



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Determinación de la composición química y la capacidad antioxidante de un complemento alimenticio basado en hoja de olivo

Alumno: David Cañada Blanca

Junio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

GRADO EN QUÍMICA
Trabajo Fin de Grado

Determinación de la composición química y la capacidad antioxidante de un complemento alimenticio basado en hoja de olivo

David Cañada Blanca

Jaén, junio de 2019

Fdo. David Cañada Blanca

ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
2.1. Compuestos fenólicos.....	3
2.1.1. Clasificación.....	4
2.2. Actividad antioxidante.....	10
2.3. Contenido total en polifenoles (TPC).....	11
2.4. Contenido total en flavonoides (TFC).....	12
2.5. Evaluación de la capacidad antioxidante.....	13
2.5.1. Ensayo ABTS.....	13
2.5.2. Ensayo DPPH.....	14
3. Parte experimental.....	15
3.1. Reactivos.....	15
3.2. Instrumentación utilizada.....	16
3.3. Preparación de la muestra.....	17
3.4. Extracción de los compuestos fenólicos.....	17
3.5. Contenido total en polifenoles (TPC).....	18
3.6. Contenido total en flavonoides (TFC).....	19
3.7. Evaluación de la capacidad antioxidante.....	21
3.7.1. Ensayo ABTS.....	21
3.7.2. Ensayo DPPH.....	22
3.8. Análisis cromatográfico.....	24
4. Resultados.....	24
4.1. Contenido total en polifenoles (TPC).....	24
4.2. Contenido total en flavonoides (TFC).....	26
4.3. Ensayos ABTS y DPPH.....	27
4.4. Comparación de los métodos de extracción.....	30
4.5. Composición química.....	32
5. Conclusiones.....	36
6. Bibliografía.....	37

1. RESUMEN

Este trabajo de fin de grado se basa en la determinación del contenido total de flavonoides y polifenoles, así como de la capacidad antioxidante, de un complemento alimenticio basado en hoja de olivo, así como la determinación de la composición química mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). Se han preparado extractos acuosos y metanólicos para llevar a cabo la comparación entre ambos extractantes.

Los procedimientos utilizados se basan en espectrofotometría, y son los siguientes: ensayos DPPH y ABTS para la capacidad antioxidante, ensayo de Folin Ciocalteu para la determinación del contenido total en polifenoles (TPC) y ensayo mediante la formación de complejos flavonoide-Al para la determinación del contenido total de flavonoides (TFC).

Por otra parte, para la determinación de la composición química de la muestra se ha utilizado HPLC-MS para identificar los compuestos mayoritarios.

ABSTRACT

This Final Year Project is based on the determination of total flavonoid and phenolic content, as well as the antioxidant capacity, of a supplementary material based on olive leaves extracts. The chemical composition was also assessed by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS). Aqueous and methanolic extracts were prepared to discuss the difference between both extractants.

The following spectrophotometric assays were performed: ABTS and DPPH for antioxidant activity, Folin Ciocalteu for the determination of total phenolic content (TPC) and the complexation between flavonoids and Al for total flavonoid content (TFC).

Finally, the main compounds present in the analyzed extracts (phenolics) were characterized by HPLC-MS.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son uno de los constituyentes más importantes de las plantas y los cuales les otorgan numerosos beneficios. Están formados por un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividad, aunque generalmente se presentan en forma de glucósidos en los extractos de verduras, frutos y otros derivados de plantas ricos en polifenoles. Estas sustancias presentan una variedad de actividades biológicas como propiedades organolépticas, actividades anticancerígena, antiinflamatoria, antihipertensiva, estrogénica, antioxidante y protección contra enfermedades cardiovasculares. Por esto, un consumo de compuestos fenólicos por parte del ser humano está asociado a efectos positivos en la salud.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas y su cantidad depende de muchos factores como la especie vegetal, la maduración, condiciones de cultivo o el procesado que ha sufrido la planta (pelado, hervido, frito...). Un detalle es la distribución de los polifenoles en las plantas, a nivel celular se observan mayores cantidades en capas exteriores (Romero, 2012).

La función de los compuestos fenólicos en los vegetales son muchas, entre las que destacan el crecimiento y reproducción de estas, así como agentes protectores frente a parásitos, temperaturas extremas, radiación UV, etc (Muñoz et al., 2007).

En cuanto a su estructura, los compuestos fenólicos contienen un número muy variable de grupos hidroxilos. Según su estructura se pueden clasificar en polifenoles, ácidos fenólicos y flavonoides (Ochoa & Ayala, 2004).

Por otra parte, los flavonoides son metabolitos secundarios de los polifenoles que desarrollan la función de pigmentos naturales presentes en las plantas, protegiéndolas del daño causado por agentes oxidantes. Fueron descubiertos por el ganador del premio Nobel, Szent-Gyorgy en 1930.

Como se menciona anteriormente, los compuestos fenólicos están presentes en diversidad de vegetales y, por tanto, en alimentos de origen vegetal, como el café, el té o el cacao, además de en frutas y verduras, aunque en estos últimos en cantidades

menores. Otros alimentos con presencia de compuestos fenólicos son el aceite de oliva, los frutos secos y las especias (Crozier et al., 2009).

2.1.1. Clasificación

Su clasificación se da según su estructura química:

- Fenoles simples

Estos compuestos tienen la característica de poseer en su estructura un anillo aromático y dos o tres grupos hidroxilo. Además de la capacidad antioxidante, tienen también más funciones biológicas, como antibióticos y antiparasitarios. Algunos ejemplos de estos compuestos serían el catecol y el floroglucinol (Sánchez-Paniagua, 2008; Gil, 2002).

