

Cromatografía en Fase Gaseosa y Acción Farmacodinámica de los Compuestos Volátiles del "Mataojo" (*Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk.)

Amalia GASPARRI de VAZQUEZ¹, Marta NAJERA², Gabriela SALA³, Osvaldo BALDINI⁴, Eloy MANDRILE³ y Lázaro F. R. CAFFERATA^{1*}

Laboratorio de Farmacognosia³ y Cátedras de Química Orgánica I¹, Farmacobotánica² y Farmacodinamia⁴, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 esq. 115, (1900) La Plata, Argentina.

RESUMEN. Se ha efectuado el análisis por cromatografía gaseosa de los componentes volátiles de hojas y tallos frescos del "mataojo" (*Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk.), comparándose las eficiencias de los métodos de extracción por destilación por arrastre con vapor de agua y de muestreo estático de la cámara ocupada por el vapor en equilibrio con el material ("Headspace Analysis", HSA) a 80 ± 2 °C. Se utilizaron una columna rellena con "Porapak Q" y otra capilar de sílice fundida con metilsilicona como fase estacionaria. La retención cromatográfica de los componentes volátiles fue expresada por medio de diagramas (perfiles cromatográficos), que constituirían una forma apropiada para diferenciar material proveniente ya sea de hojas como de tallos del mismo vegetal. Tanto el residuo seco del extractivo bencénico como el destilado de hojas frescas de *Pouteria salicifolia* poseen componentes con efectos histaminérgicos: producen irritación de la conjuntiva y broncoespasmo en cobayos, hipotensión en conejos y tienen acción espasmódica sobre íleon distal de cobayo, efectos que son bloqueados por la acción del clorhidrato de difenhidramina.

SUMMARY. "Gas Chromatographic Analysis and Pharmacodynamic Action of Volatile Compounds of "Mataojo" (*Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk.)." The volatile components of fresh leaves and stems of "mataojo" (*Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk.) have been studied to contribute to their gas-chromatographic characterization. Efficiencies of the following methods of separation employed were evaluated: steam distillation and Static Headspace Analysis (HSA) at 80 ± 2 °C. A packed column of "Porapak Q", and a silica fused capillary column with methylsilicone as stationary phase were employed for the analysis by gas chromatography. The retention data corresponding to the volatile compounds were represented by means of chromatographic profiles, which would constitute a suitable way to differentiate leaves and stems of the same vegetal. Both the residue of the benzenic extractive as the distillate obtained from leaves of *Pouteria salicifolia* shows a definite histaminergic action: causes eye irritation and bronchial spasm in guinea pigs, arterial hypotension in rabbits, and spasmodic action on guinea pig distal ileon, all the effects being counteracted by difenhydramine chlorhydrate.

* autor a quien dirigir la correspondencia

PALABRAS CLAVE: *Pouteria salicifolia*, "mataojo", Componentes volátiles, Acción histaminérgica, Static Headspace Analysis.

KEY WORDS: *Pouteria salicifolia*, "mataojo", Volatile components, Histaminergic action, Headspace Analysis.

INTRODUCCION

Pouteria salicifolia (Spreng.) Radlk. (Sapotaceae), n.v.: "matajojo", es un árbol que forma parte de la flora del litoral fluvial de las Provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Corrientes y Misiones (Argentina), como así también de algunas regiones del Paraguay, Brasil y de la República Oriental del Uruguay.

En 1919 Domínguez *et al.* consignan la presencia de peroxidasas ¹. Con posterioridad, Meyer describió detalladamente las características morfológicas de la planta y sus partes constitutivas ². Por otra parte, informaciones provenientes de la etnobotánica y de la práctica oftalmológica dan cuenta de que los obreros encargados de su desmonte acusan frecuentes síntomas irritativos en sus ojos, probablemente causados por emanaciones provenientes de los cortes practicados en el vegetal. Ya en el año 1882 Hieronymus ³ informó que el humo que se producía al quemar la madera de ese vegetal dañaba los ojos, dato que fue posteriormente corroborado por Burkart ⁴ en conversaciones mantenidas con nativos de nuestro delta paranaense.

