

EVALUACIÓN FITOQUÍMICA PRELIMINAR DE *Xanthium spinosum* L. (CASHAMARUCHA) EN ECUADOR

Marco Castillo¹, Eduardo Quinatoa¹, David Risco¹, Itziar Arnelas²

¹Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Ambato-Ecuador

²Universidad Técnica Particular de Loja, Departamento de Ciencias Naturales, Loja-Ecuador

RESUMEN

Se llevó a cabo el estudio fitoquímico de *Xanthium spinosum* L. en Ecuador, dadas sus propiedades medicinales tradicionales relacionadas con las afecciones de pulmón, hígado, riñones y próstata. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de metabolitos secundarios de interés medicinal como los alcaloides, esteroides, triterpenos, leucoantocianinas y saponinas, si bien la presencia de leucoantocianinas se restringe al fruto y la raíz, y la de saponinas al tallo y hojas. Tanto los alcaloides como los esteroides y triterpenos fueron detectados en todas las estructuras analizadas. No se detectaron en ninguna estructura compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas, antraquinonas, taninos y glicósidos cianogénicos. La ausencia de flavonoides y taninos en la población estudiada, a diferencia de poblaciones de la misma especie en Bolivia estudiada por otros autores, podría ser consecuencia de la influencia de factores bióticos y/o abióticos que contribuyen a la síntesis de los mencionados metabolitos secundarios. El interés medicinal de las especies de este género, combinado con la diversidad de metabolitos secundarios que presentan, hacen que esta especie sea de interés científico para futuros estudios en diferentes poblaciones en Ecuador. Esto es especialmente importante, dado al escaso conocimiento que tenemos sobre los Andes Tropicales. Es de vital importancia continuar con este tipo de investigaciones preliminares, contribuyendo como medida de conservación de estos diversos ecosistemas y su riqueza cultural, reportando un beneficio a la sociedad en general.

Palabras clave: Plantas medicinales, etnomedicina, etnobotánica, Ecuador.

ABSTRACT

Phytochemical study of *Xanthium spinosum* L. in Ecuador was done, due its medicinal properties for diseases of lung, liver, kidney and prostate. Results showed the presence of medicinal secondary metabolites such as alkaloids, steroids, triterpenes, leuco-anthocyanins and saponins. The presence of leuco-anthocyanins were detected on fruit and roots, and the saponins on stems and leaves. Alkaloids, steroids and triterpenes were detected in all studied structures. Phenolic compounds, flavonoids, lactones, anthraquinone, tannins and cyanogenic glycosides, were not detected from any structures. There is no evidence of the presence of flavonoids and tannins in the studied population, in contrast to Bolivian population of the same species studied by other authors. Abiotic/biotic factors might induce the synthesis of these secondary metabolites. The medicinal interest of some species in this genus, combined with the diversity of the presence of secondary metabolites, makes of scientific interest this species for futures studies in different populations from Ecuador. This is especially important due to the poor knowledge of Andean ecosystem that we have. It is of vital importance to continue with these types of preliminary investigations, contributing to conservationist actions of these ecologically and cultural rich ecosystems, reporting a benefit society.

Keywords: Medicinal plants, ethnomedicine, ethnobotany, Ecuador.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas tropicales son considerados los hábitats más diversos de la Tierra [1] aunque su descripción y clasificación dista de ser completa. Ecuador es uno de los países que presenta un alto valor en diversidad de especies plantas [2], así como de grupos culturales³. Sin embargo, este país se ubica entre uno de los primeros en la crisis de deforestación y pérdida de conocimientos ancestrales. El uso de las plantas en las diversas poblaciones humanas, está intrínsecamente ligado a las tradiciones culturales [4]. De esta forma, la investigación etnobotánica ha sido un punto clave para saber cómo cada población aprovecha la flora de su entorno por ser parte sustancial de su identidad [5]. Es por ello que, este tipo de investigaciones son de vital impor-

