

Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (Piperaceae)

Leishmanicidal and antioxidant activity of extracts of *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (Piperaceae)

Dr. C. Wilson Cardona Galeano^I, Dra. C. Sara M. Robledo Restrepo^I, Dr. C. Benjamín Alberto Rojano^{II}, Dr. C. Fernando Alzate Guarín^I, MSc. Diana Lorena Muñoz Herrera^I, Dr. C. Jairo Saez Vega^I

^I Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

^{II} Escuela de Química. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: la leishmaniasis es la enfermedad protozoaria responsable de la mayor morbilidad y mortalidad en la población mundial. Los medicamentos utilizados para su tratamiento presentan serios problemas, entre estos la alta toxicidad y los efectos secundarios severos. Por otro lado, la producción de radicales libres debido al estrés oxidativo ocasiona la oxidación de lípidos, proteínas, DNA y enzimas que son responsables del daño del tejido celular. Algunas especies de la familia Piperaceae presentan un amplio espectro de actividades biológicas, lo cual incita a la exploración de la propiedad antioxidante y antiprotozoaria en miembros del género *Piper*, como una alternativa en la búsqueda de nuevos medicamentos contra la leishmaniasis y de nuevos antioxidantes naturales.

Objetivo: evaluar la actividad leishmanicida, citotóxica y antioxidante de extractos alcohólicos y no alcohólicos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel.

Métodos: después de secado el material vegetal (tallos y hojas), se realizó un proceso de extracción por percolación con etanol. La solución obtenida se concentró a presión reducida y con el extracto crudo de las hojas se hizo la partición por cromatografía en columna, con solventes de diferente polaridad como hexano, diclorometano y acetato de etilo. Se evaluó la actividad leishmanicida en

amastigotes axénicos e intracelulares para cada fracción y cada extracto etanólico. Se evaluó la citotoxicidad en células U-937 y la capacidad antioxidante mediante el método FRAP (*ferric reducing ability of plasma*).

Resultados: la fracción obtenida por percolación con hexano (fracción de desengrase) y el extracto etanólico de los tallos resultaron los más activos contra amastigotes intracelulares de *Leishmania panamensis*, lo cual las hace fracciones promisorias en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad leishmanicida. Los dos extractos y todas las fracciones, con excepción de la fracción de desengrase, mostraron una alta capacidad reductora, por lo tanto, estas fracciones, principalmente la de acetato de etilo, se consideran como potenciales fuentes de sustancias antioxidantes.

Conclusiones: los resultados muestran que *Piper daniel-gonzalezii* presenta propiedades tanto leishmanicida como reductora, por lo cual tiene un alto potencial como fuente de compuestos para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis, o como una fuente natural de antioxidantes con un alto uso potencial en la industria farmacéutica y de alimentos.

Palabras clave: *Piper daniel-gonzalezii*, leishmaniasis, antioxidantes.

ABSTRACT

Introduction: leishmaniasis is the protozoal disease with the highest morbidity and mortality worldwide. The medications used to treat it have serious drawbacks, among which are their high toxicity and severe side effects. On the other hand, production of free radicals due to oxidative stress results in the oxidation of lipids, proteins, DNA and enzymes responsible for cell tissue damage. Some species of the family Piperaceae present a broad spectrum of biological activities, inviting exploration of the antioxidant and antiprotozoal properties of members of the genus *Piper* as an alternative in the search for new drugs against leishmaniasis and new natural antioxidants.

Objective: evaluate the leishmanicidal, cytotoxic and antioxidant activity of alcoholic and non-alcoholic extracts of *Piper daniel-gonzalezii* Trel.

Methods: drying of the plant material (stems and leaves) was followed by extraction by percolation with ethanol. The solution thus obtained was concentrated under reduced pressure, and the crude leaf extract was subjected to partition column chromatography with solvents of varying polarity, such as hexane, dichloromethane and ethyl acetate. Leishmanicidal activity in axenic and intracellular amastigotes was evaluated for each fraction and ethanolic extract. An evaluation was conducted of cytotoxicity in U-937 cells and of antioxidant capacity by the FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) method.

