

137
2 ej^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE ALGUNAS ACTIVIDADES
BIOLOGICAS DEL METABOLITO SECUNDARIO
BENZILESTER DEL ACIDO O-METOXI SALICILICO,
EXTRAIDO DE *Eupatorium pettolare* Moc.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ANTONIO NIETO CAMACHO



TESIS CON FALLA DE ORIGEN MEXICO, D. F. SECCION ESCOLAR

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Estudio de algunas actividades biológicas del metabolito secundario
benzilester del ácido 6-metoxi salicílico, extraído de Eupatorium
petiolare Moc.
realizado por Antonio Nieto Camacho

con número de cuenta 8432085-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	
Propietario	M. en C. Javier Antonio Taboada Ramírez
Propietario	Dr. Carlos Guerrero Ruiz
Propietario	Dr. Fructuoso Ayala Guerrero
Suplente	Biol. José Armando Muñoz Hoya
Suplente	Dr. José Serafín Calderón Rardo

Consejo Departamental de Biología

A mi madre Roselia Camacho García, por tu apoyo, confianza y cariño en todos estos años.

A mi abuelita Marina García López, gracias por tus sabios consejos y por compartir conmigo la sabiduría acumulada en tantos años de tu vida.

A mi hermano Alejandro, por mostrarme una nueva filosofía sobre la vida.

Con especial afecto a Eyra, por tu cariño, apoyo y comprensión en el tiempo que hemos compartido y sobre todo, por ser mi amiga.

A mis amigos y compañeros de generación con los que paso momentos muy agradables, en especial a Lupita, Armando, Chuy, Javier, Claudia C. y Héctor.

Este trabajo fue realizado
en el Laboratorio de Pruebas Biológicas
del Instituto de Química de la UNAM.

Durante su realización
se contó con el apoyo de una beca
otorgada por la D.G.A.P.A.

ESTUDIO DE ALGUNAS ACTIVIDADES
BIOLOGICAS DEL METABOLITO SECUNDARIO
BENZILESTER DEL ACIDO 6-METOXI SALICILICO,
EXTRAIDO DE *Eupatorium petiolare* Moc.

AGRADECIMENTOS

A los directores de tesis M. en C. Javier Antonio Taboada Ramírez y Dr. Carlos Guerrero Ruiz por su confianza, paciencia y comentarios tan velosos para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. José S. Calderón Pardo del Instituto de Química de la UNAM, por haberme suministrado la muestra del metabolito.

Al Dr. Efraín Campos del departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su ayuda brindada en las pruebas de analgesia.

Al Dr. Fructuoso Ayala Guerrero del Centro de Neurobiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su apoyo en la realización de las pruebas del sueño.

A Antonio Vidal del departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina y a Don Elías del departamento de Neurobiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, ambos de la UNAM; por su ayuda brindada y compartir conmigo su conocimiento en el manejo de animales de laboratorio.

A Carmen Gutiérrez y Mónica Torres, por su ayuda en el laboratorio.

A Lety Guerrero, por su ayuda brindada en la elaboración del material fotográfico.

Finalmente agradezco por haber aceptado tan amablemente ser miembros del jurado al Dr. Fructuoso Ayala Guerrero, Biol. José Armando Muñoz Moya y al Dr. José S. Calderón Pardo.

INDICE

RESUMEN	II
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	9
Familia Compositae	9
Descripción de <i>Eupatorium petiolare</i> Moc.	9
Distribución de <i>E. petiolare</i> Moc.	10
Usos tradicionales de <i>E. petiolare</i> Moc.	11
Estudios químicos y biológicos del género <i>Eupatorium</i>	12
Estudios químicos de <i>E. petiolare</i> Moc.	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS	15
Colecta y determinación de <i>E. petiolare</i> Moc.	15
Extracción del metabolito secundario.	15
Pruebas de actividad biológica	17
Germinación de semillas	17
Formación de raíces	18
DL ₅₀ en <i>Artemia salina</i> (citotoxicidad)	18
DL ₅₀ en ratón	20
Analgesia	20
platina caliente	20
fenilquinona	21
Actividad sobre el sueño	22
RESULTADOS	24
DISCUSION	36
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42

RESUMEN

La diversidad vegetal de México ha sido empleada por los indígenas desde épocas inmemorables con fines medicinales. Una parte de ese conocimiento -para nuestra fortuna- ha logrado sobrevivir a lo largo de 400 años y llegado hasta nosotros. Ejemplo de ello es *Eupatorium petiolare* Moc., esta planta es usada por la población en el tratamiento de reumatismo, diarrea, malestares del estómago, hígado, dolor de cabeza y espalda, resfrío y tos (Aguilar, 1994). Un estudio químico de esta planta reveló la existencia del metabolito benzilester del ácido 6-metoxi salicílico (Calderón *et al.*, 1983). Dado que la estructura molecular del metabolito es similar a la del ácido salicílico y que se cuenta además con referencias del uso de la planta como analgésico, se decidió aplicar al metabolito una serie de pruebas de cribado como son las siguientes: actividad sobre la germinación de semillas, efecto sobre la formación de raíces, DL₅₀ en *Artemia salina* (citotoxicidad), DL₅₀ preliminar en ratón, pruebas de analgesia y efecto sobre el sueño de ratas Wistar.

Los resultados obtenidos muestran que el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico no tiene un efecto analgésico a dosis de 100 mg/kg, sin embargo, se observó un ligero incremento en el tiempo total de sueño lento y sueño M.O.R. de ratas Wistar, aunque este incremento no es estadísticamente significativo. Los datos obtenidos del bioensayo con *A. salina*, sugieren una posible actividad citotóxica del metabolito, pues la DL₅₀ en *A. salina* resultó ser de 15.38 ppm. con un valor mínimo de 10.02 ppm. y un máximo de 23.39 ppm.

Al parecer, el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico no es el responsable de las propiedades analgésicas que se le atribuyen a *Eupatorium petiolare* Moc.

INTRODUCCION.

La diversidad vegetal con que cuenta México es considerada como una de las más variadas del mundo, por lo menos existen unas 26,000 especies, reflejada por la presencia de prácticamente todos los tipos de vegetación; propiciada en gran medida por la ubicación de nuestro territorio en el planeta (Estrada, 1985) y por la historia del continente; pues en el pasado durante muchos miles de años, Sudamérica y Norteamérica estuvieron separadas. no existía el puente centroamericano que hoy los une. Sudamérica era un inmenso continente aislado de los otros, donde prosperó una flora característica, diversa y abundante conocida como Neotropical. Norteamérica en cambio, estuvo unida a Europa y el norte de Asia donde también prosperó una biota propia, típica de la región, conocida como Holártica. Cuando Norteamérica se separó de Europa y surgió el puente centroamericano, muchas especies migraron de un lado a otro. La zona de transición se convirtió en una región extraordinariamente rica en especies; esta región es México, localizado entre las dos zonas biogeográficas de América: La Neártica y la Neotropical (Krebs, 1985; Rzedowski, 1988; Hengevel, 1989). A esto se suma una de las topografías más accidentadas de la tierra, producto de una intensa actividad orogénica, que ha dado origen a una gran variedad de tipos de rocas; tanto por su naturaleza como por su edad, que en conjunción con otros factores como la presencia oceánica, corrientes marinas, los vientos alisios, etcetera, da como resultado la existencia de toda una gama de climas y suelos (Estrada, 1985). De esta forma nuestro país dio albergue en sus sierras, montañas y picos a la flora del norte, de carácter templado o frío; en sus planicies costeras y trópicos albergó a las especies del sur, de carácter cálido. Por otro lado nuestro país comprende en más del 50 % de su territorio una zona conocida como desierto. En ella también prosperó una flora típica conocida como Xerofítica, adaptada a condiciones extremas de calor y sequía (Krebs, 1985; Rzedowski, 1988; Hengevel, 1989).

Gracias a esta abundancia los antiguos habitantes de México distribuidos a lo largo y ancho del territorio nacional pudieron hacer uso de los recursos naturales a su alcance, según sus necesidades, conocimientos y tecnologías.

Los conocimientos acerca de nuestras plantas medicinales, si bien muchos de ellos solamente empíricos, son muy antiguos, pues datan de épocas muy anteriores al descubrimiento de América. Los indígenas, en virtud de su contacto más íntimo con la naturaleza y por una experiencia prolongada - y tal vez dolorosa en más de una ocasión - habían adquirido amplios conocimientos sobre las virtudes curativas de las plantas y las sabían aprovechar con sorprendente acierto (Martínez, 1944). De esta forma los antiguos habitantes de México acumularon una gran cantidad de información acerca del medio que los rodeaba. Su conocimiento sobre plantas era notable; pues las habían clasificado sistemáticamente y muchas de ellas habían sido domesticadas, como el maíz, el frijol, el aguacate, etcétera (Romo de Vivar, 1981). Así los indígenas lograron sacar provecho de las plantas cultivadas y silvestres pues las utilizaban como alimento, para la construcción y vestimenta, además de conocer sus ya mencionadas propiedades curativas y estimulantes; sin embargo, la tecnología con que contaban no les permitió conocer los principios activos responsables de dicha propiedad.

En realidad el conocimiento de principios activos es bastante reciente. Fue hasta fines del siglo XVIII (1772-1777) cuando Lavoisier alabó un método de análisis por medio del cual podía medir las proporciones en que el carbono y el hidrógeno participaban en la composición de una sustancia orgánica. A partir de este punto la investigación en química orgánica de productos naturales se acelera notablemente, sin embargo, las armas con que contaba el químico eran escasas todavía. A pesar de que podía determinar, el número y proporción de los elementos que formaban parte de una sustancia, todavía resultaba difícil llegar a conocer su estructura. Por ejemplo, el alcanfor, una sustancia ampliamente conocida y usada desde la antigüedad con fines medicinales e industriales, fue analizada por Dumas, quien encontró su fórmula correcta ($C_{10}H_{16}O$) en 1833. Sin embargo fueron necesarios 60 años de estudio para determinar su estructura correcta. En la actualidad bastarían unas horas para lograr esto con la ayuda de la espectroscopía (Romo de Vivar, 1981).

En las últimas décadas el estudio de productos naturales a nivel mundial ha recibido un fuerte apoyo por parte de los gobiernos y principalmente de las industrias particulares, que motivados por el afán de encontrar nuevos y mejores fármacos, y en general moléculas con alguna aplicación que pueda generar una ganancia monetaria;

han generado una gran cantidad de conocimiento de los diferentes grupos de plantas. No debe sorprendernos que algo similar ocurra en México, pues dada la riqueza florística con que contamos, la investigación mexicana de productos naturales ocupa un lugar destacado a nivel mundial. Es particularmente notable la contribución mexicana en lactonas sesquiterpénicas, pues de aproximadamente de 1,000 que se conocían hasta el año de 1981, algo más de 100 fueron producto de las investigaciones mexicanas, lo que representa alrededor de 10 % de las lactonas sesquiterpénicas conocidas, elaboradas por plantas (Romo de Vivar, 1981). Además de las lactonas se han aislado de varios grupos de plantas -en particular del grupo de las compuestas- infinidad de sustancias como triterpenos, flavonoides, alcaloides, aceites esenciales, esteroides, ácidos, ceras y muchas otras con actividades muy variadas, como por ejemplo: bactericida, fungicida, analgésica, mutágena, anticancerígena, depresora de la presión arterial, antidiarreica, antiinflamatoria, por mencionar algunas.

