

## 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

*In vitro* antioxidant capacity of total flavonoids obtained from leaves of *Sambucus peruviana* H.B.K (sauco) from Huamachuco city

Ruiz Reyes Segundo Guillermo<sup>1</sup>, Venegas Casanova Edmundo<sup>1</sup>, Ruidías Romero David<sup>2</sup>, Horna Acevedo Lissette<sup>3</sup>, López Cenizario Carlos Wilfredo<sup>3</sup>

### RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los flavonoides totales extraídos de hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K., mediante el método descrito por Brand-Williams, las determinaciones se hicieron según concentración de flavonoides y según tiempo de exposición (1, 15, 30, 45 minutos) de la solución antioxidante frente al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH\*). En primera instancia se realizó el tamizaje fitoquímico mediante el método descrito por el Dr. Armando Cuéllar, para posteriormente realizar la extracción, purificación y cuantificación de los flavonoides totales obtenidos del extracto fluido elaborado de las hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K. mediante el método descrito por Kostennikova Z. y adaptado por la Cátedra de Farmacognosia y Farmacobotánica. Los fitoconstituyentes encontrados fueron Aminoácidos, Lactonas, Triterpenos/esteroles, Antocianidinas, Flavonoides, Saponinas y Polifenoles. El porcentaje de flavonoides totales fue de 0.4775% expresados como quercetina y su capacidad antioxidante *in vitro*, expresado en porcentaje de captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH\*), fue directamente proporcional a la concentración de flavonoides y al tiempo de exposición de ambas soluciones. Se concluye que la capacidad antioxidante de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K. es proporcional tanto a su concentración como a su tiempo de exposición frente al DPPH\*.

**Palabras claves:** *Sambucus peruviana*, Extracto fluido, Flavonoides totales, Cuantificación de flavonoides totales, Capacidad antioxidante *in vitro*

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antioxidant capacity *in vitro* of total flavonoids extracted from leaves of *Sambucus peruviana* HBK, by the method described by Brand-Williams, determinations were made according to flavonoid concentration and exposure time according to (1, 15, 30, 45 minutes) of the antioxidant solution against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH\*) free radical. Phytochemical screening was performed by the method described by Dr. Armando Cuellar, later to make the extraction, purification and quantification of total flavonoids obtained from the fluid extract made from the leaves of *Sambucus peruviana* HBK by using the Kostennikova method and adapted by the Department of Pharmacognosy and pharmacobotany. The phytoconstituents founded were aminoacids, lactones, triterpenes / sterols, anthocyanidins, flavonoids, saponins and polyphenols. The percentage of total flavonoids was 0.4775% calculated as quercetin and its antioxidant capacity *in vitro*, expressed as a percentage of capture of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil free radical (DPPH\*), was directly proportional to the concentration of flavonoid and exposure time solutions. We concluded that the antioxidant capacity of total flavonoids obtained from

<sup>1</sup>Doctor en Farmacia. Docente Cátedra Farmacognosia. Fac. Farmacia- Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

<sup>2</sup>Mg. en Farmacia Clínica. Laboratorio Multifuncional.Fac. Farmacia-Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

<sup>3</sup>Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

the leaves of *Sambucus peruviana* HBK is proportional to both the concentration and its exposure time versus DPPH\*.

**Keywords:** *Sambucus peruviana*, fluid extract, total flavonoids, Quantification of total flavonoids, antioxidant capacity *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

Entre las innumerables plantas con propiedades medicinales se encuentra *Sambucus peruviana* (sauco), una especie arbórea que se cultiva en las partes altas de los Andes (Perú, Bolivia y Norte de Argentina) (1,2). El sauco es un árbol de unos 12 metros de alto, que crece entre los 40 – 3900 m.s.n.m. en suelos profundos, de textura variable; tolera pedregosidad baja a media y requiere buen nivel de humedad. (2)

El cocimiento de las flores se emplea como sudorífico, antirreumático, antiséptico y depurativo así como también en las inflamaciones de la vejiga y la próstata. El cocimiento de las hojas se emplea como galactógeno y antiséptico bucal, y el de los frutos como colutorios y en afecciones de la cavidad oral. (2, 3,4)

