



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Determinación de la capacidad antioxidante de productos alimenticios derivados de plantas

Alumna: María del Rocío Pereira Aranda

Junio, 2016



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

GRADO EN QUÍMICA

Trabajo Fin de Grado

Determinación de la capacidad antioxidante de productos alimenticios derivados de plantas

Trabajo Fin de Grado presentado por

María del Rocío Pereira Aranda

Jaén, Junio de 2016

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Rocio" o "Rocío", con una línea horizontal que atraviesa la parte inferior de la escritura.

Fdo. María del Rocío Pereira Aranda

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Introducción	3
2.1. Radicales libres y antioxidantes	3
2.2. Compuestos fenólicos	7
2.2.1. Descripción y clasificación	7
2.2.2. Relación estructura-actividad antioxidante	15
2.2.3. Compuestos fenólicos en alimentos. Estudio en plantas	16
2.3. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	18
2.3.1. Mecanismos de reacción	19
2.3.2. Determinación del contenido total en compuestos fenólicos	21
2.3.3. Contenido total en flavonoides	22
2.3.4. Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))	23
2.3.5. Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	26
2.3.6. Ensayo radical Superóxido	27
2.4. Objetivos	28
3. Experimental	28
3.1. Reactivos	28
3.2. Instrumentación	29
3.3. Muestras	29
3.4. Extracción de compuestos fenólicos	30
3.5. TPC, TFC y ensayos capacidad antioxidante	30
3.5.1. Contenido total de compuestos fenólicos	30
3.5.2. Contenido total de flavonoides	32
3.5.3. Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))	34
3.5.4. Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	35
3.5.5. Ensayo radical Superóxido	37
4. Resultados y discusión	38
5. Conclusión	45
6. Bibliografía	46

1. RESUMEN

En este trabajo fin de grado se ha determinado el contenido total en compuestos fenólicos y flavonoides, así como la capacidad antioxidante de tres especies de plantas (*Fraxinus oxycarpa*, *Rhamnus purshiana* y *Rosa aff. rubiginosa* L.) utilizadas en la elaboración de infusiones, entre otras aplicaciones. Estos parámetros se determinan por procedimientos espectrofotométricos, en concreto, la determinación del contenido fenólico se determinó mediante el ensayo de Folin- Ciocalteu, el contenido en flavonoides mediante la formación de complejos flavonoide-Al, y la capacidad antioxidante por los ensayos ABTS, DPPH y anión superóxido. Las plantas anteriormente mencionadas se han seleccionado con el fin de encontrar fuentes alternativas de compuestos antioxidantes y para completar los estudios de capacidad antioxidante realizados hasta la fecha. De las especies estudiadas destacamos *Fraxinus oxycarpa* y *Rhamnus purshiana* como especies útiles desde el punto de vista nutricional y alimenticio (basándonos en sus propiedades antioxidantes). Respecto a la *Rosa aff. rubiginosa* L. los resultados obtenidos le atribuyen una baja capacidad antioxidante.

ABSTRACT

In this work, the total content of phenolics and flavonoids, as well as the antioxidant capacity of three plant species (*Fraxinus oxycarpa*, *Rhamnus purshiana* y *Rosa aff. rubiginosa* L.) used in the preparation of infusions, among other food applications, has been determined. These parameters are determined by spectrophotometric methods: the total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu assay; the flavonoid content by complexation flavonoid-Al; and antioxidant activity by ABTS, DPPH and superoxide anion assays. These plants have been selected in order to find alternative sources of antioxidants; and complete studies of antioxidant activity made to date. We highlight *Fraxinus oxycarpa* and *Rhamnus purshiana* as useful species from the nutritional point of view based on its antioxidant properties. Regarding *Rosa aff. rubiginosa* L., the results showed low antioxidant activity.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Radicales libres y antioxidantes

Un radical libre es una especie química que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable con capacidad de formar otros radicales libres por reacciones en cadena. Una vez generados, los radicales libres aparean rápidamente el electrón desapareado uniéndose a otro radical libre, o cediendo o tomando un electrón de una estructura molecular adyacente no radicalaria, con el fin de estabilizarse (Oliveras, 2005).

Los radicales libres se sintetizan fisiológicamente en el organismo humano como parte del metabolismo energético. Los radicales libres más relevantes son los radicales derivados de oxígeno, estos se denominan de forma colectiva especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS).

Estas especies se generan debido a la reducción incompleta del oxígeno en la cadena de transporte de electrones. Las especies generadas en concreto son: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroxilo ($\text{OH}^{\cdot}$) (Mathews et al., 2003; Gutteridge, 1995).

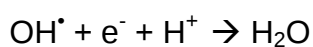
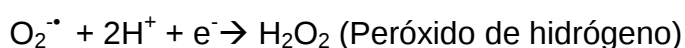


Figura 1. Reducción parcial del O_2 .

En situaciones óptimas el organismo dispone de sistemas antioxidantes capaces de neutralizar las ROS generadas de forma fisiológica, sin embargo, la producción de ROS se incrementa frente a diferentes agresiones, como infecciones, ejercicio físico extremo, dietas desequilibradas, consumo de tabaco o alcohol, radiaciones ionizantes y contaminantes ambientales, entre otros.

Este incremento genera un desequilibrio entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes, que no son capaces de frenar los procesos oxidativos. De este modo se genera el llamado estrés oxidativo, dando lugar a múltiples reacciones que finalmente llegan a producir daño celular (De Gálvez, 2010).

En concreto el radical hidroxilo daña proteínas y membranas celulares. En el caso de las membranas celulares el radical hidroxilo inicia la oxidación de los ácidos grasos de los lípidos de dichas membranas en un proceso denominado peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica es una reacción en cadena, ya que cada resto de ácido graso que sufre peroxidación genera un radical que puede iniciar otra reacción de peroxidación (Mathews et al., 2003; Nimse, Pal, 2015).

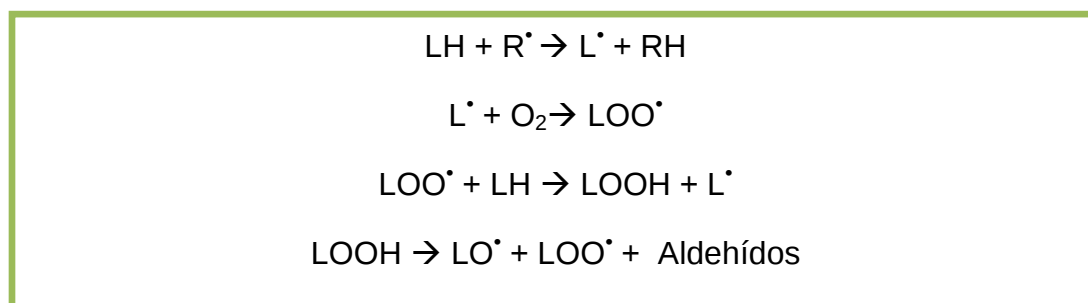


Figura 2. Reacciones en cadena de la peroxidación lipídica.

El radical hidroxilo también daña a los ácidos nucleicos, produciendo la ruptura de la cadena de polinucleótidos (las roturas de la doble cadena del ADN son letales) y cambiando la estructura de las bases del ADN. Se conocen unos 20 cambios de base diferentes, o lesiones del ADN, que son consecuencia de las reacciones del radical hidroxilo con el ADN (Mathews et al., 2003).

Uno de los mecanismos que participa de forma relevante en la formación de ROS es la presencia de iones metálicos. Éstos se liberan en el tejido dañado por la radiación UV y actúan como catalizadores en la producción de ROS mediante la reacción de Fenton (formación de radical hidroxilo a partir de la interacción de peróxido de hidrógeno con iones metálicos como hierro o cobre) (De Galvez, 2010; Mathews et al., 2003).

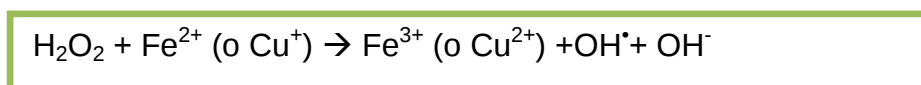


Figura 3. Reacción de Fenton.

El radical superóxido se combina con facilidad con el óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), un agente biológico de señalización que se produce en muchos tejidos animales. El producto es el peroxinitrito ($\text{OONO}^\bullet$), que se considera también una especie de oxígeno reactiva. El peroxinitrito produce peroxidación lipídica y también da lugar a la nitración de los grupos hidroxilo de la tirosina de las proteínas, una reacción dañina para las proteínas de la membrana.

En algunos casos, la producción de especies reactivas de oxígeno no es un fenómeno indeseable sino que forma parte del funcionamiento normal de una célula. Por ejemplo, determinados leucocitos contribuyen a la defensa frente a los agentes infecciosos mediante fagocitosis. Este fenómeno va seguido de una explosión respiratoria, un rápido aumento de la captación de oxígeno. En este proceso gran parte de este oxígeno se reduce a $\text{O}_2^{\bullet-}$ y a H_2O_2 , que contribuyen a destruir la bacteria engullida. Así pues, aunque la mayor parte de las células contienen mecanismos complejos para protegerse frente la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno, la explosión respiratoria comporta una producción deliberada y controlada de estas especies.

El daño oxidativo, como se ha mencionado anteriormente, puede lesionar muchas biomoléculas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, por lo que la lesión tisular que se produce puede, en principio conducir a diversas enfermedades. Se ha implicado al daño oxidativo en cerca de cien enfermedades, entre las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares, cáncer, accidentes cerebrovasculares, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades inflamatorias crónicas (Mathews et al., 2003).

El organismo posee diversos mecanismos para minimizar los efectos dañinos de los radicales libres. Estos mecanismos de defensa pueden ser de origen enzimático o no enzimático. La protección no enzimática la proporcionan los compuestos antioxidantes, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, el glutatión, las vitaminas C y E, y los carotenoides. Dentro de los enzimáticos, hay sistemas protectores que se sintetizan en el interior de las células como superóxido dismutasa (SOD), catalasa o glutatión-peroxidasa (GP), y otros que se encuentran en los fluidos extracelulares, como por ejemplo ceruloplasmina, transferrina o haptoglobina. (Mathews et al., 2003; De Gálvez, 2010).

Desde el punto de vista biológico, un antioxidante se define como una sustancia que, en concentraciones bajas en relación con el sustrato oxidable, puede retrasar o evitar la oxidación del sustrato.

Según su mecanismo de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios y terciarios (Oliveras, 2005):

- Primarios: Impiden la formación de radicales libres, frenan la reacción en cadena de los radicales libres, especialmente de las ROS, o son quelantes de metales de transición. Se comportan como captadores de las ROS, como es el caso de la vitamina E y C y de polifenoles como el resveratrol.
- Secundarios: Interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres (α -tocoferol, ácido ascórbico) o desplazan las especies reactivas de oxígeno (ácido ascórbico, carotenoides, y la mayoría de enzimas antioxidantes), de modo que inhiben la generación de ROS e impiden la actividad metabólica de carcinógenos.
- Terciarios: Reparar el daño causado a las moléculas por los radicales libres o eliminan aquellas que se han estropeado. Entre ellos encontramos la vitamina C, polifenoles, selenio ó N-acetilcisteína.

Muchos compuestos antioxidantes actúan por un único mecanismo, mientras que otros, como los polifenoles, pueden tener acciones combinadas.

El grado de actividad de los compuestos fenólicos y de otros muchos antioxidantes está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula, ya que estabilizan los radicales libres al ceder un hidrógeno de sus grupos hidroxilos (Oliveras, 2005). En la Figura 4 se muestra el mecanismo de actuación como antioxidante del hidroxitirosol (De Torres, 2013)

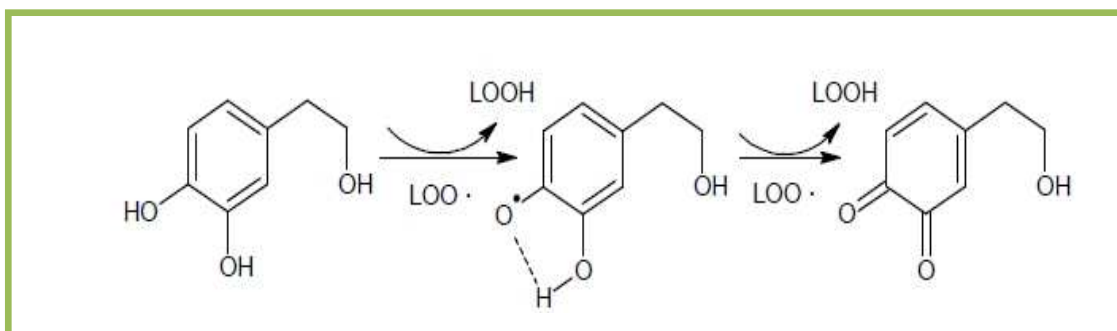


Figura 4. Mecanismo antioxidante del hidroxitirosol.

