

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS AGUAS
RESIDUALES DE LA INDUSTRIA PAPELERA (LICORES NEGROS) EN
HOMOGENATOS DE RATAS WISTAR (*Rattus rattus*).**

www.bdigital.ula.ve

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADA
EN BIOLOGIA.

REALIZADO POR LA BACHILLER ELIZABETH MARIANA PEREZ PEREZ

TUTOR: ANTONIO RODRIGUEZ MALAVER.
LAB. DE BIOQUIMICA ADAPTATIVA
(FACULTAD DE MEDICINA)

Mérida, Septiembre del 2002.

INDICE GENERAL

Agradecimientos.....	VI
Resumen.....	VII
Abstrac.....	VIII
Introducción.....	1
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	10
Materiales y Métodos	
I. Estudio de la Capacidad Antioxidante del Licor Negro y los Sistemas Inductores de la Peroxidación Lipídica.	
I.1. Método del Ácido Tíobarbitúrico (TBA).....	12
I.2. Método de FOX.....	14
II. Realización de la Curva de Concentración del Licor Negro.....	17
III. Realización de la Curva de Curso Temporal.....	18
IV. Caracterización Parcial de las muestras de Licor Negro que presentaron Capacidad Antioxidante.	
IV.1. Precipitación de la Lignina y su Caracterización Parcial.....	18
IV.2. Determinación del Porcentaje de Peso Seco.....	19
IV.3. Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos.....	20
IV.4. Espectro UV/Vis.....	22
V. Comparación de la Actividad Antioxidante del Licor Negro con la de Otros Antioxidantes Naturales.....	23
VI. Comparación de la Actividad Antioxidante del Licor Negro con Bebidas de Capacidad Antioxidante conocida.....	23
VII. Estudio de la Capacidad Antioxidante del Licor Negro sobre el Radical Hidroxilo.....	23
VIII. Estudio de la Capacidad Antioxidantes del Licor Negro sobre el Anión Superóxido.....	25
IX. Estudio de la Capacidad Antioxidante del Licor Negro sobre otros sistemas generadores de Radicales Libres.....	26
X. Determinación de Proteínas.....	26
XI. Análisis Estadístico.....	28

Resultados y Discusión

I. Estudio de la Capacidad Antioxidante del Licor Negro

I.1. Generación de MDA y HPLs.....29

I.2. Estudio del Efecto del Licor Negro y pH Alcalino.....37

II. Curva de concentración de Licor Negro.....42

III. Curva de Curso Temporal.....46

IV. Caracterización Parcial de las Muestras de Licor Negro que presentaron Capacidad Antioxidante

IV.1. Determinación del Porcentaje de Peso Sólido.....55

IV.2. Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos.....55

IV.3. Espectros UV/Vis de las Muestras de Licor Negro y Lignina Precipitada.....56

V. Comparación de la Actividad Antioxidante del Licor Negro con la de Otros Antioxidantes Naturales.....59

VI. Comparación de la Actividad Antioxidante del Licor Negro con Bebidas de capacidad antioxidante conocida.....65

VII. Estudio de la Capacidad Antioxidante del Licor negro sobre el Radical Hidroxilo.....70

VIII. Estudio de la Capacidad Antioxidante del Licor Negro sobre el Anión Superóxido...70

IX. Estudio de la Capacidad Antioxidante del Licor Negro en otros Sistemas Generadores de Radicales Libres.....73

Conclusiones.....78

Recomendaciones.....79

Bibliografía.....80

RESUMEN

Hoy en día se sabe que la industria de la pulpa y el papel es una de las más contaminantes, no solo por la gran cantidad de desechos que produce, sino por su gran variedad. Entre los desechos de la industria papelera se encuentra un compuesto llamado Licor Negro, nombre que recibe gracias a su coloración oscura, que tiene la capacidad de aumentar la demanda bioquímica de oxígeno y la demanda química de oxígeno en el agua, y es altamente rico en lignina. La Lignina es un complejo aromático del que existen muchos polímeros estructurales y la cual realiza importantes funciones que son esenciales para la vida de las plantas.

Desde el año 1968 muchos investigadores han estudiado la capacidad antioxidante de la lignina extraída de diferentes fuentes vegetales, encontrando que además de ser antioxidantes, las diferentes ligninas poseen acción antiviral y antimicrobiana. A partir de estos primeros estudios con lignina, muchos investigadores se han dedicado a estudiar la capacidad de otros compuestos naturales y sintéticos, hallando que en muchos casos estos compuestos pueden actuar como antioxidantes o prooxidantes dependiendo de las condiciones del medio de incubación que se está utilizando.

