

EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LA *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

Golfer Muedas Taipe^{*b}, Adolfo La Rosa Toro Gómez^a, Juana Robles Caycho^b

RESUMEN

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó aplicando dos métodos: el método químico, mediante la neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y el método electroquímico, empleando la voltametría cíclica. Se evaluaron el extracto alcohólico (EBO) de corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. y las fracciones derivadas del EBO: hexano, acetato de etilo, metanol, acuoso e insolubles. Además, se emplearon como estándares 4 polifenoles sintéticos: quercetina, rutina, hidroxianisol butilado (BHA) y resorcinol.

Según el análisis por DPPH, la quercetina y la rutina presentaron una mayor actividad antioxidante (84,08 y 83,83 %, respectivamente) en comparación al resorcinol y BHA que mostraron una actividad menor a 72 %. El EBO presentó una buena actividad antioxidante de 87,02 % así como las fracciones acetato de etilo (88,52 %) e insoluble (84,83 %). Según estos resultados, el extracto y las fracciones evaluadas se clasificaron en el grupo G-IV. La fracción acuosa presentó una actividad de 70,41 % (G-III) y las fracciones de metanol y hexano presentaron una baja actividad antioxidante menores al 7 % (G-I).

En el análisis electroquímico por voltametría cíclica (electrodo referencia Ag/AgCl), los polifenoles sintéticos presentaron un potencial de oxidación entre 0,156 y 0,638 V, donde la quercetina presentó el menor valor. El EBO presentó bajo potencial de oxidación, de 0,171 V, mientras que las fracciones mostraron un potencial de oxidación entre 0,147 y 0,494 V, donde el menor valor corresponde a la fracción acetato de etilo. El voltamograma cíclico (VC) no presentó ningún pico de oxidación para la fracción hexano.

Comparando los potenciales de oxidación y las propiedades antioxidantes, se concluye que a muy bajo potencial de oxidación (entre 0,14 y 0,15 V), los compuestos polifenólicos presentaron una buena actividad antioxidante (entre 84 y 88 %).

Palabras clave: antioxidante, voltametría cíclica, potencial de oxidación, *Bauhinia guianensis*.

^a Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210-Rimac, Lima 25, Perú, golfermt95@hotmail.com.

^b Departamento de Ciencias-Sección Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801, San Miguel, Lima 32, Perú.

ELECTROCHEMICAL EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ALCOHOLIC EXTRACT OF *Bauhinia guianensis* var. **kuntiana** Aubl.

ABSTRACT

The evaluation of the antioxidant activity was carried out using two methods: the chemical method, by neutralizing free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the electrochemical method, using cyclic voltammetry. The alcoholic extract (EBO) was evaluated from the bark of the *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. and fractions derived from the EBO: hexane, ethyl acetate, methanol, water and insoluble. Furthermore, 4 synthetic polyphenols standards were used: quercetin, rutin, butylated hydroxyanisole (BHA) and resorcinol.

According to the analysis by DPPH, the rutin and quercetin showed more antioxidant activity (84,08 and 83,83 % respectively) compared to resorcinol and BHA that showed less than 72 %. The EBO showed a good antioxidant activity of 87,02 % and ethyl acetate (88,52 %) and insoluble (84,83 %) fractions. According to these results, alcoholic extract and its fractions tested were classified in group G-IV. The aqueous fraction presented an activity of 70,41 % (G-III) and fractions of methanol and hexane showed a low antioxidant activity of less than 7 % (G-I).

In the electrochemical analysis by cyclic voltammetry (reference electrode Ag/AgCl), the synthetic polyphenols showed an oxidation potential between 0,156 and 0,638 V, where the quercetin presented the lowest value. The EBO presented a lower value of oxidation potential of 0,171 V, while the fractions showed an oxidation potential between 0,147 and 0,494 V, where the lowest value showed corresponds to fractions of ethyl acetate. The cyclical voltamograms (VC) did not present any oxidation peaks for the hexane fraction.

Comparing the potential of oxidation and antioxidant properties, we conclude that at a very low potential of oxidation (between 0,14 and 0,15 V), polyphenolic compounds showed a good antioxidant activity (between 84 and 88 %).