tancia para la conservación de estos ecosistemas, del conocimiento ancestral de las plantas que las poblaciones tienen, y para contribuir que estas investigaciones influyan en el bienestar de los dueños intelectuales de dichos conocimientos, y de la sociedad en general previo reconocimiento de dichos derechos. Así mismo, completar este conocimiento etnobotánico con estudios fitoquímicos, es de gran importancia para un reconocimiento preliminar de los metabolitos secundarios presentes en dichas plantas. *Xanthium spinosum* L. (Asteraceae) es una planta anual considerada nativa de Sudamérica [6], si bien ha sido introducida y/o naturalizada en numerosas partes del mundo, considerándose esta y otras especies de este género como invasoras en determinadas regiones del viejo mundo [7]. *X. spinosum* se caracteriza por presentar indumento pubescente, tallos densamente ramificados, espinas trifurcadas amarillas en las axilas de las hojas, éstas de forma ovado-lanceoladas o lanceoladas, simples o trilobadas, con haz verdoso y envés grisáceo o blanquecino, con capítulos femeninos solitarios, axilares, los masculinos agrupados en los extremos de las ramas, involucro de los capítulos masculinos con brácteas lanceoladas y los de los femeninos con dos picos. A menudo se la encuentra creciendo en bordes de cultivos o terrenos abandonados.

Xanthium strumarium L. ha sido una de las especies de este género con mayor interés medicinal y dónde mayores contribuciones científicas se han realizado, siendo de gran interés su capacidad antitumoral y anticancerígena, entre otras [8]. Para *X. spinosum* se han reportado numerosos usos medicinales en países andinos como Bolivia haciendo uso del tallo, hojas, raíz y fruto. Así, gracias al conocimiento ancestral, se sabe que esta especie presenta propiedades medicinales relacionadas con las afecciones de pulmón, hígado, riñones y próstata[9]. Sin embargo, los estudios etnobotánicos o fitoquímicos en esta especie son muy escasos, no habiéndose localizado estudio científico alguno al respecto en Ecuador. Es por ello que, el objetivo de este estudio fue realizar un estudio fitoquímico preliminar para determinar que metabolitos secundarios presenta esta especie en Ecuador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección y procesamiento del material vegetal

Xanthium spinosum L. fue recolectada a lo largo del mes de abril del 2009 en la provincia de Tungurahua, cantón Cevallos, Parroquia La Matriz, en las coordenadas UTM 0766143E 9851894N (2851 msnm). Los ejemplares recolectados están disponibles para su consulta y se encuentran conservados en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato. El material vegetal fue colectado y secado a temperatura ambiente durante 15 días. Posteriormente, se procedió a la separación de las hojas, tallos y raíz, seguido de la pulverización de cada estructura en un molino de cuchillas.

Estudio fitoquímico

Para la extracción de los compuestos se utilizó etanol como solvente. 100 g de material vegetal molido se mezclaron con 300 ml de etanol al 80%. Durante 1 hora, se procedió al calentamiento de la muestra al baño maría para después dejar reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. Se realizó una primera filtración del extracto etanólico, y posteriormente el filtrado se mezcló con 50 ml de etanol (80%) para una segunda posterior filtración. Finalmente, a través del volumen obtenido, se calcularon los gramos de droga cruda por cada mililitro de extracto vegetal. Para cada metabolito secundario se llevaron a cabo 5 repeticiones del análisis.

Alcaloides

Se colocaron 25 ml del extracto total equivalente a 50 g de material vegetal en una cápsula de porcelana, y se procedió a la evaporación hasta obtener una consistencia viscosa de la muestra. Seguidamente se adicionaron 5 ml de ácido clorhídrico 2N calentando y agitando al baño maría durante 5 minutos. Una vez enfriada la mezcla a temperatura ambiente, se alcalinizó la mezcla con 0.5 g de cloruro de sodio y se añadió el reactivo de S.R. Mayer, S.R. Wagner y de Dragendorff a diferentes muestras. La presencia de turbidez en la muestra, fue indicativo de la presencia de alcaloides.

Saponinas

Se colocaron 100 mg de muestra vegetal seca con 10 ml de agua destilada. La muestra se tapó adecuadamente. Se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Tras 30 minutos de reposo se observó la presencia de espuma por encima de la superficie líquida. La presencia de espuma pasados 30 minutos más en reposo, fue indicativo de la presencia de saponinas.

