

ANÁLISIS CUANTITATIVOS DE LOS PRINCIPALES CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE RAÍCES DE *Echinacea purpurea* Y *E. angustifolia* PRODUCIDAS EN COSTA RICA¹

Jorge Loaiza, Roberto Valverde^{2/*}, Gerardo Rodríguez^{**}, Jorge Molina^{***}

Palabras clave: *Echinacea* sp, fenilpropanoides, alcanmidas.

Keywords: *Echinacea* sp, phenylpropanoids, alkamides.

Recibido 29/04/04

Aceptado 03/08/04

RESUMEN

Se cuantificó los fenilpropanoides libres: ácido clorogénico y ácido cichórico, glicosídicos (equinacósido); así como las alcanmidas presentes en extractos de raíces de las plantas medicinales *Echinacea purpurea* y *E. angustifolia*, producidas en 3 localidades de Costa Rica: Los Santos a 1650 msnm, Santa Bárbara de Heredia a 1250 msnm y Ojo de Agua a 850 msnm. Conforme disminuyó la altitud de las zonas de siembra, también disminuyó la concentración de los metabolitos analizados. La concentración de los fenilpropanoides y del equinacósido (sintetizado exclusivamente por *E. angustifolia*) producidos en Costa Rica, fue 100 y 34% mayor, respectivamente, que la concentración reportada para una muestra control proveniente de EE.UU. Las alcanmidas se produjeron en un rango de 0,89-2,31% comparado con 0,004-0,36% reportado en EE.UU. En Costa Rica la presencia de alcanmidas fue similar para las 3 zonas en estudio. Sin embargo, 2 de ellas presentaron un grado de isomerismo diferente al reportado en muestras de EE.UU. Estos resultados indican que en condiciones tropicales, no solo se puede producir

ABSTRACT

Quantitative analyses of the main chemical constituents in the roots of *Echinacea purpurea* and *E. angustifolia* produced in Costa Rica. Free phenylpropanoids (chlorogenic and cichoric acids), and a glycosidic (echinecoside), as well as the alkamides, present in root extracts of the medicinal plants *Echinacea purpurea* and *E. angustifolia* produced in 3 different locations of Costa Rica (Los Santos at 1650 masl, Santa Bárbara de Heredia at 1250 masl and Ojo de Agua at 850 masl) were quantified. Results showed a decrease on secondary metabolites associated to an altitude reduction of the growing zone. Concentration of free phenylpropanoids and the echinecoside (produced exclusively for *E. angustifolia*) were 100 and 34 % higher than the concentration reported for a standard sample from U.S.A. Alkamides concentration ranged from 0.89-2.31%, as compared to 0.004-0.36% reported from U.S.A. The alkamides produced in Costa Rica were similar in the 3 growing zones. In addition, 2 of them showed different isomerism than the ones reported in samples from U.S.A. These results indicate that in tropical

1/ El trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor. Programa de estudios de posgrado en Sistemas de Producción Agrícola Tropical Sostenible. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

* Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

** Laboratorio de Biodiversidad, Escuela de Química, Universidad Nacional, Costa Rica.

*** Laboratorio de Fitobioquímica, Cinvestav, Irapuato, México.

Echinacea en un menor tiempo, sino también que las cantidades de metabolitos secundarios son mayores a las producidas por la planta en sus áreas de origen. La presencia de compuestos con diferente grado de isomerismo podría presentar nuevas alternativas de uso de esos metabolitos.

INTRODUCCIÓN

Echinacea sp. conocida en los Estados Unidos como “purple coneflower, coneflower y black sampson”, es una de las plantas medicinales de mayor importancia en el mercado de hierbas Europeo, Canadiense y de los Estados Unidos; está entre las más vendidas como medicina herbolaria, representando un 9,9% de la industria de las hierbas medicinales (Rawls 1996). Son plantas nativas del Norte de América, que han sido usadas por años por los indígenas con propósitos medicinales.

