

Actividad antiparasitaria de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake contra *Plasmodium falciparum*

Alejandro Hernández, Jackeline Arvizu, Candy Carranza, María Carrillo, Angel León y Jorge Molina

A. Hernández, J. Arvizu, C. Carranza, M. Carrillo, A. León y J. Molina
Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Romualdo del Campo 501, Fraccionamiento Rafael Curiel CP 79060. Cd. Valles, S.L.P.
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato. Km 9.6, Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León, CP 36821. Irapuato Guanajuato.
Escuela de Bioquímica. Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Romualdo del Campo 501, Fraccionamiento Rafael Curiel CP 79060. Cd. Valles, San Luis Potosí.
alejandro.hernandez@uaslp.mx

M. Ramos., V. Aguilera., (eds.). Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2013.

Abstract

Malaria is a public health problem worldwide due to their morbidity and mortality. It is a leading parasite disease in the tropics and subtropics including Latin America. Most cases of malaria are due to *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. Current treatments are becoming less effective due to the development of resistance by the protozoan; therefore it is necessary to search for new effective therapeutic alternatives. In this study we evaluated the biocide activity of three alkamides and borneolester from *H. longipes* roots against *P. falciparum* *in vitro*. The *N*-isobutyl-2*E*, 6*Z*, 8*E* decatrienamide showed biocide activity at 72.39 μ M, while its partially reduced molecule *N*-isobutyl-2*E* decamonoenamide was at 133.3 μ M. For the *N*-isobutyl-2*Z*-monoeno-8, 10-diinundecamide the biocide activity was at 17.02 μ M and 2*E*, 6*Z*, 8*E* bornyl decatrienoate was at 52.98 μ M. The results suggest that alkamides of *H. longipes* A. Blake Gray have biocide activity, which is influenced by the presence of *N*-isobutyl substituent, double bonds at 6*Z*, 8*E* positions and long chain.

Introducción

El paludismo o malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Plasmodium* que se transmiten al hombre a través de la picadura de las hembras infectadas de los mosquitos del género *Anopheles* (Zhang et al. 2001, Kinami et al. 2002). Las especies causantes de la enfermedad son *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* y *P. falciparum*; siendo estas dos últimas las de mayor distribución en el mundo; y *P. falciparum* el agente causal del paludismo severo que ocasiona altos índices de mortalidad. El paludismo afecta aproximadamente al 40% de la población mundial, principalmente en los países pobres de las regiones tropicales de África, Asia y América Latina. El paludismo se caracteriza por la presencia de fiebre, escalofríos y malestar general, siendo la sintomatología variable en función de la especie de *Plasmodium* causante de la enfermedad (WHO, 1998).

El tratamiento del paludismo depende principalmente de la administración de fármacos tales como cloroquina, quinina, mefloquina y pirimetamina, los cuales interfieren con la digestión de la hemoglobina en las etapas eritrocíticas del parásito, siendo hasta hace unas décadas los tratamientos de elección (Foley y Tilley 1998, Menting et al. 1997). Sin embargo, el uso indiscriminado llevó a la aparición de cepas resistentes en gran parte del mundo, principalmente a la cloroquina (Bernaola y Marcotegui 2001). Debido a la disminución de la eficacia de estos medicamentos es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para contrarrestar la enfermedad. Las plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento del paludismo representan una alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria. Al respecto se han aislado lactonas sesquiterpénicas de especies de la familia *Asteraceae*, las cuales muestran actividad parasiticida contra *P. falciparum*. Los compuestos Neurelin A y Neurelin B obtenidos de *Neurolaena lobata* muestran efectos comparables con los fármacos de referencia, artemisina y quinina (Caniato y Puricelli 2003).

En algunos extractos de *Simaroubaceae* se encontraron triterpenos brucein A, brucein B, brucein D y brusantol, los cuales poseen actividad *in vitro* contra *P. falciparum*, sin embargo son citotóxicos y poco específicos (Caniato y Puricelli 2003).

