

TAMIZAJE QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJAS Y FRUTOS DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *Miconia* (MELASTOMATACEAE)

CHEMICAL SCREENING AND ANTIOXANT ACTIVITY OF LEAVES AND FRUITS OF THREE SPECIES OF *Miconia* (MELASTOMATACEAE)

Erika Andrea Plazas González.

M.Sc Química. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, Subdirección Científica. Av 63 # No. 68-95, Bogotá, Colombia. erikaandrea.plazasgonzalez@gmail.com

RESUMEN

Este estudio permitió determinar la variabilidad de la actividad antioxidante y el contenido de metabolitos fenólicos en tres especies del género *Miconia*. A partir de las hojas y los frutos en dos estados de maduración de *Miconia summa*, *Minconia elaooides* y *Miconia* sp se obtuvieron los extractos etanólicos y se cuantificó la cantidad de fenoles. Los extractos de frutos verdes presentaron la mayor concentración de metabolitos fenólicos, se observó que a medida que aumentó el grado de maduración disminuyó la concentración de estos. La actividad antioxidante se cuantificó con el método de captación de radicales DPPH, se determinó la CI₅₀ expresada como VCEAC (mg/L). Los frutos verdes presentaron los mayores porcentajes de inhibición del radical y las menores CI₅₀, siendo los frutos *M. summa* y *M. elaooides* los que poseen una mayor capacidad antioxidante con porcentajes cercanos a los evidenciados por los controles positivos (Catequina y Ac. Gálico).

Palabras clave: *Miconia*, Melastomataceae, fenoles, antioxidante, DPPH

SUMMARY

The variability of the antioxidant potential and total phenolic content were determined in three species of *Miconia* genus. The total phenolic content were simultaneously quantified from the ethanolic extracts of leaves and fruits in two different ripening stages of *Miconia summa*, *Minconia elaooides* and *Miconia* sp. The green fruits extracts showed the highest total phenolic content, where as the ripe fruits has the lowest content. The antioxidant activity were quantified with the radical DPPH method expressed as the IC₅₀ of VCEAC (mg/L). The green fruits of *M. summa* and *M. elaooides* showed the highest percentages of inhibition of DPPH and antioxidant

capacity, similar to positive controls (catechine and Gallic acid).

Keywords: *Miconia*, Melastomataceae, Phenols, antioxidant, DPPH

INTRODUCCIÓN

Las especies pertenecientes a la familia Melastomataceae son arbustos, hierbas o arboles de distribución pantropical, con mayor presencia de especies en la región occidental de América del Sur, la Guayana y sudeste del Brasil. La familia se conforma por con 185 géneros y aproximadamente 5000 especies. En Colombia la familia está representada por 64 géneros nativos que incluyen más de 900 especies, distribuidas en la mayoría de ecosistemas desde el nivel del mar hasta las zonas de páramo (Mendoza y Ramírez, 2006). Estas especies son empleadas con fines medicinales, ornamentales y alimenticios. En la medicina tradicional principalmente de Asia y Sur América son reconocidas por sus propiedades astringentes, hemostáticas, antibacterianas y antidiarréicas (Freire *et al*, 2002).

En Colombia, algunas especies de esta familia son conocidas por sus propiedades medicinales para el tratamiento de la malaria, infecciones, heridas en la piel, enfermedades respiratorias, cálculos en la vejiga, otras dolencias genitourinarias y como diurético (García, 1974). Las especies de melastomataceas de las zonas rurales del Distrito Capital son principalmente usadas con fines maderables y ornamentales (Gutiérrez *et al*, 2011).

Por medio de los estudios de químicos de extractos y fracciones de especies de esta familia se ha determinado la presencia de metabolitos secundarios de tipo fenólico como taninos hidrolizables, flavonoides y glicosidos cianogénicos y

en menor proporción terpenos y alquil bencenos. A partir de los extractos de flores, frutos y hojas de especies de la familia se han aislado flavonoides de tipo antocianina, glicosidos de flavona y flavonoles con actividades antioxidantes y antibacterianas (Susanti *et al.*, 2007).