Diferentes partes de la planta son usadas externamente contra las picaduras de insectos, mordeduras de serpiente y quemaduras (Busing 1952, Hill *et al.* 1996), e internamente para la tos, el resfrío, el dolor de garganta, las infecciones respiratorias crónicas e inflamaciones (Hobbs 1989, 1994, Leung *et al.* 1996). También se ha confirmado la actividad inmunoestimuladora, antiviral y antibacteriana de *E. angustifolia* en humanos (Bauer y Foster 1991, Bodinet y Beuscher 1991, Bodinet *et al.* 1993). Extractos de *Echinacea* han sido también usados en medicina veterinaria para aumentar la fertilidad de hembras bovinas (Fischer 1976), en el tratamiento de la mastitis (Otto 1982) y enfermedades respiratorias en caballos (May 1994, Wolter 1997). Además, se ha demostrado que las alcamidas presentes en *Echinacea* sp. tienen actividad insecticida, habiéndose demostrado mayor actividad contra *Musca* sp que algunas piretrinas (Jacobson 1954, Crombie y Krasinki 1962).

Los principales metabolitos secundarios identificados en diferentes partes de la planta incluyen alcaloides (Hobbs 1994); alcamidas (Perry *et al.* 1997, Schulthess *et al.* 1991);

condiciones not only is it possible to produce *Echinacea*, but also that the amount of metabolites is higher than those produced in the *Echinacea*'s origin areas. The presence of compounds with different isomerism could provide an alternative use for those metabolites.

polisacáridos (Bauer y Wagner 1991, Bonadeo *et al.* 1971); poliacetilenos (Bauer *et al.* 1988, Schulte *et al.* 1967); flavonoides (Bauer y Wagner 1991, Christ y Muller 1960); fenilpropanoides (libres y glicosilados) (Bauer y Foster 1991, Hobbs 1989, Stoll *et al.* 1950); y aceites esenciales (Delabays y Slacanin 1995).

Las 2 especies de *Echinacea* más cultivadas mundialmente son *E. purpurea* (80%) y *E. angustifolia* (20%), que también son plantadas como ornamentales en jardines y producidas comercialmente como flores de corta (Starman *et al.* 1995).

En Costa Rica, durante los últimos 10 años se ha venido incrementando la siembra de *E. purpurea* y *E. angustifolia*, presentándose amplias expectativas para su producción a gran escala; dado el tiempo tan corto en que la planta completa su ciclo, 12 meses, comparado con 36 en EE.UU., el alto precio que se paga por las raíces (\$10-\$40 kg⁻¹) y por las hojas (\$1-\$2 kg⁻¹) que son producidas para exportación.

Sin embargo, la falta de estudios sobre la adaptabilidad del cultivo, la productividad y la calidad del producto; han ocasionado que algunas siembras fueron establecidas en zonas ubicadas a menos de 1500 msnm, afectando principalmente la acumulación de los principales metabolitos secundarios, esto ha causado una baja calidad del producto, lo cual es un inconveniente para la comercialización.

Por tal motivo, se planteó como objetivo principal de esta investigación identificar y cuantificar los principales metabolitos secundarios, mediante la caracterización química de las raíces de *Echinacea* sp. producida en 3 diferentes zonas de Costa Rica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectó material vegetal de 12 meses de edad, producido en 3 localidades de Costa Rica: la primera ubicada en la zona de los Santos en San Pablo de León Cortés a 1650 msnm; la segunda en la zona de Santa Bárbara, en San Pedro de Heredia a 1250 msnm; y la tercera en Belén, en Ojo de Agua a 850 msnm. El material vegetal fue identificado en el herbario Juvenal Valerio de la Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad Nacional, en donde se depositó un ejemplar de cada especie.

