

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *PIPER PIEDECUESTANUM* TREL. & YUNCK. Y *PIPER SUBPEDALE* TREL. & YUNCK.

ANA MARÍA MESA [^], DIANA CRISTINA RINCÓN [^], JOHN FREDY TORO [^], ANGÉLICA TAMAYO ^B, SILVIA BLAIR [^], BENJAMÍN A. ROJANO ^{B*}

(Received June 2011; Accepted December 2011)

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the antioxidant activity of extracts of hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol obtained from the leaves of *Piper piedecuestanum* TREL. & YUNCK. and *Piper subpedale* TREL. & YUNCK by different spectrophotometric methods: ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP and ORAC in some selected samples. The most active *Piper subpedale* TREL. & YUNCK had the lowest rate evaluated by the techniques and power of the ethyl acetate extract was determined by the ORAC assay values presented Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) = 2195.91 μmol Trolox / g of extract. The antioxidant activity measurements by different techniques, offer advantages in terms of predicting the *in vitro* antioxidant capacity of these two plants. www.relaquim.com

Key words: Antioxidant, *Piper piedecuestanum* TREL. & YUNCK. y *Piper subpedale* TREL. & YUNCK, ABTS^{•+}, FRAP, DPPH

RESUMEN

El presente estudio tuvo como propósito investigar la actividad antioxidante de extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol obtenidos a partir de las hojas de *Piper piedecuestanum* TREL. & YUNCK. y *Piper subpedale* TREL. & YUNCK por diferentes métodos espectrofotométricos: ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP y en algunas muestras seleccionadas ORAC. Los extractos de las dos especies de *Piper* presentaron una buena actividad antioxidante en las metodologías evaluadas. La especie más activa *Piper subpedale* TREL. & YUNCK presentó los mejores valores por las técnicas evaluadas y la potencia del extracto de acetato de etilo fue determinada por el ensayo ORAC que presentó valores de capacidad antioxidante de equivalentes de trolox (TEAC)= 2195.91 μmol Trolox /gramos de extracto. Las mediciones de la actividad antioxidante por diferentes técnicas, ofrecen ventajas

^a Grupo de Investigación Malaria. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Facultad de medicina, Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín, Colombia.

^b Laboratorio de Ciencias de los Alimentos. Escuela de Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. A.A 3840. Medellín, Colombia. Teléfax.: +57(4) 430 9381; Fax: +57(4) 430 9347.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. A.A 3840. Medellín, Colombia. Teléfax.: +57(4) 430 9381; Fax: +57(4) 430 9347. E-mail: brojano@unal.edu.co

en términos de la predicción de la capacidad antioxidante *in vitro* de estas dos plantas. www.relaquim.com

Palabras Clave: Antioxidante, *Piper piedecuestanum* TREL. & YUNCK. y *Piper subpedale* TREL. & YUNCK, ensayo de decoloración con el radical catiónico (**ABTS^{•+}**), ensayo de decoloración del radical α - α -difencil- β -picrilhidrazilo (DPPH[•]), ensayo ferric reducing/antioxidant power (FRAP), ensayo de capacidad de captura de radicales de oxígeno (oxygen radical absorbance capacity, ORAC).

INTRODUCCIÓN

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 (Wang *et al.*, 2011). Gran variedad de antioxidantes son obtenidos de fuentes naturales como los carotenos y tocoferoles entre otros, lo que ha posicionando a los productos naturales como una fuente de compuestos con potencial antioxidante comparable con la de antioxidantes sintéticos (Krishnaiah *et al.*, 2010). La actividad antioxidante puede ser usada para caracterizar matrices complejas de materiales vegetales, la cual se relaciona con compuestos que pueden proteger un sistema biológico de la excesiva oxidación (Moon *et al.*, 2009).