Otro grupo de compuestos bioactivos denominados alcanidas han mostrado actividad parasiticida *in vitro*. *Zanthoxylum gillettii* una planta utilizada para el tratamiento del paludismo en la medicina tradicional de Tanzania, a partir de la cual se aislaron dos alcanidas sustituidas (con grupo *N*-isobutil); la *N*-isobutil-2*E*,4*E*-decadienamida y la *N*-isobutil-3-(3,4-metilendioxyfenil)-2*E*-propenamida, que poseen actividad biocida contra *P. falciparum*, atribuyendo dicha actividad a la insaturación 2*E* presente en la estructura de las alcanidas (Weenen et al. 1990). En un trabajo similar con *Phyllanthus fraternus*, utilizada en Ghana para el tratamiento del paludismo, se aislaron dos alcanidas no sustituidas; la 2*E*,4*E*-octadienamida y 2*E*,4*Z*-decadienamida, las cuales poseen moderada actividad contra *P. falciparum*, donde los autores sugieren que no es necesaria la presencia del grupo *N*-isobutil, siendo sólo necesaria la insaturación 2*E* para el efecto observado (Sittie et al. 1998). Sin embargo, en ambos trabajos faltó considerar la longitud de cadena de las alcanidas, así como la presencia de enlaces triples. *Heliopsis longipes* A. Gray Blake es una planta endémica de la Sierra Gorda del Estado de Guanajuato, encuyas raíces acumula alcanidas siendo la *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E* decatrienamida (afinina) el compuesto mayoritario al cual se atribuyen las actividades biológicas de la planta (Ximénez 1615, Martínez 1994, Molina-Torres et al. 1999). Una de las características de la afinina y de las alcanidas sintetizadas por *H. longipes* A. Gray Blake es la presencia de la insaturación 2*E* en su estructura, la cual se ha demostrado desempeña una función importante en la actividad bactericida, fungicida y como hormona de crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Molina-Torres et al. 1999, Molina-Torres et al. 2004, Ramírez-Chávez et al. 2004). *Heliopsis longipes* A. Gray Blake posee además alcanidas con longitud de cadena variable, dos o más dobles enlaces, así como triples, por lo que esta planta representa un buen modelo para llevar a cabo estudios de relación estructura función. Así mismo, se ha demostrado que los extractos etanólicos de las raíces de la planta no muestran efectos citotóxicos en cultivos celulares *in vitro*, ni en un modelo de ratón *in vivo* (Cariño-Cortés et al. 2010). Lo que valida su uso como modelo de estudio, así como fuente de moléculas con potencial farmacológico. En base a lo anterior en este trabajo se evaluó el efecto de tres alcanidas y un éster, aislados de *H. longipes* A. Gray Blake contra *P. falciparum* *in vitro*, con el objetivo de determinar la relación estructura-actividad de las alcanidas.

1.1 Método

Recolección del material vegetal: Se recolectaron raíces de *H. longipes* A. Gray Blake, en el municipio Puerto de Tablas, Xichú en la Sierra Gorda del Estado de Guanajuato, a altitudes entre 2589 msn, en terrenos alterados de bosque de encinos (*Quercus* sp) y con pendientes pronunciadas. La autenticidad del material fue realizada por el Dr. Jerzy Rzedowski del Instituto de Ecología de Pátzcuaro, Michoacán donde se depositaron especímenes de referencia (García-Chávez et al. 2004).

Obtención de extractos: El extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake se obtuvo a partir de 1.5 Kg de raíces secas, las cuales fueron pulverizadas y maceradas con 10 L de etanol absoluto durante una semana a temperatura ambiente, transcurrido este período el extracto se filtró con papel filtro Whatman No. 2 para eliminar partículas suspendidas.

El extracto obtenido se concentró hasta aproximadamente 1 L, utilizando un evaporador rotatorio Büchi 461 a una temperatura de 50 °C, posteriormente el extracto se guardó a 4 °C hasta su uso. Las muestras del extracto etanólico fueron analizadas en un Cromatógrafo de Gases (GC Hewlett-Packard modelo 5890) equipado con una columna capilar HP-1MS (30 m x 0.25 mm, i.d.; 0.25 μ m film thickness) acoplado a un Espectrómetro de Masas (Hewlett-Packard, modelo 5972 MSD). El equipo fue programado con las siguientes condiciones de operación: la temperatura del inyector se mantuvo a 200 °C, mientras que la temperatura inicial del horno a 150 °C durante 3 minutos, con incremento de 4 °C por minuto hasta lograr una temperatura final de 300 °C, la cual se mantuvo durante 20 minutos. Se utilizó Helio como gas acarreador con un flujo constante de 1 mL/min.

