

Actividad Captadora de Radicales Libres y Citotoxicidad de Plantas Colombianas de la Familia Annonaceae

Nora JIMENEZ, Julián LONDOÑO, Gabriel J. ARANGO*

Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, Facultad de Química Farmacéutica,
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

RESUMEN. La actividad captadora de radicales libres de 53 extractos de diferente polaridad pertenecientes a especies de la familia Annonaceae fue evaluada por el método del DPPH (2,2-difenil-1-picryl hidrazil). Se calculó el porcentaje de decoloración del radical DPPH midiendo el cambio en la absorbancia a 517 nm; determinándose para cada extracto la EC₅₀ (concentración de extracto necesaria para decolorar el radical DPPH en un 50%). En general fueron más activos los extractos metanólicos, indicando que los metabolitos con mayor actividad captadora de radicales libres presentan alta polaridad. Adicionalmente fue evaluada la citotoxicidad de los extractos sobre líneas celulares U-937 (promonocitos humanos) y se obtuvieron los respectivos valores de CL₅₀ (Concentración Letal 50). Algunos extractos con alto poder para estabilizar radicales libres mostraron menos citotoxicidad que los controles utilizados, hidroxitolueno butilado (BHT) y silimarina.

SUMMARY. "Free Radicals Scavenger Activity and Cytotoxicity of Annonaceae Family Colombian Plants". Free radicals scavenger activity of 53 extracts of different polarity which belong to species of Annonaceae family was evaluated by DPPH (2,2-diphenil-1-picryl hydrazil) method. The percentage of DPPH radical was calculated measuring the change in absorbance at 517 nm; EC₅₀ (Extract concentration necessary to decolorate DPPH radical in a 50%) was determined for each extract. In general, methanolic extracts were more active, indicating that metabolites with a high free radical scavenger activity present high polarity. Additionally, cytotoxicity of extracts on U-937 (human promonocytes) cellular lines was evaluated. Corresponding values of CL₅₀ (Lethal concentration 50) were obtained. Some extracts with a high power in order to stabilize free radicals showed to be less cytotoxic than the controls used: butylated hydroxytoluene (BHT) and sylimarin.

INTRODUCCIÓN

El metabolismo oxidativo es esencial para el funcionamiento celular; sin embargo puede ser perjudicial en la medida en que las especies nocivas (radicales libres) generadas durante este proceso no sean inactivadas oportunamente mediante sistemas de defensa enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa ó por la acción de antioxidantes como Vitaminas E y C, beta-caroteno o flavonoides, entre otros antioxidantes primarios, los cuales pueden estabilizar radicales libres donando un átomo de hidrógeno rápidamente para formar un nuevo radical más estable que el primero, dete-

niendo así la fase de propagación de la oxidación¹.

Se ha sugerido, basándose en fuertes evidencias, que los radicales libres pueden generar cambios oxidativos sobre las biomoléculas, desencadenando graves patologías entre las que se cuentan aterosclerosis, cáncer, envejecimiento, diabetes, inflamación y enfermedades degenerativas²⁻⁸.

Las acciones nocivas de los radicales libres sobre el organismo han promovido la búsqueda de moléculas con propiedades antioxidantes como potenciales agentes terapéuticos, unido a la creciente preocupación por los efectos tóxicos

PALABRAS CLAVE: Actividad Captadora de Radicales libres, Annonaceae, Citotoxicidad, Concentración Efectiva cincuenta (EC₅₀), DPPH, Concentración Letal cincuenta (CL₅₀), Plantas colombianas.

KEY WORDS: Annonaceae, Colombian plants, Cytotoxicity, DPPH, Effective concentration fifty (EC₅₀), Free radicals scavenger activity, Lethal concentration fifty CL₅₀.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: gjarango@udea.edu.co

producidos por los antioxidantes sintéticos utilizados en la preservación de alimentos; esto refuerza la urgencia de obtener sustancias antioxidantes menos tóxicas y de amplia utilidad en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica⁹⁻¹¹, siendo los vegetales una potencial fuente de obtención debido a que sintetizan y acumulan en sus órganos gran variedad de metabolitos secundarios como respuesta a estímulos o condiciones ambientales¹², entre ellos, sustancias con capacidad captadora de radicales libres tales como compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas y compuestos nitrogenados^{13,14}.