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 (Jaramillo *et al.*, 2001; Jaramillo *et al.*, 2004). Pocas especies de *Piper* son económicamente importantes, por ejemplo; *Piper nigrum* a partir de la cual se obtiene la pimienta, condimento utilizado popularmente en

todo el mundo; *Piper methysicum* y *Piper betle* usadas en distintos países de Asia por sus propiedades medicinales (efectos narcóticos) y algunas otras utilizadas a nivel local en Asia y América como plantas medicinales o condimentos (Greig, 2004; Manigauha *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2002). Químicamente, en *Piper* se han encontrado lignanos y neolignanos; taninos, saponinas, compuestos fenólicos, terpenos, flavonoides, flavanonas, isoquinolinas, xantonas, limonoides y alcaloides entre otros (Parmar *et al.*, 1997). Muchos de estos compuestos, en especial fenoles y flavonoides son responsables de la actividad antioxidante (Escudero *et al.*, 2008). Extractos etanólicos, metanólicos y acuosos evaluados en su contenido de flavonoides y otros metabolitos con potencial actividad antioxidante son reportados en varias especies de *Piper*: *P. aduncum*, *P. cubeba*, *P. tricuspe*, *P. divaricatum*, *P. heterophyllum*, *P. arboreum*, *P. methysticum* (kava kava), *P. umbellatum* L. *P. tuberculatum*, *P. nigrum*, *P. sarmentosum*, *P. guineense*, *P. betel* Linn Paan (Nisar *et al.*, 2010; Khalid *et al.*, 2010; Silva D *et al.*, 2010; Valdivia *et al.*, 2009; Jagdale *et al.*, 2009; Regasini *et al.*, 2008; Sáez A *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2010).

Los estudios fitoquímicos previos sobre *P. piedecuestanum* y *P. subpedale* revelaron la presencia predominante de varios tipos de flavonoides y amidas. Como parte de nuestra serie de estudios sobre fitoquímica y bioactividad en plantas colombianas, en este artículo informamos las propiedades

de diferentes extractos obtenidos de dos especies aun no estudiadas en el campo de la actividad antioxidante *P. piedecuestanum* y de *P. subpedale* mediante las principales técnicas de medición antioxidante: ensayo de decoloración con el radical catiónico (ABTS^{•+}), ensayo de decoloración del radical α - α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH[•]), ensayo ferric reducing/antioxidant power (FRAP) y para la muestra más activa el ensayo de capacidad de captura de radicales de oxígeno (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) con el fin de caracterizar el potencial reductor en los diferentes extractos de estas dos plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El radical libre DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidracilo), fosfato ácido de sodio, MeOH, tricloruro de hierro, 2,4,6-tri(2-piridil) triazina (TPTZ), 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 2,20-azo-bis(2-amidinopropano diclorhidrato) (AAPH) usado como una fuente de radicales peroxilos, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,8-tetrametilchromano-2-carboxílico), fluoresceinato de sodio, ácido ascórbico fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), Folin-Ciocalteu fue obtenido de Merck (Darmstadt, Germany). El agua usada en los experimentos es grado HPLC. Los ensayos ORAC se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia, Perkin Elmer LS55; los ensayos de absorción UV-Vis se hicieron en un espectrofotómetro Jenway 6405.

Colección del material vegetal

Dos especies de Piperaceae, pertenecientes al género *Piper*: *P. piedecuestanum* Trel. & Yunck. y *P. subpedale* Trel. & Yunck fueron colectadas por el botánico especialista Felipe Cardona en los municipios de Norcasia-Caldas y Piedecuesta-Santander (Colombia) y se depositó cada especie en el HUA (Herbario Universidad de Antioquia).

La identificación de las especies fue realizada en conjunto con el Doctor Ricardo Callejas, especialista en la familia Piperaceae.

Preparación del material vegetal para extractos

El material seco y molido de *P. piedecuestanum* (364,3g), y de *P. subpedale* (1150g) se sometió a un proceso de extracción por percolación hasta agotamiento empleando 1000mL de los siguientes solventes: Hexano (H), diclorometano (D), acetato de etilo (A) y metanol (M). Después de tres días se comenzó la concentración del extracto a presión reducida en un rotavaporador. Los cuatro extractos de cada planta se codificaron con las iniciales de cada especie y el tipo de extracto: *P. subpedale* (PS) PSExtH, PSExtD, PSExtA, PSExtM, y para *P. piedecuestanum* (PP) (PPExtH, PPExtD, PPExtA, PPExtM), se monitorearon por cromatografía en capa delgada con fase estacionaria de sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck®, mediante diferentes sistemas de elusión y revelando con lámpara ultravioleta UVGL-58 a 254 y 366 nm, solución de DPPH[•] (200 mg/L) para determinar la decoloración de posibles compuestos antioxidantes y revelador universal (ácido sulfúrico: anhídrido acético: agua 50:30:20).