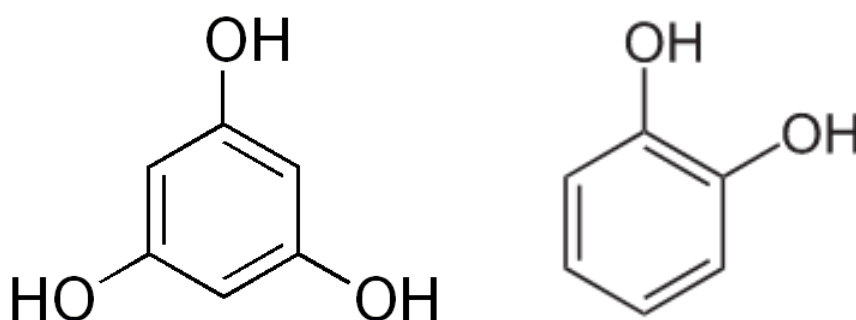


Figura 1. Floroglucinol (izquierda) y catecol (derecha).

- Ácidos fenólicos

En este grupo, además del anillo aromático y el grupo hidroxilo común en todos los compuestos fenólicos, en su estructura se encuentra un grupo carboxílico. Este grupo se puede dividir a su vez en ácidos hidroxibenzoicos, moléculas derivadas del ácido benzoico, como por ejemplo el ácido salicílico, y en ácidos hidroxicinámicos, derivadas del ácido benzoico, como por ejemplo el ácido cafeico.

La capacidad antioxidante de este grupo de compuestos fenólicos está estrechamente relacionada con el número de hidroxilos existentes en el anillo aromático y la separación de estos con el grupo carbonilo, siendo la actividad antioxidante mayor cuantos más grupos hidroxilos presente la estructura y cuanto mayor estén alejados estos del grupo carbonilo. Cabe mencionar también que los ácidos hidroxibenzoicos son menos oxidantes que los ácidos hidroxicinámicos.

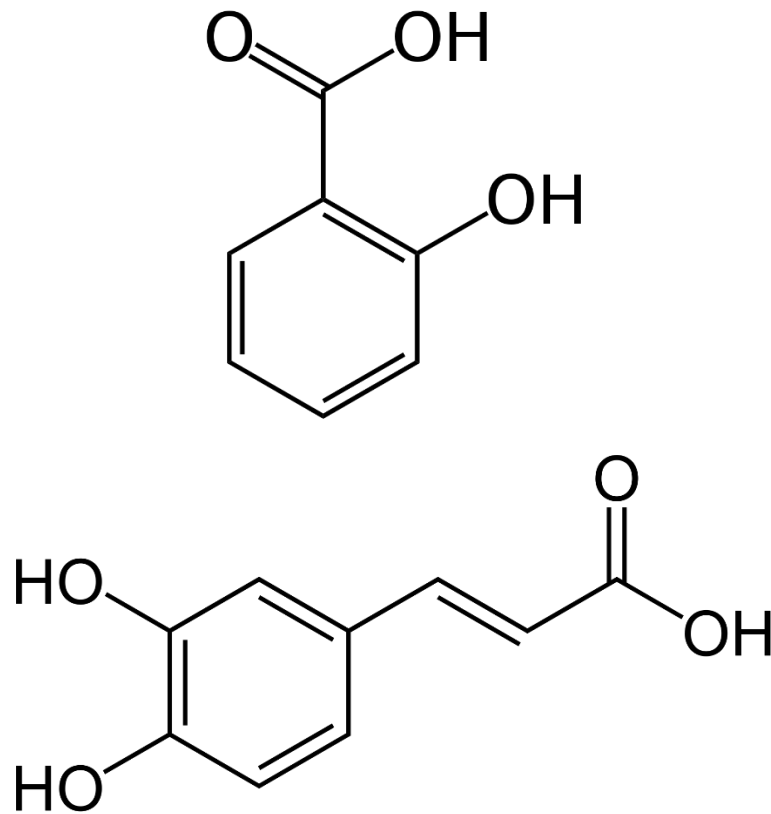


Figura 2. Ácido salicílico (arriba) y ácido cafeico (abajo)

- Cumarinas

Este grupo de compuestos están formados por un anillo aromático unido a un heterociclo de oxígeno. Son considerados fenoles cuando hay un grupo hidroxilo unido al esqueleto de una cumarina (figura 3).

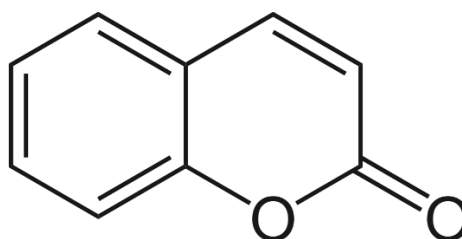


Figura 3. Cumarina

Estos compuestos se encuentran en variedad de plantas, pero sobre todo en las familias de las umbelíferas y rutáceas (Gil, 2002). En las plantas, presentan una inhibición contra el crecimiento de algunos patógenos (Sullivan, López-González et al., 2000). La cumarina más simple es la que forma parte del aceite de bergamota (Ávalos García y Pérez-Urria, 2009).

Todas las cumarinas presentan un grupo hidroxilo en la posición 7 libre, excepto la cumarina. Aunque algunas son tóxicas, la mayoría tienen un efecto farmacológico (Sánchez-Paniagua, 2008).

- Flavonoides

En cuanto a su estructura, constan de un anillo A, un anillo B y 3 átomos que unen los dos anillos. La estructura se puede presentar como un heterociclo (pirona), los cuales son los más abundantes (flavonas, flavonoles, antocianinas), o como una cadena abierta (chalconas). También presentan varios grupos hidroxilos como glucósidos, unidos a una estructura de anillo.

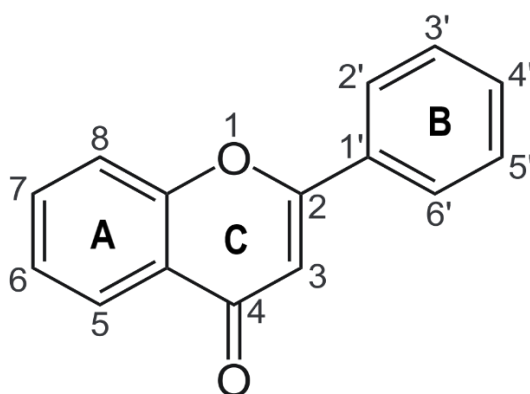


Figura 4. Estructura de los flavonoides.

