

PARÁMETROS FARMACOGNÓSTICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Piper aduncum* subsp *ossanum* Trel SEGÚN EL LUGAR DE COLECTA

Yamilet I. Gutiérrez*¹, Ramón Scull ¹, Liván Delgado ², Arturo Sánchez¹, Camilla A. Jiménez³

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Ave 23 e/ 214 y 222 # 21425. La Coronela, La Lisa, La Habana, Cuba.

² Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR), La Habana, Cuba.

³ Laboratorios MEDSOL, La Habana, Cuba.

*email: yamiletgg@ifal.uh.cu

Resumen

Piper aduncum subsp *ossanum* Trel es endémica de Cuba, ha sido utilizada tradicionalmente como hemostática, diurética, antiséptica y antirreumática, pero carece de estudios que permitan establecer su calidad, por tal motivo se presenta el estudio farmacognóstico de la planta y la actividad antioxidante en función de dos sitios de colecta. Las plantas fueron colectadas en el municipio de Bauta y en Ceiba del Agua, provincia de Artemisa. Se realizó la evaluación macroscópica y microscópica de la especie, se determinaron algunos parámetros físico-químicos a la droga cruda y tamizaje fitoquímico. Se elaboraron dos extractos hidroalcohólicos por maceración, se midieron sus parámetros de calidad y se cuantificó el contenido de fenoles totales. Finalmente fue evaluada la actividad antioxidante por el ensayo de FRAP y DPPH. La micromorfología permitió apreciar una disposición similar de los tejidos en las hojas de ambas localidades. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre el largo y ancho de las hojas, humedad residual y contenido de cenizas. La composición química determinada por tamizaje fitoquímico fue similar para ambas colectas. Los extractos obtenidos mostraron diferencias en cuanto a los sólidos totales y fenoles totales, evidenciándose los mayores porcentajes para la muestra de Bauta. La densidad óptica de las muestras evaluadas por la técnica FRAP mostró valores diferentes entre si y superiores a la sustancia de referencia (Vitamina C). La actividad secuestradora del radical DPPH para los extractos fue diferente, siendo mayor para la muestra de Bauta. El estudio farmacognóstico permitió establecer algunas especificaciones de calidad de la especie *P. aduncum* subsp *ossanum* en función de dos ecosistemas y fue demostrada la actividad antioxidante bajo las condiciones ensayadas.

Palabras clave: *Piper aduncum* subsp *ossanum* Trel, parámetros farmacognósticos, antioxidante

PHARMACOGNOSTIC PARAMETERS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Piper aduncum* subsp *ossanum* Trel ACCORDING TO THE COLLECTION PLACE

Abstract

Piper aduncum subsp *ossanum* Trel is endemic of Cuba, it has been used traditionally as hemostatic, diuretic, antiseptic and antirheumatic, but it lacks studies that allow to establish its quality, for such a reason it is presented the pharmacognostic study of the plant and the antioxidant activity in function of two collection sites place. The plants were collected in the municipality of Bauta and in Ceiba of the Water, both of the county of Artemisa. Was carried out the macroscopic and microscopic evaluation of the species, some physical-chemical parameters were determined to the crude drug and phytochemical screening. Two hydroethanolic extracts were elaborated by maceration and their parameters of quality were measured and the content of phenolic compounds was quantified. Finally the antioxidant activity was evaluated through FRAP assay (Ferric Reducing Antioxidant Power) and DPPH Radical Scavenging Method. The micromorphology allowed to appreciate a similar disposition of the tissues in the leaves of both towns. Differences were evidenced statistically significant among the long and wide of the leaves, residual humidity and ashes. The chemical composition determined by phytochemical screening it was similar for both collections. The obtained extracts showed differences as for the total solids and phenolic compounds content, being evidenced the biggest percentages for the sample of Bauta. The optical density of the samples evaluated by the technical FRAP showed different values among if and superiors to the reference substance (Vitamin C). DPPH radical scavenging activity for the extracts was also different, being bigger for the sample of Bauta. The pharmacognostic study allowed to establish some specifications of quality of the species *P. aduncum* subsp *ossanum* in function of two ecosystems and antioxidant activity was demonstrated under the rehearsed conditions.