Preparación y extracción de las raíces

Un kilogramo de raíces de cada especie fue seccionado a $\pm 2,5$ cm y luego secado en un horno con circulación de aire a 45°C por 3 días. Posteriormente, el material seco fue molido utilizando un molino de martillos con una malla de 6 mm. Una muestra de 300 g de este material fue macerada con una mezcla 80:20 de etanol al 95%: agua, la muestra se mantuvo en la mezcla por 2 semanas, al final de las cuales se filtró y el sólido fue nuevamente macerado. Después de realizar 3 maceraciones, el extracto hidroalcohólico fue concentrado en un evaporador rotativo a presión reducida y 45°C, obteniéndose 1,5 litros de extracto concentrado.

Detección y fraccionamiento de los metabolitos secundarios

Con el uso de cromatografía de capa fina (CCF) se verificó, en el extracto concentrado, la presencia de los principales metabolitos: Fenilpropanoides libres como el ácido clorogénico y el ácido cichórico; el equinacósido que es un fenilpropanoide glicosilado y las alcanidas. Un tercio (500 ml) del extracto hidroalcohólico concentrado, preparado inicialmente, fue extraído con disolventes de diferente polaridad: hexano, diclorometano, acetato de etilo, obteniéndose 4 fracciones, las cuales fueron concentradas en el evaporador rotativo a presión reducida y 45°C. Posteriormente, mediante CCF analítica y

cromatografía de columna (CC), se purificó y aisló los diferentes metabolitos secundarios: alcanidas, de la fracción hexánica, los fenilpropanoides libres de la fracción de diclorometano; y un fenilpropanoide glicosilado de las fracciones de acetato de etilo y el remanente acuoso.

Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La detección y cuantificación de los fenilpropanoides libres y del fenilpropanoide glicosilado, se realizó por medio de un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HP 1090 A), con un detector de arreglo de diodos (HP 1040 A) y un sistema integrador (HP 3392 A), todos de la marca Hewlett® Packard). Fue utilizada además, una columna Hibar 125-4, Merck, Darmstadt LiChrospher 100 C₁₈ (5µm). Los fenilpropanoides fueron separados utilizando un gradiente lineal de fase móvil (20 min) de un 5% de acetonitrilo agua⁻¹ hasta un 25% de acetonitrilo. El flujo fue de 1,0 ml min⁻¹. Además, la fase móvil contenía un 1% (v/v) de ácido fosfórico 0,1 N., para lograr una mejor resolución de los picos presentes en el cromatograma. La separación fue monitoreada a 330 nm. El volumen inyectado fue de 10 µl de muestra.

Análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS)

Debido a su volatilidad, la determinación de alcanidas se realizó por GC-MS. El equipo analítico consistió de un sistema HP 6890 (Hewlett® Packard). Se empleó una columna capilar Crosslinked Methyl Siloxane de 0,25 µm de diámetro interno, HP 19091S-933, con una temperatura inicial de 150°C y una final de 325°C; con un tiempo inicial de 3 min y un gradiente de 4°C min⁻¹, para un tiempo total de corrida de 60 min. El gas de arrastre fue helio grado cromatográfico a una presión de 13 psi. Se utilizó un detector de masas selectivo No. 5973 y una computadora Vectra Xa de Hewlett® Packard. Se realizó 3 lavados post-inyección de la jeringa con etanol y 3 con alcohol isopropílico antes de la inyección de la muestra. El volumen de inyección fue de 1 µl. Las alcanidas fueron

identificadas según los tiempos de retención y los espectros de masas de los picos obtenidos en los cromatogramas, comparados con los obtenidos con las disoluciones de sustancias puras, previamente analizados y almacenados en una base de datos. La cuantificación se realizó con el método de estándar externo empleando patrones en rango de concentración de 0-1,5% en peso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de extractos de *E. purpurea*

