UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de mecanismos de tipo antiadrenérgico alfa de los metabolitos flavonoides identificados en Achyrocline bogotensis (“Vira Vira”)

Lilian Ivon Ariza Patiño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
2021

Evaluación de mecanismos de tipo antiadrenérgico alfa de los metabolitos activos(Flavonoides) de Achyrocline bogotensis (“Vira Vira”)

Lilian Ivon Ariza Patiño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacología

Director:

Mario Francisco Guerrero Pabón

Profesor Titular del Departamento de Farmacia

Línea de Investigación:

Farmacología experimental del sistema nervioso central y del sistema cardiovascular

Grupo de Investigación:

Farmacología molecular (FARMOL Col0064459)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá D.C., Colombia

2021

Primero a Dios que es nuestro gran padre y proveedor. A mi mama por todo su apoyo y a mis lindas hijas que son el motor de mi vida.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Ivon Ariza P.

Nombre: Lilian Ivon Ariza Patiño

Fecha: 25 de noviembre del 2021

Agradecimientos

Un especial agradecimiento al doctor Mario Francisco Guerrero Pabón, profesor titular del departamento de farmacia, y tutor de este trabajo, por su inmejorable ayuda y apoyo; además de ser un excelente docente, es una magnifica persona.

Resumen

Evaluación de mecanismos de tipo antiadrenérgico alfa de los metabolitos flavonoides identificados en Achyrocline bogotensis ("Vira Vira").

Dado el impacto creciente en salud pública de la hipertrofia prostática benigna (HPB), en vista del incremento de la población adulta mayor masculina y habiéndose demostrado en un trabajo previo los efectos relajantes sobre el músculo liso del extracto *de Achyrocline bogotensis*, asociados a mecanismos de tipo antagonistas alfa-adrenérgicos (Lara *et al*, 2017)[(1)], en esta investigación se evaluó la actividad relajante de dos de los principales metabolitos flavonoides de la especie: quercetina y 5- hidroxi-7,8-dimetoxiflavona (moslosooflavona), con el fin de determinar su participación en la actividad global *de A.bogotensis*, en la preparación de anillos aislados de aorta de rata espontáneamente hipertensa (SHR). Los resultados mostraron un notable efecto de quercetina, comparable al patrón antagonista alfa utilizado: prazosín y similar al del extracto total, en tanto que fue leve el efecto encontrado con moslosooflavona. Al examinarse la interacción entre los dos flavonoides se observó que moslosooflavona disminuye el efecto de quercetina. Estos resultados confirmaron el efecto relajante tipo antiadrenérgico alfa-1 de *Achyrocline bogotensis*, dando soporte a su uso tradicional en el manejo de los síntomas de la HPB, destacando el papel clave que cumple quercetina como metabolito activo, a diferencia de moslosooflavona, pero introduce interrogantes sobre el uso eventual de esa mezcla flavonoide con ese fin terapéutico.

Palabras clave: quercetina, moslosooflavona, hiperplasia prostática benigna, *Achyrocline bogotensis*.

Abstract

Evaluation of alpha antiadrenergic mechanisms of flavonoid metabolites identified in *Achyrocline bogotensis* (“Vira Vira”)

Given the growing impact on public health of benign prostate hypertrophy (BPH), given the increase in the elderly male population and having demonstrated in a previous work the relaxing effects on smooth muscle of the extract of *Achyrocline bogotensis,* associated with mechanisms of type alpha-adrenergic antagonists (Lara et al, 2017)[1], in this research the relaxing activity of two of the main flavonoid metabolites of the species was evaluated: quercetin and 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone (moslosooflavone), in order to determine its participation in the global activity of *A. bogotensis*, in the preparation of rings isolated from spontaneously hypertensive rat aorta (SHR). The results showed a remarkable effect of quercetin, comparable to the alpha antagonist pattern used: prazosin and similar to that of the total extract, while the effect found with moslosooflavone was slight. When examining the interaction between the two flavonoids, it was observed that moslosooflavone decreases the effect of quercetin. These results confirmed the alpha-1 antiadrenergic relaxing effect of *Achyrocline bogotensis*, supporting its traditional use in the management of BPH symptoms, highlighting the key role that quercetin plays as an active metabolite, unlike moslosooflavone, but raises questions about the eventual use of this flavonoid mix for therapeutic purpose.

Keywords: quercetin, moslosooflavone, benign prostatic hyperplasia, *Achyrocline bogotensis.*

Contenido

Pág.

Resumen ..... **XI**

Lista de figuras ..... **XV**

Lista de tablas ..... **XVI**

Lista de abreviaturas ..... **XVII**

Introducción **1**

Objetivos **3**
General 3
Específicos 3

1. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) **5**

2. *Achyrocline bogotensis* **7**
2.1 Generalidades 7
2.2 Compuestos detectados y usos 8

3. Metodología **11**
3.1 Enfoque metodológico 11
3.2 Animales de experimentación 11
3.3 Material Vegetal 11
3.3.1 Secado y molienda de material vegetal 11
3.3.2 Preparación del extracto etanólico 12
3.4 Compuestos evaluados 12
3.5 Modelo de aorta aislada de rata 13
3.5.1 Diseño experimental 15
3.6 Consideraciones éticas 15

4. Resultados y Discusión **17**
4.1 Resultados 17
4.2 Discusión 24

5. Conclusiones y recomendaciones **27**
5.1 Conclusiones 27
5.2 Recomendaciones 27

A. Anexo: Estadística de datos. **29**

Bibliografía **33**

Lista de figuras

Pág.

Figura -1: *Achyrocline bogotensis.* 7
Figura -2: Estructura química de Quercetina…...……12
Figura -3: Estructura química de Moslosooflavona……..13
Figura -4: Curva concentración – respuesta del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o el agente de referencia, prazosín (1 µM)……...17
Figura -5: Curva concentración – respuesta. del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o quercetina (10^{-6}, 10^{-5} y 10^{-4} M)…….18
Figura -6 Curva concentración – respuesta. del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o de moslosooflavona (10^{-5}, $6x10^{-5}$ y 10^{-4} M)……..19
Figura -7 Curva concentración – respuesta. del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o de quercetina (10^{-4} M) y moslosooflavona ($6x10^{-5}$ M)……20
Figura -8 Curva concentración – respuesta. del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o de la mejor concentración de quercetina 1E-4 y mezcla de quercetina (10^{-4} M) + moslosooflavona ($6x10^{-5}$ M)…… . .21
Figura 9. Efecto máximo……..22
Figura 10. -LOG concentración efectiva 50……..23

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1: *Concentraciones inhibitorias* 50. ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
HPB	Hipertrofia prostática benigna
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
LUTS	Lower urinary tract symptoms- síntomas del tracto urinario inferior
5-ARI	Inhibidores de 5-alfa reductasa
EMS	Error medio estandar

Introducción

En el mundo existe un interés creciente por el uso de la medicina natural, que es una practica realizada hace cientos de años, pero con el tiempo hay mayor curiosidad en investigar acerca del tema en distintos ámbitos como son el industrial, el médico y el farmacéutico y explorar la biodiversidad vegetal de los diferentes países. En el caso de Colombia, es un país rico en flora y fauna, con diversos ecosistemas como bosques, sabanas, desiertos, selvas, pantanos, manglares, montañas y llanuras, que permiten la existencia de cientos de especies entre animales y vegetales; dentro de las vegetales el país cuenta con unas 45.000 especies, que se convierten entonces en posibles fuentes de sustancias aprovechables.

Las plantas se han utilizado como fuente de fármacos empleados en la medicina moderna y su uso se ha popularizado entre las personas, incluso algunos principios activos pueden ser más potentes que sus similares sintéticos, con la ventaja de que son químicamente biodegradables y de bajo impacto ambiental; esto ha hecho que el uso de los medicamentos a base de plantas haya aumentado e incluso ya se comercializan.

Dentro de las múltiples especies vegetales que encontramos en Colombia tenemos la familia Asteraceae también llamadas compositae, con más de 1000 géneros de los cuales el Achyrocline ha sido estudiado fitoquímica y farmacológicamente, incluso se encuentra dentro del grupo de plantas incluidas en las Normas Farmacológicas y en el Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales; tiene aprobada como indicación principal el uso como coadyuvante en el tratamiento de la patología prostática y de la piel.