Colombia es considerada como uno de los países que posee mayor biodiversidad en América Latina, gracias a la privilegiada situación geográfica, reportándose 50.000 especies dentro de su flora, de las cuales cerca de 6.000 poseen algún tipo de característica medicinal¹⁵. Particularmente se encuentra una gran variedad de especies pertenecientes a la familia Annonaceae, distribuidas ampliamente por todo el país, hallándose la mayor diversidad de especies en las regiones Amazónica (54%), Pacífica (27.5%) y Andina (27%); tan sólo en el departamento de Antioquia se encuentran alrededor de 70 especies¹⁶; en dicha familia se han reportado metabolitos secundarios con variada actividad biológica, entre los que se encuentran las acetogeninas con actividad sobre el complejo enzimático ubiquinona oxidoreductasa²². No obstante, el conocimiento que se tiene de ellas es escaso puesto que sólo se hacen descripciones de nuevos registros para la flora²⁴, no contándose con información sobre el estudio químico de los metabolitos presentes; sin embargo, a nivel mundial, múltiples usos se han reportado en medicina tradicional para diversas especies pertenecientes a esta familia²⁵.

Las búsquedas bibliográficas sobre la actividad biológica o caracterización fitoquímica de las especies en estudio mostró que para cinco de las especies (*Desmopsis panamensis*, *Ephedranthus colombianus*, *Pseudomalmea boyacana*, *Rollinia pittieri* y *R. exsucca*) no existe ningún reporte biológico (según bases de datos NAPRALERT, ScienceDirect) y que para muchas de las especies no hay reportes específicos.

Teniendo en cuenta el amplio rango de actividad hallada en la literatura para la familia Annonaceae¹⁷⁻²³, la posibilidad de acceso al material vegetal y haciendo énfasis en la necesidad de aprovechar los recursos vegetales disponibles en la búsqueda de nuevas sustancias con potencial actividad antioxidante, se han selec-

cionado 14 especies de Anonáceas de los géneros *Annona*, *Desmopsis*, *Ephedranthus*, *Guatteria*, *Oxandra*, *Pseudomalmea Rollinia* y *Xylopia*, para evaluar su actividad captadora de radicales libres y citotoxicidad sobre la línea celular U-937 (promonocitos humanos).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e hidroxitolueno butilado (BHT) se adquirieron de Sigma Chemical Co, metanol de EMD, cromatoplasmas de Silicagel 60F₂₅₄ Merck, silimarina-GenFar® (mezcla de flavolignanones de *Silybum marianum* (Asteraceae), lote 050903).

Material vegetal

La selección del material vegetal se basó en la disponibilidad y accesibilidad de colección en los departamentos de Antioquia (corregimiento de Lomas aisladas del municipio de Turbo) y Santander (municipio de Cimitarra), según la fenología disponible se recolectaron especímenes en igual estado de crecimiento y la identificación taxonómica fue realizada por comparación con colecciones disponibles en el Herbario Universidad de Antioquia, en donde reposan los respectivos vouchers cuyos números son: *Annona spraguey* (A1068), *Desmopsis panamensis* (A1070), *Ephedranthus columbianus* (A1074), *Guatteria sp.* (A1082), *Guatteria cestriifolia* (A1075), *Guatteria cf. Tonduzii* (A1073), *Guatteria tonduzii* (A1071), *Guatteria petiolata* (A1081), *Oxandra venezuelana* (A1030), *Pseudomalmea boyacana* (dos especímenes nombrados 1 y 2) (A1039, A1040), *Rollinia exsucca* (A1069), *Rollinia pittieri* (A1072), *Xylopia aromatica* (A1052 y *Xylopia discreta* (A1043).

