. 1), 22-29.
- Biffignandi, P.M., Bilia, A.N., 2000. The growing knowledge of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L) drug interactions and their clinical significance. *Current Therapeutic Research* 61 (7), 389-394.
- Bombardelli, E., Morazzoni, P., 1995. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia* 66 (1), 43-68.
- Bourin, M., 1990. Is it possible to predict the activity of a new antidepressant in animals with simple psychopharmacological tests?. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 4 (1), 49-64.
- Boissier, J.R., Dremont, C., Robins, R., Pagny, J., 1961. Tentative de pharmacologie prévisionnelle dans la domaine des neuroleptiques: Actions sédative centrale et adrérolitique de la *N*(diméthoxy-3,4-phénétyle)*N'*(chloro-2 phényle)piperazine. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 133, 29-32.
- Boya, M.T., Valverde, S., 1981. An orthoquinone isolated from *Salvia aethiopsis*. *Phytochemistry* 20 (6): 1367-1368.
- Bramwell, D., Bramwell, Z., 2001. Flores silvestres de las Islas Canarias, 4ª Edición. Editorial Rueda, S.L., Madrid, España, pp. 9-24; pp. 219-221.
- Brenner, R., Azbel, V., Madhusoodanan, S., Pawlowska, M., 2000. Comparison of an extract of *Hypericum* (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: A double-blind, randomized pilot study. *Clinical Therapeutics* 22 (4), 411-419.
- Bruneton, J., 2001a. Flavonoides. En: *Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas Medicinales*, 2ªed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España, pp. 305-349.
- Bruneton, J., 2001b. Terpenos y esteroides. En: *Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas Medicinales*, 2ªed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España, pp. 457-651.
- Bruno, M., Piozzi, F., Rodríguez, B., Savona, G., Servettaz, O., 1985. *Ent*-clerodane diterpenoids from six further species of *Teucrium*. *Phytochemistry* 24 (11), 2597-2599.

- Buendía Sánchez, E., 2000. El hipérico en el tratamiento de la depresión. *Revista de Fitoterapia* 1, 37-42.
- Butterweck, V., Wall, A., Liefländer-Wulf, U., Winterhoff, H., Nahrstedt, A., 1997. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30 (Supplement), 117-124.
- Butterweck, V., Petereit, F., Winterhoff, H., Nahrstedt, A., 1998. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica* 64 (4), 291-294.
- Butterweck, V., Jürgenliemk, G., Nahrstedt, A., Winterhoff, H., 2000. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica* 66 (1), 3-6.
- Butterweck, V., Christoffel, V., Nahrstedt, A., Petereit, F., Spengler, B., Winterhoff, H., 2003. Step by step removal of hyperforin and hypericin: Activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioural models. *Life Sciences* 73 (5), 627-639.
- Cakir, A., Mavi, A., Yildirim, A., Duru, M.E., Harmandar, M., Kazaz, C., 2003. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology* 87 (1), 73-83.
- Calixto, J.B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A.R.S., Filho, V.C., Yunes, R.A., 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research* 14 (6), 401-418.
- Cantoni, L., Rozio, M., Mangolini, A., Hauri, L., Caccia, S., 2003. Hyperforin contributes to the hepatic CYP3A-inducing effect of *Hypericum perforatum* extract in the mouse. *Toxicological Sciences* 75 (1), 25-30.
- Carlson, R.P., O'Neill-Davis, L., Chang, J., Lewis, A.J., 1985. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Inflammation Research* 17 (2), 197-204.
- Chatterjee, S.S., Nöldner, M., Koch, E., Erdelmeier, C., 1998. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: The neglected possibility. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl. 1), 7-15.
- Clarkson, C., Campbell, W.E., Smith, P., 2003. *In vitro* antiplasmodial activity of abietane and totarane diterpenes isolated from *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw). *Planta Medica* 69 (8), 720-724.