La actividad antioxidante de los flavonoides está relacionada con su capacidad para quelar metales y captar radicales libres. Por tanto, el consumo de los flavonoides o de alimentos con alto contenido en ellos proporcionan beneficios para la salud por su capacidad antioxidante, ya que esto supone mejoras en las enfermedades cardiovasculares, cáncer o procesos de envejecimiento (Sánchez-Paniagua, 2008).

Estos compuestos están presentes en multitud de alimentos, como frutas y verduras, vino, té, miel... En cuanto a sus funciones en las plantas, sirven como bactericidas y antifúngicos, además de otras funciones más. Los flavonoides son también los responsables de la coloración de las plantas y, por tanto, de algunos alimentos.

- Estilbenos

Estos compuestos presentan una estructura de 2 anillos fenólicos unidos mediante 2 átomos de carbono. Un compuesto muy conocido de esta familia es el trans-resveratrol, presenta en la uva y, por tanto, en los derivados de esta, como el vino, el cual ayuda a la prevención de enfermedades cardiovasculares y con propiedades antiinflamatorias y antitumorales (Sánchez-Paniagua, 2008).

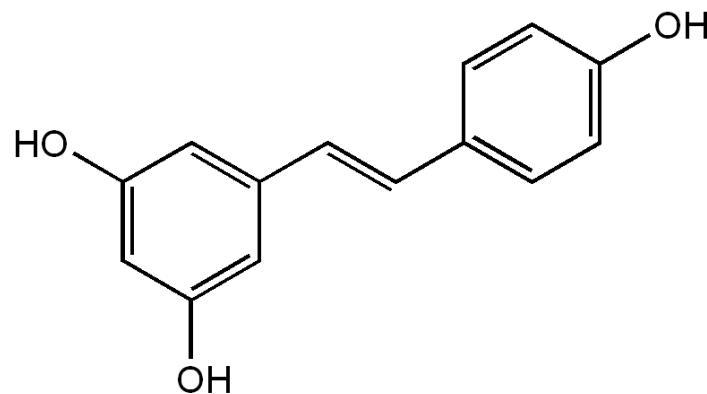


Figura 5. Resveratrol.

- Taninos

Estos son un tipo de polifenoles que se caracterizan por un alto peso molecular. Son compuestos poliméricos y su función es la de unirse a proteínas y provocar su desnaturalización. Existen dos tipos de taninos:

- Taninos hidrolizables: provenientes de la esterificación de ácidos fenólicos con azúcares o polioles, por tanto, son polímeros heterogéneos. Se hidrolizan con facilidad.
- Taninos condensados: polímeros formados por unidades de flavan-3-ol unidas por enlaces C-C que no se pueden oxidar, pero si hidrolizar por un ácido fuerte.

Algunos taninos pueden ser compatibles biológicamente con el ser humano, pero la mayoría suelen ser tóxicos debido a su acción con las proteínas (Sánchez-Paniagua, 2008).

- Lignanós

Los lignanos son compuestos fenólicos se basan en un esqueleto de carbono con dos unidades de fenil-propano unidas entre sí mediante los carbonos centrales de la cadena. Este grupo, al igual que todos los polifenoles, poseen beneficios para la salud como actividad antitumoral, insecticida y antivírica (Gil, 2002).

- Secoiridoides

Los iridoides son unos derivados del terpeno, formados por un anillo de iridano. Estos compuestos, cuando se encuentran con estructuras abiertas se denominan secoiridoides, dándose ésta apertura por la escisión del enlace entre los carbonos 1 y 5 del esqueleto de iridano. Los secoiridoides son los principales antioxidantes del aceite de oliva virgen y son los compuestos que contribuyen a las características organolépticas de éste (como el amargor o el picante).

En este trabajo se ha realizado un estudio de la composición, contenido total en polifenoles y flavonoides, y de la capacidad antioxidante de unos comprimidos de hoja de olivo, en las cuales sabemos que el antioxidante mayoritario en la muestra

es la oleuropeína, el cual está presente en mayor cantidad, tanto en el fruto, la aceituna, como en la hoja del olivo.

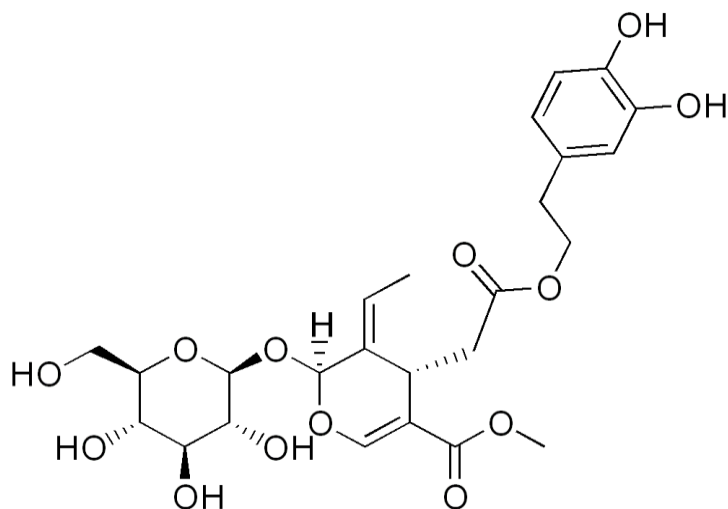


Figura 6. Molécula de oleuropeína.

La oleuropeína es un glucósido secoiridoide esterificado con presencia de un alcohol fenilpropanoide. Como hemos dicho antes, es el componente mayoritario de la hoja del olivo, incluso es muy abundante en el fruto y en el aceite de oliva virgen, siendo el responsable del amargor típico de este último. También se presenta en otras estructuras, como diferentes isómeros, glucósido de oleuropeína o como aglicona, como más adelante podremos ver en los resultados.