Key word: antioxidant, cyclic voltammetry, oxidation potential, *Bauhinia guianensis*.

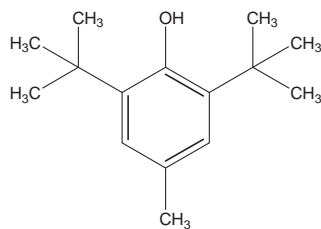
INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser usados en la industria de alimentos, cosméticos y en la atención de la salud para prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres en nuestro organismo.¹

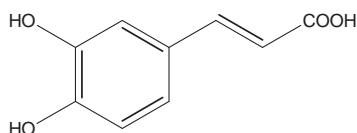
Los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales oxidables. Por el modo de acción, los podemos clasificar a los antioxidantes como: primarios (interrumpen la reacción en cadena generando un radical menos activo) y secundario (o preventivo).²

Antioxidantes primarios; que interrumpen la fase de propagación de procesos radicalarios, tenemos a los agentes captadores de radicales (radical scavengers) como los

fenoles, cuya estructura, en general, debe poseer dos características importantes: la presencia de sustituyentes voluminosos en las dos posiciones vecinas al hidroxilo y en la posición *para* la presencia de algún grupo que contribuya a la deslocalización del electrón desapareado, tales son el BHT y el ac. cafeico.



Butilhidroxitolueno (BHT)

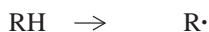


Ácido cafeico

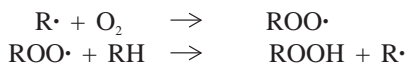
a) Antioxidante secundarios o preventivos; como los agentes quelantes, los que actúan atrapando a los cationes metálicos que intervienen en la descomposición del peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo; evitando así la formación de estos últimos. En este grupo tenemos a la penicilamina, EDTA, y el profármaco dexrazoxano.

Los ácidos grasos, presentes en las membranas celulares, son fácilmente oxidados tanto por peroxidación enzimática como autooxidativa debido a las reacciones en cadena de los radicales libres. Estas reacciones constan de las siguientes etapas:

Iniciación (etapa I)



Propagación (etapa II)

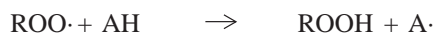


Terminación (etapa III)



Una sustancia retarda las acciones de oxidación cuando inhibe la formación de radicales libres en la etapa de iniciación (etapa I) o cuando interrumpe la propagación (etapa II) de la cadena de radicales libres.³

Uno de los estudios más importantes sobre la acción de los antioxidantes postula que éstos inhiben la reacción en cadena actuando como donadores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres, y concluye que el aceptor de radicales libres (antioxidante: AH) reacciona sobre todo con el $\text{ROO}\cdot$ y no con los radicales libres $\text{R}\cdot$ en una reacción denominada reacción de inhibición:



La eficacia de un antioxidante está relacionada con muchos factores, como la energía de activación, constantes de velocidad, potencial de óxido-reducción, solubilidad del antioxidante, etc. Por lo tanto, la eficacia del antioxidante (AH) aumenta al disminuir la fuerza del enlace AH.³

Los antioxidantes fenólicos ocupan una situación privilegiada, pues son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno y además, sus radicales intermediarios son relativamente estables.³

Los compuestos fenólicos son de ocurrencia natural en plantas y de mucho interés como protectores de sistemas biológicos contra la oxidación.⁴ Estos compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Dada la naturaleza aromática de los compuestos fenólicos ellos muestran intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo.⁵

Jovanovic *et al.*⁶ estudiaron las propiedades antioxidantes de los flavonoides, basados en la propiedades espectrales, ácido-base y rédox de los radicales fenólicos derivados de los flavonoides seleccionados como catequinas, hesperetina, hesperidina, quercetina, rutina, kaempferol, entre otros.