- Collier, H.O.J., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 32 (2), 295-310.
- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., Zarzuelo, A., 2005. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway. *European Journal of Immunology* 35 (2), 584-592.
- Couladis, M., Chinou, I.B., Tzakou, O., Petrakis, P.V., 2003. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp. *apollinis* (Boiss. & Heldr.). *Phytotherapy Research* 17 (2), 152-154.
- Cruz, F.G., Teixeira, J.S.R., 2004. Polyprenylated benzophenones with a tricyclo [4.3.1.1<sup>3,8</sup>] undecane skeleton from *Clusia obdeltifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15 (4), 504-508.
- Çirak, C., Radušienė, J., Karabük, B.(S.), Janulis, V., 2007. Variation of bioactive substances and morphological traits in *Hypericum perforatum* populations from Northern Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 (7), 403-409.
- Darias, V., Bravo, L., Barquín, E., Martín-Herrera, D., Fraile, C., 1986. Contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology* 15 (2), 169-193.
- Darias, V., Bravo, L., Rabanal, R., Sánchez-Mateo, C., González-Luis, R.M., Hernández-Pérez, A.M., 1989. New contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology* 25 (1), 77-92.
- Das, M., Ram, A., Ghosh, B., 2003. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice. *Inflammation Research* 52 (3), 101-106.
- Daudt, R., von Poser, G.L., Neves, G., Rates, S.M.K., 2000. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. *Phytotherapy Research* 14 (5), 344-346.
- De Angelis, L., 1979. Animal techniques for evaluating benzodiazepine drugs. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 1 (3), 129-155.
- Decosterd, L., Hoffmann, E., Kyburz, R., Bray, D., Hostettmann, K., 1991. A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity. *Planta medica* 57, 548-551.

- De las Heras, B., Abad, M.J., Silván, A.M., Pascual, R., Bermejo, P., Rodríguez, B., Villar, A.M., 2001. Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sciences* 70 (3), 269-278.
- De las Heras, B., Rodríguez, B., Boscá, L., Villar, A.M., 2003. Terpenoids: Sources, structure, elucidation and therapeutic potential in inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3 (2), 171-185.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M., 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Inflammation Research* 26 (3-4), 335-341.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., 1999. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65 (4), 337-353.
- Di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E., Izzo, A.A., 2001. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends in Pharmacological Sciences* 22 (6), 292-297.
- Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of Pathology* 104 (1), 15-29.
- Doherty, N.S., Robinson, B.V., 1975. The inflammatory response to carrageenan. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 27 (9), 701-703.
- Domínguez, X.A., 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Limusa, Mexico.
- Domínguez, M.J., Mossner, E., de la Torre, M.C., Rodríguez B., 1998. Hemisynthesis of some biogenetically anomalous 17 $\beta$ -neoclerodane diterpenoids. *Tetrahedron* 54 (47), 14377-14400.
- Fatehyab Ali, S., Chandra, O., Hasan, M., 1980. Effects of an organophosphate (Dichlorvos) on open field behavior and locomotor activity: Correlation with regional brain monoamine level. *Psychopharmacology* 68 (1), 37-42.
- Fayos, J., Martínez-Ripoll, M., Paternostro, M.P., Piozzi, F., Rodríguez, B., Savona, G., 1979. New clerodane diterpenoid from *Teucrium eriocephalum*. *The Journal of Organic Chemistry* 44 (26), 4992-4994.
- Feria, M., 2005. Métodos de estudio y valoración del dolor y de los analgésicos. Modelos experimentales básicos y clínicos. En: F. Zaragoza y C. Álamo (Coords.), *Abordaje del Dolor desde la Oficina de Farmacia. Modulo II, Acción Médica*, Madrid, pp. 115-131.