Purificación de las alcanidas del extracto de *H. longipes* A. Gray Blake: El extracto etanólico fue fraccionado mediante cromatografía en columna utilizando silica gel 60G (J.T. Baker) como soporte. El extracto fue eluido utilizando 100 mL de hexano y mezclas de hexano:acetato de etilo (Hex:AcoEt) con polaridad creciente: 100 mL (90:10 v/v), 200 mL (80:20 v/v), 100 mL (70:30 v/v), 100 mL (60:40 v/v), 100 mL (50:50 v/v) y 100 mL de acetato de etilo. Se colectaron fracciones de 50 mL, las cuales fueron evaporadas, disueltas en 1 mL de etanol y analizadas mediante CG-EM para determinar el perfil de compuestos en cada fracción. Las fracciones que mostraron compuestos aislados a partir del extracto se purificaron mediante cromatografía en capa fina, utilizando placas de vidrio de 20 cm X 20 cm impregnadas con 0.5 mm de silica gel 60G (Merk). Las placas se desarrollaron en una cámara de vidrio con el sistema de solventes Hex:AcoEt 2:1 (v/v) durante 45 minutos. Posteriormente se secaron al aire y se asperjaron con una solución etanólica de fluoresceína al 0.02%. Las placas se observaron bajo luz ultravioleta, de las cuales se eluyeron las bandas mayoritarias utilizando AcoEt como eluato. El AcoEt se evaporó a sequedad y las bandas purificadas se resuspendieron en etanol y se analizaron mediante CG-EM, el procedimiento se repitió hasta obtener un solo pico en los cromatogramas. La *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida fue sometida a reducción catalítica siguiendo el procedimiento descrito por Ríos-Chávez (2003), a 10 mg de la molécula pura se le adicionaron 10 mg de óxido de platino como catalizador. La mezcla se mantuvo a 80 °C y se burbujeó Hidrógeno durante 7 minutos. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en capa fina.

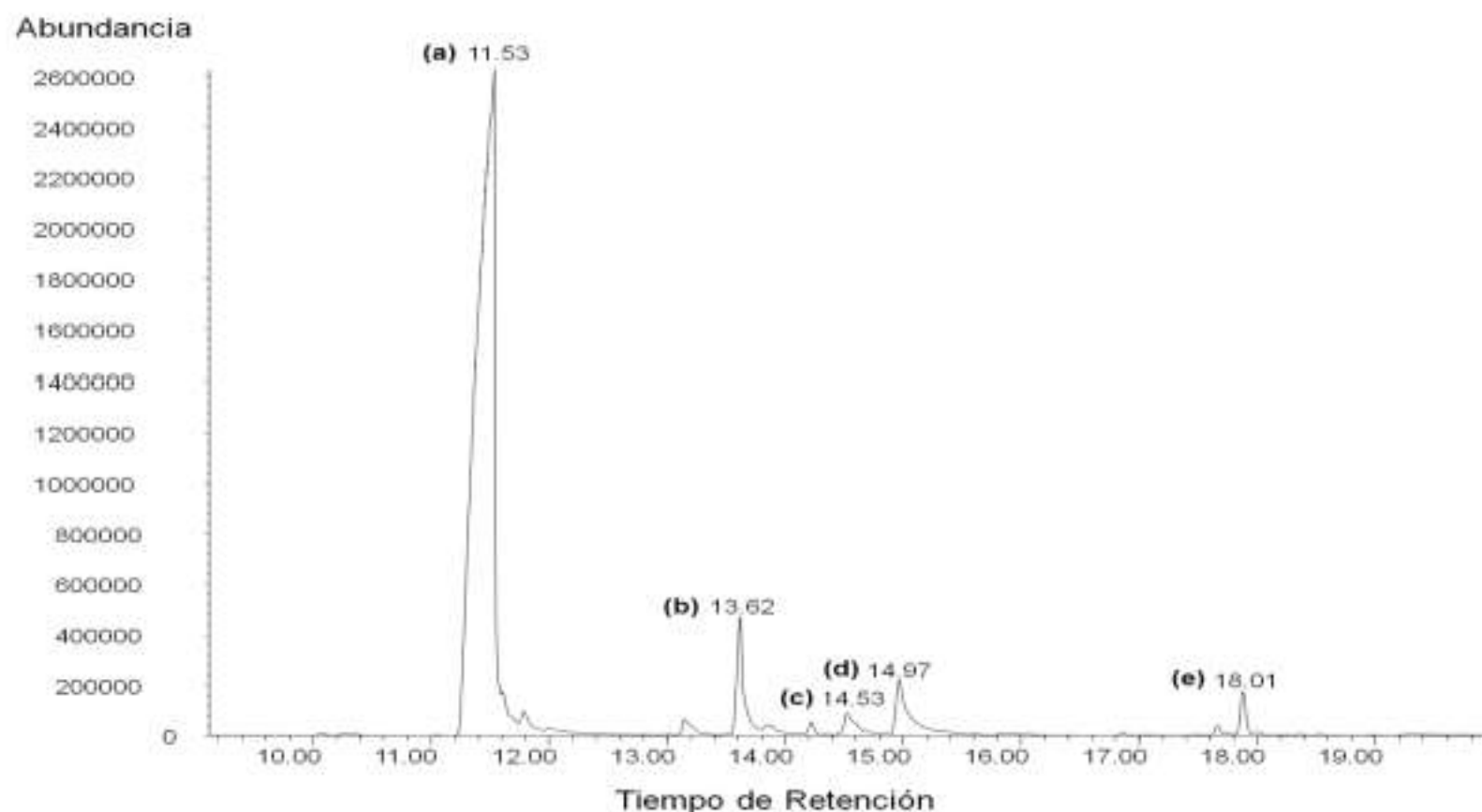
Bioensayos contra *Plasmodium falciparum*: Los ensayos se realizaron en cajas de cultivo celular de 24 pozos (Nuaire) colocando 990 μ L de cultivo de *P. falciparum* una parasitema de 2 % y hematocrito del 5 %. A cada pozo se adicionaron 10 μ L de la solución de compuestos a fin de obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8, 16, 20, 25, 30 y 35 μ g/mL. Como control positivo se utilizaron dosis de 1,5, 10, 15 y 20 μ g/mL de Pirimetamina[®] y como control negativo se utilizaron 10 μ L de etanol.