Extracción

El material vegetal fue separado, de acuerdo con la fenología, en tallos, hojas y frutos, seco a 30 °C en estufa con corriente de aire, molido y extraído en hexano y metanol hasta agotamiento; los extractos obtenidos, 53 en total (Tabla 1), se concentraron a presión reducida, y fueron guardados protegidos de la luz directa a 4° C hasta el momento del ensayo.

Ensayo espectrofotométrico del DPPH para determinar la EC₅₀ de los extractos

El ensayo espectrofotométrico se basa en lo propuesto por Band-Williams *et al.*²⁶. Para ello de cada uno de los extractos se prepararon soluciones concentradas (10.000 ppm), las cuales

Especie	Parte planta/ Tipo de Extracto	Citotoxicidad sobre Células U-937 CL ₅₀ (µg/ml)	Captación de radicales libres DPPH EC ₅₀ (µg/ml)
<i>Annona spraguey</i>	H/ He	21.0 ± 2.0	>1000 ± 0.0
	H/ M	16.9 ± 4.1	181.9 ± 13.1
	T/ He	43.5 ± 9.3	>1000 ± 0.0
	T/ M	90.5 ± 12.6	41.7 ± 2.1
	H/ He	11 ± 31.3	>1000 ± 0.0
<i>Desmopsis panamensis</i>	H/ M	122.5 ± 0.5	167.8 ± 11.4
	T/ He	307.5 ± 28.8	143.1 ± 12.6
	T/ M	251.5 ± 7.6	41.4 ± 1.1
	H/ He	65.5 ± 22.7	505.3 ± 16.2
	H/ M	165.5 ± 14.6	78.9 ± 6.4
<i>Ephedranthus columbianus</i>	T/ He	12.0 ± 3.0	186.2 ± 13.0
	T/ M	19.0 ± 3.0	>1000 ± 0.0
	H/ He	117.0 ± 20.2	>1000 ± 0.0
	H/ M	41.5 ± 5.5	62.2 ± 4.0
<i>Guatteria cestrifolia</i>	T/ He	112.0 ± 16.1	>1000 ± 0.0
	T/ M	190.5 ± 31.8	40.5 ± 2.9
	H/ He	74.5 ± 1.5	>1000 ± 0.0
	H/ M	122.5 ± 20.6	21.7 ± 2.5
<i>Guatteria cf. tonduzzi</i>	T/ He	16.0 ± 6.1	>1000 ± 0.0
	T/ M	205.0 ± 31.3	421.5 ± 38.0
	H/ He	199.5 ± 23.7	>1000 ± 0.0
	H/ M	87.0 ± 12.1	12.0 ± 0.4
<i>Guatteria tonduzii</i>	T/ He	127.5 ± 2.5	679.2 ± 56.3
	T/ M	286.5 ± 6.6	137.7 ± 13.9
	P/ He	15.5 ± 3.5	>1000 ± 0.0
<i>Guatteria petiolata</i> **	P/ M	>1000 ± 0.0	6.0 ± 1.3
	H/ He	127.5 ± 40.9	>1000 ± 0.0
	H/ M	99.1 ± 9.2	78.0 ± 1.5
<i>Guatteria sp.</i>	T/ He	120.0 ± 9.1	617.3 ± 32.9
	T/ M	42.5 ± 7.6	12.0 ± 0.8
	H/ He	93.8 ± 1.6	753.3 ± 25.5
	H/ M	>1000 ± 0.0	94.8 ± 5.1
<i>Oxandra venezuelana</i>	T/ He	72.0 ± 16.1	>1000 ± 0.0
	T/ M	341.5 ± 1.5	125.4 ± 3.4
	H/ He	86.74 ± 33.1	>1000 ± 0.0
<i>Pseudomalmea boyacana 1</i>	H/ M	20.0 ± 8.1	125.8 ± 1.3
	T/ He	93.2 ± 0.9	>1000 ± 0.0
	T/ M	283.0 ± 4.1	151.1 ± 4.7
<i>Pseudomalmea boyacana 2</i>	H/ He	95.8 ± 1.6	750.3 ± 25.5
	H/ M	87.0 ± 7.1	90.69 ± 4.31
	T/ He	231.4 ± 9.7	634.4 ± 75.2
	T/ M	429.9 ± 45.4	152.6 ± 9.6
<i>Rollinia exsucca</i>	H/ He	5.5 ± 0.9	>1000 ± 0.0
	H/ M	139.5 ± 0.5	6.0 ± 0.5
	T/ He	39.0 ± 2.0	105.9 ± 4.6
	T/ M	3.5 ± 1.5	313.2 ± 36.8
	H/ He	170.5 ± 47.0	193.9 ± 14.4
<i>Rollinia pittieri</i>	H/ M	347.0 ± 38.4	38.4 ± 1.7
	T/ He	4.5 ± 2.5	137.3 ± 13.8
	T/ M	259.0 ± 20.2	49.27 ± 1.4
<i>Xylopiá aromática</i>	H/ He	28.0 ± 2.0	282.3 ± 23.1
	H/ M	353.5 ± 27.8	43.6 ± 5.4
	T/ He	109.0 ± 7.1	>1000 ± 0.0
	T/ M	579.0 ± 29.3	27.9 ± 2.2
<i>Xylopiá discreta</i>	H/ He	119.2 ± 2.4	111.8 ± 11.8
	H/ M	28.7 ± 6.4	90.0 ± 7.1
	T/ He	194.7 ± 2.8	654.1 ± 18.4
	T/ M	240.9 ± 3.5	203.5 ± 12.5
<i>BHT</i>	-	46.8 ± 2.5	207.4 ± 18.8
<i>Silimarina</i>	-	38.7 ± 2.8	84.7 ± 7.7

