

APERTURA DEL ANILLO F DE LA DIOSGENONA Y ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN

Silvia Blair*, Jacqueline Mesa, Adriana Correa, Jaime Carmona Fonseca, Jairo Sáez

Recibido: 01/08/01 Aceptado: 14/12/01

Palabras clave: *Solanum nudum* esteroides, diosgenona.

Keywords: *Solanum nudum*, steroids, diosgenone, *Plasmodium falciparum*.

RESUMEN

La planta *Solanum nudum* (*Solanaceae*) es la más usada por los curanderos de Tumaco (Colombia) para tratar la malaria. De las hojas y tallos secos de la planta se prepararon varios extractos, y del extracto hexánico obtuvimos la sapogenina diosgenona ($C_{27}H_{40}O_5$); (25(R) espirostan-4-en-3-ona). El tratamiento de la diosgenona (compuesto 1) en un tubo sellado con anhídrido acético, a 200°C durante 6 horas, condujo a la obtención de una mezcla de los compuestos 2 y 3. La elucidación estructural de los compuestos se llevó a cabo mediante el análisis espectroscópico de RMN- H^1 y RMN- C^{13} . Los compuestos 2 y 3 son de tipo furostano; el compuesto 2 es 26-O-acetil-colestan-4-en-22-hidroxi-3-ona ($C_{29}H_{44}O_5$), y el compuesto 3 corresponde a 26-O-acetil-colestan-4,22-dien-3-ona ($C_{29}H_{42}O_4$). En dos experimentos independientes, se evaluó la ac-

tividad antiplasmodial de la mezcla de los compuestos 2 y 3 contra la cepa colombiana de *Plasmodium falciparum* FCB-2, y se halló que, en ambos experimentos, y comparada con sendos controles negativos, la mezcla de los compuestos 2 y 3 presentó actividad antimalárica *in vitro* estadísticamente significativa. El porcentaje de inhibición del crecimiento parasitario fue de 37% en un experimento (IC_{50} de 5,1 ppm [12,4 μM]) y de 64% en el otro ensayo (IC_{50} de 12,8 ppm [31,2 μM]). Aunque se requiere de más investigación sobre estos compuestos derivados de la *S. nudum*, es claro que ellos tienen actividad antiplasmodial *in vitro*.

ABSTRACT

Treatment of sapogenine diosgenone (compound 1) in a sealed tube with acetic anhydride, at 200°C for 6 hours, led to obtention of compounds 2 and 3. Structural elucidation of the compounds was carried out by RMN- H^1 and RMN- C^{13} spectroscopy. The mix of the compounds 2 and 3 was significantly effective against *Plasmodium falciparum* FCB-2.

* Grupo Malaria, Laboratorio de Hemoparásitos, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51D No. 62-29, A.A. 1226 Medellín, Colombia. Fax: 263 35 09. E-mail: sblair@carios.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

En el mundo y en Colombia, la malaria representa un grave problema de salud pública (1). Por otra parte, el fenómeno de la resistencia del parásito a las drogas antimaláricas es creciente (2,3,4,5,6), motivo que hace indispensable la búsqueda de nuevos medicamentos, para lo cual las plantas ofrecen grandes posibilidades.

Nosotros encontramos que los médicos tradicionales de las zonas endémicas de malaria emplean numerosas plantas para prevenir y tratar la enfermedad; en Tumaco (Colombia), la más utilizada de todas las plantas es la *Solanun nudum* (*Solanaceae*), con cuyas hojas y tallos se preparan infusiones, luego de recoger la planta en determinadas condiciones que define el curandero (día, noche; verano, invierno; etc.). La planta es conocida con los nombres vulgares de “zapata” o “zapatico”. A partir de las hojas y tallos secos de la planta, nosotros preparamos diversos extractos, y del extracto hexánico pudimos demostrar una potente actividad antimalárica *in vitro* contra la cepa colombiana FCB-2 de *Plasmodium falciparum* (7). A partir del extracto hexánico de *S. nudum*, obtuvimos la diosgenona, una sapogenina con fórmula $C_{27}H_{40}O_3$, cuya denominación es 25(R) espiros-tan-4-en-3-ona (8,9), la cual es insoluble en agua.

