

Capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos e hidroetanólicos de las hojas de *Cynara scolymus* L. “alcachofa” frente al 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo

In vitro antioxidant capacity of aqueous and hydroethanolic extracts of *Cynara scolymus* L. leaves versus 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Boncún León Bertha Dra.¹, Ruiz Reyes Segundo Guillermo Dr.¹, Soto Vásquez Marilú Roxana Mg.¹, Venegas Casanova Edmundo Arturo Dr.¹, Ruidias Romero David Mg.².

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos e hidroetanólicos de las hojas de *Cynara scolymus* L. “alcachofa” frente al 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Para la preparación de los extractos se trabajó con hojas de *Cynara scolymus* L. procedentes del distrito de Virú, provincia de Trujillo, región La Libertad, se prepararon los extractos hidroetanólico y acuoso al 20% (p/v) mediante extracción continua con soxhlet, al cual se le realizó la determinación de metabolitos secundarios, encontrando en el extracto hidroetanólico la presencia de triterpenos, esteroides, flavonoides, compuestos fenólicos y en el extracto acuoso: flavonoides, leucoantocianidinas, taninos y saponinas. Se determinó la capacidad antioxidante mediante el método desarrollado por Brand – Williams *et al.* (2005) cuyas lecturas espectrofotométricas se realizaron a 518 nm, los resultados fueron expresados en porcentaje de captura de DPPH*.

Los extractos hidroetanólico y acuoso de las hojas *Cynara scolymus* L. “alcachofa” presentaron capacidad antioxidante *in vitro* frente al 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil., siendo el extracto hidroetanólico el que presentó mayor porcentaje de captura del radical DPPH*.

Palabras claves: *Cynara scolymus* L., antioxidante, DPPH*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antioxidant capacity of aqueous and hydroethanolic extracts of leaves of *Cynara scolymus* L. "Artichoke" against 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. To prepare the extracts it was used the leaves of *Cynara scolymus* L. from Viru district, province of Trujillo, La Libertad region. It was prepared hydroethanolic and aqueous extracts at 20% (w/v) by continuous extraction with soxhlet, which it was made the determination of secondary metabolites. It was found in the hydroethanolic extract the presence of triterpenes, steroids, flavonoids, and phenolic compounds, in the aqueous extract it was found flavonoids, leucoanthocyanidins, tannins and saponins.

Antioxidant capacity was determined using the method developed by Brand - Williams *et al.* (2005) whose spectrophotometric readings were made at 518nm, the results were expressed in percentage of DPPH* capture. Aqueous and hydroethanolic extracts of *Cynara scolymus* L. leaves "Artichoke" showed *in vitro* antioxidant capacity compared to 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl., being the hydroethanolic extract the one that present the highest percentage of DPPH* radical capture.

Keywords: *Cynara scolymus* L., Antioxidant, DPPH*

¹ Docente. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo-Perú

² Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo-Perú

INTRODUCCIÓN

Ante la creciente oposición al uso de antioxidantes sintéticos en la industria, las investigaciones se han encaminado a buscar productos naturales que presenten actividades antioxidantes similares o mayores y que puedan en poco tiempo sustituirlos.

Es así que la naturaleza ofrece una gran oportunidad para el descubrimiento de nuevos compuestos naturales con actividad antioxidante, los cuales pueden hallarse en la *Cynara scolymus* L. (alcachofa), planta alimenticia cultivada que crece en climas templados, perteneciente al género de las *Cynara* y a la familia Asteraceae. Se nombra como alcachofa, tanto la parte de la planta entera, como la inflorescencia en capítulo, cabeza floral comestible. Esta planta es de gran tamaño, espinosa, rizomatosa, tallo carnoso, estriado, de hasta 2m de alto (1,2), tiene hojas basales, espinosas, alternas, oblongas, labadas, haz de color verde oscuro, envés de color blanquecino a grisáceo tomentoso; las hojas del tallo son más delgadas y alargadas. Presenta inflorescencia en cabezuelas terminales espinosas envueltas por brácteas sobrepuestas carnosas de color verde; flores tubulosas azulinas. Cuenta con un fruto aquenio, provisto de un largo vilano sedoso (3,4), siendo sus semillas negras lisas (5).