Los taninos o polifenoles son los metabolitos secundarios más abundantes y representativos de la familia, a este tipo de compuestos se les atribuyen las características astringentes y antioxidantes de un gran número de especies. Los taninos presentes en esta familia son hidrolizables y poseen núcleos derivados de los ácidos gálico y elágico (Yoshida *et al.* 2005; Isaza J *et al.* 2004).

Los compuestos polifenólicos presentes en diferentes especies de la familia se caracterizan por su marcada actividad antioxidante, relacionada a sus propiedades redox. Los polifenoles tienen la habilidad de disminuir la actividad de los radicales libres actuando como agentes reductores, donadores de hidrógeno o como agentes quelantes (Stanojević *et al.*, 2009).

En este trabajo se realizó la caracterización fitoquímica, la cuantificación de fenoles y se determinó la actividad antioxidante por captación de radicales DPPH en los extractos de hojas, frutos verdes y maduros de tres especies del género *Miconia* ampliamente distribuidas y en zonas rurales del Distrito Capital; con el fin de determinar el potencial antioxidante y su variabilidad en los diferentes órganos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de Material vegetal

El material vegetal (hojas, frutos verdes y frutos maduros) de las tres especies de la familia Melastomataceae fue colectado en el páramo de Calderitas y Cruz verde. Las hojas, los frutos verdes y maduros de la especie *Miconia elaeoides* fueron recolectados en el páramo de Calderitas, vía Usme-Chipaque en las coordenadas N 04°24'12,01" y W 74°06'26,5" a 3137 m.s.n.m. Las especies *Miconia summa* y *Miconia* sp fueron colectadas en el páramo de cruz verde vereda San Francisco, en las siguientes coordenadas N 04°34'35,1" y W 74°00'07,4" y N 04°35'39,3" y W 073°59'15,3" respectivamente. Un espécimen para identificación y testigo de herbario fue depositado en el herbario de la Subdirección Científica del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis.

Obtención de extractos

El material vegetal de las tres especies de la familia Melastomataceae se seleccionó, limpió y separó en los diferentes órganos de interés: hojas, frutos verdes y maduros. Las hojas y frutos de las tres especies se secaron a temperatura ambiente en la cabina con convección de aire durante 8 días. El material vegetal seco se trituró y peso para someterlo a

extracción por maceración con etanol de 96%. Los extractos se filtraron y concentraron a presión reducida en el rotavapor. Este procedimiento se realizó de forma repetitiva hasta no observar residuo sólido en la evaporación del solvente o hasta una disminución considerable del mismo, con el fin de cuantificar los rendimientos de extracción.

Análisis fitoquímico preliminar

A partir de los extractos etanólicos se realizaron separaciones sucesivas empleando solventes de diferentes polaridades con el fin de agrupar los metabolitos estructuralmente semejantes en tres fracciones: ácida para el análisis de alcaloides, para ello se emplearon las pruebas de Dragendorff, Valser, Mayer y Wagner. En la fracción etérea se realizó el análisis de esteroides y terpenos, por medio de las pruebas de Salkowski, Liebermann y VAO. En la fracción etanólica desengrasada se hizo el análisis de fenoles y taninos (cloruro férrico, gelatina-sal), flavonoides (Shinoda y leucoantocianidinas), cumarinas (Erllich y Fluorescencia) y quinonas (comportamiento ácido-base) entre otros. De esta forma fue posible caracterizar los grupos de compuestos, de acuerdo a su comportamiento químico, frente a las reacciones cualitativas. Para corroborar los resultados, se emplearon controles positivos y negativos. Como control positivo se usó un extracto rico en metabolitos del tipo a analizar o un compuesto puro o patrón y como control negativo se usó ácido clorhídrico, éter de petróleo o etanol según el caso (Sanabria, 1983; Bilbao, 1994).

