

EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Piper aduncum* EN LA OXIDACIÓN DE LDL HUMANA Y CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA PARA LA ESTABILIZACIÓN DE LA ESPECIE RADICALARIA *in vitro*

Effect of ethanol extract of leaves from *Piper aduncum* in human LDL oxidation and Median Effective Concentration for *in vitro* stabilization of radical species

Salomón Alva Bazán^{1*}, Miriam Gutiérrez Ramos¹, Roger Rengifo Penadillos²

Recibido: 13 de junio del 2014; Aceptado: 28 de diciembre del 2014

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* en la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la Concentración efectiva media (CE50) necesaria para la estabilizar especies radicalarias. Se procedió a obtener el extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* mediante el método soxhlet para determinar su actividad captadora del radical libre 2,2-difenilhidrazina (DPPH*) por el método de Brand-Williams y col, así como el grado de inhibición de la lipoperoxidación de LDL con el método enzimático Trinder y el método de TBARS, para lo cual se trabajó con 36 muestras, conformándose al azar dos grupos de trabajo: un grupo control y un grupo problema. El extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* tiene una CE50 de 32,4 ug/mL; el grado de inhibición de la lipoperoxidación de LDL por este extracto fue de 62,62%. Se concluye que 32,4 ppm del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* reducen en un 50 % la concentración inicial del DPPH* así mismo este extracto impide la oxidación de la LDL humana en un 62,62% siendo de esta manera una alternativa como un inhibidor de la lipoperoxidación humana *in vitro*.

Palabras Clave: Extracto etanólico, *Piper aduncum*, LDL, especies radicalarias.

ABSTRACT

In this research the effect of ethanol extract of leaves from *Piper aduncum* on the oxidation of low density lipoprotein (LDL) human and median effective concentration (EC50) necessary for the stabilization of radical species was determined. Proceeded to obtain the ethanol extract from leaves of *Piper aduncum* by soxhlet method to determine free radical scavenging activity of 2,2-diphenylhydrazine (DPPH*) by the method of Brand-Williams *et al*, and the degree of inhibition LDL lipid peroxidation by the enzymatic method and the method of Trinder TBARS. The ethanol extract from leaves of *Piper aduncum* had an EC50 of 32.4 ug / mL; the degree of inhibition of LDL lipid peroxidation by the extract was of 62.62 %. It is concluded that 32.4 ppm from ethanol extract of *Piper aduncum* reduces in 50% the initial concentration of DPPH *, likewise this extract prevents the oxidation of human LDL in 62.62 %. Therefore this extract is an alternative as *in vitro* human lipoperoxidation inhibitor.

Keywords: Ethanol extract, *Piper aduncum*, LDL, radical species.

INTRODUCCIÓN

La inestabilidad de los radicales libres se debe a que han perdido uno de sus electrones e intentan reponerlo tomándolo de otros átomos. Esto crea una reacción en

cadena que ocasiona grandes daños a nuestras células, que se manifiestan en envejecimiento y un buen número de enfermedades¹.

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

² Docente Cátedra de Química Física. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú

*Autor para correspondencia: salobal_2@hotmail.com

Muchas enfermedades se relacionan con el estrés oxidativo, como lo es la aterosclerosis, el cáncer, las cataratas, insuficiencia renal aguda, crónica y artritis, Parkinson, enfermedad de Alzheimer, hipertensión arterial, enfermedades autoinmunes, cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica entre otras. La teoría de los radicales libres en el envejecimiento supone que éste resulta de la acumulación de lesiones orgánicas debidas al ataque de éstas especies radicalarias sobre los tejidos. También se ha detectado una disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de radicales libres ².

Los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de inhibir, retardar o interrumpir las reacciones de oxidación y transformación que causan daño a los tejidos deteniendo los procesos de iniciación o propagación vía radicales libres, por lo que los antioxidantes son necesarios y ampliamente utilizados para prevenir enfermedades cardiovasculares, arterosclerosis, enfermedades degenerativas, envejecimiento prematuro, entre otras ³.

Gran variedad de antioxidantes son obtenidos de fuentes naturales como los polifenoles, carotenos y tocoferoles entre otros, lo que ha posicionado a los productos naturales como una fuente de compuestos con potencial antioxidante comparable con la de antioxidantes sintéticos ^{4,5,6}.

