

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINALES PERUANAS: COMPENDIO DE 08 TRABAJOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES”

En 1996, en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica se inició una línea de investigación con el objetivo de evaluar la actividad antioxidante de las plantas medicinales peruanas, con énfasis en las que tienen habitat en el Departamento de Ica. Presentamos 08 trabajos correspondientes a dicha línea de investigación:

- 1.- **Artemio Chang, Silvia Klinar y Olga Sonia León.** Actividad antioxidante en extractos de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. “uña de gato”.
- 2.- **Artemio Chang Canales , Silvia Klinar Barbuza, y Jorge Chanllio Lavarello.** Evaluación de la actividad antioxidante de cinco plantas medicinales de Ica.
- 3.- **Artemio Chang C., Silvia Klinar B. y Santos Jaimes S.** Evaluación de la actividad antioxidante de *Polimnia sonchifolia* “yacon”.
- 4.- **Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L.** Evaluación de la Actividad Antioxidante en flores de *Tropaeolum majus* L. “mastuerzo” y *Sarothamnus scoparius* Wimmer “retama negra”
- 5.- **Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L.** Evaluación de la Actividad Antioxidante en extractos de *Urtica magellanica* Poir “ortiga”.
- 6.- **Silvia Klinar, Artemio Chang y Jorge Chanllío.** Evaluación de la actividad antioxidante de *Foeniculum vulgare* WILL. (hinojo).”
- 7.- **Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L.** Evaluación de la actividad antioxidante de *Lactuca sativa* L. (Lechuga)”
- 8.- **Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L.** Evaluación de la actividad antioxidante en extractos de hojas y flores de *Althea rosea* cav. (malvarrosa)

INTRODUCCIÓN

Los nuevos conceptos fisiológicos, farmacológicos y clínicos, han devenido en investigaciones que han demostrado el rol de las especies reactivas del oxígeno (EROs) que se generan como producto de nuestro metabolismo, en diferentes patologías. Como consecuencia, en los últimos años se actualizó el tema de los antioxidantes biológicos y se ha incrementado la investigación en búsqueda de nuevos antioxidantes, principalmente de origen natural. Considerando las perspectivas que, a la par de los nuevos descubrimientos de la acción de las EROs, se generarán requerimientos de nuevas fuentes de agentes o sustancias antioxidantes, en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga se ha implementado un programa de investigación que tiene como objetivo principal el de evaluar el potencial de la actividad antioxidante de la flora peruana, en especial de aquellas especies que se utilizan en la medicina tradicional y/o popular.

Realizamos la evaluación e la actividad antioxidante por un procedimiento "in vitro", que se fundamenta en la determinación de la capacidad de inhibición a las enzimas Polifenol Oxidasas (PPO), cuando estas actúan sobre el catecol oxidándolo a o-benzoquinona, la cual absorbe a 420 nm. Se establece una estimación cuantitativa, por comparación con un estándar de referencia (Vitamina C).

En ese marco, se han evaluado:

- Extracto hidroalcohólico de corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. "uña de gato"
- Extracto etanólico de hojas de *Ambrosia peruviana* Willd (Altamisa)
- Extracto etanólico de hojas de *Euphorbia hirta* (hierba de la golondrina)
- Extracto etanólico de hojas de *Pelargonium odoratissimum* (geranio)
- Extracto etanólico de planta entera de *Spilanthes beccabunga* (deflamadera)
- Extracto etanólico de flores de *Caesalpinia gilliesii* (uña de gato).
- Extracto acuoso de tubérculo y harina de tubérculo de *Polimnia sonchifolia* "yacón"
- Extracto hidroalcohólico de flores de *Tropaeolum majus* L. "mastuerzo"
- Extracto hidroalcohólico de flores de *Sarothamum scoparia* "retama"
- Extractos de diclorometano, etanol y agua, de las diferentes partes (hojas, flores y raíces) de: *Urtica magellanica* Poir "ortiga"
- Extractos de diclorometano, etanol y agua, de las partes aéreas de *Foeniculum vulgare* WILL. "hinojo".
- Extractos de etanol y agua, de las hojas de: *Lactuca sativa* L. "lechuga"
- Extractos de diclorometano, etanol y agua, de hojas y flores de: *Althea rosea* Cav. (malvarrosa)

En la evaluación de la actividad antioxidante se ha comprobado que:

- El extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. inhibe el 73% de la actividad de las enzimas PPO.
- El extracto etanólico de hojas de *Ambrosia peruviana* presenta actividad antioxidante 36% mayor que la vitamina C.
- El extracto etanólico de hojas de *Euphorbia hirta* L. presenta actividad antioxidante 245% mayor que la vitamina C.
- El extracto etanólico de hojas de *Pelargonium odoratissimum* presenta actividad antioxidante 218% mayor que la vitamina C.
- El extracto etanólico de planta entera de *Spilanthes beccabunga* tiene una actividad 18% menor que la Vitamina C.
- El extracto etanólico de flores de *Caesalpinia gilliesii* tiene 155% más potencia.
- El extracto acuoso de yacón fresco presenta una actividad antioxidante 122% mayor que la vitamina C. El extracto acuoso de harina de yacón presenta una actividad antioxidante 101.35% mayor que la vitamina C.
- El extracto hidroalcohólico de flores de *Tropaeolum majus* L. “mastuerzo” presenta una actividad antioxidante 67% mayor que la Vitamina C.
- El extracto hidroalcohólico de flores de *Sarothamus scoparia* “retama”, presenta una actividad antioxidante 13% menor que la Vitamina C
- El extracto acuoso de hojas de *Urtica magellanica* Poir “ortiga” presenta una actividad antioxidante 7% menor que la Vitamina C; el extracto acuoso de flores tiene una actividad antioxidante 14% mayor y el extracto etanólico de hojas presenta actividad antioxidante 17% mayor que la vitamina C.
- El extracto etanólico de *Foeniculum vulgare* “hinojo” presenta una actividad antioxidante 22% mayor que la Vitamina C.
- El extracto acuoso de hojas *Lactuca sativa* L. “lechuga”, presenta una actividad antioxidante 380% mayor; el extracto etanólico de hojas, presenta una actividad antioxidante 244% mayor.
- El extracto acuoso de hojas *Althea rosea* Cav. “malva real” presenta una actividad antioxidante 72 % mayor que la vitamina C. Los extractos etanólicos de hojas y flores y el extracto acuoso de flores presentan una actividad antioxidante muy semejante a la Vitamina C.

EXPERIMENTAL

MUESTRAS

Corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C.,
Hojas de *Ambrosia peruviana* Willd.,
Hojas de *Euphorbia hirta*,
Hojas de *Pelargonium odoratissimum*,
Planta entera de *Spilanthes beccabunga*,
Flores de *Caesalpinia gilliesii*,
Tubérculo y harina de tubérculo de *Polimnia sonchifolia*,
Flores de *Tropaeolum majus* L.,
Flores de *Sarothamus scoparia*,
Hojas, flores y raíces de *Urtica magellanica* Poir.,
Partes aéreas de *Foeniculum vulgare* WILL. ,
Hojas de: *Lactuca sativa* L.,
Hojas y flores de: *Althea rosea* Cav. (malvarrosa)

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante se evaluó mediante una técnica "In Vitro", que consiste en determinar la capacidad de los extractos para inhibir a las enzimas polifenoloxidasas (PPO).

Fundamento de la Técnica

El catecol en presencia de las enzimas polifenoloxidasas se oxida a o-benzoquinona. Cuando la oxidación ocurre en presencia de un inhibidor de las enzimas PPO, disminuye la cantidad de o-benzoquinona.

Descripción de la Técnica

El catecol se somete a la acción de las PPO, la o-benzoquinona formada se mide a 420 nm; esta lectura se considera el blanco. Se repite el ensayo agregando el extracto en evaluación, a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100 ug/mL).

Si se observa actividad antioxidante, el ensayo se repite con vitamina C (estándar de referencia), y se compara con la actividad antioxidante de la muestra.

PROCEDIMIENTO

Preparar las siguientes soluciones:

- a) Blanco : 1.7 mL de amortiguador
0.3 mL de catecol
- b) Muestra : 1.4 mL de amortiguador
0.3 mL de catecol
0.3 mL de solución del extracto
- c) Estándar : 1.4 mL de amortiguador
0.3 mL de catecol
0.3 mL de solución de vitamina C

A cada solución anterior, se le agrega 1 mL de la solución de PPO, e inmediatamente se procede a leer la absorbancia a 420 nm en el Espectrofotómetro.

PREPARACIÓN DEL AMORTIGUADOR

Se prepara una solución acuosa que contenga 20 mM de acetato de sodio y 20 mM de ácido acético, con un pH aproximado de 5.

PREPARACIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA (PPO)

Se licua pulpa de manzana con cantidad suficiente de amortiguador, el homogenizado se centrifuga a 4000 rpm durante 20 minutos; se separa el sobrenadante y se conserva refrigerado.

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO (CATECOL)

Preparar una solución 0,05 M de catecol con cantidad suficiente de amortiguador y conservar en refrigeración.

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR (VITAMINA C)

Preparar soluciones acuosas de vitamina C, a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE o-BENZOQUINONA

Los resultados son el promedio de 05 ensayos

INHIB. PROD. QUINONA

Nº	ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA						
			0 blanco	10 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml	75 ug/ml	100 ug/ml
1	Uncaria tomentosa	corteza	547	410	350	295	230	165
2	Ambrosia peruviana	hojas	335	315	303	285	260	235
3	Caesalpinea gilliesii	flores	145	126	116	103	96	89
4	Euphorbia hirta	hojas	254	198	183	158	131	104
5	Pelargonium odoratissimum	hojas	623	461	434	401	355	309
6	Spilanthes beccabunga	planta entera	246	231	227	222	219	214
	Vitamina C		308	302	290	275	260	235
7	Polimnia sonchifolia							
	Extracto acuoso	tubérculo	190		161	132	99	68
	Extracto acuoso	harina	184		161	137	111	86
	Vitamina C		192		168	144	117	91
8	Tropaelum majus L.	Flores	177	-	154	133	99	68
9	Sarothamus scoparia	Flores	124	-	100	91	81	72
	Vitamina C		132	-	109	98	87	73
10	Urtica magellanica							
	Ext. de diclorometano	Hojas	174		175	172	172	173
	Extracto etanólico	Hojas	198		191	184	177	169
	Extracto acuoso	Hojas	162		158	153	150	146