Gracias a su gran capacidad antioxidante, este compuesto proporciona múltiples beneficios a la salud, además de que ayuda a que la conservación del aceite de oliva virgen extra ya que lo protege de la oxidación natural. Entre los beneficios para la salud, el que más destaca es el de la reducción de la presión arterial. De hecho, la venta de comprimidos comerciales como la muestra estudiada en este trabajo está destinada a controlar y mejorar la presión arterial.

Otro ejemplo de secoiridoide es el ligstrósido, presente también en la muestra de este trabajo. Este es un compuesto que se encuentra en el aceite de oliva virgen, el cual interviene en el sabor picante de éste.

2.2. Actividad antioxidante

En primer lugar, para entender la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos hay que conocer las sustancias antioxidantes. Éstas son sustancias que previenen los efectos adversos para la salud de los radicales libres (Patthamakanokporn et al., 2008) y se pueden encontrar en los alimentos de origen vegetal.

Además de estas sustancias, los propios organismos disponen de sistemas de protección contra los radicales libres, como el glutatión, un tripéptido generado por los organismos. Otros compuestos endógenos con capacidad antioxidante son el ácido úrico, la albúmina o la bilirrubina entre otros.

Los antioxidantes pueden ser clasificados según su mecanismo de reacción (Oliveras, 2005) en:

- Primarios: Su eficacia se basa en que imposibilitan la formación de los radicales libres. Ejemplos de ellos serían la vitamina C, E y algunos polifenoles como el resveratrol.
- Secundarios: Interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres, como por ejemplo los carotenos.
- Terciarios: Se encargan de reparar el daño causado por los radicales libres a las moléculas. Ejemplo: el selenio.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está estrechamente relacionada con su estructura, como por ejemplo la posición y el número de los grupos hidroxilos, la glicosilación y otras sustituciones.

En los flavonoides existen tres grupos estructurales que terminan la capacidad antioxidante de la molécula:

- Una estructura catecol en el anillo B.
- Dobles enlaces 2,3 en conjugación con un 4-oxo de un grupo carbonilo en el anillo C.
- Grupos hidroxilo en las posiciones 4 y 5.

Una de las moléculas que presentan estos tres grupos es la quercetina, por lo que presenta una gran actividad antioxidante.

Otra característica importante a la hora de saber la capacidad antioxidante de una molécula es su capacidad para la quelación de metales. Esta actividad quelante necesita la presencia de una configuración 3',4'-dihidroxi, un grupo hidroxilo en C3 y C5 y una quinona en C4. La hidrogenación del doble enlace en C2-C3 determinará la pérdida de la actividad quelante de metales debido a que se pierde el reagrupamiento de electrones que se presenta durante la formación del complejo metal-flavonoide. (Pokorny et al., 2004; Muñoz, Ramos, 2007; Kasprzak et al., 2015).

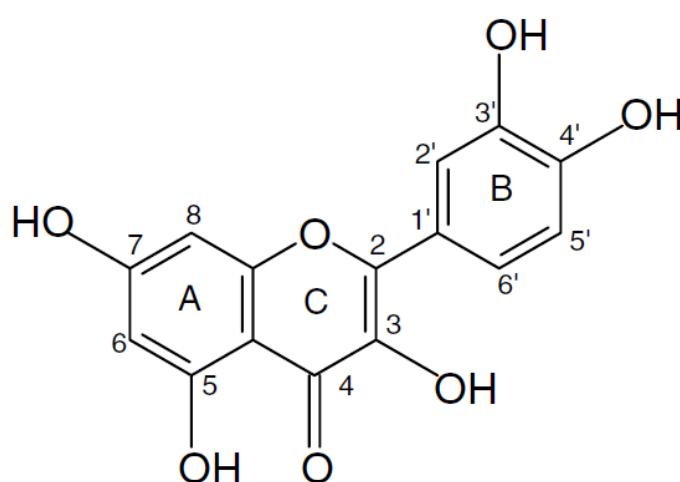


Figura 7. Quercetina

2.3. Método contenido total en polifenoles (TPC)

Para la determinación del contenido total en polifenoles (TPC) se usó el ensayo de Folin-Ciocalteu, el método más empleado para este fin. Este ensayo se basa en la reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu, la cual produce una coloración azul que puede ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm.

El reactivo de Folin-Ciocalteu está compuesto por una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato. Este reactivo no sólo reacciona con los polifenoles, si no con toda sustancia reductora, además, el molibdato es más fácil de reducir que el tungstenato, por lo que la reacción de transferencia de electrones se dará entre los reductores (polifenoles) y el molibdato.

La reacción entre el reactivo de Folin-Ciocalteu y los compuestos fenólicos tiene que darse en condiciones básicas (pH 10) con el fin de que se genere un ión fenolato a partir de la disociación de los polifenoles, el cual es el que reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Hay que tener en cuenta que este método tiene algunos inconvenientes, y es que los extractos de plantas contienen sustancias que pueden interferir en los resultados, ya que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, concluyendo en unos resultados erróneos. Estos compuestos son reductores, como el ácido ascórbico, azúcares reductores (fructosa y glucosa) y aminoácidos.

2.4. Método contenido total en flavonoides (TFC)

El método consiste en el uso de AlCl_3 para la formación de complejos con los flavonoides, por lo que el ensayo se basa en la capacidad quelante de los flavonoides. Los complejos formados presentan absorbancia a 420 nm, siendo de color amarillo.

El método fue desarrollado en un principio por Woisky y Salantino, posteriormente modificado por Chang et al, 2002, y es un método utilizado específicamente para la determinación del contenido en flavonoides. En esta modificación se adicionó acetato potásico después del cloruro de aluminio y su posterior medición de la absorbancia a 415 nm. La quercetina es usada como estándar en los dos métodos, siendo este último método el que ha sido usado en este trabajo.