Piper, el género nominal de la familia *Piperaceae*, es uno de los géneros más diversos de angiospermas basales. Se considera que actualmente tiene cerca de 1500 especies y su mayor diversidad se encuentra en los bosques húmedos de las regiones tropicales de todo el planeta ⁷.

Nuestro país tiene el privilegio de contar en su territorio con numerosas plantas medicinales, entre ellas la familia *Piperácea* que comprende unas 1300 especies. La especie *Piper aduncum*, es oriunda de América del Sur, abunda en el Perú, Ecuador, Bolivia, Paraguay, Brasil y norte de Argentina. Crece particularmente en lugares húmedos a orillas de riachuelos y de fangos. Es un arbusto de 2 – 3 m. de altura, la hoja entera es ampliamente ovada y acorazonada

en la base, con el ápice terminal en punta, de color gris verdoso, pubescente por el envés, olor aromático que recuerda un poco a la menta, sabor cálido amargo no desagradable ⁸.

En el trabajo de investigación intitulado efecto antihipertensivo del extracto de *Piper aduncum* ‘matico’ sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones, se concluye que el extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* ‘matico’ en las condiciones experimentales de trabajo, tiene metabolitos secundarios con actividad antihipertensiva ⁹.

En base a los antecedentes de los principios activos surge el interés de investigar: ¿Qué efecto tiene el extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* en la oxidación de LDL humana y cuáles la CE50 para la estabilización de especies radicalarias, *in vitro*? Considerándose que el extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* inhibe la oxidación de LDL humana, *in vitro*

Constituyen objetivos del presente trabajo:

Determinar el efecto del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* en la oxidación de LDL humana, *in vitro*.

Determinar la CE50 para la estabilización de especies radicalarias, *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODO

Material Biológico:

- 36 muestras sanguíneas de personas voluntarias, de ambos sexos, estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNT.

Criterios de inclusión: se seleccionó a estudiantes con edades entre 20 y 25 años.

Criterios de exclusión: Estudiantes entre 20 y 25 años obesos con tratamiento farmacológico, con Diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial o gestantes.

- 05 Kg de hojas de *Piper aduncum*

Material de Laboratorio y Equipos:

El de uso común de laboratorio.

Reactivos:

- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 1%
- Ácido tricloroacético (TCA) 15%
- CuSO₄·7H₂O 100 µM
- Solución metanólica de DPPH* 0,02 mg/mL

Método:**Obtención de las hojas de *Piper aduncum*:**

Las hojas de *Piper aduncum* fueron recolectada en el Distrito de Otuzco en el mes de Mayo del 2013.

Identificación de las hojas de *Piper aduncum*:

Las hojas obtenidas fueron identificadas en el *Herbarium Truxillensis* de la Universidad Nacional de Trujillo y depositadas con el código 57600.

Selección y secado:¹⁰

Se procedió a la selección de las hojas considerando su forma y su estado de conservación, seguidamente fueron lavadas y desinfectadas con solución de hipoclorito de sodio y secadas a temperatura ambiente sobre papel Kraft. Posteriormente se colocaron en la estufa, en bolsas de papel Kraft agujereadas, a una temperatura de 40 °C por 24 horas hasta peso constante.

Pulverizado:¹⁰

Las hojas secas se pulverizaron en un mortero de acero.

Tamizado:¹⁰

El polvo fue tamizado empleando tamiz N° 18, almacenándose en frascos de vidrio ámbar.

Obtención del extracto etanólico de *Piper aduncum*:¹¹

10 g del polvo de hoja de *Piper aduncum* fueron mezclados con cantidad suficiente de arena lavada y tratada, extrayéndose los principios activos con 250 mL de alcohol etílico de 96° GL, a través del método Soxhlet, durante 3 horas, el extracto etanólico obtenido se llevó a rotavapor hasta evaporar todo el disolvente.

Entrega de la Carta de Consentimiento Informado:

Luego de informar a las personas voluntarias se procedió al llenado y firma de la carta de Consentimiento Informado.