Esteroides

15 ml de extracto etanólico se evaporaron hasta la sequedad al baño maría. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se adicionaron 10 ml de éter de petróleo desechando el líquido sobrenadante después del reposo. Este proceso se repitió tantas veces como fueron necesarias hasta que la muestra tornase a un color claro. Seguidamente, se añadieron 10 ml de cloroformo junto con

100 mg de sulfato de sodio anhidro, procediéndose a una filtración final del extracto. Para determinar la presencia de este tipo de metabolitos, se llevaron a cabo 2 pruebas:

- a) Test de Liebermann. Para llevar a cabo este test, se adicionó 1 ml de ácido acético glacial al filtrado obtenido en el paso anterior. Cuidadosamente, se añadió 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Un cambio de color comparado con una muestra control, indicó la presencia de triterpenos y esteroides.
- b) Test de Salkowski. En este caso, al filtrado obtenido se le añadieron 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. La presencia de color rojo en la capa de cloroformo, indicó la presencia de esteroides.

Lactonas

En un papel de filtro se colocaron 3 gotas de extracto etanólico en concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3 ml. El papel de filtro fue secado haciendo uso de una corriente de aire caliente. Una vez secado, se añadió el reactivo de Kedde. La presencia de una mancha coloreada o un anillo púrpura alrededor de la muestra, comparado con una muestra control, indicó la presencia de lactonas.

Flavonoides

Se evaporaron 15 ml de extracto etanólico hasta la sequedad al baño maría. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se adicionaron 10 ml de éter de petróleo desechando el líquido sobrenadante después del reposo. Este proceso se repitió tantas veces como fueron necesarias hasta que la muestra tornase a un color claro. Seguidamente, se añadieron 10 ml de cloroformo junto con 100 mg de sulfato de sodio anhidro, procediéndose a una filtración final del extracto. Se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

- a) Test de la Cianidina. El extracto obtenido después de la filtración fue mezclado con 0.5 ml de HCl concentrado y tres virutas de magnesio. Se observaron los cambios de coloración dentro de los 10 minutos siguientes. Si persistió alguna coloración, la muestra fue diluida con agua destilada al mismo volumen. Seguidamente, se añadió 1 ml de alcohol octílico y se procedió a la agitación. Una vez pasado el tiempo necesario para la separación de las capas, se observó el color en cada una comparándolo con una muestra control que sirvió como patrón referencial. En caso de no existir separación de capas, se consideró la inexistencia de flavonoides.
- b) Test para Leucoantocianinas. El extracto obtenido después de la filtración fue mezclado con 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y calentado durante 5 minutos. La presencia de una coloración roja en la muestra pasado una hora, indicó la presencia de leucoantocianinas.

Taninos y fenoles

Se evaporaron 5 ml de extracto etanólico hasta la sequedad al baño maría. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se agregaron 25 ml de agua destilada calentando y mezclando bien. Se adicionaron 4 ml de cloruro sódico al 10% con la intención de eliminar cualquier compuesto no tánico. Una vez enfriada a temperatura ambiente y filtrada la mezcla, se realizaron 3 pruebas para determinar la presencia de taninos o fenoles.

- a) Test con cloruro férrico. Se mezclaron 3 ml de extracto acuoso con 3 ml de cloruro férrico (1%). La presencia de un color negro-azulado indicó la presencia de fenoles. La presencia de un color verde o verde azulado oscuro, indicó la presencia de taninos.
- b) Test de la Gelatina. Se mezclaron 3 ml de extracto acuoso con 5 ml de gelatina al 5%. La formación de un precipitado, indicó la presencia de fenoles.
- c) Test de la Gelatina-Cloruro de sodio. Se mezclaron 3 ml de extracto acuoso con 5 ml de gelatina al 5%-cloruro de sodio). La presencia de un precipitado, indicó la presencia de fenoles.