Tabla 1. Actividad captadora de radicales libres y citotoxicidad de extractos de plantas de la familia Annonaceae. F: Fruto; T: Tallo; H: Hojas; P: Planta completa; He: Hexano; M: Metanol. ** Datos excluidos en el análisis estadístico.

fueron mezcladas en proporción 1:2 (v/v) con la solución metanólica de DPPH ($5,07 \times 10^{-5} \text{M}$). La concentración de la solución de DPPH en cada ensayo fue ajustada en el rango ($3,8 \times 10^{-5}$ - $6,3 \times 10^{-5} \text{M}$), de acuerdo con la ecuación:

$$A_{\lambda 517} = 20,36 [\text{DPPH}] + 0,02338 \quad r^2 = 0,9960$$

La absorbancia a 517 nm fue tomada exactamente cinco min después de iniciada la reacción y la decoloración fue comparada con una solución que contenía la misma proporción (1:2) de metanol y DPPH.

El porcentaje de decoloración del DPPH fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{Decoloración} = 1 - \left(\frac{A_m - A_{bm}}{A_{b\text{DPPH}}} \right) * 1000$$

donde A_m : Absorbancia de la muestra, A_{bm} : Absorbancia del blanco de la muestra y $A_{b\text{DPPH}}$: Absorbancia del blanco del DPPH.

La solución inicial fue diluida al 75, 50, 25, 10, 5 y 1%, con el fin de calcular, para cada extracto, la EC_{50} o concentración de extracto necesaria para decolorar en un 50% el DPPH. Se tomaron, cuatro mediciones de cada una de las concentraciones de extracto y se aseguró que la variabilidad entre ellas no superará el 10% ²⁷.