Con el fin de procurar obtener derivados hidrosolubles de la diosgenona con los cuales se pudiesen hacer ensayos de actividad antimalárica, la mencionada diosgenona fue sometida a tratamiento con anhídrido acético. El presente trabajo informa sobre la elucidación es-

tructural y la actividad antimalárica *in vitro* contra la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum* de la mezcla de los compuestos 2 y 3, obtenidos de la diosgenona (8).

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

La diosgenona se obtuvo de la planta *S. nudum* según una metodología ya empleada anteriormente (7, 8); la planta está registrada en el herbario de la Universidad de Antioquia con el código 554.

Apertura y acetilación del anillo F de la diosgenona

Se pusieron 200 mg de diosgenona (compuesto 1) en un tubo sellado, disueltos en 2 mL de anhídrido acético, y se sometieron a calentamiento a 200°C durante 6 horas. Estando frío, el producto de reacción se vertió en 50 mL de agua acidulada (HCl al 2%); luego se extrajo tres veces con porciones de 50 mL de diclorometano (CH_2Cl_2). La solución orgánica total se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida, para obtener un residuo; al monitorear este último por cromatografía de capa delgada (cromatoplasas de alufolien kieselgel 60 F. 254), se halló la presencia de varios compuestos. La purificación por cromatografía en columna (sílica gel 60 H) eluida con la mezcla de hexano:acetato de etilo (6:4) condujo a la obtención de 15 mg de mezcla de los compuestos 2 y 3, con prevalencia del compuesto 2 (ver figura 1). No pudo lo-

grarse la separación de los compuestos 2 y 3 mediante cromatografía normal y rápida, por lo cual se tomó la mezcla para los estudios de actividad antimalárica.

La elucidación tentativa de la estructura química de los componentes 2 y 3 obtenidos de la diosgenona por acetilación se hizo por métodos espectroscópicos de RMN- H^1 y RMN- C^{13} .

Condiciones experimentales de los bioensayos

Los experimentos se realizaron a partir de cultivos continuos según la técnica de Trager y Jensen (10) y según el método de Rieckman (11), una microtécnica en la cual se determina la actividad de los compuestos contra estados aseuados eritrocíticos de *Plasmodium fal-*

ciparum, utilizando volúmenes de cultivo y del compuesto del orden de microlitros. La técnica original recibió algunas modificaciones por parte de Cruz-Mancipe y Fuenmayor (12), y por parte nuestra (8). Las condiciones experimentales fueron:

- Cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum*, parasitemia de 1,0% (13)
- Hematócrito del 5% con glóbulos rojos O^+
- Microplatos de 96 pozos, marca Falcon, de fondo plano. Por cada experimento se usaron dos microplatos.
- El control negativo de cada experimento consistió en pozos que sólo tenían *Plasmodium falciparum*.