Glicósidos

- a) Test de Bornträger para la detección de antraquinonas. El extracto etanólico equivalente a 1 g se evaporó hasta la sequedad utilizando el baño maría. El residuo se redisolvió en 30 ml de agua destilada, para una posterior filtración. Una vez enfriado el filtrado, se procedió a mezclar con 10 ml de benceno. Pasado el tiempo suficiente para la separación de las capas, la capa bencénica se transfirió a un nuevo tubo de ensayo en el cuál se agregaron 5 ml de amoníaco. La presencia de un color rojo en la capa alcalina fue indicativo de la presencia de antraquinonas.
- b) Test para la detección de glicósidos cianogénicos. Se mezclaron 5 g de material vegetal seco con 125 ml de agua destilada.

Después, se procedió a la preparación de un papel impregnado con picrato de sodio sumergiendo una tira de papel filtro en una solución recientemente preparada de picrato de sodio (0.5 g de CO_3Na + 0.5 g de ácido pícrico en 100 ml de agua destilada). Se insertó el papel impregnado de picrato de sodio cuidando de no tocar las paredes, se tapó debidamente sujetando el papel desde

el tapón, y se incubó a 35°C durante 3 horas. Si pasadas 3 horas se observaba un cambio de coloración en el papel, se asumió la presencia de glicósidos cianogénicos. Si tras 48 horas no se observaba ningún cambio de coloración, se asumió la no presencia de este metabolito secundario.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio, se resumen en la Tabla 1. El estudio fitoquímico preliminar mostró la presencia de diferentes metabolitos como alcaloides, esteroides, triterpenos, leucoantocianinas y saponinas. Sin embargo, no todas las estructuras vegetales analizadas presentaron todos los metabolitos secundarios analizados. Así, tanto los alcaloides como los esteroides y triterpenos, se detectaron en todas las estructuras analizadas (tallos, hojas, fruto y raíz). Sin embargo, la presencia de leucoantocianinas solo fue detectada en el fruto y la raíz, y la de saponinas en tallos y hojas. No se detectaron en ninguna estructura compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas, antraquinonas, taninos y glicósidos cianogénicos.

Tabla 1. Resultados obtenidos del estudio fitoquímico de *X. spinosum* L. Abundancia del metabolito: (-) ausencia; (+) escasa presencia del metabolito; (++) moderada; (+++) alta.

	tallos y hojas	fruto	raíz
Alcaloides	++	++	++
Compuestos fenólicos	—	—	—
Esteroides	+	+++	++
Flavonoides	—	—	—
Lactonas	—	—	—
Leucoantocianinas	—	+++	++
Antraquinonas	—	—	—
Saponinas	++	—	—
Taninos	—	—	—
Triterpenos	+	+++	++
Glicósidos cianogénicos	—	—	—

DISCUSIÓN

Los alcaloides son metabolitos secundarios muy frecuentes en la naturaleza, los cuales presentan diferentes propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatorias así como la capacidad para inhibir determinadas enzimas[10]. Los esteroides han sido relacionados con el control del colesterol[11] y con propiedades antivirales[12]. Estudios en *Vaccinium uliginosum* L. mostraron como la presencia de antocianinas (las leucoantocianinas son las precursoras de éstas[13]) estuvieron correlacionadas con la actividad antioxidante[14]. Estudios en ratones, indicaron que el suministro de determinadas antocianinas puede contribuir a controlar el peso por dietas ricas en grasas[15]. Diferentes estudios han atribuido diferentes propiedades a las saponinas. Los basados en la familia Caryophyllaceae[16], concluyeron como determinadas tipos pueden ser precursores de medicinas, detergentes y cosméticos. En el caso de las propiedades medicinales, el interés de las saponinas es relevante. Estudios específicos en especies de esta familia de plantas indicaron una importante capacidad antioxidante y hemolítica[17]. Otros, basados en el estudio del conocimiento ancestral del uso medicinal de las plantas[18, 19], indicaron como determinados tipos de saponinas presentaron actividad antitumoral. Los relacionados con el desarrollo de vacunas, mostraron la capacidad de este tipo de metabolito secundario como estímulo inmune para el mejoramiento de las mismas[20].