	Ext. de diclorometano	Flores	196		194	193	195	192
	Extracto etanólico	Flores	201		203	201	198	202
	Extracto acuoso	Flores	177		171	165	160	154
	Ext. de diclorometano	Raíces	188		188	186	187	184
	Extracto etanólico	Raíces	165		165	162	163	162
	Extracto acuoso	Raíces	169		174	170	168	167
	Vitamina C		185		179	169	164	158
11	Foeniculum vulgare							
	Extrac. diclorometano	Partes aéreas	223		224	222	225	220
	Extracto etanólico	Partes aéreas	276		252	225	203	182
	Extracto acuoso	Partes aéreas	233		231	233	234	230
	Vitamina C		244		221	203	189	176
12	Lactuca sativa							
	Extracto acuoso	Hojas	342		301	262	222	181
	Extracto etanólico	Hojas	358		327	298	270	241
	Vitamina C		349		341	332	325	317
13	Althea rosea Cav.							
	Extracto etanólico	Hojas	198		194	190	187	182
	Extracto acuoso	Hojas	194		187	181	173	165
	Extracto etanólico	Flores	201		197	193	188	184
	Extracto acuoso	Flores	197		193	189	186	182
	Vitamina C		205		201	197	192	187

DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN A LAS ENZIMAS PPO

Con los resultados experimentales se procesan los datos para establecer el porcentaje de inhibición, de los extractos, a las enzimas polifenoloxidasas. Se aplica la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \Delta A \times 100 / A_b$$

Donde: ΔA = absorbancia del blanco – absorbancia de la muestra

A_b = absorbancia del blanco

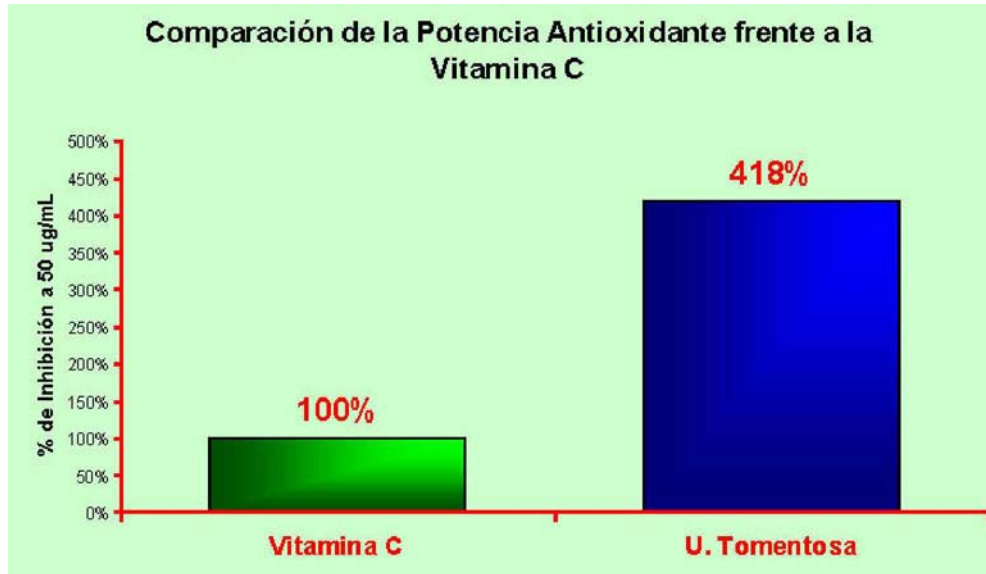
Nº	Muestra	% DE INHIBICIÓN A LAS PPO			
		25 ug/mL	50 ug/mL	75 ug/mL	100 ug/mL
1	Uncaria tomentosa	36	46	58	70
2	Ambrosia peruviana	10	15	22	30
3	Caesalpineia gilliesii	19	28	33	38
4	Euphorbia hirta	28	38	48	59
5	Pelargonium odoratissimum	30	35	43	50
6	Spilanthes beccabunga	7	9	11	13
	Vitamina C	6	11	16	24
7	Polimnia sonchifolia				
	Extracto acuoso	15.26	30.53	47.89	64.21
	Extracto acuoso	13.83	27.69	43.43	58.23
	Vitamina C	6.87	13.75	21.57	28.92
8	Tropaelum majus L.	15.26	30.53	47.89	64.21
9	Sarothamus scoparia	7.21	15.74	25.00	33.33
	Vitamina C	10.66	19.87	28.69	40.16
10	Urtica magellanica				
	Extracto etanólico de hojas	3.54	7.07	10.61	14.65
	Extracto acuoso de hojas	2.47	5.56	7.41	9.88