Evaluación de la actividad antioxidante

Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS^{•+}: se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones (Re *et al.*, 1999). El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azinobis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. En la evaluación se utilizaron 10 μ L de extracto y 990 μ L de la solución del radical ABTS^{•+}. A los 30 min de reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad, se leyó el cambio en la absorbancia respecto a la referencia

del reactivo, a una longitud de onda de 734 nm. La referencia del reactivo consistió en una solución del radical ABTS^{•+} con el solvente de la muestra. Los resultados se expresaron como valores TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante TROLOX[®].

Ensayo de decoloración del radical α -difenil- β -picrilhidrazilo (DPPH[•]): Para cuantificar la capacidad captadora de radicales libres de los extractos se determina el grado de decoloración que provocan sus componentes a una solución metanólica de DPPH[•] mediante el método de *Brand-Williams*, con algunas modificaciones (Peyrat-Maillard *et al.*, 2000; Brand-Williams *et al.*, 1995). Se preparó una solución madre de DPPH[•] aproximadamente 20 mg/L del radical en metanol, 990 μ L de esta solución se mezclaron con 10 μ L de solución de extracto a diferentes concentraciones. Se preparó un blanco de muestra que contenía 990 μ L MeOH con 10 μ L de muestra y un blanco de referencia con 990 μ L DPPH[•] y 10 μ L de solvente. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm. Los resultados se expresaron como valores TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante TROLOX[®].

Ensayo FRAP (ferric reducing/antioxidant power): este método evaluó la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe⁺³) presente en un complejo con la 2, 4, 6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe⁺²), que tuvo un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm (Benzie IF *et al.*, 1996). Este ensayo se llevó a cabo en un *buffer* ácido acético-acetato de sodio (pH 3.4), que contenía TPTZ y FeCl₃. Se utilizaron 900 μ L de esta solución, 50 μ L de muestra y 50 μ L de agua destilada. Luego

de 60 min de reacción se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. Para cada muestra se tuvo en cuenta la lectura de la absorbancia del blanco sin cromóforo, de la misma manera que en las pruebas anteriores. La curva de referencia se construyó usando ácido ascórbico como patrón primario. Las actividades de las muestras se expresaron como TEAC (*ascorbic acid equivalent antioxidant capacity*: mg de ácido ascórbico/100 g extracto).

Ensayo ORAC (oxygen radical absorbance capacity): En aquellas muestras con resultados de inhibición superiores al 50 % a 100 ppm y que presentarán diferencias estadísticamente significativas con altos valores de TEAC para ABTS^{•+}, DPPH[•], y de mg de ácido ascórbico / 100 gr muestra para FRAP se realizó el ensayo ORAC. El procedimiento experimental estuvo basado en reportes previos de *Ou* y otros, (*Ou B et al.*, 2001; *Atala E et al.*, 2009) en el cual se empleaba Trolox como estándar y condiciones controladas de temperatura a 37 °C y pH 7,4. Las lecturas se realizaron a una λ de excitación 493 nm y *slit* de excitación 5, λ de emisión 515 nm y *slit* de emisión 13, con atenuador de 1 % y sin placa atenuadora. Para el desarrollo de la técnica se utilizaron soluciones de fluoresceína 1×10^{-2} M en PBS (75 mM), AAPH 0,6 M en PBS (75 mM). La muestra contenía 21 μ L de fluoresceína, 3 μ L de PBS, 30 μ L del extracto ensayado y 50 μ L de AAPH. El efecto protector del antioxidante fue calculado usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, se comparó contra la curva del Trolox y se expresó en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra (μ mol Tx/g muestra), de acuerdo con la ecuación 1.

$$\text{Ec 1. ORAC} = \frac{(AUC - AUC^{\circ})}{(AUC_{\text{Trolox}} - AUC^{\circ})} f[\text{Trolox}]$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra, AUC[°] área bajo la curva para

el control, AUC_{Trolox} área bajo la curva para el Trolox, f es el factor de dilución de los extractos.

