

FLAVONOIDES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA AISLADOS DE *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. (Piperaceae)

ANTIFUNGAL FLAVONIDS ISOLATED FROM *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC (Piperaceae)

FLAVONÓIDES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA ISOLADOS DE *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC (Piperaceae)

Mónica C. Ávila^{1,2}, Óscar J. Patiño¹, Juliet A. Prieto¹, Wilman A. Delgado¹, Luis E. Cuca¹

Recibido: 29/03/11 – Aceptado: 29/04/11

RESUMEN

El fraccionamiento bioguiado del extracto etanólico de la parte aérea de *Piper septuplinervium* (Piperaceae) permitió la obtención de dos sustancias de tipo flavonoide, activas contra dos cepas de hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi y *Botrytis cinerea*). Las estructuras de los compuestos aislados fueron determinadas de acuerdo con el análisis espectroscópico (RMN uni y bi-dimensional, EMAR). La actividad antifúngica fue determinada por ensayo en disco, seguido por bioautografía directa sobre las dos cepas de hongos en prueba.

Palabras clave: *Piper septuplinervium*, Piperaceae, flavonoides, actividad antifúngica.

ABSTRACT

Guided fractionation of ethanolic extract of aerial part of *Piper septuplinervium*

(Piperaceae) yielded two flavonoid-type active substances against two strains of phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi and *Botrytis cinerea*). The structures of isolated compounds were determined by spectroscopic analysis (single-and two-dimensional NMR, HRMS). The antifungal activity was determined by disk test, followed by direct bioautography against the two strains of fungi tested.

Key Words: *Piper septuplinervium*, Piperaceae, flavonoids, antifungal activity.

RESUMO

O fracionamento bio-guiado do extrato etanólico da parte aérea de *Piper septuplinervium* (Piperaceae) permitiu obter duas substâncias flavonoidesativas contra duas linhagens de fungos patogênicos (*Fusarium oxysporum* f. sp. Dianthi e *Botrytis cinerea*). Mediante a análise espectroscó-

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Bogotá, Colombia.

² mcavilam@unal.edu.co

pica (RMN mono e bidimensional, RMS) determinaram-se as estruturas desses compostos. A atividade antifúngica foi determinada pelo teste de disco, seguido por bio-autografía direta sobre duas inha-gens fúngicas testadas.

Palavras-chave: Piper septuplinervium, Piperaceae, flavonóides, atividade antifúngica.

INTRODUCCIÓN

La agricultura en Colombia representa un renglón importante en la economía del país, teniendo en cuenta que esta contribuye con un 20% al producto interno bruto (1). Según el Ministerio de Comercio, Industria y Turismo del país, de los 20 productos más exportados por Colombia, 13 son productos agrícolas, entre los que se destacan el café, diversos tipos de frutas y las flores (2).

Varios problemas fitosanitarios afectan los cultivos, como el ataque de patógenos que disminuyen notablemente tanto la calidad como la cantidad de la producción. Las pérdidas en las cosechas debidas a enfermedades fúngicas pueden estar cercanas al 12% en el mejor de los casos; los países en desarrollo pueden superar este valor (3).

Para el control de los hongos fitopatógenos se emplean fungicidas sintéticos, muchos de los cuales son altamente tóxicos tanto para los agricultores como para los consumidores y el ambiente. Por tal motivo, se están buscando alternativas para disminuir al máximo el uso de estas sustancias tóxicas, mediante el desarrollo de nuevos productos fitosanitarios de bajo impacto ambiental y de acción específica

(4). Las plantas pueden ser una fuente para encontrar sustancias útiles en el sector agrícola, pues producen diversos metabolitos secundarios como defensa química y han sido usadas empíricamente por el hombre como agentes de protección de cultivos desde hace muchos años (5). Ejemplo de esto son las especies vegetales pertenecientes a la familia Piperaceae, ampliamente utilizadas de manera tradicional en la protección de cultivos y como fuente de fitomedicamentos (6). El género *Piper*, perteneciente a la familia Piperaceae, es el más abundante con un total de 1000 especies; a pesar de su origen asiático, en el país existe cerca del 20% del total de especies del género *Piper* reportadas en el mundo (7), muchas de las cuales son especies endémicas colombianas, como la especie *Piper septuplinervium*, objeto del presente estudio.

