

# ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL MUSGO *Polytrichum juniperinum*

Por

Johanna Morantes<sup>1</sup>, Catalina Prieto<sup>2</sup>, Edgar Linares<sup>3</sup>,  
Javier Rincón<sup>2</sup> & Fabio Aristizábal\*<sup>1</sup>

## Resumen

Morantes, J., C. Prieto, E. Linares, J. Rincón & F. Aristizábal: Análisis fitoquímico y de actividad biológica del musgo *Polytrichum juniperinum*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **31**(121): 473-479, 2007. ISSN 0370-3908.

Este trabajo constituye el primer estudio fitoquímico y de actividad biológica realizado para *Polytrichum juniperinum* en Colombia. En éste, se determinó que los principales metabolitos secundarios del extracto etanólico y de las fracciones aisladas de esta briofita son terpenos, polifenoles, cumarinas, moléculas glicosiladas y sacarosa. Por el Test de Irwin se estableció que ratones tratados con el extracto etanólico total o la fracción en diclorometano experimentaban trastornos motrices moderados y transitorios del SNC. Con bajas dosis del extracto y de la fracción hexánica se detectó una actividad depresiva. La actividad citotóxica de la fracción orgánica sobre MCF-7 y la fracción en diclorometano sobre HEp-2 y MKN-45 resultó promisoria. No se evidenció actividad antimicrobiana bajo las condiciones de ensayo.

**Palabras clave:** musgos, *Polytrichum juniperinum*, Test de Irwin, citotoxicidad *in vitro*, actividad antimicrobiana.

## Abstract

This is the first phytochemical and biological activity study made for *Polytrichum juniperinum* in Colombia. The principal secondary metabolites of the whole ethanolic extract and fractions obtained of this briophyta were terpenes, polyphenols, coumarins, glycosilated molecules and sucrose. By Irwin Test, the mice treated with the ethanolic extract or the dichloromethane fraction, show

<sup>1</sup> Grupo Farmacogenética del Cáncer, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Grupo Productos Bioactivos de Plantas Medicinales Colombianas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

\* Correspondencia: Fabio Aristizábal, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia, E-mail: faaristizabalg@unal.edu.co

slight and temporary affection in mobility and CNS activity. Also when the total extract and hexanic fractions, were used in low doses, the mice showed depressive activity. The cytotoxicity of organic fraction against MCF-7 and dichloromethane fraction against HEP-2 and HT-29 are promising. Antimicrobial activity was not evidenced in the conditions of test.

**Key words:** moss, *Polytrichum juniperinum*, Irwin Test, *in vitro* cytotoxicity, antimicrobial activity.

## Introducción

La búsqueda bioguiada de metabolitos biológicamente activos constituye una de las estrategias empleadas para el desarrollo de nuevos fármacos. Entre las fuentes de metabolitos se encuentran las plantas superiores, inferiores, organismos marinos, animales y artrópodos (Cordell *et al.*, 1991). La alta diversidad de especies vegetales en Colombia, la amplia gama de moléculas orgánicas que presentan y los reportes de interesantes propiedades biológicas, las hacen una de las principales fuentes de productos biológicamente activos (Pezzuto, 1997; Sanabria, 1997). Las briofitas (musgos y hepáticas) pertenecen al grupo de las plantas no vasculares, presentan entre sus metabolitos, flavonoides, terpenos, esteroides, compuestos fenólicos y en general una gran diversidad de estructuras químicas. *Polytrichum juniperinum*, objeto de este trabajo, es una briofita que pertenece a la familia Polytrichaceae, cosmopólita distribuida ampliamente en diferentes países de Europa, Asia y América y de la cual no existe un claro registro de sus principales metabolitos secundarios ni evidencias experimentales de las posibles actividades biológicas que estos presentan (Asakawa, 1990; Churchill *et al.*, 1995). Por lo anterior se decidió comenzar un estudio sistemático de los principales metabolitos secundarios de este musgo, así como el estudio bioguiado de su actividad biológica.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

El material fue recolectado en la vereda La Cumbre, San Francisco – Cundinamarca, en las coordenadas geográficas: 4°56'39" N, 74°18'38" E y a una altitud de 2100 m. La colección y determinación taxonómica fueron realizadas por el botánico E. Linares (No. 10073). Un ejemplar testigo se encuentra depositado en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales (COL 510107).

El material recolectado se secó durante 5 días a temperatura ambiente y finalizado este proceso se limpió.