En el cuadro 1 se muestra los porcentajes de ácido clorogénico y ácido cichórico presentes en muestras representativas de 3 zonas de producción de esta especie en Costa Rica. La mayor concentración fue de 5,16% y se obtuvo en la zona de los Santos (1500 msnm.), la muestra contiene 1,12% más ácido clorogénico y cichórico que la muestra reportada de EE.UU. También el cuadro 1 presenta como la concentración de estos metabolitos disminuye drásticamente en las otras 2 zonas evaluadas, con 3,23 % para Santa Bárbara y 0,82 % para Ojo de Agua. Podrían ser múltiples las causas que provocaron este comportamiento; sin embargo, la altitud es considerada como una de las principales variables que estaría afectando la acumulación de estos metabolitos. Lo anterior podría deberse a problemas de adaptabilidad del cultivo, dado que *Echinacea* sp. es una planta C₃ que necesita hábitats aptos para que pueda realizar un proceso fotosintético normal. El hábitat

natural de esta planta, se encuentra a altitudes iguales o mayores a los 1500 msnm.

Por lo que se podría esperar que conforme disminuya la altitud del lugar de cultivo, condiciones climáticas como la temperatura y la luminosidad varíen, con lo cual, esta planta reduce su capacidad fotosintética y aumenta la fototranspiración (Delabays y Scalamin 1995), lo cual conduce a una menor acumulación de fotoasimilados y por ende a una disminución de la concentración de los metabolitos secundarios.

En el cuadro 2 se presenta los tipos y porcentajes de las alcanidas identificadas en muestras representativas de las 3 zonas productoras de Costa Rica, en comparación con los tipos reportados en una muestra de EE.UU. Los resultados indican que en las muestras de Costa Rica solo se detectaron 3 tipos de alcanida en comparación con las 12 presentes en la muestra estándar de EE.UU. Más aún, 2 de las 3 alcanidas encontradas en las muestras de Costa Rica presentan un patrón de isomerismo (2E,4E) (2E,4Z) y (2E, 4Z,8Z,10E) diferente al reportado por Bauer *et al.* (1988, 1989).

La concentración de alcanidas encontrada en las muestras de Costa Rica fue de $2,31 \pm 0,02\%$ para la zona de los Santos, $1,12 \pm 0,02\%$ para Santa Bárbara y $1,73 \pm 0,02\%$ para Ojo de Agua, en comparación con $0,004-0,039\%$ reportado para muestras estándar de EE.UU., $0,013-0,102\%$ para muestras de Australia y $0,08-0,36\%$ para muestras de Nueva Zelandia (Rogers *et al.* 1998). Aún cuando la cantidad de alcanidas encontrada en las plantas producidas en Costa Rica fue mayor que la reportada para *E. purpurea*

Cuadro 1. Contenido de fenilpropanoides libres en muestras de *Echinacea purpurea* provenientes de 3 zonas altitudinales de Costa Rica. (% por peso seco de raíz).

Metabolito	EE.UU. ^a (%)	Costa Rica ^b (%)		
		Los Santos (1650 msnm.)	Santa Bárbara (1250 msnm)	Ojo de Agua (850 msnm.)
Ácido clorogénico	0,56±0,02 ^c	1,15±0,03	0,77±0,03	0,66±0,03
Ácido cichórico	3,48±0,02	4,01±0,03	2,46±0,03	0,16±0,03
Total	4,04±0,02	5,16±0,03	3,23±0,03	0,82±0,03

^a Ver Rogers *et al.* 1998.

^b Promedio de 3 repeticiones.

^c Datos ± error estándar

Cuadro 2. Contenido de alcanmidas en muestras de *Echinacea purpurea* provenientes de 3 zonas altitudinales de Costa Rica. (% por peso seco de raíz).