Análisis estadístico

La comparación entre las dos plantas y los diferentes ensayos de actividad antioxidante se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con un nivel de confianza de $p < 0,05$ empleando el programa Graph-Pad Prism 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro de las técnicas más empleadas para el análisis antioxidante se encuentran los ensayos de ABTS^{•+}, FRAP, DPPH[•] y más recientemente el ensayo *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) propuesto para medir la capacidad antioxidante con gran relevancia a nivel biológico, fiabilidad, repetitividad y bajo costo. Los datos presentados en este estudio demostraron que todas las muestras evaluadas poseen

buenas propiedades antioxidantes y un alto potencial reductor se presentó para el extracto de acetato de etilo de la especie *P. subpedale*. Los rendimientos de la extracción provenientes de las dos diferentes especies de *Piper* juntos con las mediciones por triplicado y los resultados expresados como la media \pm desviación estándar de TEAC μ Mol Trolox/ g de extracto para ABTS^{•+}, DPPH[•] y los valores en mg ácido ascórbico(a.a) / 100 gr muestra de FRAP se presentan en el cuadro 1.

Los porcentajes de material extraíble para cada planta con los diferentes solventes mostraron rendimientos máximos de extracción en porcentaje en peso con respecto al material vegetal seco en el extracto de diclorometano de *P. subpedale* 5,41% y en el extracto de metanol de *P. piedecuestanum* 3,58%. Ninguna asociación se encontró entre los rendimientos de extracción y las pruebas actividad antioxidante que se realizaron.

Las muestras con valores de TEAC en el ensayo ABTS^{•+} muestran que hay una diferencia estadísticamente significativa

Cuadro 1. Resultados de los ensayos ABTS^{•+}, DPPH[•] y FRAP para los extractos de las especies *P. piedecuestanum* y de *P. subpedale*

Extracto	% Rendimiento del extracto (g de extracto /100g de material Vegetal seco)	TEAC μ Mol Trolox/ g de extracto TEAC ABTS ^{•+}	TEAC μ Mol Trolox/ g de extracto TEAC DPPH [•]	mg a.a / 100 gr muestra media FRAP
<i>P. subpedale</i>				
PSExtH	3,94	1347 \pm 67*	314,2 \pm 16 *	38366,0 \pm 1918 *
PSExtD	5,41	1221 \pm 61	937,9 \pm 47	224885,5 \pm 11244
PSExtA	2,26	2676 \pm 134	1432,5 \pm 72	448675,1 \pm 22434
PSExtM	ND*	3250 \pm 162	502,7 \pm 25	183409,2 \pm 9170
<i>P. piedecuestanum</i>				
PPExtH	0,78	898 \pm 45	104,6 \pm 5	180130,6 \pm 9007
PPExtD	2,74	1618 \pm 81	825,7 \pm 41	343918,8 \pm 17196
PPExtA	0,76	1417 \pm 71	603,0 \pm 30	145783,5 \pm 7289
PPExtM	3,58	1042 \pm 52	393,1 \pm 20	125745,0 \pm 6287

ND*=No determinado, TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity, a.a. = ácido ascórbico. *corresponden a correlaciones entre las columnas con un valor de $p < 0,05$.