Keywords: *Piper aduncum* subsp *ossanum* Trel, pharmacognostic parameters, antioxidant

Introducción

P. aduncum subsp *ossanum* Trel (Piperaceae) es endémica de la región occidental de Cuba (Abreu *et al.*, 2012), ha sido utilizada tradicionalmente por su amplia gama de propiedades medicinales, destacándose como hemostática, diurética, antiséptica y antirreumática (Roig, 1988).

Los estudios fitoquímicos y biológicos están centrados, fundamentalmente, en el aceite esencial, el cual es rico en piperitona, alcanfor y germacreno D como componentes mayoritarios (Pino *et al.*, 2002). Otras investigaciones también relacionadas con el aceite esencial han demostrado su

actividad acaricida (Pino *et al.*, 2011), antifúngica (Duarte *et al.*, 2013) y el uso como plaguicida (Infante *et al.*, 2013). Por su parte, Martínez *et al.* (2004) demostraron el efecto antiulceroso y actividad antiinflamatoria del flavonoide 2"-0- ramnosil 4"-0- metilvitexina, aislado de las hojas de esta planta.

En la literatura científica existen escasos reportes de investigaciones farmacognósticas, fitoquímicas y biológicas para la subespecie *ossanum*, que es endémica de Cuba, por tanto, cualquier investigación en este sentido amplía el conocimiento de la especie objeto de estudio, la cual pudiera constituir un recurso potencial en el campo de los productos fitoterapéuticos. Por tal motivo se presenta el estudio farmacognóstico de la planta y la actividad antioxidante en función de dos sitios de colecta.

Materiales y métodos

Recolección y procesamiento del material vegetal

Para el desarrollo del estudio se utilizó como material vegetal la especie *Piper aduncum* subsp *ossanum* Trel, recolectada en el mes de Septiembre de 2012, en el municipio Bauta y localidad Ceiba del Agua, provincia Artemisa. Las plantas se encontraron en estado fenológico vegetativo. De las colectas realizadas solo se emplearon las hojas.

Caracterización botánica de la especie

La descripción macromorfológica se realizó a simple vista y con ayuda de una lupa, según metodología descrita por Miranda y Cuéllar (2000). Se evaluaron 100 hojas, a las cuales se les determinó la forma del limbo, borde, ápice, base, peciolo, venación y color. También se efectuaron mediciones de largo y ancho de las hojas con ayuda de un pie de rey. Se calcularon los valores promedios y la desviación estándar.

Para el análisis micromorfológico se realizaron cortes transversales de las hojas en estado fresco, por el método manual, los que fueron hidratados y aclarados con hipoclorito de sodio. Los mismos se colorearon con safranina al 1 %, se fijaron con gelatina glicerizada, según los procedimientos descritos por Arnol (1973) y Gattuso M. y Gattuso S. (1999). Sobre los cortes se realizó la determinación de aceite esencial empleando una solución de sudam III al 5 % en etanol al 70 % (Gattuso y Gattuso S. 1999; Miranda y Cuéllar, 2000).

Parámetros físico-químicos de calidad determinados al material vegetal

Se determinaron los parámetros de calidad a la droga cruda según procedimientos reportados por la NRSP 309 (1992) y Miranda y Cuéllar (2000): humedad residual (método azeotrópico), contenido de sustancias solubles o extraíbles (agua y mezclas hidroalcohólicas al 50 y 90 %), cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 % y tamizaje fitoquímico.

Obtención de los extractos y parámetros físico-químicos de calidad

A partir del material vegetal se elaboraron extractos hidroalcohólicos al 20 %, por el método de maceración, durante un periodo de siete días, a una temperatura de $30^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, utilizando como disolvente una mezcla hidroalcohólica al 50 %.

Los extractos obtenidos fueron analizados mediante la evaluación de sus propiedades organolépticas (olor y color), pH, índice de refracción, densidad relativa y sólidos totales. El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999; Memnune *et al.*, 2009; Chlopicka *et al.*, 2012).