La peroxidación lipídica es un proceso que se ha asociado a múltiples patologías humanas. En este proceso ocurre la generación de hidroperóxidos lipídicos y malonildialdehído a través de una serie de reacciones que involucran oxidaciones sucesivas de los ácidos grasos polinsaturados. Este proceso afecta de forma notable la integridad de la membrana, la fluidez y el transporte de iones a través de la misma. De allí que la investigación de antioxidantes que puedan disminuir o evitar este fenómeno es de vital importancia.

En el presente trabajo se desea estudiar la actividad antioxidante del Licor Negro usando como fuente de radicales libres el proceso de peroxidación lipídica. Además, se desea comparar esta capacidad antioxidante con otros antioxidantes naturales como Vitamina E, Vitamina C, Melatonina, Quercitina, Té negro, Té verde, Café y Vino Tinto; y con compuestos sintéticos de la Lignina. Posteriormente, es de interés estudiar el efecto del Licor Negro sobre la acción de otros radicales libres (anión superóxido y radical hidróxilo). Por último, se usaran otros sistemas generadores de radicales para estudiar el efecto antioxidante de las muestras de Licor Negro.

ABSTRAC.

Currently, it is well known that the industry of pulp and paper is one of the most contaminant only for its quantity of waste materials but also for its large variety. Among waste materials from this industry, there is a waste water called Black Liquor, which receives this name due to its dark coloration, it has the capacity of arising biochemistry oxygen demand and the chemistry oxygen demand of water, and is very rich in lignin. Lignin is an aromatic compound that has many structural polymers which do important functions that are essentials for the plant development.

Since 1968 many researchers have studied the antioxidant capacity of the lignin extracted from different vegetal sources, finding that it has not only antioxidant capacity but also action against virus and bacteria. Therefore, many researchers have studied the antioxidant capacity of other natural and synthetic compounds, and found that in many cases those compounds can act like antioxidants or prooxidants depending on the conditions of the incubation medium that are used.

Lipid peroxidation is a process associated with a variety of human pathologies. In this process, occurred the generation of lipid hydroperoxides and malondialdehyde (MDA) by a sequence of reactions that involve successive oxidations of polyunsaturated fatty acids. This process affects in a very important way the integrity of the membrane, its fluidity, and the transport of ions forward the membrane. Thus, the investigation of antioxidants that can diminish or void this phenomenon is very important.

The aim of this investigation was study the antioxidant capacity of the Black Liquor using as a means of free radicals the process of lipid peroxidation. Moreover, it will be compared this antioxidant capacity with other natural compounds such as Vitamin E, Vitamin C, Melatonin, Quercetin, Black tea, Green Tea, Coffee, and Red Wine, and with other synthetic compounds of lignin. Afterwards, it is very interesting to study the effect of the Black Liquor on the action of other free radicals (superoxide anion and hydroxyl radical). In the last part, it will be used other systems that can generate free radicals to examine the antioxidant effect of the Black Liquor on those systems.

INTRODUCCIÓN.

Los radicales Libres son definidos como cualquier especie química capaz de existir con por lo menos un electrón desapareado. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son radicales libres asociados con el átomo de oxígeno o con sus equivalentes y tienen una mayor reactividad con otras moléculas que el oxígeno molecular. Las ROS usualmente comprenden las siguientes especies: i) anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ii) peróxido de hidrógeno (H_2O_2), iii) radical hidroxilo ($\bullet OH$), y iv) oxígeno singlete (1O_2), los cuales constituyen los radicales libres de mayor importancia biológica. Las especies H_2O_2 y 1O_2 no son radicales libres por definición, pero se comportan como tales, ya que pueden generar radicales libres y ser más reactivos que el O_2 , respectivamente. Otros radicales libres biológicamente importantes son los hidroperóxidos lipídicos (ROOH), radical peroxil lípido (ROO \bullet), y radical alcoxil lípido (RO \bullet), los cuales están asociados con la membrana lipídica; el óxido nítrico (NO), una especie reactiva del nitrógeno; radical tiol, el cual tiene un electrón desapareado en un átomo de azufre; y el radical carbono, el cual puede ser generado durante el metabolismo del CCl_4 en los microsomas de hepatocitos (Hogg, 1998; Toyokuni, 1999).