En Paraguay se considera que el látex del "matajojo" produce ceguera, lo que justifica su nombre vulgar. Sin embargo, en el sur de Brasil su corteza se emplea en medicina folklórica, reconociéndosele efectos hemostáticos y en la disentería, probablemente por su contenido en taninos; además, pobladores de las Provincias de Santa Fe y de la Mesopotamia argentina lo utilizan como cicatrizante. Sin embargo, no se han caracterizado hasta el presente los componentes volátiles de este vegetal, que a temperaturas cercanas a la ambiente podrían ser las responsables de la mencionada acción irritativa.

En nuestro país los miembros de la familia *Sapotaceae*, comúnmente caracterizados por la presencia de látex en sus hojas y tallos, están representados por árboles o arbustos que viven cercanos a ríos y arroyos, cultivándose los como ornamentales. En la Argentina crecen tres especies de *Pouteria*, de las cuales en el presente trabajo se han estudiado los componentes volátiles de *Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk. por cromatografía gaseosa, ensayándose también su acción histamínica, en razón de la mencionada acción irritativa.

MATERIAL Y METODOS

Material Vegetal

Se emplearon hojas y tallos de *Pouteria salicifolia* obtenidos de plantas en estado vegetativo, recogidas en el sur de la Provincia de Entre Ríos durante el período enero-marzo de 1989. El material fue comparado para su identificación con ejemplares del Herbario del Museo de Botánica y Farmacognosia "Carlos Spegazzini" de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, donde se depositaron duplicados del mismo.

Las hojas y los tallos fueron desecados en estufa con circulación de aire a 38-40 °C. Luego las hojas se molieron hasta llegar a una granulometría final semejante a la de la yerba mate doméstica y los tallos (diám. ca. 8-9 mm) se cortaron en trozos (long. ca. 3-4 cm).

Métodos de extracción y de análisis de los componentes volátiles

Destilación por arrastre con vapor de agua

En este caso se efectuó una posterior extracción de la fase acuosa resultante con solventes de distintas características fisicoquímicas (benceno, n-hexano y acetato de etilo). Asimismo se realizó la extracción de los componentes volátiles utilizando un dispositivo de vidrio Pyrex ⁵ (Figura 1), el cual permitió en una única operación (que no demanda más de 1 hora de trabajo) destilar por arrastre con vapor de agua y extraer simultáneamente con un solvente apropiado (ca. 0,2 ml) componentes de la muestra del material analizado (ca. 500 mg).

En este caso el líquido extractante tiene que poseer una densidad menor que la del agua y su tiempo de retención como así también de sus impurezas presentes como trazas, en las condiciones de los análisis cromatográficos que se realicen con posterioridad, no conviene que sea cercano al de ninguno de los componentes volátiles del vegetal, ya que estos se encuentran presentes en concentraciones relativamente muy bajas. Además, el funcionamiento de este dispositivo requiere la circulación de agua a 3-4 °C, lo cual contribuye a la eficiencia de recuperación de los componentes volátiles del material estudiado.

Los extractos de los componentes volátiles en los solventes orgánicos utilizados, una vez secados sobre carbonato de potasio, fueron analizados utilizando una columna de sílice fundida (long. 30 m; d.i. 0,25 mm), con metilsilicona como fase estacionaria, en un cromatógrafo marca Hewlett-Packard, modelo 5840 A, en las siguientes condiciones operativas:

- Programación de temperatura de columna: inicial: -20 °C (18 min), + 10 °C / min hasta 130 °C (20 min)
- Temperatura del inyector: 180 °C ("quartz liner", d.i.: 1,5 mm).
- Modo operativo: "on column, split mode (1/100), stop flow 30 s."
- Temperatura del detector (FID): 300 °C
- Gas portador: nitrógeno; presión: 40 psi; caudal: 0,2 cm³/min.