2.2. Compuestos fenólicos

2.2.1. Descripción y clasificación

Los compuestos fenólicos son la fuente más importante de compuestos bioactivos de la dieta humana (componentes de los alimentos que poseen cierta actividad biológica dentro del organismo, que se traduce en efectos beneficiosos para la salud). Se encuentran principalmente en forma de glucósidos en los extractos de las frutas, hierbas, vegetales, cereales y legumbres (Muñoz, Ramos, 2007).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por los vegetales tanto en su desarrollo normal como en respuesta a condiciones de estrés (polución, radiaciones UV, temperaturas extremas y parásitos, entre otras). La cantidad de compuestos fenólicos presentes en una planta depende de factores como la especie o variedad, técnica y condiciones de cultivo, estado de maduración, así como condiciones de procesamiento (pelado, troceado, hervido y fritura) y almacenamiento, entre otras. Por otro lado, su distribución en los tejidos de las plantas, a nivel celular y subcelular, no es uniforme:

- Las capas exteriores contienen mayores cantidades que las interiores.
- Los compuestos fenólicos insolubles se encuentran en las paredes celulares (enlazados a diversos compuestos celulares contribuyen a darle resistencia mecánica), mientras que los solubles se encuentran en vacuolas.

En las plantas desempeñan importantes funciones morfológicas y fisiológicas:

- Juegan un papel muy importante en el crecimiento y reproducción.
- Al acumularse en las capas más superficiales de los vegetales, captan radiaciones UV, impidiendo sus efectos nocivos en los tejidos internos.
- Establecen relaciones químicas entre la planta y su entorno: son componentes de esencias y pigmentos de las flores y frutos (confiriéndoles aromas y coloraciones atractivos para insectos y animales herbívoros, favoreciendo así la polinización y la dispersión de semillas) así como de sabores (principalmente amargos) o texturas desagradables (para que los animales se nutran de otras plantas).

Los compuestos fenólicos son, en gran parte, los responsables de las principales características organolépticas de los alimentos y bebidas procedentes de plantas. Contribuyen en su color (pigmentos amarillos, naranjas, rojos y azules), sabor (sobre todo en el amargor y la astringencia), olor y estabilidad oxidativa.

En el hombre, un consumo elevado de compuestos fenólicos se ha asociado con efectos positivos para la salud, sobre todo por sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos exhiben un rango muy amplio de propiedades fisiológicas: antialergénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, cardioprotectores, vasodilatadores, anticancerígenos, antitrombóticos, entre otras. Para evaluar los efectos biológicos de estos compuestos, así como de cualquier fármaco o componente alimenticio, uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es su biodisponibilidad, en la que influyen factores tales como estructura química, absorción, distribución, metabolismo y eliminación.

El término compuesto fenólico engloba más de 8000 compuestos con una gran diversidad estructural, aunque todos ellos poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Los criterios para clasificar estos compuestos no están claramente establecidos; una forma de hacerlo es basándose en su estructura química básica: teniendo en cuenta el número de átomos de carbono que lo constituyen y la estructura del grupo fenólico elemental (Gómez, 2010). A continuación se indican las principales familias de compuestos fenólicos:

- Fenoles simples

Este grupo de compuestos se caracteriza por poseer en su esqueleto básico un anillo aromático y grupos hidroxilo (C_6). Ejemplos de este grupo son el catecol y el floroglucinol (Sánchez-Paniagua, 2008; Gil, 2002).

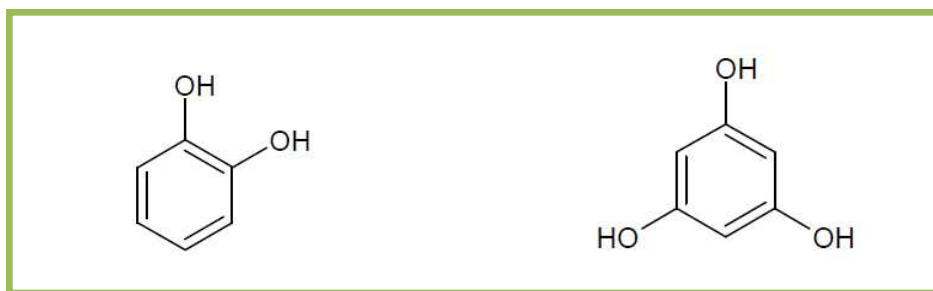


Figura 5. Catecol (izquierda) y Floroglucinol (derecha).

- Ácidos fenólicos

La estructura química de este grupo de compuestos consta de un anillo aromático y un grupo hidroxilo común a todos los compuestos fenólicos y un grupo carboxílico. Dentro de este grupo se encuentran muchos compuestos con interés terapéutico, como los derivados del ácido benzoico (C₆-C₁) y del ácido cinámico (C₆-C₃). Los derivados del ácido cinámico son abundantes en la naturaleza en forma libre (ácido cumárico, ácido caféico) o esterificados con azúcares (ácido cafeil-tartárico), ácido quínico (ácido clorogénico), etc. Los derivados de ácido benzoico son también abundantes en la naturaleza en forma libre, como ácidos (ácido vanílico, ácido gálico) o aldehídos (vanillina, anisaldehído). El café, té y vino contienen importantes antioxidantes fenólicos, como los ácidos clorogénico, caféico, gálico y ferúlico, que pueden contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Sánchez-Paniagua, 2008).

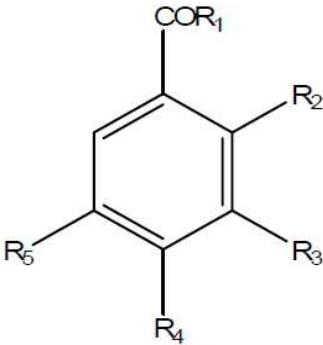
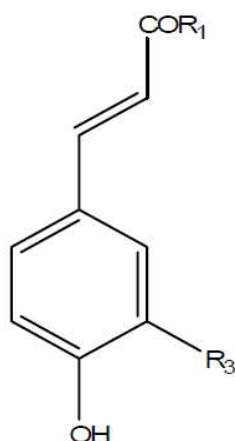
Ácidos benzoicos; C ₆ -C ₁	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
	OH	H	OH	OH	OH	Ác. gálico
	OH	OH	H	H	H	Ác. Salicílico
	OH	H	OH	OH	H	Ác. protocatéquico
	OH	H	OCH ₃	OH	H	Ác. Vanílico
	OH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Ác. Siríngico
	H	H	OCH ₃	OH	H	Vanillina
	H	H	H	OCH ₃	H	Anisaldehído

Tabla 1. Estructura química de compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico.

Ácidos cinámicos; C₆-C₃



R ₁	R ₃	
OH	OH	Ácido Caféico
OH	H	Ácido p-cumárico
OH	OCH ₃	Ácido ferúlico

Tabla 2. Estructura química de compuestos fenólicos derivados del ácido cinámico.

- Acetofenonas y ácidos fenilacéticos

Estos compuestos poseen un anillo fenólico con un sustituyente de 2 átomos de carbono (C₆-C₂). Un ejemplo de ácidos fenilacéticos es el *p*-hidroxifenilacético. La estructura de compuesto se muestra en la Figura 6 (Sánchez-Paniagua, 2008; Gil, 2002).

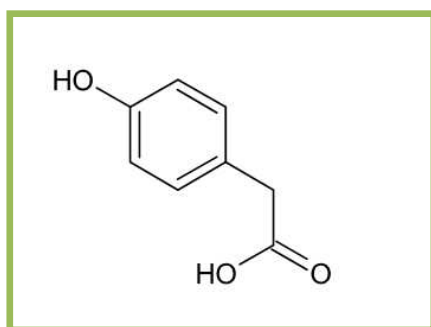


Figura 6. Ácido *p*-hidroxifenilacético.

- Cumarinas

Las cumarinas están ampliamente distribuidas en las plantas especialmente en las familias de las umbelíferas y rutáceas (Gil, 2002). Estos compuestos tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopiran-2-ona, C₆-C₃, denominada cumarina.

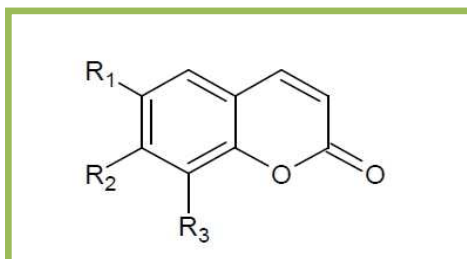


Figura 7. Cumarina.

Prácticamente todas las cumarinas, a excepción de la cumarina propiamente dicha, poseen un sustituyente hidroxílico en R₂, como sucede en la umbeliferona, esculetina y escopoletina. La esculetina es común entre las familias de angiospermas, por ejemplo en la corteza de fresno, *Fraxinus spp.* La escopoletina existe en las solanáceas, rosáceas así como en las flores de *Artemisa afra* (Gil, 2002; Sánchez-Paniagua, 2008).

- Xantonas

Estos compuestos poseen 2 anillos fenólicos unidos por un átomo de carbono (C₆-C₁-C₆). Las xantonas y sus derivados han resultado tener efectos beneficiosos sobre las enfermedades cardiovasculares. Este efecto protector se debería a sus propiedades antioxidantes y a su actividad antiagregante plaquetaria y vaso relajante (Sánchez-Paniagua, 2008).

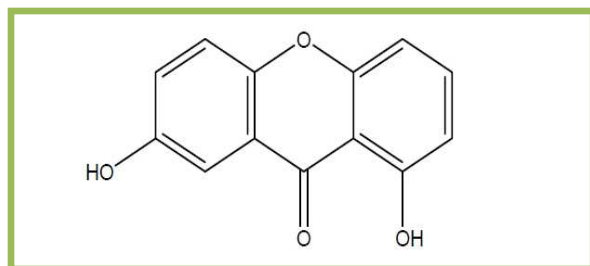


Figura 8. Euxantona.

- Estilbenos

Este grupo de compuestos fenólicos posee una estructura de 2 anillos fenólicos unidos mediante 2 átomos de carbono ($C_6-C_2-C_6$). Un compuesto representativo de este grupo es el resveratrol el cual está presente en uvas y derivados (vino). Este compuesto ayuda a prevenir las enfermedades cardiovasculares, y además posee propiedades antiinflamatorias y antitumorales (Sánchez-Paniagua, 2008).

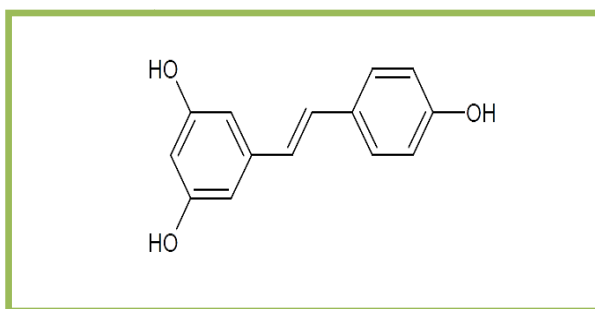


Figura 9. Resveratrol.

- Antraquinonas

Las antraquinonas, $C_6-C_2-C_6$, constituyen el grupo más numeroso de quinonas; generalmente son de color rojo o violeta. Están ampliamente distribuidas en las plantas aunque también están presentes en microorganismos; en las plantas jóvenes se encuentran como glucósidos.

La emodina se encuentra en la corteza de *Rhamnus frangula*, planta que se conoce con diferentes nombres como arraclán, ruibarbo de pobres o cáscara sagrada, utilizada por sus efectos purgantes (Gil, 2002).

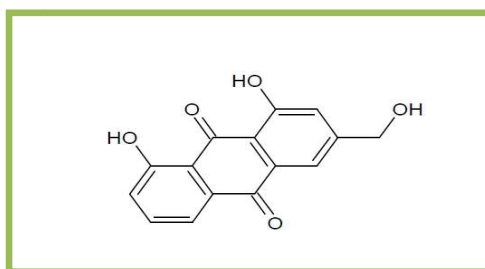


Figura 10. Emodina.

- Lignanos

Son compuestos diméricos $(C_6-C_3)_2$. La estructura más típica de lignano es aquella en la que el acoplamiento de las dos unidades de fenilpropano tiene lugar a través de los carbonos centrales de la cadena lateral, como en el (+)-pinoresinol. Los lignanos poseen en general interesantes propiedades biológicas que los hace útiles en diferentes campos: actividad antitumoral, antivírica o insecticida, entre otras (Gil, 2002).