Está establecido que las ROS están involucrados en una gran variedad de fenómenos biológicos tales como mutaciones, carcinogénesis, envejecimiento, arteriosclerosis, radiación o exposición a emisión ultravioleta, inflamación, isquemia–reperfusión, diabetes mellitus, y enfermedades neurodegenerativas (Toyokuni, 1999; Villa–Caballero *et al*, 1999). Además, las ROS son producidas en toda célula en la que se use oxígeno como mayor fuente de energía, dentro o fuera de la célula, induciendo estrés oxidativo si los mecanismo de control y

eliminación de las ROS no están funcionando de manera óptima (Toyokuni, 1999). Se define como estrés oxidativo a la pérdida del equilibrio entre la producción de radicales libres o ROS y los sistemas de defensa antioxidante, y que tiene efectos deletéreos sobre los carbohidratos, lípidos y proteínas, el cual se sabe que juega un papel primordial en la mayoría de las patologías degenerativas (Hogg, 1998; Villa–Caballero *et al*, 1999). Debido a la gran variedad de patologías en las que se encuentran involucradas las ROS, se ha convertido en una necesidad de primera clase la búsqueda de antioxidantes que puedan atenuar los efectos de las ROS en el organismo.

Uno de los estudiados hasta la fecha es la Lignina. La palabra lignina proviene del término latino *lignum* que significa madera; así, a las plantas que contiene una gran cantidad de ligninas se les denomina leñosas. La lignina se caracteriza por ser un complejo aromático (no carbohidratado) del que existen mucho polímeros estructurales (ligninas), es una macromolécula con un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos. Después de la celulosa, la lignina es el polímero orgánico más abundante en el mundo vegetal y es la única fibra no polisacárida que se conoce. La lignina realiza múltiples funciones que son esenciales para la vida de las plantas, entre ellas: transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos; proporciona rigidez a la pared celular y actúa como puente de unión entre las células de la madera, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones, flexiones y ataques de microorganismos (Sarkanen y Ludwig, 1971; Argyropoulus y Menachem, 1997; Lanzalunga y Bietti, 2000).

Recientemente, se ha demostrado que la lignina es un secuestrador de radicales libres, en especial del radical anión superóxido producido por la xantina oxidasa (Lu *et al*, 1998). Yamafuyi y Murakami (1968) aislaron un tipo especial de ligninas de plantas de bambú y demostraron que tenían un gran potencial antitumoral, proponiendo como mecanismo de acción de la lignina la inhibición de la replicación del DNA de las células tumorales. Posteriormente, Sakagami *et al* (1995) aislaron varias sustancias relacionadas con ligninas y encontraron que estas inhibían el crecimiento de tumores sólidos transplantados en ratones. Estas sustancias antitumorales también poseían actividad antiviral en contra del VIH, el virus del herpes simplex y el virus de la influenza.

Después de estas investigaciones pioneras, han sido muchos los investigadores que se han dedicado a estudiar la capacidad antioxidante y otras utilidades de los diferentes polímeros de lignina (Nagasawa *et al*, 1992; Sakagami *et al*, 1995; Satoh *et al*, 1996; Ferguson y Harris, 1996; Dizhbite *et al*, 1999; Fernández *et al*, 2002), así como de otras sustancias químicas de las cuales se sospecha capacidad antioxidante como vinos, licores, frutas como el Kiwi y la manzana, té negro y té verde, vitaminas (vitamina E, vitamina C), extractos de bacterias, licopeno, β -carotenos y sustancias sintéticas (Lu y Liu, 1991; Heinonen *et al*, 1998; Slamenova *et al*, 1999; Jiang *et al*, 2001; Motohashi *et al*, 2001; Fernández y Urizar, 2001). Cabe destacar que se conoce como antioxidante a cualquier sustancia que en bajas concentraciones disminuye o inhibe el daño oxidativo de una molécula blanco (Gutteridge y Halliwell, 1994).