Además se utilizó un control de eritrocitos al 5 % más 10µL de etanol y como blanco 990 µL del cultivo de *P. falciparum* más 10 µL de medio RPMI 1640. La caja del bioensayo fue expuesta durante un minuto a una mezcla de gases 1% O₂, 3% CO₂ y 96 % N₂ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el período de incubación se tomaron alícuotas de 100 µL para realizar un frotis, el cual fue teñido con colorante Giemsa y se observó en el microscopio para determinar el porcentaje de parasitemia. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa de diseños experimentales FAUANL versión 2.5 (Olivarez-Sáenz, 1994). La dosis letal media se determinó mediante análisis de regresión (Zhang et al. 2001).

1.2 Resultados

Perfil cromatográfico del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake: A partir del extracto concentrado a presión reducida se recuperó un aceite color amarillo, cuyo aspecto correlaciona con la naturaleza lipídica de las alcanidas. El aceite se disolvió en etanol absoluto y se analizó mediante CG-EM. El análisis del cromatogramamuestravarios compuestos los cuales se identificaron en base a la biblioteca NIST (Grafico 1).

Grafico 1 Perfil cromatográfico del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* A Gray Blake



El pico más alto corresponde a la (a) *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida, el compuesto bioactivo presente en las raíces de la planta. El resto de los picos corresponden a las diferentes alcanidas presentes en el extracto, (b) *N*-(2-metilbutil)-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida, (c) *N*-isobutil-2*Z*-mono-en-8,10 diin-undecamida, (d) *N*-isobutil-2*E*-mono-en-8,10 diin-undecamida y (e) 2*E*,6*Z*,8*E* decatrienoato de bornilo.

El análisis del cromatograma revela un compuesto mayoritario que eluye con un tiempo de retención de 11.53 minutos (Figura 1); y un patrón de fragmentación por EM m/z (masa/carga) = 221 (10), 192 (4), 141 (100), 126 (39), 98(26), 81 (94), 68 (14), 53 (12); el cual al ser comparado con la biblioteca NIST, confirma que el compuesto mayoritario en las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake es la (a) afinina (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E* decatrienamida), cuyos picos m/z = 221 y 141 corresponden al ión molecular y al ión padre, respectivamente (Figura 2).