En otro trabajo realizado por Born *et al.*⁴, utilizaron tres pruebas para la evaluación de la actividad antioxidante: inhibición de oxidación de proteínas e inhibición de peroxidación de lípidos, y un tercer método electroquímico basado en la medición del potencial rédox. Como resultado de este trabajo, se obtuvo que los compuestos catecoles (quercetina, verbascosida, ácido clorogénico, mangiferina y 1,3,6,7-tetrahidroxixantona) presentan buena actividad antioxidante.

Kook *et al.*⁷, reportaron procedimientos para evaluar la actividad antioxidante de aproximadamente 700 plantas de diversas familias. Los métodos más utilizados fueron: método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y método de actividad para inhibición de xantina/xantina-oxidasa. En particular varios compuestos flavonoides y otros compuestos polifenólicos fueron aislados de extractos de plantas mediante el fraccionamiento guiado por bioensayos e identificados como potentes antioxidantes.

En la presente investigación se busca la relación estructura-propiedad-actividad en las pruebas de antioxidantes de un grupo de polifenoles sintéticos y extracto alcohólico (EBO) de corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. y las fracciones derivadas del EBO, comparando su propiedad rédox y su actividad antioxidante.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

La corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. se colectó en la provincia de Maynas, Departamento de Loreto, en bosque primario del Puerto Almendras-Río Nanay, el 07 de diciembre del 2005.

La corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. se secó a temperatura ambiente en la provincia de Maynas, durante 8 días, disponiendo al inicio de nuestro trabajo, de suficiente material seco.

La muestra seca se pulverizó a grano fino, en un molino de platos en el Laboratorio de la Universidad Cayetano Heredia.

A partir de la muestra seca, se realizó la extracción etanólica, obteniendo un extracto bruto orgánico (EBO). Luego del fraccionamiento del EBO, se obtuvieron las fracciones de hexano (H), acetato de etilo (AE), metanol (M), acuosa (AC) e insoluble (I).

Los reactivos: rutina, quercetina, hidroxianisol butilado, resorcinol, el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil y los solventes utilizados fueron de grado *para análisis*. (figura 1).

Para el método de neutralización de radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) se ha utilizado el espectrofotómetro UV-Visible Agilent 8453E. Los voltamogramas cíclicos (VC) fueron obtenidos utilizando un potenciostato Pine Instruments AFRDE5E conectado a una tarjeta A/D Cassy 524010 y un sistema de tres electrodos compuesto de carbón vítreo (electrodo de trabajo), platino (electrodo auxiliar) y Ag/AgCl/KCl 3M (electrodo de referencia)