- Flausino Jr., O.A., Zangrossi Jr., H., Salgado, J.V., Viana, M.B., 2002. Effects of acute and chronic treatment with *Hypericum perforatum* L. (LI 160) on different anxiety-related responses in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71 (1-2), 251-257.
- Gaspar-Marques, C., Pedro, M., Simões, M.F.A., Nascimento, M.S.J., Pinto, M.M.M., Rodríguez, B., 2002. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on the growth of human cancer cell lines. *Planta Medica* 68 (9), 839-840.
- Gaspar-Marques, C., Rijo, P., Simoes, M.F., Duarte, M.A., Rodriguez, B., 2006. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine* 13 (4), 267-271.
- Gnerre, C., von Poser, G.L., Ferraz, A., Viana, A., Testa, B., Rates, S.M.K., 2001. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53 (9), 1273-1279.
- Godin, P., 1954. A New Spray Reagent for Paper Chromatography of Polyols and Cetoses. *Nature* 174, 134.
- Greeson, J.M., Sanford, B., Monti, D.A., 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum*): A review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology* 153 (4), 402-414.
- Grynberg, N.F., Echevarria, A., Lima, J.E., Pamplona, S.S.R., Pinto, A.C., Maciel, M.A.M., 1999. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 65 (8), 687-689.
- Guardia, T., Rotelli, A.E., Juárez, O., Pelzer, L.E., 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco* 56 (9), 683-687.
- Guedes, M.M., Cunha, A.N., Silveira, E.R., Rao, V.S.N., 2002. Antinociceptive and gastroprotective effects of diterpenes from the flower buds of *Egletes viscosa*. *Planta Medica* 68 (11), 1044-1046.
- Gutmann, H., Poller, B., Buter, K.B., Pfrunder, A., Schaffner, W., Drewe, J., 2006. *Hypericum perforatum*: Which constituents may induce intestinal MDR1 and CYP3A4 mRNA expression?. *Planta Medica* 72 (8), 685-690.

- Heilmann, J., Winkelmann, K., Sticher, O., 2003. Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from *Hypericum* species. *Planta Medica* 69 (3), 202-206.
- Hernández-Pérez, M., Rabanal, R.M., de la Torre, M.C., Rodríguez, B., 1995. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and haematological effects of aethiopinone, an o-naphthoquinone diterpenoid from *Salvia aethiopsis* roots and two hemisynthetic derivatives. *Planta Medica* 61 (6), 505-509.
- Hernández-Pérez, M., Rabanal, R.M., Arias, A., de La Torre, M.C., Rodríguez, B., 1999. Aethiopinone, an antibacterial and cytotoxic agent from *Salvia aethiopsis* roots. *Pharmaceutical Biology* 37 (1), 17-21.
- Hernández-Pérez, M., Sánchez-Mateo, C.C., Montalbetti-Moreno, Y., Rabanal, R.M., 2004. Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. *Journal of Ethnopharmacology* 93 (2-3), 279-284.
- Herrera, R.M., Pérez, M., Martín-Herrera, D.A., López-García, R., Rabanal, R.M., 1996. Antimicrobial activity of extracts from plants endemic to the Canary Islands. *Phytotherapy Research* 10 (4), 364-366.
- Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Toma, W., Paula, A.C.B., Almeida, A.B.A., Brasil, D.D., Muller, A.H., Souza-Brito, A.R., 2000. Evaluation of the gastroprotective activity of cordatin, a diterpene isolated from *Aparisthium cordatum* (Euphorbiaceae). *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23 (12), 1465-1469.
- Ho, P.-C., Saville, D.J., 2001. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 4 (3), 217-227.
- Hu, L.-H., Sim, K.-Y., 2000. Sampsoniones A-M, a unique family of caged polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives, from *Hypericum sampsonii*. *Tetrahedron* 56 (10), 1379-1386.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30 (1), 103-114.
- Iwamoto, M., Minami, T., Tokuda, H., Ohtsu, H., Tanaka, R., 2003. Potential antitumor promoting diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii*. *Planta Medica* 69 (1), 69-72.
- Izzo, A.A., 1996. PAF and the digestive tract. A review. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48 (11), 1103-1111.