Results: the fraction obtained by percolation with hexane (degreasing fraction) and the ethanolic stem extract were the most active against intracellular amastigotes of *Leishmania panamensis*, a fact that turns them into promising fractions in the search for new compounds with leishmanicidal activity. The two extracts and all the fractions, except for the degreasing fraction, exhibited a high reducing capacity. These fractions, particularly the ethyl acetate fraction, are therefore considered to be potential sources of antioxidant substances.

Conclusions: results show that *Piper daniel-gonzalezii* has both leishmanicidal and reducing properties, and thus great potential either as a source of compounds for developing new therapeutic alternatives against leishmaniasis, or as a natural source of antioxidants with great potential for use in the pharmaceutical and food industries.

Key words: *Piper daniel-gonzalezii*, leishmaniasis, antioxidants.

INTRODUCCIÓN

El género *Piper* pertenece a la familia Piperaceae, el cual cuenta con cerca de 2 000 especies distribuidas ampliamente en todos los continentes.¹ Algunas especies del género tienen utilidad comercial, económica y medicinal. Desde el punto de vista económico las piperaceas son importantes en los mercados de especias en todo el mundo.¹ Algunos usos explorados y reportados para especies de *Piper* son: antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiparasitario, anticancerígeno, analgésico, antiinflamatorio, anti-asma, hipotensor, insecticida.¹ Adicionalmente, varias especies del género *Piper* han presentado actividad contra protozoos del género *Leishmania*,²⁻⁵ los cuales causan la leishmaniasis, una enfermedad que afecta las poblaciones más pobres, principalmente de países en vía de desarrollo. Hoy día, 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección y se presentan 2 millones de casos nuevos cada año.⁶ Según la Organización Mundial de la Salud, esta enfermedad es la responsable de la mayor morbilidad y mortalidad en la población mundial.⁷

Hasta el momento, los compuestos de antimonio pentavalente junto con el isetionato de pentamidina y la miltefosina, son los medicamentos disponibles para el tratamiento de todas las formas de leishmaniasis.⁸ Sin embargo, el empleo de estos fármacos tiene numerosas desventajas, entre las que están las altas dosis que se asocian con moderada o alta toxicidad, la necesidad de usar esquemas terapéuticos prolongados, la aparición de cepas resistentes y un alto costo del tratamiento.^{9,10} Por lo anterior, se hace necesaria la búsqueda de nuevos medicamentos que sean seguros, efectivos y de bajo costo, para posibilitar su uso general y enfrentar así este grave problema de salubridad tanto en Colombia como en el mundo.

Los productos naturales son una fuente importante de compuestos biológicamente activos contra diferentes microorganismos infecciosos, que se convierten en una alternativa para la introducción de nuevos compuestos con uso terapéutico.^{11,12}

Por otro lado, los antioxidantes son conocidos por proveer beneficios a la salud, como reducción de riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer, al combatir el daño celular causado por los radicales libres.¹³⁻¹⁵ La capacidad antioxidante de varias especies del género *Piper* ha mostrado buenos resultados mediante el método DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).¹⁶⁻¹⁸

Piper daniel-gonzalezii Trel. es una planta nativa de Colombia, descrita originalmente del departamento de Antioquia y distribuida en el norte de las cordilleras Central y Oriental, entre 1 800 y 2 800 m. Esta especie no ha sido objeto de análisis de estudios relacionados con su potencial farmacológico y sobre la base del amplio espectro de actividades biológicas que han sido reportadas para la familia Piperaceae, así como la necesidad de nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis y de nuevos antioxidantes naturales. El presente estudio tuvo como objetivo, evaluar la actividad leishmanicida, citotóxica y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii*.

MÉTODOS

Recolección y secado de la planta

El material vegetal (tallos y hojas) fue recolectado en el corregimiento de Santa Elena, municipio de Medellín, en el departamento de Antioquia (Colombia) en enero de 2011. Un espécimen se depositó en el Herbario de la Universidad de Antioquia bajo el número de colección Alzate 2713. El material se secó en estufa a 35 °C durante 48 h.

Extracción y aislamiento

El material vegetal seco se sometió a percolación con hexano y el extracto obtenido se concentró a presión reducida, la que se llamó la fracción desengrase. Luego, las hojas y los tallos, de forma separada, se sometieron a extracción por percolación con etanol durante 15 días. El extracto obtenido se concentró a presión reducida. El crudo resultante de las hojas se particionó en una columna cromatográfica sobre sílica-gel utilizando como eluentes hexano, diclorometano y acetato de etilo.