Además de la importancia que revisten las especies del género *Piper* por sus usos tradicionales, son relevantes los estudios fitoquímicos los cuales han mostrado la presencia de metabolitos secundarios como amidas, flavonoides, derivados de ácido benzoico y fenil propanoides principalmente (8), los que en su mayoría poseen actividades insecticidas y antifúngicas comprobadas (9-12). En este trabajo se presenta el aislamiento bio guiado de dos metabolitos tipo flavonoide con actividad antifúngica contra dos cepas de hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* f sp. dianthi, responsable del marchitamiento vascular del clavel, y *Botrytis cinerea* responsable de la enfermedad conocida como moho gris característica de hortalizas y frutas que comúnmente se manifiesta como tizones en las inflorescencias, pudrición de los frutos, así como

cancrosis o pudriciones de los tallos (13). Las cepas escogidas para este estudio poseen una importancia económica teniendo en cuenta que los productos agrícolas que se ven afectados por estos hongos son de importancia económica para nuestro país ya que tanto el clavel como las frutas y hortalizas son actualmente productos de exportación y generan importantes dividendos económicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

General

En la cromatografía de columna flash se usó sílica gel 60 de 0,040 mm a 0,063 mm Merck®, para la cromatografía en capa delgada se emplearon cromatoplasas Merck® de sílica gel HF₂₅₄ de 0,3 mm de espesor usando como reveladores luz UV de 254 nm, 365 nm, vapores de I₂ y vainillina-acido fosfórico 50%. Los espectros RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY, DEPT, HMQC, HMBC, fueron registrados en un equipo Bruker Avance 400 utilizando TMS como estándar interno. Los puntos de fusión fueron tomados en un equipo Mel-temp II Laboratory Devices. Los espectros de masas EMAR fueron tomados en el equipo LCMS-IT-TOF Shimadzu DGU-20AS.

Material vegetal

La muestra utilizada para este estudio corresponde a la parte aérea de la especie *Piper septuplinervium* (Piperaceae), recolectada en la vereda San José Bajo del municipio de Granada (Cundinamarca) y determinada por el biólogo Adolfo Jara Muñoz. Un espécimen reposa en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto

de Ciencias Naturales con el número COL-517695.

Material biológico

Las cepas fúngicas empleadas en el ensayo corresponden a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* y *B. cinerea*. Todas las cepas fueron mantenidas en incubadora a 27 ± 1 °C en medio de papa-dextrosa-agar (PDA).

Ensayo de actividad antifúngica

La determinación de la actividad antifúngica del extracto se realizó por el método de difusión en disco (14). El medio de cultivo (PDA) fue inoculado con 100 µL de una suspensión de esporas de 10⁵ UFC en una caja de Petri de 9 mm de diámetro. Se prepararon soluciones en metanol de cada extracto en diferentes concentraciones (50, 40, 25 y 10 µg/µL) y se aplicaron 10 µL de cada solución sobre discos de papel filtro, colocados sobre el medio inoculado, correspondiendo a 500, 400, 250 y 100 µg de cada extracto aplicado. Las cajas de Petri fueron selladas con parafilm e incubadas por tres días a 28 °C. Posteriormente, se midió el halo de inhibición alrededor de los discos de papel en mm y se determinó la CMI de cada extracto, definida como la mínima cantidad de extracto que causa inhibición en el crecimiento del hongo. Cada ensayo se realizó por triplicado y se usaron Benomil e Iprodiona como controles positivos para las cepas de *F. oxysporum* y de *B. cinerea*, respectivamente, en cantidad mínima de 10 µg en ambos casos.