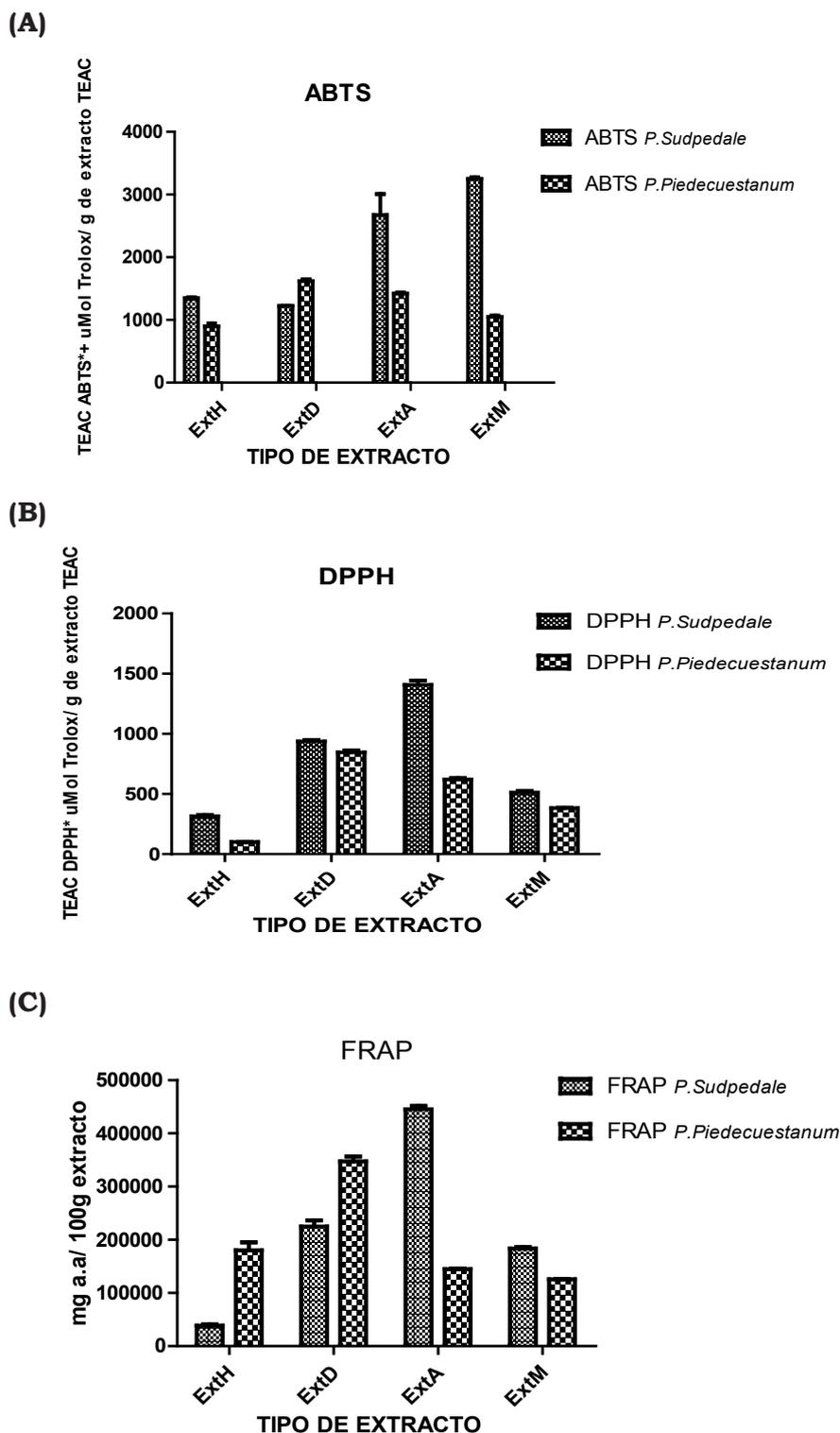


Figura 1. Efecto antioxidante de los extractos de hexano (ExtH), diclorometano (ExtD), acetato de etilo (ExtA) y metanol (ExtM) de las plantas *P. subpedale* y *P. piedecuestanum* (A) ABTS⁺, (B) DPPH[•] y (C) FRAP. Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar (DE, n=3). Diferencias entre los extractos con un nivel de $p < 0.05$.