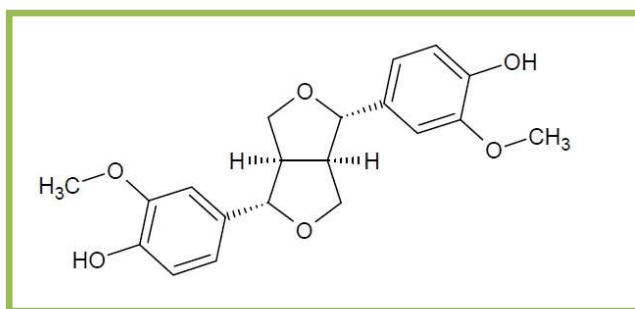


Figura 11. (+)-Pinoresinol.

- Taninos

Son compuestos de alto peso molecular. Se caracterizan por tener un esqueleto básico $(C_6-C_3-C_6)_n$. Existen dos tipos de taninos: los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, provienen de la esterificación de ácidos fenólicos con azúcares o polioles; y los taninos condensados, formados por unidades de flavan-3-ol como la procianidina B-1 (Ramírez, 2011).

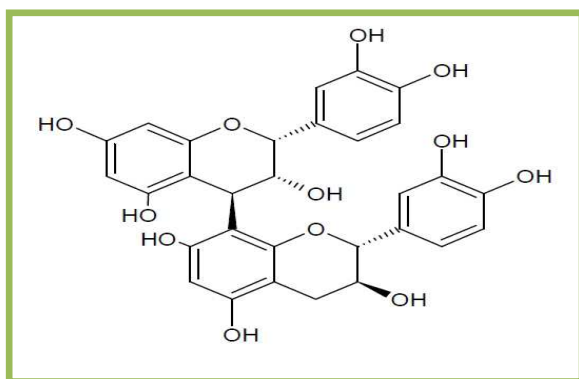


Figura 12. Procianidina B-1

- Flavonoides

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, un anillo B y 3 átomos que unen los 2 anillos ($C_6-C_3-C_6$). La estructura puede conformar un heterociclo (pirona) que son los más abundantes (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianinas) o una cadena abierta (chalconas). Poseen varios grupos hidroxilos unidos a una estructura de anillo y se encuentran normalmente como glucósidos.

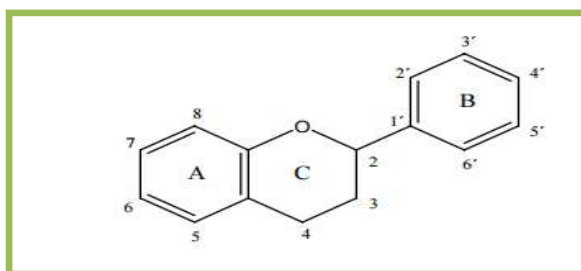


Figura 13. Estructura básica flavonoides.

Los flavonoides están presentes en una gran cantidad de alimentos como frutas, verduras, cerveza, té, vino, miel, etc. Entre sus funciones en los vegetales se destaca su papel antifúngico y bactericida. Debido a sus propiedades organolépticas, los flavonoides son los responsables del color natural de los alimentos. Su contribución en la pigmentación de los alimentos vegetales está claramente reconocida, a través de las antocianinas, responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de las plantas y de sus productos. Los taninos condensados constituyen la principal fracción fenólica responsable de las características de astringencia de los alimentos vegetales. Los flavonoides tienen un enorme interés científico debido a sus propiedades antioxidantes.

Su actividad antioxidante, está relacionada con su capacidad para quelar metales y captar radicales libres, tiene interés desde un punto de vista nutricional, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales (alimentos que pueden proporcionar un beneficio para la salud además de nutrición básica).

Esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer así como en procesos de envejecimiento, por lo que está siendo intensamente estudiado (Sánchez-Paniagua, 2008).

Los compuestos fenólicos más abundantes en la dieta son los flavonoides (60%) y los ácidos fenólicos (30%) (Gómez, 2010).

2.2.2. Relación estructura-actividad antioxidante

La relación estructura-actividad influye en la actividad biológica de los compuestos fenólicos. El número y la posición de los grupos hidroxilo, la glicosilación y otras substituciones determinan la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. En el caso de los flavonoides hay tres grupos estructurales que determinan la potencia antioxidante: una estructura catecol en el anillo B, los dobles enlaces 2,3 en conjugación con una función 4-oxo de un grupo carbonilo en el anillo C y la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5. La quercetina posee estos tres grupos y, por tanto, presenta una elevada actividad antioxidante. Sin embargo la sustitución de grupos hidroxilo por glicosilación disminuye la actividad antioxidante. Las estructuras con grupos orto-dihidroxi son las más importantes ya que presentan una alta actividad antioxidante. También es de suma importancia la capacidad de estos compuestos para quelar metales. La actividad quelante de metales requiere la presencia de configuración 3',4'-dihidroxi, una quinona en C-4 y un grupo hidroxilo en C-3 o C-5. La hidrogenación del doble enlace en C2:C3 determina la pérdida de la actividad quelante de metales, probablemente debido a la pérdida del reagrupamiento de electrones que se presenta durante la formación complejo metal-flavonoide. (Muñoz, Ramos, 2007; Pokorny et al., 2004; Kasprzak et al., 2015).

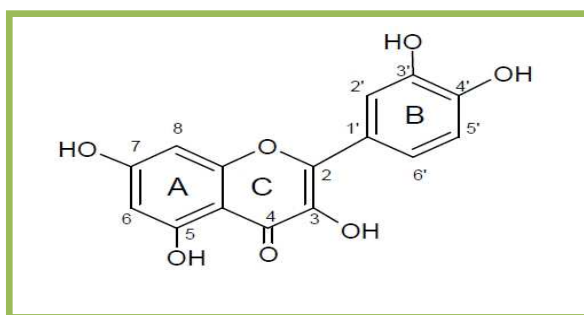


Figura 14. Estructura Quercetina.

2.2.3. Compuestos fenólicos en alimentos. Estudio en plantas

Existe una gran variedad de alimentos que contienen compuestos fenólicos, entre ellos destacan el té verde, té negro, café, chocolate y el vino tinto. Las frutas y verduras también contienen este tipo de compuestos pero en menor proporción. Otros alimentos también significativos son el aceite de oliva, frutos secos, algas, plantas y especias (Crozier et al., 2009).

En este trabajo se han realizado un estudio del contenido total de compuestos fenólicos y de flavonoides, y la capacidad antioxidante, de tres especies de plantas utilizadas en la elaboración de infusiones: fresno, cáscara sagrada y rosa de mosqueta. Las características principales de dichas plantas se describen a continuación.

Fresno (*Fraxinus oxycarpa*) es una especie arbórea perteneciente a la familia de las oleáceas. Es un árbol que pierde las hojas en invierno, las cuales se disponen sobre las ramas una enfrente de otra y se componen de tres a seis pares de hojuelas lanceoladas, aserradas en los bordes, con una de none en el ápice. Las flores forman ramilletes opuestos, sin cáliz ni corola, reducidas a dos estambres y a un pequeño pistilo. El fruto es seco, prolongado y aplanado a manera de lengüecita. Florece en primavera, antes de echar hojas nuevas, y madura sus frutos en verano. Se cría en los bosques algo húmedos, mayormente en las umbrías, a orillas de las aguas, etc., de todo el país (Font, 2007).

La presencia de cumarinas, secoiridoides y feniletanoides es un rasgo característico de las especies del género *Fraxinus*. Lignanós, flavonoides y compuestos fenólicos simples también son comunes, pero tienen una distribución más limitada (Kostova, Iossifova, 2007).

Las hojas son laxantes, y se emplean también contra el reuma y la gota. La corteza se creyó febrífuga, pero ha caído en olvido. Las infusiones de sus hojas tienen efectos laxantes y diuréticos.

En los valles de todo el Pirineo y de la Cordillera Cantábrica, hasta Galicia, se cría el llamado *fresno de Vizcaya*, de mayor porte que el descrito, de yemas oscuras, hojas y hojuelas mayores y frutos más anchos, el llamado *Fraxinus excelsior*, el cual tiene análogas virtudes y la composición que hemos indicado anteriormente (Font, 2007).

Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*) es una especie arbórea de la familia de las Ramnáceas. Árbol de 6 a 12 metros de altura, ramas redondas y pubescentes. Las hojas miden de 5 a 8 cm de longitud y la cuarta parte de ancho; son alternas y frondosas cubiertas de vellosidad cuando son jóvenes; al crecer son de color verde brillante. Flores pequeñas blanco-verdosas. El fruto maduro es una pequeña drupa negra del tamaño de un guisante, triangulada, con 2 o 3 semillas brillantes. Crece en los bosques de coníferas de Estados Unidos y Canadá. Se cultiva en varias regiones del mundo, principalmente en África Central. Esta planta se utiliza como laxante natural (Arango, 2006).

Las especies del género *Rhamnus* se caracterizan por su alto contenido en antraquinonas (Kremer et al., 2012).

Rosa mosqueta (*Rosa aff rubiginosa* L., *Rosa eglanteria* L.) es un arbusto silvestre que puede medir hasta 2 metros de altura, con ramas delgadas y flexibles, cubiertas de espinas de color violáceo. Las hojas de la rosa de mosqueta son caducas, pinnadas, de bordes serrados y con presencia de estípulas. Sus flores tienen 5 pétalos de color rosado y olor almizclado. Su fruto es un cinorrodón de forma ovoide y color rojo o naranja, con restos de sépalos espinosos en sus extremos. Este arbusto es originario de Europa Central y se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial. Los frutos de esta especie son muy valorados debido a su alto contenido compuestos fenólicos y vitamina C, se utilizan como alimento, principalmente en la preparación de mermeladas, té y bebidas alcohólicas. En Turquía, las frutas, hojas y raíces se hierven en agua y se utilizan como diuréticos y como remedio para resfriados. El aceite de rosa de mosqueta, se emplean en productos cosméticos, debido a su alto contenido en ácido linolénico (45-50%) y ácido linoleico (40%). (Hornero, Mínguez, 2000; Benaiges, 2008; Ercisli, 2007).

2.3. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*

El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos para la salud por parte de los antioxidantes ha originado que se desarrollen una gran cantidad de métodos para determinar la capacidad antioxidante de extractos de alimentos. En la actualidad, no existe ningún procedimiento estándar para medir la capacidad antioxidante *in vitro*, pero sí se han planteado las condiciones que éste debería reunir:

- Asegurar que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes como fuente de daño oxidativo.
- Ser sencillo.
- Tener un mecanismo y un punto final definido.
- Poseer una instrumentación más o menos disponible.
- Tener una buena reproducibilidad.
- Ser adaptable para medir antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.
- Usar diferentes fuentes de radicales.
- Ser adaptable para análisis rutinarios a gran escala.

Es difícil evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método, en vez de por la combinación de varios, como se hace en la actualidad. Esto se debe a varias razones; en primer lugar, los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos (pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos...) y en un mismo alimento puede haber mezclas de diferentes antioxidantes con distintos mecanismos de acción y entre los que, además, se pueden establecer reacciones sinérgicas, por lo que serán necesarios distintos análisis para poder considerar los posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes en un alimento.

Por otro lado, además del mecanismo de reacción, existen otros factores que también deben considerarse al determinar la capacidad antioxidante de muestras tan complejas como son los extractos de alimentos, tales como la localización del antioxidante en las distintas fases, el tipo de sustrato oxidable, la composición del sistema, las interacciones con otros componentes, etc.

Otro aspecto a considerar es que, debido a las múltiples modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes, muchas veces la comparación de resultados, aun correspondiendo al mismo método de medida, se deben efectuar con precaución, ya que pueden haber existido cambios en el modo de combinar las muestras con los reactivos, en la metodología empleada en la extracción (tamaño de partícula, ciclos de extracción, modo de agitación de la muestra, relación muestra: disolvente, etc.), en la temperatura del ensayo, etc. Así mismo, el hecho de que el sistema a analizar haya una alta o baja presencia de agua es también importante, ya que este factor afecta a la migración de compuestos, puede producir fenómenos de cristalización, coalescencia, complejación, colapsos de estructuras, etc. También se debe tener en cuenta el hecho de que, en la literatura, los resultados para un mismo método se expresan en múltiples formas, lo que dificulta su comparación (Pérez, 2011; Prior et al., 2005).

2.3.1. Mecanismos de reacción

Los antioxidantes pueden inactivar los radicales a través de dos vías principales: reacciones de transferencia de átomo de hidrógeno (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET). El resultado final es el mismo, independientemente del mecanismo, pero la cinética y las reacciones colaterales difieren. Ambos mecanismos pueden ocurrir paralelamente, el mecanismo dominante del sistema se determina a través de la estructura y propiedades del antioxidante; solubilidad, coeficiente de partición y el solvente del sistema. La energía de disociación de enlace y el potencial de ionización son los dos factores principales para determinar el mecanismo y la eficacia de los antioxidantes.