Como referente teórico para el desarrollo de este trabajo, se tuvieron en cuenta los aportes realizados como parte de trabajo de grado de Lara et al llamado “Efecto antiadrenérgico alfa del extracto de Achyrocline bogotensis (Vira Vira) en anillos aislados de aorta de

rata”[1], del cual pudieron determinar que el extracto etanólico presentaba efectos relajante cuando la contracción había sido generada por fenilefrina sugiriendo un efecto antiadrenérgico alfa al tratarse de un agonista especifico para este tipo de receptores; apoyando así el uso de esta planta para patología prostática, ejerciendo su efecto a través de la relajación del musculo liso del uréter y mejorando el flujo urinario causante de la sintomatología. De igual manera se aislaron compuestos del extracto, que permiten ampliar el estudio a estos.

Objetivos

General

Determinar si metabolitos de tipo flavonoide identificados en la especie *Achyrocline bogotensis* (“Vira Vira”) ejercen mecanismos de tipo antiadrenérgico alfa.

Específicos

- Evaluar el efecto anti adrenérgico alfa de los metabolitos flavonoides: quercetina y 5-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona (moslosooflavona) en baño de órgano aislado.

- Establecer la potencia y eficacia relativa de tales metabolitos con respecto al extracto etanólico total de la especie.

1. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

También conocida como hipertrofia prostática benigna, se trata de una afección benigna en la que hay un crecimiento excesivo del tejido de la próstata, que puede llegar a presionar la uretra y la vejiga, bloqueando así el flujo de la orina, que resulta en síntomas del tracto urinario inferior conocidos por sus siglas en ingles LUTS. Es una afección muy común en los hombres de mediana edad; hasta el 15 % a 25 % de los hombres de 50 a 65 años tienen LUTS, que consisten en nicturia o aumento de la frecuencia de la orina por la noche, urgencia urinaria, aumento de la frecuencia, tenesmo vesical que es una sensación de no vaciar completamente la vejiga, esfuerzo para orinar, y flujo urinario débil. [(2)]

Con respecto a su epidemiologia, aproximadamente 15 millones de hombres en los Estados Unidos mayores de 30 años se ven afectados por LUTS asociados a HPB, que varia con la edad, en mayores de 50 años entre el 50% a 75 %, en mayores de 70 años, el 80 % padece LUTS. Debido a que el volumen de la próstata suele aumentar con la edad, y se asocia con LUTS, los hombres con agrandamiento de próstata significativo (> 50 cm^3) son 3.5 veces más propensos a padecer síntomas de moderados a severos. La tasa de incidencia es apróxidamente de 15 casos por 1000 personas-año de seguimiento, según estudios recientes realizados. [(3)]

La sintomatología en esta afección se puede dar a través de dos mecanismos: estático, en el cual el tejido prostático hiperplásico comprime la uretra y el dinámico con alteración a nivel del sistema nervioso adrenérgico y aumento del tono del músculo liso prostático; en ambos casos se aumentan la resistencia al flujo urinario a nivel de la salida de la vejiga, que se va adaptando a través de la hipertrofia de los músculos del detrusor para vencer esta resistencia y poder mantener el flujo urinario; sin embargo, con el tiempo, puede haber una mayor actividad del detrusor, causando algunos de los síntomas. La

terapia va dirigida a uno o ambos mecanismos. Actualmente se cuenta con varias opciones de tratamiento para estos pacientes que incluyen la vigilancia, el manejo farmacológico, las terapias mínimamente invasivas y la cirugía; para decidir cual utilizar debe tenerse en cuenta la condición del paciente y lo más importante es en que grado los síntomas afectan su calidad de vida, casi se vuelve una terapia individualizada. La Asociación Americana de Urología (AUA) creó y validó un índice de síntomas para la HPB, denominada Puntaje Internacional de Síntomas de la Próstata (IPSS), con preguntas que indagan sintomatología e incluso afección de la calidad de vida, con puntajes que van de 0 y 35.5, si la puntuación es menor a 8 significa síntomas leves, mientras que las puntuaciones de 8-19 significan síntomas moderados, y puntuaciones de 20 o más indican síntomas graves, esta herramienta se utiliza antes para determinar o sugerir manejo y después de los tratamientos para evaluar cambios. [4,5]

Dentro de la terapia farmacológica se cuenta con los agentes alfa-bloqueadores, inhibidores de 5-alfa reductasa (5-ARI), inhibidores de fosfodiesterasa 5, agentes anticolinérgicos y terapias combinadas.

Los receptores alfa-adrenérgicos se encuentran distribuidos en todo el cuerpo y regulan el tono del músculo liso, el receptor alfa-1a es el subtipo que se encuentra en mayor cantidad en el cuello de la vejiga y la próstata, y este es el blanco de la terapia; los bloqueadores alfa relajan el músculo liso en la próstata y el cuello de la vejiga, reduciendo así la resistencia al flujo urinario. Estos compuestos tienen un rápido inicio de acción con importante mejoría de los síntomas, con eficacias similares. Se cuenta con 3 generaciones por ahora, la primera es no selectiva y se asoció entonces con mayores efectos secundarios cardiovasculares y gastrointestinales, la segunda generación tiene impacto cardiovascular y riesgo de hipotensión por lo que se regula la dosis, y la tercera generación, que incluyen la Tamsulosina, son los mejor tolerados. [5]

De aquí surge la importancia de estudiar agentes de este tipo que son claves en el manejo de este tipo de patologías.

2. *Achyrocline bogotensis*

2.1 Generalidades

Esta planta pertenece a la familia Asteraceae también llamadas compositae, pertenece al orden de las Asterales, esta familia denominada de malas hierbas, incluye los géneros Achyrocline. Esta familia comprende numerosas especies que crecen desde el páramo de 4000 m.s.n.m. hasta 0 m.s.n.m. sobre el nivel del mar, con mayor distribución en los páramos y los subpáramos de las tres cordilleras. Se presentan como plantas herbáceas de alrededor de 1 m de altura, bien ramificadas, de tallos erectos y pubescentes en su gran mayoría, de hojas alternas sésiles de lineares a linear-lanceoladas de puntas agudas, lanuginosas o de pelos cortos lo que le otorga una coloración blanquecina. Las inflorescencias se denominan capítulos, casi siempre de color amarillento, en Colombia es frecuente en climas fríos y terrenos secos, crece a una altura de 2600-3300 m.s.n.m. [6,7]

Figura -1: *Achyrocline bogotensis.*

Taxonomía

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Achyrocline
Epíteto específico	bogotensis
Autor del epíteto específico	(Kunth) DC.
Nombre científico	*Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC.

Herbario JBB en línea - Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. (8)

Esta se conoce tradicionalmente como vira-vira, cenizo y suso y se encuentra dentro del grupo de plantas incluidas en las Normas Farmacológicas y en el Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales; tiene aprobada como indicación principal el uso como coadyuvante en el tratamiento de la inflamación leve de vías urinarias bajas y se reporta el uso, de forma tradicional, de las hojas y tallos en forma de decocción para el tratamiento de barros y espinillas.[9] En las plazas de mercado de Bogotá es posible conseguirla, con la indicación por parte de los comercializadores de uso para patología prostática, piel, y otras diversas inflamaciones, empleando las ramas en forma de decocción e infusión. [10]

2.2 Compuestos detectados y usos

A. bogotensis ha sido estudiada fitoquímicamente encontrándose varias clases de metabolitos secundarios tales como: alcaloides, flavonoides, taninos, antraquinonas, saponinas, esteroles, triterpenos, quercetina, 3-metoxiquercetina, gnafalina y ß-sitosterol. En las flores y hojas se encuentran tres flavonas metoxiladas, del extracto metanólico de las partes aéreas se han aislado los achirodímeros A, B, C, D y E, pinorrisenol, escoporoan, escopoletina, ácido ursólico y sitosterol. [11]

También cuenta con diferentes actividades que se le atribuyen. Téllez et al., en 2015,

realizaron el primer reporte de actividad antiviral in vitro contra rotavirus y astrovirus tras el estudio de extractos y fracciones, una de las cuales (F1/HM1) evidenció dicha actividad biológica. [12] Presento actividad antibacteriana, antifúngica y antiinflamatoria contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pyogenes*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida spp.* [6]