- Izzo, A.A., Ernst, E., 2001. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs. A systematic review. *Drugs* 61 (15), 2163-2175.
- Izzo, A.A., 2004. Drug interactions with St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): A review of the clinical evidence. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 42 (3), 139-148.
- Jacobs, B.L., 1976. An animal behavior model for studying central serotonergic synapses. *Life Sciences* 19 (6), 777-785.
- Jakovljevic, V., Popovic, M., Mimica-Dukic, N., Sabo, A., Gvozdenovic, L., 2000. Pharmacodynamic study of *Hypericum perforatum* L. *Phytomedicine* 7 (6), 449-453.
- Jang, S.I., Kim, H.J., Kim, Y.-J., Jeong, S.-I., You, Y.-O., 2006. Tanshinone IIA inhibits LPS-induced NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells: Possible involvement of the NIK-IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways. *European Journal of Pharmacology* 542 (1-3), 1-7.
- Jayasuriya, H., Clark, A.M., Mc Chesney, J.D., 1991. New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. *Journal of Natural Products* 54 (5), 1314-1320.
- Just, M.J., Recio, M.C., Giner, R.M., Cuéllar, M.J., Máñez, S., Bilia, A.R., Ríos, J.L., 1998. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosum*. *Planta Medica* 64 (5), 404-407.
- Kaur, R., Singh, D., Chopra, K., 2005. Participation of  $\alpha_2$  Receptors in the Antinociceptive Activity of Quercetin. *Journal of Medicinal Food* 8 (4), 529-532.
- Kitanov, G.M., 2001. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 29 (2), 171-178.
- Klein Gebbinck, E.A., Jansen, B.J.M., de Groot, A., 2002. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. *Phytochemistry* 61 (7), 737-770.
- Koek, W., Jackson, A., Colpaert, F.C., 1992. Behavioral pharmacology of antagonists at 5-HT<sub>2</sub>/5-HT<sub>1C</sub> receptors. *Neuroscience & Biobehavioural Reviews* 16 (1), 95-105.
- Kunkel, G., 1991. Flora y Vegetación del Archipiélago Canario. Tratado florístico, 2<sup>a</sup> Parte, Dicotiledóneas. Edirca, S.L., Las Palmas de G.C., pp.63-64.
- Lahlou, S., de Barros Correia Jr., C.A., Vasconcelos dos Santos, M., Mauricio David, J., Pereira David, J., Pinto Duarte, G., Caldas Magalhães, P.J., 2007. Mechanisms

- underlying the cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in normotensive rats. *Vascular Pharmacology* 46 (1), 60-66.
- Lee, J.-J., Jin, Y.-R., Lim, Y., Hong, J.-T., Kim, T.-J., Chung, J.-H., Yun, Y.-P., 2006. Antiplatelet activity of carnosol is mediated by the inhibition of TXA2 receptor and cytosolic calcium mobilization. *Vascular Pharmacology* 45 (3), 148-153.
- Levy, L., 1969. Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sciences* 8 (11), 601-606.
- Lewis, D.A., Hanson, D., 1991. Anti-ulcer drugs of plant origin. En: G.P. Ellis y G.B. West (Eds.), *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 28, Elsevier Science Publishers B.V., pp. 201-231.
- Litchfield, J.T., Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 96 (2), 99-113.
- Litter, M., 1986. Farmacología de la inflamación. Antiinflamatorios no esteroides analgésicos antipiréticos. Antiinflamatorios específicos. Oro. En: *Farmacología experimental y clínica*, 7ª edición, "El Ateneo" Pedro García S.A., Buenos Aires, Argentina, pp.1303-1366.
- López Luengo, M.T., 2002. Flavonoides. *Offarm* 21 (4), 108-113.
- Madabushi, R., Frank, B., Drewelow, B., Derendorf, H., Butterweck, V., 2006. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *European Journal of Clinical Pharmacology* 62 (3), 225-233.
- Mathis, C., Ourisson, G., 1963. Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* I. Répartition de l'hypericine. *Phytochemistry* 2 (2), 157-171.
- Martin, M.J., Motilva, V., Alarcón de la Lastra, C., 1993. Quercetin and naringenin; Effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. *Phytotherapy Research* 7 (2), 150-153.
- Martin, M.J., Marhuenda, E., Perez-Guerrero, C., Franco, J.M., 1994. Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats *Pharmacology* 49 (3), 144-150.
- Mattace Raso, G., Pacilio, M., Di Carlo, G., Esposito, E., Pinto, L., Meli, R., 2002. In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54 (10), 1379-1383.