En las reacciones tipo HAT, se inactiva el radical por donación de un átomo de hidrógeno por parte del antioxidante. La reacción se muestra en la Figura 15, siendo $X^\bullet$ el radical libre y AH, el antioxidante:

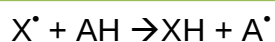


Figura 15. Reacciones tipo HAT.

El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial. Estas reacciones vienen determinadas por la entalpía de disociación del grupo donador de H en la molécula antioxidante. Las reacciones tipo HAT son independientes del pH y del disolvente. La presencia de agentes reductores, incluidos metales, complican la reacción y provocan una sobreestimación de la reactividad.

En las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir cualquier compuesto, incluyendo, metales, carbonilos y radicales.

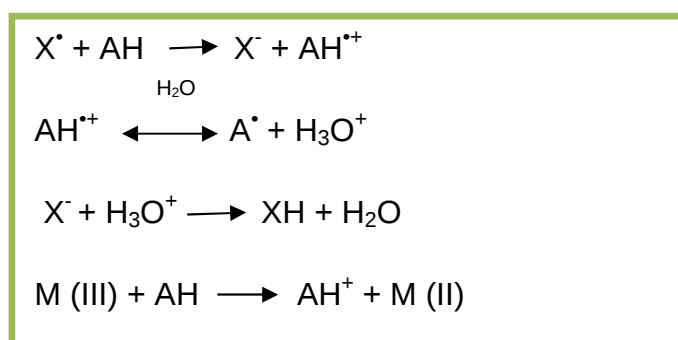


Figura 16. Reacciones tipo SET.

Los mecanismos SET y HAT casi siempre ocurren al mismo tiempo, el pH y la estructura de los antioxidantes determinará cuál de ellos es el predominante.

La reactividad relativa en el método SET se basa principalmente en la desprotonación y en el potencial de ionización del grupo funcional reactivo, por lo que las reacciones son dependientes del pH. En general, el potencial de ionización disminuye con el incremento del pH, reflejando el aumento de la capacidad donadora de electrones con desprotonación.

Cuando $AH^{\bullet+}$ tiene un tiempo de vida alto, las reacciones secundarias producen interferencias significativas en el ensayo, también son muy sensibles a la presencia de trazas de contaminantes y otros componentes (particularmente metales) que pueden convertirse en la causa de una alta variabilidad, pobre reproductibilidad y poca consistencia de los resultados (Prior et al., 2005).

2.3.2. Determinación del contenido total en compuestos fenólicos

El ensayo de Folin-Ciocalteu es el método más empleado para determinar el contenido de compuestos fenólicos en alimentos. El ensayo se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los compuestos fenólicos en condiciones alcalinas. La naturaleza química exacta del reactivo de Folin-Ciocalteu no está claramente definida, pero se cree que está constituido por una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico que se reducen para producir un cromóforo de color azul con máximo de absorbancia a 765 nm (Shahidini, Zhong, 2015).

De los componentes del reactivo de Folin-Ciocalteu el molibdato es más fácil de reducir que el tungsteno, esto sugiere que la reacción de transferencia de electrones sea más frecuente entre los reductores y el molibdato.

El ensayo de Folin-Ciocalteu surgió a partir de la mejora del ensayo de Folin y Denis, este ensayo fue diseñado para determinar indirectamente la concentración total de proteínas mediante la medida del contenido de tirosina y triptófano. El fundamento de ambos métodos está basado en la reacción entre el agente oxidante y tirosina/triptófano, reacción que produce la formación de un color azul proporcional a la concentración de proteínas. La principal diferencia entre los ensayos de Folin-Ciocalteu y Folin-Denis es la proporción de molibdato (Mo) utilizado en la formación del reactivo de Folin. Folin-Ciocalteu aumentaron la cantidad de Mo con el objetivo de prevenir la formación de un blanco precipitado que fue observado en el ensayo Folin-Denis. El ensayo de Folin-Ciocalteu es más sensible y reproducible que el ensayo Folin-Denis. La aplicación de ambos métodos se ha ampliado a la determinación del contenido de compuestos fenólicos en alimentos.

En el ensayo, la reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu tiene lugar a pH 10, el cual se alcanza mediante la adición de carbonato sódico. En condiciones básicas, la disociación del protón de los compuestos fenólicos conduce a la formación del ión fenolato, el cual es capaz de reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu.

El principal inconveniente de este ensayo es que en extractos de plantas pueden aparecer interferentes (otros compuestos reductores) que pueden reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu y producen que se determine de forma inexacta el

contenido en compuestos fenólicos. Entre estos compuestos reductores encontramos al ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (DHA) y azúcares reductores (por ejemplo, glucosa y fructosa). La presencia de estos interferentes no debe ser un problema en las muestras a analizar en este trabajo.

En condiciones ácidas el reactivo de Folin-Ciocalteu y los compuestos reductores AA y DHA reaccionan rápidamente, esto se observa por la aparición de color azul justo cuando se mezcla el reactivo de Folin-Ciocalteu con el extracto. La observación de este color azul antes de adicionar el carbonato sódico nos indica la presencia de AA, DHA u otros compuestos reductores que no requieren la forma de fenolato para reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu (Sánchez et al., 2013).

2.3.3. Contenido total en flavonoides

Este ensayo se basa en la capacidad quelante de los flavonoides, fue desarrollado por Woisky y Salatino, estos autores utilizaron $AlCl_3$ para formar complejos con flavonoides. Estos complejos presentan un color amarillo intenso. El valor de la absorbancia en este método se medía a 420 nm, utilizando la quercetina como estándar. Este método ha sido modificado por Chang et al, 2002, y es específico para la determinación del contenido en flavonas y flavonoles, la modificación consistió en la adición de acetato potásico después de la adición de cloruro de aluminio y la posterior medición de la absorbancia a 415 nm. La quercetina se sigue utilizando como estándar. Este último método es el que se ha utilizado en este trabajo.

Los iones metálicos pueden enlazarse con el grupo carbonilo del carbono 4 y los grupos hidroxilo de los carbonos 3 o 5 de flavonas y flavonoles, también puede formar complejos lábiles con los grupos orto-di-hidroxi presentes en los anillos A y B de los flavonoides (Chang et al., 2002; Kasprzak et al., 2015).

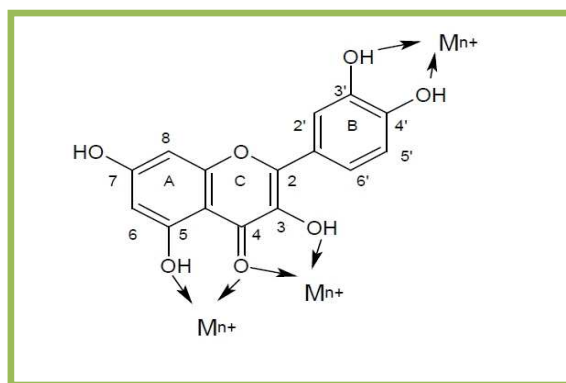


Figura 17. Posibles sitios quelantes de la quercetina.

Los científicos Mammen y colaboradores realizaron una evaluación de los procedimientos de Woisky y Salantino y Chang y colaboradores, utilizando como muestra nueve de los flavonoides más comunes en plantas. Estos autores determinaron que estos ensayos no son fiables a la hora de determinar el contenido total de flavonoides en muestras desconocidas, ya que los diferentes compuestos que se sometieron a estudio no reaccionaban de manera uniforme. Además no se ha tenido en cuenta el hecho de que en plantas, los flavonoles y flavonas existen como glucósidos, la presencia de restos de azúcar obstaculiza la quelación con AlCl_3 . Cualquier bloqueo de los grupos hidroxilo por glicosilación en los carbonos de las posiciones 3, 5, 3' o 4' evita la quelación con AlCl_3 y produce el cambio batocrómico hacia 415/420 nm. Incluso la metoxilación en estos carbonos de las flavonas y flavonoles reduce los desplazamientos batocrómicos.

2.3.4. Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)).

Este ensayo fue desarrollado por Miller y colaboradores en 1993 (Miller et al., 1993) como un método simple y eficaz para determinar la capacidad antioxidante. El ensayo mide la capacidad de los antioxidantes para captar el radical catiónico $\text{ABTS}^{+\cdot}$, compuesto cromóforo de color verde azulado con un máximo de absorción a 734 nm, el cual decrece en intensidad en presencia de antioxidantes. El radical catiónico $\text{ABTS}^{+\cdot}$ puede generarse a partir de ABTS en presencia de fuertes agentes oxidantes.

Los antioxidantes pueden neutralizar el radical catiónico $\text{ABTS}^{+\bullet}$ mediante la transferencia de electrones (SET) o por donación de átomos de hidrógeno (HAT). El que se produzca un mecanismo u otro depende de la estructura de los antioxidantes y el pH del medio. Este método se suele clasificar como método SET, pero debe tenerse en cuenta el hecho de que el mecanismo HAT también puede producirse.

El grado de decoloración del color verde-azul, cuantificado como un decrecimiento en la absorbancia a 734 nm, depende de la duración de la reacción, del tipo y concentración de antioxidantes presentes en la muestra. Este ensayo puede controlar el decrecimiento de la absorbancia con el tiempo, o la caída en cierto punto final. Cuando medimos la reacción en un cierto punto final debemos determinar si en ese punto la reacción se ha completado (Shahidini, Zhong, 2015).

En el ensayo original el radical catiónico $\text{ABTS}^{+\bullet}$ se generó a partir de la reacción entre ABTS y el radical ferrimioglobina generado *in situ* por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. En este procedimiento la muestra se adicionó antes de la formación del radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Este procedimiento presentaba el inconveniente de que los antioxidantes no distinguen entre el radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ y el radical ferrimioglobina, por lo tanto se produce una sobreestimación de los resultados. El método se mejoró generando el $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a partir de persulfato potásico y, adicionándolo posteriormente a la muestra (Litescu et al., 2014; Schaich et al., 2015).

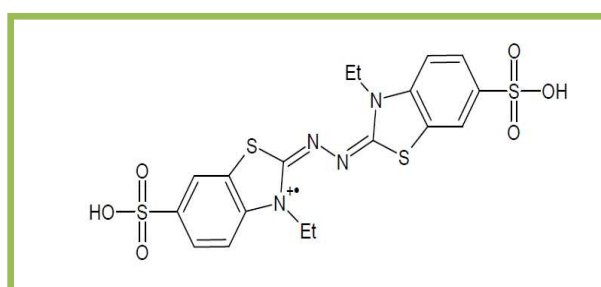


Figura 18. Radical catiónico ABTS.

El ensayo TEAC ha sido utilizado para medir la actividad antioxidante de sustancias puras, fluidos biológicos y extractos de plantas (Shahidini, Zhong, 2015).

Las ventajas de este ensayo es que es un ensayo simple, puede realizarse como análisis de rutina en casi cualquier laboratorio sin necesidad de equipos sofisticados y se puede efectuar tanto en antioxidantes hidrosolubles como liposolubles. Es uno de los ensayos más empleados a la hora de determinar la capacidad antioxidante, por lo tanto nos permite comparar nuestros resultados con los de otras especies de plantas o con plantas de la misma familia (Shahidini, Zhong, 2015; Litescu et al., 2014).

El principal inconveniente de este método está en el tiempo de medida. La actividad antioxidante se mide a un tiempo fijo de reacción con el radical, aunque no existe un consenso en cuanto al tiempo óptimo de medida. Sin embargo, la actividad antioxidante obtenida guarda relación directa con el tiempo al que se midió la absorbancia. Algunos antioxidantes reaccionan completamente en un corto período de tiempo, otros reaccionan lentamente y poco a poco, y otros tienen una mezcla de reacciones iniciales rápidas y lentas. Dos factores controlan las velocidades de reacción: los mecanismos de reacción SET o HAT y el acceso al radical ABTS^{•+}. Las reacciones en las que los antioxidantes actúan por el mecanismo SET y tienen acceso completo al ABTS^{•+} se producen en tiempos de reacción de milisegundos, en cambio, las reacciones que presentan antioxidantes con múltiples anillos y grupos—OH, aductos, altas concentraciones de antioxidantes y mecanismo de reacción HAT requieren mayor tiempo de reacción. El aumento del tiempo de reacción con el radical posibilita la actuación de todas las sustancias antioxidantes presentes (Schaich et al., 2015).

También ha sido cuestionado por su falta de relevancia biológica, ya que el radical catiónico ABTS^{•+} no se encuentra en sistemas biológicos ni en alimentos. A pesar de los inconvenientes este ensayo es uno de los más empleados para determinar la capacidad antioxidante (Shahidini, Zhong, 2015).