Actividad antioxidante

- Técnica del potencial de reducción total FRAP

Se determinó la capacidad de la muestra para reducir el hierro férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}), según la metodología descrita por Benzie y Strain (1996). Un volumen de 10 μL de las soluciones etanólicas de *P. aduncum* subsp *ossanum* en varias concentraciones, se mezcló con 50 μL de agua destilada y 900 μL del reactivo FRAP. Las mezclas se dejaron en reposo y en ausencia de luz durante 30 minutos y transcurrido ese tiempo fue leída la absorbancia a 593 nm. Las actividades de los extractos se expresaron en valores de densidad óptica. Se utilizó Vitamina C como sustancia de referencia.

- Ensayo de DPPH

La actividad antioxidante de los extractos también se evaluó mediante la capacidad captadora del radical DPPH, utilizando la metodología de Brand-Williams *et al.* (1995). Un volumen de 990 μL de una solución metanólica de DPPH se mezcló con 10 μL de las soluciones etanólicas de *P. aduncum* subsp *ossanum* en varias concentraciones. Las mezclas se dejaron en reposo y en ausencia de luz durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición de la coloración del DPPH por la fórmula siguiente:

$$\% \text{ DPPH} = 100 - [(D.O_m - D.O_b) \times 100 / D.O_{\text{DPPH}}]$$

Donde:

D.O_m: densidad óptica de la muestra (nm)

D.O_b: densidad óptica del blanco (nm)

D.O_{DPPH}: densidad óptica de la solución de DPPH (nm)

% DPPH: porcentaje de decoloración del DPPH (%)

Se calculó la concentración de la muestra que inhibe el 50 % de la decoloración del DPPH mediante la construcción de una curva patrón, utilizando Vitamina C.

Estadística

Los resultados fueron procesados por el programa Statgraphics®Plus, versión 5.0, llevándose a cabo un análisis de varianza de clasificación simple a través de ANOVA-1, para un nivel de confianza del 95 %. Para la comparación de las medias se utilizó el test de Rangos Múltiples de Duncan.

Resultados

Al realizar una diagnosis taxonómica de la planta se pudo constatar que es un arbusto perenne con hábito de crecimiento erecto (Dionel *et al.*, 2000), es ramificado, nudoso, y las hojas tienen una disposición alterna sobre el tallo. En la figura 1 se representan algunos detalles morfológicos de la especie y en la tabla 1 se detallan las características macromorfológicas de la lámina foliar de los dos sitios de colecta y las referidas por la literatura.

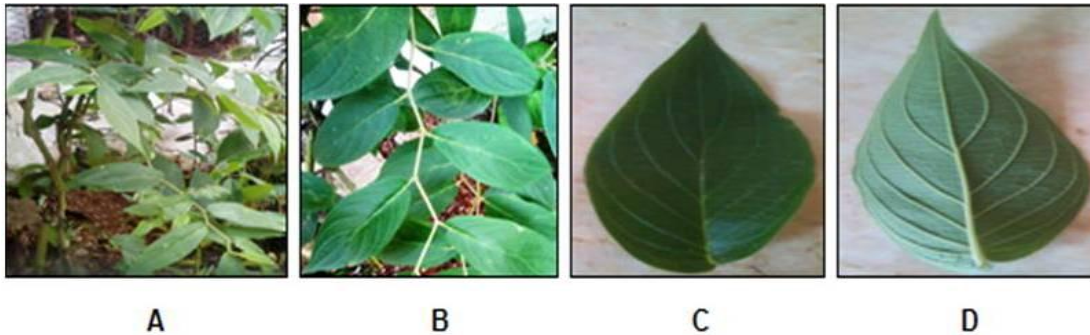


Fig. 1. Detalles macromorfológicos de *P. aduncum* subsp. *ossanum*
A: arbusto, B: disposición alterna de las hojas sobre el tallo, C: haz, D: envés

Tabla 1. Características macromorfológicas de las hojas de *P. aduncum* subsp. *ossanum* procedentes de Bauta, Ceiba del agua y las referidas en la literatura.