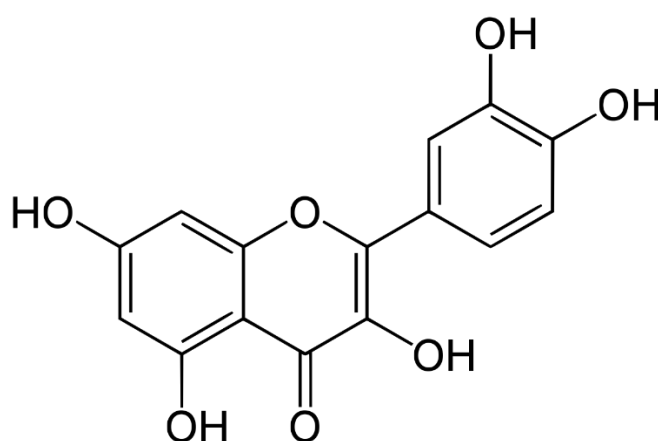


Figura 11. Molécula de quercetina.

Mammen y colaboradores realizaron una evaluación de los procedimientos de Woisky y Salantino y Chang y colaboradores en varios flavonoides más comunes en los vegetales, y determinaron que los ensayos no son fiables para determinar el contenido total en flavonoides para muestras que son desconocidas. Por otra parte, no se tiene en cuenta que, en vegetales, los flavonoides están en forma de glucósidos, lo cual dificulta la quelación con el AlCl_3 .

2.5. Evaluación de la capacidad antioxidante.

2.5.1. Ensayo ABTS

Este ensayo fue desarrollado por Miller y colaboradores (Miller et al, 1993), siendo un método simple y eficaz para la determinación de la capacidad antioxidante. El ensayo en cuestión consiste en medir la capacidad de los antioxidantes a partir de la captación de radicales libres, los cuales en este caso es el radical catiónico $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Este es generado a partir de ABTS en presencia de fuertes agentes antioxidantes.

El fundamento del ensayo consiste en la cuantificación de la decoloración del radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ de color azulado con un máximo de absorción a 734 nm, que decrece en intensidad con la presencia de antioxidantes.

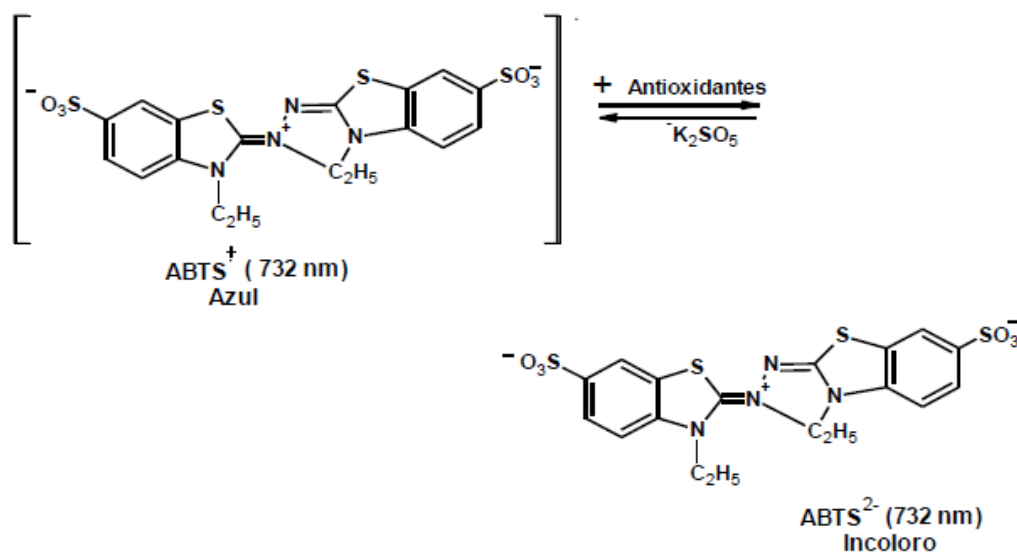


Figura 8. Estructura del $\text{ABTS}^{+\cdot}$ antes y después de la reacción con el antioxidante (Zuleta et al., 2009).

En cuanto a la generación del radical $ABTS^{•+}$ consiste en la reacción entre ABTS y persulfato potásico ($K_2S_2O_8$). Este radical es el que posee una coloración azulada, con tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La reacción con los antioxidantes reduce el radical a ABTS, decreciendo la coloración a 734 nm. La decoloración dependerá del tipo de antioxidante, concentración de este o del tiempo de la reacción (Shahidi & Zhong, 2015).

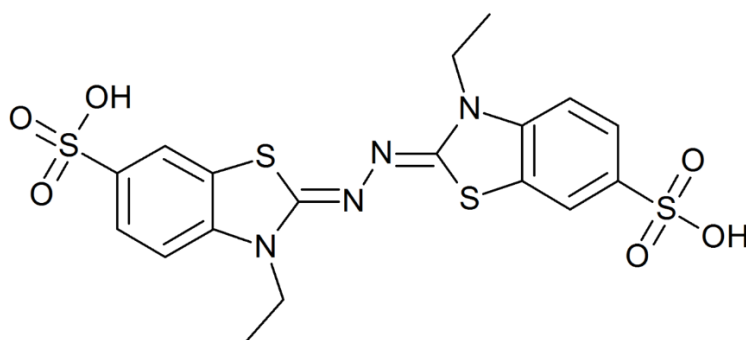


Figura 9. Estructura del ABTS

2.5.2. Ensayo DPPH

Este es el ensayo más simple, rápido y con menos costes de todos los métodos utilizados anteriormente. Fue propuesto por Marsden Blois (1958) (Blois, M., 1958). Consiste en la medición de la capacidad de los antioxidantes para captar el radical $DPPH^{•}$ por medio de la disminución de la absorbancia, la cual es medida a 515 nm, que va perdiendo el color violeta debido a la deslocalización del electrón desapareado.