Obtención de basales de LDL:

Las personas voluntarias que participaron en el estudio acudieron en ayunas (de 12 a 16 horas) para la extracción de muestra sanguínea de la vena media cubital del antebrazo, en cantidad aproximada de 6 mL, colocándose ésta en tubos limpios con anticoagulante. Se obtuvo el suero de manera usual.

Actividad captadora del radical libre DPPH•:

Mediante el procedimiento descrito por Brand-Williams y col.¹²

Se pesaron 45 mg de extracto seco de hojas de *Piper aduncum*, disolviéndose en 25 mL de etanol 96° G.L., a partir de esta solución se midieron 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mL a matraces aforados de 10 mL enrazándose con etanol de 96° G.L.

A 500 µL de las soluciones que contenían diferentes concentraciones de extracto etanólico se adicionó a 1000 µL de una solución etanólica de DPPH• (0,02 mg/mL), leyéndose la absorbancia a 517nm cada dos minutos, hasta estabilización de la reacción. La concentración de DPPH• a diferentes tiempos de reacción ([DPPH•]T) se cuantificaron de acuerdo con la siguiente ecuación de la recta:

$$A_{517nm} = 31,63 [DPPH\bullet]T - 0,01686 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Con un coeficiente de regresión lineal de 0,99, y una desviación estándar de 0,004351. El porcentaje del radical DPPH• remanente (% DPPH•] REM) se calcula por la siguiente ecuación:

$$\% [DPPH\bullet] \text{ REM} = ([DPPH\bullet] T / [DPPH\bullet]) * 100$$

Ecuación 2.

El modelo de la curva dosis-respuesta que se obtiene al correlacionar el porcentaje de DPPH• remanente frente a la concentración de antioxidante, permite calcular la cantidad de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del radical libre (CE50)¹³, con la siguiente ecuación:

$$CE50 = (50 - b)/m \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde b = intercepto de la recta y m= valor absoluto de la pendiente de la recta.

Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)¹²:

• **Aislamiento de LDL**

Se obtuvo con el método enzimático Trinder de laboratorio Wiener¹⁴.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se separaron del suero precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular. Luego de centrifugar, en el sobrenadante quedan las HDL y VLDL y las LDL precipitan.

Las muestras de LDL obtenidas fueron repartidas en dos grupos experimentales:

Grupo Control: 6 muestras de LDL

Grupo Problema: 30 muestras de LDL con extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* procedentes del Distrito de Otuzco.

• **Oxidación de la LDL**

El grupo control estaba conformado por 6 tubos de ensayo que contenían 0,1 mL de LDL y 0,2 mL de agua destilada.

El grupo problema estaba compuesto por 30 tubos de ensayo conteniendo 0,1 mL de LDL y 0,2 mL de extracto etanólico.

La oxidación se inició con la adición a todos los tubos de 0,1 mL de $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 M, incubándose durante 30 minutos a 37°C.

• **Determinación de TBARS**¹²

Seguidamente se añadió 1 mL ácido tricloroacético (TCA) al 20%, llevándose a ebullición en un baño de agua a 100°C durante 30 minutos, luego la suspensión

se centrifugó a 1700 g por 20 minutos, decantándose en tubos limpios a los que se les agregó 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1%, continuándose con la ebullición en un baño de agua a 100°C durante 30 minutos, después del tiempo transcurrido se volvió a centrifugar a 1700 g por 20 minutos, cada sobrenadante se transfirió a la celda de un espectrofotómetro Jenway para leer la absorbancia a 535 nm frente a un blanco de reactivos. La concentración de malondialdehído (MAD) se expresó en nM por 100 uL de suero.

• **Curva de calibración de malondialdehído (MAD)**¹⁵

La curva de calibración del malondialdehído (MAD) se realizó empleando el método de estándar externo con 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Se preparó una disolución de MDA diluyendo 20 µL de TEP en 100 mL de disolución amortiguadora de pH = 3,5. Con una posterior dilución al 1:10 se obtuvo una disolución con una concentración de 83,5 µmol/L. A partir de esta disolución patrón se prepararon las soluciones estándar de concentraciones 0,42, 0,83, 1,67, 2,50, 4,17, 8,3 y 16,7 nmol/L, preparado concomitantemente a una solución de ácido tiobarbitúrico a una concentración de 0,8%, la ecuación resultante de graficar absorbancia vs. concentración permitió calcular la concentración de MAD en nmol/mL en las diferentes muestras.