- Medina, M.A., Martínez-Poveda, B., Amores-Sánchez, M.I., Quesada, A.R., 2006. Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound?. *Life Sciences* 79 (2), 105-111.
- Meotti, F.C., Luiz, A.P., Pizzolatti, M.G., Kassuya, C.A.L., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., 2006. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: Evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 316 (2), 789-796.
- Merritt, A.T., Ley, S.V., 1992. Clerodane diterpenoids. *Natural Products Reports* 9, 243-287.
- Micó, J.A., 1990. Modelos animales de screening de antidepresivos. En: E. Alvarez, M. Casas, R. Noguera y C. Udina (Coords.), *Fármacos Antidepresivos, Promociones y Publicaciones Universitarias S.A.*, Barcelona, pp. 97-100.
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Oyoshikawa, T., Kumazawa, Y., Morikawa, S., 2003. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences* 74 (6), 709-721.
- Mukherjee, P.K., Verpoorte, R., Suresh, B., 2000. Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 70 (3), 315-321.
- Mukherjee, P.K., Suresh, B., Verpoorte, R., 2001. CNS active potentials of some *Hypericum* species of India. *Phytomedicine* 8 (5), 331-337.
- Müller, W.E., 2003. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacological Research* 47 (2), 101-109.
- Nahrstedt, A., Butterweck, V., 1997. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 30 (Supplement), 129-134.
- Naidu, P.S., Singh, A., Joshi, D., Kulkarni, S.K., 2003. Possible mechanisms of action in quercetin reversal of morphine tolerance and dependence. *Addiction Biology* 8 (3), 327-336.
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* 33 (1), 2-16.
- Nohria, V., 1983. A critical assessment of behavioural test procedures used to analyse dopaminergic and antidopaminergic drugs. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 5 (6), 357-364.

- Nöldner, M., Schötz, K., 2002. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Medica* 68 (7), 577-580.
- Orhan, D.D., Küpeli, E., Yesilada, E., Ergun, F., 2006. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *Viscum album* ssp. *album*. *Zeitschrift für Naturforschung* 61c, 26-30.
- Öztürk, Y., Aydin, S., Beis, R., Hüsnü Can Baser, K., 1996. Effects of *Hypericum calycinum* L. extract on the central nervous system in mice. *Phytotherapy Research* 10 (8), 700-702.
- Öztürk, B., Apaydin, S., Goldeli, E., Ince, I., Zeybek, U., 2002. *Hypericum triquetrifolium* Turra. extract exhibits antiinflammatory activity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* 80 (2-3), 207-209.
- Pafet, G.E., Barnes, J.M., 1964. Toxicity test. En: D.R. Laurence and A.L. Bacharach (Eds.), *Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics*, Academic Press Inc., London LTD., pp.135-166.
- Paladini, A.C., Marder, M., Viola, H., Wolfman, C., Wasowski, C., Medina, J.H., 1999. Flavonoids and the central nervous system: From forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51 (5), 519-526.
- Paredes Salido, F., Roca Fernández, J.J., 2003. El hipérico y el tratamiento de la depresión. *Offarm* 22 (1), 108-114.
- Pérez de Paz, P.L., Hernández-Padrón, C.E., 1999. Plantas medicinales o útiles en la flora canaria. *Aplicaciones populares*. Francisco Lemus (Ed.), La Laguna, España, p.115.
- Pistelli, L., Bertoli, A., Zucconelli, S., Morelli, I., Panizzi, L., Menichini, F., 2000. Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia* 71 (Suppl. 1), S138-S140.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioural despair in mice: A primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapie* 229, 327-336.
- Prado, B., Rabanal, R.M., Sánchez-Mateo, C.C., 2002. Evaluation of the central properties of several *Hypericum* species from the Canary Islands. *Phytotherapy Research* 16 (8), 740-744.