Determinación de la actividad leishmanicida y la citotoxicidad

Evaluación in vitro de la citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó sobre la línea celular de monocitos/macrófagos humanos U-937 y células hepáticas HepG2 en fase exponencial de crecimiento, así como en cultivo primario de macrófagos peritoneales de hámster.¹⁹ Para las evaluaciones, las células se cultivaron en platos de cultivo celular de 96 pozos a diferentes concentraciones según el tipo de célula, así, 100 000 células U-937 o HepG2/mL o 75 000 células/mL para los macrófagos peritoneales de hámster. Todos los tipos de células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB (suero fetal bovino). Para cada extracto se evaluaron 6 concentraciones dobles seriadas a partir de 200 µg/mL. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 72 h en presencia del extracto y, posteriormente, el efecto en la viabilidad de las células se determinó midiendo la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial al producir formazan por la adición de 10 µL/pozo de solución MTT (5 mg/mL) e incubación a 37 °C por 3 h. La reacción se detuvo con la adición de 100 µL de una solución de 50 % isopropanol con 10 % SDS e incubación durante 30 min. La viabilidad celular se determinó según la cantidad de formazan producido mediante la lectura de las densidades ópticas (DO) en un lector de ELISA a 570 nm. Como control de viabilidad se usaron células no expuestas a la acción del extracto, pero mantenidas bajo las mismas condiciones. Como control de toxicidad se usaron células expuestas a anfotericina B, y mantenidas bajo las mismas condiciones. Los ensayos se realizaron 3 veces con 3 réplicas por cada concentración evaluada. Los datos obtenidos se usaron para calcular la concentración letal 50 (CL₅₀) por el método Probit.²⁰

Evaluación in vitro de la actividad leishmanicida

Para los ensayos de actividad leishmanicida *in vitro* se utilizaron promastigotes de *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* transfectados con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP).²¹ Para asegurar una buena infección *in vitro*, los parásitos se aislaron periódicamente a partir de lesiones en hámster dorados (*Mesocricetus auratus*), infectados de modo experimental. Una vez obtenidos los parásitos, se

cultivaron en medio bifásico NNN modificado, empleando como fase líquida PBS suplementado con glucosa a un pH de 6.9 e incubados a una temperatura de 26 °C. A partir de estos promastigotes se obtuvieron los amastigotes axénicos e intracelulares.

Actividad sobre amastigotes axénicos

Los promastigotes se cultivaron durante 4 a 5 días en medio NNN, los cuales se ajustaron a una concentración de 2×10^6 parásitos/mL en medio de Schneider; pH 5,4, enriquecido con 20 % de SFB, 100 µg/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomomicina y 2 mM L-glutamina. Los parásitos se incubaron a 28 °C durante 3 días, repitiéndose el proceso con temperaturas de 30, 31 y 32 °C. Una vez los promastigotes se convirtieron en amastigotes se mantuvo la temperatura en 32 °C. El medio de cultivo se cambió cada 3 a 4 días y la densidad de los parásitos se mantuvo en 2×10^6 parásitos/mL. La capacidad de los medicamentos para matar amastigotes axénicos de *L. (V) panamensis* se determinó sobre la base de la viabilidad de los parásitos, luego de la exposición a los extractos y las fracciones por el método MTT, siguiendo el protocolo descrito antes en la sección de citotoxicidad.

Actividad sobre amastigotes intracelulares

El efecto de los medicamentos sobre amastigotes intracelulares se evaluó mediante citometría de flujo en células U-937 infectadas con promastigotes de *L. panamensis*, siguiendo la metodología descrita por Taylor y otros.²²

Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles se realizó por el método colorimétrico de *Follin-Ciocalteu*,²³ mediante la construcción de una curva patrón usando como estándar ácido gálico. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/L de bebida, con lecturas realizadas a 760 nm.