	Extracto acuoso de flores	3.39	6.78	9.61	13
	Vitamina C	3.25	5.95	9.19	11.89
11	Foeniculum vulgare				
	Extrac. diclorometano	-0.5	0.5	-0.9	1.34
	Extracto etanólico	8.7	18.5	26.5	34
	Extracto acuoso	0.85	0	-0.4	1.28
	Vitamina C	9.42	16.8	22.5	27.8
12	Lactuca sativa				
	Extracto acuoso	11.99	23.39	35.09	47.08
	Extracto etanólico	8.66	16.76	24.58	32.68
	Vitamina C	2.29	4.87	6.88	9.17
13	Althea rosea Cav.				
	Extracto etanólico	2.02	4.04	5.56	8.08
	Extracto acuoso	3.61	6.70	10.82	14.95
	Extracto etanólico	1.99	3.98	6.47	8.46
	Extracto acuoso	2.03	4.06	5.58	7.61
	Vitamina C	1.95	3.90	6.34	8.78

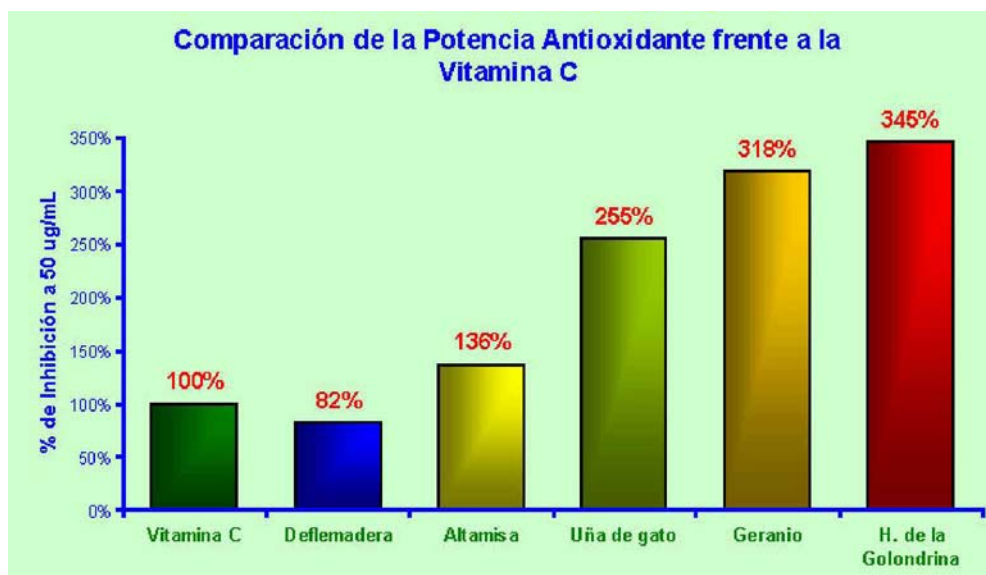
INTERPRETACION DE RESULTADOS

Al comparar los porcentajes de inhibición de las muestras con la Vitamina C a la concentración de 50 ug/ml, se determina la actividad de dichos extractos frente al estándar.

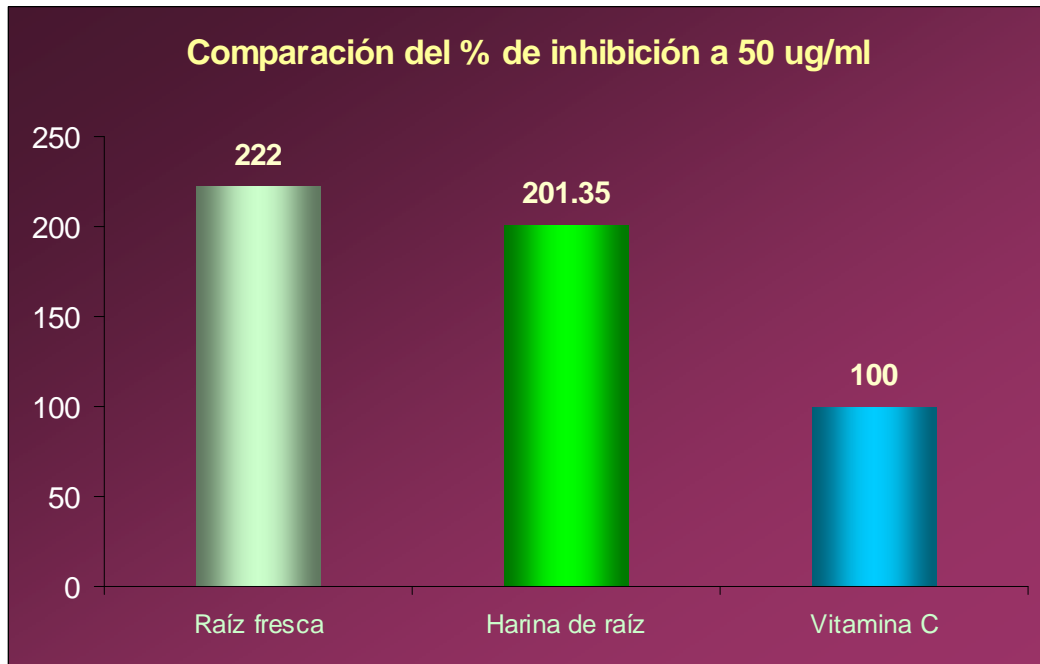
Extracto etanólico de corteza de Uncaria tomentosa (Willd) D.C. “uña de gato”