Hasta la fecha se ha comprobado la capacidad antioxidante de una gran variedad de moléculas naturales, entre ellas la Vitamina E, que se encuentra en aceites vegetales, huevos, pescado, vegetales verdes y granos, y que se le ha relacionado con la protección en contra de enfermedades cardiovasculares, cáncer, Alzheimer, Parkinson e infecciones inmunes (Prior, 2000); la Quercitina, a la cual se le ha atribuido potencial antitumoral, antiinflamatorio y antioxidante (Huang y Ferraro, 1992, Middleton y Kandaswami, 1992; Tournaire *et al*, 1993; Saija *et al*, 1995; Hertog y Hollman, 1996); Vitamina C, la cual puede actuar como antioxidante en los compartimentos extracelulares inhibiendo la peroxidación lipídica iniciada por el radical peróxilo o cualquier otra sustancia química (Frei *et al*, 1989; Bernhard *et al*, 1998); la Melatonina, cuya pérdida a lo largo del procesos de envejecimiento impide el secuestro de radicales libres y por ende la protección del organismo (Poeggeler *et al*, 1993; Reiter, *et al*, 1998).

www.bdigital.ula.ve

Así, también ha sido posible comprobar la capacidad antioxidante de bebidas como el vino tinto, cuya fracción polifenólica incluye ácidos fenólicos y flavonoides que poseen capacidad antioxidante (Salah *et al*, 1995; Soleas *et al*, 1997; Horowitz, 2002); Té Negro, el cual esta compuesto en un 48% de flavonoides con capacidad antioxidante (Hertog y Hollman, 1996; Kuresh y James, 2001); el Té Verde, que posee catequinas con un poder antioxidante 100 veces mayor al de la Vitamina C (Horowitz, 2002); y café, con polifenoles antioxidantes (Horowitz, 2002; Kuresh y James, 2001).

Por el contrario, Bagnati *et al* (1999) encontraron un efecto pro-oxidante en el proceso de oxidación de lipoproteínas de baja densidad inducido por cobre en presencia de

ácido úrico, el cual es un antioxidante que se encuentra en los fluidos humanos como plasma y saliva, agregado durante la fase inhibitoria o fase lag y durante la progresión de la oxidación. Este efecto pro-oxidante del ácido úrico fue registrado por un aumento en la formación de dienos conjugados, peróxidos lipídicos, de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico y un incremento en la carga negativa de la lipoproteína. Esto hace pensar que dependiendo de las condiciones del medio de incubación, para un determinado compuesto, se puede obtener un efecto antioxidante o pro-oxidante. Se puede definir como prooxidante a una sustancia que estimula el daño oxidativo de una molécula blanco (Gutteridge y Halliwell, 1994).

La mayor fuente de lignina que se conoce hasta la fecha es el Licor Negro, proveniente del proceso de pulpeo, el cual es objeto de estudio en esta investigación. Los mejores estimados indican que sólo en los Estados Unidos de Norteamérica se generan 26 millones de toneladas de ligninas al año en la industria papelera (Sarkanen, 1997). La industria de la pulpa y papel es una de las más contaminantes, debido no solo a la gran cantidad de desecho que produce, sino a la variedad de los mismos, entre los que se tienen las partículas de madera que se generan en los depósitos de las mismas, sustancias que aumentan la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), compuestos cromóforos que afectan la entrada de la luz solar dentro del agua, compuestos aromáticos cancerígenos, compuestos orgánicos volátiles que se liberan a la atmósfera, enormes cantidades de Licor Negro que aumentan la DBO y la demanda química de oxígeno (DQO) en las aguas, entre muchos otros (Sarkanen, 1997). Debido a esto ha surgido la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que permitan disminuir los niveles de producción de contaminantes; razón por la

cual se ha intensificado la investigación para buscar alternativas para hacer a la producción industrial más amigable con el ambiente.

El nombre de Licor Negro es debido a su coloración oscura y esta compuesto por una parte de materia orgánica, producto de la extracción de la lignina, y por la otra inorgánica, principalmente de NaOH y Na₂S. El Licor Negro es usualmente quemado o recobrado químicamente, pero actualmente se están investigando procesos que permitirían recuperarlo disminuyendo el daño que este causa a la biosfera (McGraw, 2002)

La capacidad antioxidante del Licor Negro se va a estudiar sobre un proceso fisiológico conocido como la peroxidación lipídica, la cual consiste en la oxidación de los lípidos de la membrana por medio de una serie de reacciones de autooxidación cuya sucesión no se conoce, dando como resultado la formación de malondialdehído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (Esquema 1) (Slater, 1984, Bernhard *et al*, 1998). La sucesión de la reacción comienza por la sustracción de un átomo de hidrógeno de una molécula de ácido graso insaturado, lo cual resulta en la formación de un radical libre relativamente estable llamado alquilo (R) que en la presencia de oxígeno inicia una cadena de reacciones autooxidativas. Uno de los primeros pasos en esta secuencia es la reestructuración de los dobles enlaces dentro de la molécula lipídica. La reacción procederá a lo largo de una o dos sendas, resultando en la formación de endoperóxidos lipídicos y/o hidroperóxidos lipídicos (HPLs). Una mayor degradación de los endoperóxidos resulta en la formación de un producto final relativamente estable llamado Malondialdehído (MDA) (Slater, 1984).