Para calcular, a partir de los porcentajes de decoloración del DPPH, los valores de EC_{50} , se utiliza el paquete estadístico GraphPad Prism[®] para manejar el modelo de curva dosis- respuesta, el cual está definido por cuatro parámetros: valor máximo en el estado estable, valor mínimo en el estado estable, EC_{50} y pendiente. El programa utiliza la Ecuación de Hill o ecuación logística de cuatro parámetros definiendo la respuesta (Y) cómo función de la dosis (X) ²⁸.

$$Y = \text{Mínimo} + \frac{\text{Máximo} - \text{Mínimo}}{1 + 10^{-(\log EC_{50} - X) (\text{Hillpendiente})}}$$

Ensayo de citotoxicidad

La evaluación de la actividad citotóxica se realizó sobre células promonocíticas humanas de la línea U-937 ²⁹, utilizando el micrométodo enzimático MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromido] ³⁰. Las células U-937 se mantuvieron en cultivo como células en suspensión en medio RPMI 1640 (Gibco BRL,

Grand Island, NY) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SBF) inactivo a 37 °C y 5% de CO_2 a una concentración de 3×10^5 células/mL y haciendo cambio de medio cada dos días. El día del ensayo se lavó las células centrifugando a 400 x g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF. Las células se contaron y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/mL de RPMI con 10% de SBF. En cada pozo de un plato de 96 pozos se dispensaron 100 μL de células. Luego se adicionaron 100 μL de una solución de los diferentes extractos disueltos en DMSO, en un rango de concentración final de 3 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Las células se incubaron a 37 °C con 5% CO_2 durante 96 h, cambiando el medio a las 48 h. Después de 96 h se agregó 10 μL de MTT (10 mg/ml) a cada pozo y se incubó la placa durante 3 h. La reacción enzimática se detuvo por la adición de 100 μL de una solución al 50% de isopropanol y 10% de dodecil sulfato de sodio. Los pozos se incubaron un tiempo adicional de 30 min a temperatura ambiente y se leyó la densidad óptica a 570 nm, que es directamente proporcional a la producción de Formazan, utilizando un lector ELISA (Bio Rad).

Las células cultivadas en ausencia de tratamiento pero mantenidas bajo las mismas condiciones sirvieron como control del ensayo. Se realizaron tres experimentos independientes cada uno de ellos por triplicado para la determinación de la citotoxicidad de cada extracto. Los resultados se expresan como CL_{50} calculados por el método probabilístico Probit ³¹.

Análisis estadístico

Fue empleado el paquete estadístico GraphPad Prism[®] Versión 4.00 para Windows, (GraphPad software, Inc, San Diego CA 2003) para calcular la EC_{50} y sus parámetros estadísticos (bondad de ajuste, intervalos de confianza, error estándar). Los resultados fueron analizados utilizando el test Bonferroni en una tabla ANOVA - doble vía y aplicando una distribución de frecuencias.

RESULTADOS

La actividad captadora de radicales libres de los extractos de plantas de la familia Annonaceae fue medida espectrofotométricamente utilizando el DPPH, un radical libre estable de coloración violeta en solución metanólica que absorbe radiación fuertemente a 517 nm y contiene

un electrón desapareado, el cual es estabilizado en presencia de antioxidantes primarios, resultando una decoloración estequiométrica con respecto al número de electrones donados, de tal manera que la interacción de un potencial antioxidante con el DPPH depende de su conformación estructural con requerimientos relacionados con la presencia de grupos hidroxilo y estructuras que soportan el radical libre recientemente formado ³².

En general, según el análisis estadístico realizado, la distribución de frecuencias mostró que el 75% de las especies de Annonaceae evaluadas presentan una CL_{50} mayor de 41.5 $\mu\text{g/mL}$ siendo menos citotóxicas que los controles empleados (BHT y silimarina). El BHT es un antioxidante sintético utilizado ampliamente en la industria alimentaria, farmacéutica y de cosméticos. Sin embargo su uso ha sido restringido ampliamente debido a los problemas de seguridad que ha presentado ^{8,9}. En el presente estudio se evaluó la citotoxicidad del BHT y la silimarina sobre líneas celulares U-937 obteniendo una CL_{50} de 46,8 y 38,7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. En cuanto a la actividad captadora de radicales libres, el 50% de los extractos evaluados presentan una EC_{50} menor o igual a 167,8 $\mu\text{g/mL}$; comparada con 207,4 y 84,7 $\mu\text{g/mL}$ del BHT y silimarina, respectivamente.