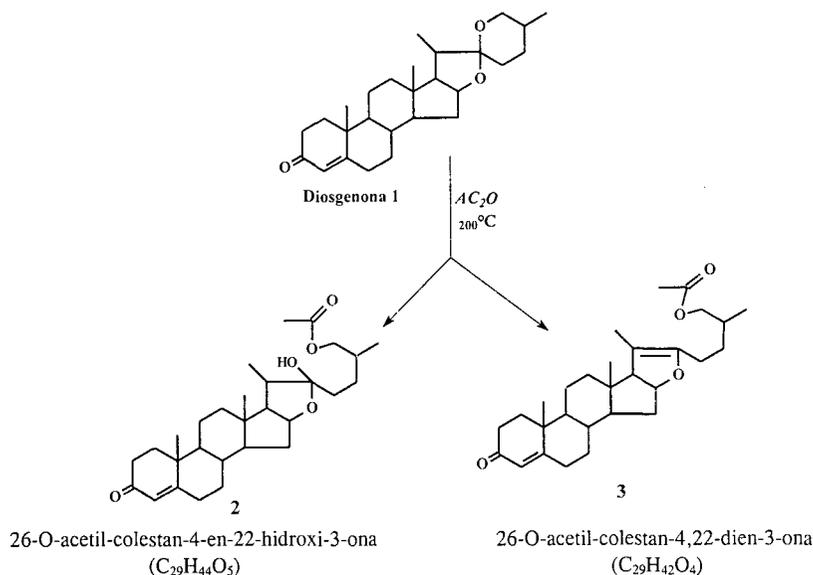


Figura 1: Apertura del anillo F de la diosgenona

Evaluación *in vitro* de la actividad antimalárica de la mezcla de los compuestos 2 y 3

En dos experimentos independientes se evaluó la acción parasiticida de la mezcla de los compuestos 2 y 3 sobre *Plas-*

modium falciparum (cepa FCB-2). Las concentraciones empleadas de la solución madre de la mezcla de los compuestos 2 y 3, y las concentraciones cuya actividad antiplasmodial se examinó, fueron las siguientes, según el experimento:

Exp.	Solución madre	Rango de concentraciones evaluadas en bioensayos
1	1053.3 mg/100 mL	95,76 a 0,19 mg/100 mL, haciendo diluciones seriadas dobles
2	300 mg/100 mL	27,27 a 0,05 mg/100 mL, haciendo diluciones seriadas dobles

Previamente se demostró que las concentraciones examinadas de la mezcla de los compuestos 2 y 3 carecían de efecto citotóxico, empleando para ello el protocolo de Maron y Ames (14), el cual usa como blanco la cepa TA-100 de *Salmonella typhimurium*.

En cada experimento, en el primer pozo se depositaron 20 μ L de la mezcla de los compuestos 2 y 3 sobre 200 μ L de cultivo de *Plasmodium falciparum*; a partir del primer pozo se realizaron diluciones al doble, hasta un total de diez diluciones o concentraciones de la mezcla de los compuestos 2 y 3. De cada dilución se realizaron doce réplicas, para un total de 120 observaciones por experimento. Cada vez, los pozos del control negativo sólo contenían 100 μ L de parásitos en cultivo; el número de observaciones del control negativo fue de 72.

La lectura de la parasitemia fue realizada en extendidos de sangre tomados del contenido de cada pozo, coloreados con Giemsa. Se utilizó un microscopio de luz blanca con objetivo 100x. En

once campos microscópicos se contaron los parásitos asexuados, discriminados por estadio (anillos, trofozoítos y esquizontes); la cifra de parásitos en cada estadio se multiplicó por tres. La parasitemia se expresó en porcentaje.

El efecto antimalárico (antiplasmodial) se definió como el porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito en los pozos tratados con la mezcla de los compuestos 2 y 3, comparado con el de los pozos sin tratamiento (control negativo). El porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito o porcentaje de inhibición de la parasitemia se calculó de acuerdo con Deharo y colaboradores (15): diferencia entre la parasitemia del control negativo y la parasitemia con la mezcla, dividida por la parasitemia del control; el resultado se multiplica por 100.

Análisis estadístico

En cada experimento se realizaron los siguientes análisis con el programa Statgraphics 7.0:

- a) Comparación de los promedios de parasitemia de los dos grupos (control y mezcla de los compuestos 2 y 3) mediante una prueba *t* para muestras independientes.
- b) Comparación de los promedios de parasitemia de las once concentraciones de la mezcla de los compuestos 2 y 3, considerando como concentración cero la correspondiente al control negativo y como concentraciones 1 a 10 las ya descritas para la diosgenona acetilada. Se aplicó para ese fin la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis. Esta prueba se escogió porque, si bien las curvas de distribución de parásitos en cada dilución tuvieron una distribución normal (según se demostró con el análisis de Kolmogorov-Smirnov), las varianzas de las once diluciones no fueron iguales (según la prueba de homocedasticidad de las varianzas de Bartlett), lo cual impidió aplicar la prueba paramétrica de análisis de varianza (anova).
- c) Se realizó un análisis de rango múltiple por el método de Newman y Keuls al 95% para identificar cuáles promedios diferían de los otros.
- d) Se hizo un análisis de correlación y de regresión lineal para establecer si existía correlación entre el número de parásitos y la concentración de la mezcla de los compuestos 2 y 3 a fin de establecer la relación dosis-respuesta.

En todas las pruebas y estimaciones se aplicó un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de los compuestos 2 y 3

Compuesto 2: 26-O-acetil-colestan-4-en-22-hidroxi-3-ona ($C_{29}H_{44}O_5$).

Espectro de RMN- H^1 ($CDCl_3$, 200 MHz) δ (ppm): 0,80 (s, C-18); 1,24 (s, C-19); 0,77 (d, C-27); 0,96 (d, C-21); 5,67 (s, C-4); 3,39 (dd, C-16); 2,1 (s, CH_3 -CO).

Espectro de RMN- ^{13}C ($CDCl_3$, 75,5 MHz) δ (ppm): 200,1 (C-3); 179,8 (C-5); 123,8 (C-4); 80,6 (C-16); 109,0 (C-22).

Compuesto 3: 26-O-acetil-colestan-4, 22-dien-3-ona ($C_{29}H_{42}O_4$).

Espectro de RMN- ^{13}C ($CDCl_3$, 75,5 MHz) δ (ppm): 200,1 (C-3); 179,8 (C-5); 123,8 (C-4); 80,6 (C-16); 109,3 (C-22).

El componente mayoritario **2** presenta cuatro señales: dos dobletes a 0,77 y 0,96 ppm, y dos singletes a 0,80 y 1,24 ppm, asignados a los metilos de los carbonos C-27, C-21, C-18 y C-19, respectivamente. Una señal a 5,67 ppm del protón vinílico del sistema 4-en-3-ona (16,17), justificado por las señales RMN- C^{13} a 123,8, 179,8 y 200,1 ppm. Una señal a 2,1 ppm se asigna a un grupo acetilo, lo cual implica la apertura del anillo F, ya que la señal en el espectro de RMN- C^{13} a 109,2 ppm es característica de esteroides tipo furostano (18,19,20). El compuesto **2** conserva la estructura de tipo furostanol, ya que la señal 3,39 ppm puede asignarse al protón del C-16, co-

robado con la señal a 80,69 ppm (18,19).

El compuesto 3 sólo se detectó en vestigios, y, por las señales en el espectro de RMN-C¹³ a 109,3 y 153,4 ppm, se corrobora el doble enlace entre los carbonos C-20 y C-22. De acuerdo con los datos espectrales obtenidos por RMN-C¹³, RMN-H¹ y el análisis realizado a éstos, se pueden proponer las estructuras como las correspondientes a los compuestos obtenidos por degradación de la diosgenona en las condiciones dadas (ver figura 1).

Actividad antimalárica de la mezcla de los compuestos 2 y 3

Comportamiento de los controles negativos

Debido a que el análisis final de esta investigación comparó el promedio de parasitemia de los pozos tratados con la

mezcla de los compuestos 2 y 3, con el promedio de parasitemia de los pozos con control negativo, es importante analizar el comportamiento de dicho control, cuyos datos estadísticos se presentan en la tabla 1. De un experimento a otro hubo notoria oscilación y una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de parásitos de los dos controles ($F = 571,22; p = 0,0000$), motivo por el cual los resultados de los dos experimentos se presentan por separado: los datos del ensayo con la mezcla de los compuestos 2 y 3 en el experimento 1 se contrastan con el control 1, y en el experimento 2 se comparan con el control 2. Estas diferencias en el comportamiento del parásito en los controles eran esperadas, según nuestra experiencia de más de diez años de trabajo con la cepa FCB-2, por lo cual siempre se usa un control actual para cada experimento; esto parece ser parte de la variación biológica del parásito.