entre los extractos de ambas especies (Fig 1A). Los extractos que presentaron mayor actividad para esta prueba fueron los de acetato de etilo y metanol de *P. subpedale* con valores de PSExtA (2676 ± 134) y PSExtM (3250 ± 162) seguido del extracto de acetato de etilo de *P. piedecuestanum* con un valor de PPExtA (1417 ± 71). Para el ensayo de DPPH \cdot , los valores de TEAC muestran diferencias estadísticamente significativa entre los extractos de ambas especies (Fig 1B). El extracto de acetato de etilo para esta prueba presentó un alto y promisorio potencial reductor para *P. subpedale* PSExtA ($1432,5 \pm 72$) seguido del extracto de diclorometano de *P. piedecuestanum* PPExtD ($825,7 \pm 41$). Estudios con otras especies del mismo género reportaron el potencial antioxidante por diferentes métodos, donde se evalúa la habilidad reductora mediante ensayos de actividad atrapadora del radical DPPH \cdot de los extractos etanólicos de las hojas de *Piper betel* (Rathee *et al.*, 2006) y de los extractos de acetato de etilo de las hojas de *P. arboreum* y *P. tuberculatum* (Regasini, 2008). Igualmente en el ensayo FRAP, hay diferencia estadísticamente significativa entre todos los extractos de ambas especies (Fig 1C). Los mejores valores los presentó el extracto de acetato de etilo de *P. subpedale* PSExtA ($448675,1 \pm 22434$) y el extracto de diclorometano de *P. piedecuestanum* PPExtD ($343918,8 \pm 17196$).

Las propiedades antioxidantes más significativas con altos valores en todas las técnicas evaluadas, las presentó *P. subpedale* asociada principalmente al extracto de acetato de etilo en los ensayos de ABTS $^{+\cdot}$, DPPH \cdot y FRAP, por lo que los compuestos antioxidantes presentes en este extracto de polaridad media o de naturaleza polar, tienen una alta capacidad reductora y posiblemente se deba a compuestos fenólicos como flavonoides y flavonas reportadas en estudios previos de otras especies de *Piper*. Este extracto fue el seleccionado para el análisis por el ensayo ORAC y presentó

valores de TEAC a 1ppm = $2195.91 \mu\text{mol Tx/g}$ de extracto. Según estos resultados, se recomienda explorar las características estructurales de los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo de la planta *P. subpedale*, mediante un fraccionamiento bioguiado por cromatografía para aislar y purificar metabolitos que tengan una promisorio actividad antioxidante y que se puedan explorar con más profundidad en modelos *in vivo* para un mayor entendimiento del potencial reductor de esta planta, dado que los métodos para medir la actividad antioxidante tienen en cuenta aspectos como: intervención de mecanismos, atrapamiento de radicales libres, descomposición catalítica, supresión prooxidante, porcentaje de atrapamiento y concentración efectiva (moles de radicales libres atrapados por mol de antioxidante).