Parámetros	Resultados		
	Bauta	Ceiba del agua	(Roig, 1988; Saralegui, 2004)
Forma	Elíptico-lanceolada, peciolo corto, borde entero, base cordada, ápice acuminado, nervadura pinnada		Elíptico-lanceolada o aovado-elíptica, peciolo corto, borde entero, base cordada, ápice acuminado, nervadura pinnada
Textura	Escamosa o escariosa		Escariosa
Superficie	Vellosa o pubescente		Vellosa o pubescente
Color	Verde oscuro por el haz y más claro por el envés		Verde por el haz, verde claro por el envés
Olor	Aromático (pimienta)		Aromático (pimienta, mentolado)
Largo (cm) \bar{x} / s	17,67/2,04 ^a	18,73/1,89 ^b	12 - 21
Ancho (cm) \bar{x} / s	6,22/0,78 ^c	7,54/0,11 ^d	3 – 8

Leyenda: \bar{X} / S : valor promedio/ desviación estándar

Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95 % de confianza.

El análisis micromorfológico de las hojas se muestra en la figura 2. Las muestras de los dos lugares de colecta mostraron características muy similares. En la epidermis abaxial se observó gran cantidad de estomas del tipo anomocítico (donde las células epidérmicas que rodean el par de células oclusivas no difieren morfológicamente del resto de las células epidérmicas) y bolsas de aceites esenciales, las cuales se observaron de color rojo frente al reactivo de sudam (figura 2A y 2B). Imágenes más ampliadas del mismo tejido permitió visualizar un pelo pluricelular conformado por tres segmentos de células (figura 2C) y un pelo del tipo glandular (figura 2D) cuyo extremo es redondeado, así como una nervadura prominente del tipo elicoidal (figura 2E). Las epidermis adaxial y abaxial (figura 2F y 2G) estuvieron conformadas por células de forma y tamaño variable, en la última se constataron bolsas de aceite esencial.