Los salicilatos que en la actualidad son usados ampliamente por la población como antipiréticos o analgésicos tienen una historia que se remonta a épocas del siglo XIX. Por décadas las infusiones de *Salix alba* se usaron para reducir el dolor, la fiebre y las inflamaciones. De esa planta Leroux en 1827, aisló la salicilina. En 1838, a partir de la salicilina Pirra preparó el ácido salicílico, el cual fue aislado en 1844 por Cahours, y en 1860 fue sintetizado por Kolbe a partir del fenol. Estos descubrimientos fueron seguidos rápidamente por la introducción de diversos derivados del ácido salicílico (figura # 1). La aspirina se obtuvo por vez primera en 1853 por Gerhardt, sin embargo su evaluación farmacológica se realizó hasta el año de 1899 por Eichengrum (Korolkovas, 1988).

A pesar de que una buena parte de la población emplea cotidianamente estos fármacos obteniendo resultados positivos, existe otro grupo que presenta reacciones alérgicas a algunos salicilatos manifestadas como crisis de tos asmática, comezón excesiva, mareos y vómitos. De esta forma las investigaciones de los salicilatos se han incrementado con el fin de encontrar nuevas sustancias que no produzcan estas reacciones indeseables a las personas sensibles.

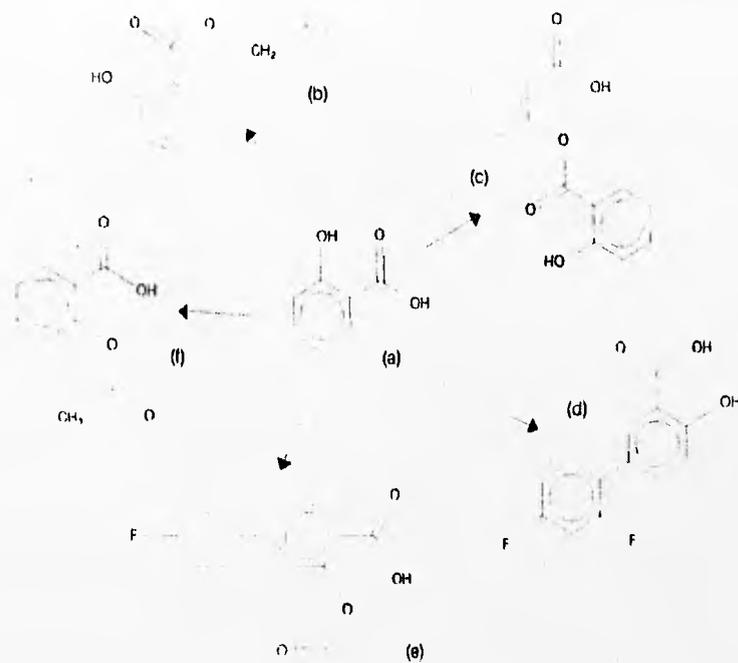


Fig 1. Algunos derivados del ácido salicílico: a) ácido salicílico, b) ácido salicílico benzilester, c) salsalato, d) diflunisal, e) flufenisal y f) ácido acetilsalicílico.

Las pruebas aplicadas a una sustancia dependen de los fines particulares del investigador y pueden ser tan variadas como los mismos fines. La incansable búsqueda de nuevos fármacos realizada por investigadores, tanto nacionales como extranjeros, no culmina con el hecho del descubrimiento. Las investigaciones deben continuar y encaminarse al diseño de un proceso sencillo y barato que permita la producción masiva de dicha sustancia y así poner a disposición de la población medicamentos baratos y efectivos.

Dadas las características socioeconómicas e idiosincrasia del pueblo mexicano, la medicina tradicional toma un papel muy importante en la salud de los mismos, pues deben considerarse los siguientes puntos:

- a) Un porcentaje de la población padece desnutrición severa y analfabetismo.
- b) La desnutrición y las condiciones en que vive más de la mitad de la población, son las principales causas de la diversidad e incidencia de casi todas las enfermedades, principalmente en la población de escasos recursos.
- c) Las enfermedades gastrointestinales y respiratorias, principales causas de defunción en México son previsibles y aunque tienen curación con la medicina moderna, ésta no llega a gran parte de la población, principalmente rural.
- d) La medicina moderna en nuestro país depende del extranjero para la adquisición de materias primas y tecnología en la elaboración de casi todos los medicamentos, que aunado a la crisis nacional y mundial, dichos medicamentos se han estado convirtiendo en productos inaccesibles para gran parte de la población.
- e) Las instituciones oficiales de salud pública no asisten a la mayoría de las comunidades rurales.
- f) La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), en 1978 consignó que el 66.6 % de la población de los países subdesarrollados, sólo recurren a la medicina tradicional para resolver sus problemas de salud. Estas cifras no han cambiado de manera considerable en los últimos años. Con lo expuesto hasta ahora, se pone de manifiesto

que las plantas medicinales constituyen una alternativa viable para resolver los problemas de salud en México, de manera complementaria con la "medicina moderna" (Estrada, 1985).

La ciencia moderna, en lo general, no ha aumentado en mucho los descubrimientos que los indígenas hicieron hace varios siglos, y se ha concretado a aplicar métodos más sofisticados de investigación, comprobando, en multitud de casos, las propiedades que los indígenas habían hallado de un modo empírico (Martínez, 1944).

Los vastos conocimientos médicos de los indígenas no han llegado en su totalidad hasta nosotros, debido a que los transmitían verbalmente de una generación a otra, sin escribirlos nunca, ya que su sistema de escritura no se prestaba para ello, pues con sus geroglíficos sólo trataban de perpetuar la memoria de los grandes acontecimientos de su historia (Martínez, 1944). Por estas y otras razones es lógico pensar que de la diversidad existente en nuestro país, por lo menos la mitad de las especies tiene algún uso medicinal empírico, lo cual implica la existencia de 12,000 a 15,000 plantas medicinales. Si consideramos que en la actualidad están registradas a especie aproximadamente 3,000 plantas medicinales y que diferentes reseñas históricas de la conquista indican que mucha de la información sobre las artes y las ciencias se perdió o se ha ido perdiendo, podemos decir que, de los recursos naturales vegetales usados por el hombre, en nuestro país, es más lo que ignoramos que lo que sabemos, así pues, las especies medicinales registradas sólo constituyen el 25 % del total estimado; algunos indicadores que ejemplifican lo anterior son los siguientes: 1º A manera de ejemplo histórico; Francisco Hernández, protomédico general de las Indias (1571), registró un total de 3,269 plantas medicinales, de las cuales a la fecha solo se han identificado 667 especies; 2º Hasta 1985, se habían registrado 148 especies nuevas como medicinales en comunidades de los estados de Puebla, Hidalgo y Guanajuato. Por otra parte, de la mayoría de las especies registradas, ni del 10% ha sido comprobado su uso en el laboratorio (Estrada, 1985).

Dada la existencia casi infinita de metabolitos vegetales, es muy frecuente que para muchos de ellos el conocimiento de su actividad biológica sea escaso o se desconozca del todo. Tal es el caso del benziléster del ácido 6-metoxi salicílico, no

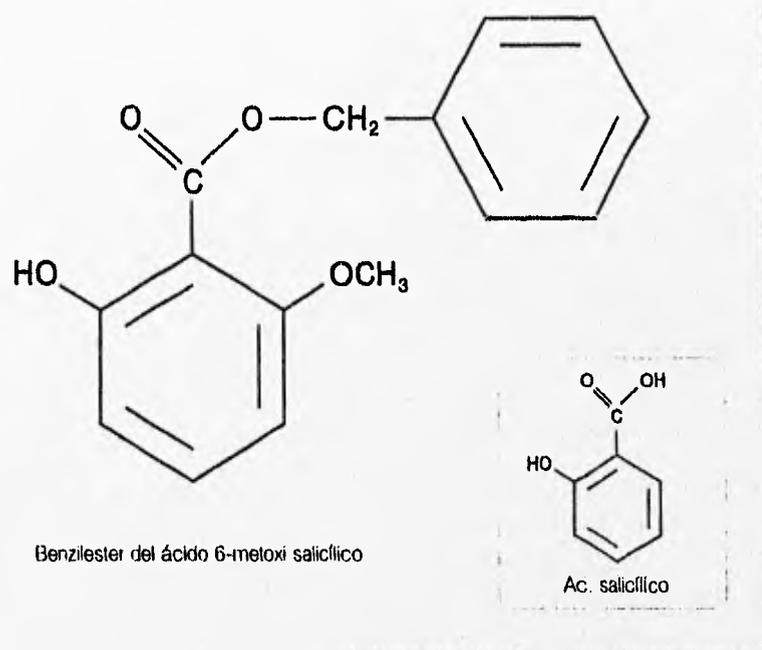


Fig. 2. Estructura molecular del benzilester del ácido 6-metoxi salicílico (al centro); ácido salicílico (esquina inferior derecha) .

obstante que su estructura molecular se conoce desde 1969 (Figura 2), hasta la actualidad no se reportan trabajos que hayan explorado su actividad biológica. El benzilester del ácido 6-metoxi salicílico a diferencia del ácido salicílico tiene adicionado en el carbono número 6 un grupo metoxilo y un bencilo se encuentra esterificando al hidroxilo del ácido salicílico. Dada esta semejanza estructural resulta interesante analizar si el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico tiene alguna actividad biológica, en particular la de analgésico.

Como se puede apreciar aun falta mucho por descubrir y la investigación en el área de productos naturales está abierta para todo aquél que quiera conocer sus secretos.

ANTECEDENTES

Familia Compositae.

La familia Compositae o Asteraceae, una de las más grandes, si no es que la más numerosa; consta de aproximadamente 1100 géneros y unas 20000 especies de distribución mundial; se divide por lo general en 13 tribus: Heliantheae, Astereae, Anthemideae, Arctotideae, Inuleae, Senecioneae, Calendulaea, Vernonieae, Cynareae, Mutisieae, Liabeae, Lactuceae y Eupatiriae a la que pertenece el género *Eupatorium* con unas 600 especies (Jones, 1987) principalmente americanas, distribuidas sobre todo en regiones tropicales y subtropicales, aunque alcanzan las zonas templadas (Rzedowski, 1985).

Descripción de *Eupatorium petiolare* Moc.

Eupatorium petiolare Moc. (Figura 3) es un arbusto hasta de 2 m de altura; con tallos leñosos, cilíndricos, de 2 a 5 mm de diámetro hacia la parte superior, estriados, blanco-amarillentos, puberulentos; hojas opuestas, membranáceas, peciolo de 1.5 a 8 cm de largo, pubescente, lámina ovada, de 3.5 a 10 cm de largo por 2.5 a 10 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, borde crenado-dentado, base cordada, haz puberulento, envés pubescente, con abundantes glóbulos resinosos, tri a pentanervada de la base; numerosos capítulos de 7 a 8 mm de largo dispuestos en corimbos compuestos terminales, pedicelos pubescentes; involúcro turbinado, de 5 a 7 mm de largo por más o menos 5 mm de ancho, cubre la mitad basal o más de las corolas, sus brácteas dispuestas en 3 series de la misma longitud, linear, lanceoladas, agudas, verdes, pubescentes; flores 35 a 40; corola de 4 a 5 mm de largo, blanca, glabra, con glóbulos resinosos en los lóbulos, aquenio de 2 a 3 mm de largo, muy pubescente, vilano casi del largo de la corola, cerdas blanco-rosadas. Comúnmente llamada "hierba de ángel o yolochíchtli" (Rzedowski, 1985).