Análisis estadístico:

Los datos se procesaron con estimadores estadísticos como media, desviación estándar, coeficiente de variación para dar más confiabilidad a los resultados. De acuerdo con los hallazgos se utilizó una prueba t pareada para establecer diferencias, considerando un valor de p menor a 0,05 como estadísticamente significativo¹⁶.

RESULTADOS

Tabla 1. Cantidad de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del radical libre (CE50)

Pendiente	Intercepto	CE50 mg/mL
54,97	48,22	0,0324

Tabla 2: Concentración de malondialdehído en el grupo control

Control	[MDA] nmol/mL
PROMEDIO	3,5559

Tabla 3. Grado de inhibición de la peroxidación lipídica por el extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum*, en base a los productos formados durante la actividad

Problema	[MDA] nmol/mL	Grado de inhibición (%)
Promedio	1,3292	62,6169

Leyenda:

[MDA] concentración de malondialdehído

Tabla 4. Prueba t de student para verificar la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de investigación

	Control [MDA] nmol/mL	Problema [MDA] nmol/mL
Media	3.55595	1.32708667
Varianza	3.5E-08	0.01640719
Observaciones	6	30
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	29	
Estadístico t	95.3069542	
P(T<=t) una cola	4.5363E-38	
Valor crítico de t (una cola)	1.69912703	
P(T<=t) dos colas	9.0726E-38	
Valor crítico de t (dos colas)	2.04522964	

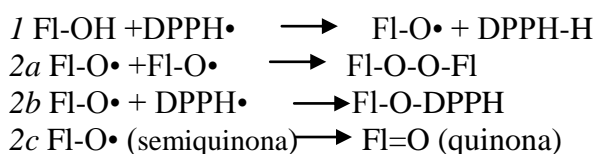
DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación, se determinó la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum*, expresado como CE50; con el propósito de poder darle una aplicabilidad y contribuir con la sociedad.

Las diferentes concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* presentan un porcentaje de captura de DPPH* bastante elevado evidenciando un alto potencial antioxidante del vegetal a concentraciones relativamente pequeñas.

Muchos autores sostienen que la actividad antioxidante de estos extractos polares es debida, a la presencia de sustancias con grupos hidroxilos, los cuales ejercen su acción por donación de protones (capacidad secuestrante de radicales libre), o bien por interacción, adición o combinación de radicales o por reacciones redox (transferencia de electrones).

Los resultados confirman dichas observaciones. De hecho, las reacciones más aceptadas para definir la capacidad de captación de radicales libres, las cuales son inicialmente atribuidas a la alta reactividad de los sustituyentes hidroxilo, son ¹⁷:



La reacción 2a representa el acoplamiento entre dos radicales flavonoides (dimerización), la reacción 2b el acople entre un radical flavonoide con un radical DPPH•, y la reacción 2c representa, probablemente, el mecanismo de terminación predominante, el cual se produce mediante la formación de una quinona, más estable, a partir de una semiquinona, por pérdida de 1 electrón¹⁷. Por lo tanto, el grupo catecol en el anillo B de los flavonoides, es el principal grupo funcional en lo concerniente a la actividad antioxidante.

Investigadores de India determinaron la capacidad antioxidante frente al 2,2-difenil-

1-pyrcilhidrazilo, del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn, encontrando un CE50 de 105,99 ug/mL para dicho extracto y un CE50 de 52,71ug/mL para el patrón curcumina¹⁸.

Otros investigadores determinaron la capacidad antioxidante frente al DPPH*, del extracto de metanólico de raíz de *Indula cappa*, encontrando un CE50 de 116,64 ug/mL para dicho extracto y un CE50 de 4,85 ug/mL para el patrón pirogalol¹⁹.

La CE50 es un parámetro ampliamente utilizado para describir la habilidad de un compuesto o extracto para atrapar el radical DPPH*, y los valores son obtenidos mediante una correlación lineal entre el porcentaje remanente de DPPH* y las diferentes concentraciones del extracto⁹.