La peroxidación lipídica de la membrana se ha propuesto como un mecanismo importante del daño celular. Este proceso puede alterar las propiedades intrínsecas de la membrana debido a cambios físico-químicos de los lípidos oxidados o al entrecruzamiento y polimerización de componentes de la membrana afectados por el Malondialdehído (MDA) (Hocstein y Jain, 1981). La peroxidación lipídica puede contribuir indirectamente con otros efectos dañinos de la isquemia/reperfusión, porque aumenta la susceptibilidad de los fosfolípidos a la degradación por las fosfolipasas (Weglicki *et al*, 1984), y la permeabilidad de la membrana para el calcio (Tskos-Kunh *et al*, 1986). Este proceso es uno de los efectos más dañinos del radical hidroxilo y altera tanto la fluidez de la membrana como una gran variedad de funciones que incluyen la permeabilidad de la membrana a iones, y el decrecimiento de la actividad de varias ATPasas. Su capacidad de propagarse en la membrana en lo que la hace realmente dañina para las células (Rauchova *et al*, 1995; Tretter *et al*, 1996).

www.bdigital.ula.ve

Se ha demostrado por medio de estudios *in vitro*, que la peroxidación de los lípidos en la membrana es un proceso relativamente lento, así este fenómeno no puede explicar todos los efectos tóxicos de los radicales libres en los corazones reperfundidos, y es probable que sean mediados por otras acciones de los radicales del oxígeno (Bernier *et al*, 1986).

Una de las maneras de proteger al organismo del proceso de peroxidación lipídica es el uso de antioxidantes como los mencionados anteriormente, los cuales pueden actuar de diferentes maneras: a) disminuir las concentraciones locales de O_2 ; b) prevenir la iniciación del proceso; c) quelar los iones metálicos necesarios (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+ , Cu^{2+}); d) descomponer

los peróxidos para convertirlos en productos no radicales; y e) romper las cadenas de generación de radicales libres (Gutteridge y Halliwell, 1989).

La finalidad del presente trabajo es estudiar la actividad antioxidante del Licor Negro usando como fuente de radicales libres el proceso de peroxidación lipídica. Además, se desea comparar esta capacidad antioxidante con otros antioxidantes naturales como Vitamina E, Vitamina C, melatonina, Indulín C, lignina precipitada, té negro, té verde, café, y vino tinto. Posteriormente, es de interés estudiar el efecto del Licor Negro sobre la acción de otros radicales libres (anión superóxido y radical hidroxilo) y por último, se usaran otros sistemas generadores de radicales para estudiar el efecto antioxidante de las muestras de Licor Negro.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

- El mejor sistema para la generación de MDA No enzimático y HPLs fue el Reactivo de Fenton **1** y **2**, respectivamente, debido a la mayor reactividad del radical hidroxilo.
- El MDA Enzimático es generado en mayor cantidad por parte del NADPH que del NADH, gracias a la mayor variedad de enzimas que participan en su generación.
- El Licor Negro es capaz de inhibir significativamente la formación de MDA generado de manera No Enzimática y Enzimática.
- El Licor Negro no tiene la capacidad de disminuir significativamente la cantidad de HPLs generados por medio del Reactivo de Fenton **2** y medido mediante el método de FOX.
- La inhibición de la peroxidación lipídica ejercida por el Licor Negro es proporcional a la concentración de Licor Negro utilizada y al tiempo de incubación de las muestras.
- Todos los antioxidantes estudiados resultaron ser positivos en la disminución de la concentración de HPLs y MDA, siendo el Licor Negro uno de los más débiles, y los más fuertes la lignina precipitada, el Vino Tinto, Té Negro y el Té Verde.
- El Licor Negro tiene la capacidad de disminuir la concentración de radical hidroxilo y anión superóxido de una manera significativa.
- El Licor Negro comprueba su capacidad antioxidante al disminuir la ocurrencia del proceso de peroxidación generado por medio de la exposición a luz UV de una manera estadísticamente significativa.

BIBLIOGRAFÍA.