Los antioxidantes en general son compuestos que pueden inhibir o retardar el proceso oxidativo, interfiriendo con la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de la auto-oxidación. Estos fenómenos contribuyen la aparición y progreso de enfermedades crónico-degenerativas en el ser humano. Existen diferentes moléculas naturales que se pueden comportar como antioxidantes entre ellos tenemos a las vitaminas, carotenoides, compuestos nitrogenados (alcaloides, aminos, betalaínas) e incluso ciertos terpenoides; quizá los metabolitos más reconocidos por su actividad antioxidante son los de naturaleza fenólica: ácidos fenólicos, quinonas, cumarinas, lignanos, estilbenos, taninos y flavonoides, siendo estos últimos de mayor interés para la medicina. (5,6,7,8)

Los flavonoides pertenecen a un grupo de compuestos naturales arreglados bajo un sistema C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. Se conoce como 10 clases de flavonoides (Chalconas, flavonas,

flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc) los cuales pueden encontrarse como aglicona o bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa. (7, 8,9)

En su relación con el hombre, los flavonoides actúan como antioxidantes naturales, es decir, tienen la capacidad de secuestrar y neutralizar los radicales libres, especies químicas muy reactivas que fácilmente conducen a reacciones incontroladas, resultando en diversas formas de daños oxidativos sobre las moléculas, organelas y diversas células y tejidos; causando su degeneración, envejecimiento, pérdida de su función y otras formas importantes de daño celular. Por lo tanto los flavonoides juegan un papel importante en la prevención de varios procesos fisiopatológicos asociados con el estrés oxidativo y presencia de radicales libres, tales como el cáncer y diversas enfermedades neurodegenerativas (alzhéimer), cardiovasculares (hipertensión arterial) y metabólicas (diabetes mellitus II). (7,10,11)

Por todo lo expuesto anteriormente, el presente trabajo no solo pretendió demostrar la actividad antioxidante *in vitro* de los flavonoides totales obtenidos de la hoja de *Sambucus peruviana* H.B.K, sino también canalizar la posibilidad de su utilización en la prevención de enfermedades producidas por estrés oxidativo, contribuyendo de esta manera a fomentar estudios científicos que demuestran su actividad antioxidante *in vivo* y pudiendo lograr en un futuro su instauración como terapia alternativa y coadyuvante de la medicina tradicional.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Material de Estudio**

Hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K (sauco) proveniente del distrito de Huamachuco de la provincia de Sánchez Carrión. Departamento de la Libertad.

**Material, Equipos y Reactivos**

- **Materiales de Laboratorio**  
De uso común en el laboratorio de Farmacognosia
- **Equipos:** De uso común en el laboratorio de Farmacognosia
- **Reactivos y solventes:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH\*) Lab. Sigma, Ácido sulfúrico 98% de pureza. Calidad Merck, Alcohol etílico de 96° GL.