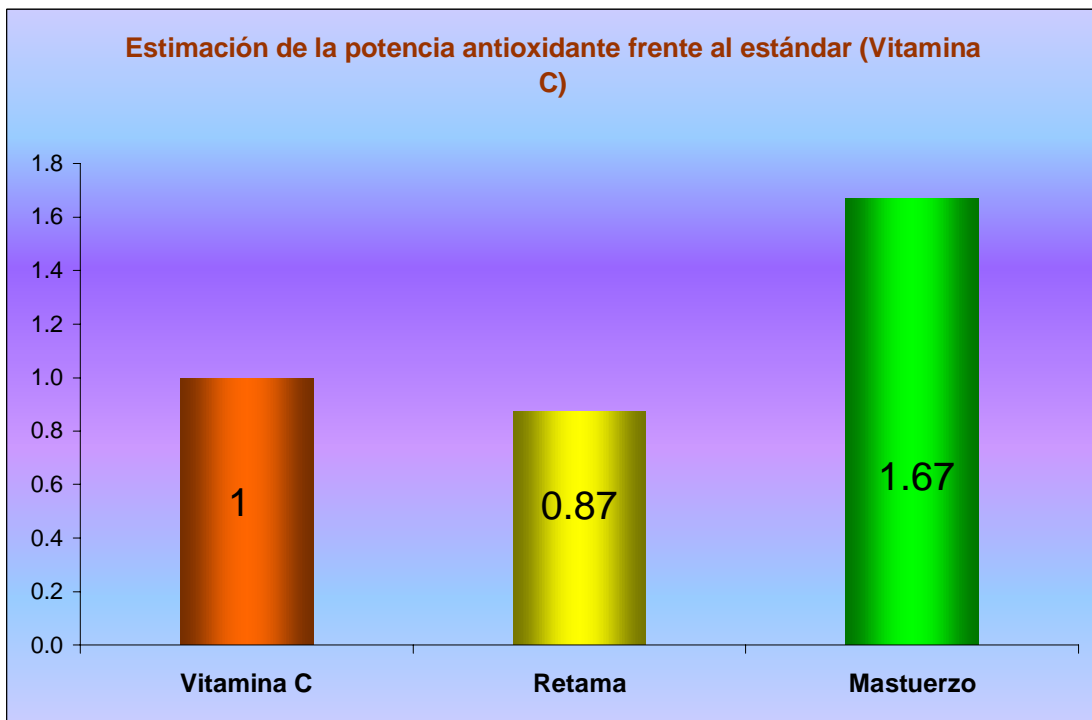
Extracto etanólico de hojas de Ambrosia peruviana Willd (Altamisa), extracto etanólico de hojas de Euphorbia hirta (hierba de la golondrina), extracto etanólico de hojas de Pelargonium odoratissimum (geranio), extracto etanólico de planta entera de Spilanthes beccabunga (deflamadera), extracto etanólico de flores de Caesalpinia gilliesii (uña de gato).



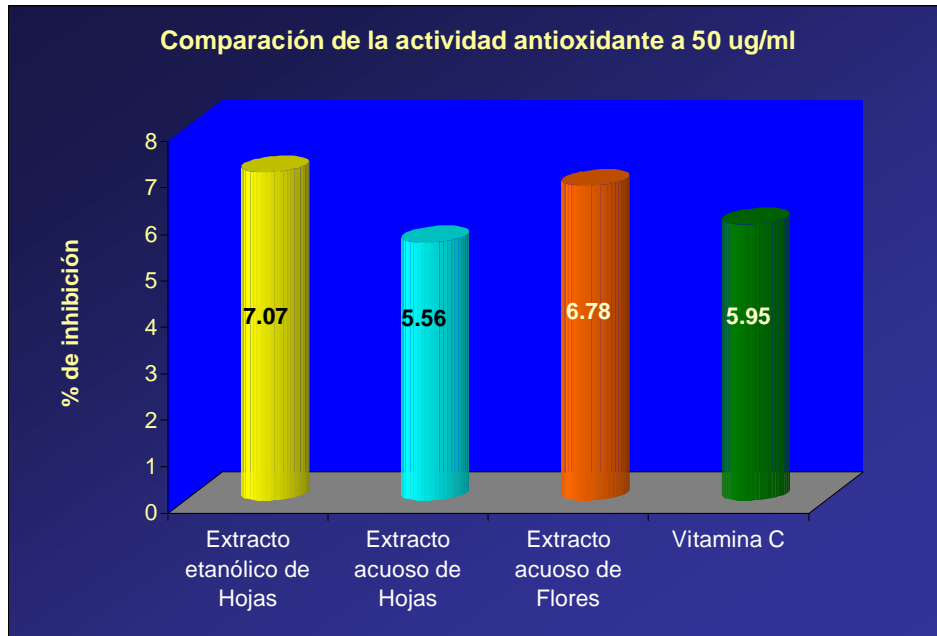
Extractos acuosos de tubérculo de Polimnia sonchifolia “yacón” y de harina de tubérculo de Polimnia sonchifolia “yacón”