Alcanmida	Los Santos ^a (1650 msnm) %	Santa Bárbara ^a (1250 msnm) %	Ojo de Agua ^a (850 msnm) %
Olefínica			
1. (M)N-Isobutil-(2E,4Z,8Z,10E)- dodecatetraenamida	0,592±0,01 ^b	0,742±0,02	0,749±0,01
Acetilénica			
2. (M)N-Isobutilundeca-(2E,4E)- dieno-8,10-diamida	1,050±0,02	0,066±0,01	0,526±0,02
Acetilénica			
3. (M)N-(2-Metilbutil) undeca- (2E,4E)-dieno-8,10-diamida	0,673±0,03	0,311±0,03	0,451±0,03
TOTAL	2,315±0,02	1,12±0,02	1,73±0,02

Según Rogers *et al.* 1998, las alcanmidas reportadas en EE.UU. son: Undeca, dodeca, Isobutil y Metilbutil amidas. Olefínicas y acetilénicas. Cuyos grados de isomerismo son:

(2E, 4Z),(2Z, 4E),(2E-4E, 8Z, 10Z),(2E-4E, 8Z, 10E)

^aPromedio de 3 repeticiones ^bDatos ± error estándar

creciendo en otras partes del mundo, esta cantidad pudo ser todavía mucho mayor; sin embargo, ha sido informado que la determinación de alcanmidas, en este tipo de planta, podría verse afectada por las condiciones de manejo de la muestra en el laboratorio, entre las que se puede mencionar el seccionado, el secado, la extracción y el tipo de solventes utilizados; además, de los periodos de almacenamiento de los extractos, lo cual provoca la formación de compuestos extraños y la pérdida de ciertas alcanmidas ya formadas (Rogers *et al.* 1998).

Contenidos altos de alcanmidas son muy deseables debido no solo al efecto positivo de estos compuestos sobre el sistema inmunológico en seres humanos, sino también por su actividad insecticida contra la mosca doméstica (*Musca domestica* L.) (Greger 1984).

Análisis de extractos de *E. angustifolia*

La zona de los Santos fue donde se obtuvo la mayor producción de metabolitos, por tal motivo se determinó la cantidad de los metaboli-

tos en una muestra representativa de esta zona y se comparó con los datos reportados de una muestra estándar proveniente de EE.UU. Se observó que en la zona de los Santos la acumulación promedio de los ácidos clorogénico y cichórico y del equinacósido fue 100% y 25% mayor, respectivamente, que la de EE.UU. (Cuadro 3). Estos resultados corroboran que las condiciones climáticas, a la altura que se encuentra la zona de los Santos, son propicias para la producción de fenilpropanoides en alta cantidad tanto de *E. purpurea* como de *E. angustifolia*. Cabe resaltar que el interés de cultivar ambas especies de *Echinacea* en Costa Rica obedece a que *E. angustifolia* produce, en adición a los metabolitos encontrados en *E. purpurea*, un equinacósido, el cual presenta una comprobada actividad inmunoestimuladora en los seres humanos (Bauer y Wagner 1991). En este sentido la zona de los Santos no solo produce mayor cantidad del equinacósido en comparación con EE.UU. sino que de las 3 zonas evaluadas en Costa Rica esta es la única donde la planta lo sintetiza (datos no mostrados).

Cuadro 3. Contenido de fenilpropanoides en una muestra de *Echinacea angustifolia*, representativa de la zona los Santos, Costa Rica. (% por peso seco de raíz).

Fenilpropanoides	EE.UU. ^a %	Zona de los Santos ^b (1650 msnm.) %
Ácido clorogénico	0,03%±0,01 ^c	0,21%±0,05
Ácido cichórico	0,18%±0,01	0,21%±0,05
Equinacósido	1,40%±0,01	1,87%±0,05

^a Ver Rogers *et al.* 1998

^b Promedio de 3 repeticiones.

^c Datos ± error estándar

En el cuadro 4 se presenta las 3 alcalmidas identificadas en una muestra representativa de la zona de los Santos, al igual que en el caso de *E. purpurea*, se encontró que de los 3 tipos de alcalmida, 2 de ellas presentan un patrón de isomerismo (2E,4E) y (2E, 4Z,8Z,10E), diferente al reportado por Bauer *et al.* (1988).