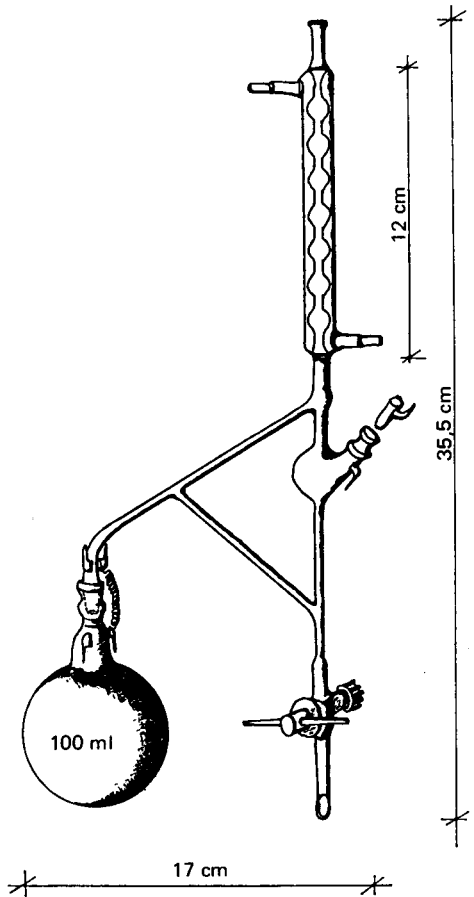


Figura 1. Esquema del dispositivo utilizado para efectuar la destilación por arrastre de hojas de *Pouteria salicifolia* ("mataojo") en presencia de solventes ⁵.

Extracción y análisis de los componentes volátiles mediante muestreo del espacio vapor en equilibrio con el material vegetal ("Static Headspace Analysis", HSA) ⁶ a $80 \pm 2^\circ\text{C}$

La técnica ya ha sido descrita en un trabajo anterior ⁷. Se utilizó a este fin el cromatógrafo ya mencionado pero provisto de una columna de acero inoxidable de 1,80 m de longitud y 1,25 mm de diámetro interno, rellena con "Porapak Q, tamiz 80/100 (Waters Associates, Inc.), material constituido por un polímero poroso apropiado para el análisis de muestras que contienen vapor de agua. En este caso las condiciones de los análisis cromatográficos en fase gaseosa de las hojas y tallos de *P. salicifolia* fueron las siguientes:

Temperatura de la columna (isotérmica): 130°C

Temperatura del inyector: 180°C ("quartz liner", 1,5 mm d.i.)

Temperatura del detector (FID): 300°C

Gas portador: nitrógeno; presión: 40 psi; caudal: $15\text{ cm}^3/\text{min}$.

Ensayos Farmacodinámicos *in vivo* ⁸

Instilación en la conjuntiva ocular del cobayo

A un cobayo al que previamente se le cortaron los párpados, se le instiló en un ojo una gota de la solución resultante de disolver el residuo seco del extractivo bencénico, llevado a sequedad a presión reducida (rotavapor) y retomado con solución fisiológica (NaCl 0,85 %); en el otro ojo se instiló una gota de solución fisiológica como ensayo de referencia. A otro cobayo, también con el párpado cortado, se le instiló en la conjuntiva una gota de solución acuosa (concentración: $10\text{ }\mu\text{g/ml}$) de clorhidrato de difenhidramina (Sigma), dejándose actuar durante 5 minutos y luego se instiló una gota del mismo extractivo vegetal. El otro ojo fue también instilado, como control, con solución fisiológica.

Nebulización (aerosol)

A un cobayo ($250 \pm 10\text{ g}$ de peso) colocado en una cámara (figura 2), se lo sometió a nebulización con el extractivo del vegetal en solución fisiológica empleando una corriente de aire hasta que se observaba dificultad respiratoria, con movimientos diafragmáticos espasmódicos. A otro cobayo del mismo peso se le inyectó por vía intraperitoneal 1 ml de una solución de clorhidrato de difenhidramina ($5\text{ }\mu\text{g/ml}$); la droga se dejó actuar durante 30 min. para asegurar su fijación en el sitio de acción (receptores H1 bronquiales), y posteriormente se sometió al animal a los efectos del aerosol que contenía el extractivo del vegetal.

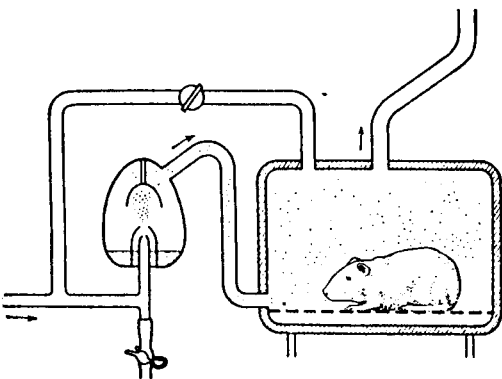


Figura 2. Esquema de la cámara para nebulización utilizada.