Posteriormente se pulverizó mecánicamente empleando un molino de discos. Con el polvo obtenido, se realizó una extracción por percolación utilizando como solvente etanol al 96%. El solvente fue retirado del extracto a presión reducida utilizando un rotavapor y el residuo obtenido se secó al vacío utilizando un desecador.

### Análisis fitoquímico preliminar

Para determinar los principales grupos de metabolitos presentes en esta planta, el extracto etanólico (EE) y las fracciones obtenidas fueron analizadas usando diferentes reacciones de coloración, precipitación y cromatografía en capa delgada (CCD). Para el fraccionamiento del extracto etanólico, se emplearon solventes de diferente polaridad (hexano, diclorometano, metanol, butanol y agua); cada solvente se eliminó de las fracciones mediante el uso de rotavapor o liofilizando según el caso (Sanabria, 1983; CYTED, 1999).

### Aislamiento y purificación

La fracción en diclorometano (FD) (16,2 g), obtenida por partición del extracto etanólico, se purificó teniendo en cuenta que reveló la presencia de flavonoides, cumarinas y terpenos. Para ello se empleó una cromatografía en columna a vacío (CCV) la cual se preparó con 200 g de sílica gel 60 G y se eluyó con hexano, cloroformo y metanol, puros y en mezclas de polaridad creciente. Las sub-fracciones obtenidas fueron concentradas, pesadas y analizadas mediante CCD y posteriormente reunidas en grupos según sus perfiles cromatográficos. Las muestras con un rendimiento mayor a 100 mg, con mayor grado de pureza y que revelaron manchas propias de núcleos químicos de tipo polifenólico y terpénico, fueron purificadas mediante cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP). Algunas muestras se sometieron a una previa acetilación, para disminuir la polaridad y así facilitar su purificación. La acetilación se realizó con anhídrido acético y piridina seca en un reactor, a temperatura ambiente y agitando por 24 horas. Al terminar la reacción, la mezcla se puso en un embudo de decantación, se adicionó agua fría y luego cloroformo en una relación

1:3 para hacer la extracción. Para eliminar el exceso de piridina y de ácido de la fase orgánica, se realizaron lavados con ácido clorhídrico al 10 % y agua, finalmente esta fase se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró. La muestra fue purificada por CCDP, usando como fase estacionaria Sílica gel 60 G y como eluyente cloroformo:metanol en una relación 90:10. Los productos con mayor grado de pureza se sometieron a técnicas de identificación como: IR (Perkin Elmer 1600FT-IR), RMN (Bruker 400) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  uni- y bi- dimensional (DEPT, HOMOCOSY, HMQC Y HMBC) (Crews *et al.*, 1998).

## Estudios de actividad biológica

### Test de Irwin

La prueba se realizó con el extracto etanólico total (EE) y las fracciones hexánica (FH) y en diclorometano (FD) en dosis de 2000, 1000, 500 y 250 mg/Kg peso. El extracto y las fracciones se prepararon en una mezcla de agua destilada, glicerina y propilenglicol (8:1:1). Los productos se administraron por vía oral a ratones machos (cepa ICR) de 7-8 semanas de edad. Los parámetros del test fueron evaluados a los 0, 15, 30, 60 y 90 minutos y 2 y 24 horas (Irwin, 1962). Por cada tratamiento se usaron dos ratones control de la misma edad de experimentación a los que se les administró 0,3 mL del vehículo por vía oral.

Los ratones que fueron empleados para esta prueba fueron criados y mantenidos en el Bioterio del Departamento de Farmacia, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, con ciclos de 12h luz/12h oscuridad, temperatura  $21 \pm 1$  °C, agua y comida a libre demanda. Los procedimientos realizados en esta prueba siguieron los lineamientos éticos establecidos en las "Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud" establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

### Actividad antimicrobiana

Usando la metodología de difusión en gel, se evaluó de forma preliminar la actividad antimicrobiana del extracto EE, sobre *Bacillus subtilis* (bacilo Gram positivo), *Micrococcus luteus* (coco Gram positivo), *Escherichia coli* (bacilo Gram negativo), *Salmonella spp* (bacilo Gram negativo) y *Candida albicans* (levadura). Para realizar las valoraciones, el EE se suspendió en una mezcla de agua-DMSO (65:35) y partiendo de una solución madre de 200 mg/mL, se probaron diluciones de 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 mg/mL. Se incubaron durante 24 horas a 25°C para la levadura y durante 18 y 24 horas a 36°C para el resto de

microorganismos. Las valoraciones se realizaron por triplicado y en todos los casos se evaluó el efecto del vehículo.