Cuantificación de fenoles

El contenido total de fenoles en los extractos etanólicos de la especie de estudio fue determinado espectrofotométricamente de acuerdo al método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A partir de una solución stock de ácido gálico a 200 mg/L (reactivo analítico) se construyó la curva de calibración a concentraciones de 200, 150, 100, 50, 10, 5 y 1 ppm de AG. Se pesó 1 mg del extracto etanólico y se disolvió en 1 mL de metanol, luego se aforó a 10 mL con agua destilada obteniendo una solución de 100 mg/L. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL de esta solución y se le agregó 5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido en proporción 1:10 con agua destilada), se dejó en reposo 5 minutos y se le agregó 4 mL de una solución 7.5% de carbonato de sodio, la solución se agitó y se guardó en un lugar oscuro a temperatura ambiente por 2 horas (Stanojević *et al.*, 2009; Singleton, *et al.* 1999).

Los ensayos se hicieron por triplicado y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico por g de extracto (mg GA/ g extracto).

Actividad antioxidante por captación de radicales libres

Los extractos etanólicos de los frutos verdes, rojos y mora-

dos se solubilizaron en metanol a tres concentraciones 150, 100 y 50 mg/L. Se tomó una alícuota de 200 μ L de cada concentración y se llevó a 2ml con una solución metanólica de DPPH a 60mg/L. Se leyó la absorbancia a tiempo cero a 517 nm en espectrofotómetro. Se monitoreó la disminución de la absorbancia cada minuto durante 5 minutos y posteriormente cada cinco minutos durante una hora o hasta observar la estabilización. Como control positivo se utilizó ácido gálico en solución metanólica a concentraciones de 100, 50 y 10 mg/L (Sharma y Bhat, 2009; Mishra *et al* 2012; Deng *et al*, 2011). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición del radical DPPH (ecuación 2), se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Inhibición del DPPH} = \frac{(A_{\text{Blanco}} - A_{\text{Muestra}})}{A_{\text{Blanco}}} * 100$$

Donde, A es la absorbancia.

La concentración efectiva cincuenta (CI50) se determinó interpolando el valor correspondiente al 50% de inhibición del DPPH. Los resultados fueron expresados como VCEAC (actividad antioxidante equivalente al ácido gálico mg/L).

Análisis estadístico

El análisis estadístico para la determinación de fenoles, flavonoides totales y la cuantificación de la actividad captadora de radicales libres DPPH, se realizó mediante el programa estadístico statgraphics Plus. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media de tres determinaciones +/- desviación estándar. Valores con la misma letra como superíndice no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los rendimientos de extracción de las hojas y frutos de las tres especies del género *Miconia* son variables y se encuentran entre el 10 y 30% (Tabla 1), que es el rango promedio para los procesos de extracción en productos naturales (Hostettmann *et al.*, 2008).

Tabla 1. Resultados de la obtención de extractos etanólicos de tres especies del género *Miconia*

Especie	Órgano	% Rendimiento
<i>M. elaeoides</i>	Hojas	14,7
	Frutos verdes	13,0
	Frutos maduros	31,0
<i>M. summa</i>	Hojas	11,0
	Frutos verdes	10,2
	Frutos maduros	20,6
<i>Miconia sp</i>	Hojas	12,0
	Frutos verdes	14,5
	Frutos maduros	20,3

Los mayores rendimientos de extracción se obtuvieron en los frutos maduros de las tres especies de estudio, 31% para *M. elaeoides*, 21% para *M. summa* y 20% para *Miconia sp*. En la extracción de los frutos verdes y hojas se obtuvieron rendimientos entre un 10 a 15%, con pequeñas variaciones en cada especie. Los rendimientos de extracción son proporcionales a la cantidad de metabolitos secundarios solubles en etanol, así que la variabilidad en los porcentajes en hojas y frutos verdes respecto a los frutos maduros puede estar relacionada con un mayor contenido de compuestos no solubles en etanol, como ligninas, polisacáridos y fibras en los dos primeros.