La determinación de la actividad antifúngica de las fracciones y los compuestos puros se realizó por el método de bioautografía directa (15). Diez microli-

tros de las soluciones de las fracciones y los compuestos puros se prepararon, en diferentes concentraciones correspondientes a 100, 50, 25, 10, 5, 2 y 1 μg de compuestos puros, y 300 μg de fracciones aplicados. Las muestras se aplicaron a las placas de TLC y se eluyeron en los sistemas cloroformo-metanol (95:5) y n-hexano-AcOEt (8:2). Después de dejar secar los cromatogramas para eliminar totalmente el solvente, se procedió a asperjarlos con una suspensión de esporas de hongos en solución de caldo nutritivo de KH_2PO_4 0,7%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3%, KNO_3 0,4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, NaCl 0,1% y glucosa 30%; posteriormente, las placas se incubaron durante 72 horas en la oscuridad en una cámara húmeda a 25 °C. Finalmente, las placas de TLC se expusieron a la luz UV (254 nm) y a los vapores de yodo para detectar las zonas de inhibición, lo que indica la actividad inhibitoria contra el crecimiento del hongo. Se utilizó Benomil e Iprodiona como control positivo a una cantidad de 1 μg en ambos casos; los disolventes utilizados para las muestras se emplearon como controles negativos.

Extracción y aislamiento

La parte aérea de *Piper septuplinervium* seca y molida (980 g) fue sometida a extracción por percolación con etanol al 96%, obteniéndose 70 gramos de extracto, fraccionado por cromatografía en columna flash con la mezcla tolueno-acetato de isopropilo en gradiente desde 9:1 hasta 1:9 y posterior lavado con metanol, obteniendo 18 fracciones totales marcadas como F1 a F18. Las fracciones activas, de acuerdo con la bioautografía en cromatografía en capa delgada sobre sílica gel, fueron purificadas por medio de cromato-

grafía en columna flash sucesiva con las mezclas hexano-acetona y diclorometano-acetona en diferentes proporciones, obteniendo los compuestos **1** (512 mg), **2** (150 mg).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto **1** es un sólido blanco que cristaliza en forma de agujas, pf: 189-190 °C, no posee absorción en el UV $\lambda_{365 \text{ nm}}$, presenta coloración amarilla con vainillina-ácido fosfórico, y coloración negra con vapores de I_2 , da prueba positiva al reactivo de FeCl_3 indicando la presencia de OH fenólico. El espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) muestra la presencia de las señales en $\delta 7,27$ (d, $J=7,3$ Hz, 4H) y $\delta 7,17$ (m, 1H), características de los hidrógenos de un anillo aromático monosustituido. Las señales de los protones en $\delta 6,03$ (d, $J=2,1$ Hz, 1H) y $\delta 5,97$ (d, $J=2,1$, 1H) son características de un anillo aromático tetrasustituido cuyos hidrógenos se encuentran en posición meta. La presencia de los dos anillos aromáticos se confirma por las señales del espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) en $\delta 92,9$, $\delta 97,9$, $\delta 106,8$, $\delta 127,6$, $\delta 130,1$, $\delta 130,2$, $\delta 143,7$, $\delta 165,5$, $\delta 166,6$, $\delta 169,5$, las cuales corresponden a desplazamientos típicos de carbonos sp^2 , en especial carbonos aromáticos que, según el experimento DEPT 135 y en comparación con el espectro RMN ^{13}C , corresponden a 7 metinos y 5 carbonos cuaternarios, los tres últimos carbonos cuyo desplazamiento químico se debe a la presencia de sustituyentes oxigenados. Es importante anotar que dos de las señales de metinos en $\delta 130,1$ y $\delta 130,2$ poseen el doble de la intensidad de las demás, con lo cual se concluye que cada una corres-

ponde a dos carbonos que deben ser equivalentes (16). Las señales en $\delta 32,4$ y $\delta 47,4$, las cuales según el espectro HMQC se correlacionan con las señales en $\delta 2,95$ (t, $J = 7,7$, 2H) y $\delta 3,3$ (t, $J = 7,7$, 2H), respectivamente, junto con la señal en $\delta 206$ correspondiente a un carbono carbonílico cetónico, son características de un sistema de carbonilo; los protones α y β , de una estructura tipo dihidrochalcona (17a).