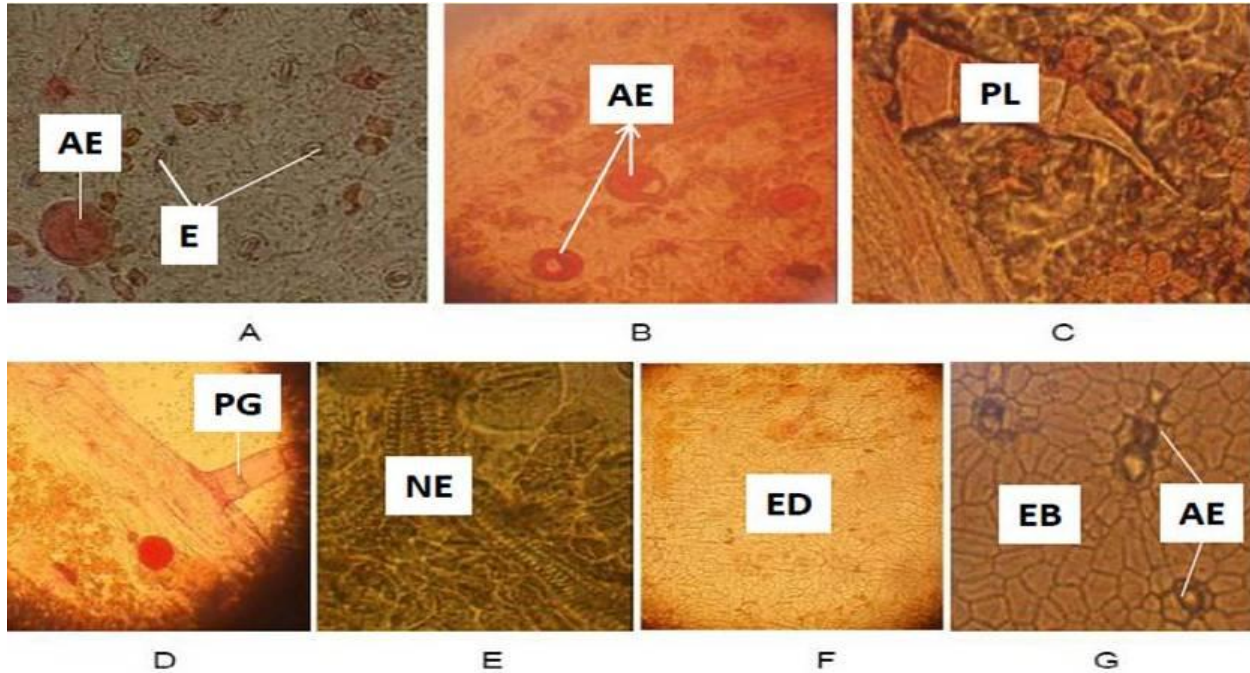


Fig. 2. Detalles micromorfológicos a nivel de la epidermis de la hoja de *P. aduncum* subsp. *ossanum*

A y B: epidermis abaxial (AE: bolsa de aceite esencial, E: estomas) **C:** PL: pelo pluricelular, **D:** PG: pelo glandular de la epidermis abaxial, **E:** NE: nervadura elicoidal, **F:** ED: epidermis adaxial, **G:** EB: epidermis abaxial, AE: bolsas de aceite esencial.

Dentro del estudio farmacognóstico de una droga se encuentra la determinación de un conjunto de parámetros físico-químicos, los cuales son indispensables para garantizar su calidad y pureza, lo que se traduce en el valor intrínseco de la misma. En la tabla 2 se muestran algunos de los parámetros que le fueron evaluados al material vegetal.

Tabla 2. Parámetros físico-químicos de la droga cruda de *P. aduncum* subsp. *ossanum*

Parámetros (%)	Resultados	
	\bar{x} / s	
	Bauta	Ceiba del Agua
Humedad residual	12,32/ 0,10 ^a	13,65/0,09 ^b
Sustancias solubles en agua	19,31/0,02 ^c	16,87 /0,34 ^d
Sustancias solubles en etanol 50%	20,12/0,09 ^e	18,24/ 0,19 ^f
Sustancias solubles en etanol 90%	13,65/0,04 ^g	11,15/ 0,09 ^h
Cenizas totales	10,11 / 0,19 ⁱ	9,47/0,34 ^j
Cenizas solubles en agua	2,78 / 0,38 ^k	1,26/0,12 ^l
Cenizas insolubles en HCL al 10%	1,72/0,01 ^m	0,56/0,02 ⁿ

Leyenda: \bar{x} / s : valor medio de las determinaciones/desviación estándar

Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95 % de confianza.

Uno de los aspectos considerados de interés en el estudio de una droga es conocer de forma preliminar su composición química general por métodos de tamizaje fitoquímico. En la tabla 3 se muestran los resultados del estudio.

Tabla 3. Resultados de los ensayos de tamizaje fitoquímico de *P. aduncum* subsp. *ossanum*

Ensayos	Metabolitos	Resultados	
		Bauta	Ceiba del Agua
Sudam	Compuestos grasos	+	+
Espuma	Saponinas	-	-
Resina	Resinas	-	-
Ninhidrina	Aminoácidos	+	+
Fehling	Sustancias reductoras	++	++
Cloruro férrico	Fenoles y/o taninos	++	+
Lieberman-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	++	+
Boritrager	Quinonas	+	+
Dragendorff	Alcaloides	-	-
Mayer	Alcaloides	-	-
Wagner	Alcaloides	-	-
Baljet	Lactonas y coumarinas	++	+
Antocianidinas	Antocianidinas	-	-
Shinoda	Flavonoides	++	++

Leyenda: + ensayo positivo; ++ ensayo muy positivo; - ensayo negativo

Con el propósito de determinar la calidad de los extractos hidroalcohólicos de los dos sitios de colectas evaluados, se procedió al análisis de los parámetros físico-químicos. Fueron considerados los aspectos siguientes: propiedades organolépticas (olor y color), análisis del pH, sólidos totales, índice de refracción, densidad relativa y fenoles totales. En la tabla 4 se presentan los resultados del estudio.