Por otro lado el cromatograma, muestra que además de la afinina, el extracto contiene compuestos minoritarios (Figura 1); cuyo patrón de fragmentación por EM comparado con la base de datos, sugiere que corresponden a distintas alcanidas: (b) *N*-(2-metilbutil)-2*E*,6*Z*,8*E* decatrienamida, (c) *N*-isobutil-2*Z*-monoeno-8,10 diin-undecamida y (d) *N*-isobutil-2*E*-monoeno-8,10 diin-undecamida; y el éster (e) 2*E*,6*Z*,8*E* decatrienoato de bornilo (Tabla 1, grafico 1.2), lo cual demuestra que el extracto etanólico está formado por una mezcla de alcanidas. Finalmente, con el análisis por CG-EM se determinó la concentración del extracto, estimada como 142.2 mg/mL en base a la alcanida mayoritaria; la afinina, considerada como parámetro indicador de la eficiencia del proceso de extracción.

Grafico 1.1 Patrón de fragmentación por Espectrometría de Masas de la afinina, *N*-isobutil-2*E*, 6*Z*, 8*E* decatrienamida.

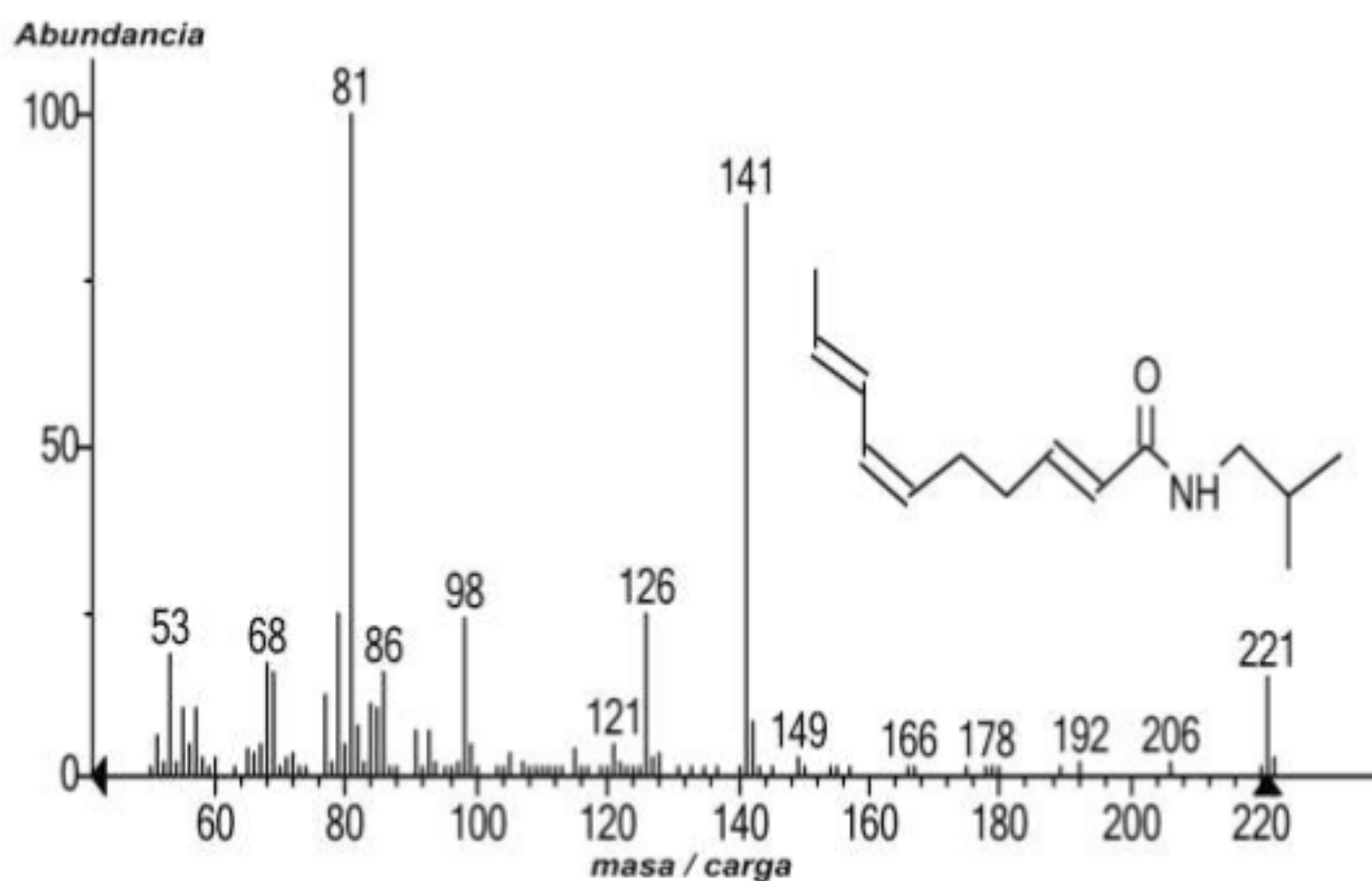
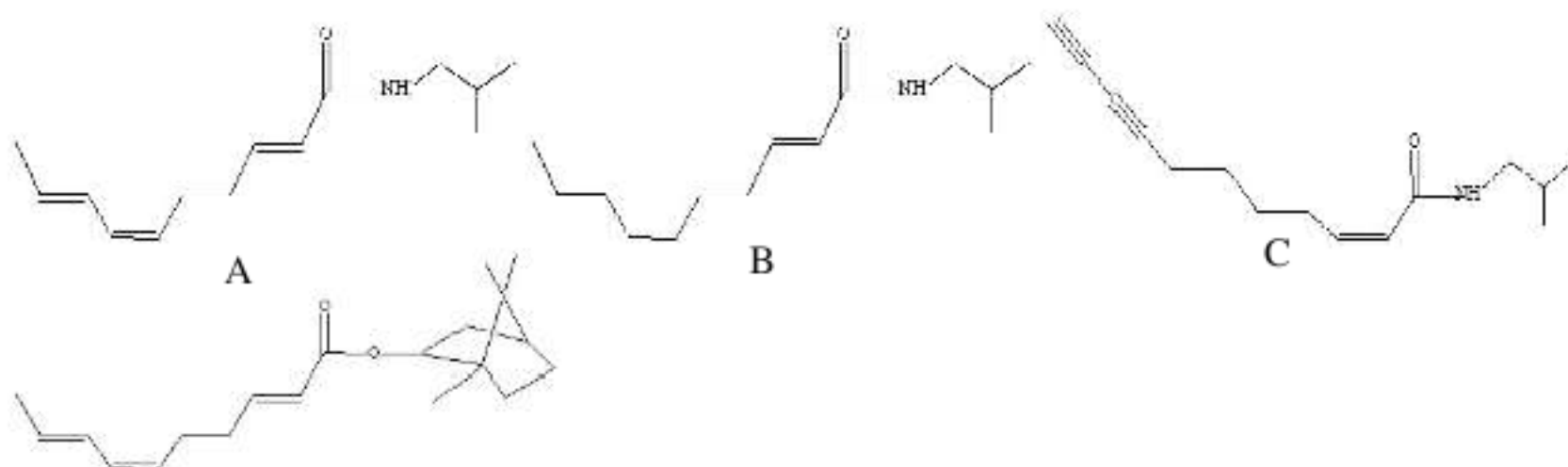