La señal en $\delta 14,9$ (s, 1H) es característica de un hidrógeno quelatado con un grupo carbonilo, lo cual es común en sistemas flavonoides y confirma la presencia de OH fenólico. Finalmente, los acoplamientos a larga distancia presentados en el experimento HMBC entre la señal en $\delta 3,3$ y $\delta 2,95$ a dos y tres enlaces con la señal en $\delta 143$, así como entre la señal de $\delta 3,3$ y $\delta 2,95$ a dos y tres enlaces con la señal en $\delta 206$ permiten hacer la conexión entre los fragmentos e identificar el compuesto **1** como 2', 4'-dihidroxi-6'-metoxidihidrochalcona, comúnmente conocida como uvangoletina, aislada de especies de las familias Anonacea (18), Ptaeroxylaceae (19), y Zingiberaceae (20) En la Figura 1 se presenta la estructura de la uvangoletina.

A pesar de que este compuesto ha sido reportado anteriormente, los datos espectroscópicos reportados corresponden a experimentos RMN ^{13}C de 15 MHz (21); por tanto, en la Tabla 1 se reportan los datos espectroscópicos correspondientes a ^{13}C 100 MHz. Este es el primer reporte de la

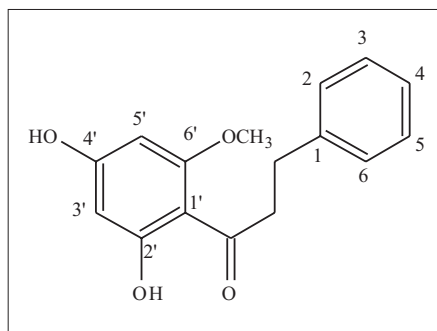


Figura 1. Estructura del compuesto 1.

presencia de uvangoletina en la familia Piperaceae.

El compuesto **2** es un sólido amarillo amorfo cuyo punto de fusión es $261\text{ }^{\circ}\text{C}$, posee fluorescencia amarilla intensa en

Tabla 1. Datos RMN ^{13}C (100 MHz) tomados en $\text{Me}^2\text{CO}-d_6$

C	δ	DEPT	HMQC
C-1	143,7	C	--
C-2	130,2	CH	7,27
C-3	130,1	CH	7,27
C-4	127,6	CH	7,17
C-5	130,1	CH	7,27
C-6	130,2	CH	7,27
C- α	47,4	CH_2	3,30
C- β	32,4	CH_2	2,95
C=O	206	C	--
C-1'	106,8	C	--
C-2'	169,5	C	--
C-3'	97,9	CH	5,97
C-4'	166,6	C	--
C-5'	92,9	CH	6,03
C-6'	165,5	C	--
OCH_3 -6'	57,2	CH_3	3,86

Tabla 2. Valores de CMI contra el crecimiento de los dos hongos fitopatógenos para el extracto etanólico de *Piper septuplinervium* y los controles usados por el método de difusión en disco.

Muestra ensayada	Cantidad mínima inhibitoria (μg)	
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	<i>B. cinérea</i>
Extracto etanólico <i>P. septuplinervium</i>	100	100
Benomil	10	---
Iprodiona	---	10

UV $\lambda_{365 \text{ nm}}$, coloración naranja intensa al revelarse con vainillina-ácido fosfórico, y coloración amarilla con vapores de I_2 . Presenta prueba positiva con el reactivo de FeCl_3 , indicando la presencia de OH fenólico. La asignación por resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC, HMBC), EMAR, y la comparación con los datos reportados en la literatura (17b) permitieron identificar el compuesto **2** como 5,7-dihidroxi-flavona, comúnmente conocida como chrysin, aislada anteriormente de especies de las familias Lamiaceae (22), Fabaceae (23), Chenopodiaceae (24), Orchidaceae (25).