CONCLUSIÓN

El presente estudio confirmó las actividades antioxidantes de los extractos de *Piper piedecuestanum* TREL. & YUNCK. y *Piper subpedale* TREL. & YUNCK, por diferentes metodologías ABTS $^{+\cdot}$, DPPH, FRAP y ORAC. Estas actividades respaldan, al menos que para la especie *Piper subpedale* TREL. & YUNCK, futuros estudios en el desarrollo y descubrimiento de nuevas sustancias antioxidantes naturales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el Ministerio de Agricultura de Colombia proyecto (No. 009-2007-V7552-38-07), a la Universidad de Antioquia y a la universidad Nacional sede Medellín.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Atala E, Vásquez L, Speisky H, Lissi E, López-Alarcón C. (2009) Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. *Food Chemistry* **113** (1): 331-335.
- Benzie I.F., Strain J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* **239** (1): 70-6.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset, C. (1995) Use a of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* **28**(1): 25-30.
- Da Silva J.K., Andrade E., Guimaraes E., Maia J.G. (2010) Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. *Natural product communications* **5**(3): 477-80.
- Escudero M. R., Escudero D., Ramos F., Remsberg C.M., Takemoto J. K., Davies, N.M., Yanez J.A. (2008) Identification of polyphenols and anti-oxidant capacity of *Piper aduncum* L. *Open Bioactive Compounds Journal* **1**: 18-21.
- Greig N. (2004) Introduction. En: Dyer L, Palmer A (Eds.). *Piper a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, p 1-4.
- Hussain K., Ismail Z., Sadikun A., Ibrahim P. (2010) Standardization and *in vivo* antioxidant activity of ethanol extracts of fruit and leaf of *Piper sarmentosum*. *Planta medica* **76**(5): 418-25.
- Jagdale S.C., Kuchekar B.S., Chabukswar A.R., Lokhande P.D., Raut C.G. (2009) Anti-oxidant activity of *Piper longum* Linn. *International Journal of Biological Chemistry* **3**(3): 119-125.
- Jaramillo A., Callejas R. (2004) 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, p.179-198.
- Jaramillo M., Manos A., Paul S. (2001) Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae). *American Journal of Botany* **88**(4): 706-716.
- Khalid H., Zhari I., Amirin S., Pazilah I. (2010) Standardization and *in vivo* antioxidant activity of ethanol extracts of fruit and leaf of *Piper sarmentosum*. *Planta Medica* **76**(5): 418-425.
- Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyananda R. (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant Species. *Food and Bioproducts Processing*. **89**(3): 217-233.
- Lei D., Chan C., Wang Y., Wang T., Lin B., Huang C., Lee J., Chen H., Jeng J., Chang M. (2003) Antioxidative and antiplatelet effects of aqueous inflorescence *Piper betle* extract. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**(7): 2083-2088.
- Manigauha A., Huma A., Maheshwari M.U. (2009) Antioxidant activity of ethnolic extract of *Piper betel* leaves. *Journal of Pharmacy Research* **2**(3): 491-494.
- Moon J.K., shibamoto T. (2009) Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**(5): 1655-1666.
- Nisar A., Hina F., Haider A.B., Muhammad R., Tariq M., Nighat F. (2010) Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated tissues of *Piper nigrum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **102**(1): 129-134.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. 2001 Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**(10): 4619-26.

- Parmar V.S., Jain S. C., Bisht K. S., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O.D., Ashok K., Wengel J., Olsen P.M. (1997) Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **46 (4)**: 597-673.
- Peyrat-Maillard MN, Bonnely S, Berset C. (2000) Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta* **51(4)**: 709-16.
- Rathee J.S., Patro B.S., Mula S., Gamre S., Chattopadhyay S. (2006) Antioxidant activity of *Piper betel* leaf extract and its constituents. *Journal of agricultural and food chemistry* **54(24)**: 9046-9054.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. **26 (9-10)**: 1231-7.
- Regasini L., Cotinguiba F., Siqueira J. R., Bolzani V., Silva D., Furlan K.J. (2008) Radical scavenging capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Latin American Journal of Pharmacy* **27(6)**: 900-903.
- Saez A., Rojano B., Blair S., Segura C., Bruno F., Blandine S., Philippe G., Saez J. (2008) Antimalarials and antioxidants compounds from *Piper tricuspe* (Piperaceae). *Pharmacologyonline* **1**: 1-8.
- Silva D., Kelly J. R., Andrade E. H., Guimaraes E.F., Maia, Guilherme J.S. (2010) Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. *Natural Product Communications* **5(3)**: 477-480.
- Singh G., Kiran S., Marimuthu P., de Lampasona M. P., De Heluani C. S., Catalan C. A.N. (2008) Chemistry, biocidal and antioxidant activities of essential oil and oleoresins from *Piper cubeba* (seed). *International Journal of Essential Oil Therapeutics* **2(2)**: 50-59.
- Valdivia A.C., Mollinedo P., Vilaseca A., Sterner O. (2009) Prenylated protocatechuic acid derivatives with anti-oxidant activity from *Piper heterophyllum*. *Revista Boliviana de Química* **26(2)**: 83-89.
- Wang S., Melnyk J.P., Tsao R., Marccone M.F. (2011) How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International* **44 (1)**: 14-22.
- Wu D., Yu L., Nair M., DeWitt G., Ramsewak R.S. (2002) Cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds with antioxidant activities from *Piper methysticum* (kava kava) roots. *Phytomedicine* **9(1)**: 41-47.