Registro de la presión arterial en conejos

A fin de determinar si el extractivo en estudio producía modificaciones tensionales se procedió al registro de la presión arterial en conejos de 2000 ± 100 g de peso. Los animales se anestesiaron con uretano (carbamato de etilo, Sigma) a razón de 1 g/kg por vía intraperitoneal (dosis de inducción y de mantenimiento). Por su carótida se inyectó luego una solución (5 mg/kg) de heparina como anticoagulante, conectándose a través de un transductor de presión a un polígrafo (Beckman R-511), para determinar variaciones tensionales. Por la vena yugular se inyectaron sucesivamente: 0,1 ml de extractivo del vegetal en solución fisiológica (dilución 1:2), 0,1 ml del mismo extractivo sin diluir, 0,1 ml de solución de diclorhidrato de histamina (0,5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma), 0,1 ml de solución de clorhidrato de difenhidramina (5 $\mu\text{g/ml}$), 0,1 ml de extractivo vegetal sin diluir y 0,1 ml de una solución de clorhidrato de histamina (0,5 $\mu\text{g/ml}$).

Ensayos farmacodinámicos *in vitro* ⁹

Puesto que las sustancias con actividad histaminérgica producen estímulo de la musculatura lisa del íleon distal del cobayo, se empleó este reactivo biológico para ensayar la acción del extractivo de *Pouteria salicifolia*.

Una porción (3 cm) de íleon distal de cobayo se colocó en una caja de Petri conteniendo solución Tyrode a 37 °C, previa limpieza de la luz intestinal por eliminación de su contenido. Luego se seccionó un trozo de 3 cm, montándose en un baño de órganos aislados que contenía solución Tyrode ($37 \pm 0,5$ °C), aireada con burbujeo continuo. Un extremo del trozo de intestino se fijó en la parte inferior de la cuba termostatzada mientras que el otro extremo por medio de un hilo se ligó a una palanca inscriptora para registrar los movimientos intestinales en tambor ahumado impulsado por un quimógrafo eléctrico (marca Harvard, Figura 3). La palanca inscriptora fue sobrecargada con 1 g (media hora) a fin de estabilizar el preparado.

La velocidad del instrumento fue de 5-10 mm/min. Luego de registrarse el trazado normal (movimientos pendulares), se agregaron sucesivamente a la cuba: 0,1 ml de diclorhidrato de histamina (5 $\mu\text{g/ml}$), 0,1 ml del extractivo de *Pouteria salicifolia*, 0,15 ml del mismo extractivo, 0,1 ml de difenhidramina (10 $\mu\text{g/ml}$), 0,1 ml de extractivo vegetal, 0,15 ml del mismo extractivo y finalmente 0,1 ml de diclorhidrato de histamina (5 $\mu\text{g/ml}$). Entre el agregado de una u otra solución, el preparado fue lavado 3 veces con solución Tyrode a 37 °C a fin de eliminar la droga utilizada anteriormente, excepto luego del agregado de difenhidramina.

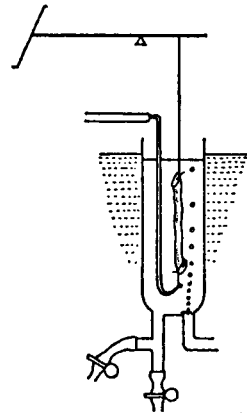


Figura 3. Esquema del dispositivo para ensayos sobre órganos aislados utilizado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis Cromatográfico en fase gaseosa

No obstante emplearse en los análisis cromatográficos una columna de tipo capilar con programación desde temperatura subambiente, con sus reconocidas características de resolución, los extractos en solventes orgánicos provenientes de los dos procedimientos empleados inicialmente (por destilación con arrastre de vapor de agua), no produjeron resultados suficientemente reproducibles como para poder efectuar una aceptable caracterización del material estudiado; además, la inevitable presencia de trazas de impurezas en dichos solventes y el amplio ámbito de temperatura necesario para la separación cromatográfica de los componentes volátiles presentes contribuyeron también a ese inconveniente.