Cynara scolymus L. "alcachofa" presenta compuestos químicos como: flavonoides, aceites esenciales; fitoesteroles, saponinas, alcoholes triterpénicos (taraxasterol), taninos, azúcar, inulina, mucílago, pectina, vitamina A, B₂ y C, elementos minerales: potasio, fósforo, yodo, hierro, calcio, magnesio y azufre (6,7).

Las hojas se utilizan para el tratamiento de afecciones hepáticas, ictericia, indigestión, hipertensión, cistitis, reumatismo (1). La inflorescencia es usada como antianémico, antirraquítico, antireumático, tónico digestivo, aperitivo, dolor de estómago, náuseas, meteorismo, usada también para el tratamiento de litiasis biliar y desordenes hepáticos (1,5).

cálculos biliares, gota y anorexia, es diurética, hipocolesterolémica, hipoglicemiantes y laxante (7). El fruto tiene efectos antidiabéticos, antianémicos, sobre enfermedades hepatobiliares y depurativos sanguíneos; y su tallo es usado para el reumatismo (6).

En el Perú, *Cynara scolymus* L. "alcachofa" se ha convertido en uno de los productos bandera de las crecientes industrias agroindustriales apostadas en el norte del país. Este producto alcanzó la cifra record en los años 2008 al 2010 (8, 9,10). No obstante estas exportaciones remarcan el valor alimenticio que tiene la alcachofa, olvidándose por completo del valor medicinal de esta planta, por lo que es importante realizar investigaciones que resalten los valores medicinales de la alcachofa.

Existen investigaciones, que afirman las características antioxidantes de la alcachofa, como aquella donde se determinó la actividad antioxidante de los extractos acuoso-orgánicos de alcachofa utilizando los métodos FRAP, DPPH y LDL en modelo animal, concluyendo que la parte comestible de la alcachofa posee actividad antioxidante DPPH* de 29,2 y 62,6 mg de vitamina C y equivalente a un valor FRAP *in vitro* de 77,9 y 159 mg de vitamina E, respectivamente (11)

Otros investigadores evaluaron la composición polifenólica del extracto alcohólico fresco de *Cynara scolymus* var. spinoso sardo, utilizándose tres métodos diferentes: HPLC /UV, espectrofotométrica directa a 330 nm y espectrofotométrico con reactivo de Folin-Ciocalteu (770 nm). Las propiedades antioxidantes se evaluaron determinando la capacidad de captura del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), obteniendo como resultado que el extracto fresco de *Cynara scolymus* L. var. spinoso presentó mayor contenido de polifenoles y mayor capacidad antioxidante (12).

También Llorac *et al* (2002) presentaron un método rápido, económico y factible para extraer compuestos fenólicos antioxidantes a partir de

subproductos industriales de la alcachofa. Estos son desechados por varias industrias y constituyen partes sobrantes de alcachofa. Se realizaron extracciones a base de metanol y agua. Los extractos de subproductos industriales de alcachofa mostraron una alta actividad de captura de los radicales libres frente a DPPH y ABTS. Así como la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica (método del tiocianato férrico). De acuerdo con estos resultados, los extractos de subproductos industriales de alcachofa pueden ser posibles ingredientes para alimentos funcionales que disminuyan la peroxidación lipídica y promuevan la salud de las personas (13).

No obstante, en nuestro país los antecedentes referentes a la alcachofa son inexistentes. Por lo que en base a todo lo anteriormente expuesto el presente trabajo tuvo como objetivo: Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos acuoso e hidroetanólico de las hojas de *Cynara scolymus* L. "alcachofa" frente al 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil; y determinar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroetanólico y acuoso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas de *Cynara scolymus* L. alcachofa" fueron recolectados en el mes de julio en el distrito de Virú (82°26'00''L.S., 78°48'00''L.O., a 68 m.s.n.m.), provincia Trujillo, región La Libertad. Un ejemplar de la planta fue identificado y depositado en el *Herbarium Truxillensis* (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo.