- Prisinzano, T.E., 2005. Psychopharmacology of the hallucinogenic sage *Salvia divinorum*. *Life Sciences* 78 (5), 527-531.
- Quintela, O., Cruz, A., Concheiro, M., de Castro, A., López-Rivadulla, M., 2005. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Revista de toxicología* 22 (1), 7-14.
- Rabanal, R.M., Arias, A., Prado, B., Hernández-Pérez, M., Sánchez-Mateo, C.C., 2002. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology* 81 (2), 287-292.
- Rabanal, R.M., Bonkanka, C.X., Hernández-Pérez, M., Sánchez-Mateo, C.C., 2005. Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. *Journal of Ethnopharmacology* 96 (3), 591-596.
- Ragasa, C.Y., Pendon, Z., Sangalang, V., Rideout, J.A., 1999. Antimicrobial flavones from *Coleus amboinicus*. *Philippine Journal of Science* 128 (4), 347-351.
- Ramabadran, K., Bansinath, M., Turndorf, H., Puig, M.M., 1989. Tail immersion test for the evaluation of a nociceptive reaction in mice. Methodological considerations. *Journal of Pharmacological Methods* 21 (1), 21-31.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K., 2004. Hormonas locales, inflamación y reacciones inmunitarias. En: *Farmacología*, 5ª Edición, Elsevier España, S.A., Madrid, España, pp. 217-243.
- Rieli Mendes, F., Mattei, R., Luiz de Araujo Carlini, E., 2002. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. *Fitoterapia* 73 (6), 462-471.
- Robson, N.K.B., 1977. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) I. Infrageneric classification. *Bulletin of the British Museum (Natural History). Botany* 5, pp. 293-355.
- Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M.A.C., Stoeckli-Evans, H., Hostettmann, K., 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 40 (5), 1447-1452.
- Rodríguez, B., Fernández-Gadea, F., Savona, G., 1984. A rearranged abietane diterpenoid from the root of *Salvia aethiopsis*. *Phytochemistry* 23 (8): 1805-1806.
- Rodríguez, B., de la Torre, M.C., Perales, A., Malakov, P.Y., Papanov, G.Y., Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M., 1994. Oxirane-opening reactions of some 6,19-oxygenated 4 $\alpha$ ,18- epoxy-*neo*-clerodanes isolated from *Teucrium*. Biogenesis and antifeedant activity of their derivatives. *Tetrahedron* 50 (18), 5451-5468.

- Rodríguez, B., de la Torre, M.C., Bruno, M., Piozzi, F., Vassallo, N., Ciriminna, R., Servettaz, O., 1996. Neo-clerodane diterpenoids from three species of *Teucrium*. *Phytochemistry* 43 (2), 435-438.
- Rodríguez, J.A., Theoduloz, C., Yáñez, T., Becerra, J., Schmeda-Hirschmann, G., 2006. Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: Assessment of its mechanism of action using *in vitro* models. *Life Sciences* 78 (21), 2503-2509.
- Rodríguez-Landa, J.F., Contreras, C.M., 2003. A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine* 10 (8), 688-699.
- Rotelli, A.E., Guardia, T., Juárez, A.O., de la Rocha, N.E., Pelzer, L.E., 2003. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research* 48 (6), 601-606.
- Roz, N., Mazur, Y., Hirshfeld, A., Rehavi, M., 2002. Inhibition of vesicular uptake of monoamines by hyperforin. *Life Sciences* 71 (19), 2227-2237.
- Rozalski, M., Kuzma, L., Krajewska, U., Wysokinska, H., 2006. Cytotoxic and proapoptotic activity of diterpenoids from *in vitro* cultivated *Salvia sclarea* roots. Studies on the leukemia cell lines. *Journal of Biosciences* 61 (7-8), 483-488.
- Sánchez de Medina, F., Vera, B., Gálvez, J., Zarzuelo, A., 2002. Effect of quercitrin on the early stages of haptan induced colonic inflammation in the rat. *Life Sciences* 70 (26), 3097-3108.
- Sánchez-Mateo, C.C., Prado, B., Rabanal, R.M., 2002. Antidepressant effects of the methanol extract of several *Hypericum* species from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology* 79 (1), 119-127.
- Sánchez-Mateo, C.C., Bonkanka, C.X., Prado, B., Rabanal, R.M., 2005. Antidepressant properties of some *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. extracts in the forced swimming test in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 97 (3), 541-547.
- Sánchez-Mateo, C.C., Bonkanka, C.X., Hernández-Pérez, M., Rabanal, R.M., 2006a. Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. *Journal of Ethnopharmacology* 107 (1), 1-6.
- Sánchez-Mateo, C.C., Bonkanka, C.X., Hernández-Pérez, M., Rabanal, R.M., 2006b. Recent Research on Several *Hypericum* Species Used in the Canary Islands for Their Medicinal Properties En: V.K. Singh, J.N. Govil, K. Ahmad y R.Kr. Sharma