Distribución de *E. petiolare* Moc.

Originaria de México, habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado se distribuye desde Coahuila y Tamaulipas a Oaxaca (Figura 3), entre 900 y 3000 m snm. Asociada a bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y de pino. Crece frecuentemente en sitios de disturbio, especialmente a lo largo de caminos y carreteras (Argueta, 1994; Rzedowzki, 1985).



Fig. 3. Aspecto general de *Eupatorium petiolare* Moc. (Sanchez, 1984) y areas de uso en México (Argueta, 1994).

Usos terapéuticos tradicionales de *E. petiolare* Moc.

En las comunidades de los estados de la República es usada para tratar diversos malestares, en la tabla # 1 se muestran algunos de sus usos terapéuticos así como la preparación y la parte empleada de la planta, también se mencionan algunos de sus nombres populares.

Tabla 1
Nombres populares de *Eupatorium petiolare* Moc. y usos terapéuticos más comunes en algunos estados de la República Mexicana (Aguilar, 1994).

s/i Sin indicación; s/p Sin preparación

NOMBRE POPULAR	LOCALIDAD	PADECIMIENTO Y USO	PARTE UTILIZADA	PREPARACION	VIA DE ADMON
Coñesda Pestón	Mina Vieja, Edo. de Méx.	Reumatismo Diarrea	Flores Frutos	Maceradas Cocimiento	Oral Local (tallo sobre el estomago)
Hierba del ángel	San Juan Tepecoculco, Edo. de Méx.	Billis	Flores	Infusión	Oral
Hierba del ángel Hierba del burro	Zitácuaro, Mich.	Higado, billis	s/i	s/i	s/i
Hierba del burro	Linares, N. L.	Malestares del estómago	Planta	Macerada y reposar en agua	Oral
Hierba del burro	San José, Gómez Farías, Tamps.	Espanto	Tallos y hojas	Exprimidas	Oral
Hierba dulce	Quimixtlán, Pue.	Resfrío	Ramas	Cocimiento	Oral
Sabasunum (tzeltal)	Amatenango del Valle, Chis.	Calentura, dolor de cabeza	Ramas	s/p	Externa (limpias)
Sabasunum (tzeltal)	Amatenango del Valle, Chis.	Espanto, dolor de cabeza	Ramas	s/p	Externa (barridas)
Pecho	San Andrés Timilpan, Edo. de Méx.	Dolor de espalda	Ramas	Macerado	Local (untado)
Poshil-oval (tzeltal)	Tenejapa, Chis.	Tos	Ramas	Infusión	Oral

Estudios químicos y biológicos del género *Eupatorium*.

Hasta la década de los 70s eran muy escasos los estudios químicos de la tribu Eupatorieae, aproximadamente el 10 % de sus especies habían sido examinadas químicamente pero no se conocían reportes químicos de unos 50 géneros, de modo que el 80 % de sus miembros eran desconocidos desde ese punto de vista.

Sin embargo a partir de esa época se han aislado numerosos metabolitos secundarios, varios de ellos muy importantes como herbicidas, fármacos, hormonas de crecimiento vegetal, etc. De los miembros del género *Eupatorium* se han aislado derivados benzofuránicos de la euparina, varios triterpenos, flavonoides, alcaloides, aceites esenciales, terpenos, lactonas sesquiterpénicas, y muchas otras sustancias (Heywood, 1977). Por ejemplo: la hidroxitrementona y el toxol se aislaron de *E. rugosum* (Bonner *et al.*, 1961, 1962); el *E. urticaefolium* aportó la trementona (Bonner y DeGraw, 1962). Kupchan *et al.* (1969) encontraron 7 flavonas citotóxicas en 2 especies de *Eupatorium* (*E. cuneifolium* y *E. semiserratum*). El estudio de otras doce especies de *Eupatorium* aportó cuatro nuevas germacrólidas y guaianolodas (Bohlmann *et al.*, 1977). *E. deltoideum* dio dos nuevas lactonas sesquiterpénicas del tipo germacrólidas, la deltoidina A y B (Quijano *et al.*, 1980). En 1981 Herz y colaboradores estudiaron las propiedades citotóxicas y antileucémicas de los metabolitos secundarios de *E. lancifolium* (eupacunolina y eupacunina) y de *E. semiserratum* (eupaserrina, desacetyeupaserrina y eupatorina), además emplearon estas sustancias para diferenciar ambas especies.

En 1986 se analizaron las propiedades inmunológicas del polisacárido 4-O-metilglucuronoxilano de *E. perfoliatum* (Volmar *et al.*, 1986). Se reporta la actividad antitumoral, antibiótica, molusquicida, entre otras, que tiene la brevipeina extraída de *E. brevipes* (Guerrero *et al.*, 1988). La biosíntesis y acumulación de benzofuranos en cultivos de raíz de *E. cannabinum* fue estudiada en 1989 por Siebertz y colaboradores. El metilripariocromeno A aislado de *E. riparium* muestra actividad fungicida sobre 5 especies de hongos microscópicos (Ratnayake *et al.*, 1992).

Estudios químicos de *Eupatorium petiolare* Moc.

No obstante la bibliografía reportada para varias de las especies del género *Eupatorium*, *E. petiolare* Moc. fue estudiada químicamente hasta el año de 1982. El estudio químico de Guerrero aplicado a *Eupatorium petiolare* Moc. dio como resultado el aislamiento del ácido 2-hidroxi, 6-metoxi benzoico y de la nueva germacrólida 11,13-dihidroeupatoriopirina (Guerrero, 1982). Un estudio posterior de esta planta, reveló la existencia del benzilester del ácido 6-metoxi salicílico (Calderón *et al.*, 1983). La estructura molecular de este ácido fue descrita en Alemania en el año de 1969, cuando Bohlman lo aisló de *Aster plarnicoides* (Bohlmann *et al.* 1969). Hasta la fecha no se reportan trabajos que hayan explorado la actividad biológica ni de la planta ni del benzilester del ácido 6-metoxi salicílico.

OBJETIVOS.

De acuerdo a la información anterior, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Colecta y determinación a especie de *Eupatorium petiolare* Moc.
- Extracción, aislamiento y purificación del metabolito secundario de *Eupatorium petiolare* Moc., benzilester del ácido 6-metoxi salicílico.
- Determinación del punto de fusión y solubilidad en solventes orgánicos del benzilester del ácido 6-metoxi salicílico.
- Elucidar la estructura molecular del metabolito mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).
- Determinación de las posibles actividades biológicas del benzilester del ácido 6-metoxi salicílico mediante la aplicación de los siguientes bioensayos:
 - Actividad sobre la germinación de semillas.
 - Efecto sobre la formación de raíces.
 - Determinación de la DL₅₀ en *Artemia salina* (Citotoxicidad).
 - Determinar la DL₅₀ preliminar en ratón por las vías oral, subcutánea e intraperitoneal.
 - Pruebas de analgesia mediante la inducción de dolor con platina caliente y fenilquinona.
 - Efecto sobre el ciclo vigilia-sueño de ratas Wistar
- Establecer alguna posible relación entre los usos populares de la planta y los resultados obtenidos en las pruebas de analgesia.

MATERIAL Y METODOS.

La metodología consta de dos partes: una parte química (extracción del producto natural) asesorada por el Doctor Carlos Guerrero Ruiz y una parte biológica (pruebas de actividad biológica) dirigida por el Maestro en Ciencias Javier Antonio Taboada Ramirez.

COLECTA Y DETERMINACION DE *Eupatorium petiolare* Moc.

E. petiolare Moc. se colectó en el mes de abril en el Pedregal de la Ciudad de México, D.F. La determinación de la especie se realizó siguiendo la clave publicada por Rzedowski en el año de 1985, en Flora fanerogámica del Valle de México. Vol. II. Dicotyledoneae (Euphorbiaceae-Compositae).

EXTRACCION DEL METABOLITO SECUNDARIO

La extracción del producto natural se realizó siguiendo la metodología descrita por Calderón en 1983 (Figura 4). La parte aérea de la planta (hojas y flores) con un peso seco de 938 g se sometió a extracción con hexano por 24 horas a temperatura ambiente; el extracto se concentró en un rotavapor a presión reducida. Este procedimiento se repitió tres veces. El extracto hexánico se corrió en una columna cromatográfica con 2.5 kg de sílica gel como soporte; usándose como eluyentes una mezcla de disolventes hexano, hexano-benceno y benceno-acetato de etilo en orden creciente de polaridad. Las fracciones eluidas se analizaron en cromatografía de capa fina comparando las bandas con un patrón de benzilester del ácido 6-metoxi salicílico. Las fracciones eluidas con benceno que presentaron una banda con un factor de corrimiento (Rf) similar al Rf de la banda del benzilester del ácido 6-metoxi salicílico se purificaron por recristalización. Se determinó el punto de fusión de los cristales, se les realizaron pruebas de solubilidad y se les aplicó un análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear (RMN) para determinar si la estructura molecular de dichos cristales correspondía con la descrita por Bolhmann en 1969.

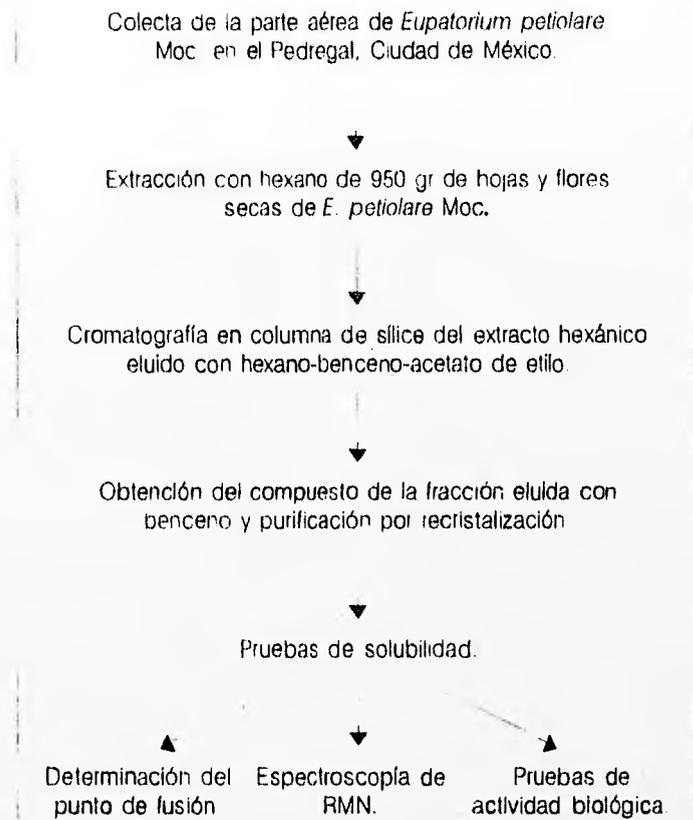


Fig. 4. Procedimiento de extracción, aislamiento y purificación del metabolito benzilester del ácido 6-metoxi salicílico.