- ARGYROPOULOUS, D. S. y S. B. Menachem. (1997). **Biotechnology in the pulp and Paper Industry**. Lignin in: K – E.L. Eriksson (Ed). pp 127 – 158.
- BAGNATI, M.; C. Perugini; C. Cau; R. Bordone; E. Bordone; y G. Bellomo. (1999). **When and why a water-soluble antioxidant becomes pro-oxidant during copper-induced low-density lipoprotein oxidation: a study using uric acid**. *Biochem. J.* Vol. 340. 143 – 152.
- BERNHARD, H., y G. Phyllis. (1998). **Suggestions for Pharmacological and Nutritional Management Strategies**. *The Journal of Spinal Cord Medicine*. Vol. 21. N 4. pp 309 – 334.
- BERNIER, M.; D.J. Dearse; y A. S. Manning. (1986). **Reperfusion – induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with “anti free radicals and a free radical generating system in the isolated perfused rat heart**. *Circ. Res.* Vol 58. 331 – 340.
- CHANOCK, S., J. Benna, R. Smith, y B. Babior. (1994). **The respiratory oxidase burts**. *J. Biol Chem.* Vol. 269. pp 24519 – 22.
- DIZHBITE, T., G. Zakis, A. Kizima, E. Lazareva, G. Rossinskaya, V. Jurkane, G. Telysheva y U. Viesturs. (1999). **Lignin – a useful bioresource for the production of sorption – active materials**. *Bioresource Technology*. Vol 67. pp 221 – 228.
- FERGUSON, J. y P. Harris. (1996). **Studies on the role of specific dietary fibers in protection against colorectal cancer**. *Mutat. Res.* Vol. 350. 173 – 184.
- FERNANDEZ, A. y S. Urizar. (2001). **Natural Antioxidant for World Protection**. *Radical Research*. Vol 4. pp 135 – 148.
- FERNANDEZ, A. (2002). **Uso de Ligninas y Taninos Vegetales con Sales de Cobre para Preservar Madera**. *Bioresources Technology*. Vol 69. pp 164 – 175.
- FREI, B., L. England, y B. Ames. (1989). **Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol 86. pp 6377 – 6381.

- FRIDOVICH, I. (1986). **Biological effects of the superoxide radical**. Arch Biochem Biophys. Vol. 247. pp 1 – 11.
- GUTTERIDGE, J. y P. Halliwell. (1989). **Free Radicals in Biology and Medicine**. Clarendon Press – Oxford. 188 – 276.
- GUTTERIDGE, J. Y P. Halliwell. (1992). **Biologically relevant metal ion dependent hydroxyl radical generation: an update**. FEBS Letter. Vol 307. pp. 108 – 112.
- GUTTERIDGE, J. y B. Halliwell. (1994). **Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease**. Oxford University Press. New York. 40 – 62.
- HALLIWELL, B.; J. Gutteridge; y O. Aruoma. (1987). **The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals**. Anal. Biochem. Vol. 165. 215 – 219.
- HaMai D.; A. Campbell; y S. Bondy. (2001). **Modulation of oxidative events by multivalent manganese complexes in brain tissue**. Free Radical Biology & Medicine. Vol 31. N° 6. pp. 763 – 768.
- HEINONEN, M.; P. Lehtonen; A. Hopia. (1998). **Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liqueurs**. J. Agric. Food Chem. Vol. 46. 25 – 31.
- HERMES-LIMA, M; W. G. Willmore; y K. Storey. (1995). **Quantification of Lipid Peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylene orange complex formation**. Radical Biology and Medicine. Vol. 19. N° 3. 271 –280.
- HERTOOG, M. y P. Hollman. (1996). **Potencial health effects of the dietary flavonols quercetin**. European Journal of Clinical Nutrition. Vol 50. pp 63 – 71.
- HOECSTEIN, P. y S. K. Jain. (1981). **Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane protein with erythrocyte aging**. Fed. Proc. Vol 40. 183 – 192.
- HOGG, N. (1998). **Free Radicals in Disease**. Seminars in Reproductive ENDOCRINOLOGY. Vol 16. N 4. pp 241 – 248.
- HOROWITZ, J. (2002). **101 alimentos que cambiaran su vida**. El Nacional, Caracas, 19 de Enero.
- HUANG, M. y T. Ferraro. (1992). **Phenolic compounds in foods and cancer prevention**. II Symposium of Phenolic compounds in food and their effects on health. Chapter 2. Washington.