Tabla 1. Porcentaje de parasitemia en los controles negativos de los dos experimentos con la mezcla de compuestos 2 y 3 obtenidos de diosgenona (compuesto 1)

Variable	Control 1	Control 2
Tamaño de la muestra	72	72
Media aritmética	1,438	2,835
Varianza	0,095	0,151
Desviación estándar	0,308	0,388
Error estándar	0,036	0,045
Coefficiente de variación	21,5%	13,7%

Comportamiento de la mezcla de los compuestos 2 y 3

En la tabla 2 se aprecian las estadísticas sobre la parasitemia cuando los parásitos fueron tratados con la mezcla de los compuestos 2 y 3, en cada uno de los dos experimentos. En el experimento 2, el promedio de parásitos en los pozos con tratamiento fue de más del triple del promedio en el experimento 1, con una diferencia estadísticamente significativa ($F = 106,14$; $p = 0,0000$).

Los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2 muestran un efecto antimalárico para la mezcla de los compuestos 2 y 3: en el experimento 1, el control tiene 1,43%, y los pozos tratados poseen en promedio 0,523%; por su parte, en el experimento 2, los controles tienen 2,83%, y los pozos tratados presentan en promedio 1,784%. Esta diferencia entre los promedios de los controles y de los pozos tratados es muy significativa en ambos experimentos (ex-

perimento 1: $F = 191,51$; $p = 0,0000$; experimento 2: $F = 48,48$; $p = 0,000$).

Al considerar la parasitemia en función de la dosis o concentración de la mezcla de los compuestos 2 y 3, se obtienen los resultados que se presentan en la tabla 3, en la cual puede apreciarse que en cualquiera de los diez pozos, la concentración de la mezcla de los compuestos 2 y 3 es mucho mayor en el experimento 1 que en el 2, en una relación de 3,5 a 1. En el experimento 1, es claro que hasta el pozo 9 (la mezcla de los compuestos 2 y 3: 0,38 mg/100 mL) el promedio de cada concentración tiene una gran diferencia con respecto al control negativo. En el experimento 2, es evidente que hasta el pozo 5 (concentración de la mezcla de los compuestos 2 y 3: 1,17 mg/100 mL) el promedio de cada concentración difiere en forma marcada con respecto al control negativo. Además, debe apreciarse que la diferencia entre los pozos control y los pozos tratados oscila en torno a la mis-

Tabla 2. Porcentaje de parasitemia en los pozos tratados con la mezcla de compuestos 2 y 3, obtenida de la diosgenona (compuesto 1), según experimento

Medida	Experimento 1	Experimento 2
Muestra	120	120
Promedio	0,523	1,784
Varianza	0,254	1,544
Desviación estándar	0,504	1,243
Error estándar	0,046	0,113
Coefficiente de variación	96,4%	69,6%

Tabla 3. Promedio de parasitemia (porcentaje) en cada concentración de la mezcla de compuestos 2 y 3 (mg/100 mL) y en el control negativo, según el experimento

Experimento 1

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	1,26	1,335	1,313	1,455	1,395	1,372	1,312	1,477	<u>1,470</u>	1,267
Comp. 2 y 3	0,03	0,065	0,102	0,140	0,220	0,497	0,795	1,111	<u>1,045</u>	1,222
[Comp. 2 y 3]	95,76	47,88	<u>23,94</u>	11,97	5,98	2,99	1,50	0,75	0,38	0,19

Experimento 2

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	2,820	2,888	2,963	2,783	<u>3,135</u>	2,933	2,880	2,790	2,790	3,008
Comp. 2 y 3	0,015	0,023	0,235	1,256	<u>2,251</u>	2,685	2,913	2,835	3,015	2,615
[Comp. 2 y 3]	<u>27,27</u>	13,64	6,82	3,41	1,17	0,85	0,43	0,22	0,11	0,05