El mantenimiento de las cepas y la preparación de los inóculos se realizaron de acuerdo a protocolos adaptados por Sanabria *et al.*, 2002.

### Actividad citotóxica

Para estas valoraciones se emplearon las líneas celulares de origen tumoral humano y de crecimiento adherente: HEP-2 (carcinoma de laringe), SiHa (carcinoma de cérvix), MKN-45 (carcinoma de estomago), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Las líneas se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> de área, con medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL. Se incubaron a 37°C, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa.

Para la evaluación de la actividad citotóxica, se emplearon los cultivos en un 90% de confluencia. Las células se tripsinizaron y se contaron en cámara de Neubauer usando azul de trypan al 0,4% y luego se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano en las siguientes densidades: MCF-7:  $1,5 \times 10^4$ ; MKN-45:  $1,6 \times 10^4$ ; HT-29:  $2 \times 10^4$ ; HEP-2:  $7,5 \times 10^3$ ; SiHa:  $1 \times 10^4$ . Tras un periodo de incubación de 24h, estas células se trataron durante 48h con el extracto total (EE) y las fracciones: hexánica (FH), en diclorometano (FD), metanólica (FM), butanólica (FB), acuosa (FW) y fase orgánica total obtenida a partir del extracto etanólico (FF). El extracto y las fracciones se disolvieron previamente en dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración inicial de 135 mg/mL. Al momento de tratar las células, se realizaron cinco diluciones seriadas en medio de cultivo, evaluando una concentración máxima de 270 µg/mL. Como control positivo de actividad se empleó doxorubicina HCl y se evaluó el efecto del vehículo (DMSO), el cual fue usado al 0,2% para evitar su interferencia en los resultados.

Como medida indirecta del efecto citotóxico, se cuantificó la viabilidad celular empleando el método de reducción del metil tiazol tetrazolio (MTT), establecido por Mosmann, 1983 y adaptado al laboratorio por Cordero *et al.*, 2002. Para este ensayo, se retiró el tratamiento y se reemplazó por 100 µL de una solución de MTT (0,25 mg/ml) en MEM sin suplementar y se incubó a 37°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el medio con el MTT no metabolizado y los cristales de formazán producidos por las células vivas y metabólicamente activas, se disolvieron en 100 µL de DMSO. Después de agitar por 5 minutos a 800 rpm, la absorbancia fue leída a 570 nm en un lector de placas BIORAD 550.

Los valores de absorbancia obtenidos se usaron para calcular y graficar el porcentaje de supervivencia celular en función del logaritmo de la concentración de los tratamientos. Empleando el programa estadístico SAS se calculó la concentración en la que el extracto o las fracciones causan la muerte al 50% de las células tratadas ( $CL_{50}$ ).

Los resultados se expresaron como el promedio de la  $CL_{50}$  de dos ensayos realizados en semanas diferentes y su respectiva desviación estándar (DS) ( $CL_{50} \mu\text{g/mL} \pm \text{DS}$ ).

## Resultados y discusión

### Estudio fitoquímico

De 2500g de material vegetal recolectado, se obtuvieron 2315g tras el secado y la molienda. De este material se extrajeron 93,8g de extracto etanólico seco, estableciéndose un rendimiento del 4% (relación entre material vegetal seco/molido y extracto obtenido). El rendimiento total del proceso de fraccionamiento del extracto fue del 85,4%, las fracciones FH, FW y FD mostraron el ma-

yor rendimiento con porcentajes del 33,8, 30 y 17,3%. El rendimiento de la fracción FB fue del 2,5% y el de la FM del 1,8%.

Los resultados del análisis fitoquímico preliminar muestran que *Polytrichum juniperinum* presenta entre sus metabolitos secundarios terpenos, flavonoides, cumarinas y moléculas glicosiladas y estos se distribuyen en las fracciones de acuerdo a su polaridad. Sobre el extracto y las fracciones poco polares se realizaron además ensayos para determinar la presencia de captadores de radicales libres. Usando los reveladores DPPH y  $\beta$ -caroteno, se observó que extracto etanólico y las fracciones FF, FH y FD, presentan manchas que dan positivo con ambos reveladores, lo que indica la presencia de sustancias captadoras de radicales libres, con un posible efecto antioxidante.