- JANERO, D. (1990). **Malondialdehyde and thiobarbituric acid – reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury.** Free Radical Biol Med. Vol 9, pp. 541 – 559.
- JIANG, Z.; J. Hunt; y S. Wolff. (1992). **Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein.** Analytical Biochemistry. Vol. 202. 384 – 389.
- JIANG, Y.; K. Satoh, C. Aratsu; N. Kobayashi; S. Unten; H. Kakuta; H. Kikuchi; H. Nishikawa; H. Ochiai; y H. Sakagami. (2001). **Combination effect of lignin F and natural products.** Anticancer Res. Vol. 21. 965-970.
- KASPRZYCKA-GUTTMAN, T. y D. Odzeniak. (1994). **Antioxidant properties of lignin and its fractions.** Thermochimia Acta. Vol 231. 161-168.
- KIM, H.; M.K. Mill; y A. L. Fricke. (1987). **Preparation of kraft lignin from black liquor.** TAPPI Journal. 112 – 116.
- KRIZKOVA, L.; J. Polonyi; B. Kosikova; J. Dobias; A. Belicova; J. Krajcovic; y L. Ebringer. (2000). **Lignins reduces ofloxacin-induced mutagenicity in Euglena assay.** Anticancer Research. Vol 20. 833-836.
- KUKREJA, R., H. Kontos, M. Hess, u E, Ellis. (1986). **PGH sintesis and lipoxygenase generate superoxide in presence of NADH and NADPH.** Circ Res. Vol 59. pp 612 – 619.
- KURESH, A. y J. James. (2001). **A possible emerging role of phytochemicals in improving age – related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects.** Free Radical Biology and Medicine. Vol. 30. N 6. pp. 583 – 594.
- LANZALUNGA, O. y M. Bietti. (2000). **Photo and radiation chemical induced degradation of lignin model compounds.** Journal of Photochemistry and Photobiology, B. Biology. Vol 58. pp 85 – 108.
- LIEBERMAN, E. M. (1967). **Structural and functional sites of action of ultraviolet radiations in crab nerves fibres. III. The fotoactivation of a Na⁺K⁺ activayes ATPase system and its correlation with inactivation of excitability.** Exp. Cell Res. Vol. 47. 518 – 535.
- LU, H. Y G. Liu. (1991). **Anti-Oxidant Activity of Dibenzocyclooctene Lignans Isolated from Schisandraceae.** Planta Med. Vol. 58. 311 – 313.

- LU, F.; L. Chu; y R. Gau. (1998). **Free Radical-Scavenging Properties of Lignin**. Nutrition and Cancer. Vol. 30. 31 – 38.
- McGRAW, Linda. (2002). **Researches Seek New Uses for Black Liquor**. ARS News and Information. (www.newsandinformation.com).
- Middlenton, E, y C. Kandaswami. (1992). **Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions**. Biochem Pharmacol. Vol. 43. pp 1167 – 1179.
- MOTOHASHI, N.; Y. Shirataki; M. Kawase; S. Tani; H. Sakagami; K. Satoh; T. Kurihara; H. Nakashima; K. Wolfard; C. Miskolci; y L. Molnar. (2001). **Biological activity of kiwifruit peel extracts**. Phytother. Res. Vol. 15. N° 4. 337 –343.
- NAGASAWA, H.; S. Sakamatoto; y K. Sawaki. (1992). **Inhibitory effect of lignin-related pinecone extract on cell proliferating enzyme activity of spontaneous mammary tumors in mice**. Anticancer Res. Vol. 12. 501 - 504.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; J. Tajaddini – Sardami; y S. Wolff. (1994). **Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation – xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine**. Analytical Biochemistry. Vol. 220. 403 – 409.
- POEGGELER, B., R. Reiter, D. Tan, L. Chen, L. Manchester y J. guerrero. (1993). **Melatonin hidroxyl radical – mediated oxidative damage and aging: A hipotesis**. J. Pineal Res. Vol 14. pp 151 – 168.
- PRYOR, W. (2000). **Vitamin E and Hearth Disease: Basic Science to Clinical Intervention Trials**. Free Radical Biology & Medicine. Vol 28, N° 1. pp. 141 – 164.
- RAUCHOVA, H., J. Ledvinkova, M. Kalous, y Z. Drahota. (1995). **The effect of lipid peroxidation on the activity of various membrana-bound ATPases in rat kidney**. Int L Biochem Cell Biol. Vol 27. pp 251 – 255.
- REITER, R., J. Guerrero, J. Garcia, y D. Acuña. (1998). **Reactive Oxygen Intermediates, Molecular Damage, and Aging**. Annals New York Academy of Sciences. Vol 854. pp 410 – 424.
- RICE-EVANS, C.; A. Diplock; y M. Symons. (1991). **Laboratoru Tecniques in Biochemistry and Molecular Biology: Tecniques in Free Radicals Research**. RH Burdon and PH van Knippenberg. Amsterdam: Elsevier. Vol. 22.