**Metodología**

- **Recolección:** Se recolectó hojas maduras de *Sambucus peruviana* H.B.K (sauco) de la ciudad de Huamachuco. Provincia de Sánchez Carrión. Departamento de la Libertad (7.8° sur latitud, 78.07° Oeste longitud y 3072 m.s.n.m.).
- **Selección:** Se seleccionó la materia vegetal con el objetivo de realizar una separación de las partes deterioradas y evitar la mezcla con otra especie.
- **Identificación taxonómica:** La planta medicinal seleccionada, fue llevada al Herbario Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación Taxonómica. Código N° 52790 (HUT).
- **Clasificación Taxonómica:** La especie *Sambucus peruviana*, es nativa de nuestro país, de acuerdo al sistema de clasificación filogenética de Adolph Engler publicada en la XII Edición del Syllabus DER PFLANZENFAMILIEN del año 1954 – 1964.
- **Desecación:** Las hojas seleccionadas se colocaron sobre papel kraft en un lugar fresco y seco durante 24 horas. Luego fueron pasadas a bolsas hechas de papel kraft y se llevó a estufa a una temperatura de 40 °C, durante 48 horas.
- **Molienda y Tamización:** Una vez desecado el material vegetal, se procedió a su molienda en mortero de acero hasta tamaño de partícula adecuado. El material así pulverizado, se tamizó (tamaño partícula 2 mm), y se almacenó adecuadamente en frascos ámbar en un lugar sin humedad y luz directa, hasta su posterior utilización.
- **Preparación del extracto fluido de sauco**<sup>12</sup>: Pesar 250 g de droga y proceder a humectar, separar porciones equivalentes a 125 g, 75 g y 50 g de droga. Colocar la porción de 125 g previamente humectada en el percolador, macerar con alcohol de 70°GL por 48 horas. Se prosigue a percolar y recoger 50 mL de extracto fluido, los cuales se separan y guardan en un frasco ámbar. Se sigue recibiendo 5 porciones sucesivas de percolado de 75 mL cada una enumerándola según el orden que se recibe. Colocar la porción equivalente a 75 g de extracto fluido en un percolador y macerar con las porciones de 75 mL del lote anterior por 48 horas. Se percola hasta obtener 75 mL y se guarda en el frasco ámbar. Se prosigue percolando 5 porciones de 50 mL de extracto fluido, cada uno enumerado. Se coloca la tercera porción equivalente a 50 g y se macera por 48 horas con las porciones de extracto del lote anterior. Proceder a percolar hasta obtener 125 mL de extracto, los cuales se pasan al frasco ámbar. La cantidad final de extracto fluido debe ser de 250 mL.
- **Tamizaje Fitoquímico del extracto fluido:** “Prueba de la Gota”(12,13): Evaporar el solvente del extracto fluido, y el residuo redissolver en los solventes necesarios (diclorometano, etanol, agua, agua ácida) para la realización de los ensayos.
- **Extracto diclorometánico:** Identifica compuestos de muy baja polaridad como: Esteroles, Quinonas.
- **Extracto etanólico:** Identifica compuestos de polaridad muy variada, como: Esteroides, Alcaloides, Flavonoides y Taninos.
- **Extracto acuoso - ácido:** Identifica compuestos básicos, como: Alcaloides.
- **Extracto acuoso:** Identifica compuestos de alta polaridad, como: Flavonoides, Leucoantocianidinas, Saponinas, Taninos.

**Cuantificación de flavonoides totales del extracto fluido de Sambucus peruviana H.B.K. mediante espectrofotometría UV-visible (14,15)**

- **Preparación de la Solución Patrón:** Pesar 80 mg de quercetina patrón y disolver con c.s.p. 100 mL de etanol a 96 ° GL; para obtener una concentración de 800 p.p.m.

$$80 \text{ mg quercetina } x = \frac{1000 \text{ ml}}{800 \text{ mg}} 100 \text{ mL}$$

- **Preparación de la Solución Blanco:** Utilizar etanol a 96 °GL como solución blanco, tomar una alícuota de 3 mL aproximadamente para la calibración del espectrofotómetro THERMO modelo GENESYS 10 UV.
- **Preparación de la muestra:**  
**Hidrólisis de Flavonoides:** Medir 20 mL del extracto fluido a un balón y llevar a reflujo con 20 mL de ácido sulfúrico al 10 % durante dos horas.  
**Preparación de la solución problema:** Pesar los cristales purificados equivalentes a 0.2g de droga y aforar a 100 mL con etanol al 96°GL; de éste aforo tomar dos alícuotas de 3 mL aproximadamente, y de cada alícuota obtener 3 lecturas en el espectrofotómetro THERMO modelo GENESYS 10 UV.

**Determinación de la capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de Sambucus peruviana H.B.K. (16,17)**

- **Fundamento del método:** El fundamento del método descrito por Brand Williams et al, consiste en que el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH\*) tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia capturadora de radicales libres; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres.

- **Determinación de los porcentajes de captura del radical DPPH\***

En un set de 10 fioas (problema), adicionar en cada uno de ellos 10mL de la solución de DPPH 0,1 mM. Tomar alícuotas de 1 mL de cada concentración de solución etanólica de flavonoides totales y enfrentar a la solución de DPPH\* 0,1 Mm. Realizar tres lecturas de cada sistema a una absorbancia de 519nm, al minuto luego 15, 30 y 45.