Se evaluó el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de A. bogotensis mediante el modelo de edema en pata de rata inducido por carragenina, encontrándose un efecto antiinflamatorio similar al patrón (diclofenaco) y a diferencia de este patrón comienza a evidenciar su acción a la primera hora de experimentación; concluyéndose también de acuerdo a los resultados obtenidos, que se puede clasificar dentro del grupo de los extractos de baja toxicidad y por lo tanto puede ser utilizado de manera segura. [13]

Como referente del presente trabajo se tienen las investigaciones realizadas por Lara et al, quienes demostraron que *Achyrocline bogotensis* posee un efecto anti adrenérgico alfa; soportando así el uso tradicional de este para aliviar los síntomas generados por la hipertrofia prostática benigna y ampliar el estudio a sus metabolitos. [1]

Cinco dímeros de ciclobutano, achyrodímeros A-E, junto con 11 compuestos fueron aislados del extracto metanólico de *Achyrocline bogotensis.* Varios de estos compuestos fueron investigados por inducir actividad citoquina en células sanguíneas mononucleares periféricas humanas. [14]

Otro estudio demostró que algunas fracciones tienen sustancias promisorias para su investigación en la actividad antioxidante y el efecto citotóxico. [7]

3. Metodología

3.1 Enfoque metodológico

Se trata de un estudio experimental que desarrollara pruebas biológicas de órgano aislado.

3.2 Animales de experimentación

Para el presente estudio se utilizaron ratas SHR (ratas espontáneamente hipertensas) machos, suministrados por el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales, con un peso promedio de 300 a 400 gr, se mantuvieron en un ambiente controlado, con comida y agua a libre demanda, ciclos de luz y oscuridad de 12/12 horas, temperatura entre 19 a 23 ºC y humedad relativa de 60 %. Para el desarrollo de las pruebas biológicas de órgano aislado, se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias (Acta 10/2019).

3.3 Material Vegetal

El material vegetal (hojas) se recolectó en Fómeque (Cundinamarca), y se clasificó en el Herbario de la Universidad Nacional de Colombia, donde reposa un ejemplar (Col 611955). Con el material recolectado se realizo la preparación de extracto etanólico como se cita a continuación.

3.3.1 Secado y molienda de material vegetal

Los tallos y hojas del material vegetal se lavaron y posteriormente se secaron en un horno de aire circulante, a una temperatura entre 40 a 50 °C durante 48 horas; posterior al secado se trituró en un molino de disco, se pesó y se guardó en frascos tapados, rotulados y protegidos de la humedad ambiente y de la luz.

3.3.2 Preparación del extracto etanólico

Se inició con 1517 g de material seco y molido, se procedió con percolación hasta agotamiento usando como solvente etanol al 96 %, y posteriormente se concentró hasta sequedad en un rotavaporador a una temperatura constante de 35 ºC, bajo presión reducida, y secado a temperatura ambiente con ayuda de un desecador a vacío y protegido de la luz, hasta obtener un extracto de consistencia blanda.

Se obtuvieron 249,65 gramos de extracto etanólico de vira vira, lo que indica un rendimiento del 16.4 %. El extracto se utilizó en los ensayos biológicos del presente estudio.

La consecución de los metabolitos de tipo flavonoide, se realizo comercialmente.

3.4 Compuestos evaluados

Se evaluaron 2 compuestos flavonoides identificados previamente en la especie *Achyrocline bogotensis*, y documentado en diferentes estudios de referencia [15, 16,17,18],los cuales se adquirieron de manera comercial y estos son:

- Quercetina
- 5 hidroxi- 7,8- dimetoxiflavona (Moslosooflavona)

Figura -2 Estructura química de Quercetina.

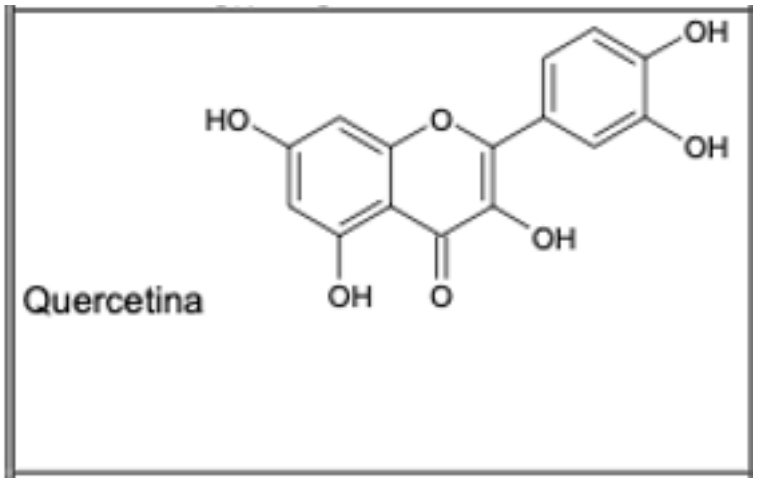
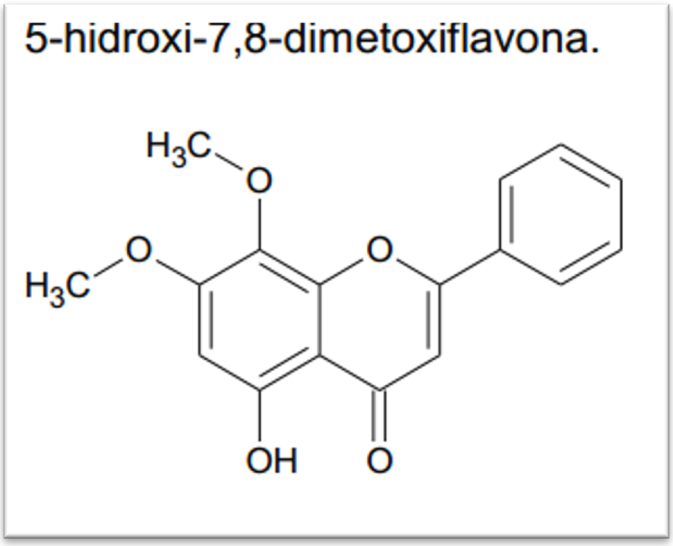


Figura -3 Estructura química de Moslosooflavona.



3.5 Modelo de aorta aislada de rata

Técnica: se debe primero sacrificar al animal, lo cual se realiza en cámara de CO_2, posterior a esto se debe extraer la aorta.

Se debe primero fijar la rata para proceder al procedimiento. Para retiro de aorta se debe realizar una toraco-laparotomía (incisión desde tórax a abdomen), que comprometa piel y planos musculares, disecando las estructuras y separando los órganos para visualizar la aorta y proceder a extraerla. [19]

Una vez removido el vaso se traslada a una caja de Petri con base de parafina inmersa en una solución nutricia oxigenada con carbógeno, aquí se le retirara grasa y tejido circundante y se cortara en anillos de 4 a 6mm los cuales luego se colocaran en el baño de órgano fijándolo por 2 extremos, uno al soporte inferior y otro al transductor.

Para el baño con anillos de aorta se debe utilizar una preparación con solución de Krebs-Henseleit oxigenada, ajustada a pH promedio de 7.4 con la siguiente composición (mM): NaCl, 118.0, KCl 4.7, $CaCl_2$1.8, $MgSO_4$, 1,2, KH_2PO_4, 1.2, ácido ascórbico 0.6, EDTA 0.03,

$NaHCO_3$ 25, glucosa 11.7, gasificada con carbógeno (O_2 95 % - CO_2 5 %), mantenida a 37 ºC promedio.

Cada baño de anillo de aorta se conectó a un transductor isométrico (FT 10, WPI) y este a su vez a un amplificador (ISDB-8, WPI), conectado al convertidor análogo digital del computador (LabTrax, WPI) para la visualización y registro de la señal de la fuerza generada por el anillo vascular. Luego de la fijación de los anillos, la tensión de fuerza basal que se aplicó para cada anillo fue de 2 gramos, para garantizar la estabilización de la preparación, para lo cual se requirió un periodo de equilibrio de aproximadamente 1 hora, con tres cambios del medio liquido cada 20 minutos. Una vez los anillos se encuentran estabilizados, ósea sin cambios significativos de la línea basal, se inicia el protocolo específico de acuerdo a cada mecanismo de acción, en este caso, se realizaron ensayos con curvas de inhibición de fenilefrina.