Tabla 4. Parámetros físico-químicos de los extractos de *P. aduncum* subsp. *ossanum*

Parámetros	Resultados obtenidos (\bar{X}/S)	
	Bauta	Ceiba del Agua
Propiedades organolépticas	Líquidos translúcidos de color verde intenso y olor característico.	
pH	6,61/0,03 ^a	6,53/0,01 ^a
Sólidos totales (%)	2,07/0,05 ^b	1,28/0,04 ^c
Índice de refracción	1,366/0,00 ^d	1,362/0,00 ^d
Densidad relativa (g/mL)	0,854/0,00 ^e	0,855/0,00 ^e
Fenoles totales (mg/mL)	62,15/0,24 ^f	51,83/0,11 ^g

Leyenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza.

La actividad antioxidante de los extractos se llevó a cabo por las técnicas FRAP y DPPH. En la tabla 5 se reflejan los resultados del estudio.

Tabla 5. Actividad antioxidante por las técnica FRAP y DPPH

Muestras	Ensayo FRAP	Ensayo DPPH	
	Densidad óptica \bar{X}/S	Porcentaje de secuestro del radical DPPH (%) \bar{X}/S	Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$)
Vitamina C (sustancia de referencia)	0,149/0,001 ^a	67,13/0,34 ^e	20
Extracto de Bauta	0,239/ 0,16 ^b	60,72/0,60 ^d	25
Extracto de Ceiba del Agua	0,197/0,004 ^c	58,45/0,10 ^f	25

Leyenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza.

Discusión

Los resultados del estudio macromorfológico realizado a las hojas de los dos lugares de colectadas, en cuanto a las características y dimensiones, concuerdan en términos generales con la descripción reflejada en la literatura (Roig, 1988; Saralegui *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2012). No obstante, se pudo

constatar que existen diferencias estadísticamente significativas, entre las dimensiones de largo y ancho de las hojas para las muestras de Bauta y Ceiba del agua, lo que sugiere que el lugar de colecta tiene aparente influencia sobre el tamaño de las hojas cuando la planta se encuentra en estado adulto.

Los estudios encontrados sobre los caracteres micromorfológicos de especies pertenecientes al género *Piper* son escasos, solo los realizados por Pradhan *et al.* (2013) en la India a *P. betle* donde señalan la presencia de un sistema vascular en forma de paquetes bien definidos. En el caso particular de la subespecie *ossanum*, lo notorio fue el hecho de encontrar un sistema vascular en forma elicoidal, no descrito con anterioridad para la especie objeto de estudio.

Dentro de los parámetros físico-químicos de calidad de la droga cruda el contenido de humedad residual se enmarcó en el intervalo exigido, entre el 8 % y el 14 % (Lou-Zhi-cen, 1980; WHO, 1998; Miranda y Cuéllar, 2001).

En la determinación de sustancias solubles se utilizaron diferentes menstruos y los resultados revelaron mayor rendimiento para la mezcla hidroalcohólica al 50 %, siendo más elevadas en la muestra procedente de Bauta. El análisis estadístico de los resultados mostró que existen diferencias significativas entre los extractos evaluados de los dos sitios de colecta.

Para el contenido de cenizas totales la literatura (Lou-Zhi-cen, 1980; WHO, 1998) plantea un índice de hasta el 5 %, aunque los valores pueden variar significativamente en dependencia del material vegetal y el lugar de colecta. El valor obtenido fue elevado, aunque puede ser característico de esta planta en dependencia de las condiciones del suelo donde se desarrolle la misma. La cantidad de cenizas solubles en agua y las insolubles en ácido clorhídrico al 10 %, son también parámetros que ayudan a evaluar la pureza de la droga. En ambas determinaciones los valores fueron pequeños y están dentro de los límites establecidos (alrededor del 2 % para plantas medicinales). Se constataron algunas diferencias estadísticamente significativas en el contenido de cenizas de las dos muestras, que pudieran ser atribuibles a las características del suelo en el que se desarrolló la planta, donde la disponibilidad de nutrientes puede variar de un lugar a otro.