En las tres especies de estudios los extractos etanólicos tienen características similares, los extractos de hojas poseen coloraciones verdes oscuras, apariencias pastosas y olores característicos. Mientras que los extractos de frutos verdes y maduros presentan coloraciones marrones claras a oscuras, apariencias grasosas y olores dulces, lo que puede indicar menor presencia de clorofilas, mayor presencia de grasas y metabolitos glicosilados.

En la tabla 2 se resumen los resultados del análisis fitoquímico preliminar para los 9 extractos de las tres especies, objeto de estudio, el signo (+) es para las sustancias que están presentes en el extracto, mientras que el signo (-) significa que están ausentes.

De acuerdo a los resultados se observó variabilidad en cantidad y presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios en los órganos y especies de estudio. En el caso de los flavonoides se logró determinar una alta presencia en los frutos maduros de *M. summa*, bajas cantidades en los frutos verdes y ausencia en los frutos verdes y maduros de *M. elaeoides* y en las hojas de las tres especies. Los esteroides y terpenos fueron más abundantes en los extractos de hojas y frutos verdes, respecto a los extractos de frutos maduros en las tres especies.

Teniendo en cuenta el comportamiento observado en el análisis cualitativo respecto a la presencia de metabolitos secundarios de tipo fenol en los extractos de las tres especies de estudio, se realizó la cuantificación para determinar la variabilidad de los mismos de acuerdo al estado de maduración y verificar su relación con la actividad antioxidante. En la tabla 3 se reportan los resultados de la cuantificación de fenoles en los diferentes extractos de estudio. El contenido de compuestos fenólicos en plantas, podría clasificarse en tres categorías: Bajo (entre 1–10), Medio (entre 11–40), Alto con más de 40 mg de AG/g de extracto (Stanojević *et al*, 2009).

Tabla 2. Resultados del fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de tres especies del género *Miconia*

METABOLITO	PRUEBA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Valser	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpenos esteroides	Salkowski	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	Liebermann-Burchard	++	++	++	+++	+	+	++	++	+
	VAO	++	+	+	++	+	+	+	+	+
Fenoles Taninos	FeCl ₃	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Gelatina-sal	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonoides	Shinoda	+	++	+++	+	-	-	+	+	++
	Leucoantocianidinas	-	-	+++	-	-	-	-	++	+++
	Rosenhein	-	-	+++	-	-	-	-	++	++
Quinonas	Zn/HCl	++	++	-	-	-	+	-	-	-
	Zn/NaOH	++	++	+	+	-	+	+	+	+
	Hidrosulfito	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	Rodamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	Hidroxamato férrico	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Erlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fluorescencia	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Cardiotónicos y Saponinas	Espuma	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Antrona	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Molish	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Convenciones: - no reacción, + tenue, ++ observable, +++ abundante

M. summa. 1. Hojas 2. Frutos verdes 3. Frutos maduros

M. elaeoides. 4. Hojas 5. Frutos verdes 6. Frutos maduros

Miconia sp. 7. Hojas 8. Frutos verdes 9. Frutos maduros

Tabla 3. Cuantificación de fenoles totales en los extractos de hojas y frutos de tres especies del género *Miconia*

Especie	Órgano	C Fenoles mg de AG/g
<i>M. summa</i>	Hojas	852,2 ± 20,1
	F. verdes	685,8 ± 15,1
	F. maduros	659,4 ± 10,7
<i>M. elaeoides</i>	Hojas	614,0 ± 12,5
	F. verdes	880,4 ± 25,4
	F. maduros	755,5 ± 1,2
<i>Miconia</i> sp	Hojas	908,3 ± 8,4
	F. verdes	772,9 ± 18,4
	F. maduros	647,7 ± 22,5