Ensayo de FRAP (ferric reducing ability of plasma): se usó el método descrito por Benzie y Strain²⁴ con algunas modificaciones. Una alícuota (0,05 mL) de cada muestra se adicionó a 0,9 mL de una solución que contenía el reactivo de FRAP (buffer de acetato de sodio 0,3 µM, pH 3,6; 10 µM de tripiridiltriazina [TPTZ] en una solución 40 mM de HCl y 20 µM FeCl₃.6H₂O) y la mezcla de reacción se incubó por 30 min a 37 °C. La absorbancia se determinó a 593 nm. La capacidad de las muestras de reducir el ion férrico se calculó a partir de la curva de calibración y la capacidad antioxidante se expresó como miligramos de ácido ascórbico por 100 g de muestra seca. Todos los experimentos de actividad antioxidante se realizaron en un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesis 2.

Análisis estadístico

La evaluación de la actividad leishmanicida, la citotoxicidad y la capacidad antioxidante se realizaron y midieron por triplicado para los extractos y las fracciones de la planta, utilizando el método Probit para los dos primeros ensayos, así como un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), con un nivel de confianza de $p < 0,05$ empleando el programa Graph-Pad Prism 4 para el último ensayo.

RESULTADOS

Actividad leishmanicida y citotóxica

Los resultados para la actividad leishmanicida y la citotoxicidad se muestran en la tabla 1. Se observa que los extractos con mejor actividad contra amastigotes axénicos resultaron el hexánico y el etanólico de las hojas, con valores de $38,5 \pm 7,9$ y $55,6 \pm 9,9$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La fracción obtenida de tallos de desengrase, diclorometano, acetato de etilo y etanol, exhibieron valores de actividad mayores que 100 $\mu\text{g/mL}$. La evaluación en amastigotes intracelulares mostró que el extracto etanólico de los tallos y la fracción de acetato de etilo y desengrase, tenían una actividad mayor que 35 , 40 y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La fracción de hexano, diclorometano y el extracto etanólico de las hojas no presentaron actividad. La menor citotoxicidad la presentó la fracción de acetato de etilo ($\text{CL}_{50} = 140,3 \pm 24,0$ $\mu\text{g/mL}$); la fracción de hexano y la de diclorometano fueron las más citotóxicas con valores de $19,3$ $\mu\text{g/mL}$, cada una.

Tabla 1. Actividad leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper daniel-gonzalezii*

Muestra	CL ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{x} \pm \text{DE}$	CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{x} \pm \text{DE}$		IS Amastigotes axénicos
	U937	Amastigotes axénicos	Amastigotes intracelulares	
Fracción desengrase	$40,4 \pm 5,7$	$> 100,0$	$> 40,4$	$< 0,4$
Fracción hexano	$19,3 \pm 0,6$	$38,5 \pm 7,9$	NR	$0,5$
Fracción diclorometano	$19,3 \pm 1,5$	$> 100,0$	NR	$< 0,2$
Fracción acetato de etilo	$140,3 \pm 24,0$	$> 100,0$	$> 100,0$	$< 1,4$
Extracto etanol hojas	$20,0 \pm 0,9$	$55,6 \pm 9,9$	NR	$0,4$
Extracto etanol tallos	$35,4 \pm 1,8$	$> 100,0$	$> 35,4$	$< 0,4$
Anfotericina	$52,5 \pm 3,6$	$0,09 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$583,3$

Los valores indicados representan el promedio de tres mediciones independientes \pm desviación estándar, NR: no realizado debido a la alta toxicidad.

Capacidad antioxidante fenoles totales

En la tabla 2 se muestran los resultados de la capacidad antioxidante y los fenoles totales. La muestra que presentó mayor contenido de fenoles fue la fracción hexánica ($3\ 250$ $\text{mg}/100$ g). La fracción de diclorometano y acetato de etilo y los extractos etanólicos de tallos y hojas, exhibieron un contenido de fenoles similares, variando entre $2\ 690$ y $2\ 970$ $\text{mg}/100$ g, mientras que la fracción de desengrase mostró muy poca cantidad de fenoles (380 $\text{mg}/100$ g).

La fracción de acetato de etilo tuvo la mayor capacidad antioxidante con un valor de $16\ 430$ $\text{mg}/100$ g, seguida de la fracción de diclorometano y el extracto etanólico de las hojas, con valores de $4\ 790$ y $3\ 980$ $\text{mg}/100$ g, respectivamente.