El resultado que se presenta en la tabla 2 y corresponde al valor del CE50 obtenido con las diferentes concentraciones del extracto, ratificando el potencial del extracto de hojas de *Piper aduncum* para inhibir la propagación de radicales libres; el CE50 de 32,4 ug/mL obtenido para este extracto es menor al obtenido para el extracto de metanol de los rizomas *Curculigo orchioides* Gaertn con el valor de CE50 de 105,99 ug/mL y de CE50 de 52,71ug/mL para el patrón curcumina¹⁸ y también menor al conseguido para el extracto metanólico de raíz de *Indula cappa* CE50 de 116,64 ug/mL¹⁹, lo que indica que tiene un mayor poder antioxidante que las especies anteriormente citadas, pero menor al del pirogalol que tiene un CE50 de 4,85 ug/mL.

Se ha evaluado también la inhibición de la oxidación lipídica, utilizando la formación de malondialdehído (MDA) como índice de la oxidación de LDL, después de la oxidación con CuSO₄.7H₂O

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son, en su mayoría, especies moleculares con un electrón libre en su estructura que le confiere un carácter muy reactivo y si bien resulta importante su formación en determinados casos, un desbalance en estas reacciones puede implicar daños severos para

las células. Por este motivo es importante conservar un equilibrio entre su generación y aquellos mecanismos que protegen a las células de sus efectos nocivos y cuando estos fallan se hace necesario su complementación con la aplicación de sustancias antioxidantes²⁰.

Entre otras múltiples reacciones, estos radicales libres pueden interactuar con ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, y causar la destrucción oxidativa de las mismas; a este proceso es al que se le denomina lipoperoxidación. Uno de los ácidos grasos más importantes en este proceso es el malondialdehído (MDA), que es uno de los productos finales del metabolismo oxidativo de los lípidos de membranas y es frecuentemente utilizado como indicador de la lipoperoxidación de muestras biológicas. Los extractos que actúan impidiendo la formación del MDA son posibles antioxidantes que inhiben la peroxidación lipídica²¹.

De los resultados mostrados en la tabla 2 se observa que la oxidación de la LDL en el grupo control tiene como resultado 3,556 nmol (MDA)/mL. Sin embargo, la oxidación fue inhibida después de la adición de una concentración de 3 mg/mL de extracto etanólico de la especie en estudio, al observarse que las [MDA] fue de 1,3292 nmol/mL, cantidad inferior al del control por lo que el extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* presentan la capacidad de inhibir la formación de lipoperóxidos mediados por TBARS, teniendo un máximo de inhibición sobre la oxidación de la LDL humana de 62,62%, superior al encontrado en un estudio acerca de la actividad antioxidante del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides*, que fue de 48%¹⁸.

En este estudio se evidencia que el extracto etanólico de las hojas de las hojas de *Piper aduncum* presenta acción antioxidante, *in vitro*, teniendo un grado de inhibición de la oxidación de la LDL de 62,62 %, lo que se corrobora con el CE50 de 32,4ug/mL.