[Comp. 2 y 3]: concentración de la mezcla de compuestos 2 y 3 en cada pozo.

ma concentración: 1,17 a 1,50 mg/100 mL. Las diferencias de parasitemia por concentración son estadísticamente significativas, es decir, debe aceptarse que el promedio de parásitos no es el mismo en todas las concentraciones (experimento 1: $F = 90,317$; $p = 0,0000$; experimento 2: $F = 200,610$; $p = 0,0000$).

El análisis de correlación (en cada uno, $n = 192$, con 11 concentraciones, incluyendo la concentración cero) mues-

tra que en cada experimento hay correlación negativa entre las variables de parasitemia y de concentración de la mezcla de los compuestos 2 y 3, lo cual indica que, a medida que aumenta la concentración del antiparasitario, se reduce la parasitemia. Las ecuaciones de regresión lineal ajustadas ($Y = a - bX$) a los datos de cada experimento son las siguientes, donde Y es parasitemia y C es concentración de la mezcla de los compuestos 2 y 3:

Exp.	Ecuación	r	R ²
1	Parasitemia = 1,047 - [0,015 (Concentración)]	-0,603	36%
2	Parasitemia = 2,116 - [0,128 (Concentración)]	-0,809	65%

Los valores del estadígrafo F para los coeficientes "a" y "b" de cada experimento fueron altamente significativos (experimento 1: para a: $F = 26,1681$, $p = 0,0000$; para b: $F = -10,4431$, $p = 0,0000$; experimento 2: para a: $F = 49,0354$, $p = 0,0000$; para b: $F = -18,9676$, $p = 0,0000$).

Llama la atención que la pendiente (coeficiente "b") del experimento 1 tiene la mitad del valor de la del experimento 2, lo cual concuerda con el hecho de que la concentración de la mezcla de los compuestos 2 y 3 en el experimento 1 es 3,5 veces mayor que la del experimento 2.

Si $Y = a + b.C$, entonces $C = (Y - a)/b$. Si se recuerda que la parasitemia inicial fue de 1%, puede calcularse la concentración de compuestos que se requiere para reducir la parasitemia en un 50% (rebajarla a 0,5%), o

sea, calcular la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}). Hechas las operaciones, se obtiene que la CI_{50} en el experimento 1 es de 1,28 mg/100 mL, que equivalen a 12,8 ppm (31,19 μM), mientras en el experimento 2 es de 0,51 mg/100 mL, o 5,1 ppm (12,4 μM).

En resumen, la mezcla de los compuestos 2 y 3 mostró actividad antimalárica *in vitro* contra la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum*, expresada en una reducción del crecimiento parasitario de 37 a 64%, a la cual corresponde una IC_{50} de 5,1 a 12,8 ppm (12,4 a 31,2 μM). A pesar del comportamiento no homogéneo de la mezcla de los compuestos 2 y 3 en los dos experimentos, en ambos hay aspectos comunes de suma importancia, como que la actividad antimalárica se observó inequívocamente en ambos y que en los dos hay una clara relación dosis-respuesta, de tal

forma que al incrementarse la dosis de los compuestos, se reduce la parasitemia. Es claro que se requiere de más investigación que permita aclarar problemas existentes. Sin embargo, no caben dudas sobre el carácter promisorio de la planta *Solanum nudum* como posible fuente de antimaláricos y, en particular, de sus productos la diosgenona y sus derivados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a la Universidad de Antioquia por el financiamiento de este trabajo, y al estudiante Carlos Cárdenas por su colaboración en el manuscrito.