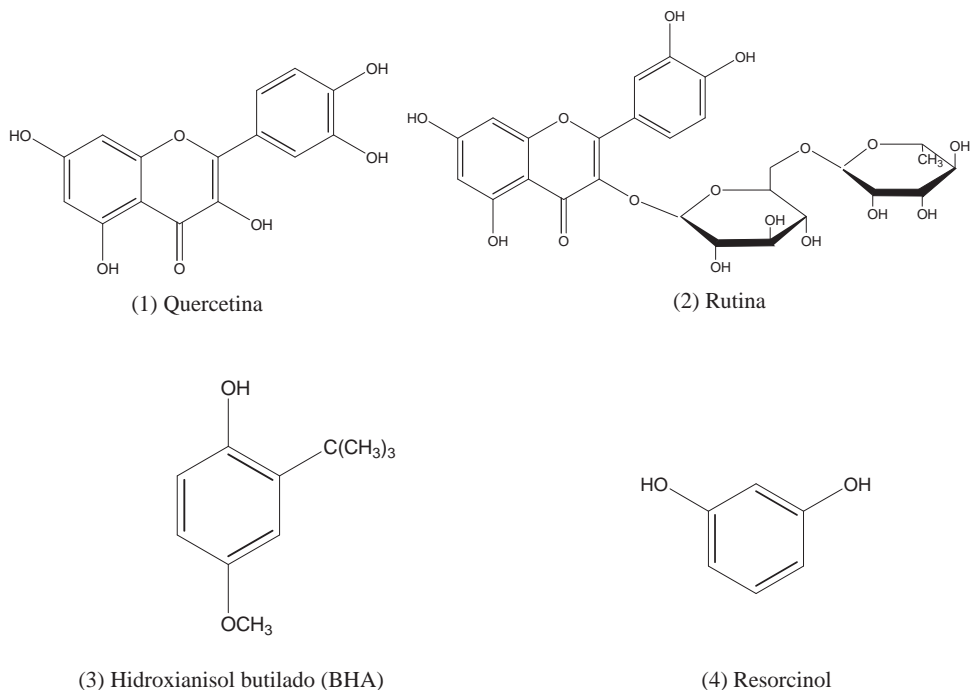


Figura 1. Estructura de polifenoles sintéticos

Los extractos fueron clasificados por su actividad antioxidante (% AA) a la concentración de 10 µg/mL:

Categoría	% AA a 10 µg/mL
G-I	(0 - 25 %)
G-II	(25,1 - 50 %)
G-III	(50,1 - 75 %)
G-IV	(75,1 % - más)

Voltametría cíclica

Esta técnica consiste en la evaluación del potencial rédox de los compuestos polifenólicos mediante la aplicación de un barrido de potencial, siendo posible cuantificar la respuesta dada en valores de corriente.

El EBO, fracciones del EBO y polifenoles sintéticos, se disolvieron a concentraciones de 0,3-1,0 mM, en solventes de etanol y un buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,4 (1:1). Las soluciones fueron purgadas con N₂ realizándose los experimentos en atmósfera inerte. Se obtuvieron los voltamogramas cíclicos (VC) a una velocidad de barrido de 50 mV/s. El carbón vítreo fue pulido antes de cada experimento utilizando una lija N° 1200 con la que se elimina la película polimérica formada durante el barrido potencioestático; la reproducibilidad del potencial del pico voltamétrico es del orden de ± 0,1 V, dependiendo del pretratamiento del carbón vítreo. Para cada compuesto se han obtenido varios (VC) y el pico de potencial de oxidación reportado en el presente trabajo fue tomado del pico con el potencial más bajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método de neutralización del radical libre DPPH

Según el método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), a la concentración de 10 µg/mL, la quercetina y la rutina mostraron una mayor actividad antioxidante (84,08 y 83,83 %, respectivamente) en comparación al BHA y resorcinol que presentaron una actividad antioxidante de 71,49 % y 12,98 % (tabla 1).

Tabla 1. Actividad antioxidante de estándares

Estándar	Código de estándar	Peso de fracciones (mg)	Concentración (µg/mL)	Actividad antioxidante (%)
Quercetina	QUER	5,0	10	84,08
			50	87,63
Rutina	RUT	5,1	10	83,83
			50	84,79
Hidroxianisol butilado	BHA	5,0	10	71,49
			50	86,12
Resorcinol	RESOR	5,0	10	12,98
			50	35,79

Según la tabla 2, el EBO presentó una alta actividad antioxidante de 87,02 %. Asimismo, la fracción acetato de etilo e insoluble mostraron una actividad antioxidante de 88,52 y 84,83 %, respectivamente. Según los porcentajes de actividad y la clasificación de extractos, el EBO y las fracciones mencionadas se clasifican en el grupo G-IV (75,1 % a más, clasificación de extractos por su actividad antioxidante a la concentración de 10¹ g/mL).

Tabla 2. Actividad antioxidante del extracto etanólico (EBO) y fracciones

Nombre científico	Código de muestra	Peso de fracciones (mg)	Concentración (? g/mL)	Actividad antioxidante (%)
<i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	1865 EBO	5,0	10	87,02
			50	93,14
	1865 AE	5,0	10	88,52
			50	92,92
	1865 I	5,0	10	84,83
			50	91,79
	1865 AC	5,1	10	70,41
			50	91,27
	1865 M	5,1	10	6,92
			50	69,76
	1865 H	5,0	10	-12,98
			50	-8,09

El análisis de DPPH para la fracción acuosa, reporta una actividad antioxidante de 70,41%, clasificándose en el grupo G-III. Las fracciones metanol y hexánica presentan una baja actividad antioxidante (menor a 7 %) y se clasifican en el grupo G-I.