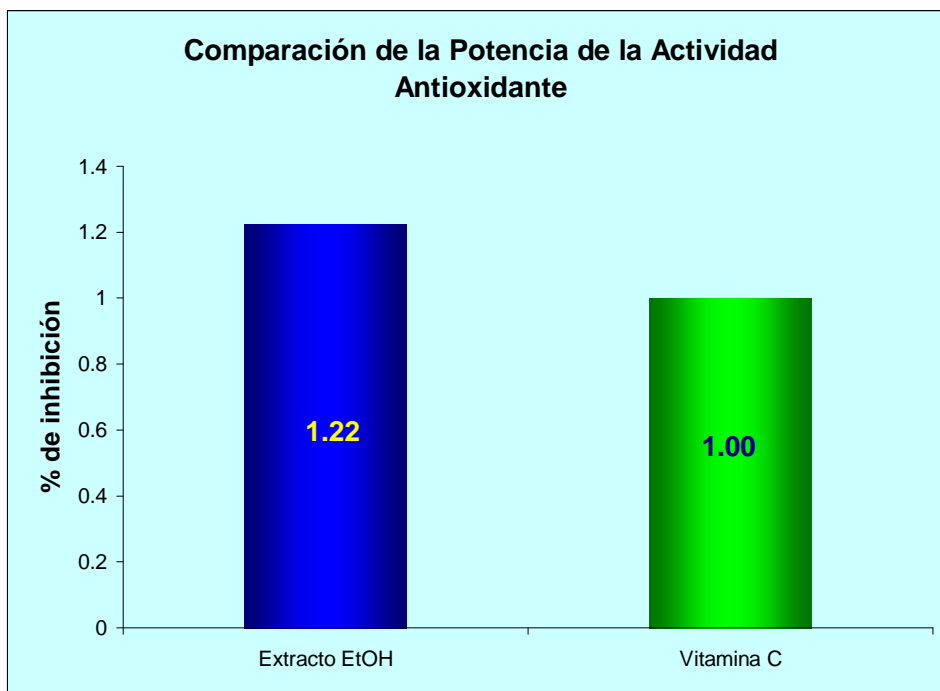
Extracto hidroalcohólico de flores de Tropaelum majus L. “mastuerzo” y extracto hidroalcohólico de flores de Sarothamus scoparia “retama”



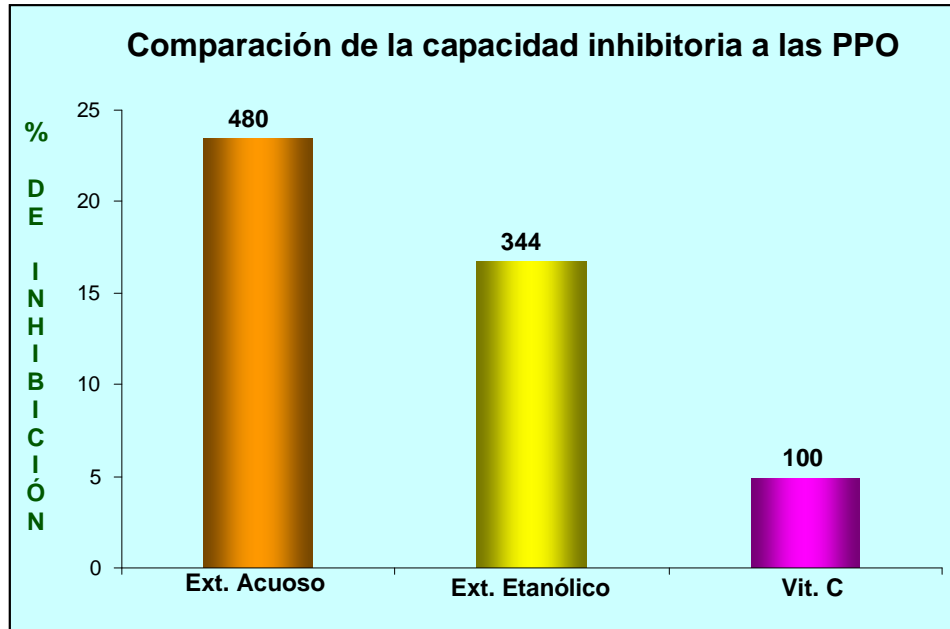
Extractos de diclorometano, etanol y agua, de las diferentes partes (hojas, flores y raíces) de: *Urtica magellanica* Poir “ortiga”