Uvangoletina y chrysin son objeto de investigación continua por su importante y comprobada actividad citotóxica sobre varias líneas celulares. Además, se ha comprobado la actividad antifúngica in vitro de la chrysin sobre cinco cepas de hongos, entre las cuales se encuentra la

forma especial cepae del hongo *Fusarium oxysporum*, la cual ataca específicamente cultivos de ajo y cebolla (25). En esta investigación, mediante el aislamiento bioguiado del extracto etanólico de la parte aérea de *Piper septuplinervium*, se evidenció la importante actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y *Botrytis cinerea* de los anteriores compuestos de tipo flavonoide, representada en los valores determinados en la cantidad mínima inhibitoria, los cuales se presentan en las Tablas 2 y 3.

La Tabla 2 evidencia la cantidad mínima inhibitoria del extracto de *Piper septuplinervium*, comparada con los controles utilizados para el ensayo, que corresponden a los principios activos de fungicidas comerciales comúnmente utilizados en el tratamiento en campo de las enfermedades causadas por las cepas de hongos objeto de esta investigación. Si

Tabla 3. Valores de CMI contra el crecimiento de los dos hongos fitopatógenos para los compuestos puros y los controles usados por el método de bioautografía directa.

Muestra ensayada	Cantidad mínima inhibitoria (μg)	
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	<i>B. cinérea</i>
Uvangoletina	2	100
Chrysin	2	> 100
Benomil	1	---
Iprodiona	---	1

bien las cantidades mínimas inhibitorias de los controles no son comparables con la obtenida para el extracto. Es importante tener en cuenta que los controles usados en el ensayo son compuestos puros y los extractos vegetales son mezclas muy complejas de cientos de compuestos en diversas cantidades; por eso se ensayan concentraciones relativamente altas de forma que es bastante posible que los metabolitos causantes de la actividad ejerzan su efecto en cantidades muy pequeñas. Lo anterior se confirma con los resultados de la Tabla 3, pues a diferencia de lo que sucede con el extracto, las cantidades mínimas inhibitorias presentadas por uvangoletina (1) y chrysina (2) son comparables con los controles positivos usados en el ensayo. Es de destacar que los compuestos aislados tienen mayor efecto sobre la *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi, lo cual es un resultado bastante importante, considerando que las mayores pérdidas de los productores de clavel se deben al marchitamiento vascular de los esquejes, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Esta situación repercute enormemente en las divisas por exportaciones si se tiene en cuenta que Colombia es el segundo exportador mundial después de Holanda. (26)

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos:

Al Laboratorio de investigación hospedero-patógeno del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y al Laboratorio de Bromatología y Fitoquímica del Jardín Botánico José Celestino Mutis de la ciudad de Bogotá por proporcionar el material biológico usado en esta investigación.

Al Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia por la determinación de las especies vegetales utilizadas en la presente investigación.

A los laboratorios de Resonancia Magnética Nuclear y Cromatografía líquida-espectrometría de masas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por la toma de los espectros utilizados en la elucidación estructural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. Análisis Macroeconómico del Sector Agropecuario en Colombia, 2007. [Consultado en abril de 2011]. Disponible en: http://www.minagricultura.gov.co/documentos/macroeconomía_25sep07.ppt. [Consulta, abril de 2011].
2. Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. Colombia. Comercio exterior de Colombia 2010. [Consultado en abril de 2011]. Disponible en: <http://www.mincomercio.gov.co/econtent/documentos/estudioeconomicos/2010-expopresentaciónju-liopdf>.
3. Bajpai, V.; Shukla, S.; Kang, S. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technology*. 2008. **99**: 8903-8908.
4. Lizarazo, K.; Mendoza, C.; Carro, R. Efecto de extractos vegetales de *Polygonum hydropiperoides*, *Solanum nigrum* y *Caliandra pittieri*