Método por voltametría cíclica

Primer grupo de compuestos: Catecoles. Este primer grupo de compuestos está formado por la quercetina (1) y la rutina (2). Estos compuestos tiene en común un grupo catecol (dos -OH adyacentes), el cual es electroquímicamente activo.

Cuando se examinó a una velocidad de barrido de 50 mV/s, estos compuestos mostraron un pico de oxidación a un potencial E_{pa} más bajo que 0,3 V.

En el voltamograma cíclico (VC), la quercetina (figura 2) presentó un E_{pa} de 0,156 V debido a la oxidación de los -OH del grupo catecol, mientras que la rutina mostró un E_{pa} de 0,027 V.

La rutina presentó un potencial de oxidación ligeramente más alto que la quercetina, debido a la influencia del sustituyente en el C-3 de la rutina. (tabla 3).

Segundo grupo de compuestos: Fenoles. El segundo grupo está formado por el hidroxianisol butilado, BHA (3) y el resorcinol (4). Estos compuestos tienen al menos un grupo fenólico y mostraron un pico de oxidación a un potencial E_{pa} que varía entre 0,4–0,7 V.

En los voltamogramas cíclicos, el BHA presentó un E_{pa} de 0,618 V debido al grupo fenólico presente en la estructura.

El resorcinol (figura 3) muestra un E_{pa} de 0,638 V, debido a la presencia del grupo fenólico (1,3-dihidroxi).

Tabla 3. Potencial de oxidación de los polifenoles sintéticos medidos bajo condiciones estándar

Estándar	Código de estándar	Potencial de oxidación E_{pa} (V)
Quercetina	QUER	0,156
Rutina	RUT	0,227
Hidroxianisol butilado	BHA	0,618
Resorcinol	RESOR	0,638

* Condiciones estándar: Buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,4/EtOH 1:1 (v/v); electrodo de trabajo y auxiliar de carbono cristalino (GC) y electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 M; velocidad de barrido: 50 mV/s.

Según el voltamograma cíclico (VC) (figura 4), el extracto alcohólico (EBO) con un potencial de oxidación E_{pa} de 0,171 V pertenece al primer grupo, por lo que presenta compuestos con grupos catecólicos.

Según la tabla 4, las fracciones derivadas del EBO: fracciones de acetato de etilo e insoluble, presentan un potencial de oxidación E_{pa} menor a 0,2 V (figuras 5 y 6), por lo que son clasificados dentro del primer grupo (catecólicos).

El VC de la fracción acuosa muestra un E_{pa} de 0,494 V, clasificándose dentro del segundo grupo (fenólicos).

La fracción de hexano (figura 7), según el VC, no presentó ningún pico de oxidación, por lo que esta fracción es electroquímicamente inactiva.

Tabla 4. Potencial de oxidación del extracto etanólico (EBO) y fracciones medidos bajo condiciones estándar

Nombre científico	Código de muestra	Potencial de oxidación E_{pa} (V)
<i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	1865 EBO	0,171
	1865 AE	0,147
	1865 I	0,174
	1865 AC	0,494
	1865 H	Sin picos

* Condiciones estándar: Buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,4/EtOH 1:1 (v/v); electrodo de trabajo y auxiliar de carbono cristalino (GC) y electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 M; velocidad de barrido: 50 mV/s.

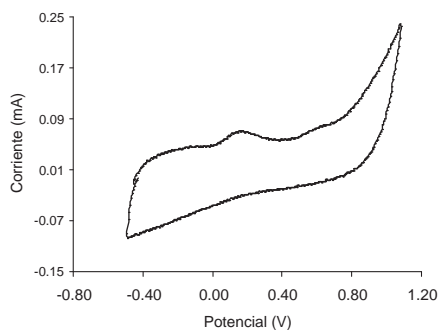


Figura 2. Voltamograma cíclico de la quercetina en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v)

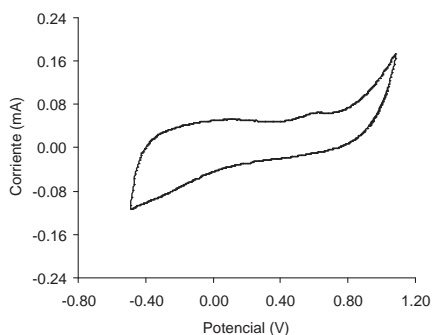


Figura 3. Voltamograma cíclico del resorcinol en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v)