- ROJAS, O. (1993). **Segregación Interfacial de derivados de Lignina**. Informe Técnico FIRP 9306. Facultad de Ingeniería. Universidad de Los Andes.
- SAIJA, A., M. Scalese, M. Lanza, D. Marzulla, F. Bonina, y F. Castelli. (1995). **Flavonoids as antioxidants agents: importante of their interaction with biomembranes**. Free Rad Biol Med. Vol. 19. pp 481 – 486.
- SAKAGAMI, H.; N. Kuribayashi; M. Had; T. Sakagami; y M. Takeda. (1995). **Introduction of DNA fragmentation by tannin – and lignin – related substances**. Anticancer Res. Vol. 15. 2121 – 2128.
- SALAH, N.; N. Miller; G. Paraganga; L. Tijburg ; G. Bolwell ; y C. Rice–Evans. (1995). **Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as Chain–breaking antioxidants**. Arch. Biochem. Biophys. Vol 322. pp 339 – 346.
- SARKANEN, K. y C. Ludwig. (1971). **Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions**. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
- SARKANEN, S. (1997). **Progress Report Means for Producing 100 % Kraft Lignin Based Biodegradable Plastics**. University of Minnesota.
- SATOH, K.; H. Sakagami, y K. Nakamura. (1996). **Enhancement of radical intensity and cytotoxic activity of ascorbate by PSK and lignins**.
- SLAMENOVA, D.; E. Horvathova; B. Kosikova; L. Ruzekova; y J. Labaj. (1999). **Detection of lignin biopolymer – and vitamin E – stimulated reduction of DNA strand breaks in H₂O₂ – and MNNG – treated mammalian cells by the comet assay**. Nutr. Cancer. Vol. 33. 88 – 94.
- SLATER, T. F. (1984). **Free Radical mechanism in tissue injury**. Biochem J. Vol 222. 1 – 15.
- SOLEAS, G.; E. Diamandis; y D. Goldberg. (1997). **Wines as biological fluid: history, production, and role in disease prevention**. J. Clin. Lab. Analysis. Vol. 11. pp 287 – 313.
- TOURNAIRE, C, S. Croux, y M. Maurette. (1993). **Antioxidant activity of flavonoids : efficiency of singlet oxygen (1 delta g) quenching**. J. Photochem photobiol. Vol. 19. pp 205 – 215.
- TOYOKUNI, S. (1999). **Reactive oxygen species–induced molecular damage and its application in pathology**. PATHOLOGY International. Vol. 49. pp 91 – 102.

- TRETTER, L., y V. Adam – Vizi. (1996). **Early events in free radical-mediated damage of isolated nerve terminals: effects of peroxides on membrane potential and intracellular Na⁺ y Ca²⁺ concentrations.** J. Neurochem. Vol. 66. pp 2057 – 2066.
- TSOKOS-KUNH, J.; C. V. Smith; C. A. Tate; y J. R. Mitchell. (1986). **Evidence for increased membrane permeability of plasmalemmal vesicles from livers of phenobarbital induced CCl₄ intoxicated rats.** Mol. Pharmacol. Vol. 30. 444 – 451.
- WEGLICKI, W. B.; B. F. Dickens; y I. T. Mak. (1984). **Enhanced lysosomal phospholipid degradation and lysophospholipid production due to free radicals.** Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 124. 229 – 235.
- VILLA – CABALLERO, L., A. Nava, A. Frati, y H. Ponce. (1999). **Es estrés oxidativo. ¿Es necesario medirlo en el paciente diabético?** Gac. Med. Mex. Vol 136. N 3. pp 249 – 255.
- WEGLICKI, W. B.; B. F. Dickens; y I. T. Mak. (1984). **Enhanced lysosomal phospholipid degradation and lysophospholipid production due to free radicals.** Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 124. 229 – 235.
- YAMAFUJI, K. y H. Murakami. (1968). **Antitumor potency of lignin and pyrocatechol and their action on deoxyribonucleic acid.** Enzymology. Vol. 35. 139 – 153.