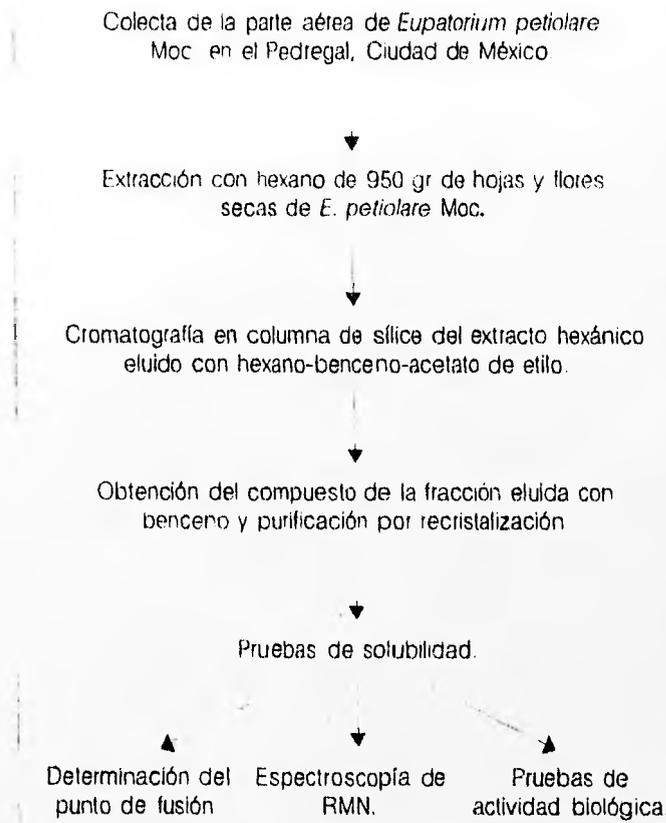


Fig. 4. Procedimiento de extracción, aislamiento y purificación del metabolito benzilester del ácido 6-metoxi salicílico.

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

• ACTIVIDAD SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.

La existencia de sustancias inhibidoras de la germinación presentes en las partes de una planta como son la raíz, semillas, hojas, frutos, flores, etcétera; muchas veces no tienen una función reguladora de la germinación de la semilla, sino más bien, desempeñan un papel ecológico muy importante conocido como alelopatía, al inhibir o retrasar la germinación de semillas de otras especies. Esta propiedad se puede aplicar en el cultivo y/o almacenamiento de granos, pues es muy sabido que los cultivos muchas veces son invadidos por malas hierbas y que las semillas almacenadas muy frecuentemente germinan antes de salir al mercado; en ambos casos esto tiene una repercusión monetaria grave.

Se pusieron a germinar semillas de lechuga en las siguientes soluciones por un periodo de 2 horas:

- 25 semillas en 50 partes por millón (ppm) de benzilester del ácido 6-metoxi salicílico + 0.05 ml de dimetil sulfoxido (DMSO)
- 25 semillas en 100 ppm de benzilester del ácido 6-metoxi salicílico + 0.05 ml de DMSO
- 25 semillas en 200 ppm de benzilester del ácido 6-metoxi salicílico + 0.05 ml de DMSO
- 25 semillas en 0.05 ml de DMSO (testigo)
- 25 semillas en agua (testigo)

Las semillas se colocaron después sobre papel filtro (Whatman # 1) dentro de cajas petri, humedecido con 5 ml de la solución inhibidora correspondiente. Se observaron cada 24 horas durante tres días y se cuantificó el porcentaje de germinación.

- EFECTO SOBRE LA FORMACION DE RAICES.

Muchas plantas, tanto comestibles como de ornato son propagadas por el humano de forma vegetativa, en ocasiones la sobrevivencia de dichas plantas depende de la rapidez de enraizamiento de la misma, por lo cual es importante contar con sustancias (hormonas) que aceleren este proceso.

Se usaron 20 ml de las siguientes soluciones de ácido 6-metoxi salicílico benzilester:

- 100 ppm + 0.05 ml de (DMSO)
- 50 ppm + 0.05 ml de DMSO
- 25 ppm + 0.05 ml de DMSO
- Agua + 0.05 ml de DMSO
- Agua

En cada una de las soluciones se sumergió por la placa basal una cebolla con las raíces previamente cortadas, se realizaron 7 repeticiones para cada concentración. Al término de 6 días de tratamiento se cuantificaron las raíces y se aplicó a los datos una prueba de "t de Student"

- DETERMINACION DE LA DL₅₀ EN *Artemia salina* (CITOTOXICIDAD).

Uno de los padecimientos que ha preocupado siempre a la humanidad es el cáncer en sus diferentes manifestaciones. En las últimas décadas la frecuencia de cáncer se ha incrementado notablemente en la población mundial, siendo los países desarrollados los que presentan una tasa mayor de incidencia. Preocupados por esto, los institutos de investigación sobre el cáncer han creado programas que tienen como fin la búsqueda de sustancias que puedan ser utilizadas en el tratamiento y cura del cáncer. Estas pruebas de laboratorio requieren de equipo y de condiciones de manejo muy especiales, de modo tal que esto representa un costo bastante elevado para su realización. Por esta razón se han diseñado bioensayos que permitan el análisis de la

actividad citotóxica de las sustancias pero a un costo mucho más bajo. Tal es el caso del bioensayo que emplea como modelo al crustáceo *Artemia salina* para detectar la actividad citotóxica de las sustancias. Se ha visto que existe una correlación entre la DL₅₀ de *A. salina* y la citotoxicidad sobre células de carcinoma nasofaríngeo (KB) y de leucemia linfofítica (PS). Cuando la DL₅₀ en *A. salina* es igual o menor a 1000 ppm. por lo general el metabolito en experimentación también resulta tóxico para las células KB y PS (Cassady y Suffness, 1980; Meyer *et al.*, 1982; Solis *et al.*, 1993).

Se prepararon 500 ml de una solución salina a una concentración de 35 g/l. En un estanque de plástico dividido previamente en una parte oscura y una luminosa se vertieron 250 ml de la solución salina; en la parte oscura del recipiente se colocaron huevos de *Artemia salina*, y se incubaron a una temperatura de 24-25 °C por un periodo de 48 horas (transcurrido este lapso las larvas de *A. salina* eclosionan).

Se prepararon 20 ml de las siguientes soluciones del metabolito estudiado disueltas en solución salina a 35 g/l:

- 1 ppm + 0.02 ml de dimetil sulfóxido (DMSO)
- 10 ppm + 0.02 ml de DMSO
- 100 ppm + 0.02 ml de DMSO
- 200 ppm + 0.02 ml de DMSO
- 0.02 ml de DMSO
- Solución salina 35 g/l

Se tomaron 5 ml de cada una de las soluciones y se colocaron individualmente en frascos viales de 10 ml, a cada solución se le agregaron 10 larvas de *A. salina* capturadas previamente con una pipeta Pasteur de la parte iluminada del recipiente de incubación (las larvas de *A. salina* presentan fototropismo positivo). Se mantuvieron a una temperatura de 24-25 °C durante 24 horas y se cuantificó la mortalidad al término de este plazo. Para cada solución se realizaron tres repeticiones y los resultados se analizaron con el programa de cómputo Finney Purde (Meyer *et al.*, 1982; Solis *et al.*, 1993).

- DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL 50 (DL₅₀) PRELIMINAR EN RATON.

Si se quieren realizar experimentos con animales de laboratorio, administrando una sustancia por alguna vía, se debe tener la certeza de que la dosis administrada no será letal para el animal. Para ello es necesario conocer previamente la dosis letal 50 (DL₅₀), que es una de las primeras pruebas a las que se someten las nuevas sustancias (Madroño, 1980).

Para la determinación de la DL₅₀ se formaron nueve lotes (3 controles y 6 experimentales) con una n = 10 ratones machos por lote con un peso promedio de 25 g. A los lotes experimentales se les administró por vía oral, intraperitoneal y subcutánea un volumen de la solución del metabolito estudiado equivalente a una dosis de 100 y 200 mg/kg, usando como vehículo agua para la vía oral y aceite de maíz para las vías intraperitoneal y subcutánea. Una vez administrada la solución se observó durante una hora la conducta de los ratones y se mantuvieron en observación por un periodo de 8 días. Al final de este periodo se cuantificaron los ratones muertos y se determinó la DL₅₀ con el programa Finney.

- PRUEBAS DE ANALGESIA.

El manejo del dolor es un problema generalmente interdisciplinario, que va desde el empleo de sustancias de fácil administración hasta procedimientos neuroquirúrgicos muy sofisticados; en la mayoría de los casos el dolor se puede controlar o disminuir con la administración de fármacos capaces de producir en el individuo un estado de analgesia. Sin embargo existen personas que manifiestan reacciones alérgicas a muchos de estos fármacos, de modo que la búsqueda de nuevos analgésicos se hace necesaria.

Inducción de dolor por medio de platina caliente.

Se probó una dosis de 100 mg/Kg de ácido 6-metoxi salicílico benzilester administrada por vía oral. Para administrar el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico se solubilizó en agua agregando 1 gota de hidróxido de sodio 0.05 N, esto forma la sal del

metabolito y permite su solubilización en agua. Se formaron tres lotes experimentales y un lote control, cada lote con una $n = 5$ ratones machos con un peso promedio de 25g. Una vez administrada la solución se colocaron los ratones sobre una platina caliente a temperatura constante de 55 °C; esta temperatura permite estimular las terminaciones nerviosas de las extremidades lo suficiente para producir dolor sin provocar daño a los tejidos epidérmicos de las patas de los ratones. Cada lote se colocó sobre la platina sólo una vez a intervalos postadministración de 30, 60 y 120 minutos. Se cronometró el tiempo de reacción de cuatro conductas que fueron las siguientes:

- 1º Levantar una de sus extremidades
- 2º Lamerse una de ellas
- 3º Erguirse en busca de alguna salida
- 4º Salto para escapar de la platina.

El tiempo máximo de estímulo fue de 150 segundos. Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba estadística de "t de Student".

Inducción de dolor por medio de fenilquinona.

La fenilquinona es una sustancia que administrada intraperitonealmente a dosis de 5 mg/kg produce repetidas contracciones de los músculos abdominales acompañadas por la extensión de los miembros traseros. Estos estiramientos que se interpretan como una manifestación de dolor, son fáciles de observar y de cuantificar, de modo que esta prueba es empleada para la valoración de analgésicos (Hendershot, 1959). Se preparó una suspensión homogeneizando 5 mg de fenilquinona en 10 ml de aceite de maíz; de ella se tomó un volumen equivalente a la centésima parte del peso del ratón (dosis correspondiente a 5 mg/kg) y se le administró intraperitonealmente a 7 ratones, se observó la conducta de los ratones y se cuantificó durante 15 minutos los estiramientos de las extremidades posteriores a intervalos de 5 minutos ($t_1 = 0$ a 5 min, $t_2 = 5$ a 10 min y $t_3 = 10$ a 15 min). El 6-metoxi salicílico benzilester se disolvió en aceite de maíz de la misma forma y se administró subcutáneamente a los ratones en dosis de 100 y 200 mg/kg, se usaron 7 ratones para cada dosis. Transcurridos 30 minutos se administró la

fenilquinona del mismo modo que en los controles y nuevamente se cuantificaron los estiramientos de patas (Hendershot y Forsaith, 1959). Los datos se sometieron a una prueba de "t de Student".