2.3.5. Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Es uno de los ensayos más utilizados para determinar la capacidad antioxidante en alimentos. Este método fue desarrollado por Blois en 1958. Mide la capacidad de los antioxidantes para captar el radical DPPH[•] a través de la disminución de la absorbancia, medida a 515 nm. El radical DPPH[•] es un compuesto orgánico nitrogenado que está disponible comercialmente y no necesita ser generado con antelación. Cuando el radical DPPH[•] reacciona con los antioxidantes presentes en la muestra se produce un cambio de color de púrpura a amarillo.

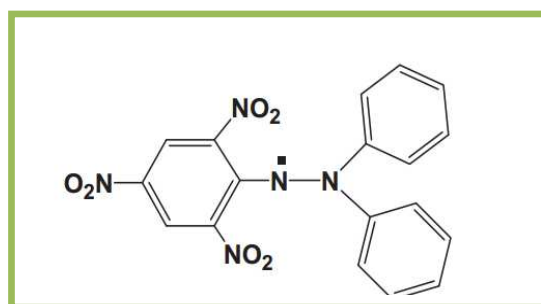


Figura 19. Radical DPPH.

En principio se creía que este ensayo se guiaba por un mecanismo HAT, pero varios autores han planteado el hecho de que al utilizar disolventes con fuertes enlaces de hidrógeno, como metanol, interfiere en la liberación de átomos de hidrógeno, esto aumenta la posibilidad de que se produzca el mecanismo SET frente al HAT.

El radical DPPH[•] es soluble solo en disolventes orgánicos, su estabilidad está influenciada por el disolvente utilizado en su preparación. La absorbancia del metanol y acetona decrece un 20% y 35%, respectivamente, durante 120 minutos a 25 °C, en presencia de luz, mientras que en oscuridad no cambia significativamente durante 150 minutos. Varios compuestos se utilizan como estándar en este ensayo: ácido ascórbico, α-tocoferol, ácido gálico, butilhidroxitolueno (BHT) y trolox.

La reacción está dominada por el impedimento estérico de la molécula DPPH[•], las moléculas pequeñas tienen mejor acceso al lugar de la molécula donde se encuentra el radical, por lo tanto presentan una mayor capacidad antioxidante. Por otra parte, los compuestos de mayor tamaño que reaccionan rápidamente con radicales peróxido pueden reaccionar lentamente o incluso pueden ser inertes en este ensayo.

La inexistencia del radical DPPH[•] o radicales similares en sistemas biológicos es uno de los principales inconvenientes de este ensayo. Otro inconveniente es que otros compuestos absorben en el mismo rango de longitud de onda, como las antocianinas, que presentan una fuerte absorción a (500-550 nm) como el DPPH[•]. (Pyrzynska, Pękal, 2013; Schaich et al., 2015; Shahidini, Zhong, 2015).

2.3.6. Ensayo radical Superóxido

Este método se basa en la generación del radical anión superóxido mediante el sistema NADH/PMS. La reacción se inicia por la reducción del PMS por el NADH; el PMSH₂ reducido es capaz de reaccionar con el oxígeno molecular del aire produciendo el radical anión superóxido que reduce al NBT a diformazán, compuesto altamente coloreado que presenta un máximo de absorción a 560 nm. En este ensayo se mide el decrecimiento de la absorbancia a 560 nm, el decrecimiento de la absorbancia se debe a la acción antioxidante captadora de radicales (Ponti et al., 1978; Nimse, Pal, 2015).

La principal ventaja de este ensayo es que el radical anión superóxido si se encuentra en sistemas biológicos y alimentos.

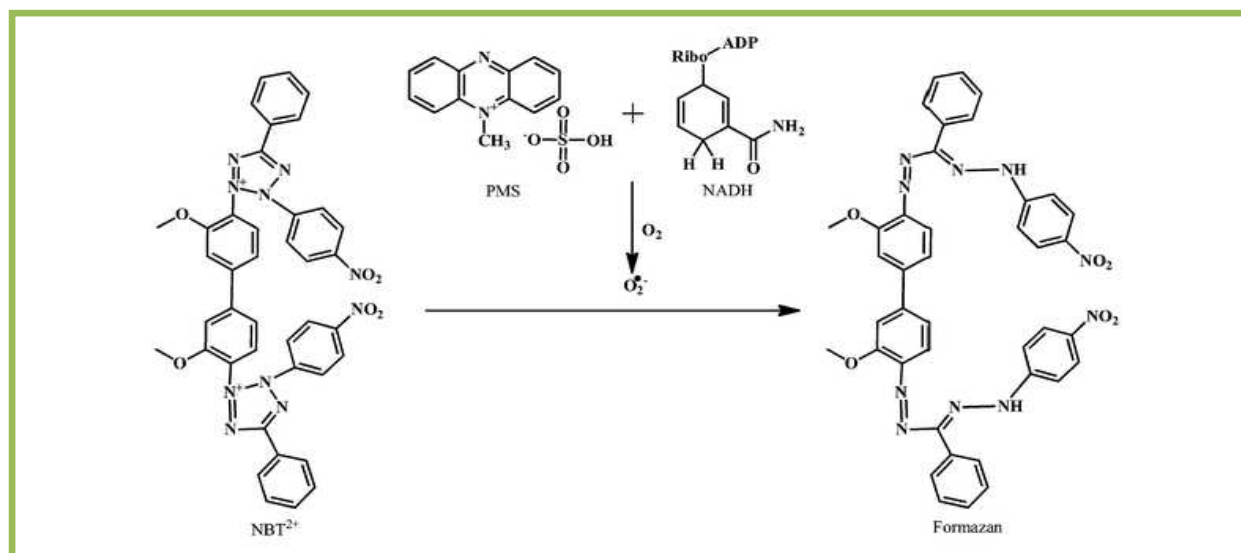


Figura 20. Reducción del NBT por el radical superóxido, radical producido en la reacción PMS –NADH.

2.4. Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo son:

- 1) Determinar el contenido fenólico total (ensayo Folin-Ciocalteu), el contenido total de flavonoides, y la actividad antioxidante (ensayo ABTS, DPPH y superóxido) de tres especies de plantas utilizadas en la elaboración de infusiones.
- 2) Comparar los resultados con los de otras plantas o alimentos similares y evaluar si estas plantas pueden llegar a ser útiles desde el punto de vista nutricional y alimenticio basándose en sus propiedades antioxidantes.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

Los reactivos y estándares utilizados en los ensayos fueron los siguientes : ácido gálico ($\geq 99\%$), ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)(pureza: 97%), cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT)(98%), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (97%), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ($>99\%$), metosulfato de fenazina (PMS)(90%), β - nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)(97%), quercetina (95%), sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)(98%), tricloruro de aluminio hexahidratado (99%) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Acetato potásico (99%), carbonato sódico (99%), di-sodio hidrógenofosfato 2-hidrato (99%), etanol (96%), metanol ($>99\%$), reactivo Folin-Ciocalteu, sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato (98%), fueron adquiridos de Panreac (Barcelona, España). Agua ultrapura (sistema de purificación de agua Milli-Q ultra pura de Millipore (Milford, EEUU).

3.2. Instrumentación

Balanza analítica (Sartorius, Madrid, España), espectrofotómetro UV/Vis VarianCary 50 (Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU), pH-metro GLP-21(Crison, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España) rotavapor R-210 y baño de calor B-491 (Buchi, Prat de Llobregat, Barcelona, España), ultrasonidos Bandelin Sonorex Digital 10P (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

3.3. Muestras

Las especies de plantas seleccionadas para el estudio de la capacidad antioxidante se adquirieron en un herbolario de la ciudad de Jaén. La rosa de mosqueta pertenece a la casa comercial Floralp's Natura y la cáscara sagrada y fresno a Granadiet.



Imagen 1. Especies de plantas seleccionadas para el estudio de la capacidad antioxidante.

3.4. Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó siguiendo el procedimiento de (Spínola et al., 2014): se realizó una extracción sólido-líquido empleando 5 g de muestra y 100 mL de metanol en un baño de ultrasonidos durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se filtró y se eliminó el disolvente en un rotavapor. Los extractos se congelan hasta que se lleva a cabo los ensayos.

Observaciones: el extracto de fresno presenta un intenso color verde debido a la presencia de clorofila. Esto impide conocer si existen compuestos reductores que interfieren en la medida del ensayo Folin-Ciocalteu, por esta razón eliminamos este pigmento con carbón activo antes de eliminar el disolvente (Castro, Cordenusi, 2014).

3.5. TPC, TFC y ensayos capacidad antioxidante

3.5.1. Contenido total de compuestos fenólicos

El contenido total de compuestos fenólicos (total phenolic content, TPC) fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu. El procedimiento de este ensayo es el siguiente: 50 μL de muestra (5 mg/mL de extracto seco en metanol) fueron mezclados con 1.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10) y 1 mL de Na_2CO_3 del 7,5%. La absorbancia se midió a los 30 minutos de reacción, durante este tiempo la reacción se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 765 nm, se realizaron 3 repeticiones por extracto de planta. El contenido total de compuestos fenólicos se expresa en mg equivalentes ácido gálico/100 g de extracto seco (Spínola et al., 2014).

Observación: antes de adicionar el Na_2CO_3 observamos el color del ensayo, ya que la generación de un tono azul antes de adicionar Na_2CO_3 podría indicar la presencia de otros compuestos reductores a parte de los compuestos fenólicos. En las muestras estudiadas no se observó un tono azul antes de adicionar Na_2CO_3 .

A continuación se muestran tres imágenes tomadas en la realización del ensayo TPC.

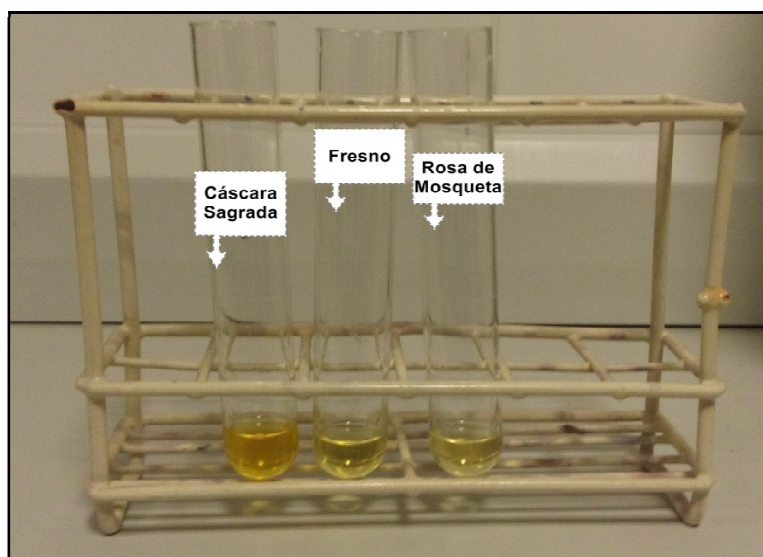


Imagen 2. Extractos de plantas en un mililitro de metanol.

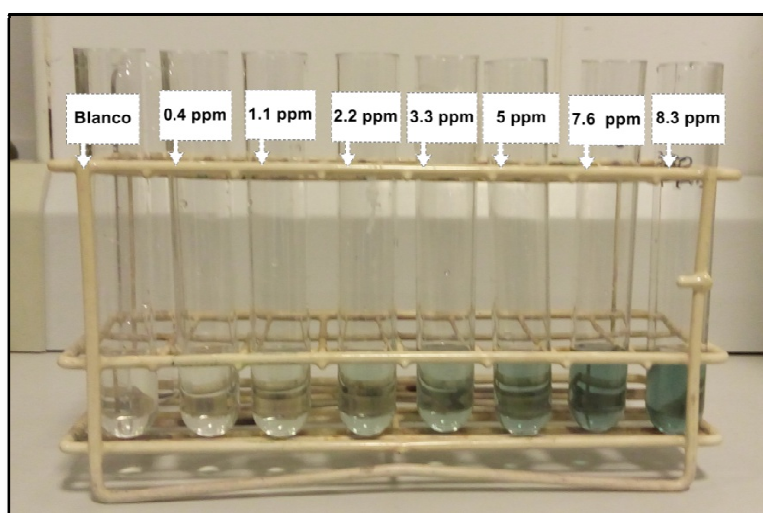


Imagen 3. Ensayo TPC en diferentes concentraciones de ácido gálico (patrón). Se observa un aumento en la intensidad del color al aumentar la concentración de ácido gálico.