Preparar un control (que consiste en 10mL de solución de DPPH\* 0,1 mM) y leer la absorbancia a 519 nm en el espectrofotómetro. Como blanco se utiliza etanol de 96°GL.

Posteriormente, utilizar los valores de absorbancia de los tubos problema y la absorbancia del tubo control, para calcular el porcentaje de radicales DPPH\* que serán capturados. Calcular el porcentaje de radicales DPPH\* capturados, con la siguiente fórmula:

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

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS (18)**

Los datos fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007. Caracterizados mediante parámetros estadísticos descriptivos<sup>26,27</sup>.

**RESULTADOS**

**Tabla 1:** Tamizaje fitoquímico del extracto fluido de *Sambucus peruviana* H.B.K

ENSAYOS	METABOLITOS	RESULTADO
Dragendorf	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	-
Wagner	Alcaloides	-
Hager	Alcaloides	-
Ninhidrina	Aminoácidos	+
Baljet	Lactonas	+
Bornträger	Quinonas	-
Liebermann-Burchard	Triterpenos/esteroles	+
Rosenhein	Antocianidinas	+
Shinoda	Flavonoides	+
Kedde	Glicósidos cardiotónico	-
Espuma	Saponinas	+
Cloruro férrico	Polifenoles	+
Gelatina	Taninos	-

**Leyenda:** + : Positivo, - : Negativo

**Tabla 2:** Cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina de las hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K. mediante espectrofotometría UV- visible.

Gramos de droga	Contenido de flavonoides totales
100 g	0.48 g expresados como quercetina

**Tabla 3:** Porcentajes de captura del radical DPPH\* de la solución etanólica de flavonoides totales de las hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K

Muestra	Volumen de solución de DPPH 0,1 mM (mL)	Volumen de Solución etanólica de flavonoides totales (mL)	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales (ug/mL)	% de captura Minuto 1	% de captura Minuto 15	% de captura Minuto 30	% de captura Minuto 45
1	10	1	3.096	6.63	8.84	8.97	12.28
2	10	1	6.192	12.37	17.97	19.02	20.22
3	10	1	9.288	15.72	21.38	24.63	28.11
4	10	1	12.384	20.87	28.38	30.81	32.36
5	10	1	15.480	26.73	34.40	36.91	39.23
6	10	1	18.576	31.90	35.75	40.96	44.21
7	10	1	21.672	35.94	43.91	48.14	52.04
8	10	1	24.768	39.61	46.50	50.28	52.64
9	10	1	27.864	42.86	48.37	53.76	56.68
10	10	1	30.960	48.29	55.82	58.03	59.37

**Tabla 4:** Concentración del radical DPPH\* capturado por la solución etanólica de flavonoides totales de las hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K

Muestra	Volumen de solución de DPPH 0,1 mM (mL)	Volumen de Solución etanólica de flavonoides totales (mL)	Concentración de la solución etanólica de flavonoides totales (ug/mL)	Concentración DPPH* capturado (ug/mL) Minuto 1	Concentración DPPH* capturado (ug/mL) Minuto 15	Concentración DPPH* capturado (ug/mL) Minuto 30	Concentración DPPH* capturado (ug/mL) Minuto 45
1	10	1	3.096	2.51	3.35	3.40	4.65
2	10	1	6.192	4.69	6.81	7.21	7.66
3	10	1	9.288	5.96	8.10	9.33	10.65
4	10	1	12.384	7.91	10.75	11.67	12.26
5	10	1	15.480	10.13	13.04	13.99	14.87
6	10	1	18.576	12.09	13.55	15.52	16.75
7	10	1	21.672	13.62	16.64	18.24	19.72
8	10	1	24.768	15.01	17.62	19.05	19.94
9	10	1	27.864	16.24	18.33	20.37	21.48
10	10	1	30.960	18.30	21.15	21.99	22.50

## DISCUSIÓN

Antes de empezar la valoración de un principio activo, es necesario realizar un "Screening" fitoquímico, llamado también marcha fitoquímica o tamizaje fitoquímico, 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.