Tabla 1. Perfil cromatográfico del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake

Compuesto	TR	EM (<i>m/z</i>)
(a) <i>N</i> -isobutil- 2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> decatrienamida	11.53	221 (10), 192 (4), 141 (100), 126 (39), 98(26), 81 (94), 68 (14), 53 (12)
(b) <i>N</i> -(2-metilbutil)- 2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> decatrienamida	13.62	235 (12), 53 (18), 69 (18), 81 (100), 86 (30), 98 (14), 126 (12), 155 (88)
(c) <i>N</i> -isobutil-2 <i>Z</i> -monoén-8,10 diin- undecamida	14.53	230 (1), 146 (10), 141 (9), 131 (73), 117 (76), 103 (27), 91 (95), 57 (100)
(d) <i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> -monoén-8,10 diin- undecamida	14.97	231 (17), 57 (45), 63(35), 79 (21), 91 (100), 103 (41), 116 (45), 131 (58)
(e)2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> decatrienoato de bornilo	18.01	302 (0.2), 137 (76), 121 (9), 109 (13), 93 (14), 81 (100), 69 (7), 55 (6.1)

TR= Tiempo de retención; EM= Patrón de fragmentación por espectrometría de masas

Figura 1.2 Estructura de las alcanidas aisladas del extracto etanólico de *H. longipes* A. Gray Blake: (A) *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida, (B) *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E* decamonoenamida (C) *N*-isobutil-2*Z*-monoén-8,10 diin-undecamiday (D) 2*E*,6*Z*,8*E* decatrienoato de bornilo