Los estudios fitoquímicos en *X. spinosum* son escasos, y hasta la fecha, no se sabe de la existencia de este tipo de análisis básicos para esta especie en Ecuador. Los llevados a cabo en Bolivia[21], indicaron la presencia de flavonoides y taninos (además de alcaloides y saponinas), resultados que discrepan de los obtenidos en este estudio. Los obtenidos en otras especies como *X. strumarium*[22, 23], muestran la presencia de alcaloides y terpenos acordes a los resultados obtenidos en este estudio, sin embargo, también se reportan la presencia de flavonoides y taninos. La inexistencia de estos metabolitos secundarios en las muestras analizadas de *X. spinosum*, podría explicarse por el hecho de la notable diversidad de metabolitos secundarios que este género presenta, y que algunos autores han relacionado con la sistemática y la distribución geográfica de las especies de este género[24].

La presencia y variabilidad en el contenido de estos metabolitos secundarios, ha sido relacionado con las adaptaciones abióticas y bióticas al medio[25]. Determinados autores demuestran como en algunas especies en la familia Asteraceae, el aumento de la altitud acompañado de una mayor radiación ultravioleta, puede inducir la síntesis de determinados tipos de flavonoides, como respuesta a las condiciones xéricas del medio[26]. Así mismo, los taninos, entre otras funciones, han sido relacionados con la defensa ante patógenos[27], y ciertos estudios han demostrado que la variación de su concentración tiene que ver con aspectos como las condiciones ambientales, fenología, sexo y edad, relacionando la incidencia de la radiación ultravioleta, con la síntesis de los mismos para la protección del genoma celular[28]. Si bien estas cuestiones no pueden resolverse con el objetivo perseguido en este trabajo, los resultados obtenidos y en base a los argumentos presentados en los trabajos citados, podría plantearse la hipótesis de si la presencia de flavonoides y taninos en la población en Bolivia, podría estar relacionado con las condiciones xéricas del medio y con la incidencia de la radiación ultravioleta por la elevada altitud (alrededor 3800 msnm), si se compara con poblaciones de la misma especie a menor altitud, menor incidencia en la radiación ultravioleta y condiciones menos extremas, como es el caso de la población estudiada en Ecuador (colectada a 2851 msnm, con unas condiciones ambientales menos exigentes que en el altiplano boliviano).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, muestran la presencia de metabolitos secundarios importantes desde el punto de vista medicinal. Este tipo de estudios abre las puertas para futuras investigaciones que puedan determinar aquellas poblaciones con mayor diversidad de compuestos metabólicos secundarios de interés medicinal en esta especie, y poder así correlacionarlo con variaciones morfológicas y ecológicas. Esto es especialmente importante, dado al escaso conocimiento que se tiene sobre los Andes Tropicales. Ampliar este tipo de conocimiento, no solo puede contribuir a la sociedad en general por las aplicaciones medicinales que *X. spinosum* pueda tener, sino que también como medida de conservación de estos diversos ecosistemas, su riqueza cultural y el conocimiento ancestral.

REFERENCIAS

- [1] Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- [2] León Yáñez, S. (2000). La flora de los páramos ecuatorianos. *Serie Páramo (Biodiversidad)*, 7, 5–21.
- [3] Benítez, L. & Garcés, A. (1988). *Culturas Ecuatorianas Ayer y Hoy*. Quito: Abya-Yala.
- [4] Tene, V., Malagón, O., Finzib, P.V., Vidarib, G., Armijos, C. & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of ethnopharmacology*, 111(1), 63–81.
- [5] Ríos, M., Koziol, M.J., Borgoft, P.H. & Granda, G. (2007). *Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas*. Quito: AbyaYala.
- [6] Barkworth, M.E., Capels, J.M., Long, S. & Piep, M.B. (Eds). (2006). *Flora of North America North of Mexico. Volume 21: Magnoliophyta: Asteridae, Part 8: Asteraceae, Part 3*. New York: Oxford University Press.
- [7] Shao, H., Huang, X., Wei, X. & Zhang, C. (2012). Phytotoxic Effects and a Phytotoxin from the Invasive Plant *Xanthium italicum* Moretti. *Molecules*;17, 4037–4046.
- [8] Kamboj, A. & Saluja, A.K. (2010). Phytopharmacological review of *Xanthium strumarium* L. (Cocklebur). *International Journal of Green Pharmacy*, 4(3), 129–139.
- [9] Girault, L. (1987). *Kallawayas: Curanderos itinerantes de los andes*. La Paz: Quipus.
- [10] Wansia, J.D., Devkota, K.P., Tshikalange, E. & Kuete, V. (2013). 14 - Alkaloids from the Medicinal Plants of Africa. En V. Kuete (Ed.), *Medicinal Plant Research in Africa. Pharmacology and Chemistry* (pp. 557–605). London, Waltham: Elsevier.
- [11] Plat, J. & Mensink, R.P. (2001). Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 11(1), 31–40.
- [12] Abid Ali, M.M., Jain, D.C., Bhakuni, R.S., Zaim, Mohd. & Thakur R.S. (1991). Occurrence of some antiviral sterols in *Artemisia annua*. *Plant Science*, 75(2), 161–165.
- [13] Bate-Smith, E.C. (1959). Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochemical Journal*, 58(1), 122–125.