Posteriormente se procedió a la limpieza de las hojas hasta que estuvieran totalmente libres de sustancias extrañas. Luego éstas fueron secadas en la estufa a 38 °C hasta peso constante. Seguidamente se sometieron a un proceso de molienda empleando un mortero de acero inoxidable. El material pulverizado se pasó por los tamices N° 2, 1,2, 0,7 y 0,3. La muestra de trabajo fue la correspondiente al tamiz N°

0,7. La droga tamizada fue almacenada y protegida en un frasco ámbar de boca ancha.

Preparación de los extractos acuoso e hidroetanólico

Se pesaron por separado dos muestras de 20g de las hojas previamente pulverizadas y tamizadas, luego fueron sometidas a humectación. A la primera muestra se le añadió 20 mL de etanol de 70° G.L. y a la segunda 20 mL de agua destilada y se dejó en reposo 1 hora. Una vez humectadas las muestras se colocaron en cápsulas de porcelana y se mezclaron con cantidad suficiente de arena lavada.

Luego cada muestra se vertió en un cartucho de papel de filtro y se colocó en el extractor del equipo de soxhlet y se extrajo el primero con 150 mL de etanol de 70° G.L. y el segundo con agua destilada. Se sometió a la extracción continua durante 3 horas, teniendo en cuenta el punto de ebullición de cada solvente.

Cada extracto obtenido se filtró con papel filtro Whatman N° 4. Obteniéndose un extracto hidroetanólico de color verde y un extracto acuoso de color marrón.

Ambas muestras fueron enrasadas a 100 mL con su respectivo solvente (14,15).

Determinación de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico y acuoso

Se determinaron los metabolitos secundarios en el extracto hidroetanólico y acuoso mediante el método de Olga Lock de Ugaz modificado por la cátedra de Farmacognosia (16).

Capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos e hidroetanólicos de las hojas de *Cynara scolymus* L. "alcachofa", mediante el método modificado desarrollado por Brand – Williams.

Fundamento del método

La capacidad antioxidante se determinó utilizando el método basado en la reducción del radical libre estable 2,2-

difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*), la cual tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia captadora de radicales libres. La reducción del reactivo es seguida midiendo la disminución de la absorbancia espectrofotométricamente a 518nm. A continuación se muestra la reacción de reducción del radical DPPH con la sustancia antioxidante (AH) (17, 18)

Preparación de la recta de calibración para la solución de radical DPPH*

Se preparó una solución madre de DPPH* 0,1 mM y se conservó refrigerado en envase de vidrio color ámbar recubierto con papel de aluminio. A partir de esta solución se prepararon las siguientes concentraciones: 7.9µg/mL, 15.8µg/mL, 31.5µg/mL, 39.4µg/mL.

Se realizaron tres lecturas de absorbancias en el espectrofotómetro THERMO modelo GENESIS 10 UV a 518 nm, de las cuales se obtuvieron los promedios.

Se utilizó como blanco etanol de 96° G.L, luego se graficaron las concentraciones versus las absorbancias para que obtener la recta de calibración (18,19).

Preparación de la solución problema

Se colocaron 12 fias de 10 mL y en cada una de ellos se agregaron 10 mL de DPPH* 0,1 mM. A las primeras 6 fias se le añadió 20 µL del extracto hidroetanólico y a las otras 6 fias se les añadió 20 µL del extracto acuoso. Se protegió de la luz con papel aluminio. Se dejó en reposo durante 30 minutos. Luego se realizó seis lecturas de absorbancias en el espectrofotómetro THERMO modelo GENESIS 10 UV a 518 nm, de las cuales se calcularon los promedios (18,19).

Preparación de un control

Se preparó un control (que consistió en 5 ml de solución de DPPH* 0,1 mM) y se leyó la absorbancia a 518 nm en el espectrofotómetro. 24,25

Cálculo del porcentaje de captura de radicales DPPH*

Posteriormente, se utilizaron los valores de absorbancia de los tubos problema y la absorbancia del tubo control, para calcular el porcentaje de radicales DPPH* que fueron capturados por 20µl de la muestra

Se calculó el porcentaje de radicales DPPH* capturados, con la siguiente fórmula (18,19):

$$X = \% \text{ de captura de radicales DPPH} = \frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. control}} \times 100$$

Análisis estadístico

Los valores de la capacidad antioxidante fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, utilizando un nivel de significancia del 95% (p<0,05). Este análisis de varianza fue obtenido utilizando el programa estadístico SPSS 18.0 versión en español.

RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios en el extracto hidroetanólico y acuoso de las hojas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofa).

| EXTRACTOS | ENSAYOS | METABOLITOS | RESULTADO |
|-----------------|-----------------------|--------------------------|-----------|
| Hidroalcohólico | Liebermann - Burchard | Triterpenos y esteroides | + |
| | Dragendorff | Alcaloides | - |
| | Mayer | Alcaloides | - |
| | Wagner | Alcaloides | - |
| | Shinoda | Flavonoides | ++ |
| | FeCl ₃ | Compuesto fenólicos | ++ |
| Acuoso | Dragendorff | Alcaloides | - |
| | Mayer | Alcaloides | - |
| | Wagner | Alcaloides | - |
| | Shinoda | Flavonoides | + |
| | Rosenheim | Leucoantocianidina | + |
| | Espuma | Saponina | + |
| | Gelatina | Taninos | + |

Leyenda:

| | | | | | |
|-------------|-----|----------|-----------------|---|----------|
| Intensidad: | + | Baja | Identificación: | + | Positivo |
| | ++ | Moderada | | - | Negativo |
| | +++ | Alta | | | |

Tabla 2.- Porcentajes de captura del radical DPPH* en los extractos hidroetanólico y acuoso de las hojas de

| Muestra | Volumen de solución de DPPH* 0,1 mM (mL) | Volumen del extracto hidroetanólico o acuoso (µL) | Volumen del extracto (µL) | % de captura del radical DPPH* (extracto hidroetanólico) | Concentración de DPPH* Capturado (µg/mL) | % de captura del radical DPPH* (extracto acuoso) | Concentración de DPPH* Capturado (µg/mL) |
|-----------------|--|---|---------------------------|--|--|--|--|
| 1 | 10 | 20 | 20 | 52,2 | 16,6 | 25,4 | 8,3 |
| 2 | 10 | 20 | 20 | 47,7 | 15,2 | 21,6 | 7,1 |
| 3 | 10 | 20 | 20 | 52,6 | 16,7 | 31,0 | 10,0 |
| 4 | 10 | 20 | 20 | 46,2 | 14,7 | 24,2 | 7,9 |
| 5 | 10 | 20 | 20 | 49,9 | 15,9 | 26,5 | 8,6 |
| 6 | 10 | 20 | 20 | 50,6 | 16,1 | 23,1 | 7,6 |
| Promedio | 10 | 20 | 20 | 49,9 | 15,8 | 25,3 | 8,2 |

Cynara scolymus L. (Alcachofa).

DISCUSIÓN

Antes de empezar la valoración de un principio activo, es necesario realizar un Screening, tamizaje o marcha fitoquímica, que permita determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos de la planta, a partir del cual, puede orientarse las extracciones y/o el fraccionamiento de los extractos eligiendo los grupos de mayor interés para el investigador (16).

El tamizaje fitoquímico realizado a los extractos (hidroetanólico y acuoso), según la Tabla 1, en el extracto hidroetanólico, se evidenció la presencia de triterpenos y esteroides, flavonoides, compuestos fenólicos; mientras que en el extracto acuoso se identificaron flavonoides, leucoantocianidas saponinas y taninos. Comparando ambos extractos se nota una mayor presencia de flavonoides en el extracto hidroetanólico. Datos que son corroborados con los reportados en esta especie, donde se menciona que las hojas de alcachofa presentan gran cantidad de flavonoides como: apigenín y su rutinósido, cosmósido, cosmosin, cinarósido, cinarotriósido, escolimósido, hesperidósido, hesperitín, luteolín, sus derivados glucosídicos, gentiobiosídico, rutinosídico y ramnosil-glucosídico, maritimeín, quercetín y rutín; los compuestos fenólicos ácidos caféico, clorogénico, sus isómeros neo e iso y criptoclorogénico; los lignanos ácidos 1-3-, 3-4-, 3-5- y 4-5-dicafeoil-quinico, cinarín, los sesquiterpenos iso-amberboín, cianopicrina, guaianólidos I y II de *Cynara scolymus*, cina-ratriol, cinaropicrín; el compuesto dehidrogenado 8-epi-gro-sheimín; los triterpenos cinarogenín, taraxasterol; las cumarinas escopoletín y glucósido de esculetín y el cinarólido, de estructura no determinada (20,21,22).