Por el contrario, la aplicación de la técnica HSA estática para la extracción de los componentes volátiles de las hojas y tallos de *P. salicifolia* y su posterior análisis cromatográfico mediante una columna rellena con "Porapak Q", permitió constatar con precisión aceptable la presencia de numerosos componentes, con un supuestamente estrecho ámbito de volatilidades y de naturaleza química probablemente diferentes (Figura 4).

Es de destacar que si bien en este caso los componentes analizados, representados por los correspondientes picos cromatográficos, en general se encuentran presentes tanto en las hojas como en los tallos del material estudiado, su abundancia relativa en dichos órganos de la planta difiere en forma significativa al considerar uno de ellos como referencia interna de (Tablas 1 y 2, *v.g.* t_R 1,52-1,54 min). Esto refleja diferencias que son fundamentalmente de orden cuantitativo entre los componentes volátiles presentes en las hojas y tallos del material estudiado.

Los resultados que se grafican en las Tablas 1 y 2 pueden ser expresados también en forma de diagramas (perfiles cromatográficos) ⁷ que permiten visualizar las características de retención de los componentes volátiles presentes en el material analizado (Figura 5).

t_R min	Área de pico unidades arbitrarias	t_R rel	Área relativa
1,52	71640	1,0	1,0
3,51	364950	2,3 ± 0,0	5,1 ± 0,0
5,36	32550	3,5 ± 0,0	0,4 ± 1,8
7,05	7168	4,6 ± 0,0	0,1 ± 0,8
10,6	13445	7,0 ± 0,0	0,2 ± 2,6
14,1	10312	9,3 ± 0,0	0,1 ± 0,7
23,9	2320	15,7 ± 0,1	0,0 ± 0,1
31,0	15785	20,4 ± 0,1	0,2 ± 1,8

Tabla 1. Tiempos de retención y áreas de picos cromatográficos obtenidos por el método HSA de hojas frescas de *Pouteria salicifolia* (valores medios de por lo menos 3 determinaciones independientes).