Luego de la estabilización se aplicó a cada baño de aorta fenilefrina 10^{-6} M (tiempo de incubación 40 minutos), hasta tener una respuesta estable de contracción máxima (fase de meseta), posterior a esto se realizaron los lavados de los anillos (6 en total), cada 15 minutos con solución de Krebs, hasta llevarlos hasta su estado basal.

Después aleatoriamente se adiciona a los anillos los diferentes tratamientos a probar, que son: extracto etanólico (0,1 mg/mL); quercetina en concentraciones $1x10^{-4}$, $1x10^{-5}$ y $6x10^{-5}$; moslosooflavona en concentraciones $1x10^{-4}$, $1x10^{-5}$ y $6x10^{-5}$; moslosooflavona $1x10^{-2}$+ quercetina $1x10^{-4}$ y como patrón prazosin (1µM), se dejan incubar las sustancias administradas durante 10 minutos y se empiezan a adicionar concentraciones acumulativas crecientes de fenilefrina en las siguientes concentraciones cada 5 minutos: $1x10^{-10}$, $1x10^{-9}$, $1x10^{-8}$, $3x10^{-8}$, $6x10^{-8}$, $1x10^{-7}$, $3x10^{-7}$, $6x10^{-7}$, $1x10^{-6}$, $3x10^{-6}$, $1x10^{-5}$ y $1x10^{-4}$.

De los ensayos se obtuvieron los datos de las curvas de inhibición a la fenilefrina (como control), con el calculo de la concentración efectiva 50 (concentración para alcanzar el 50% de la respuesta máxima y efecto máximo que es la máxima respuesta que se puede obtener), con sus respectivos errores estándar; y los efectos máximos para cada tratamiento aplicado. Para la tabulación y posteriores cálculos y graficas de datos se

utilizaron los programas de Excel y GraphPad, los cuales se muestran en el capitulo de resultados.

3.5.1 Diseño experimental

Cada uno de los anillos aislados de rata SHR correspondió a una unidad experimental, sobre el que se aplicó aleatoriamente uno de los siguientes tratamientos: (1) Control negativo (fenilefrina más DMSO), (2) Control positivo (fenilefrina más prazosín), (3) Extracto total de *A. bogotensis,* (4) Quercetina, (5) Moslosooflavona y (6) Quercetina más Moslosooflavona. Se construyeron curvas concentración – respuesta de fenilefrina en presencia y ausencia de los tratamientos, efectuando una regresión sigmoidea para obtener la potencia y la eficacia de relajación (concentración efectiva 50 -CE50- y el efecto máximo -Emax-). Los datos se expresaron como el promedio ± el error estándar (n: 6-12) y se normalizaron con respecto al control. Se efectuó un análisis de varianza con una $p<0,05$.

3.6 Consideraciones éticas

Para este tipo de estudio se siguen las disposiciones de la Ley 84 de 1989, que es el Estatuto Nacional de Protección de los animales, el cual pretende lograr que los animales tengan especial protección contra el sufrimiento y el dolor, causados directa o indirectamente por el hombre; y por lo cual el proyecto fue sometido a Comité de Ética institucional, con su respectiva aprobación (Acta 10-2019, fecha 23 de septiembre del 2019).

Las técnicas de manipulación y sacrificio de los animales se realizarán cumpliendo los principios internacionales aceptados y acogidos a las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud” establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia- Titulo V.

En este punto es importante aclarar que el uso de órganos aislado, primero proporciona datos importantes para la farmacología experimental con la ventaja que requiere pequeñas cantidades de sustancias, y requiere menor numero de animales de experimentación dada

la facilidad de realizar muchos experimentos con una sola preparación y su bajo costo.

Los residuos biológicos se dispusieron bajo protocolos del sistema de gestión ambiental de la Universidad Nacional, a través de la empresa Ecocapital quien se encarga de la disposición final de los mismos.

4. Resultados y Discusión

4.1 Resultados

Se realizaron curvas concentración vs respuesta con el objetivo de ilustrar y comparar la actividad inhibitoria que puede tener el extracto de *Achyrocline bogotensis* (*vira vira*), y los metabolitos quercetina y moslosooflavona a distintas concentraciones, usando anillos de aorta de rata. Las concentraciones de fenilefrina son sucesivas, mientras que las de extracto y mezclas de flavonoides son fijas.

Como agente antagónico se usa prazosin en la concentración de 1 E-10 M el cual tiene un efecto inhibitorio de la actividad agonista alfa de fenilefrina, dicho efecto se observa en la figura 4. De la cual se observa que tanto prazosín como el extracto de vira vira, poseen una actividad antagónica al ser adicionada fenilefrina a dosis sucesivas y acumulativas, en el rango de 1E-12M a 1E-4M.

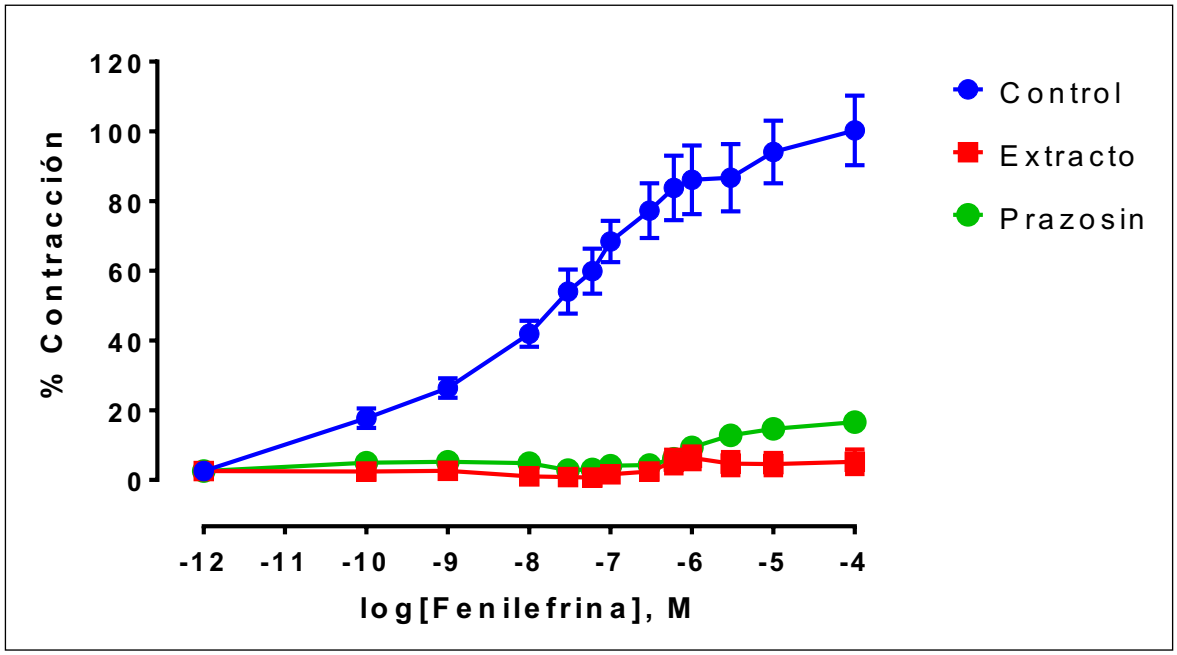


Figura -4.*Curva concentración – respuesta. del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o el agente de referencia, prazosín (1 µM), en anillos aislados de aorta de rata SHR. Cada punto representa el promedio con su respectivo EMS.*

Para evaluar el efecto inhibitorio de quercetina al ser adicionada con fenilefrina, se realiza la adición de quercetina a 3 concentraciones distintas (1E-4 M, 1E- 5M y 6E-5M) y se compara con el efecto observado en el extracto y como control se usa fenilefrina. Quercetina tiene un efecto inhibitorio mayor al 80 %, siendo la concentración de 1E-4M la que presenta mejor perfil inhibitorio. Al ser comparada con relación al extracto, quercetina tiene un perfil muy similar al del extracto. Figura 5