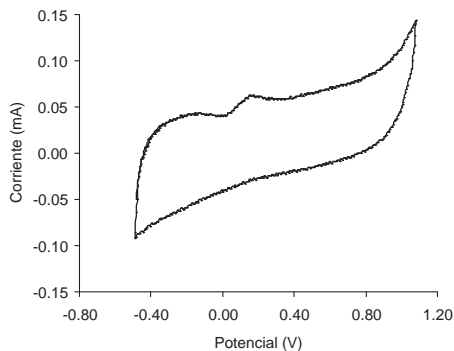


Figura 4. Voltamograma cíclico del extracto etanólico (1865 EBO) en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v)

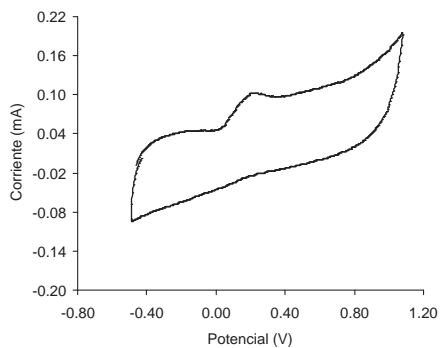


Figura 5. Voltamograma cíclico de la fracción de acetato de etilo (1865 AE) en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v)

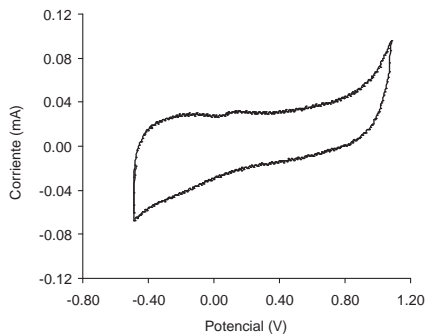


Figura 6. Voltamograma cíclico de la fracción de insoluble (1865 I) en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v)

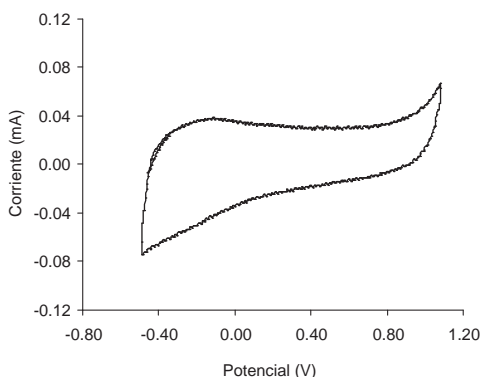


Figura 7. Voltamograma cíclico de la fracción de hexano (1865 H) en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v)

Los compuestos examinados mostraron una relación cualitativa entre la estructura molecular, el primer potencial de oxidación y la actividad antioxidante.

La clasificación química en catecoles, fenoles y no fenoles, está relacionada con la medición de su potencial de oxidación por voltametría cíclica y en la actividad antioxidante según el análisis por DPPH.

El primer grupo examinado corresponde a los catecoles, quienes mostraron un potencial de oxidación más bajo que 0,3 V. Estos compuestos fueron también los más activos en la prueba de antioxidantes de DPPH (tablas 5 y 6).

El segundo grupo analizado corresponde a los fenoles quienes mostraron un potencial de oxidación mayor a 0,4 V.