En la Tabla 2 se observan los porcentajes de captura del radical DPPH* del extracto hidroetanólico y acuoso de las hojas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofa), siendo estos 49.9% y 25.3% para el

extracto hidroetanólico y acuoso respectivamente. Asimismo se observa que la cantidad de DPPH* capturado por el extracto hidroetanólico es mucho mayor que el extracto acuoso; siendo estos 15.8 $\mu\text{g/mL}$ y 8.2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, evidenciándose que el extracto hidroetanólico presenta un mayor porcentaje de captura del radical DPPH*. Al correlacionar la actividad antioxidante como una función de la naturaleza del solvente extractor, se observaron diferencias significativas entre los extractos ($p < 0,05$).

La mayor capacidad antioxidante del extracto hidroetanólico de las hojas de *Cynara scolymus*, es atribuible a la mayor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides que se encuentran en este extracto. Dato que es corroborado por Mabeau *et al.* Asimismo estos autores determinaron que los compuestos fenólicos más representativos en la alcachofa (*Cynara scolymus* L.) son el ácido Caféico (ácido 3,4-dihidroxicinámico), el ácido clorogénico (ácido 3-Cafeilquinico), la cinarina, el cinarósido, la isorhoifolina, y la narirutina, todos estos con propiedades antioxidantes (23)

Según Sroka y Cisowski, la actividad antioxidante del ácido caféico es mayor que la del ácido clorogénico, estos compuestos tienen bondades en función del grupo hidroxilo que contienen, el ácido caféico presenta dos grupos OH en su estructura mientras el clorogénico sólo uno (18)

Asimismo los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (3,4). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (24). Las propiedades anti-radicales libres de los flavonoides se dirigen

fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma) (25).

De otra parte, los compuestos de naturaleza fenólica juegan papel importante en los procesos de oxidación lipídica y se les asocia con la actividad antioxidante (26).

Específicamente, ácidos fenólicos y flavonoides son típicamente reconocidos como poseedores de actividad antioxidante. Ácidos tales como caféico, ferúlico y vainílico, entre otros, son de amplia distribución en el reino vegetal y universalmente se les ha implicado en el papel antioxidante de frutas, verduras, hortalizas y otros vegetales (27).

En general se afirma que los fitofenólicos exhiben actividad antioxidante/prooxidante, dependiendo de factores como el potencial reductor de metales, el comportamiento quelante, el pH, las características de solubilidad, de su conformación estructural, de la cantidad de grupos hidroxilos disponibles en la molécula, entre otros. (28).

CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroetanólico son triterpenos, esteroides, flavonoides, compuestos fenólicos y en el extracto acuoso se identificaron flavonoides, leucoantocianidinas, taninos, saponinas.
2. Los porcentajes de captura del radical DPPH* del extracto hidroetanólico y acuoso de las hojas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofa) fueron 49,9% y 25,3% respectivamente.
3. El extracto hidroetanólico de las hojas de *Cynara scolymus* L. "alcachofa"

presenta mayor capacidad antioxidante *in vitro* frente al 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil, que el extracto acuoso.