- sobre el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). *Agronomía Colombiana*. 2008. **26**(3): 427-434.
5. Abad, M. J.; Ansuategui, M.; Bermejo P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*. 2007. **8**: 116-145.
 6. Regnault-Roger, C.; Philogene, B.; Vincent, C. Biopesticides d'origine végétale. Tec&Doc-Lavoisier. Paris. 2003. p. 46.
 7. Garcia Barriga, H. Flora medicinal de Colombia. Tercer Mundo Editores. Bogotá. 1992. p. 222.
 8. Parmar, V.; Jain, S.; Bisht, K.; Jain R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O.; Prasad, A.; Wengel J.; Olsen C.; Boll P. Phytochemistry of genus Piper. *Phytochemistry*. 1997.**46**: 567-673.
 9. Steenkamp, V.; Fernandes, A. C.; Van Rensburg, C. E. J.; Screening of Venda medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *South African Journal of Botany*. 2005. **73**: 248-256.
 10. Nyane, A.; Biyiti, L.; Bouchet, P.; Nkengfack, A.; Zollo, A. Antifungal activity of *Piper guineense* of Cameroon. *Fitoterapia*. 2003. **74**: 464-468.
 11. Lago, H.; Ramos, C.; Casanova, D.; Morandi, A.; Bergamo, D.; Cavalheiro, A.; Bolzani, V.; Furlan, M.; Guimaraez, E.; Young, M.; Kato, M. Benzoic acids derivatives from Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium sphaerospermum*. *Journal of Natural Products*. 2004. **67**: 1783-1788.
 12. Danelutte, A.; Lago, J.; Young, M.; Kato, M. Antifungal flavones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*. 2003. **64**: 555-559.
 13. Agrios, G. Plant pathology. Elsevier Academic Press. USA. 2005. Pp. 126-127.
 14. Pabón, L.; Cuca, L. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). *Química Nova*. 2010. **33**(4): 875-879.
 15. Patiño, O.; Cuca, L. Chemical constituents of the wood from *Zanthoxylum quinduense* Tul (Rutaceae). *Química Nova*. 2010. **33** (5): 1019-1021.
 16. Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M. Organic structures analysis. Oxford University Press. New York. 2010. p. 74.
 - 17a. Harborne, J. B. The flavonoids. Advances in research since 1986. Chapman and Hall. London. 1994. p. 401.
 - 17b. Harborne, J. B. The flavonoids. Advances in research since 1986. Chapman and Hall. London. 1994. p. 261.
 18. Ichimaru, M.; Nakatani, N.; Takahashi, T.; Nishiyama, Y.; Moriyasu, M.; Kato, A.; Mathenge, S.; Juma, F.; Nganga, J. Citotoxic C-benzilated Dihydrochalcones from *Uvaria acuminata*. *Chemical*

- and Pharmaceutical Bulletin*. 2004. **52**(1): 138-141.
19. Koorbanally, N.; Randrianarivojosia, M.; Mulholland, D.; Ufford, L.; Van den Berg, A. Chalcones from the seed of *Cedrepolis grevei* (Pteroxylaceae). *Phytochemistry*. 2003. **62**(8): 1225-1229.
20. Subhadhirasakul, S.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Pracha, S. Anti-inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*. *Food Chemistry*. 2009. **115**(2): 534-536.
21. Hufford, H. Oguntimein, B. Dihydrochalcones from *Uvaria angolensis*. *Phytochemistry*. 1980. **19**(9): 2036-2038.
22. Tomimori, T.; Miyaiachi, Y.; Imoto, Y.; Kizu, H.; Namba, T. Studies on the Nepalese crude drugs. XI: On the flavonoid constituents of the aerial parts of *Scutellaria discolor*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1988. **36** (9): 3654-3658.
23. Amer, M.E.; Abdel-Kader, M.S.; Mahmoud, Z.F.; Abdel, N.A.; Gang, S.; Mabry, T. *Revista Latinoamericana de Química*. 1989. **20**:152-155.
24. Mata, R.; Navarrete, A.; Álvarez, L.; Miranda, R.; Delgado, G.; De Vivar, A. R. Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens*. *Phytochemistry*. 1986. **26**(1): 191-193.
25. Shimura, H.; Matsura, M.; Takada, N.; Koda, Y. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthus* var. *rebunense* (Orchidaceae). *Phytochemistry*. 2007. **68** (10):1442-1447
26. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. 2011. [Consultado en abril de 2011]. Disponible en: http://www.minagricultura.gov.co/archivos/agenda_prospectiva_de_investigación_y_desarrollo_tecnológico_paralacadena_productiva_de_flores_y_follajes_con_énfasis_en_clavel.