Tabla 5. Relación entre el potencial de oxidación y actividad antioxidante de los polifenoles sintéticos

Grupo	Estándar	Código de estándar	Potencial de oxidación E_{pa1} (V)	Actividad antioxidante AA (%)
Grupo 1 Catecoles	Quercetina	QUER	0,156	84,08
	Rutina	RUT	0,227	83,83
Grupo 2 Fenoles	Hidroxianisol butilado	BHA	0,618	71,49
	Resorcinol	RESOR	0,638	12,98

Tabla 6. Relación entre el potencial de oxidación y actividad antioxidante del EBO y fracciones

Grupo	Muestra	Código de muestra	Potencial de oxidación E_{pa1} (V)	Actividad antioxidante AA (%)
Grupo 1 Catecoles	Extracto bruto orgánico	1865 EBO	0,171	87,02
	Acetato de etilo	1865 AE	0,147	88,52
	Insoluble	1865 I	0,174	84,83
Grupo 2 Fenoles	Acuoso	1865 AC	0,494	70,41
Grupo 3 No fenoles	Hexano	1865 H	Sin picos	-12,98

CONCLUSIONES

- La evaluación de la actividad antioxidante se realizó aplicando dos métodos: el método químico, mediante la neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y el método electroquímico, empleando la voltametría cíclica.
- Se evaluaron el extracto alcohólico (EBO) de corteza de la *Bauhinia guianensis* var. kuntiana Aubl. y las fracciones derivadas del EBO: hexano, acetato de etilo, metanol, acuoso e insolubles, empleando como estándares 4 polifenoles sintéticos: quercetina, rutina, hidroxianisol butilado (BHA) y resorcinol.
- Según el análisis por DPPH, la quercetina y la rutina presentaron una mayor actividad antioxidante (84,08 y 83,83 %, respectivamente) en comparación al resorcinol y BHA, que mostraron una actividad menor a 72 %. El EBO presentó una buena actividad antioxidante de 87,02 % así como las fracciones acetato de etilo (88,52 %) e insoluble (84,83 %). Según estos resultados de DPPH, el extracto y las fracciones evaluadas se clasificaron en el grupo G-IV (75,1 % a más, clasificación de extractos por su actividad antioxidante a la concentración de 10 ì g/mL). La fracción acuosa presentó una actividad de 70,41 % (G-III) y las fracciones de metanol y hexano presentaron una baja actividad antioxidante, menores al 7 % (G-I).
- En el análisis electroquímico por voltametría cíclica (electrodo referencia Ag/AgCl), los polifenoles sintéticos presentaron un potencial de oxidación entre 0,156 y 0,638 V, donde la quercetina presentó menor valor de potencial de oxidación (presencia de grupo catecol). El EBO presentó bajo potencial de oxidación, de 0,171 V, mientras que las fracciones mostraron un potencial de oxidación entre 0,147 y 0,494 V, donde el menor valor corresponde a la fracción acetato de etilo.
- Comparando los potenciales de oxidación y las propiedades antioxidantes, se concluye que a muy bajo potencial de oxidación (entre 0,14 y 0,15 V), los compuestos polifenólicos, el EBO y sus fracciones, presentaron una buena actividad antioxidante (entre 84 y 88 %).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Departamento de Ciencias - Sección Química, de la Pontificia Universidad Católica del Perú y a la Facultad de Ciencias - Laboratorio de Electroquímica, de la Universidad Nacional de Ingeniería, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo; Al Instituto General de Investigación y al Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, por el apoyo económico brindado para la presentación de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castillo P., Lock O., *Rev. Soc. Quím. Perú* 2005; 71 (4): 227-236.
2. Castillo Romero P., Estudio Químico y de Actividad Antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.). Tesis de Maestría en Química - Mención en Productos Naturales. Lima, Perú: Escuela de Graduados, Pontificia Universidad Católica del Perú; 2004.
3. Chávez R., Plaza A., Lock O., *Revista de Química* 1996; 10 (1): 71-101.
4. Born M., Carrupt P., Zini R., Brée F., Tillement J., Hostettmann K., Testa B., *Helvetica Chimica Acta* 1996; 79: 1147-1158.
5. Lock Sing O., Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Lima: Fondo editorial PUCP; 1994.
6. Jovanovic S., Steenken S., Tomic M., Marjanovic B., Simic M., *J. Am. Chem. Soc.* 1994; 116: 4846-4851.
7. Kook L., Mbwambo Z., Chung HaSook, Luyengi L., Gamez E., Mehta R., Kinghorn D., Pezzuto J., *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 1998; 1: 35-46.
8. Cheeseman K., Slater T., *British Medical Bulletin* 1993; 49: 481-491.