1.3 Aislamiento y purificación de las moléculas del extracto etanólico de *H. longipes* A. Gray Blake.

Las fracciones eluidas con la mezcla de solventes Hex:AcoEt 90:10, 70:30 y 50:50 mostraron compuestos aislados, por lo que se procedió a realizar la purificación mediante cromatografía en capa fina. A partir de la mezcla 90:10 se obtuvo el 2*E*,6*Z*,8*E*decatrienoato de bornilo, mientras que de las mezclas 70:30 y 50:50, la molécula mayoritaria del extracto *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida y la *N*-isobutil-2*Z*-monoén-8,10-diin-undecamida, respectivamente. Las moléculas se resuspendieron en etanol y se cuantificaron mediante CG-EM hasta su uso. Además, la *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida fue sometida a reducción catalítica para obtener una molécula reducida parcialmente, la *N*-isobutil-2*E*decamonoenamida, cuya identidad fue confirmada por CG-EM y Resonancia Magnética Nuclear (datos no mostrados).

1.4 *H. longipes* A. Gray Blake muestra efecto antiparasitario contra *P. falciparum* in vitro.

Los resultados obtenidos muestran que el extracto etanólico y alcanidas de *H. longipes* A. Gray Blake ejercen actividad contra *P. falciparum* in vitro (Tabla 2). La parasitemia disminuye en relación directa con la concentración de las moléculas evaluadas, así se observó deformación de la membrana parasitófora, colapso y muerte de trofozoitos y esquizontes, siendo estos los estadios más afectados por las alcanidas. Los compuestos pueden ordenarse en base a la actividad mostrada: 2*E*,6*Z*,8*E*decatrienoato de bornilo > *N*-isobutil-2*Z*-monoeno-8,10-diin-undecamida > *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida > *N*-isobutil-2*E*decamonoenamida.

Tabla 1.1 Dosis Letal 50 de las alcanidas evaluadas contra *P. falciparum*

Molécula	DL ₅₀ μM
Extracto etanólico	90.49
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> decatrienamida	72.39
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> decamonoenamida	133.30
<i>N</i> -isobutil-2 <i>Z</i> -monoeno-8,10-diin-undecamida	52.98
2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> decatrienoato de bornilo	17.02
Pirimetamina	12.00

1.5 Discusión

Previamente se ha demostrado la actividad parasiticida de las alcanidas aisladas de dos plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional de África, *Zanthoxylum guilletii* y *Phyllanthus fraternus*, dicha actividad se ha atribuido a la insaturación 2*E* presente en la estructura de las alcanidas independientemente de la presencia del sustituyente *N*-isobutil (Weenen et al. 1900, Sittie et al. 1998). Sin embargo en estos estudios no fue considerada la longitud de cadena, la cantidad de dobles enlaces, la presencia de triples enlaces y la longitud de la cadena. *Heliopsis longipes* A. Gray Blake sintetiza varias alcanidas, cuyas características son la presencia del sustituyente *N*-isobutil e insaturaciones, siendo la más común la 2*E*, variedad de longitud de cadena y la presencia de triples enlaces en la evaluación biológica.

Estas características la hacen un buen modelo para estudiar la relación estructura función de las moléculas sintetizadas por la planta. La *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida, es la alcanida mayoritaria presente en las raíces de esta planta, la cual es responsable de los efectos bactericida, fungicida, entre otros (Molina-Torres et al. 1999, Molina-Torres et al. 2004).

El extracto etanólico de *H. longipes* ejerce efecto contra *P. falciparum* de manera dependiente de dosis, el cual puede ser atribuido al efecto sinérgico de las alcanidas presentes en las raíces. La *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida, alcanida mayoritaria, con longitud de 10 átomos de carbono muestra efectos similares parasiticidas. Sin embargo su derivado, la molécula parcialmente reducida la *N*-isobutil-2*E*decamonoenamida, en la cual se eliminaron las insaturaciones 6*Z*, 8*E*; disminuyen la actividad biológica demostrando la importancia de estos dobles enlaces para dicha actividad.

Por otro lado la molécula *N*-isobutil-2*Z*-monoeno-8,10-diin-undecamida, con longitud de 11 átomos de carbono, dos triples enlaces en las posiciones 8 y 10, ejerce efecto a menores concentraciones que la *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*decatrienamida.