En el tamizaje fitoquímico efectuado a la especie no se apreciaron diferencias en la composición química en los lotes evaluados, pero si en las intensidades de color para algunos ensayos, manifestándose de forma muy evidente compuestos de naturaleza fenólica, sustancias reductoras, así como triterpenoides y esteroides. Otros compuestos como quinonas, aminas, compuestos grasos (incluyendo aceites esenciales) fueron encontrados, lo cual está en concordancia con los reportes en la literatura para algunas especies del género *Piper* (Aydin *et al.*, 2013; Rufino *et al.*, 2014; Soto, 2015).

Considerando los resultados obtenidos en la determinación de sustancias extraíbles, donde el disolvente con mayor poder extractivo fue la mezcla hidroalcohólica al 50 %, se procedió a la obtención de extractos a partir del material vegetal de los dos sitios de colecta (Bauta y Ceiba del Agua). El método de extracción utilizado fue la maceración (siete días), por ser uno de los más empleados para la elaboración de extractos y menos agresivo para el material vegetal.

El análisis de los parámetros físico-químicos de calidad de los extractos permitió detectar diferencias entre las dos muestras ensayadas, principalmente, en el contenido de sólidos totales y fenoles totales donde el mayor porcentaje fue para la colecta de Bauta, lo cual está en correspondencia con los resultados obtenidos en la determinación de sustancias extraíbles. Las diferencias pudieron estar condicionadas por la influencia de factores extrínsecos, especialmente, por las características del ecosistema donde creció el vegetal, que propician variaciones en el contenido de metabolitos.

En el estudio de la actividad antioxidante por la técnica FRAP, como se puede constatar en la tabla 5, los valores de densidad óptica de las muestras evaluadas difieren de la sustancia de referencia (Vitamina C, reconocido antioxidante). El valor encontrado para los extractos fue superior a dicho patrón, lo cual demuestra la elevada capacidad reductora de los mismos.

En el ensayo de DPPH los extractos exhibieron porcentajes de secuestro del radical DPPH inferiores al patrón. No obstante, los resultados fueron superiores al 50 %, siendo mayor para el extracto procedente de la colecta de Bauta. En los dos casos las concentraciones mínimas inhibitorias fueron pequeñas y cercanas a 20 µg/mL, concentración a la cual se cataloga un buen antioxidante.

En términos generales, el extracto de la colecta de Bauta fue el de mayor actividad antioxidante, lo cual está en correspondencia con el mayor contenido fenoles totales. Lo anterior sugiere, que dichos compuestos, están relacionados de manera muy directa con la actividad antes descrita, y en concordancia con reportes reflejados en la literatura donde describen que la actividad antioxidante determinada por FRAP y DPPH tiene una correlación directamente proporcional al contenido de compuestos fenólicos (Michalak, 2006; Thaipong *et al.*, 2006; Ljiljana *et al.*, 2009; Faustino *et al.*, 2010; Dejan *et al.*, 2011). Dentro de esta gran familia suelen encontrarse tres grupos principales: los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides (Ochoa y Ayala, 2004).

Los resultados del presente estudio permitieron establecer algunas especificaciones de calidad de la especie de *P. aduncum* subsp. *ossanum* en función de dos lugares de colecta. Asimismo fue demostrada una elevada actividad antioxidante bajo las condiciones ensayadas.