REFERENCIAS

1. Padilla, J.C. (1998). Tratamiento de la malaria en Colombia. *Infectio* (Asociación Colombiana de Infectología) **2** 49.
2. Restrepo, A.; Álvarez, L.; Restrepo, M. (1980). Estudio *in vivo* de la resistencia del *P. falciparum* a la cloroquina en Colombia. *Acta Médica Colombiana* **5** 367-379.
3. Blair, S. (1986). Resistencia de *Plasmodium falciparum* a las drogas en Colombia 1961-1986. *Biomédica* **6** 95.
4. Blair, S.; Lacharme, L.; Carmona, J.; Tobón A. (1999). Resistencia de *Plasmodium falciparum* a los tratamientos antimaláricos en Urabá y Bajo Cauca antioqueño, 1998. *Rev Epidemiol Antioquia* **24** (3-4) 207-216.
5. Blair, S.; Lacharme, L.; Carmona, J.; Tobón, A. (2001). Resistencia de *Plasmodium falciparum* a tres fármacos antimaláricos en Turbo (Antioquia, Colombia), 1998. *Revista Panamericana de Salud Pública* **9** (1) 23-29.
6. Osorio, L.E.; Giraldo, L.E.; Grajales, L.F.; Arriaga, A.L.; Andrade A.L.S.; Ruebush II, T.K.; *et al.* (1999). Assessment of Therapeutic Response of *Plasmodium Falciparum* to Chloroquine and Sulfadoxine-Pyrimethamine in an Area of Low Malaria Transmission in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* **61** (6) 968-972.
7. Espinal-Zapata, D. 1995. Sapogeninas esteroideas en *Solanum nudum*. Tesis de posgrado. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 85 pp.
8. Sáez, J.; Espinal, D.; Blair, S.; Madridrigal, B.; Martínez, A. (1994). Diosgenona natural en fracción de hexano de *Solanum nudum* (*Solanaceae*). *Química, Actualidad y Futuro* **4** 35.
9. Sáez, J.; Cardona, W.; Espinal, D.; Blair, S.; Mesa, J.; Bocar, M.; Josang, A. (1998). Five New Steroids from *Solanum nudum*. *Tetrahedron* **54** 10771.
10. Trager, W.; Jensen, J.B. (1976). Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science.* **193** 674.
11. Rieckmann, K.H.; Campbell, G.H.; Sax, L.J.; Mrema, J.E. (1978).

- Drug Sensitivity of *Plasmodium falciparum*: an *in vitro* Microtechnique. *Lancet* **1** 22.
12. Cruz-Mancipe, D.E.; Fuenmayor-Peláez, D.A. (1989). *Evaluación in vitro de la actividad antimalárica de extractos vegetales*. Trabajo de grado, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 80 pp.
 13. Espinal, C.A.; Moreno, E.; Guerra, P.; De la Vega, P. (1982). Aislamiento y caracterización de cepas colombianas de *Plasmodium falciparum*. *Biomédica* **2** (1) 118-128.
 14. Maron, D.N.; Ames, B. (1983). Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. *Mutation Research* **113** 173-215.
 15. Deharo, E.; Gautret, Ph.; Muñoz, V.; Sauvin, M. (2000). *Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas*. Cytel-IRD, La Paz: (Bolivia), p. 61.
 16. Achenbach, H.; Hubner H.; Reiter, M. (1996). Cholestane and Pregnane-Type Glycosides from the Roots of *Tribulus cistoides*. *Phytochemistry* **41** 907.
 17. Oger, J.M. (1991). Steroids from *Neosiphonia superts*, a Marine Fossil Sponge. *J Natural Products* **54** 273.
 18. Peng, J.; Yao, X.; Kobayashi, H.; Ma, C. (1995). Novel Furostanol Glycosides from *Allium macrostemon*. *Planta Médica* **61** 58.
 19. Sharma, S.C.; Thakur, N.C. (1996). Oligofurostanoides and oligopirostanoides from Roots of *Asparagus filicinus*. *Phytochemistry* **41** 599.
 20. Morales, A.; Riera, C.; Moreno, L. (1974). Componentes del *Solanum tovarense bitter*. *Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes, Mérida (Venezuela)* **15** 133.