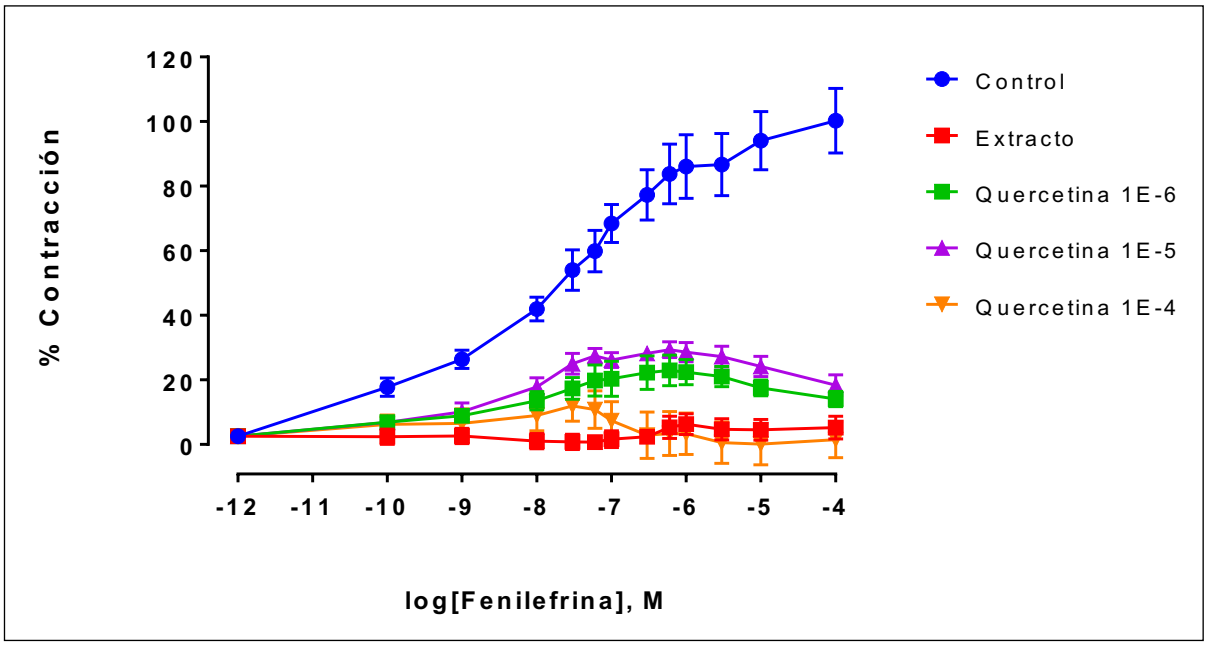


Figura -5 *Curva concentración – respuesta. del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o quercetina (10^{-6}, 10^{-5} y 10^{-4} M), en anillos aislados de aorta de rata SHR. Cada punto representa el promedio con su respectivo EMS.*

En la figura 6 se observa la adición de 3 concentraciones distintas de moslosooflavona, $1x10^{-4}$ M, $1x10^{-5}$ M, $6x10^{-5}$ M, a adiciones acumulativas de fenilefrina. La concentración que presenta mejor inhibición de la actividad de fenilefrina es $6x10^{-5}$ M. El efecto inhibidor de moslosooflavona se encuentra entre un 20 y 40 %, siendo el mayor efecto observado a concentración de $6x10^{-5}$ M.

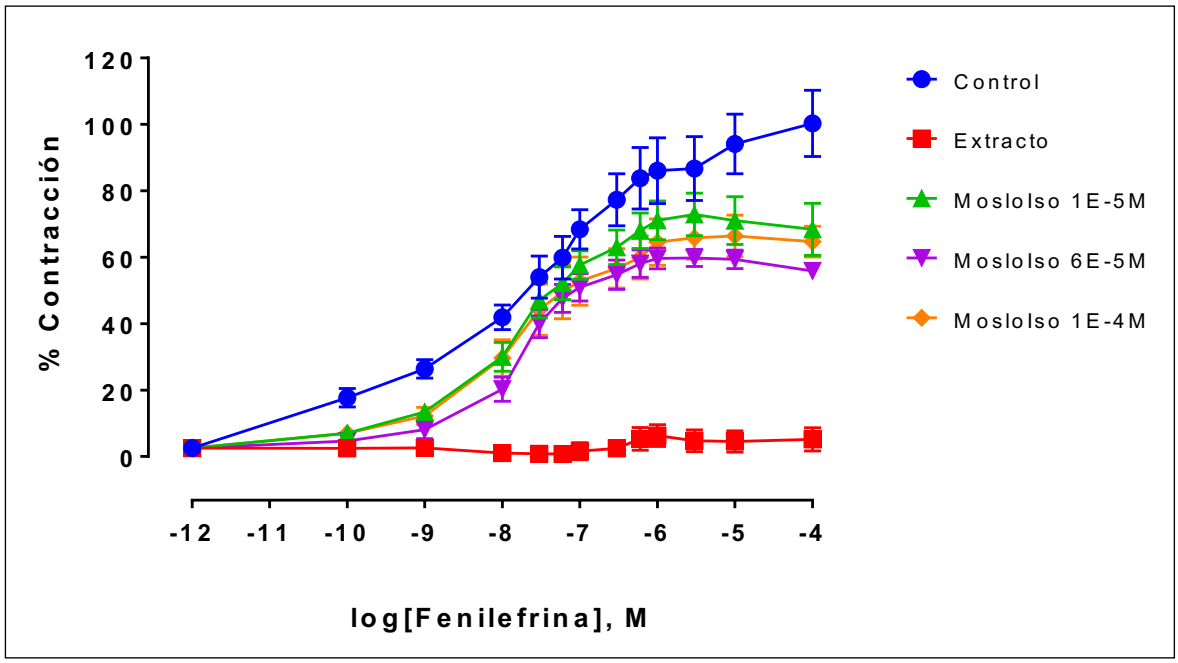


Figura -6 *Curva concentración – respuesta. del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o de* moslosooflavona *(10^{-5}, $6x10^{-5}$ y 10^{-4} M), en anillos aislados de aorta de rata SHR. Cada punto representa el promedio con su respectivo EMS.*

La figura 7 muestra la comparación al adicionar extracto de vira vira con respecto a la mezcla de quercetina y moslosooflavona; de la cual se observa que el extracto presenta una actividad inhibitoria en relación a fenilefrina, mientras que la mezcla quercetina – moslosooflavona solo inhibe el efecto de fenilefrina a dosis menores que 1*10 -8 M de fenilefrina.