- [14] Wanga, L.J., Sua, S., Wua, J., Dua, H., Li, S.S., Huoc, J.W., Zhangd, Y. & Wang, L.S. (2014). Variation of anthocyanins and flavonols in *Vaccinium uliginosum* berry in Lesser Khingan Mountains and its antioxidant activity. *Food Chemistry*, 160 (1), 357–364.
- [15] Wua, T., Qia, X., Liua, Y., Guoa, J., Zhua, R., Chena, W., Zhenga, X. & Yu, T. (2013). Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice. *Food Chemistry*, 141, 1(1), 482–487.
- [16] Jia, Z., Koike, K., Sahu, N.P. & Nikaido, T. (2002). Triterpenoid saponins from Caryophyllaceae family. *Studies in Natural Products Chemistry*, 26, 3–61.
- [17] Arslana, I. & Çelikb, A. (2013). Saponin Rich Fractions (SRPs) from Soapwort Show Antioxidant and Hemolytic Activity. *APCBEE Procedia*, 7, 103–108.
- [18] Calabria, L.M., Piacente, S., Kapusta, I., Dharmawardhane, S.F., Segarra, F.M., Pessiki, P.J. & Mabry, T.J. (2008). Triterpene saponins from *Silphium radula*. *Phytochemistry*, 69(4), 961–72.
- [19] Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L. & Liu, C. (2010). Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81(7), 703-14.
- [20] Song, X. & Hu, S. (2009). Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. *Vaccine*, 27(36), 4883–4890.
- [21] Gutierrez, M.P., Limachi, G., Gonzales, E. & Bermejo, P. (2011). Control de Calidad del *Xanthium spinosum*, planta medicinal expendida en la ciudad de La Paz, Bolivia. *Biofarbo*, 19(1), 15–21.
- [22] Hasan, T., Das, B.K., Qibria, T., Morshed, M.A. & Uddin, M.A. (2011). Phytochemical Screening and Evaluation of Analgesic Activity of *Xanthium strumarium* L. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 3(1), 455–463.
- [23] Yadav, R.N.S. & Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*, 3(12), 10-14.
- [24] McMillan, C., Chavez, P.I., Plettman, S.G. & Mabry, T.J. (1975). Systematic implications of the sesquiterpene lactones in the "strumarium" morphological complex (*Xanthium strumarium*, Asteraceae) of Europe, Asia and Africa. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2(3), 181–184.
- [25] Dixon, R. & Paiva, N. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085–1097.
- [26] Nikolova, M. T. & Ivancheva, S. V. (2005). Quantitative flavonoid variations of *Artemisia vulgaris* L. and *Veronica chamaedrys* L. in relation to altitude and polluted environment. *Acta Biologica Szegediensis*, 49(3–4), 29–32.
- [27] Feeny, P. P. (1970). Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, 51, 565–581.
- [28] Espírito-Santo, M.M., Femandes, G.W., Allain, L.R. & Reif, T.R.F. (1999). Tannins in *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae): effects of seasonality, water availability and plant sex. *Acta Botanica Brasilica*, 13(2), 167–174.