Pruebas para alcaloides, antraquinonas y glicosidos cardiotónicos resultaron negativas para esta planta (Tabla 1).

Del proceso de sub-fraccionamiento y purificación de la fracción en diclorometano se aislaron diferentes mues-

**Tabla 1.** Resultados del estudio fitoquímico preliminar de fracciones aisladas de *Polytrichum juniperinum*

COMPUESTOS	PRUEBA	FRACCIONES						
		EE	FW	FB	FF	FH	FD	FM
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-	-	-	-
	Reineckato	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	NP-PEG	+	-	+	+	-	+	+
Terpenoides	Godin	+	+	+	+	+	+	+
	Ácido Ortofosfórico	+	0	0	+	+	+	0
Lactonas sesquiterpénicas	Ácido Ortofosfórico	-	0	0	-	-	-	0
	Hidroxamato férrico	-	0	0	-	-	-	0
Cardenólidos	Raymond	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	UV	+	-	-	+	-	+	-
	Hidroxamato férrico	+	-	-	+	-	+	-
Captadores de Radicales libres	DPPH	+	0	0	+	+	+	0
	$\beta$ -caroteno	+	0	0	+	+	+	0

EE, extracto etanólico; FW, fracción acuosa; FB, fracción butanólica; FH, fracción hexánica; FM, fracción metanólica; FF, fracción orgánica; FD, fracción en diclorometano. (+): positivo, (-): negativo y (0): no evaluado.

tras con un alto grado de pureza, por análisis de IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , espectros HOMOCOSY y DEPT se logró determinar que estas muestras presentaron mezclas de estructuras aromáticas que corresponden en su mayoría a moléculas de tipo polifenólico.

Durante la concentración del extracto etanólico, un sólido denominado PJ-S1 precipitó en una cantidad relativamente alta y con un alto grado de pureza. Los análisis espectroscópicos IR y RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mostraron un comportamiento idéntico al descrito por Breitmaier *et al.*, 1987 para la sacarosa.

Como producto de la acetilación de una subfracción diclorometánica, se obtuvo el sólido PJ-Ac 12-41 FD. Usando diferentes pruebas de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMQC y HMBC) se determinó que este sólido corresponde a una mezcla donde el principal constituyente es un éster del ácido ftálico de cadena lineal. Los valores de los desplazamientos químicos para las señales del espectro de RMN, y que se relacionan con la porción alifática de la molécula aislada se presentan en la Tabla 2.

### Actividad biológica

#### Test de Irwin

Aunque la vía intraperitoneal se usa con mayor frecuencia para administrar los tratamientos en este tipo de ensayos, en este trabajo se empleó la vía oral pues el tamaño de partícula de la preparación no resultó lo suficientemente fino para usar la primera vía de administración. Los resultados de la prueba (Tabla 3), mostraron que los animales tratados con el extracto EE presentaron una alteración de la actividad motora moderada y transitoria, al igual que leves cambios en la conducta. Para las mayo-

**Tabla 2.** Valores de los Desplazamientos Químicos (ppm) para las señales del espectro de RMN de la Fracción PJ- Ac-12-41 FD aislada de *Polytrichum juniperinum*

CARBONO	▣ Carbono ppm	▣ Hidrógeno ppm
(CH <sub>2</sub> )	79.21	4.75
(CH <sub>2</sub> )	79.45	3.23
(CH <sub>2</sub> )	71.43	3.76
(CH <sub>2</sub> )	63.71	3.76
(CH <sub>2</sub> )	69.99	3.23
(CH <sub>2</sub> )	69.99	3.00
(CH <sub>2</sub> )	30.38	2.15
(CH <sub>2</sub> )	38.75	1.67

res dosis (1000 y 2000 mg/kg peso) se presentó una estimulación del SNC y depresión para las dosis más bajas (500 y 250 mg/Kg peso). Con todas las dosis se evidenció incoordinación motora, reflejada por el aumento del polígono de sustentación. A las 24h de administración no se presentó letalidad ni trastornos en el comportamiento de los animales tratados.

Con el fin de verificar si este comportamiento se mantenía a medida que se realizaba el fraccionamiento del extracto, se ensayaron las fracciones FD y FH. Estas se escogieron por su alto rendimiento. La respuesta de los animales (Tabla 3), frente a estos tratamientos, difiere para algunos parámetros, lo que sugiere que el fraccionamiento del extracto hace que la concentración de algunos metabolitos se aumente o disminuya. Posiblemente en algunos casos la pérdida del efecto está relacionada con sinergismos entre moléculas poco activas individualmente.