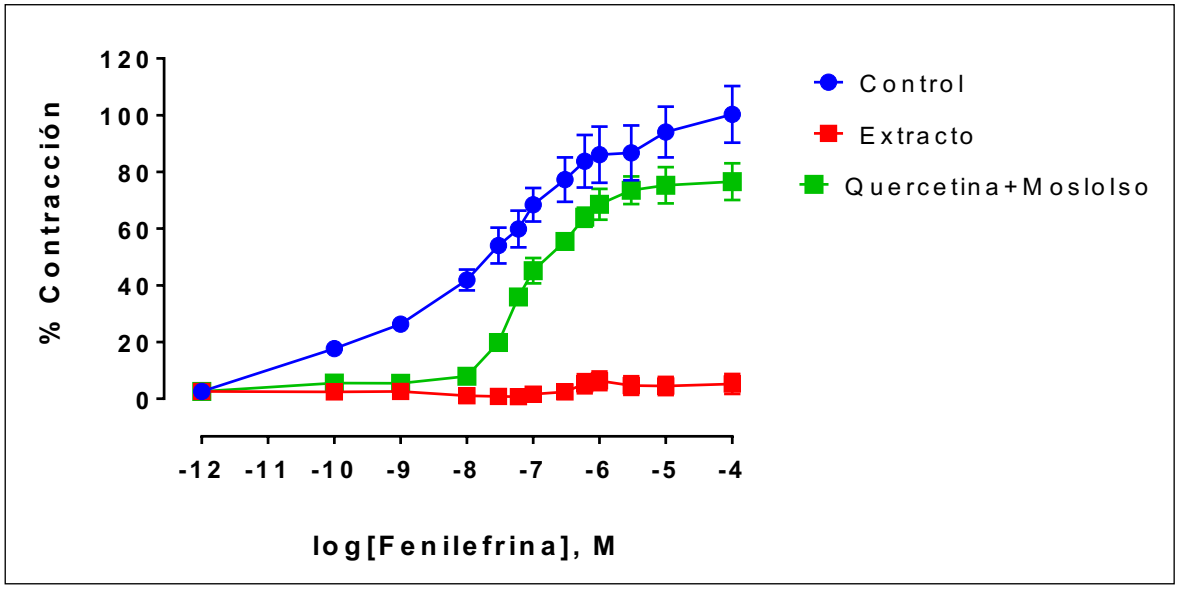
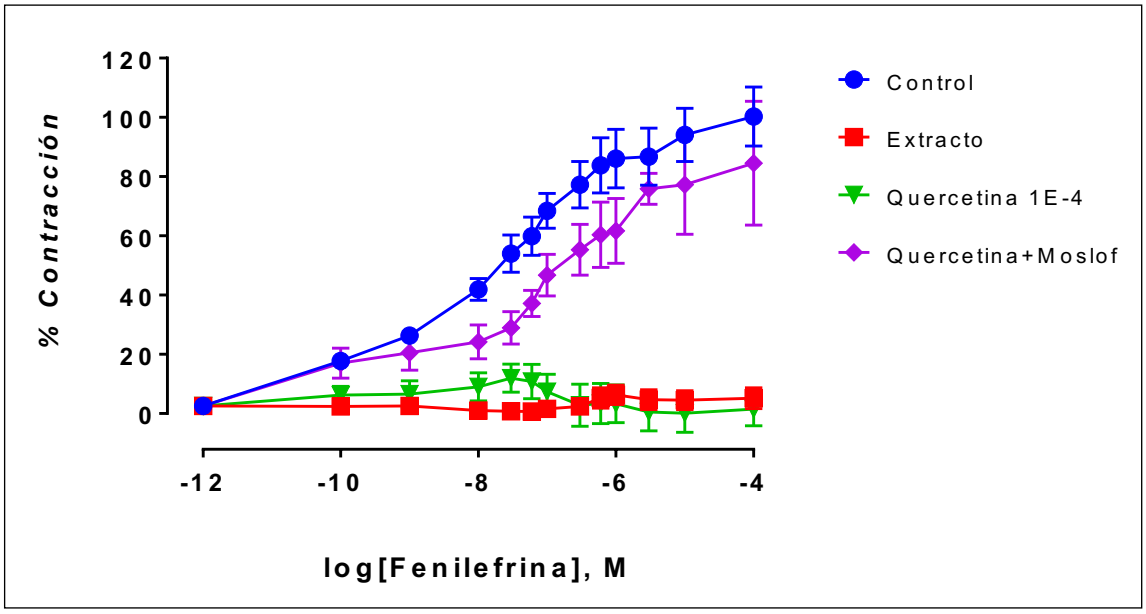


Figura -7 *Curva concentración – respuesta. del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o de quercetina (10^{-4} M) y moslosooflavona ($6x10^{-5}$ M), en anillos aislados de aorta de rata SHR. Cada punto representa el promedio con su respectivo EMS.*

Se realiza la figura 8 con el objetivo de mostrar el efecto que tiene el adicionar quercetina y una mezcla de quercetina + moslosooflavona a concentraciones sucesivas de fenilefrina. En dicha grafica se observa que al adicionar moslosooflavona a quercetina el efecto inhibidor se pierde, ya que pasa de una inhibición total a una menor al 20 %; ósea no mejora el efecto de la quercetina si no que al contrario lo inhibe, no hay sinergia.

Figura -8 *Curva concentración – respuesta. del agonista alfa fenilefrina en presencia y en ausencia del extracto total de A. bogotensis o de la mejor concentración de quercetina 1E-4 y mezcla de quercetina (10^{-4} M) + moslosooflavona ($6x10^{-5}$ M), en anillos aislados de aorta de rata SHR. Cada punto representa el promedio con su respectivo EMS.*



Para evaluar el efecto antagonista alfa adrenérgico de las mezclas usadas, se realiza la comparación de todas las concentraciones usadas (ver figura 9). En esta se tiene un efecto máximo de contracción (100 %), el cual es logrado por la adición sucesiva y acumulativa de fenilefrina desde 1 E-12 M hasta 1 E-4M; con base a este resultado se comparan en porcentaje el efecto en los demás muestras. Se observa que extracto, quercetina y prazosin son los compuestos que presentan mejor actividad inhibitoria, mientas que moslosooflavona al estar presente, inhibe la actividad de quercetina y permite la actividad agonista alfa 1 característica de fenilefrina. La inhibición de la actividad alfa 1 agonista para quercetina, prazosin y extracto es mayor al 90 %.

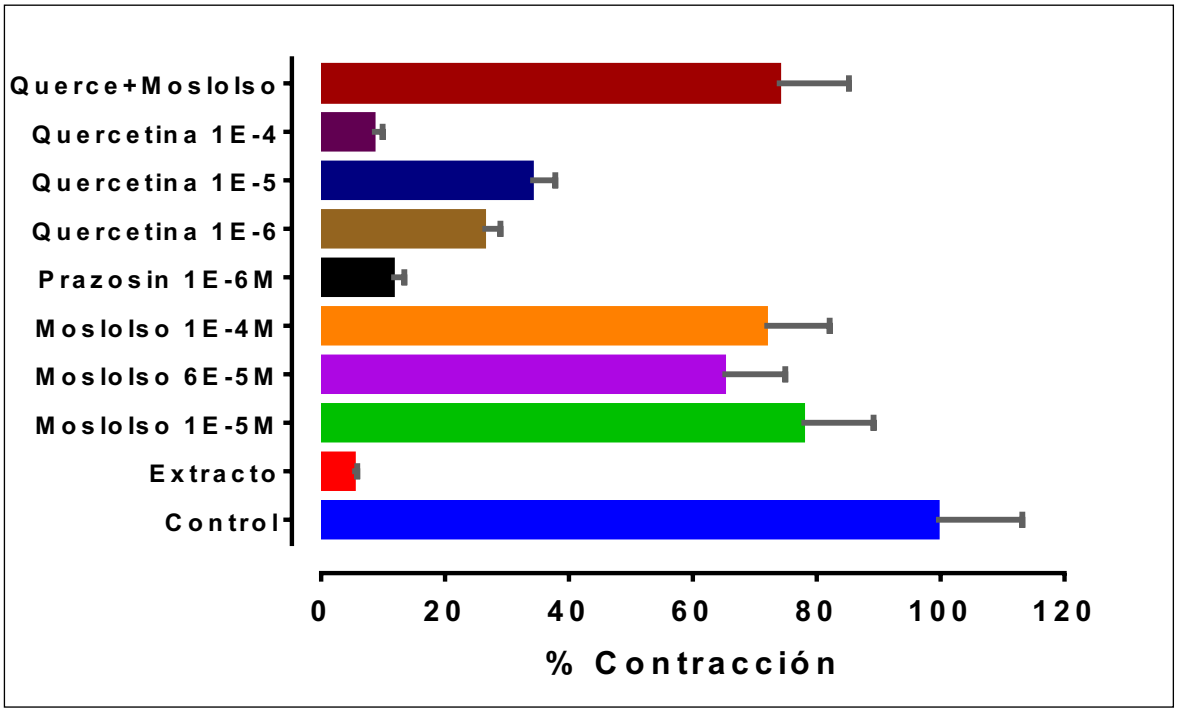


Figura 9. *Efecto máximo. Diferentes concentraciones usadas vs respuesta (contracción). Se usa fenilefrina como efecto máximo de contracción. Se presentan las barras de error ajustadas de acuerdo a su EMS.*

La grafica de concentración IC 50 (figura 10) se desarrolla con el fin de cuantificar la respuesta de los extractos y sustancias usadas, para fines de ordenamiento de los datos, se grafica el –LOG IC50 y así obtener comparaciones en ordenes de magnitud similares. Los que presentan IC50 similares a fenilefrina (control) son quercetina + moslosooflavona y las tres concentraciones de Moslosooflavona. En contraste quercetina 1E-5 y prazosín 1E-6M tienen una IC50 muy baja. (Ver Anexo A1)

MUESTRA	-LOG IC50	SEM
Control	7,79	0,137
Moslof 1E-5M	7,06	0,120
Moslof 6E-5M	6,30	0,129
Moslof 1E-4M	6,72	0,146
Prazosín 1E-6M	0,18	0,580
Quercetina 1E-5	0,08	1,185
Quercetina+Moslof	6,55	0,069

Tabla 1. *Concentraciones inhibitorias 50 de las muestras analizadas expresadas como –Log IC50; se reporta el Error Medio Estándar (SEM) para cada una de las muestras. Son los datos que se usaron para elaborar la figura 10.*