Cuadro 4. Contenido de alcalmidas en una muestra de *Echinacea angustifolia*, representativa de la zona de los Santos, Costa Rica. (% por peso seco de raíz).

Alcalmida	Zona de los Santos ^a (1650 msnm) %
Olefínica	
1. (M)N-Isobutil-(2E,4Z,8Z,10E)-dodecatetraenamida	0,646±0,01 ^b
Acetilénica	
(2): (M)N-Isobutilundeca-(2E,4E)-dieno-,8,10-diinamida	0,109±0,02
Acetilénica	
(3): (M)N-Metilbutilundeca-(2E,4Z)-dieno-,8,10-diinamida	0,135±0,03
TOTAL	0,89±0,02

Según Rogers *et al.* 1998, Las 15 alcalmidas reportadas en EE.UU. son:

Undeca, dodeca, Isobutil y Metilbutil amidas. Olefínicas y acetilénicas cuyos grados de isomerismo son: (2E, 4Z),(2Z, 4E),(2E-4Z, 8Z, 10Z),(2E-4Z, 8Z, 10Z)

^a Promedio de 3 repeticiones.

^b Datos ± error estándar

La cantidad de alcalmidas encontrada en la muestra de Costa Rica fue de 0,89±0,02% en comparación con 0,12±0,02% para muestras de EE.UU. y 0,06±0,02% para muestras de Australia (Rogers *et al.*, 1998). Estos resultados corroboran una vez más el gran potencial de la zona de los Santos como región productora de *Echinacea* sp. de alta calidad. Nuevamente, los datos sobre la acumulación de alcalmidas, podrían estar influenciados por las condiciones de manejo de la muestra tal y como se comentó para el caso de *E. purpurea*.