- EFECTO SOBRE EL CICLO VIGILIA-SUEÑO.

En la actualidad, las sustancias con propiedades hipnóticas son utilizadas en porcentajes relativamente elevados. Cuando una persona se queja de insomnio, inmediatamente se le aconseja la utilización de algún tipo de somnífero. Las sustancias que se han utilizado como inductores del sueño son de estructura química diversa. Los barbitúricos, introducidos hace más de cincuenta años son considerados como prototipos de estos fármacos. Sin embargo, debido a efectos indeseables, tales como habituación y dependencia física que producen, su uso ha ido decreciendo. Actualmente el uso de las benzodiazepinas se ha generalizado porque ofrecen numerosas ventajas sobre los barbitúricos. Algunas de estas sustancias evitan los despertares continuos, acortan la latencia para el inicio del sueño e incrementan su duración, además de presentar baja toxicidad. No obstante lo anterior, también es un hecho conocido la manifestación de efectos colaterales perjudiciales (Ayala *et al.*, 1990).

Una droga ideal sería aquella que produjera sensación de bienestar y que no tuviera efectos colaterales indeseables, pero dicha sustancia todavía no ha sido descubierta a pesar de las numerosas investigaciones que se han llevado a cabo por diversos grupos de investigadores (Ayala *et al.*, 1990).

El experimento se realizó siguiendo la metodología descrita por Ayala en 1990. Se utilizaron 6 ratas Wistar, adultas, aparentemente sanas, de sexo masculino. Bajo anestesia general (pentobarbital sódico, 50 mg/kg ip), se implantaron epiduralmente dos pares de electrodos de acero inoxidable para registrar la actividad eléctrica de las regiones frontal y occipital del cerebro. La actividad ocular se registró por medio de electrodos colocados sobre el hueso supraorbitario, se procedió igual para registrar la actividad eléctrica de los músculos de la nuca. Los animales se dejaron recuperar de la intervención quirúrgica por un periodo mínimo de una semana. Luego se colocaron en una cámara sonoamortiguadora a temperatura y luz constantes, con agua y comida *ad*

libitum. para registrar su ciclo vigilia-sueño mediante un polígrafo Grass, modelo 111 D de 8 canales. Los registros se obtuvieron primero bajo condiciones normales durante 10 horas continuas (de las 9 a las 19 horas); posteriormente la sustancia en estudio se inyectó por vía intraperitoneal a dosis de 2.4 mg/kg en 6 ratas, registrándose inmediatamente después de manera semejante a la manera descrita para las condiciones normales. Los registros se analizaron visualmente, identificándose las diferentes etapas del ciclo vigilia-sueño. El tiempo total de cada una de ellas se midió manualmente obteniéndose así su duración promedio en condiciones control y bajo el efecto del fármaco administrado. Se aplicó la prueba "t de Student" para obtener los grados de significancia de las diferencias observadas entre las dos condiciones de registro (Ayala *et al.*, 1990).

RESULTADOS.

De la extracción de *Eupatorium petiolare* Moc. se obtuvieron 175.2 g de extracto crudo, de los cuales 4.31 g fueron de benzilester del ácido 6-metoxi salicílico; cristales blancos con un punto de fusión de 38-39 °C. Este ácido es soluble en acetona, acetato de etilo, eter isopropílico y dimetil sulfoxido (DMSO); es poco soluble en etanol y propilen glicol caliente; es insoluble en agua. La estructura molecular obtenida mediante el analisis espectroscópico de RMN corresponde con la descrita por Bohlmann en 1969.

La figura 5 muestra los porcentajes de germinación durante los tres días de tratamiento. No se ven diferencias entre los controles y los experimentales.

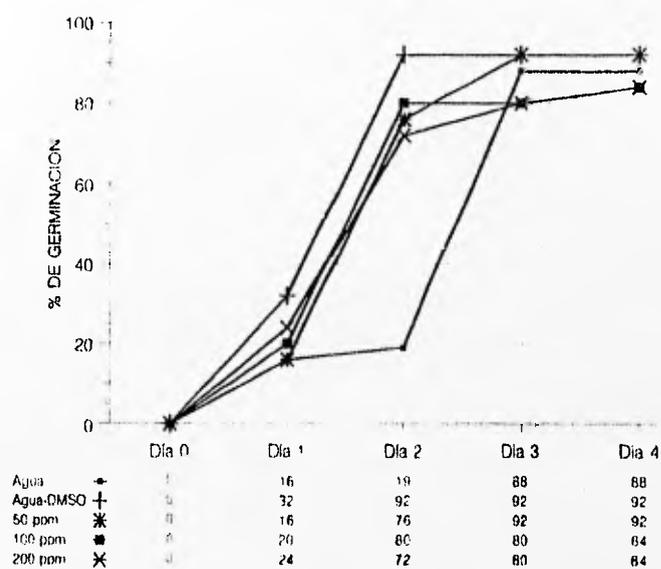


Fig. 5 Porcentaje de germinación en cada solución del metabolito durante el tiempo de tratamiento.

Los resultados del efecto sobre la formación de raíces se muestran en la figura 6. La prueba estadística de "t de Student" mostró que no existen diferencias significativas entre los controles y los experimentales ($p > 0.05$).

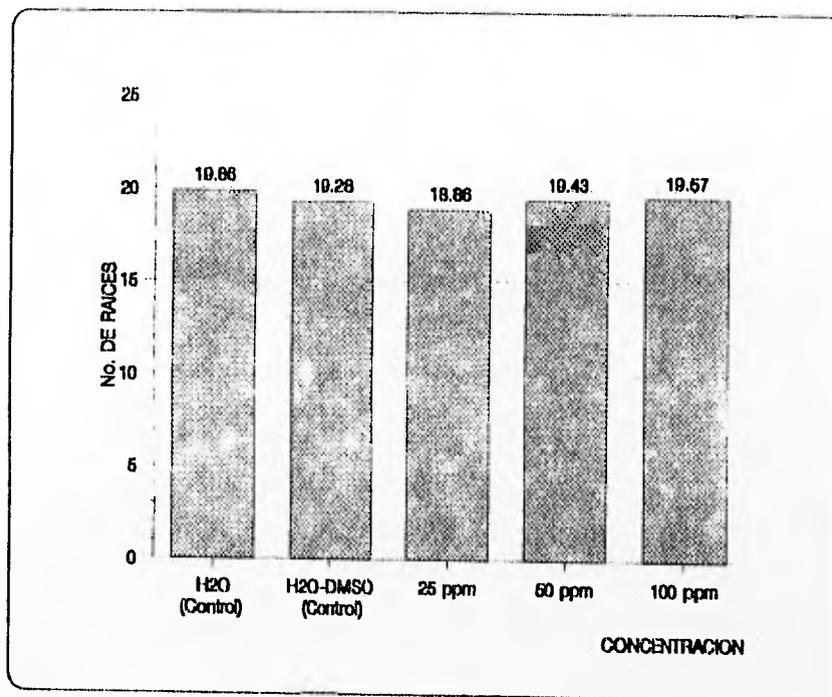


Fig. 6 Promedio total de raíces formadas en cada solución del metabolito en un lapso de 6 días ($p > 0.05$).

Los datos del efecto que tiene el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico sobre las larvas de *A. salina* se muestran en la tabla II. El metabolito tiene sobre el crustáceo una DL₅₀ de 15.39 ppm con un valor máximo de 23.39 ppm y un mínimo de 10.02 ppm.

Tabla II
Total de artemias muertas a las 24 horas del tratamiento con el metabolito a diferentes concentraciones. DL₅₀ = 15.39 ppm.

	No. de muertes a las 24 hr.			
	Tubo I	Tubo II	Tubo III	Total
H ₂ O (control)	0	1	1	2
DMSO (control)	0	0	0	0
1 ppm	0	0	0	0
10 ppm	4	2	3	9
100 ppm	10	10	10	30
200 ppm	10	10	10	30

Las dosis empleadas en el presente trabajo no permitieron determinar la DL₅₀ preliminar en ratón, los datos se muestran en la tabla III. La conducta de los ratones durante la primer hora postadministración fue normal, acicalándose continuamente después del manipuleo, comieron y bebieron para después dormir. Los animales a los que se les administró el metabolito intraperitonealmente presentaban erizamiento de los pelos dorsales y estuvieron muy quietos, esto debido probablemente a la molestia de la inyección.

Tabla III
Número de ratones muertos en un lapso de 8 días después de administrado el metabolito a dosis y vía diferente.

Dosis	No. de muertes por cada vía		
	Oral	Subcutanea	Intraperitoneal
Control (0 mg/kg)	1	1	0
100 mg/kg	0	0	1
200 mg/kg	0	0	0

El análisis de los resultados de las pruebas de analgesia dio para ambas un valor de $p > 0.05$. La tabla IV muestra los tiempos de reacción de las conductas cuando se induce dolor con una platina caliente. Los resultados de la prueba con fenilquinona se muestran en la figura 7 y en la tabla V.

Tabla IV
Tiempos de reacción promedio de las cuatro conductas a los 30, 60 y 120 minutos después de administrado el metabolito ($p > 0.05$)

CONDUCTA	TIEMPO DE REACCION PROMEDIO			
	CONTROL	EXPERIMENTALES (Intervalo postadministración)		
		30 min	60 min	120 min
Levanta extremidad (seg)	x = 7.2 S = 2.53	x = 7.15 S = 1.3	x = 5.9 S = 2.2	x = 7.36 S = 1.1
Lame extremidad (seg)	x = 11.84 S = 3.8	x = 9.96 S = 2.21	x = 11.26 S = 3.9	x = 12.12 S = 4.2
Posición erguida (seg)	x = 40.22 S = 17.03	x = 30.18 S = 17.98	x = 28.52 S = 15.8	x = 57.62 S = 41.8
Salto (seg)	x = 119.32 S = 22.19	x = 124.12 S = 17.85	x = 83.9 S = 15.1	x = 129.62 S = 24.76

Tabla V

Total de extensiones de los miembros posteriores en un lapso de 15 minutos a dosis del metabolito de 100 y 200 mg/kg, cuantificados a intervalos de 5 minutos.