El tamizaje fitoquímico realizado al extracto fluido (Tabla 1) evidenció la presencia de flavonoides, mediante la reacción de shinoda, dato que sirvió como base para continuar con la valoración de los flavonoides totales presentes en el extracto. En la Tabla 2 se observa que 100 g de droga contienen 0.48 g de flavonoides totales, lo cual constituye un rendimiento del 0.48 %, este dato es de gran utilidad para la futura realización de preparados galénicos que incluyan extractos de *Sambucus peruviana* H.B.K.

Inicialmente es necesario investigar in vitro las propiedades antioxidantes de cualquier fármaco o sustancia natural antes de considerarlo un antioxidante. Si bien es cierto existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea in vitro o in vivo, el método del DPPH *in vitro* permite tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas in vivo. Este método presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones por presentar un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que otros tienen que ser generados tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica (19,20). En la tabla 3 se observa que a mayor concentración de los flavonoides totales enfrentados con la solución de DPPH\*, mayor son los porcentajes de captura de radicales de DPPH\*, así como que a mayor tiempo transcurrido, este porcentaje aumenta. Encontrándose el valor máximo a los 45 minutos para la solución de mayor concentración de flavonoides totales (30.960 ug/mL), el cual fue de 59.37% que equivale a una concentración de 22.50 µg/mL de DPPH\* capturado (Tabla 4). Lo mencionado anteriormente corrobora otros trabajos realizados sobre capacidad antioxidante con

otras especies, Bartolo et al. (2010) demostraron que la capacidad antioxidante del decocto de *Zea mays* L. variedad morado procedente de Cajamarca aumenta a medida que aumenta la concentración del extracto, obteniendo un valor máximo de porcentaje de inhibición de DPPH de 87.02 %, correspondiente a un tiempo de 60 minutos. Por otra parte Diazet al. realizaron un estudio detallado sobre la capacidad antioxidante de las isoflavonas totales obtenidas de las semillas de *Glycine max* L. procedentes de Jaén, expresando los resultados en eficiencia antiradicalaria la cual fue igual a 0.00250 mL x ug<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. (21,22)

En el estudio se demostró mediante el análisis fitoquímico preliminar del extracto fluido de las hojas de *Sambucus peruviana* H.B.K. proveniente de la ciudad de Huamachucola presencia de metabolitos activos tales como, aminoácidos, lactonas, triterpenos y esteroides, antocianidinas, flavonoides, saponinas. Se encontró un concentración de 0.48% de flavonoides totales expresados como quercetina y se demostró que el porcentaje de captación de DPPH\* por los flavonoides totales de *Sambucus peruviana* H.B.K. es mayor a medida que se aumenta la concentración de este último y según aumenta el tiempo de exposición.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li E. El Futuro de los Productos Andinos en la Región Alta y los Valles Centrales de los Andes/Plantas Medicinales [Online] Ministerio de Producción. [Citado el 25 de junio del 2011]. Disponible en: [http://www.unido.org/fileadmin/import/69934\\_PERU\\_Informe\\_final\\_plantas\\_medicinales\\_2vf.pdf](http://www.unido.org/fileadmin/import/69934_PERU_Informe_final_plantas_medicinales_2vf.pdf)
2. Mostacero J. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. 1ª ed. Trujillo: Ed. Concytec. 2002. vol. I pp. 852 – 854.
3. Ponessa G. Caracterización anatómico foliar y aspectos etnobotánicos de *Sambucus nigra* L. subsp peruviana. [online]. Instituto de morfología vegetal Miguel Lillo. Acta farmacéutica bonaerense. 2001. vol.20 n°3 [Citado el 20 de junio del 2011]. Disponible en:

- [http://www.latamjpharm.org/trabajos/20/3/LAJOP\\_20\\_3\\_1\\_2\\_JG4ZJPRNN5.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/20/3/LAJOP_20_3_1_2_JG4ZJPRNN5.pdf)
4. Ortiz H. Industrialización de la hoja de *Sambucus peruviana* H.B.K. (sauco) preparación de formas medicamentosas: bolsitas filtrantes y cápsulas. [online]. Sciendo. 2006. vol.9 n°1. [Citado el 25 de junio del 2011]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/46895725/Re-Vista-Sci-en-Do>.
  5. Kim K. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*, J.Ethnopharmacol.: 85 (1), 69-72 (2003).
  6. Martínez A. Flavonoides. Colombia. 2005. [Fecha de acceso 29 enero 2012]. Disponible en: [http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoide\\_s2001.pdf](http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoide_s2001.pdf)
  7. Rodríguez J., Menéndez Y., Trujillo M. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev. Cubana Med. Milit.: 30 (1), 15-20 (2001).
  8. Kuklinski C. Farmacognosia. Barcelona:Ed. Omega, S.A. 2000. pp. 120-130
  9. De Pascuale A. Phramcognosy. Theoldestmodernscience. Journal of ethnopharmacology; vol 11: 1-16.
  10. Martínez A. Flavonoides. Curso de farmacognosia y fitoquímica, Setiembre 2006. págs. 7 – 49.
  11. García M. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. [online]. Universidad Autónoma de Querétaro. [Citado el 25 de junio del 2011]. Disponible en: [http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56\\_1UAQGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf)
  12. Miranda M. Manual de prácticas de laboratorio.1 ed. La Habana: Ed. Editorial Félix Varela.2002. pp. 70-110.
  13. Lock O. Investigación Fitoquímica.1 ed. Lima: Ed. Fondo Editorial. 1994. pp. 1-9, 114-121
  14. Chávez M., Eustaquio C. Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L.noni y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. Tesis para obtener el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica, Trujillo-Perú, Universidad Nacional de Trujillo. 2010. 13-14 pp.
  15. Rivero A, Betancort J. Evaluación de la Actividad Antioxidante de Polifenoles de Algas Marinas. [Práctica de Laboratorio (Práctica VI.3)]. España: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; 2006. pág. 3. [Citada 2009 Octubre 13]. Disponible en: [http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-VI-3.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-3.pdf)
  16. Murillo E. Actividad Antioxidante de Bebidas de Frutas y de Té Comercializadas en Costa Rica. Panamá: Universidad de Panamá. Instituto de Alimentación y Nutrición (IANUT), 2002. pág. 8, 9. [Citada 2009 Octubre 14]. Disponible en: [http://www.florida.co.cr/productos\\_es/estudio\\_antioxidantes.pdf](http://www.florida.co.cr/productos_es/estudio_antioxidantes.pdf)
  17. Domenech J. Bioestadística. Métodos Estadísticos Para Investigadores. 1° ed. España: Ed. Herder S.A.; 1980. pp. 315-320, 617.
  18. Glantz S. Bioestadística. 6° ed. Ed. Mc. Graw-Hill/Interamericana Editores, S.A de C.V.; 2005. pp. 73-81.
  19. Rojas M., Rumay A. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcoholico de las hojas de *Piper aduncum* procendente de la provincia de San Marcos. Departamento de Cajamarca. Tesis para obtener el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica, Trujillo-Perú, Universidad Nacional de Trujillo. 2009. 10-14 pp.
  20. Bartolo R., Chávez C. Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* del decocto de la coronta de *Zea mays* L. (variedad morado) del Distrito de Cajabamba, departamento de Cajamarca. Tesis para obtener el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica, Trujillo-Perú, Universidad Nacional de Trujillo. 2010. 12-16 pp.
  21. Diaz H., Rodriguez I. Capacidad Antioxidante *in vitro* de las Isoflavonas Totales Obtenidas de Semillas de *Glycine max* L. (Soya) Provenientes de la Provincia de Jaén-Cajamarca. Tesis para obtener el grado de bachiller en Farmacia

- y Bioquímica, Trujillo-Perú, Universidad Nacional de Trujillo. 2010. 07-15 pp.
22. Bartolo R., Chávez C. Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* del decocto de la coronta de *Zea mays* L. (variedad morado) del Distrito de Cajabamba, departamento de Cajamarca. Tesis para obtener el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica, Trujillo-Perú, Universidad Nacional de Trujillo. 2009. Pp.28