El extracto metanólico de *Guatteria pettiolata* (planta completa) es interesante, bien por su buena actividad captadora de radicales libres ($EC_{50} = 6.0 \mu\text{g/mL}$), como por su baja citotoxicidad ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$). Otros extractos considerados también relevantes en el estudio debido a su buena actividad captadora de radicales libres son los extractos metanólicos de las hojas de *Rollinia exsucca* ($EC_{50} = 6.0 \mu\text{g/mL}$), *Guatteria tonduzzi* ($EC_{50} = 12.0 \mu\text{g/mL}$), *Guatteria cf. Tonduzzi*, ($EC_{50} = 21.7 \mu\text{g/mL}$), *Rollinia pittieri* ($EC_{50} = 38.4 \mu\text{g/mL}$), *Guatteria cestrifolia* ($EC_{50} = 62.2 \mu\text{g/mL}$) y extractos metanólicos de los tallos de *Guatteria sp.* ($EC_{50} = 12.0 \mu\text{g/mL}$), *Xylopia aromatica* ($EC_{50} = 27.9 \mu\text{g/mL}$), *Guatteria cestrifolia* ($EC_{50} = 40.5 \mu\text{g/mL}$), *Desmopsis panamensis* ($EC_{50} = 41.4 \mu\text{g/mL}$), *Annona spraguey* ($EC_{50} = 41.7 \mu\text{g/mL}$) y *Rollinia pittieri* ($EC_{50} = 49.3 \mu\text{g/mL}$).

CONCLUSIONES

El estudio logró comprobar que en las especies analizadas de la familia Annonaceae, los metabolitos con mayor actividad captadora de radicales libres son de carácter polar y que por su parte los agentes responsables de la citotoxi-

cidad son, generalmente, no polares. Por lo tanto, la utilización de alguna de estas plantas para un estudio que pretenda aislar sus componentes activos con potencial actividad antioxidante, puede partir de la preparación de un extracto alcohólico de la parte aérea (tallos y hojas).

De los 58 extractos evaluados 12 se consideran muy promisorios debido a su alta actividad captadora de radicales libres (EC_{50} menor de 50 $\mu\text{g/mL}$) comparados con los controles utilizados, de tal manera que se justifica su fraccionamiento con el fin de encontrar los metabolitos responsables del efecto o comprobar la existencia de un sinergismo entre ellos. Los resultados obtenidos en el presente estudio hacen ver estos extractos como fuente de futuras investigaciones que amplíen la evidencia en cuanto a su actividad antioxidante y vislumbren posibles aplicaciones.

Se demostró, una vez más, que la técnica del DPPH es rápida, y que puede ser utilizada para la evaluación de la actividad captadora de radicales libre en matrices complejas como los extractos vegetales.

La familia Anonáceae, según la literatura consultada, presenta importancia terapéutica dada su actividad biológica relacionada principalmente con acciones antiparasitarias y antitumorales ¹⁷⁻²³. En el presente trabajo se evidencia adicionalmente en forma novedosa el potencial antioxidante de especies de esta familia, lo cual podría ser de gran importancia en la búsqueda de sustancias activas contra patologías causadas por radicales libres

Agradecimientos. Este estudio fue soportado con recursos de la Universidad de Antioquia, a través del Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI). Los autores agradecen al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), por la realización de los ensayos de citotoxicidad, y a los biólogos Fernando Alzate Guarín y Alvaro Idarraga del Herbario Universidad de Antioquia (HUA), por la recolección e identificación del material vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pryor, W.A. & B. Frei (2004) "Natural Antioxidants in Human Health and Disease"; Ed. Academic press: Londres, págs 1-62.
2. Ames, B N., M.K. Shigenaga & T.M. Hagwn (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 7915-22.
3. Aruoma, O.L. (1998) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **75**: 199-212.