Ratón (#)	De 0 a 5 min			De 5 a 10 min			De 10 a 15 min		
	Control (#)	Experimental (#)		Control (#)	Experimental (#)		Control (#)	Experimental (#)	
		100 mg/kg	200 mg/kg		100 mg/kg	200 mg/kg		100 mg/kg	200 mg/kg
1	0	6	13	0	2	9	0	0	4
2	6	24	0	5	12	0	11	6	0
3	12	7	16	3	1	5	7	1	12
4	12	4	11	11	2	4	11	0	7
5	19	17	11	5	3	5	2	5	4
6	18	10	14	6	4	3	4	0	7
7	7	3	17	5	3	2	5	4	2
X	10.57	10.14	11.71	5	3.86	4	5.7	2.29	5.14
S	6.27	7.12	5.23	3.07	3.44	2.62	3.92	2.43	3.64
	p > 0.05			p > 0.05			p > 0.05		

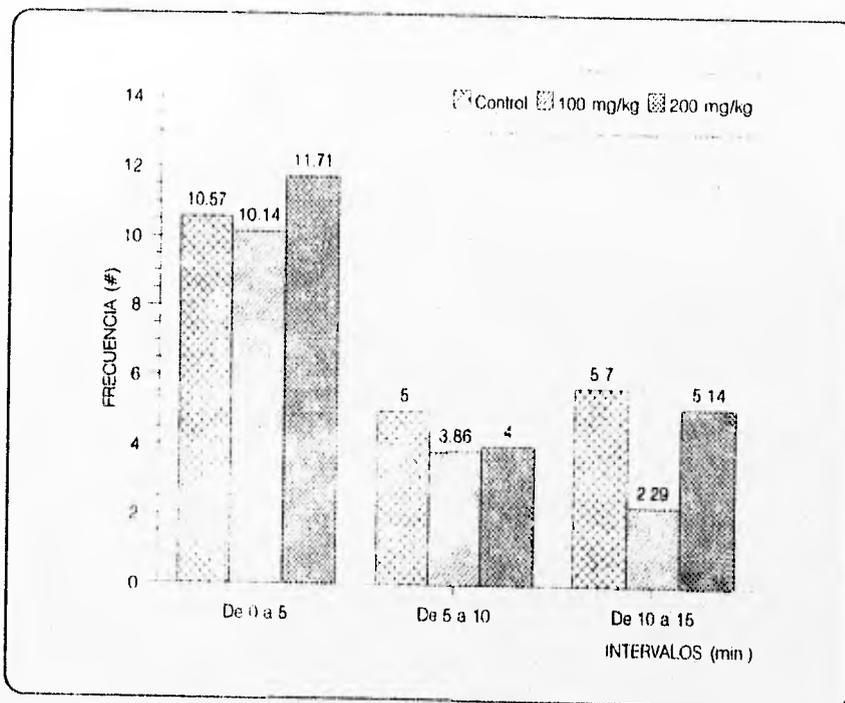


Fig. 7 Promedio total de estiramientos de las extremidades posteriores a intervalos de 15 minutos.

Los resultados del efecto sobre los estados de vigilancia aparecen en la tabla VI y se muestran graficados en la figura 8. La frecuencia, la duración promedio y la latencia de la fase de sueño M.O.R. aparecen graficados en la figura 9 y 10, los datos se muestran en la tabla VII. Para ambas series de datos se obtuvo una $p > 0.05$.

Tabla VI
Tiempo invertido por los animales en cada estado de vigilancia durante las 10 horas de registro.

Rata	Vigilia (min)		Sueño lento (min)		M.O.R. (min)	
	Control	Experimental	Control	Experimental	Control	Experimental
1	280.33	148.25	257.28	334.69	80.42	128.21
2	241.60	292.1	280.13	295.33	81.30	16.36
3	156.31	121.24	364.13	396.51	94.24	105.23
4	287.52	209.16	300.40	340.44	28.84	66.40
5	227.60	169.56	309.15	342.35	80.36	98.48
6	197.16	170.56	309.08	326.12	102.16	113.31
X	231.75	165.14	303.36	339.22	77.89	88
S	45.59	54.64	32.74	30.03	23.40	37.11
	p > 0.05		p > 0.05		p > 0.05	

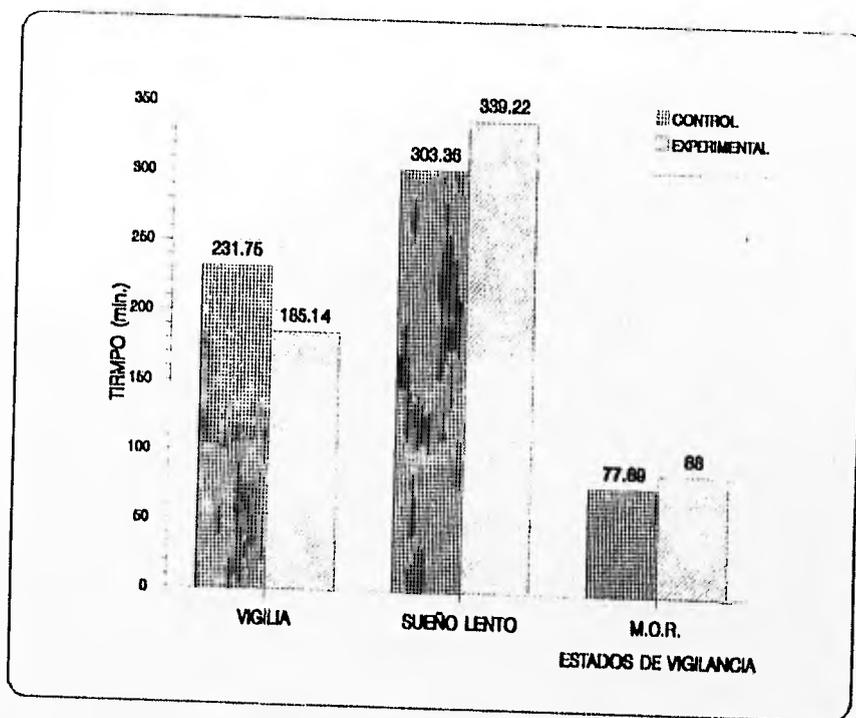


Fig. 8 Duración promedio de los estados de vigilancia durante 10 horas de registro.

Tabla VII

Frecuencia, duración promedio y latencia de las fases de sueño M.O.R. durante las 10 horas de registro.

Rata	Frecuencia (#)		Duración promedio (min)		Latencia (min)	
	Control	Experimental	Control	Experimental	Control	Experimental
1	26	47	3.09	2.73	161.28	93.41
2	29	11	2.80	1.49	135.2	290.03
3	45	47	2.09	2.24	79.32	60.44
4	23	31	1.25	2.14	128.6	138.2
5	39	35	2.06	2.81	100.24	53.16
6	50	67	2.04	1.69	72.4	51.16
X	35.33	39.66	2.22	2.18	112.84	114.4
S	10.01	17.19	0.59	0.48	31.65	84.18
	p > 0.05		p > 0.05		p > 0.05	

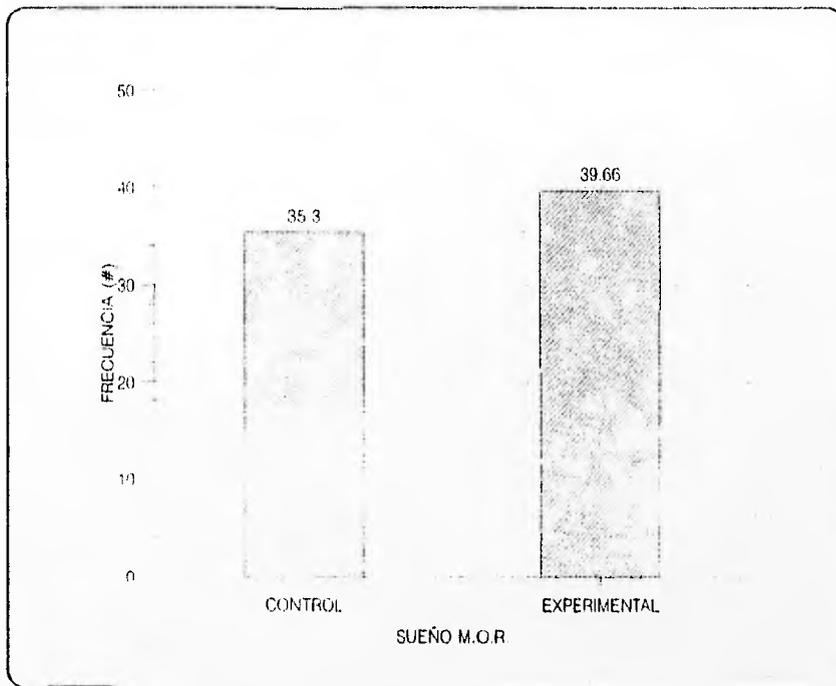


Fig. 9 Frecuencia promedio de la fase de sueño M.O.R. en 10 horas de registro.

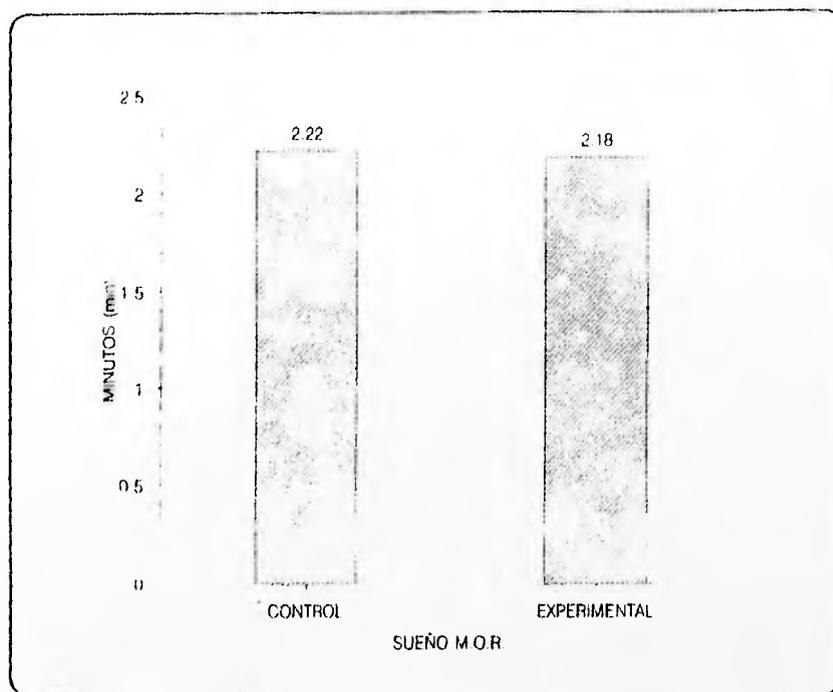


Fig. 10 Duración promedio de la fase de sueño M.O.R. en 10 horas de registro.

DISCUSION

En la naturaleza son pocas las sustancias orgánicas que se encuentran en estado puro; además, en el caso de metabolitos secundarios es muy frecuente que esas sustancias estén presentes en cantidades ínfimas y esto constituye un problema si se quiere explorar la actividad biológica de dicha sustancia. La obtención de 4.31 g del metabolito benzilester del ácido 6-metoxi salicílico nos permite y nos facilita la realización de algunos bioensayos. Por otra parte la insolubilidad en agua de este metabolito, muy común en productos naturales, complica un poco la metodología de trabajo, pues en una gran parte de los bioensayos se emplean soluciones acuosas; así pues, si nuestra molécula es insoluble en ella, se debe recurrir a otros solventes que pueden resultar tóxicos (e ciertas concentraciones) para el modelo biológico empleado. La toxicidad de esos solventes se debe tener muy presente al momento de montar los experimentos, pues si llegamos o rebasamos la dosis letal obtendremos resultados que distorsionen o enmascaren los efectos de la sustancia que estamos analizando. No obstante lo anterior es posible realizar algunas pruebas biológicas.