Mientras que el 2*E*,6*Z*,8*E*decatrienoato de bornilo, con longitud de cadena de 10 átomos de carbono y como sustituyente el borneol, ejerce efecto a menores concentraciones que las alcanidas anteriormente mencionadas. Los resultados obtenidos sugieren en orden de importancia para la actividad contra *P. falciparum*, el tipo de sustituyente conjugado a las insaturaciones 2*E*,6*Z*,8*E*; la longitud de cadena, triples enlaces; la insaturación 2*E* conjugada con 6*Z*,8*E*. Además la importancia del *N*-isobutil puede estar asociada a las insaturaciones conjugadas 2*E*,6*Z*,8*E* y a la longitud de cadena carbonada.

1.6 Conclusiones

Las alcanidas de *H. longipes* A. Gray Blake ejercen actividad parasiticida contra *P. falciparum* *in vitro*, esta actividad está relacionada con el tipo de sustituyente presente en la estructura molecular, así como la longitud de cadena carbonada, los triples enlaces y las insaturaciones 2*E*,6*Z*,8*E*.

1.7 Referencias

- Bernaola, E. Marcotegui, F. (2001). Paludismo. Revista de la Asociación Española de Pediatría 27:183-187.
- Canniato, R., Puricelli L. (2003). Review: Natural antimalarial agents (1995-2201). Critical Reviews in Plant Sciences 22(1):79-105.
- Cariño-Cortés, R., Gayosso-De-Lucio, J. A., Ortíz, M. I., Sánchez-Gutiérrez, M., García-Reyna, P. B., Cilia-López, V. G., Pérez-Herrera, N. (2010). Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S. F. Blake in mice. J. Ethnopharmacol 130:216-221.
- Foley, M., Tilley, L. (1998). Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. Pharmacology Theraphy 79:55-87.
- García-Chávez A, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J. 2004. El género *Heliopsis* (Heliantheae, Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana* 69:115-131.
- Kinami, A. M., Chepkwony, H., Govaerts, C., Roets, E., Busson, R., De Witte, P., Zupkp, I. (2002). The antimalarial activity of isolates from *Ajugaremota*. *J. Nat. Prod.* 65:789-793.
- Martínez M. 1994. Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas 6ª Ed. pp. 113-115.
- Menting, J. G., Tilley, L., Deady, L. M., Simpson, R. J., Cowman, A. F., Foley, M. (1997). The antimalarial drug, chloroquine interacts with lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Mol and Biochem Parasitol* 88:215-224.

Molina-Torres J, García-Chávez A, Ramírez-Chávez E. 1999. Antimicrobial properties of alkamides presents in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: Affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacology* 64:241-248.

Molina-Torres J., Salazar-Cabrera C. J., Armenta-Salinas C., Ramírez-Chávez E. (2004). Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: Affinin and reduced amides. *J. Agric, FoodChem* 52: 4700-4704.

Olivarez-Sáenz, E. (1994). Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N. L.

Ramírez-Chávez, E., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., Molina-Torres, J. (2004). Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in Arabidopsis. *Plan Physiol* 134:1058-1068.

Ríos-Chávez, P., Ramírez-Chávez, E., Armenta-Salinas C., Molina-Torres, J. (2003). *Acmellaradicans* var *radicans*. In vitro culture establishment and alkamide content. *In vitro Cell Develop Biol* 39:37-41.

Sittie, A. A., Lemmich, E., Olsen, C. E., Hviid, L., Christensen S. B. (1998). Alkamides from *Phyllanthus fraternus*. *Plantamedica* 64:192-193.

Weenen, H., Nkunya, M. H., Bray, D. H., Mwasumbi, L. B., Kinabo, L. S., Kilimali, A. E. (1990). Antimalarial compounds containing an α,β -unsaturated carbonyl moiety from Tanzanian medicinal plants. *PlantaMedica* 56:371-373.

World Health Organization (WHO) Annual Report, 1998.

Ximénez F. (1615). *Qvatro libros de la naturaleza*. México Calle Diego López Dávalos pp. 224.

Zhang, H. J., Tamez, P. A., Hoang, V. D., Tan, G. T., Hung, N.V. (2001). Antimalarial compounds from *Raphidopora decursiva*. *J. NatProd.* 64:772-777.