4. Feskanish, D., R.G. Ziegler, D.S. Michaud, E.L. Giovannucci, F.E. Speizer, E. C. Willett & G. A. Colditz (2000) *J. Natl. Cancer I.* **92**: 1812-23.
5. Gordon, M.H. (1990) "Food antioxidants", Ed. B.J.F. Hudson, Londres, págs. 1-18.
6. Halliwell, B. (1996) *Ann. Rev. Nutr.* **16**: 33-50.
7. Maxwell, S.R. & G.Y. Lip (1997) *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **44**: 307-17.
8. Pratico D. & N. Delanty (2000) *Amer. J. Med.* **109**: 577-85.
9. Barlow, S.M. (1990) "Food antioxidants", Ed. B. J. F. Hudson, Londres, págs. 253- 307.
10. Branen, A.L. (1975) *J. Amer.Oil Chem. Soc.* **52**: 59-63.
11. Pokorny, J. (1991) *Trends Food Sci. Technol.* **9**: 223-7.
12. Shu, Y. (1998) *J. Nat. Prod.* **61**: 1053 -71.
13. Desmarchelier, C., G. Ciccía & J. Coussio (2000) *Stud. Nat. Prod. Chem.* **22**: 343-367.
14. Larson, R.A. (1988) *Phytochemistry* **4**: 969-78.
15. Duque V.A. (2002) "Encuesta nacional de plantas medicinales y aromáticas: una aproximación al mercado de las plantas medicinales y aromáticas en Colombia", Ed. Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, págs. 1-10.
16. Herbario de la universidad de Antioquia HUA (2000) Medellín Colombia.
17. Fournet, A., A. Barrios & V. Munoz (1994) *J. Ethnopharmacol.* **41**: 19-37.
18. De Arias, A., A. Inchausti, M. Acurrat, N. Fleitas, E. Rodriguez & A. Fournet (1994) *Phytother. Res.* **8**: 141-4.
19. Tinto, W., L. Blair, W. Reynolds & S. Mc Lean (1992) *J. Nat. Prod.* **55**: 701-6.
20. Arango, G., D. Cortes & A. Cave (1987) *Phytochemistry.* **26**: 1227 - 9.
21. Zhang, J., A. El-Shabrawy, M. El-Shanawany, P. Schiff & D. Slatkin (1987) *J. Nat. Prod.* **50**: 800-6.
22. Gallardo, T., J. Saez, H. Granados, J.R. Tormo, I.D. Velez, N. Brun, B. Torres & D. Cortes (1998) *J. Nat. Prod.* **61**: 1001-5.
23. Hocquemiller, R., D. Cortex, G. Arango, S. Myint, A. Cave, A. Angelo, V. Munoz & A. Fournet (1991) *J. Nat. Prod.* **54**: 443-52.
24. Murillo, J. (2001) *Biota Colombiana* **2**: 49-58
25. Bories, C., P. Loiseau, D. Cortes, S.H. Myint, R. Hocquemiller, P. Gayral, A. Cavé & A. Laurens (1991) *Planta Med.* **57**: 434-6
26. Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier & C. Berset (1995) *Lebensm.-Wissen. Technol.* **28**: 25-30.
27. Benedeck B. (2002) "Godoya Antioquensis A Bio-Guided Flavonoids". Tesis de maestría en Farmacia, Facultad de ciencias Naturales y matematicas, Universidad de Viena.
28. Motulsky, H.J. & A. Christopoulos (2003) "Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: A practical guide to curve fitting", Ed. GraphPad software Inc., San Diego CA, págs. 257-75.
29. Sundstrom K. & C. Nilsson (1976) *Int. J. Cancer* **17**: 565-77.
30. Sereno, D. & J. Lemestre (1997) *Parasitol. Res.* **83**: 401-3.
31. Finney, D. (1964) "Probit Analysis: Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve", Ed. Cambridge Univ. Press, Londres, págs 5-120.
32. Nanjo F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai & Y. Hara (1996) *Free Rad. Biol. Med.* **21**: 895-902.