#### Actividad antimicrobiana

Los resultados obtenidos bajo las condiciones de este ensayo mostraron que el extracto EE no muestra activi-

**Tabla 3.** Resultados Test de Irwin de 3 productos aislados de *Polytrichum juniperinum*.

Muestra Dosis	Extracto Etanólico	Fracción Hexánica	Fracción en Diclorometano
250 mg /Kg	↓ Actividad motora	↓ Actividad motora Exoftalmia	---
500 mg /Kg	↓ Actividad motora ↑ Polígono sustentación Endoftalmia	---	Pasividad Adormecimiento Temor manipulación
1000 mg/Kg	↑ Actividad motora ↑ Polígono sustentación ↑ Erección cola	↓ Actividad motora Exoftalmia	Pasividad Adormecimiento Temor manipulación
2000 mg/Kg	↑ Actividad motora ↑ Polígono sustentación ↑ Erección cola	↓ Actividad motora ↓ Fuerza prensil ↓ Reacción alarma Fasciculaciones Temor.	↑ Actividad motora ↑ Curiosidad Temor

↑ Aumento de actividad; ↓ Disminución de actividad; --- No evaluado.

dad contra los microorganismos de prueba. Sin embargo, no debe descartarse del todo esta actividad, pues el ensayo realizado es una prueba preliminar.

Las fracciones y muestras puras aisladas no fueron evaluadas.

### Actividad citotóxica

#### Controles

Las líneas celulares mostraron ser sensibles a la Doxorubicina HCl, agente antineoplásico de uso en clínica, y empleado aquí para verificar en todas las valoraciones la sensibilidad de las líneas celulares (Cordero *et al.*, 2002).

En todos los casos se observó que el DMSO, empleado como vehículo para la disolución de los extractos vegetales, no presentó actividad citotóxica sobre ninguna de las líneas celulares, lo que indica que a las concentraciones en que fue empleado (máximo 0.2%), no interfiere con el resultado.

#### Tratamientos

El extracto etanólico total de *Polytrichum juniperinum* mostró actividad citotóxica, sin embargo esta fue promisoriosa solo sobre SiHa ( $90.6 \pm 1.90 \mu\text{g/mL}$ ), los valores de las  $CL_{50}$  calculados para las líneas restantes superaron los  $100 \mu\text{g/mL}$ , valor de referencia empleado para la selección de productos de origen natural con potencial actividad anticáncer (Boyd M, 1997).

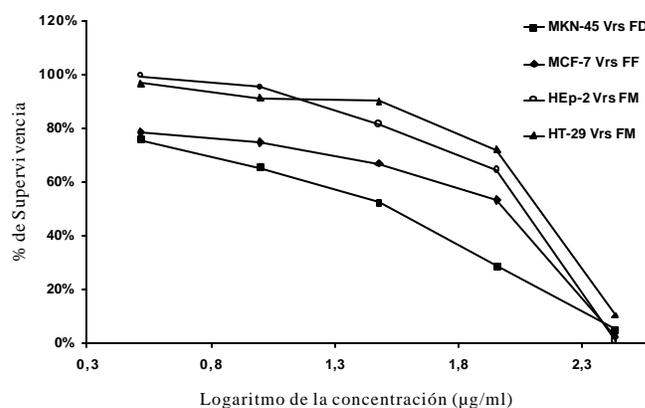
Las fracciones FM, FD y FF mostraron actividad citotóxica sobre algunas de las líneas. Con base en los valores las  $CL_{50}$  (Tabla 4), podrían ser consideradas promisorias las actividades de la fracción en dicloro-

tano sobre MK-45 y HEp-2, y la actividad de la fracción FF sobre la línea celular MCF-7. La fracción metanólica también mostró actividad sobre las líneas celulares HEp-2 y MK-45, aunque los valores de  $CL_{50}$  son mayores que los calculados para la fracción en diclorometano sobre estas mismas líneas.

Las fracciones FD y FM generaron una disminución en el porcentaje de supervivencia de la línea celular HT-29, los valores de  $CL_{50}$  son mostrados en la tabla 4.

Las fracciones hexánica, acuosa y butanólica no mostraron actividad bajo las condiciones de ensayo.