El radical $DPPH^{•}$ es un radical orgánico nitrogenado que es disponible comercialmente y que es de los pocos estables que existen (Prior et al., 2005). Este radical es soluble solo en disolventes orgánicos, por lo que su estabilidad dependerá del disolvente utilizado en su preparación. En el disolvente que utilizamos, el metanol, su absorbancia decrece un 20% durante 120 minutos y a 25 °C en presencia de luz, mientras que, en oscuridad, como es nuestro caso, la absorbancia no cambia significativamente durante 150 minutos. Como patrón se utilizan varios compuestos, entre los cuales están: ácido ascórbico, α -tocoferol, ácido gálico, butilhidroxitolueno (BHT) y trolox.

- Ensayo DPPH: trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (97%), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (>99%).
- Ensayo TPC: ácido gálico (98%), reactivo de Folin-Cioaltea, carbonato sódico (99%).
- Ensayo TFC: acetato de potasio (99%), tricloruro de aluminio hexahidratado (99%), quercetina (95%).
- Además de los reactivos utilizados en específico en cada ensayo, también se usaron algunos comunes: metanol (>99%) y agua ultrapura (obtenida por el sistema de purificación de agua Milli-Q ultra pura de Millipore (Milford, EEUU)).

3.2. Instrumentación utilizada



Imagen 1. Sistema cromatográfico Agilent 1100 – Esquire 6000

El sistema cromatográfico (imagen 1) está compuesto de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, (Agilent 1100), Fig.11, acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica como analizador, equipado con un ionizador de electrospray (ESI), (Esquire 6000 de Bruker Daltonics).

Sonda de ultrasonidos (Qsonica Sonicators; Newtown, CT, USA; potencia de 55 W y frecuencia de 20 kHz).

3.3. Preparación de la muestra

La muestra consiste en unos comprimidos de extracto de hoja de olivo de la marca “ELADIET”. La composición que contiene la muestra según su envase consta de: hojas de olivo (*Olea europaea* L.) 231 mg, estabilizante (celulosa vegetal), antiaglomerante (dióxido de silicio) y estabilizante (estearato de magnesio). En el envase también consta que 3 comprimidos aportan 693 mg de hoja de olivo.



Imagen 2. Presentación comercial de la muestra.

La preparación de la muestra consistió en trituraron 4 comprimidos con la ayuda de un mortero para su mejor manipulación y se homogeneizaron.

3.4. Extracción de los compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante el procedimiento de (Spínola et al., 2014), el cual consistió en una extracción sólido-líquido donde usé 2.5 g de muestra y 50 mL de metanol; la extracción se llevó a cabo mediante una sonda de ultrasonidos (Qsonica Sonicators; Newtown, CT, USA; potencia de 55 W y frecuencia de 20 kHz) al 50% y durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente, la muestra se filtró mediante un filtro de pliegues y se eliminó el disolvente con un rotavapor.

Posteriormente, seguí el mismo procedimiento, pero esta vez usé agua destilada en lugar de metanol para obtener dos extractos diferentes. Los extractos secos obtenidos se dejaron en congelación hasta su uso para los ensayos.

El fin de que la extracción de los polifenoles se haga por duplicado, una con metanol y otra con agua, es la de comparar con qué medio se extrae más cantidad.

3.5. Contenido total en polifenoles (TPC)

El contenido total en polifenoles se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu anteriormente descrito (Spínola et al., 2014). Este ensayo tiene el siguiente procedimiento: se añadieron a un tubo de ensayo 50 μ L de muestra, 1.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10) y 1 mL de Na_2CO_3 del 7.5% (p/v) y agitamos. Se mide la absorbancia a 765 nm a los 30 minutos de reacción, por lo que durante este tiempo se mantiene a oscuridad a temperatura ambiente. El contenido total en polifenoles obtenido se expresa en mg equivalentes de ácido gálico/100 g de extracto seco (Spínola et al., 2014). La muestra utilizada tenía una concentración de 2 miligramos de extracto seco por cada mililitro de disolvente (misma concentración tanto para la muestra seca extraída con agua como con metanol).

Para la preparación de la recta de calibrado se llevó a cabo el mismo procedimiento que para la muestra, añadiendo el volumen requerido de una disolución patrón de 500 mg L^{-1} de ácido gálico para cada punto de la recta.