La fracción hexánica y el extracto etanólico de los tallos, mostró una actividad de 2 940 y 2 370 mg/100 g, respectivamente. La fracción de desengrase fue la que menor capacidad antioxidante exhibió (460 mg/100 g).

Tabla 2. Capacidad antioxidante y fenoles totales de extractos de *Piper daniel-gonzalezii*

Muestra	FRAP (<i>ferric reducing ability of plasma</i>) (mg ácido ascórbico/100 g de muestra seca)	Fenoles (mg ácido ascórbico/100 g de muestra seca)
Fracción desengrase	460 ± 30	380 ± 90
Fracción hexano	2 940 ± 220	3 250 ± 50
Fracción diclorometano	4 790 ± 320	2 970 ± 310
Fracción acetato de etilo	16 430 ± 110	2 810 ± 60
Extracto etanol hojas	3 480 ± 310	2 690 ± 60
Extracto etanol tallos	2 370 ± 150	2 900 ± 140

Los valores indicados representan el promedio de 3 mediciones independientes ± desviación estándar.

DISCUSIÓN

Actividad leishmanicida y citotoxicidad

La actividad observada en amastigotes axénicos y en amastigotes intracelulares de la fracción de desengrase y el extracto etanólico de los tallos, sugiere que estas fracciones pueden ser promisorias ($CE_{50} < 60 \mu\text{g/mL}$) en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad leishmanicida. La fracción de hexano y el extracto etanólico de las hojas son las dos fracciones que presentan mejor actividad contra amastigotes axénicos de *L. (V) panamensis*. Desafortunadamente, la citotoxicidad mostrada por estas fracciones hace que sean consideradas como poco promisorias en la búsqueda de nuevos compuestos leishmanicidas, debido al riesgo de toxicidad y no selectividad.

Otras fracciones que no mostraron potencialidad en este estudio son las fracciones de acetato de etilo que resultaron ser las menos citotóxicas y con muy baja actividad contra amastigotes, tanto axénicos como intracelulares; y la fracción de diclorometano fue casi inactiva en los dos tipos de cepas.

Según estos resultados, se recomienda realizar un fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de los tallos y separar los metabolitos secundarios mayoritarios, tanto de las fracciones que presenten mejor actividad como de la fracción de desengrase, y explorar las características estructurales de los compuestos presentes para que sirvan de plantilla en el desarrollo de un nuevo medicamento contra la leishmaniasis.

Ferreira y otros²⁵ documentan la forma de acción de los alcaloides producidos por algunas especies de Piperaceae, los cuales generan daño mitocondrial que disminuye considerablemente la viabilidad de *Leishmania* sp. Dentro de estos alcaloides se encuentra piperidina y sus análogos, los cuales están reportados para un amplio grupo de especies del género *Piper* y pueden ser los responsables de la actividad aquí encontrada para *P. daniel-gonzalezii*.

Capacidad antioxidante fenoles totales

Los dos extractos y todas las fracciones, con excepción de la fracción de desengrase, mostraron una alta capacidad reductora, lo cual hace que estas fracciones, principalmente la fracción de acetato de etilo, sean consideradas como potenciales fuentes de sustancias antioxidantes. Los valores obtenidos para *P. daniel-gonzalezii* son superiores a los reportados para otras especies del género como *P. peltatum*,²⁶ especie utilizada como medicinal en la zona noroccidental de Colombia.

La fracción de acetato de etilo fue la que mayor capacidad antioxidante exhibió y su valor fue mejor con respecto a la sustancia de referencia y del extracto crudo. Este comportamiento se da con frecuencia en las fracciones, porque los compuestos activos presentes en estas se encuentran menos ligados a otros compuestos de la mezcla.

A excepción de la fracción de desengrase, todas las fracciones y los 2 extractos mostraron un alto contenido de fenoles y la fracción de hexano fue la que mayor contenido exhibió. La capacidad antioxidante está estrechamente relacionada con la cantidad de fenoles que presente una muestra. Esto no se ve reflejado en el caso de la fracción de hexano y en la fracción de acetato de etilo, lo cual puede deberse a la variación composicional que podrían presentar estas dos fracciones debido a la diferencia de polaridades que poseen.