Se observaron altas concentraciones de este tipo de metabolitos secundarios con valores superiores a 600mg de AG por gramo de extracto para todas las especies de estudio. Estos resultados sugieren que un alto porcentaje de los compuestos presentes en los extractos de las especies de estudio poseen hidroxilos aromáticos que reaccionaron con el complejo tungstofosfato-molibdato desarrollando coloraciones azules, lo cual está en concordancia con el comportamiento observado tanto en el análisis fitoquímico preliminar (Tabla 2). En estudios previos realizados en especies del género *Miconia* se han reportado una importante presencia de metabolitos fenólicos empleando métodos de cuantificación, así como el aislamiento e identificación de flavonoides, taninos y derivados del ácido cumárico, a los cuales se les atribuyen actividades antibacterianas, antioxidantes y analgésicas (Pieroni *et al.*, 2011).

En las especies *M. summa* y *Miconia* sp las mayores concentraciones de fenoles se presentaron en hojas, seguidas de los frutos verdes y los frutos maduros, sin embargo las diferencias en las concentraciones resultaron poco significativas. Por otro lado la especie *M. elaioides* presentó menor concentración de compuestos fenólicos en las hojas y mayores concentraciones en frutos verdes y maduros respectivamente.

Las altas concentraciones de fenoles observadas en las tres especies de estudio del género *Miconia* pueden estar relacionadas con actividades biológicas como actividad antioxidante, antibacteriana y citotóxica reportadas previamente para este tipo de metabolitos secundarios aislados en la familia Melastomataceae (Campos *et al.*, 2012).

La actividad antioxidante fue determinada por el método de captación de radicales DPPH y fue expresada como actividad antioxidante equivalente al ácido ascórbico mg/L (VCEAC). El porcentaje de inhibición indica la capacidad del antioxidante para neutralizar el radical libre DPPH a las concentraciones y condiciones específicas, entre más alto el porcentaje, mayor es su potencial como antioxidante. De forma complementaria el valor CI_{50} indica la concentración del antioxidante necesaria para neutralizar la mitad de la concentración del radical libre DPPH, por lo tanto a menor CI_{50} mayor poder del antioxidante (Yen y Chen, 1995).

Los extractos de frutos verdes de las tres especies y los extractos de hojas de *M. summa* resultaron ser activos en el ensayo de captación de radicales DPPH (Tabla 4). Los extractos de maduros de las tres especies, los extractos de hojas de *M. elaioides*, *Miconia* sp, presentaron media y baja capacidad captadora de radicales DPPH con porcentajes entre 20 y 40% aproximadamente y CI_{50} superiores a 100ppm. Los

frutos verdes de las tres especies del género *Miconia* presentaron los mayores porcentajes de inhibición del radical y las menores CI_{50} , siendo los frutos verdes de *M. summa* y *M. elaioides* los que poseen una mayor capacidad antioxidante con porcentajes cercanos a los evidenciados por el control positivo (Ac. Gálico).

Al comparar entre los diferentes órganos de las especies del género *Miconia* se observa que los frutos verdes son más activos, que los extractos de hojas y que los extractos de frutos maduros poseen baja actividad captadora de radicales. Este comportamiento se puede correlacionar con las concentraciones de fenoles totales obtenidas por el método de Folin, en donde las hojas y los frutos verdes presentaron las mayores concentraciones de este tipo de metabolitos secundarios. Sin embargo en la cuantificación de fenoles los extractos de la especie *Miconia* sp, mostraron las mayores concentraciones de fenoles comparadas con las dos especies restantes y en el ensayo de actividad antioxidante estos fueron significativamente menos activos que *M. summa* y *M. elaioides*. Este comportamiento puede deberse a una mayor concentración de fenoles con baja capacidad “atrapadora” de radicales, por lo que es recomendable contrastar estos resultados con otras técnicas de actividad antioxidante.