Correspondencia:

Marilú Soto Vásquez

Correo electrónico: msoto@unitru.edu.pe

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arango M. Plantas Medicinales: Botánica de interés médico. Colombia: Editorial Artes Gráficas Tizán; 2006. p.56-57
2. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. 2da edición. Guatemala: Editorial Universitaria; 1999. p.120.
3. Alonso J. Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas. 2da edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Isis; 1998. p.202.
4. Ara R. Cien plantas medicinales escogidas. 4ta edición. Madrid, España: Editorial EDAF S.A.; 2004. p. 45.
5. Agapito F, Sung E. Fitomedicina 1100 Plantas Medicinales II. Lima. Perú: Editorial Isabel; 2004. p.305.
6. Villar M, Villavicencio O. Manual de fitoterapia. 2da. Edición. Lima, Perú: OPS/OMS; 2001.p.363.
7. Cavero R, Marco R, López M. y Echeverría L. Composición química de la alcachofa de Tudela a lo largo de su desarrollo. Pub. Bio. Uni. Nav. 1997; 10(1): 67-77.
8. Nicho P. Programa nacional de investigación hortalizas. URL disponible en: <http://www.inia.gob.pe/notas/nota0110/expo/PNI%20Hortalizas%20Pedro%20Nicho.pdf>. (Fecha de acceso 10 de octubre del 2012).
9. Asociación de Exportadores (ADEX). Investigación de alcachofa para mejorar competitividad. URL disponible en: <http://eldiario.pe/adex-pide-al-gobierno-invertir-en-investigacion-de-alcachofa-para-mejorar-competitividad/>. (Fecha de acceso 09 de noviembre del 2012).

10. Gobierno Regional La Libertad. Agencia Agraria Pacasmayo. Boletín informativo "El labrador". 2010 dic. Año II N° 7: p.1-2.
11. Jiménez A, Dragsted L, Daneshvar B, Pulido R, Saura F. In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. J. Agric. Food Chem. 2003 august 27; 51(18):5540-45. PubMed PMID: 12926911.
12. Alamanni M, Cossu M. Antioxidant activity of the extracts of the edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) var. *Spinoso sardo*. Ital. J. Food Sci. 2003 Jun 12; 15(2): 187-195.
13. Llorach R, Espín J, Tomás-Barberán F, Ferreres F. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. J. Agric. Food Chem. 2002 Jun 04; 50 (12): 3458-64. PubMed PMID: 12033811
14. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana, Cuba: Editorial Félix Varela; 2000. p.44
15. Miranda M. Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana, Cuba: Editorial Félix Varela. 2001. p. 18.
16. Lock O. Investigación Fitoquímica. Lima, Perú: Fondo editorial PUCP; 1994. p. 125.
17. Brand-Williams W, Cuvelier M and Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm. - Wiss. Technol. 1995; 28: 25-30.
18. Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. Food Chem. Toxicol. 2003 Jun; 41(6): 753-58. PubMed PMID: 12738180
19. López C, Horna L. Capacidad antioxidante *in vitro* de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K. (sauco) proveniente de la ciudad de Huamachuco. Tesis de Bachiller. Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 2011. 10 pp.
20. Delgadillo O. Acción de la *Cynara scolymus* sobre la colesterolemia. Tesis de Bachiller. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1996. 45pp.
21. Fritsche J, Beindorff C, Dachtler M, Zhang H, and Lammers JG. Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. Eur Food Res Technol. 2002; 215 (2): 149-57.
22. Gebhardt R. anticholestatic activity of flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) and of their metabolites. Med Sci Monit. 2001; 7 (1): 316-20.
23. Mabeau S., *et al.* Antioxidant activity of extracts of artichoke and by-products. Acta horticulturae. 2007. Jan; 730(1):491-96.
24. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G y Goldberg DM.: The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. Clin. Chim Acta. 1995 mar 31; 235(2):207-219. PubMed PMID: 7554275
25. Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG y Hara Y: Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. Flavonoids in health and disease. 1998. 4(1): 137-161.
26. Sokmen M. *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. Life Sci. 2005 may 06; 76 (25): 2981-93. PubMed PMID: 15820508
27. Pyo YH, Lee T, Logendra L y Rosen R. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cykla*) extracts. Food Chem. 2004 mar; 85(1): 19-26.
28. Mathew S y Abraham T. *In vitro* antioxidant activity and scavenging

effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. Food and Chemical Toxicology. 2006 feb; 44(2): 198–206. PubMed PMID: 16087283.