- (Eds.), Recent Progress in Medicinal Plants, vol.15, Studium Press LLC, U.S.A., Houston, pp. 116-126.
- Sánchez-Mateo, C.C., Bonkanka, C.X., Prado, B., Rabanal, R.M., 2007. Antidepressant activity of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 112 (1), 115-121.
- Šavikin, K., Dobrić, S. Tadić, V., Zdunić, G., 2007. Antiinflammatory activity of ethanol extracts of *Hypericum perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. richeri* Vill. and *H. androsaemum* L. in rats. *Phytotherapy Research* 21 (2), 176-180.
- Savona, G., Paternostro, M.P., Piozzi, F., Rodríguez, B., 1979. New furanoid diterpenes from *Teucrium gnaphalodes* L'her. *Tetrahedron Letters* 20 (4), 379-382.
- Savona, G., García-Alvarez, M.C., Rodríguez, B., 1982. Dihydroteugin, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium chamaedrys*. *Phytochemistry* 21 (3), 721-723.
- Schmeda-Hirschmann, G., Rodríguez, J.A., Theoduloz, C., Astudillo, L., Feresin, G.E., Tapia, A., 2003. Free radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radical Research* 37 (4), 447-452.
- Schmitt-Schillig, S., Schaffer, S., Weber, C.C., Eckert, G.P., Müller, W.E., 2005. Flavonoids and the aging brain. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56 (Suppl. 1), 23-36.
- Schulz, V., Hänsel, R., Tyler, V.E., 1998. Rational Phytotherapy, third edition. Springer-Verlag, New York, pp. 50-65.
- Schulz, V., 2001. Incidence and clinical relevance of the interactions and side effects of *Hypericum* preparations. *Phytomedicine* 8 (2), 152-160.
- Schulz, V., 2002. Clinical trials with *Hypericum* extracts in patients with depression - Results, comparisons, conclusions for therapy with antidepressant drugs. *Phytomedicine* 9 (5), 468-474.
- Shank, R.P., Gardocki, J.F., Schneider, C.R., Vaught, J.L., Settler, P.E., Maryanoff, B.E., McComsey, D.F., 1987. Preclinical evaluation of McN-5707 as a potential antidepressant. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 242 (1), 74-84.
- Singh, A., Naidu, P.S., Kulkarni, S.K., 2002. Quercetin, a bioflavonoid, reverses development of tolerance and dependence to morphine. *Drug Development Research* 57 (4), 167-172.

- Smith, D.H., Vernier, V.G., 1978. Antidepressants. En: A.A. Rubin (Ed.), *New Drugs: Discovery and Development. Drug and the Pharmaceutical Sciences*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 203-261.
- Souza-Brito, A.R., Rodríguez, J.A., Hiruma-Lima, C., Haun, M., Nunes, D., 1998. Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 64 (2), 126-129.
- Srinivasan, K., Muruganandan, S., Lal, J., Chandra, S., Tandan, S.K., Raviprakash, V., Kumar, D., 2003. Antinociceptive and antipyretic activities of *Pongamia pinnata* leaves. *Phytotherapy Research* 17 (3), 259-264.
- Sturgeon, R.D., Fessler, R.G., Meltzer, H.Y., 1979. Behavioral rating scales for assessing phencyclidine-induced locomotor activity, stereotyped behavior and ataxia in rats. *European Journal of Pharmacology* 59 (3-4), 169-179.
- Tallarida, R.J., Murray, R.B., 1987. *Manual of pharmacological calculations with computer programs*, 2nd Edition. Springer-Verlag, New York, pp. 110-134.
- Thompson, E.B., 1990a. Bioscreening technique for analgesic activity. En: *Drug Bioscreening. Drug Evaluation Techniques in Pharmacology*, VCH Publishers, Inc., New York, pp. 53-78.
- Thompson, E.B., 1990b. Bioscreening technique for antipsychotic activity. En: *Drug Bioscreening. Drug Evaluation Techniques in Pharmacology*, VCH Publishers, Inc., New York, pp. 33-52.
- Thompson, E.B., 1990c. Bioscreening technique for antidepressant activity. En: *Drug Bioscreening. Drug Evaluation Techniques in Pharmacology*, VCH Publishers, Inc., New York, pp. 79-89.
- Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* 51(1), 5-17.
- Topcu, G., Tan, N., Ulubelen, A., Sun, D., Watson, W.H., 1995. Terpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Salvia candidissima*. *Phytochemistry* 40 (2), 501-504.
- Trease-Evans, W.C., 1991. *Farmacognosia*. Evans, 13<sup>a</sup> ed., Interamericana, Mc Graw-Hill, Madrid.
- Trovato, A., Raneri, E., Kouladis, M., Tzakou, O., Taviano, M.F., Galetti, E.M., 2001. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd. (Guttiferae). *Il Farmaco* 56 (5-7), 455-457.