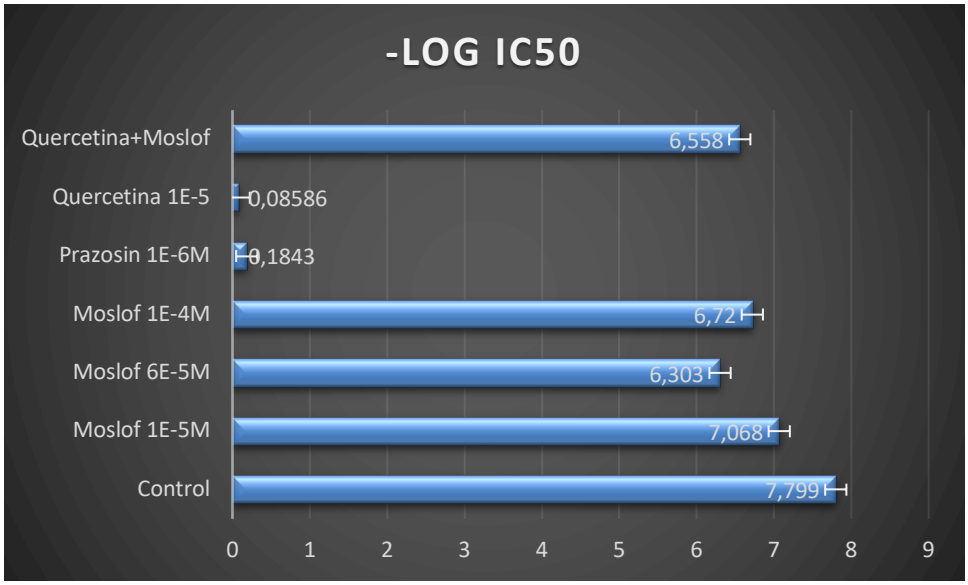


Figura 10. *-LOG concentración efectiva 50. Concentración IC 50 en relación a las muestras analizadas, quercetina 1E-5, Quercetina+ Moslosooflavona, Prazosín 1 E-6M, Moslosooflavona en concentraciones de 1E-4M, 1E-5M y 6E-5M, control (Fenilefrina).*

La IC50 es una medida cuantitativa que indica la capacidad inhibitoria de una sustancia, siendo aquel punto en el cual se alcanza una inhibición equivalente al 50%. En este caso se puede realizar el análisis en dos perspectivas; una como comparativo de efecto contracturante, similar a fenilefrina y otro el de efecto inhibitorio o antagonista adrenérgico alfa.

En el caso del comparativo de efecto contracturante las sustancias que presentan menor IC50 son control, las tres concentraciones de moslosooflavona y quercetina + moslosooflavona. Esto indica que presentan un efecto similar y en igual magnitud a fenilefrina al ser aplicado al músculo liso de la aorta de rata. Para el extracto y quercetina en sus tres concentraciones no se logra el efecto contracturante, lo cual indicaría un efecto inhibitorio de la acción de fenilefrina, como se analizó anteriormente.

En cuanto al efecto inhibitorio de la contracción se ve que las sustancias que presentan valores de IC50 menores, son los que tienen bajo o nulo efecto inhibitorio, como lo son moslosooflavona y quercetina + moslosooflavona. Las sustancias que no alcanzan una concentración IC 50 serán las que tienen un efecto antagonista adrenérgico alfa, contrario a fenilefrina, en las concentraciones analizadas de 1E-12M a 1E-4M. Estas son quercetina en sus tres concentraciones y el extracto de vira vira. Cabe resaltar que al adicionar

moslosooflavona al extracto de quercetina la capacidad inhibitoria de la contracción disminuye totalmente, ya que pasa de una inhibición total a un nivel de contracción del 84 % en comparación con fenilefrina.

4.2 Discusión

En los ensayos de dosis – respuesta, el extracto de vira vira presentó efectos relajantes frente a fenilefrina, lo cual sugiere que posee un efecto antiadrenérgico alfa; ya que causa un efecto significativo de relajación cuando la contracción ha sido generada por fenilefrina que es un agonista especifico para receptores de tipo alfa, los cuales predominan en las membranas del musculo liso. [1]

En la aorta de rata aislada, los receptores que predominan son los de tipo Alfa, por tanto, presentan buena respuesta al ser sometidos a contracción con fenilefrina. En este caso se usa una curva de inhibición de contracción usando extracto de vira vira, quercetina y moslosooflavona frente a adición de concentraciones sucesivas de fenilefrina. Se evaluó la viabilidad de uso de los anillos, contrayendo con fenilefrina, además se descartaron los que presentaron bajo nivel de respuesta al estímulo químico.

De acuerdo a la relación estructura actividad, fenilefrina presenta interacción con el receptor alfa, debido el anillo bencénico que provee de ambiente para interacciones de tipo Van der Waals, los hidroxilos en posiciones 3’ y 4’ son útiles para la unión al sitio activo, mediante enlaces de Hidrógeno. El carbono quiral, en su conformación R presenta mejor actividad que el S. Su cadena lateral al contener un grupo metilo, ayuda a mejorar la selectividad por el receptor Alfa 2. El nitrógeno de la cadena lateral permite una interacción iónica al anclaje del sitio activo, por último, uno o más sustituyentes alquílicos del grupo amino incrementan la selectividad por los receptores de tipo Beta. [20]

El sitio activo del receptor adrenergico con tiene aminoácidos especificos que permiten las interacciones antes mencionadas, los cuales son fenilalanina-290, Asparagina-293, serina 207 y 204 y Asparagina 113. [20]

Cuando se realiza la comparación estructural con quercetina, se puede relacionar que los efectos biológicos de quercetina dependen de la disposición de los grupos funcionales sobre su estructura [21]. Se conoce que quercetina es uno de los más potentes

antioxidantes y la presencia de dos hidroxilos en el anillo B (carbonos 3´y 4´), un doble enlace en el anillo C (carbonos 2 y 3) y la disposición de grupos hidroxilo de los anillos A y C (carbonos 3,5 y 7) confieren un potencial captador de radicales libres y una mayor estabilidad a su forma auto-oxidada[22]. Estas características estructurales le dan la capacidad a quercetina para ser oxidada por oxígeno y generar O2-, el cual reacciona con NO. [23]

En varias investigaciones se ha visto que los flavonodes que tienen mejor actividad vasoldilatadora son los que tienen mayor carácter lipofílico, por ejemplo la introduccion de un grupo alilico, junto con la disminución de grupos hidroxilos en el anillo A y la presencia de esqueletos estructurales del tipo chalcona, Flavanona y Aurona y sustituyentes en el anillo B mejoran su actividad y selectividad. [24,25]

De acuerdo a los resultados presentados en este estudio, se observa que el extracto de vira vira y quercetina poseen actividad inhibitoria de la contracción con fenilefrina; mientras que moslosooflavona no interefiere en la actividad contracturante de feniefrina. Esto indica que el extracto contiene metabolitos que actuan como agentes antiadrenergicos alfa, posiblemente se debe a su contenido en quercetina y otros flavonoides. Como comparador se usa moslosooflavona en mezcla con quercetina, y se obtiene que moslosooflavona presenta un efecto inhibidor de la actividad de quercetina. Esto puede indicar que existe una inhibición competitiva entre moslosooflavona y quercetina que no afecta la actividad de fenilefrina.

Por su estructura quercetina compite por el sitio activo con fenilefrina, generando el efecto antialfa adrenérgico, puesto que posee varios anillos aromáticos y elongaciones de cadenas carbonadas, las cuales le permiten la interacción con los aminoacidos del sitio activo mediante formación de enlaces de puentes de hidrógeno e interaccion de Van der Waals. Cuando se mezcla quercetina y mosloisoflavona se genera competicion por el sitio activo, siendo mas afin por este mosloisoflavona, la cual posee dos o-metilaciones en el anillo A del esqueleto de flavonoide, esto le da mayor carácter lipofílico y por ende mejor afinidad al receptor alfa adrenergico.