Basados en los resultados, se recomienda realizar un fraccionamiento biodirigido de la fracción de acetato de etilo, separar los metabolitos secundarios mayoritarios y determinar sus estructuras, con el fin de evaluar su potencial reductor *in vivo* y explorar el desarrollo de nuevos compuestos antioxidantes a partir de *P. daniel-gonzalezii*, como una fuente natural con un alto uso potencial en la industria farmacéutica y de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la Universidad de Antioquia (Programa de Sostenibilidad y CIDEPRO) y a la Universidad Nacional sede Medellín.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parmar V, Jain S, Bisht K, Jain R, Taneja P. Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*. 1997; (46):591-673.
2. Fournet A, Barrios AA, Munoz V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1994; (41):19-37.

3. Fournet A, Ferreira ME, Arias AR, Fuentes S, Torres S. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal studies of *Peperomia galioides* (Piperaceae). *Phytomedicine*. 1996; (3): 271-5.
4. Mahiou V, Roblot F, Hocquemiller R, Cavé A, Barrios AA, Fournet A, et al. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. *J Nat Prod*. 1995; (58): 324-8.
5. Estevez Y, Castillo D, Tangoa Pisango M, Arevalo J, Rojas R, Alban J, et al. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *J Ethnopharmacol*. 2007; (114): 254-9.
6. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005; (366): 1561-77.
7. WHO. Leishmaniasis. Geneva: website World Health Organization [cited 10 Ago 2012]. Available at: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html
8. Olliaro P, Sundar S. Anthropometrically derived dosing and drug costing calculations for treating visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop Med Int Health*. 2009; (14): 88-92.
9. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother*. 2004; (10): 307-15.
10. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003; (19): 502-8.
11. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2008; (13): 894-901.
12. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007; (70): 461-77.
13. Morton LW, Caccettah RAA, Puddey IB, Croft KD. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; (27): 152-9.
14. Temple NJ. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*. 2000; (20): 449-59.
15. Wang S, Melnyk JP, Tsao R, Marcone MF. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Res Int*. 2011; (44): 14-22.
16. Agbor GA, Vinson JA, Oben JE, Ngogang JY. *In vitro* antioxidant activity of three Piper species. *J Herb Pharmacother*. 2007; (7): 49-64.
17. Diaz L, Muñoz D, Prieto R, Cuervo S, Gonzalez D. Antioxidant, antitubercular and cytotoxic activities of Piper imperial. *Molecules*. 2012; (17): 4142-57.
18. Rathee J, Patro B, Mula S, Gamre S, Chattopadhyay S. Antioxidant activity of Piper betel leaf extract and its constituents. *J Agric Food Chem*. 2006; (54): 9046-54.

19. Robledo S, Osorio E, Jaramillo L. *In vitro* and *in vivo* cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. *Antimic Agents Chemoth.* 2005; (49):1652-5.
20. Finney JD. *Probit Analysis*. 3rd ed. United Kingdom: Cambridge University Press, Cambridge; 1971.
21. Pulido SA, Muñoz DL, Restrepo AM, Mesa CV, Alzate JF, Vélez ID, et al. Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for the *in vitro* and *in vivo* screening of antileishmanial drugs. *Acta Trop.* 2012; (122):36-45.
22. Taylor VM, Muñoz DL, Cedeño DL, Vélez ID, Jones MA, Robledo SM. *Leishmania tarentolae*: utility as an *in vitro* model for screening of antileishmanial agents. *Exp Parasitol.* 2010; (126):471-5.
23. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RI. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2002; (50):3010-4.
24. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *J Anal Biochem.* 1996; (239):70-6.
25. Ferreira C, Soares DC, Barreto CB, Nascimento MT, Freire-de-Lima L, Delorenzi JC, et al. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. 2011; (72):2155-64.
26. Puertas M, Chabala L, Rojano B, Sáez J. Capacidad antioxidante *in vitro* de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Rev Cubana Plant Med.* 2009; (14):1-11.

Recibido: 17 de agosto de 2012.

Aprobado: 4 de enero de 2013.

Wilson Cardona Galeano. Instituto de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia. Teléf.: +57(4) 219 5653; Fax: +57(4) 233 0120. Correo electrónico: wcardona@matematicas.udea.edu.co; wcardonag@gmail.com