La estructura química de los compuestos fisiológicamente activos nunca deja de tener interés debido a su relación con la actividad fisiológica de cada uno de ellos. Mediante diversos estudios se han logrado establecer ciertas características mínimas indispensables para que un determinado compuesto tenga actividad auxínica. Estas características son las siguientes:

- 1. Una parte cíclica
- 2. Una cadena lateral ácida
- 3. Una cierta separación entre el grupo carboxilo y el anillo
- 4. Una disposición espacial particular entre la parte cíclica y la cadena lateral ácida.(Devlin, 1980).

Aunque el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico cumple con la primer característica (una parte cíclica), esto al parecer no es suficiente para que presente alguna actividad. Además cabe señalar que la naturaleza de los anillos y la disposición

espacial de la molécula tampoco sea la adecuada para que la molécula funcione como hormona de crecimiento o como inhibidor de la germinación.

Durante los métodos de evaluación de sustancias anticancerígenas que frecuentemente emplean las líneas celulares KB (carcinoma nasofaríngeo) o las células PS (leucemia linfocítica), se considera que las sustancias en experimentación tienen una actividad significativa cuando la DL₅₀ para esas líneas celulares es igual o menor a 30 microg/ml, según lo establecido por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (Meyer *et al.*, 1982; Solis, *et al.* 1993).

En la tabla VIII se muestran los efectos de 41 extractos de *Euphorbiaceae* probados en dos líneas celulares (células PS y KB), y en *A. salina*. 23 de los extractos resultan tóxicos para las células PS a una dosis (DL₅₀) menor a 30 μ g/ml, de ellos 12 son tóxicos para *A. salina* con una DL₅₀ menor a 1000 μ g/ml. En las células KB sólo 6 de los extractos tienen una DL₅₀ igual o menor a 30 μ g/ml y únicamente tres de ellos tienen una actividad en *A. salina* con una DL₅₀ menor a 1000 μ g/ml (Meyer, *et al.* 1982).

Tomando en cuenta los datos mencionados arriba en donde se considera que una DL₅₀ para *A. salina* \leq 1000 μ g/ml es un buen parámetro para determinar si una sustancia es citotóxica o no, es factible que el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico, que sobre el crustáceo tiene una DL₅₀ = 15.39 ppm, con un valor máximo de 23.39 ppm y un mínimo de 10.02 ppm (tabla II), también presente alguna actividad significativa en células cancerosas.

Por último, aunque el bioensayo con *Artemia salina* no aporta ninguna información sobre dónde y cómo actúan las sustancias en las células tumorales, nos permite sin embargo, la posibilidad de detectar rápidamente y a un bajo costo las sustancias que tengan alguna posible actividad sobre este tipo de células.

Como se puede ver en la tabla III la dosis de 200 mg/kg no provoca la muerte a los ratones, esto nos permite realizar algunos experimentos con la seguridad de que a esas dosis o inferiores a ellas los ratones no morirán. Si el metabolito llegara a tener alguna actividad la baja toxicidad de este se convierte en un parámetro importante, pues se

considera que un buen fármaco es aquel que a dosis bajas tiene un efecto terapéutico significativo siendo que a dosis altas es poco tóxico y además el efecto "puede" ser mayor. Un ejemplo de lo anterior es el ácido acetilsalicílico (aspirina), esta droga se emplea regularmente como un efectivo analgésico en dosis de 1 g (Di Palma, 1980), si consideramos que el peso promedio del humano está alrededor de los 70 kg la dosis equivalente sería de 14 mg/kg -una dosis mucho más baja que la empleada en el presente trabajo-. En adición a lo anterior, pacientes con malestares crónicos tales como fiebre reumática o artritis han tomado aspirina por más de 10 años en dosis altas que van de 6 a 8 g por día sin presentar efectos perjudiciales aparentes (Di Palma, 1980; Korolkovas, 1988). Dada la semejanza estructural del benzilester del ácido 6-metoxi salicílico y de la aspirina (figura 2), es factible que los mecanismos de absorción, biodegradación y excreción, una vez que estos se han ingerido, sean similares en ambos casos; de esta forma se podría explicar la baja toxicidad del metabolito estudiado.

El benzil ester del ácido 6-metoxi salicílico no presenta un efecto analgésico debido probablemente a que no tiene el mecanismo de acción de los salicilatos. El mecanismo de acción de estos compuestos calma el dolor mediante acciones ejercidas tanto en el sistema nervioso central como en la periferia, en donde modifican la causa del dolor en su punto de origen. Se cree que la sensación dolorosa está relacionada con la liberación o producción de ciertas sustancias endógenas, tales como las prostaglandinas, en respuesta a otros compuestos endógenos del tipo de la bradicinina. Los salicilatos inhiben la síntesis de prostaglandinas y, por ende, evitan la sensibilización de los receptores del dolor. Hay pruebas de que el mecanismo de acción de otros antipiréticos-analgésicos es idéntico al de los salicilatos (Levine, 1982)

Tabla VIII
Efecto de los extractos alcohólicos de semillas de Euphorbiaceae sobre *A. salina* y líneas celulares (Meyer et al. 1982).

ESPECIE	Porcentaje de muertes a 24 hr				9PS DL ₅₀	9KB DL ₅₀
	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml	DL ₅₀ µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>Eremocarpus setigerus</i>	32	78	100	24	0.0176	inactiva
<i>Euphorbia amygdaloides</i>	30	80	74	30	6.8	inactiva
<i>Croton tiglium</i>	26	78	96	30	0.0001	0.0001
<i>Reverchonia arenaria</i>	22	44	100	98	inactiva	inactiva
<i>Sapium montevidense</i>	0	24	98	116	4.2	inactiva
<i>Euphorbia lagascae</i>	30	34	80	119	0.8	inactiva
<i>Euphorbia marginata</i>	0	26	100	162	7.7	40.6
<i>Aleurites fordii</i>	0	10	100	247	18.3	inactiva
<i>Antidesma nigricans</i>	0	4	100	288	inactiva	inactivo
<i>Euphorbia lathyris</i>	0	8	88	333	1.2	74.9
<i>Bridelia rethusa</i>	6	14	100	353	7.8	41.1
<i>Euphorbia cyparissias</i>	0	24	72	369	0.024	3.9
<i>Sapium japonicum</i>	0	10	80	388	31.3	inactiva
<i>Euphorbia cyberensis</i>	0	8	74	516	6.8	15.1
<i>Chrozophora hierosolymitana</i>	0	0	58	641	65.5	inactiva
<i>Putranjiva roxburghii</i>	0	8	60	713	inactiva	inactiva
<i>Daphniphyllum himalaense</i>	0	8	52	960	inactiva	inactiva
<i>Jatropha spatulata</i>	10	32	48	981	0.27	inactiva
<i>Manihot rubricaulis</i>	0	0	38	> 1000	65.8	inactiva
<i>Euphorbia paralias</i>	0	0	46	> 1000	20.2	inactiva
<i>Euphorbia eriophora</i>	0	4	46	> 1000	30.0	inactiva
<i>Trewia nudiflora</i>	0	2	56	> 1000	0.039	0.00015
<i>Euphorbia heterophylla</i>	10	26	42	> 1000	70.1	inactiva
<i>Jatropha curcas</i>	0	2	32	> 1000	9	inactiva
<i>Cnidioscolus tepiquensis</i>	13	23	40	> 1000	7.1	inactiva
<i>Daphniphyllum humile</i>	0	0	4	> 1000	inactiva	inactiva
<i>Mallotus philippensis</i>	0	6	12	> 1000	inactiva	inactiva
<i>Chrozophora tinctoria</i>	0	0	4	> 1000	inactiva	inactiva
<i>Sapium haematospermum</i>	0	0	10	> 1000	62.4	inactiva
<i>Jatropha gossypifolia</i>	0	0	0	> 1000	inactiva	inactiva
<i>Euphorbia falcata</i>	0	0	6	> 1000	inactiva	inactiva
<i>Excoecaria bussai</i>	0	0	16	> 1000	12.9	inactiva
<i>Bischofia javanica</i>	0	0	2	> 1000	38.9	inactiva
<i>Macaranga parakensis</i>	0	10	10	> 1000	7.8	inactiva
<i>Manihot toxicaria</i>	0	0	6	> 1000	4	3.3
<i>Cnidioscolus elasticus</i>	0	0	0	> 1000	33.5	31.2
<i>Manihot tweediana</i>	8	4	24	> 1000	5.2	41.4
<i>Sapium sebiferum</i>	0	14	24	> 1000	0.82	inactiva
<i>Aleurites moluccana</i>	4	10	16	> 1000	5.3	2.6
<i>Euphorbia medicaginea</i>	0	0	0	1000	4	68.9
<i>Euphorbia myrsinites</i>	0	0	20	1000	inactiva	inactiva

Como se puede ver en la tabla VII la duración total de sueño lento no es significativamente mayor en los experimentales. La duración promedio de la fase de sueño M.O.R. en los controles y experimentales es prácticamente la misma sin embargo, la frecuencia es ligeramente mayor en los animales tratados con el metabolito. Aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$), esta variación sugiere que el metabolito en experimentación posiblemente actúe sobre los mecanismos que disparan el sueño M.O.R. y no sobre los reguladores de la duración de este estado.

Los resultados obtenidos en este trabajo no deben parecer desalentadores, pues aunque solamente en las pruebas de citotoxicidad y modificación del patrón vigilia-sueño se obtuvieron resultados interesantes, existe una variedad de pruebas que nos permiten explorar el campo de acción de las sustancias, mismas que pueden ser aplicadas al metabolito estudiado.

Resulta interesante el hecho de que *Eupatorium peñolare* Moc. sea empleada como un efectivo analgésico en varios estados de la República para aliviar dolores de cabeza y/o de espalda (tabla I). Dados los resultados obtenidos en este trabajo, el efecto analgésico de la planta parece no tener relación con el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico. Sin embargo, cabe la posibilidad de que este metabolito en combinación con otros metabolitos de la planta ejerza un efecto analgésico; por lo cual en estudios posteriores se pueden realizar pruebas de analgesia empleando el extracto crudo de la planta o administrando las infusiones que los médicos tradicionales preparan para sus pacientes.

CONCLUSIONES.

- De *Eupatorium petiolare* Moc. se aisló el metabolito benzilester del ácido 6-metoxi salicílico, con fórmula condensada $C_{15}H_{14}O_4$ y punto de fusión 38-39 °C.
- El metabolito no tiene efecto sobre la germinación y la formación de raíces a las dosis empleadas.
- El metabolito administrado por vía oral, subcutánea e intraperitoneal a dosis de 100 y 200 mg/kg, no resulta mortal para los ratones.
- La DL_{50} preliminar en *Artemia salina* es de 15.38 ppm, con un máximo de 23.39 ppm y un mínimo de 10.02 ppm.
- Es factible que el metabolito tenga actividad citotóxica.
- El incremento de la frecuencia y duración promedio de la fase de sueño MOR de ratas Wistar no es estadísticamente significativo a dosis de 2.4 mg/kg.
- En ratones, el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico no tiene efecto analgésico a dosis de 100 mg/kg.
- Administrado en forma aislada, el benzilester del ácido 6-metoxi salicílico no produce los efectos analgésicos de *Eupatorium petiolare* Moc.