- Turner, R.A., 1965a. Quantal responses. Calculation of the ED<sub>50</sub>. En: Screening Methods in Pharmacology, Academic Press, New York and London, pp. 60-68.
- Turner, R.A., 1965b. Analgesics. En: Screening Methods in Pharmacology, Academic Press, New York and London, pp. 100-117.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.H., Webb, D.A., 1968. In Flora Europaea, University press: Cambridge, vol. 2, 261-269.
- Ueda, H., Yamazaki, C., Yamazaki, M., 2002. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 25 (9), 1197-1202.
- Ulubelen, A., Birman, H., Oksuz, S., Topcu, G., Kolak, U., Barla, A., Voelter, W., 2002. Cardioactive diterpenes from the roots of *Salvia eriophora*. Planta Medica 68 (9), 818-821.
- Uydes-Dogan, B.S., Takir, S., Özdemir, O., Kolak, U., Topcu, G., Ulubelen, A., 2005. The comparison of the relaxant effects of two methoxylated flavones in rat aortic rings. Vascular pharmacology 43 (4), 220-226.
- Vanaclocha, B., Cañigüeral, S., 2003. Hipérico. En: Fitoterapia. Vademécum de prescripción, 4ª edición, Masson, S.A., Barcelona, p. 300.
- Van Dijk, J., Hartog, J., Hillen, F.C., 1978. Non-tricyclic antidepressants. En: G.P. Ellis y G.B. West (Eds.), Progress in Medicinal Research, vol. 15, Elsevier-North-Holland Biomedical Press, pp. 262-320.
- Vázquez André, M.L., Pérez Trullén, J.M., Tomás Casamayor, J.C., 2004. Tratamiento del síndrome doloroso. Offarm 23 (1), 74-78.
- Viana A., do Rego J.C., von Poser G., Ferraz A., Heckler A.P., Costentin J., Kuze Rates S.M., 2005. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. Neuropharmacology 49 (7), 1042-1052.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M., 1984. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 163-192.
- Wagner, H., 1989. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and anti-allergic activity. Planta Medica 55 (3), 235-241.
- Wagner, K.-H., Elmadfa, I., 2003. Biological relevance of terpenoids. Annals of Nutrition and Metabolism 47 (3-4), 95-106.

- Williamson, E.M., Okpako, D.T., Evans, F.J., 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity. En: *Pharmacological Methods in Phytotherapy Research*, vol. 1. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. John Wiley & Sons Ltd, England, pp.131-154.
- Williamson, E.M., 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 8 (5), 401-409.
- Willner, P., 1994. Animal model of depression. En: J.A. Den Boer y J.M. Sitsen (Eds.). *Handbook of depression and anxiety: A biological approach*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 291-311.
- Yan, F., Roth, B.L., 2004. Salvinorin A: A novel and highly selective  $\kappa$ -opioid receptor agonist. *Life Sciences* 75 (22), 2615–2619.
- Zaragozá García, F., Tofiño González, M.I., Oliveira Santamaría, L., 2002. Flavonoides y fitoterapia. *Revista de Fitoterapia* 2 (1), 21-32.
- Zhou, S., Koh, H.-L., Gao, Y., Gong, Z.-Y., Lee, E.J.D., 2004. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. *Life Sciences* 74 (8), 935-968.