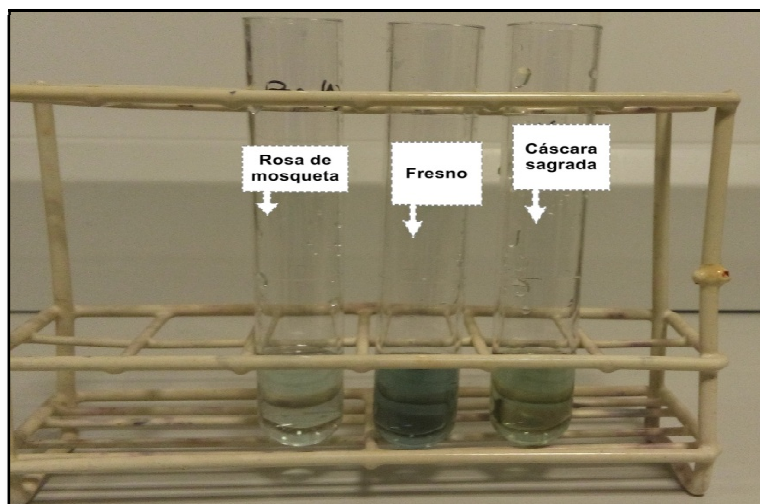


Imagen 4. Ensayo TPC en las muestras de plantas. Se observa una mayor intensidad en fresno, seguido de cáscara sagrada y rosa mosqueta.

3.5.2. *Contenido total de flavonoides*

El contenido total en flavonoides (total flavonoid content, TFC) fue determinado mediante el siguiente procedimiento (Gouveia, Castilho, 2011): 0.5 mL de muestra (2.5 mg/mL de extracto metanólico) fueron mezclados con 1.5 mL de metanol, 2.8 mL de agua, 0.1 mL de acetato potásico (1M) en metanol y 0.1 mL de tricloruro de aluminio (10% en metanol). La absorbancia se midió a los 30 minutos de reacción, durante ese tiempo la reacción se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 415 nm y se realizaron 3 repeticiones por extracto de planta. El contenido total de flavonoides se expresa como mg equivalentes de quercetina/100 g de extracto seco. A continuación se muestran dos imágenes de este ensayo.

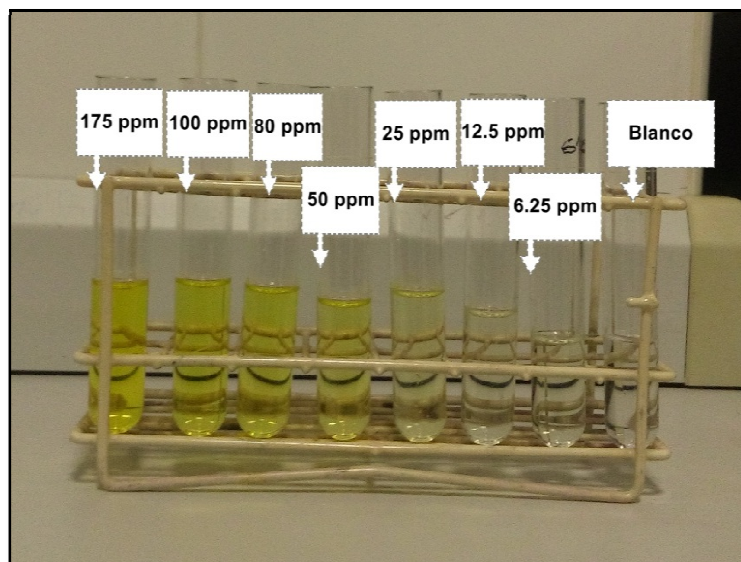


Imagen 5. Ensayo TFC en diferentes concentraciones de quercetina (patrón). Se observa un aumento en la intensidad del color al aumentar la concentración de quercetina debido a la formación del complejo flavonoide-Al.

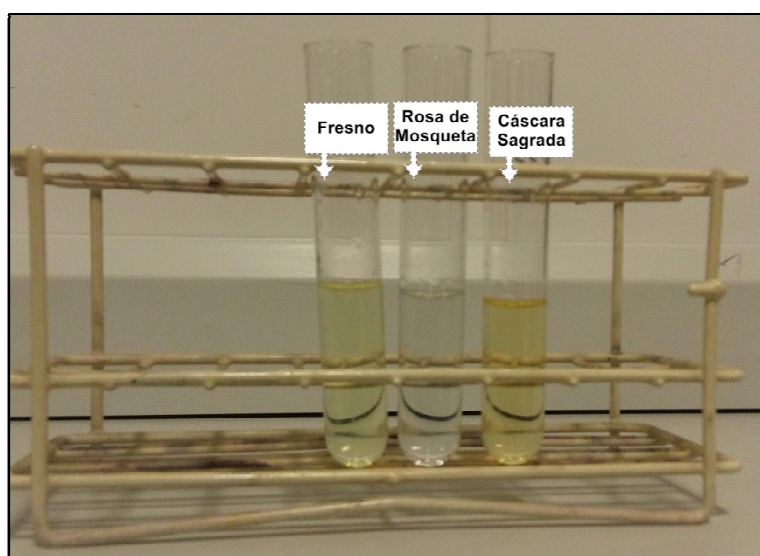


Imagen 6. Ensayo TFC en las muestras de plantas. Se observa una mayor intensidad en cáscara sagrada, seguida de fresno y rosa mosqueta.

3.5.3. Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))

En el procedimiento descrito en este ensayo (Gouveia, Castilho, 2011) se introdujeron algunas modificaciones. El radical $ABTS^{•+}$ fue generado a partir de 50 mL de 2 mM ABTS con 200 μ L de persulfato potásico 70 mM. Esta disolución se deja reaccionar durante 16 horas en oscuridad a temperatura ambiente y es estable durante 2 días. Para cada análisis, la disolución de $ABTS^{•+}$ se diluye con etanol (Ramírez, 2011) hasta que registre una absorbancia inicial de 0.700 ± 0.021 a 734 nm. A continuación se toma una alícuota de 100 μ L de extracto metanólico (10 mg/mL) y se adicionan 1.8 mL de $ABTS^{•+}$ y se mide el decrecimiento de la absorbancia a 734 nm al transcurrir 10 minutos de reacción. Durante ese tiempo se mantendrá la reacción en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron 3 repeticiones por extracto de planta. Los resultados se expresan en μ mol equivalentes trolox/100 g extracto seco.

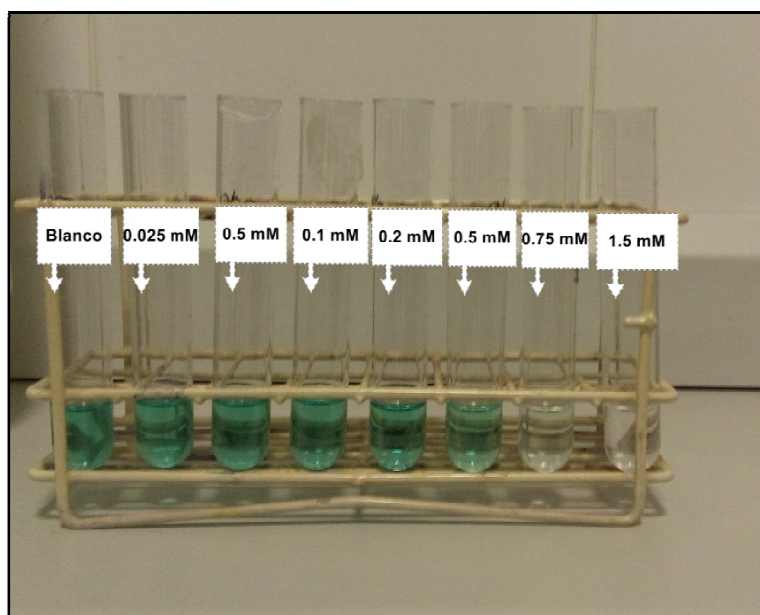


Imagen 7. Ensayo ABTS en diferentes concentraciones de trolox (patrón). Se observa una disminución en la intensidad del color al aumentar la concentración de trolox debido a la capacidad antioxidante de este compuesto.

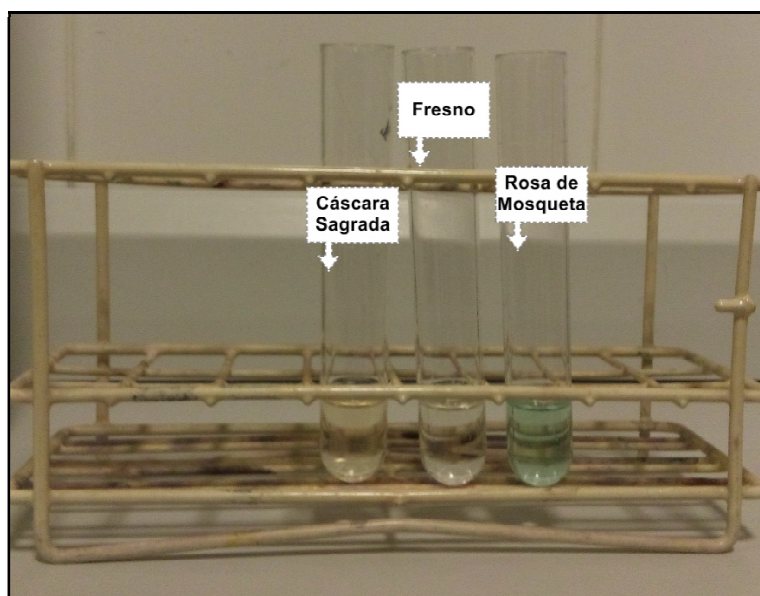


Imagen 8. Ensayo ABTS en las muestras de plantas. Se observa una menor intensidad en la muestra de fresno, seguido de cáscara sagrada y rosa mosqueta (mayor capacidad antioxidante en fresno, seguido de cáscara sagrada y rosa mosqueta).

3.5.4. Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

En este ensayo a 100 μ L de extracto metanólico (5 mg/mL) se le adicionaron 3.5 mL de 0.06 mM DPPH (la disolución de DPPH se prepara en metanol). Se mide el decrecimiento de la absorbancia a 516 nm transcurridos 30 minutos de reacción, durante este tiempo la muestra se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron 3 repeticiones por extracto de planta. Los resultados se expresan en μ mol equivalentes trolox/100 g extracto seco (Gouveia, Castilho, 2011; Spínola et al., 2014).

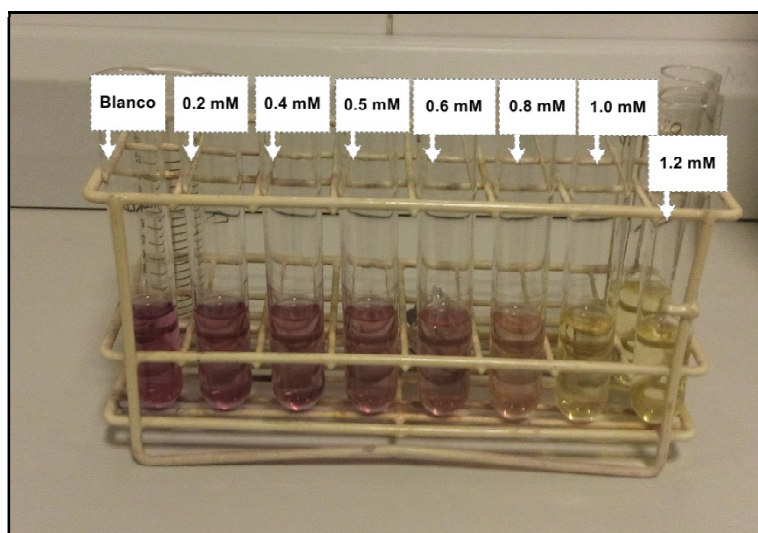


Imagen 9. Ensayo DPPH en diferentes concentraciones de trolox (patrón). Se observa un cambio de color (de púrpura a amarillo) al aumentar la concentración de trolox debido a la capacidad antioxidante de este compuesto.

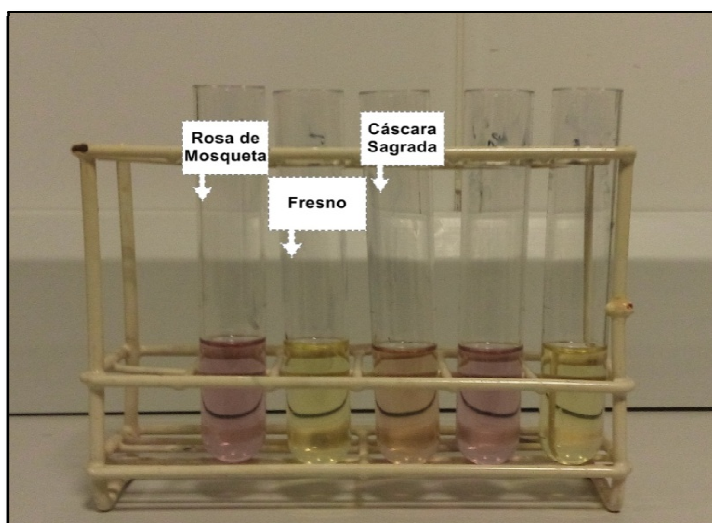


Imagen 10. Ensayo DPPH en las muestras de plantas. En este caso se observa un color distinto en cada tipo de extracto. La rosa mosqueta presenta un color púrpura, por lo tanto no posee una alta capacidad antioxidante. La muestra de fresno presenta color amarillento, por lo que presenta una capacidad antioxidante mayor que las otras muestras. La cáscara sagrada tiene un color anaranjado, por lo tanto, presenta una capacidad antioxidante menor que el fresno, pero mayor que la rosa mosqueta.