Estudios realizados en especies de la familia Melastomataceae indican la presencia de polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos con actividad antioxidante, que posiblemente sea los responsables de la actividad en los frutos verdes de las especies de estudio (Susanti *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2011).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis por la financiación de la investigación.

Tabla 4. Resultados de la actividad antioxidante por captación de radicales DPPH de los extractos de las especies de estudio

Especie	Órgano	% Inhibición DPPH 100 ppm	CI_{50} mg/L
<i>M. summa</i>	Hojas	61,3	86,9
	F. verdes	89,0	38,9
	F. maduros	19,5	122,1
<i>M. elaioides</i>	Hojas	18,9	261,8
	F. verdes	81,4	17,7
	F. maduros	23,8	392,2
<i>Miconia</i> sp	Hojas	43,1	124,6
	F. verdes	73,5	20,7
	F. maduros	34,8	143,9
Ac. Gálico	Ac. Gálico	96,6	2,0

BIBLIOGRAFÍA

1. Bilbao, M. 1994. Investigación fitoquímica. Universidad del Quindío. Facultad de Ciencias Básicas y tecnológicas. Programa de Química de Productos Vegetales.
2. Campos, T., Reges, A., Dos Santos, T., Almeida, A., Trovatti, A., Branco, A. 2012. Antimicrobial activity of *Marsetia* DC species (Melastomataceae) and analysis of its flavonoids by reverse phase-high performance liquid chromatography coupled-diode array detector. *Pharmacognosy Magazine*, 8(31): 209-2014.
3. Deng, J., Cheng, W., Yang, G. 2001. A novel antioxidant activity index (AAI) for natural products using DPPH assay. *Food Chemistry*. 125: 1430-1435.
4. Freire, A., Frenandez, D., Quintana, C. 2002. Usos de melastomataceae en el Ecuador. *Brit Org/SIDA*. 20(1): 233-260
5. García, H. 1974. Flora medicinal de Colombia: Botánica médica. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional. Tomo II. Pp 108-122.
6. Gordon, A., Schadow, B., Quijano, C., Marx, F. 2011. Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart. (Melastomataceae). *Food Research International*, 44: 2120-2127.
7. Gutiérrez, M., Pineda, M., García, A. 2011. Las maticas de mi región. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. p. 60-61.
8. Hostettmann, K., Gupta, M. P., Marston, A. y Ferreira, E. 2008. *Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos*. Colombia: Convenio Andrés Bello y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 38-43.
9. Isaza, J., Ito, H., Yoshida, T. 2004. Oligomeric hydrolyzable tannins from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry*. 65: 359-367.
10. Mendoza, H., Ramirez, B. 2006. Guía ilustrada de géneros de Melastomataceae y Memecylaceae de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humbolt. Bogotá D.C. Colombia.
11. Mishra, K., Ojha, H. y Chaudhury, N. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*. 130: 1036-1043.
12. Pieroni, L., de Rezende, F., Ximenes, V., Dokkedal A. 2011. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. *Molecules*, 16(11): 9439-9450.
13. Sanabria, A. 1983. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
14. Singleton, L., Orthofer, R. y Lamuela, R. 1999. Analysis of total phenolics by means of Folin-Ciocalteu reagent Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants. Part A. Ed. Lester Packer. Academic Press, San Diego. 299: 152-178.
15. Susanti, D., Sirat, H., Ahmad, F., Mat Ali, R., Aimi, N., Kitajima, M. 2007. Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabathricum* L. *Food Chemistry*. 103: 710-716.
16. Stanojević, L., Stanković, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ristić, D., Čanadonovic-Brunet, J. y Tumbas, V. 2009. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *Sensors*. 9: 5702-5714.
17. Yen, G. y Chen, H. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 3: 27-32.
18. Yoshida, T., Amakura, Y., Yokura, N., Ito, H., Isaza, J., Ramírez, E., Pelaez, D., Renner, S. 1999. Oligomeric hydrolyzable tannins from *Tibouchina multiflora*. *Phytochemistry*. 52:1661-1666.