En resumen se obtuvo que los contenidos de metabolitos secundarios producidos tanto en *Echinacea purpurea* como en *E. angustifolia*, en condiciones de Costa Rica, son mayores que los reportados en los EE.UU., de donde es originaria esta planta. Se encontró que *E. angustifolia*, además produce un equinacósido que no sintetiza *E. purpurea* y que es de suma importancia por ser uno de los principales compuestos para mejorar el sistema inmunológico de los seres humanos. También es importante resaltar que en el caso de las alcalmidas aunque solo se encontró 3 en comparación con 12 reportadas en EE.UU., 2 de ellas presentan diferente grado de isomerismo, esta característica es importante evaluarla con más detalle pues podría modificar el efecto del metabolito. En general, las condiciones tropicales que ofrece Costa Rica al cultivo de esta especie no solo reducen el tiempo en que la planta completa su ciclo de vida, sino que también ofrecen la posibilidad de cultivarla en zonas donde la altura y el clima brindan condiciones muy favorables para aumentar la cantidad de los metabolitos de interés, tal es el caso de la zona de los Santos a 1500 msnm.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Molina y sus colaboradores, por el apoyo brindado durante la pasantía que se realizó en su laboratorio en el CINVESTAV, México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICIT) por el apoyo financiero otorgado para realizar parte de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- BAUER R., KHAN I.A., WAGNER H. 1988. TLC and HPLC analysis of *Echinacea pallida* and *E. angustifolia* roots. *Planta Médica* 54:426-430.
- BAUER R., REMIGER P., WAGNER H. 1989. Alkamides from the roots of *Echinacea purpurea*. *Phytochemistry* 27:2339-2342.
- BAUER R., WAGNER H. 1991. *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs. *Econ. Medicinal Plant Res.* 5:253-321.
- BAUER R., FOSTER S. 1991. Analysis of alkamides and caffeic derivatives from *Echinacea simulata* and *E. paradoxa* roots. *Planta Médica* 57:447-449.
- BONADEO I., BOTTAZI G., LAVAZZA, M. 1971. Echinacin B: Active polysaccharide of the *Echinacea*. *Riv. Ital. Essenza. Profumi. Piante.* 53:281-295.
- BODINET C., BEUSCHER N. 1991. Antiviral and immunological activity of glycoproteins from *Echinacea purpurea* Radix. *Planta Médica* 57: 33-34.
- BODINET C., WILLIGMANN I., BEUSCHER N. 1993. Host-resistance increasing activity of root extracts from *Echinacea* species. *Planta Médica* 59:672-673.
- BUSING K. 1952. Hyaluronidasehemmung durch echinacin. *Arzneim Forsch.* 2:467-469.
- CHRIST B., MULLER K.H. 1960. Zur serienmabigen bestimmung dess gehhaltes an flavonol-derivaten in drogen. *Arch. Pharm.* 293:1033-1042.
- CROMBIE L., KRASINKI A. 1962. Synthesis of N-isobutyrlundeca-trans-2, cis-6, trans-8 and trans-2, cis-6, cis-8-trienamide. *Chemistry and Industry* 2:983-984.
- DELABAYS N., SLACANIN I. 1995. Domestication and selection of new plant species of interest to the cosmetics industry. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* 27:143-147.
- FISHER K.D. 1976. Experiments to improve the fertility results of heifers with Echinacin (extract of *Echinacea purpurea*). Thesis, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- GREGER H. 1984. Alkamides: structural relationships, distribution and biological activity. *Planta Médica* 50:366-375.
- HILL N., STAM C., Van HASELEN R.A. 1996. The efficacy of prikweg R. gel in the treatment of insect bites: A double-blind, placebo controlled clinical trial. *Pharmacy World Sci.* 18:35-41.
- HOBBS C.R. 1989. The *Echinacea* handbook. Capitola: Botanica Press. 78 p.
- HOBBS C.R. 1994. *Echinacea*. A literature review. *Herbalgram* 30:33-49.
- JACOBSON M. 1954. Ocurrence pungent insecticidal principles in American coneflower roots. *Science* 120: 1028-1029.
- LEUNG A.Y., FOSTER S. 1996. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. Wiley. p. 216-219.
- MAY T. 1994. Treatment of chronic bronchitis in horse with "mucosa compositum" and "*Echinacea compositum*". *Biologische Tiemedizin* 11:93-97.
- OTTO H. 1982. Experiences with homeopathic treatment of acute parenchymatous mastitis in cows. *Tierärztliche Umschau* 37:732-734.
- PERRY N.B., Van KLIK J.W., GURGESS E.J. 1997. Alkamide levels in *Echinacea purpurea* (L.) Moench. A rapid analytical method revealing differences among roots, rhizomes, stems, leaves and flowers. *Planta Médica* 63:58-62.
- RAWLS R. 1996. Europe's strong herbal brew. *Chemical & Engineering News*, sept. 23, 1996. p.53-60.
- ROGERS K.L., GRICE I.D., MITCHEL C.J., GRIFFITHS L.R. 1998. High performance liquid chromatography determined alkamides in Australian-grown *Echinacea* spp. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38:403-408.
- SCHULTE K.E., RUECKER G., PERLICK J. 1967. The presence of polyacetylene compounds in *Echinacea purpurea* and *E. angustifolia*. *Arzneim Forsch.* 17:825-829.
- SCHULTESS B.H., GIGER E., BAUMANN T.W. 1991. *Echinacea*: anatomy, phytochemical pattern, and germination of the achene. *Planta Médica* 57:384-388.
- STARMAN T.W., CERNY T.A., MacKENSIE A.J. 1995. Productivity and profitability of some field grown special cut flowers. *Hort Science* 30:1217-1220.
- STOLL A., RENZ J., BRACK A. 1950. Antibacterial substances II. Isolation and constitution of echinacoside, a glycoside from the roots of *Echinacea angustifolia*. *Helv. Chim. Acta* 33:1877-1893.
- WOLTER H. 1997. Homeopathic therapy of respiratory diseases, especially in the horse. *Praktische Tierarzt.* 58:558-564.