3.5.5. Ensayo radical Superóxido

El procedimiento seguido en este ensayo fue (Ewing, Janero, 1995): 25 μL de muestra (5 mg/mL) fueron mezclados con 200 μL de 0.1 mM EDTA, 62 μM NBT y 98 μM NADH en 50 mM tampón fosfato, pH 7.4. La reacción se inicia al adicionar 25 μL de 33 μM PMS (conteniendo 0,1 mM EDTA). Todas las disoluciones se prepararon en tampón fosfato. En este trabajo se adaptó este ensayo a un volumen final de 2 mL, respecto a los 0,25 mL del ensayo original. El ensayo original utilizaba una placa microtituladora a la hora de realizar las medidas espectrofotométricas, sin embargo, ese accesorio no está disponible en los laboratorios de la Universidad de Jaén, por lo que se adaptó el volumen final para poder medir en él espectrofotómetro. Se midió el decrecimiento de la absorbancia a 560 nm transcurridos 5 minutos de reacción. Durante ese tiempo se mantuvo la reacción en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron 3 repeticiones por extracto de planta. Los resultados se expresan en μmol equivalentes Trolox/100 g extracto seco.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos experimentales de los distintos ensayos se muestran a continuación. En concreto se exponen los valores de absorbancia y la recta de calibrado de los ensayos TPC y ABTS. De los restantes ensayos, por simplificar datos, solo se mostrará la recta de calibrado.

1. Contenido total en compuestos fenólicos

Ácido gálico (ppm)	Absorbancia minuto 30
0	0.1086
0.4	0.1183
1.1	0.1724
2.2	0.2834
3.3	0.3740
5	0.5295
7.6	0.7327
8.3	0.7898

Tabla 3. Medidas de absorbancia en el ensayo TPC.

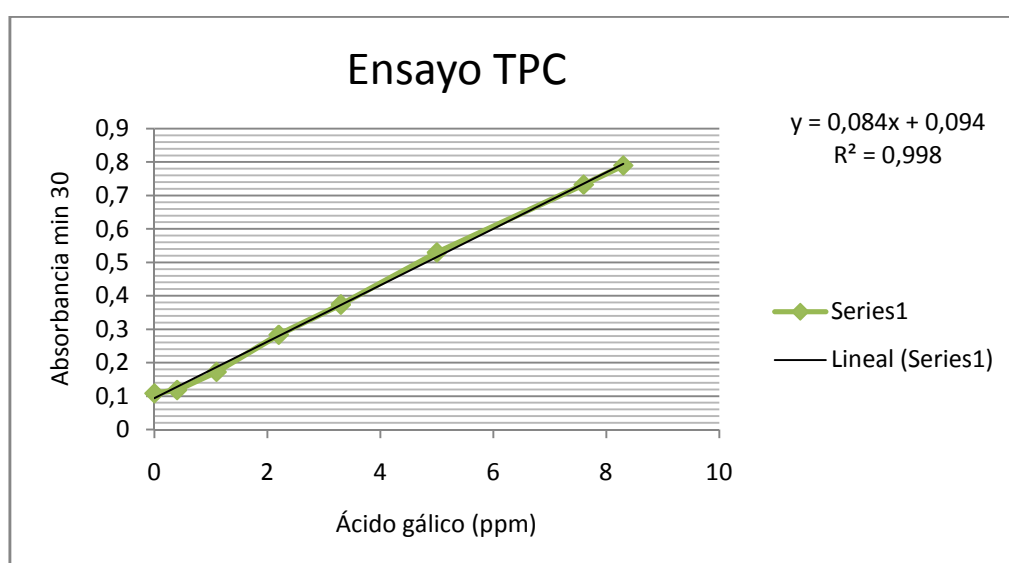


Figura 21. Recta de calibrado ácido gálico. Ensayo TPC.

2. Contenido total en flavonoides

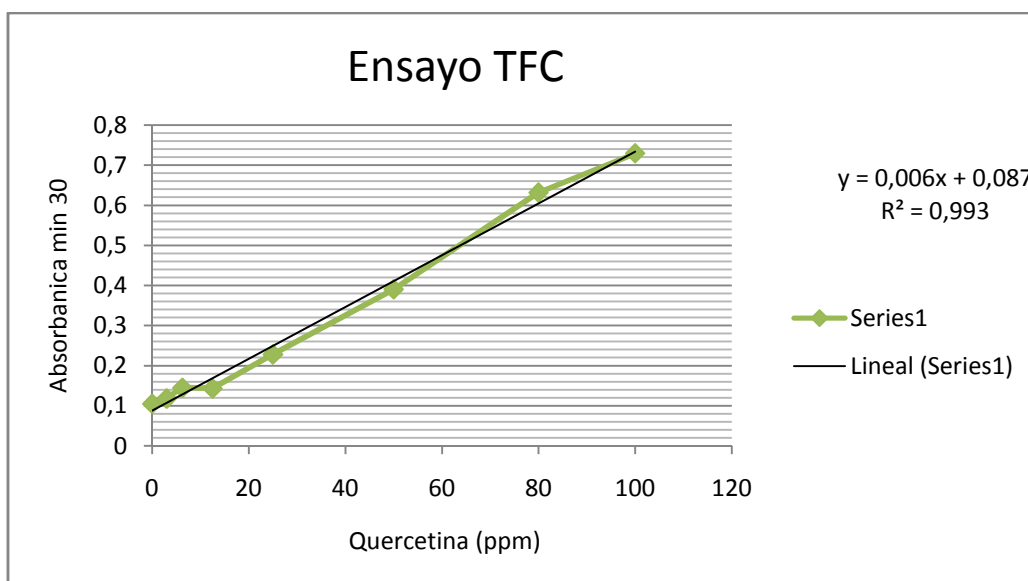


Figura. 22. Recta de calibrado quercetina. Ensayo TFC.

3. Ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)).

Trolox mM	Absorbancia minuto 10
0	0.6790
0.025	0.6755
0.05	0.6524
0.1	0.6350
0.2	0.6056
0.3	0.5386
0.5	0.4251
0.75	0.2383
1	0.1041

Tabla 4. Medidas de absorbancia del ensayo ABTS.

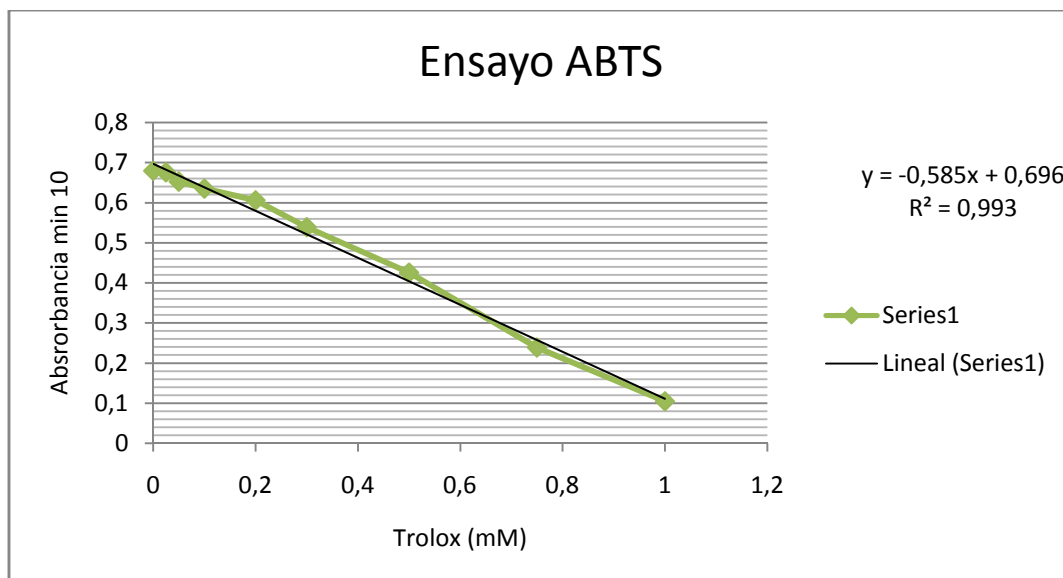


Figura 23. Recta de calibrado trolox. Ensayo ABTS.

4. Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

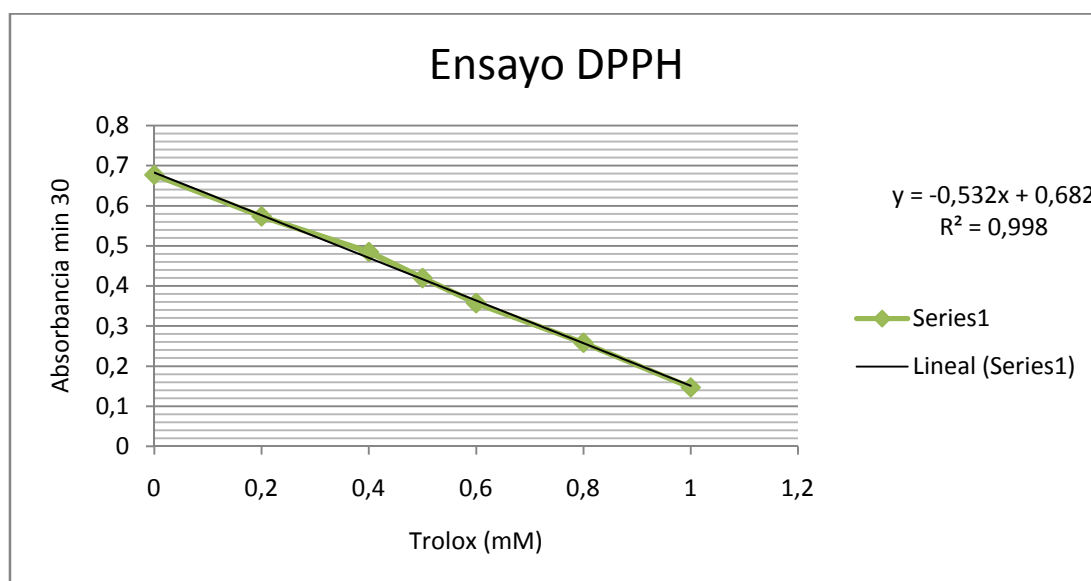


Figura 24. Recta de calibrado trolox. Ensayo DPPH.

5. Ensayo superóxido

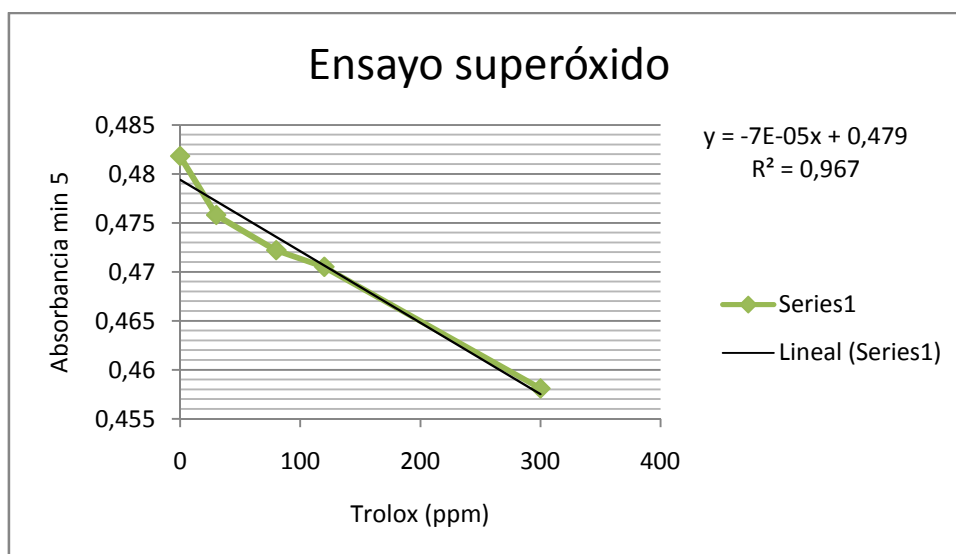


Figura 25. Recta de calibrado trolox. Ensayo superóxido.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se muestran en la Tabla 5. La planta con mayor contenido en compuestos fenólicos es el fresno seguido de la cáscara sagrada y la rosa mosqueta. Por lo tanto se prevé una mayor capacidad antioxidante en la muestra de fresno. Respecto al contenido total en flavonoides se espera que los valores obtenidos sean menores que los del ensayo anterior, ya que los flavonoides son una clase de compuestos fenólicos, además como se ha explicado en el apartado 2.3.3. el procedimiento a seguir para determinar el contenido total de flavonoides es específico para flavonas y flavonoles, por lo tanto no se mide el total, si no dos subclases. El contenido total de flavonoides es menor que el contenido total en compuestos fenólicos. La especie con mayor contenido en flavonoides es la cáscara sagrada, esto explica los valores de capacidad antioxidante obtenidos.