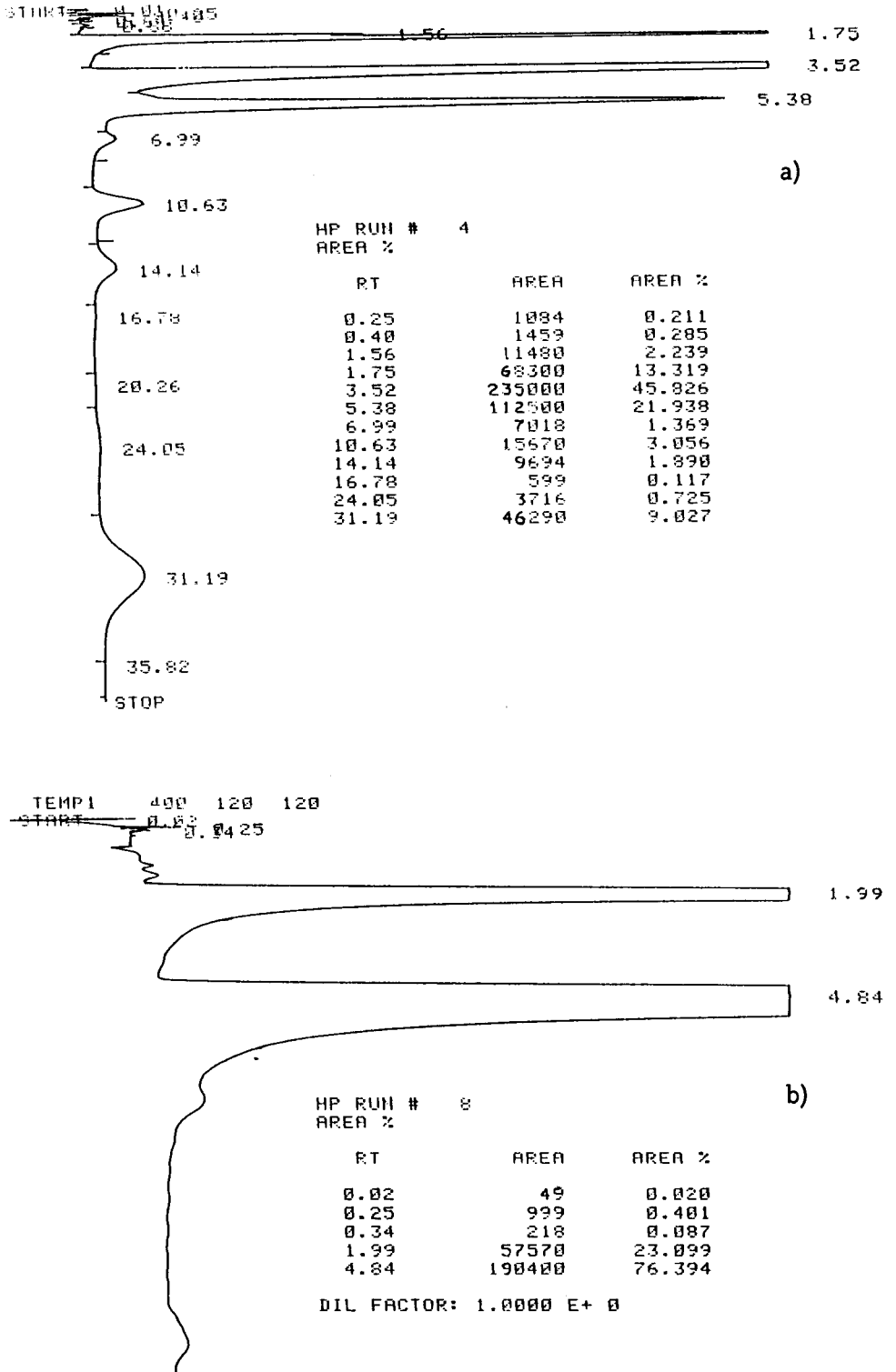


Figura 4. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis de (a) hojas frescas y (b) tallos de *Pousteria salicifolia* ("matajojo")

t_R min	Area de pico unidades arbitrarias	t_R rel	Area relativa
0,25	989	0,2	0,1
0,41	731	0,3	0,1
0,47	243	0,3	0,0
0,93	50	0,6	0,0
11,22	270	0,8	1,0
1,54	8284	1,0	0,0
2,04	84780	1,3	10,2
5,90	360700	3,8	43,5
11,4	475	7,4	0,1

Tabla 2. Tiempos de retención y áreas de picos cromatográficos obtenidos por el método HSA de tallos frescos de *Pouteria salicifolia*

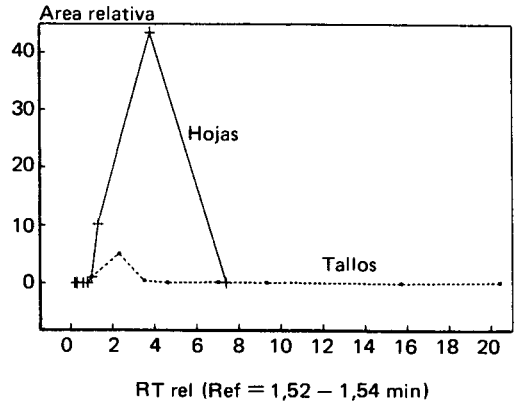


Figura 5. Perfiles cromatográficos de componentes volátiles (método HSA, a $80 \pm 2^\circ\text{C}$) de hojas y tallos frescos de *Pouteria salicifolia* ("matajojo")

Esta forma de presentar los resultados posibilita efectuar una diferenciación y caracterización en breve tiempo, utilizando una metodología relativamente sencilla, de las distintas partes del vegetal estudiado en este trabajo.

Ensayos Farmacodinámicos

Se pudo constatar en este caso una manifiesta acción irritativa inmediata con lagrimeo intenso en el ojo del cobayo instilado con el extractivo de *Pouteria salicifolia*. Además el animal de experimentación trataba de cerrar el ojo, afectándolo todo estímulo lumínico. Al estimular la córnea con un pelo de puerco (empleado para estudiar anestésicos locales) respondía débilmente a dicha acción, entrecerrando el ojo. Esta acción irritante se prolongó por un período de aproximadamente 10 min. En cambio, el ojo control instilado con solución fisiológica no presentaba ninguna alteración, respondiendo al estímulo de la córnea con un rápido parpadeo.