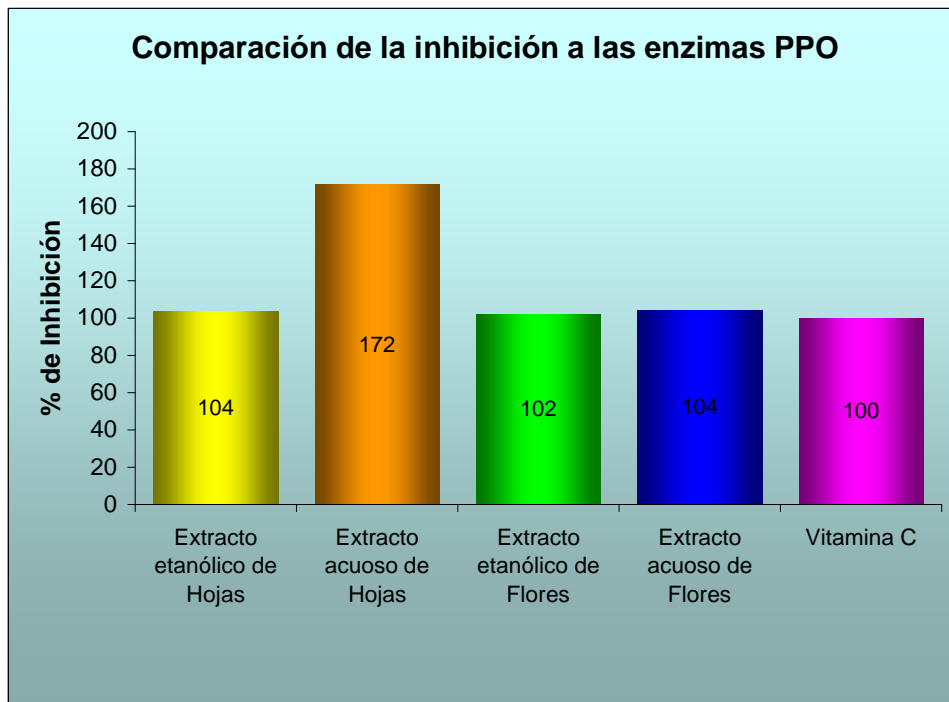
Extractos etanólico de las partes aéreas de *Foeniculum vulgare* WILL. “hinojo”.



Extractos de etanol y agua, de las hojas de: *Lactuca sativa* L. "lechuga"



Extractos de diclorometano, etanol y agua, de hojas y flores de: *Althea rosea* Cav. (malvarrosa)



CONCLUSIONES

Uncaria tomentosa (Willd) D.C. “uña de gato”

- El extracto hidroalcohólico de corteza de *Uncaria tomentosa* muestra una apreciable inhibición, en la autooxidación espontánea que involucra procesos enzimáticos (73% de inhibición),

Ambrosia peruviana Willd (Altamisa), Euphorbia hirta (hierba de la golondrina), Pelargonium odoratissimum (geranio), Spilanthes beccabunga (deflamadera) y Caesalpinia gilliesii (uña de gato).

- En la evaluación de los extractos etanólicos de hojas de *A. peruviana*, flores de *C. gilliesii*, hojas de *E. hirta*, hojas de *P. odoratissimum* y *S. beccabunga*, todos los resultados fueron positivos.
- En la comparación de la actividad antioxidante, el extracto etanólico de toda la planta de *Spilanthes beccabunga* D.C. “deflemadera”, dio una actividad menor a la Vitamina C.
- En la comparación de la actividad antioxidante, cuadro (04) extractos etanólicos resultaron más potentes que la vitamina C; de la siguiente manera:

§ Vitamina C	100%
§ Hojas de <i>A. peruviana</i>	136%
§ Flores de <i>C. gilliesii</i>	255%
§ Hojas de <i>P. odoratissimum</i>	318%
§ Hojas de <i>E. hirta</i>	346%

Polimnia sonchifolia “yacón”

- Tanto la raíz de yacón fresco (*Polimnia sinchifolia*), como la harina obtenida del mismo, presentan actividad antioxidante.
- La potencia de la actividad antioxidante se determinó por comparación con la actividad antioxidante de la Vitamina C (patrón de referencia); dando los siguientes resultados:
- Raíz de yacón fresco (*Polimnia sinchifolia*): 122% más actividad antioxidante que la vitamina C
- Harina de yacón (*Polimnia sinchifolia*): 101.35% más actividad antioxidante que la vitamina C

- Las diferencias de la actividad antioxidante, entre el extracto fresco de yacón y la harina, no son significativas si consideramos la diferencia que presentan frente a la vitamina C.

Tropaelum majus L. “mastuerzo” y Sarothamus scoparia “retama”

- El extracto hidroalcohólico de flores de *Tropaelum majus* L. “mastuerzo” presenta una actividad antioxidante de 1.67 veces mayor que la Vitamina C.
- El extracto hidroalcohólico de flores de *Sarothamus scoparia* “retama”, presenta una actividad antioxidante menor que la Vitamina C (0.87 veces)

Urtica magellanica Poir “ortiga”

- Los extractos etanólico y acuoso de hojas y acuoso de flores de *Urtica magellanica* Poir (*ortiga*) muestran actividad antioxidante en el método de inhibición de las enzimas PPO.
- En la estimación cuantitativa de la actividad antioxidante detectada se observó que:
 - El extracto etanólico de hojas de *Urtica magellanica* Poir, presenta una actividad antioxidante que es directamente proporcional a la concentración, y la progresión lineal presenta un $R^2 = 0.9992$. Al compararse con la Vitamina C, mostró una actividad antioxidante 19% mayor. Es el extracto de mayor actividad antioxidante de la especie estudiada.
 - El extracto acuoso de hojas de *Urtica magellanica* Poir, presenta una actividad antioxidante que es directamente proporcional a la concentración, y la progresión lineal presenta un $R^2 = 0.995$. Al compararse con la Vitamina C, mostró una actividad antioxidante 7% menor.
 - El extracto acuoso de flores de *Urtica magellanica* Poir, presenta una actividad antioxidante que es directamente proporcional a la concentración, y la progresión lineal presenta un $R^2 = 0.9991$. Al compararse con la Vitamina C, mostró una actividad antioxidante 14% mayor.