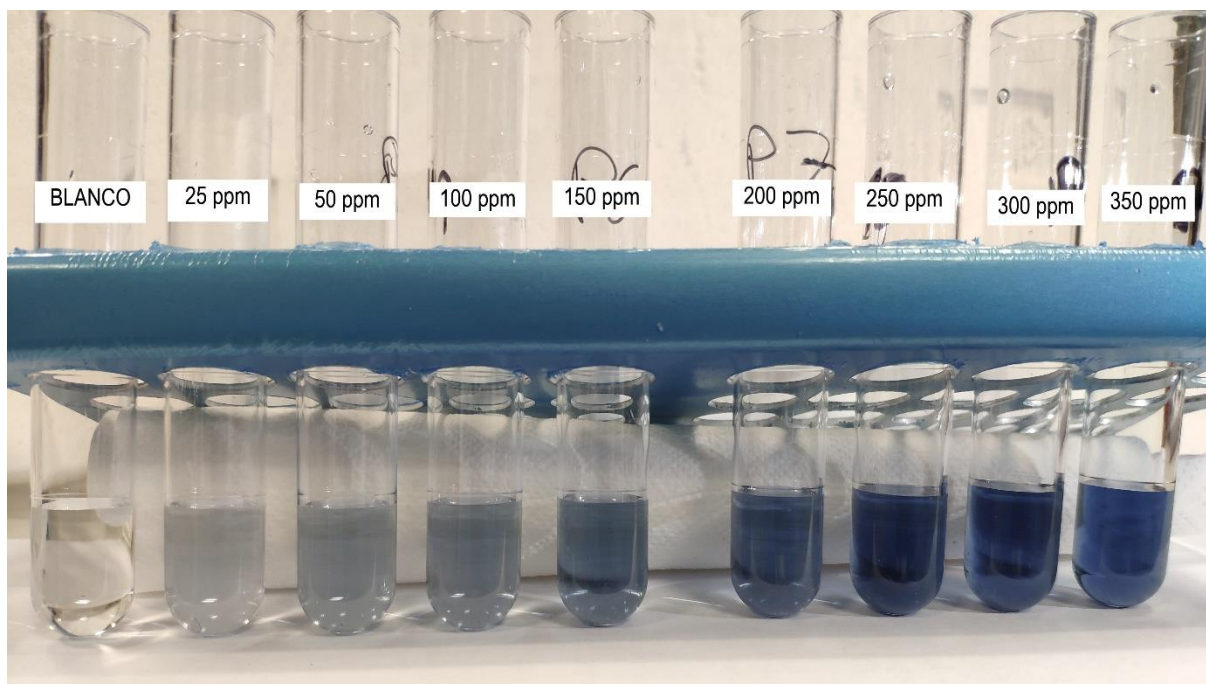


Imagen 3. Recta de calibrado del ensayo TPC con diferentes concentraciones de ácido gálico (patrón), faltan algunos puntos con respecto a los resultados.

En la imagen 3, la recta de calibrado del ensayo TPC, se puede ver como la coloración se hace más intenso conforme aumenta la concentración del patrón ácido gálico, debido a que éste reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteu, produciéndose un compuesto que da la coloración azul. Por tanto, cuanto más antioxidante, más cantidad de éste reaccionará con el reactivo de Folin-Ciocalteu, y a su vez, más coloración azul.

3.6. Contenido total en flavonoides (TFC)

El contenido total en flavonoides fue determinado mediante el procedimiento siguiente (Gouveia & Castilho, 2011): se añadieron a un tubo de ensayo 0.5 mL de muestra (mg/mL de extracto en metanol), 0.1 mL acetato potásico (1 M) en metanol, 0.1 mL de tricloruro de aluminio (10% p/v) en metanol, 1.5 mL de metanol y 2.8 mL agua destilada y agitamos. Se mide la absorbancia a los 30 minutos a 415 nm, manteniéndose en oscuridad y a temperatura ambiente durante ese tiempo. El contenido total en

flavonoides se expresa como mg equivalentes de quercetina/100 g de extracto seco. La concentración de la muestra utilizada fue de 2 mg de extracto seco por mL de metanol (para la extracción con metanol) y de 5 mg de extracto seco por mL de metanol (para la extracción con agua), tal y como se indica más adelante en la tabla 4.

Para la realización de la recta de calibrado, sigo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la muestra. Para ello, realizo unas disoluciones de quercetina con concentraciones desde 0 hasta 140 mg L⁻¹ a partir de una disolución patrón de quercetina 500 mg L⁻¹.

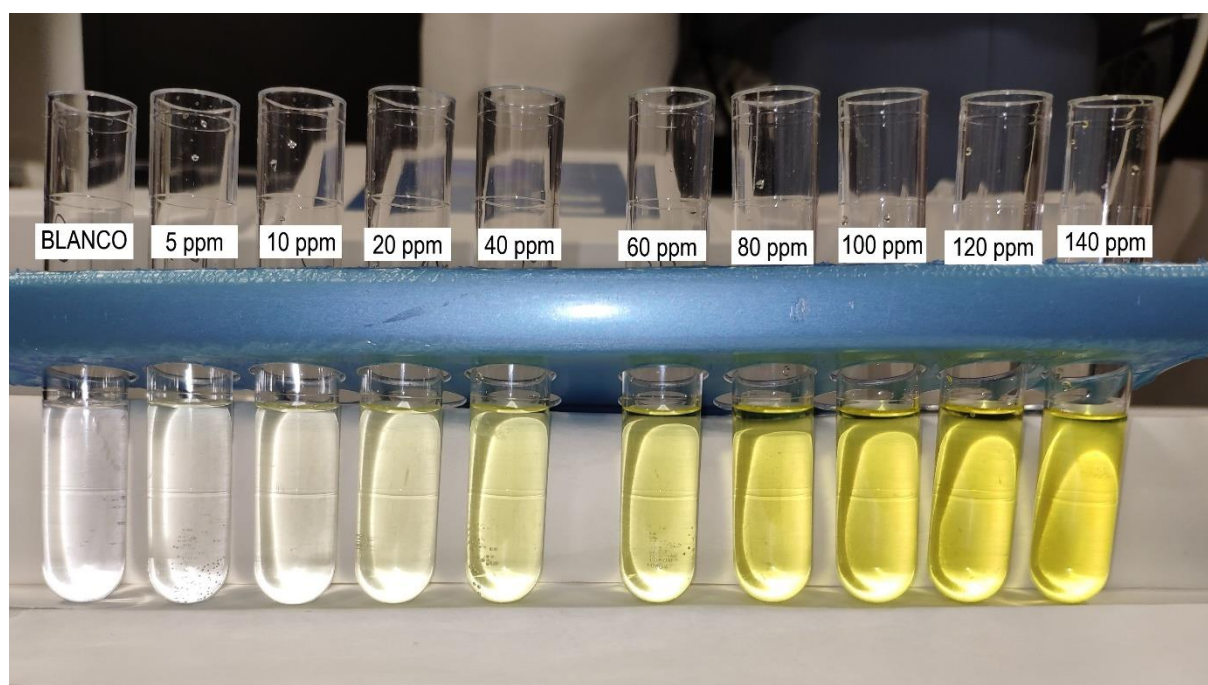


Imagen 4. Recta de calibrado del ensayo TFC con diferentes concentraciones de quercetina (patrón).