En la Tabla 4 se muestran los valores de  $CL_{50}$  para todas las fracciones que resultaron activas y en la Gráfica 1 se muestra la reducción de la supervivencia celular inducida por las fracciones con actividad citotóxica.



**Gráfica 1.** Efecto citotóxico de las fracciones *Polytrichum juniperinum* sobre cultivos de líneas celulares de origen tumoral humano.

**Tabla 4.** Valores de la  $CL_{50}$  para Doxorubicina, el extracto etanólico total y fracciones aisladas de *Polytrichum juniperinum*

Línea Tto	DOXO <sup>a</sup> µg/mL	EE µg/mL	FD µg/mL	FM µg/mL	FF µg/mL
HEp-2	$0.071 \pm 0.021^b$	$104.9 \pm 6.04$	$49.4 \pm 5.72$	$87.4 \pm 5.52$	$100 < CL_{50} \leq 270$
SiHa	$0.37 \pm 0.225$	$90.6 \pm 1.90$	$108.4 \pm 7.76$	$100 < CL_{50} \leq 270$	$100 < CL_{50} \leq 270$
MKN-45	$0.12 \pm 0.002$	$148.7 \pm 4.09$	$34.1 \pm 18.09$	$97.1 \pm 1.47$	$100 < CL_{50} \leq 270$
HT-29	$0.49 \pm 0.002$	$100 < CL_{50} \leq 270$	$78.0 \pm 7.42$	$119.2 \pm 3.18$	$100 < CL_{50} \leq 270$
MCF-7	$0.043 \pm 0.03$	$211.3 \pm 13.49$	$82.5 \pm 2.53$	$113.3 \pm 5.73$	$50.33 \pm 0.07$

a. DOXO, doxorubicina, EE, extracto etanólico; FD, fracción en diclorometano; FM, fracción metanólica; FF, fracción orgánica. b. Media  $\pm$  desviación estándar.

## Conclusiones

Los estudios realizados sugieren que el musgo *Polytrichum juniperinum* podría ser una fuente importante de terpenos, flavonoides, cumarinas y moléculas glicosiladas. En cuanto a la actividad biológica, se puede indicar que algunos de estos metabolitos podrían ser responsables de las alteraciones observadas sobre el SNC en el Test de Irwin y la actividad citotóxica observada sobre el modelo *in vitro* de líneas celulares de origen tumoral humano.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó con la financiación de la Dirección de investigaciones sede Bogotá (DIB), Universidad Nacional de Colombia.

## Bibliografía

- Asakawa Y, Longton R.E.** 1990. Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press Oxford, New York.
- Boyd M.** 1997. Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval. B. Teicher Humana Press Inc. Totowa
- Breitmaier E, Voelter W.** 1987. Carbono 13 NMR Spectroscopy: High Resolution Methods and Application in Organic Chemistry and Biochemistry. 3ra. ed., VCH Publishers, New York.
- Churchill SP, Linares EL.** 1995. Prodrómus bryologiae novo-granatis: Introducción a la flora de los musgos de Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- Cordell GA, Beecher CW, Pezzuto JM.** 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *Journal of ethnopharmacology* **32**: 117-133.
- Cordero CP, Aristizábal F.** 2002. Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología* **41**:100-106.
- Crews P, Rodriguez J, Jaspars M.** 1998. Organic structure analysis. Oxford University Press, Inc., New York.
- CYTED.** 1999. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo CYTED. Subprograma de Química Farmacéutica. Curso Taller Iberoamericano sobre metodología para la búsqueda de nuevos compuestos líderes en plantas. México.
- Irwin S.** 1962. Drug screening and evaluation procedures. *Science*, **136**: 123-130.
- Mosmann T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*. **65**: 55-63.
- Pezzuto, JM.** 1997. Plant - Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology* **53**: 121-133.
- Sanabria A.** 1983. Análisis Fitoquímico Preliminar. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- \_\_\_\_\_. 1997. De la especie vegetal al medicamento: mito y realidad: Tópicos en productos naturales: la biodiversidad como fuente de moléculas activas. Universidad de Antioquia, Medellín.
- \_\_\_\_\_, **Cárdenas L., Parroquiano, M.** 2002. Actividad antimicrobiana y examen fitoquímico preliminar de siete angiospermas y una muestra de propóleo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* **31**: 36-42.

Recibido: abril 25 de 2006

Aceptado para su publicación: diciembre 17 de 2007