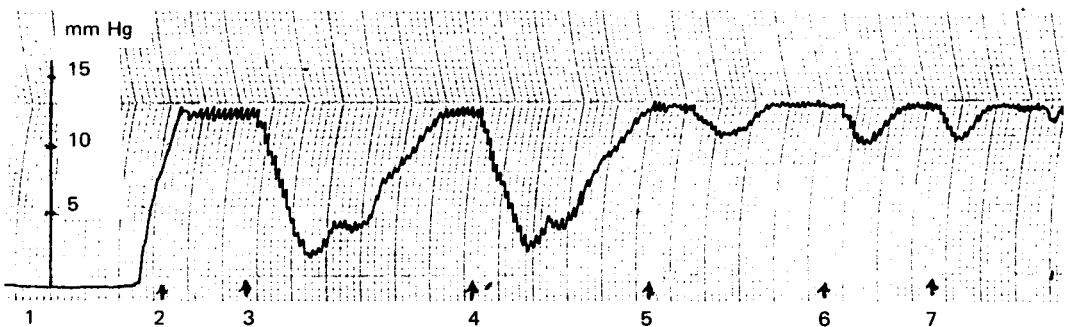


Figura 6. Registro de la presión arterial en el conejo anestesiado 1: línea de base, 2: presión arterial normal en mm de Hg, 3: 0,1 ml de extractivo bencénico de *Pouteria salicifolia* retomado en sol. fisiológica, 4: histamina diclorhidrato (0,1 ml de sol. conteniendo $5 \mu\text{g/ml}$), 5: difenhidramina clorhidrato (0,1 ml de sol. conteniendo $5 \mu\text{g/ml}$), 6: 0,1 ml de extractivo bencénico de *Pouteria salicifolia* retomado en sol. fisiológica, 7: histamina diclorhidrato (0,1 ml de sol. conteniendo $5 \mu\text{g/ml}$)

En el caso de la aplicación de clorhidrato de difenhidramina previamente a la instilación, tanto en el ojo tratado con el extractivo vegetal como con la solución fisiológica, no se constató reacción inflamatoria de la conjuntiva, respondiendo rápidamente al estímulo de la córnea con el pelo de puerco.

El cobayo sometido al efecto de la nebulización del extractivo de *Pouteria salicifolia*, a los 30 segundos de iniciada la misma mostraba dificultad respiratoria debida al broncoespasmo que se producía. En los animales inyectados previamente por vía intraperitoneal con clorhidrato de difenhidramina no se verifica ningún síntoma adverso durante la nebulización (1 min) ni tampoco con posterioridad a la misma.

El registro de la presión arterial en conejos a los que se administró el extractivo de *Pouteria salicifolia* (Figura 6) indica una significativa disminución del efecto hipotensor cuando previamente se administraba un antihistamínico anti-H1. Además, en el trozo de íleon distal de cobayo existen receptores H1 que resultaron fuertemente estimulados por el agregado del extractivo de *Pouteria salicifolia* ensayado, ya que la reacción espasmódica producida por el mismo fue reducida en alrededor de un 70% cuando previamente se adicionaba a la cuba clorhidrato de difenhidramina (Figura. 7).

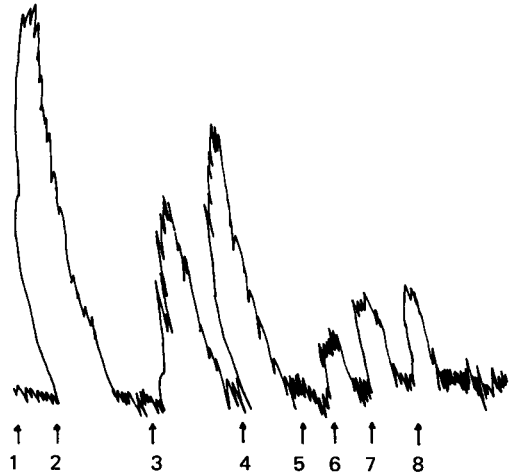


Figura 7. Ensayo sobre íleon distal de cobayo. 1: trazado normal con sol. Tyrode., 2: histamina diclorhidrato (0,1 ml de sol. conteniendo 5 µg/ml), 3: 0,1 ml de extractivo bencénico de *Pouteria salicifolia* retomado con sol. fisiológica, 4: 0,15 ml de extractivo bencénico de *Pouteria salicifolia* retomado con sol. fisiológica, 5: difenhidramina clorhidrato (0,1 ml de sol. conteniendo 10 µg/ml) 6: 0,1 ml de extractivo bencénico de *Pouteria salicifolia* retomado con sol. fisiológica, 7: 0,15 ml de extractivo bencénico de *Pouteria salicifolia* redissuelto en sol. fisiológica, 8: histamina diclorhidrato (0,1 ml de sol. conteniendo 5 µg/ml)