En cuanto al modelo de órgano aislado se puede decir que es adecuado ya que permite la reproducibilidad, permite una buena obtención de datos, varios experimentos en una sola preparación, bajo costo, permite realizar la comparación simultanea usando distintas

sustancias, apostando así información valiosa acerca de su efecto farmacológico y mecanismo de acción. Sin embargo, no es concluyente sobre la respuesta total en un organismo, ya que solo se usa una parte de un sistema y órgano.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Se corrobora el hallazgo descrito como antecedente de este trabajo, realizado por Lara et al, en el cual el extracto etanólico de *Achyrocline bogotensis* ejerce efectos de tipo antiadrenérgico alfa sobre los anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina, esta vez en anillos de rata espontáneamente hipertensa (SHR).
- Quercetina juega un papel fundamental en el efecto relajante de músculo liso ejercido por la especie *A. bogotensis*, en tanto que el efecto de mosloosooflavona es muy discreto.
- No cabe esperar una fuente eventualmente terapéutica a partir de la mezcla de los flavonoides quercetina y mosloosooflavona para el manejo sintomático de la hiperplasia prostática benigna.
- No se descarta que otros metabolitos presentes en *A. bogotensis* participen en el efecto global observado con el extracto total.
- Hay soporte adicional a partir de este estudio, para el uso tradicional de *A. bogotensis* ("*Vira vira"*) en la hipertrofia prostática benigna.

5.2 Recomendaciones

Continuar con el estudios de otros metabolitos, flavonoides y no flavonoide, identificados en *Achyrocline bogotensis*, con el fin de comprobar su participación en el efecto relajante de la musculatura lisa.

A. Anexo: Estadística de datos.

Muestra	LogIC50	IC50	Inter Conf LogIC50	Inter Conf IC50
Control	-7,799	1,59E-08	-8,071 to -7,527	8,499e-009 to 2,969e-008
Extracto	N/A	N/A	N/A	N/A
Moslof 1E-5M	-7,068	8,56E-08	-7,308 to -6,828	4,921e-008 to 1,487e-007
Moslof 6E-5M	-6,303	4,98E-07	-6,561 to -6,044	2,748e-007 to 9,031e-007
Moslof 1E-4M	-6,720	1,91E-07	-7,011 to -6,428	9,742e-008 to 3,73e-007
Prazosin 1E-6M	-0,184	6,54E-01	-1,339 to 0,9708	0,04578 to 9,349
Quercetina 1E-6	N/A	N/A	N/A	N/A
Quercetina 1E-5	0,086	1,22E+00	-2,272 to 2,444	0,005346 to 277,8
Quercetina 1E-4	N/A	N/A	N/A	N/A
Quercetina+Moslof	-6,558	2,77E-07	-6,696 to -6,419	2,012e-007 to 3,813e-007

Anexo A1. *Concentraciones inhibitorias (IC50) de las muestras analizadas, se incluyen los intervalos de confianza para el Log IC50 y IC50, con un p<0,05. N/A notación aclaratoria para sustancias que no alcanzan una concentración IC 50*

Bibliografía

1. Lara N, Rincón J, Guerrero M. Efecto antiadrenérgico alfa del extracto de Achyrocline bogotensis ("Vira Vira") en anillos aislados de aorta de rata. [Tesis Maestría]. Universidad Nacional de Colombia; Bogotá, 2016.
2. Benign Prostatic Hyperplasia And Urinary Symptoms: Evaluation And Treatment [Internet]. Postgraduate Medicine; 2015. Available from: https://doi.org/10.1080/00325481.2015.1018799
3. Egan K. The Epidemiology of Benign Prostatic Hyperplasia Associated with Lower Urinary Tract Symptoms: Prevalence and Incident Rates. Urol Clin North Am [Internet]. 2016 Aug:43(3):289-97. Available from: doi: 10.1016/j.ucl.2016.04.001.
4. UNNIKRISHNAN R, ALMASSI N, FAREED K. Benign prostatic hyperplasia: Evaluation and medical management in primary care. Cleve Clin J Med [Internet]. 2017 Jan;84(1):53-4. Available from: 10.3949/ccjm.84a.16008
5. Brandon VA, Barkin J, Elterman D. Medical therapy for benign prostatic hyperplasia: a review. Can J Urol. 2015 Oct:22(Suppl 1):7-17.
6. Chitiva D, Restrepo A, Torrenegra R. Actividad Antibacteriana y Antifúngica del Achyrocline bogotensis H.B.K. [Tesis Pregrado]. [Bogotá]: Pontificia Universidad Javeriana.; 1988.
7. Contreras. J. Evaluación de la actividad antioxidante y el efecto citotóxico de los extractos etanólicos, etéreos y fracciones de las inflorescencias y hojas de Achyrocline bogotensis (Kunth) DC (Asteraceae). [Tesis Pregrado]. Universidad Distrital Francisco Jose de Caldas. [Bogotá]; 2015.
8. Herbario JBB en línea - Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. Disponible en: http://colecciones.jbb.gov.co/herbario.
9. COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución 2834 (30, Julio, 2008). Por la cual se adopta el Vademécum de Plantas Medicinales Colombiano y se establecen los lineamientos para su actualización. Bogotá D. C., 2008
10. LC Pabón, MF Rodríguez, P Hernández-Rodríguez. 2017. Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 16. 2017(6): 529 – 546.
11. Vega J. Contribución a la estandarización del proceso de obtención de un extracto a escala de laboratorio a partir de las partes aéreas de Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. [Tesis Maestría]. Universidad Nacional de Colombia; Bogotá 2016.
12. Téllez M, Ulloa J, Téllez A, Vélez F. In vitro antiviral activity against rotavirus and astrovirus infection exerted by substances obtained from Achyrocline bogotensis (Kunth) DC. (Compositae). BMC Complementary and Alternative Medicine.2015;15(1): 428, 2015.

13. Pombo L.M. Caracterización fitoquímica y farmacológica del extracto de la planta vira- vira (*Achyrocline bogotensis* H.B.K.). *Documenta Clínica*, 2003; 16: 11-18.
14. Sagawa T, Takaishi Y, Fujimoto Y, Duque C, Osorio C, Ramos F, et al. Cyclobutane dímeros de la planta medicinal de Colombia *Achyrocline bogotensis*. *J Nat Prod*, 2005; 68:502-5
15. Torrenegra R.D, Fuentes O, Pedroso J. Estudio químico de plantas colombianas de las familias Compuestas y Apocináceas. Monografía. Bogotá: Depto. de Química. Pontificia Univ. Javeriana; 1984
16. Pulido L, Salama A.M. Contribución al estudio farmacognóstico, fitoquímico y perfiles cromatográficos de *Achyrocline bogotensis* "vira-vira". Tesis de grado. Bogotá: Depto. de Farmacia, Facultad de Ciencias. Univ. Nacional de Colombia; 2006.
17. Pombo L.M. Caracterización fitoquímica y farmacológica del extracto de la planta vira- vira (*Achyrocline bogotensis* H.B.K.). *Documenta Clínica*, 2003; 16: 11-18.
18. Torrenegra R.D, Escarria S, Tenorio E, Achenbach H. Phytochemical study of *Achyrocline bogotensis*. *Rev Latinoam Quim*, 1982; 13:75-6.
19. Guerrero M. Guía para la evaluación farmacológica de agentes vasodilatadores en baños de órgano aislado. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2016.
20. Graham L Patrick. Fifth edition. And introduction to Medicinal Chemestry, Oxford university Press. United Kingdom 20013 pp 615.
21. Kumar S, Pandey A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal, vol. 2013, 1-16. Article ID 162750.
22. Martínez S., Gonzáles J., Culebras J., et al. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp, 2002; 17 (6): 271-278.
23. Guerrero MF, Puebla P, Carrón R, Martín ML, San Román L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from Croton schiedeanus Schlecht. J Pharm Pharmacol. 2002 Oct;54(10):1373-8. doi: 10.1211/002235702760345455. PMID: 12396299.
24. Xiaowu Dong, Tao Liu, Jingying Yan, et al. Synthesis, biological evaluation and quantitative structure-activities relationship of flavonoids as vasorelaxant agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry, Volume 17, Issue 2, 2009,Pages 716-726.
25. Dong X, Wang Y, Liu T, et al. Flavonoids as vasorelaxant agents: synthesis, biological evaluation and quantitative structure activities relationship (QSAR) studies. Molecules. 2011. Sep 28;16(10):8257-72. doi: 10.3390/molecules16108257. PMID: 21959298; PMCID: PMC6264760.