REFERENCIAS.

- Aguilar, A. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS, México. 253 pp.
- Argueta, A. L. Cano y M. E. Rodarte. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Vol. II. Instituto Nacional Indigenista. 1^a Edición. México. 1193 p.p.
- Ayala-Guerrero, F., L. Vargas, J. Taboada, R. Martínez y E. Cortés. 1990. Efecto de un derivado de la 1,5 benzodiazepina sobre el sueño. *Gaceta médica de México*; **126 (6)**: 519- 522.
- Ayala-Guerrero, F., L. Guevara, J. Taboada y R. Martínez. 1993. Effect of a thione on sleep disturbances associated with chronic pain. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **36**: 233-237.
- Beckman, H. 1958; Drugs, Their Nature, Action and Use. Ed. Saunders. London. 728 p.p.
- Bohlmann, F., P. Mahanta, A. Suwita, A. Suwita, A. Anat Natu, C. Zdero, W. Dörner, D. Ehlers y M. Grenz. 1977. Neue sesquiterpenlactone und andere inhaltsstoffe aus vertretern der Eupatorium-Gruppe. *Phytochemistry*; **16**: 1973-1981.
- Bohlmann, F., C. Zdero y H. Kapteyn. 1969. Über die acetylenverbindungen des tribus Astereae. *Chem. Ber.* **102**: 1682-1690.
- Bonner, W. A. y De Graw, J. J. 1962. Ketones from "White snakeroot" *Eupatorium urticaefolium*. *Tetrahedron*. **18**: 1295-1309.
- Bonner, W. A., J. J. De Graw, D. M. Bowen y V. R. Shah. 1961. Toxic constituents of "White snakeroot". *Tetrahedron Lett.* **12**: 417-420.
- Calderón, J. S., L. Quijano M. Garduño, F. Gómez y T. Rios. 1983. 2 α -iso-valeroyloxyperuic acid, a diterpene from *Eupatorium petiolare*. *Phytochemistry*. **22 (11)**: 2617-2619.
- Cassady, J. M y Suffness M 1980. Anticancer Agents Based on Natural Product Models. Academic Press. U.S.A. 500 p.p.

- Di Palma, J. 1980. Farmacología básica y terapéutica médica. Prensa médica mexicana. México 594 p.p.
- Estrada, E. 1985. Jardín botánico de plantas medicinales Maximino Martínez. Universidad Autónoma de Chapingo. 41 p.p.
- Goldstein, A., Aronow, L. y Kalman, M. 1979. Farmacología. Ed. LIMUSA. México. 1001 p.p.
- González, G., J. Bermejo, J. Días, E. Rodríguez, A. Yañes, P. Rauter y J. Pozo. 1990. Diterpenes and other constituents of *Eupatirium salvia*. *Phytochemistry*. **29 (1)**: 321-323.
- Guerrero, C., V. Cruz y R. Saucedo. 1982. Estudio químico de *Eupatorium petiolare* Moc. Rev. Latinoamer. Quím. **13**: 33-34.
- Guerrero, C., G. Campos y J. Taboada. 1988. Estudio químico de *Eupatorium brevipes* y algunas actividades biológicas. Rev. Latinoamer. Quím. **19(3)**: 147-149.
- Gutiérrez, M. del C. 1994. Aislamiento y Purificación de 6-epi-desacetil-laurenobiólida Extraída de *Montanoa grandiflora* y Determinación de su(s) Activida(des) Biológica(s). Tesis de licenciatura. F.E.S. Zaragoza. UNAM. 40 p.p.
- Hendershot, L. y Forsaith, J. 1959. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesic and nonanalgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **125**: 237-240.
- Hengevel, L. 1989. Dynamics of biological invasions. Chapman and Hall Eds. Gran Bretaña. 160 p.p.
- Hepher, A. y J. Roberts. 1985. The control of seed germination in *Trillium lededouri*: The breaking of dormancy. *Planta*. **166**: 314-320.
- Herz, W., V. Serengolam y N. Kumar. 1981. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eupatorium lanclifolium* and *E. semiserratum*. *Phytochemistry*. **20 (6)**: 1343-1347.
- Heywood, V. y J. Harborne. 1977. An overture to the Compositae. In: The biology and chemistry of the compositae. Academic press. Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L. (eds.). New York. Vol. I. 619 p.p.

- Hicks, R., J. Moore, C. Hayes, N. Phillips y J. Hawkins. 1979. REM sleep deprivation increases aggressiveness in male tars. *Physiol. Behav.* **22 (6)**: 1097- 1100.
- Horne, J., J. Percival y J. Traynor. 1980. Aspirin and human sleep. *Electroenceph. Clin. Neuro.* **49**: 409-413.
- Horne, J. 1992. Human slow wave sleep: A review and appraisal of recent findings, with implications for sleep functions, and psychiatric illness. *Experientia.* **42**: 941-954.
- Hubert, T., A. Okunade y D. Wiemer. 1987. Quadrangolide, a heliangolide from *Eupatorium quadrangularae*. *Phytochemistry.* **26 (6)**: 1751-1753.
- Jakupovic, J., E. Ellmauerer, F. Bohlmann, A. Whittermori y D. Gage. 1986. Diterpenes from *Eupatorium turbinatum*. *Phytochemistry.* **25 (11)**: 2677-2678.
- Jakupovic, J., V. Castro y F. Bohlmann. 1987. Further sesquiterpene lactones from Costa Rican *Eupatarieae*. *Phytochemistry.* **26 (2)**: 451-455.
- Jones, S. 1987. Sistemática Vegetal. McGraw-Hill. México. 536 p.p.
- Korolkovas, A. 1988. Essentials of Medicinal Chemistry. Wiley-Interscience Publication. 1204 p.p
- Krebs, J. K. 1988. Estudio y distribución de la abundancia. Ed. Harla. México. 753 p.p.
- Kupchan, S. M., J. E. Kelsey, M. Murayama, J. M. Cassady, J. C. Hemingway y J. R. Know. 1969. Sesquiterpene lactones from *Eupatorium rotundifolium*. *The Journal of Organic Chemistry.* **34 (12)**: 3876-3883.
- Kupchan, S. M., C. W. Sigel, R. J. Hemingway, J. R. Knox y M. S. Udayamurthy. 1969. Cytotoxic flavones from *Eupatorium* species. *Tetrahedron.* **25**: 1603-1615.
- Levine, S. 1976. Ventilatory stimulation by sodium salicylate: role of thoracic receptors. *J. Appl. Physiol.* **41 (5)**: 639-645.
- Levine, R. 1982. Farmacología. Acciones y racciones medicamentosas. Salvat. España. 509 p.p.
- Liu, K., E. Roeder, H. Chen y X. Xiu. 1992. Pyrrolizidine alkaloids from *Eupatorium fortunei*. *Phytochemistry.* **31 (7)**: 2573-2574.

- Lozoya, X. y M. Lozoya. 1982. Flora medicinal de México. 1ª Parte: Plantas Indígenas. IMSS. México. 309 p.p.
- Madroño, R. 1980. Química Médica métodos fundamentales en la búsqueda de nuevos fármacos. Alhambra, Mex. D.F. 423.
- Martin, R., B. Pennock, W. Orr, M. Sanders y R. Rogers. 1980. Respiratory mechanics and timing during sleep in occlusive sleep apnea. *J. Appl. Physiol.* **48 (3)**: 432-437.
- Martínez, M. 1944. Plantas medicinales de México. Ediciones Botas. 3a edición. México. 630 p.p.
- Meyer, B. N., N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nicholson y J. L. McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. **45**: 31-34.
- Monnier, M., F. Bremer, J. M. Gaillard, H. Hediger, J. A. Horne, P. Parmeggiani, P. Passouant y G. F. Rossi. 1980. Biology of sleep. An interdisciplinary survey. *Experientia*. **36**: 1-142.
- Muñoz, J. S. 1994. Caracterización del potencial genotóxico y protector de *Ipomea orizabensis* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 65 p.p.
- Pillar, G., M. Schnall, M. Odeh y A. Oliven. 1992. Amelioration of sleep apnea by salicylate-induced hyperventilation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**: 711-715.
- Quljano, L., J. S. Calderón, G. Gómez, J. T. Garduño y T. Ríos. 1980. Deltidin A and B, two new germacrolides from *Eupatorium deltoideum*. *Phytochemistry*. **19**: 1975-1977.
- Ratnayake, B. M., C. Hewage, V. Karunaratne, G. Wannigama y N. Adikaram. 1992. An antifungal chromene from *Eupatorium riparium*. *Phytochemistry*. **31 (6)**: 1983-1985.
- Romo de Vivar, A. 1981. La química de productos naturales en México: lactonas sesquiterpénicas. *Ciencia*, **32**: 163-189.
- Romo de Vivar, A. 1985. Productos naturales de la flora mexicana. LIMUSA, México, 220 p.p.
- Rzendowski, J. 1988. Vegetación de México. Ed. Limusa. México. 432 p.p.

- Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1985. Flora fanerogámica del valle de México. Vol. II. Dicotyledoneae (Euphorbiaceae-Compositae). I.P.N. e Instituto de Ecología. México. 674 p.p.
- Samet, P., E. Fierer y W. Bernstein. 1960. Effect of salicylates on ventilatory response to inhaled carbon dioxide in normal subjects. *J. Appl. Physiol.* **15 (5)**: 826-828.
- Sanchez, S. O. 1984. Flora del Valle de México. Ediciones Herrero. México. 519 p.p.
- Siebertz, R., P. Proksh, V. Wray y L. Witte. 1989. Accumulation and biosynthesis of benzofurans in root cultures of *Eupatorium cannabinum*. *Phytochemistry.* **28 (3)**: 789-793.
- Sindrup, J., J. Kastrup, P. Madsen, H. Chistensen, B. Jorgensen y G. Wildschiodtz. 1992. Nocturnal variations in human lower leg subcutaneous blood flow related to sleep stages. *J. Appl. Physiol.* **73 (4)**: 1246-1252.
- Solis, P., C. Wright, M. Anderson, M. Gupta y J. Phillipson. 1993. A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Med.* **59**: 250-252.
- Torres, M. 1994. Estudio de algunas actividades biológicas de la lactona sesquiterpénica Glaucólido-E, extraída de *Vernonia salicifolia*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 45 p.p.
- Vollmar, A., W. Schafer y H. Wagner. 1986. Immunologically active polysaccharides of *Eupatorium cannabinum* and *Eupatorium perfoliatum*. *Phytochemistry.* **25 (2)**: 377-381.
- Wurzel, H., H. Becker, Th. Eicher y K. Tiefensee. 1990. Molluscicidal Properties of Constituents from the Liverwort *Ricciocarpous natans* and Synthetic Lunularic Acid Derivatives. *Planta Med.* **56**: 444-445.