	TPC	TFC	ABTS	DPPH
<i>Fraxinus oxycarpa</i>	59.67 ± 2.7	17.89 ± 0.62	5.28 ± 0.30	4.50 ± 0.12
<i>Rhamnus purshiana</i>	41.79 ± 1.38	19.51 ± 0.86	5.10 ± 0.17	3.22 ± 0.13
<i>Rosa aff. rubiginosa L.</i>	14.79 ± 0.29	2.99 ± 0.22	3.08 ± 0.07	2.06 ± 0.01

Tabla 5. Resultados obtenidos en los ensayos realizados en las tres especies de plantas. Los resultados en el TPC están expresados en mg ácido gálico/g extracto seco; en el TFC en mg quercetina/g extracto seco; y los ensayos ABTS y DPPH en g equivalentes trolox/100 g extracto seco.

Como se ha comentado anteriormente la especie que debe presentar una mayor capacidad antioxidante es el fresno. Este hecho se confirma en los ensayos ABTS y DPPH.

Respecto al ensayo superóxido, los datos de absorbancia tomados de las muestras no se pueden interpolar en la recta de calibrado obtenida a partir de las diferentes concentraciones de patrón (trolox). Los valores de absorbancia de la rosa mosqueta y cáscara sagrada se quedan en el límite inferior y superior, respectivamente, de la recta de calibrado. Por este motivo los datos obtenidos en este ensayo no se muestran en la Tabla 5.

Aun así se observa un amplio decrecimiento de la absorbancia en la muestra fresno. Esto estaría en consonancia con los datos obtenidos en los otros ensayos. En el caso de la cáscara sagrada y rosa mosqueta los valores de absorbancia no se asemejan a los valores obtenidos en los demás ensayos, ya que la rosa mosqueta presenta un decrecimiento de absorbancia mayor que el de la cáscara sagrada. Todo ello hace que este ensayo no se tenga en consideración a la hora de obtener unas conclusiones generales de las distintas muestras empleadas.

Por último, comentar que este ensayo se podría haber conseguido empleando distintas cantidades de muestra o modificando la recta de calibrado. Pero no se llegó a realizar por falta de tiempo.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se han comparado con los resultados de otras plantas similares. En concreto los resultados de fresno se han comparado los datos de *Fraxinus rhynchophylla* Hence aportados en el trabajo de (Lin et al., 2008). *Fraxinus rhynchophylla* Hence pertenece al mismo género que *Fraxinus oxycarpa* (especie estudiada en este trabajo), por lo que los valores de TPC y ABTS aportados nos proporcionan una idea de los valores a los que se debería aproximar la muestra estudiada. Los valores de TPC y ABTS de *Fraxinus rhynchophylla* Hence son 40.27 mg ácido gálico/g y 166.09 ± 0.34 μ mol trolox/g, respectivamente. Los valores de estos ensayos en *Fraxinus oxycarpa* son 59.67 ± 2.70 mg ácido gálico/g y 211.01 ± 11.89 μ mol trolox/g. Los valores, por tanto de ambas especies son similares. La especie *Fraxinus oxycarpa* posee un mayor contenido en compuestos fenólicos y una capacidad antioxidante mayor que la especie *Fraxinus rhynchophylla* Hence.

Respecto a la cáscara sagrada sus valores de TPC y TFC se ha comparado con los de *Rhamnus rupestris* Scop aportados por el trabajo (Kremer et al., 2012). Los valores de TPC y TFC de esta especie son 30.8 ± 1.4 mg ác. gálico/g y 17.4 ± 0.7 mg quercetina/g, respectivamente. Los valores de *Rhamnus purshiana* son 41.79 ± 1.38 mg ác. gálico/g en TPC y 19.51 ± 0.86 mg quercetina/g en TFC. La especie *Rhamnus purshiana* presenta un mayor contenido en compuestos fenólicos y flavonoides.

En el trabajo de Kremer y colaboradores también se ha determinado la actividad antioxidante de dicha especie de planta, en concreto se han realizados los ensayos DPPH y β -caroteno-ácido linoleico junto a ensayos que miden la capacidad reductora de los extractos y la capacidad quelante. Estos ensayos completan los estudios de actividad antioxidante en plantas. Respecto al ensayo DPPH, no podemos comparar los resultados con los obtenidos en este estudio ya que se expresan de forma distinta. En el trabajo de Kremer y colaboradores se expresa en EC₅₀. Este parámetro expresa la concentración de antioxidante a la que se neutraliza el 50% de DPPH (radical). Para determinar este parámetro debemos realizar medidas de la absorbancia en distintos tiempos. En nuestro caso hemos medido en el inicio de la reacción y a los 30 minutos de reacción (ensayo DPPH).

Los resultados de TPC y TFC de *Rosa rubiginosa* L. se han comparado con los resultados por Sytar et al. En dicho trabajo los valores de TPC y TFC son 4.93 ± 0.960 mg de ácido gálico/g extracto y 2.46 ± 0.002 mg quercetina/g extracto, respectivamente. En los ensayos realizados en este trabajo se ha obtenido un valor de TPC de 14.79 ± 0.29 mg ác.gálico/g extracto seco y de TFC 2.99 ± 0.22 mg quercetina/g extracto seco. Los valores de este trabajo se asemejan con los del trabajo comparado.

Por último se han comparado los valores de la actividad antioxidante las muestras analizadas en este trabajo con los de 8 especies características de té verde (Jin et al., 2016). Los valores de TPC en las especies de té verde están en un rango de 14.97-18.72 g ác.gálico/100 g muestra. Estos valores son muy superiores a los de las muestras analizadas. Respecto a los valores de los ensayos ABTS y DPPH el rango de valores del ensayo ABTS es 166.862-236.40 mmol Trolox y 140.13-221.21 mmol trolox, respectivamente. Estos valores son muy superiores a los obtenidos en los ensayos.

5. CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha determinado el contenido fenólico total (ensayo Folin-Ciocalteu), el contenido total de flavonoides, y la actividad antioxidante (ensayo ABTS, DPPH y superóxido) de tres especies de plantas utilizadas en la elaboración de infusiones. De las especies estudiadas *Fraxinus oxycarpa* es la que presenta un mayor contenido en compuestos fenólicos y una mayor capacidad antioxidante. La especie *Rhamnus purshiana* presenta un mayor contenido en flavonoides, resultado que explica que sea la segunda especie con mayor capacidad antioxidante. Respecto a la *Rosa rubiginosa* L. su contenido en compuestos fenólicos y flavonoides es relativamente bajo, lo cual se ve reflejado en su capacidad antioxidante.

Comparando los resultados obtenidos con las plantas estudiadas y aquellas relativas a distintas especies de té verde (especies con alta capacidad antioxidante), llegamos a la conclusión de que nuestras especies tienen una capacidad antioxidante inferior a la del té. Aun así, es necesario destacar las buenas propiedades nutricionales y antioxidantes de las especies *Fraxinus oxycarpa* y *Rhamnus purshiana*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Arango Mejía, M.C. *Plantas medicinales: botánica de interés biológico*. Universidad de Caldas: Manizales, 2006.
- Benaiges, A. Aceite de Rosa mosqueta. Composición y aplicaciones dermocosméticas. *Offarm*. **2008**, 27 (6), 94–97.
- Castro-Alves, V. C.; Cordenunsi, B. R. Total soluble phenolic compounds quantification is not as simple as it seems. *Food Anal. Methods*. **2014**, 8 (4), 873–884.
- Chang, C.C.; Yang, M.H.; Wen, H.M.; Chern J.-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* **2002**, 10 (3), 178–182.
- Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26 (8), 1001–1043.
- De Gálvez, M.V. Antioxidantes en fotoprotección, ¿realmente funcionan?. *Actas Dermosifiliogr.* **2010**, 101 (3), 197–200.
- De Torres Sánchez, A. Influencia de los factores tecnológicos en la calidad y en el contenido de antioxidantes del aceite de oliva virgen. Tesis doctoral, Universidad de Jaén, 2013.
- Ercisli, S. Chemical composition of fruits in some Rosa (Rosa Spp.) species. *Food Chem.* **2007**, 104 (4), 1379–1384.
- Ewing, J.F.; Janero, D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal. Biochem.* **1995**, 232, 243–248.
- Font Quer, P. *Plantas medicinales: el Dioscórides renovado*. Ed. Península: Barcelona, 2002.
- Gil Ruiz, P. *Productos naturales*. Universidad de Navarra: Pamplona, 2002.
- Gómez Romero, M. Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2010.
- Gutteridge, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* **1995**, 41, 1819–1828.

- Gouveia, S.; Castilho, P. C. Antioxidant potential of *Artemisia argentea* L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition. *Food Res. Int.* **2011**, *44* (6), 1620–1631.
- Hornero-Méndez, D.; Mínguez-Mosquera, M. I. Carotenoid pigments in *Rosa mosqueta* hips, an alternative carotenoid source for foods. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (3), 825–828.
- Jin, L.; Li, X.B.; Tian, D.Q.; Fang, X.P.; Yu, Y.M.; Zhu, H.Q.; Ge, Y.Y.; Ma, G.Y.; Wang, W.Y.; Xiao, W.F.; et al. Antioxidant properties and color parameters of herbal teas in China. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *87*, 198–209.
- Kostova, I.; Iossifova, T. Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia.* **2007**, *78* (2), 85–106.
- Kasprzak, M. M.; Erxleben, A.; Ochocki, J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Adv.* **2015**, *5* (57), 45853–45877.
- Kremer, D.; Kosalec, I.; Locatelli, M.; Epifano, F.; Genovese, S.; Carlucci, G.; ZovkoKoncic, M. Anthraquinone profiles, antioxidant and antimicrobial properties of *Frangula rupestris* (Scop.) Schur and *Frangula alnus* Mill. Bark. *Food Chem.* **2012**, *131* (4), 1174–1180.
- Li, H. B.; Wong, C. C.; Cheng, K. W.; Chen, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT - Food Sci. Technol.* **2008**, *41* (3), 385–390.
- Litescu, S. C.; Eremia, S. A. V.; Tache, A.; Vasilescu, I.; Radu, G. L. *The use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assays in the assessment of beverages' antioxidant properties.* Ed. Elsevier, 2014.
- Mammen, D.; Daniel, M. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chem.* **2012**, *135* (3), 1365–1368.
- Mathews, C. K.; Holde, K. E.v.; Ahern, K.G. *Bioquímica.* Ed. McGraw Hill/Interamericana: Madrid, 2003.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84* (4), 407–412.
- Muñoz, A.; Ramos, F. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Rev. Horiz. Médico.* **2007**, *7* (1), 23–31.

- Nimse, S. B.; Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *R. Soc. Chem.* **2015**, 5 (35), 27986–28006.
- Oliveras López, M. J. Calidad del aceite de oliva virgen extra. Antioxidantes y función biológica. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2005.
- Pérez-Jiménez, J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. Efecto de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. Tesis Doctoral, Universidad autónoma de Madrid, 2011.
- Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. *Antioxidantes de los alimentos: aplicaciones prácticas*. Ed, Acribia: Zaragoza, 2004.
- Ponti, V.; Dianzani, M. U.; Cheeseman, K.; Slater, T. F. Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chem. Biol. Interact.* **1978**, 23 (3), 281–291.
- Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (10), 4290–4302.
- Pyrzynska, K.; Pełkal, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Anal. Methods.* **2013**, 5 (17), 4288–4295.
- Ramírez Anaya, J. Influencia de las técnicas culinarias sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en hortalizas de la dieta mediterránea. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2011.
- Sánchez-Paniagua López, M. Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2008.
- Sánchez-Rangel, J. C.; Benavides, J.; Heredia, J. B.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D. A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods.* **2013**, 5(21), 5990-5999.
- Schaich, K. M.; Tian, X.; Xie, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J. Funct. Foods.* **2015**, 18, 782–796.
- Shahidi, F.; Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods.* **2015**, 18, 757–781.

- Spínola, V.; Llorent-Martínez, E. J.; Gouveia, S.; Castilho, P. C. *Myrica faya*: A new source of antioxidant phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (40), 9722–9735.
- Sytar, O.; Hemmerich, I.; Zivcak, M.; Rauh, C.; Brestic, M. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi J. Biol. Sci.* **2016**.