Referencias bibliográficas

- Abreu OAG, Rodríguez AAT, Morgado MM, Cao LBV. Farmacognosia, farmacobotánica, farmacogeografía y farmacotimología del platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*). Revista Cubana de Plantas Medicinales 2012;17(2):81-193.
- Arnol E. Peacock's Elementary Microtechnique. 4th edition, 1973:33-7.
- Aydin E, Türkez H, Geyikoğlu F. Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of α -pinene on N2a neuroblastoma cells. Section Cellular and Molecular Biology 2013;68(5):1004-1009.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power". The FRAP assay. Anal. Biochem.1996;239:70-76.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LebensmWissu Technol. 1995;28:25-30.
- Chlopicka J, Pasko P, Gorinstein S, Jedryas A, Zagrodzki P. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. LWT- Food Science and Technology 2012;46:548-555.
- Dejan ZO, Neda MMD, Marina M. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. Chemistry Central Journal 2011;5:34.
- Dionel A, Vicente J, Cáceres A. Fundamento de agrotecnología de cultivos de plantas medicinales Iberoamericanas. Editorial Convenio Andrés Bello Santafé de Bogotá. 2000. p. 270-276.
- Duarte Y., Pino O., Martínez B., Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium* spp. Rev. Protección Veg. 2013;28(3):232-235.
- Faustino H, Gil N, Baptista C and Duarte AP. Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. Molecules 2010;15:9308-9322.
- Gattuso MA, Gattuso SJ. Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo. Editorial de la Universidad nacional de Rosario Urquiza. Argentina. ISBN N^o 950-673-199-3. 1999.
- Infante D., Martínez B., Sánchez Y., Pino O.: Efecto de aceites esenciales sobre cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels., Rev. Protección Veg. 2013;28(2):153-157.
- Ljiljana S, Mihajlo S, Vesna N, Ljubiša N, Dušica R, Jasna ČB and Vesna T. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. Sensors 2009;9:5702-5714.

- Lou Zhi-cen. General control methods for vegetable drugs. Comparative study of methods included in thirteen pharmacopoeias and proposals on their international unification. WHO/PHARM/80.502, 1980:8-39.
- Martínez CR, García MS, Martínez SMM, Larionova M, Sebazco CP, Machín ML, Ruiz VA. Evaluación antiinflamatoria del flavonoide 2"- o- ramnosil 4"- o- metil vitexina en ratas. Revista Cubana de Plantas Medicinales. On-line version ISSN 1028-4796. 2004;9(1).
- Memnune S, Hilal Y, Neva G, Bulent C, Zeynep E and Sezai E. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pak. J. Pharm. Sci. 2009;22(1):102-106.
- Michalak A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. Polish J. of Environ. Stud. 2006;15(4):523-530.
- Miranda MM, Cuéllar AC. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana, 2000:25-49, 74-79.
- Miranda MM, Cuéllar AC. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Félix Varela. La Habana, 2001:265-280, 364-370.
- NRSP 309. Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayo, 1992:16-29.
- Ochoa C, Ayala A. Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. Ingeniería y Competitividad: Revista de Divulgación del Desarrollo Científico y Tecnológico 2004;6(2):93-104.
- Pino JA, Bello A and Urquiola A. The leaf oil of *Piper ossanum* Trel. from Cuba. Journal of Essential Oil Research. 2002;14(5):375.
- Pino O, Sánchez Y, Rodríguez H, Correa TM, Demedio J, Sanabria JL. Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* frente a *Varroa destructor*. Rev. Protección Veg. 2011;26(1):52-61.
- Pradhan D, Suri KA, Pradhan DK and Biswasroy P. Golden Heart of the Nature: *Piper betle* L. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2013;1(6):147-167.
- Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana. Ed. Científico-Técnica, 1988:1125.
- Rufino AT, Ribeiro M, Judas F, Salgueiro L, Lopes MC, Cabaleiro C, Mendes AF. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- α -pinene: structural and enantiomeric selectivity. J. Nat. Prod. 2014;77(2):264-269.

- Saralegui H. *Piperaceae*. En: Greuter W, Rankin Rodríguez R, editores. Flora de la República de Cuba. Serie A, Plantas Vasculares. Fascículo 9 (3). La Habana: Königstein, 2004:60-1, 81-3.
- Singleton VL., Orthofor, R y lamuela-Raventos, RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* 1999;299:152-178.
- Soto MRV. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. In *Crescendo*. Institucional 2015;6(1): 33-43.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins DB. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006;19:669-675.
- WHO. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. WHO/PHARM/92.559. Ginebra. 1998.