Conflicto de interés: No se presentan conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- González M, Muñiz-Rodríguez P, Valls-Bellés V. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios *in vitro* e *in vivo*. Centro de información: Cerveza y salud. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.nutricion.org/publicaciones/pdf/libro_cerveza_8.pdf. Consultado: 02 de diciembre de 2012.
- Guerra J. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes AN. MED. INTERNA. Madrid. 2001 18(6): 326-335. Fecha de acceso [30 de noviembre de 2012]. <http://scielo.isciii.es/pdf/ami/v18n6/revison1.pdf?iframe=true&width=95%&height=95%>
- Chen J, Chang H, Kim H, Park H. Synthesis of phospholipase A2 inhibitory biflavonoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006.16 (9): 2373-2375. Fecha de acceso [15 de diciembre de 2012]. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042009000300011&script=sci_arttext
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyananda R. Review of the antioxidant potential of medicinal plant Species. *Food and Bioproducts Processing.* 2011 89(3):217-233. Fecha de acceso [24 de noviembre de 2012]. Disponible en <http://www.relaquim.com/archive/2011/p2011393-91.pdf>
- Mesa A, Rincón D, Toro J, Tamayo A, Blair S, Rojano B.: Actividad antioxidante de *Piper piedecuestanum* trel. & Yunck. y *Piper subpedale* trel. & Yunck. *Rev. Latinoamer. Quím.* 2011 39/3 91 – 99.
- Moon J-K, Shinamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *J AgricFoodChem* 2009.57: 1655–1666. Fecha de acceso [30 de Diciembre de 2012]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182948>
- Jaramillo A, Callejas R. Classification and Phylogenetics of *Piper* L. En: Dyer L, Palmer A (Eds.). *Piper: A model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution.* Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2004 p.179-198. Fecha de acceso [21 de Noviembre de 2012]. Disponible en http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-30599-8_10
- Rengifo R. Extracción y caracterización de los metabolitos secundarios de las hojas de *Piper aduncum* y determinación de su actividad antibacteriana, *in vitro*. Tesis para optar el grado de maestro en Farmacia y Bioquímica. Mención Productos Naturales Terapéuticos. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2009. pp. 1,2.
- Arroyo J, Hañari R, Tinco A, Baca D, Domínguez L, Buendía J. Efecto antihipertensivo del extracto de *Piper aduncum* ‘matico’ sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones. *An Fac Med.* 2012; 73(4):275-80
- Mc. Cabe W. Operaciones Unitarias en ingeniería química. Séptima edición. Mc Graw Hill. México. 2007. 799-834, 835-875, 1041-1049, 1065-1070.
- González A, Kafarov V, Guzmán A. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas [fecha de acceso Noviembre 2012]. *Prospect.* 2009. 7(2): 53-60. Disponible en: https://www.uac.edu.co/images/stories/publicaciones/revistas_cientificas/prospectiva/volumen-7-no-2/articulo6-v7n2.pdf
- Osorio E, Montoya G, Bastida J. Caracterización fitoquímica de una fracción de biflavonoides de *Garcinia madruno*: su inhibición de la oxidación de LDL humana y su mecanismo de

- estabilización de especies radicalarias. *Vitae*. 2009. 16(3): 369-377 Universidad de Antioquia Colombia. Fecha de acceso [5 de diciembre de 2012]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=169813261011>.
Modificado y validado por Orlando Pretell Sevillano, Departamento de Química Biológica y Fisiología animal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.
13. Nisar A, Hina F, Haider A, Muhammad R, Tariq M, Nighat F. Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated tissues of *Piper nigrum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2010 102(1): 129-134. Fecha de acceso [15 de noviembre de 2012]. Disponible en <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11240-010-9712-x>
 14. Tresierra A. Metodología de la Investigación científica. Trujillo Perú. Editorial Biociencia. 2000
 15. Stepa V, Ródenas S, Martín M. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040. Madrid. *Anal. Real Acad. Farm.* 2001, 67
 16. Parra D, Darío I. Método y Conocimiento: metodología de la investigación cualitativa e investigación cuantitativa. Universidad Eafit. Colombia 2006. pp: 330 – 337.
 17. Hussain K, Ismail Z, Sadikun A, Ibrahim P. Standardization and *in vivo* antioxidant activity of ethanol extracts of fruit and leaf of *Piper sarmentosum*. *Planta medica*. 2010. 76(5): 418-25. Fecha de acceso [18 de diciembre de 2012]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19862670>
 18. Bafina A, Mishra S. Actividad antioxidante del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn. *Ars Pharm* 2005; 46(2): 131. India. University of Baroda. Fecha de acceso [12 de noviembre de 2013]. Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/316.pdf>.
 19. Kalola J, Shah M. Actividad de barrido de los radicales libre de *Inula cappa*. *Ars. Pharm* 2006; 47(4): 393. India: College of Pharmacy. Fecha de acceso [12 de noviembre de 2013]. Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/370.pdf>.
 20. Fernández M, Hernández I, Aneiros A, García I, Tello J. Actividad antioxidante en extractos de algas marinas. Centro de Bioproductos Marinos. Loma y 37, Plaza. C. Habana. Cuba.
 21. Echeverry C. Rol del estrés oxidativo en el sistema nervioso central. Evaluación de la lipoperoxidación en un modelo de hipoxia- re oxigenación y capacidad antioxidante de productos de origen natural y sintético. Tesis para optar por el título de Licenciado en Bioquímica. Montevideo. Uruguay. 1998.