Foeniculum vulgare WILL. “hinojo”.

- Los extractos de diclorometano y acuoso, obtenidos de las partes aéreas de *Foeniculum vulgare* WILL. (*hinojo*) no presentan actividad antioxidante en el método de inhibición de las enzimas PPO.
- El extracto etanólico, obtenidos de las partes aéreas de *Foeniculum vulgare* WILL. (*hinojo*), presenta actividad antioxidante en el método de inhibición de las enzimas PPO.
- En la estimación cuantitativa de la actividad antioxidante detectada se observó que:

- El extracto etanólico presenta una actividad antioxidante que es directamente proporcional a la concentración, y la progresión lineal presenta un $R^2 = 0.9978$.
- Al compararse con el estándar, mostró una actividad antioxidante 22% mayor que la Vitamina C.

Lactuca sativa L. “lechuga”

- Los extractos etanólico y acuoso de hojas de Lactuca Sativa L. “lechuga”, muestran actividad antioxidante en el método de inhibición de las enzimas PPO.
- En la estimación cuantitativa de la actividad antioxidante detectada se observó que:
 - § El extracto acuoso de hojas de Lactuca Sativa L. “lechuga”, presenta una actividad antioxidante que es directamente proporcional a la concentración, y la progresión lineal presenta un $R^2 = 0.9999$. Al compararse con la Vitamina C, mostró una actividad antioxidante 380% mayor. Es el extracto de mayor actividad antioxidante de la especie estudiada.
 - § El extracto etanólico de hojas de Lactuca Sativa L. “lechuga”, presenta una actividad antioxidante que es directamente proporcional a la concentración, y la progresión lineal presenta un $R^2 = 0.9997$. Al compararse con la Vitamina C, mostró una actividad antioxidante 244% mayor.

Althea rosea Cav. (malvarrosa)

- El extracto acuoso de hojas de Althea rosea Cav. “malva real”, los extractos etanólicos de hojas y flores y el extracto acuoso de flores presentan una actividad antioxidante.
- El extracto acuoso de hojas de Althea rosea Cav. “malva real” presenta una actividad antioxidante 72% mayor que la vitamina C.
- El extracto etanólico de hojas de Althea rosea Cav. “malva real” presenta una actividad antioxidante muy similar a la Vitamina C, siendo ligeramente superior por 4%.
- El extracto etanólico de flores de Althea rosea Cav. “malva real” presenta una actividad antioxidante muy similar a la Vitamina C, siendo ligeramente superior por 2%.
- El extracto acuoso de flores de Althea rosea Cav. “malva real” presenta una actividad antioxidante muy similar a la Vitamina C, siendo ligeramente superior por 4%.

REFERENCIAS

1. Artemio Chang, Silvia Klinar y Olga Sonia León. Actividad antioxidante en extractos de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. "uña de gato".
2. Artemio Chang Canales, Silvia Klinar Barbuza, y Jorge Chanllio Lavarello. Evaluación de la actividad antioxidante de cinco plantas medicinales de Ica.
3. Artemio Chang C., Silvia Klinar B. y Santos Jaimes S. Evaluación de la actividad antioxidante de *Polimnia sonchifolia* "yacon".
4. Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L. Evaluación de la Actividad Antioxidante en flores de *Tropaeolum majus* L. "mastuerzo" y *Sarothamnus scoparius* Wimmer "retama negra"
5. Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L. Evaluación de la Actividad Antioxidante en extractos de *Urtica magellanica* Poir "ortiga".
6. Silvia Klinar, Artemio Chang y Jorge Chanllío. Evaluación de la actividad antioxidante de *Foeniculum vulgare* WILL. (hinojo)."
7. Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L. Evaluación de la actividad antioxidante de *Lactuca sativa* L. (Lechuga)"
8. Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L. Evaluación de la actividad antioxidante en extractos de hojas y flores de *Althea rosea* cav. (malvarrosa)
9. Murga Z. Gladys (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
10. Olaechea G. Aela et al (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico.
11. Alarcón H. Jessica et al (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
12. Lara Paula (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
13. Peña S. Carmen (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
14. Condeña R. Anlly y Ludeña C, Sonia (1999). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
15. Acuahe A. Mirian et al (1999). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
16. Cueto Ch. Christian (2000). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
17. Mirian Acuahe, Artemio Chang y Silvia Klinar (2000) Reporte de la evaluación de la actividad antioxidante de plantas medicinales de Ica. Congreso Internacional Fito 2000.
18. Artemio Chang y Silvia Klinar. Fitofarmacopea Tradicional de Ica. (En prensa)
19. Calderón Perseverando (1987) Plantas Terapéuticas de Ica. Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UNICA
20. Soukoup J. (1970) Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana. Colegio Salesiano. Lima – Perú.
21. Font Quer P. (1978) Botánica pintoresca. Sopena. España.
22. Gamboa Aboado Raúl. Revista Médica, Vol. 2 – 14 – 15, 86 – 88.