CONCLUSIONES

El análisis por cromatografía gaseosa capilar con temperatura programada de extractos en benceno y n-hexano de los componentes de hojas y de tallos de *Pouteria salicifolia* ("matajojo"), indican la presencia de numerosos componentes en muy pequeñas cantidades en el material previamente acondicionado a temperaturas cercanas a la ambiente. En cambio, el análisis por cromatografía gaseosa del vapor en equilibrio a 80 °C con el material estudiado (Técnica HSA) utilizando una columna rellena con "Porapak Q" permite caracterizar y contribuye a diferenciar los órganos del vegetal mediante su retención cromatográfica relativa ("perfiles cromatográficos").

El extracto bencénico seco retomado con solución fisiológica de los componentes de hojas de "matajojo", como también el destilado a presión reducida (ca. 1 Torr) y temperatura ambiente, recogido a -190 °C, de hojas frescas del mismo vegetal, ocasionan en el ojo del cobayo una definida acción irritativa, con miosis pupilar y cierto grado de acción anestésica.

Los ensayos farmacodinámicos realizados permiten constatar también que los extractivos provenientes de *Pouteria salicifolia* contienen componentes con acción histaminérgica, probablemente responsable del efecto inflamatorio irritativo provocado en la córnea del cobayo. Estos resultados se pueden resumir en los siguientes puntos:

a) inhibición de la respuesta inflamatoria irritativa en la conjuntiva del cobayo con la instilación previa de un antagonista anti-H1, el clorhidrato de difenhidramina.

b) inhibición de la broncoconstricción en el cobayo sometido a nebulización del extractivo vegetal cuando previamente se le inyectaba una solución de un antihistamínico anti-H1.

c) inhibición del 70% de la actividad hipotensora de *Pouteria salicifolia* comprobado al inyectar por vía intravenosa un antihistamínico anti-H1.

d) los resultados obtenidos en las experiencias *in vivo* resultan confirmados con el preparado realizado *in vitro* del íleon distal del cobayo (el cual posee receptores tipo H1).

Agradecimientos. Los autores agradecen al Sr. Víctor H. Giusto el suministro en varias oportunidades de muestras del vegetal estudiado. Los análisis cromatográficos fueron realizados en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA). Este trabajo fue apoyado económicamente por el CONICET mediante su Programa de Investigación y Desarrollo LADECOR-431. G.S. agradece al Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires la Beca de Estudio que le fue oportunamente otorgada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Domínguez J.A., J.F. Molino y E. Gallelli (1919) *Trab. Inst. Bot. Farmac. Fac. Cs. Médicas Buenos Aires* N° 40, págs. 44 y 170
2. Meyer, T. (1957) *Rev. Agronómica del Noroeste Argentino* 2: 274-5
3. Hieronymus, J. (1882) "*Plantae Diaphoricae Florae Argentinae*", Bol. Acad. Nac. Córdoba 4: 199-598 (Reedición: "*Plantas Diafóricas. Flora Argentina*", Ed. Atlántida, 1930)
4. Burkart A. (1979) "*Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina)*", Tomo VI, Parte 5. Colección Científica del INTA, Buenos Aires, págs. 36-9
5. Bicchi, C., A. D'Amato, G. M. Nano y C. Frattini (1983) *J.Chromatogr.* 279: 409-16
6. Ioffe, B.V. y A. G.-Vitenberg (1982) "*Head-Space Analysis and Related Methods in Gas Chromatography*" Wiley Interscience, New York, págs. 9-48
7. Sala, G., E. Mandrile y L.F.R. Cafferata (1992) *Acta Farm. Bonaerense* 11: 73-82
8. Barnes, C.D. (1964) "*Drug dosage in laboratory animals, a handbook*" University of California Press, Berkeley, California
9. Livingstone, E. y S. Livingstone (1970) "*Pharmacological experiments on isolated preparations*", Edited by the staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Edinburgh, 2nd. edition