En esta última imagen 4 podemos ver la recta de calibrado del ensayo TFC, en la cual se puede ver una coloración creciente conforme aumenta la concentración de quercetina (patrón). Esto se produce por el mismo hecho que con la recta del ensayo TPC. En este caso, la reacción se produce entre los antioxidantes (quercetina en el patrón, flavonoides en la muestra) y AlCl₃ que dan lugar a la formación de un complejo

que da ese color amarillo. Por tanto, cuanto más cantidad de antioxidantes, mayor color amarillo se dará en la disolución.

3.7. Evaluación de la capacidad antioxidante

3.7.1. Ensayo ABTS

Para este ensayo se utilizó el procedimiento de (Gouveia & Castilho, 2011), con alguna modificación

Se generó el radical ABTS^{•+} a partir del siguiente procedimiento:

- Disolución A: 54.8 mg ABTS + 50 mL H₂O destilada MilliQ, obteniendo 2 mM.
- Disolución B: 189.2 mg K₂S₂O₈ + 10 mL H₂O destilada MilliQ, obteniendo 70 mM.

Preparadas las disoluciones anteriores, agrego a la disolución A (2 mM) 200 µL de la disolución B (70 mM). Se agita y cubre con aluminio durante 12-16 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, pasado el tiempo indicado, se diluyó la disolución obtenida con etanol hasta obtener una absorbancia inicial de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. Este procedimiento es realizado por (Ramírez, 2011).

Una vez generado el radical ABTS^{•+}, procedí con la elaboración de la recta patrón, con concentraciones crecientes desde el blanco hasta 0,4 mM de trolox, obteniéndose los colores de la imagen 5. Para ello, se echaron la cantidad correspondiente para cada punto de la recta de calibrado de disolución de trolox 1 mM y otra cantidad correspondiente de metanol hasta el volumen de 1 mL para obtener la concentración deseada de cada punto.

Una vez los puntos de la recta están elaborados, procedo a la medición de la absorbancia a 734 nm. Para ello, cojo 100 µL de cada punto de la recta y le añado 1,8 mL del radical ABTS^{•+}. Seguidamente, dejo la nueva disolución a oscuridad y a temperatura ambiente durante 10 min. Pasado el tiempo, procedo a medir la absorbancia. Para la medida de la absorbancia de la muestra hago el mismo

procedimiento que para los puntos de la recta, añadiendo 1,8 mL del radical ABTS^{•+} a 100 µL de muestra, dejo a oscuridad y temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente procedo a medir la absorbancia a 734 nm.

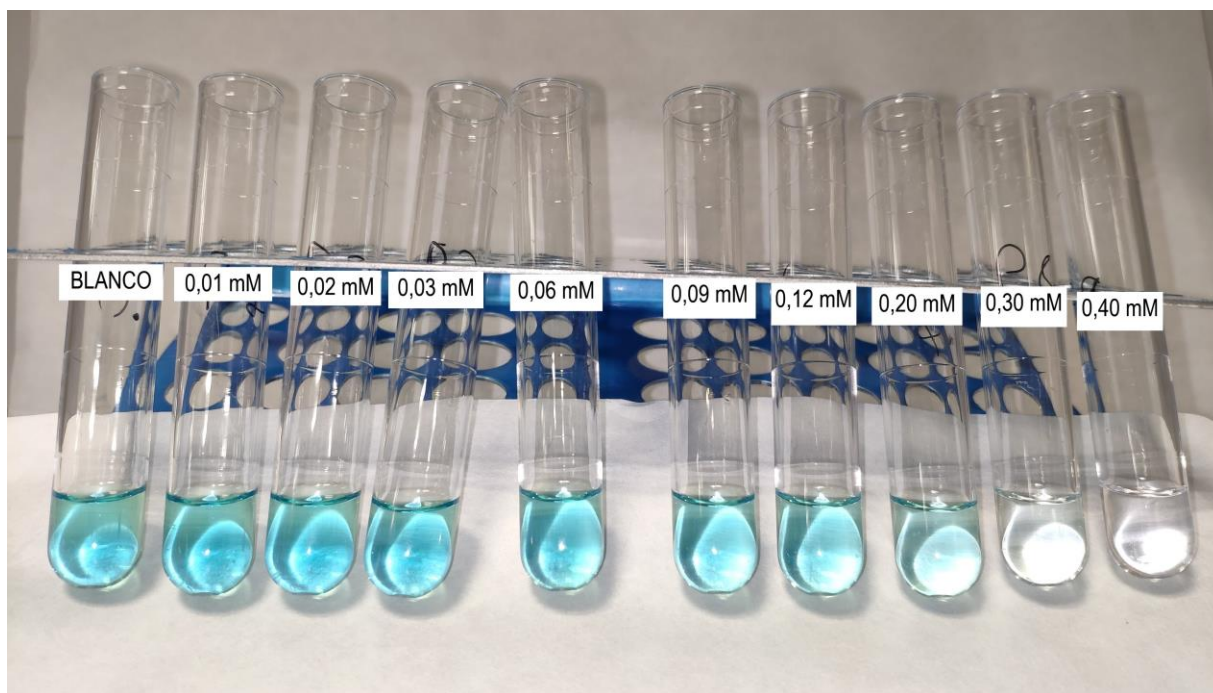


Imagen 5. Recta de calibrado del ensayo ABTS con diferentes concentraciones de trolox (patrón).

En la imagen 5, la recta de calibrado del ensayo ABTS, podemos apreciar una disminución del color, que concuerda con la disminución de la absorbancia conforme aumenta la concentración de trolox. Esto es debido al poder antioxidante del trolox, ya que, al haber mayor cantidad de éste, reacciona con el radical ABTS^{•+}, produciéndose una disminución del color.

3.7.2. Ensayo DPPH

En primero lugar, procedí con la preparación de la disolución DPPH 0,06 mM, para ello se pesaron 1,2 mg de DPPH y se añadieron 50 mL de metanol.

Para este ensayo se utilizó el procedimiento descrito por (Spínola et al., 2014) con la modificación en la concentración de los extractos.

Por tanto, se usaron 100 μ L de muestra extracto metanólico, a los cuales se les adicionan 3,5 mL de disolución DPPH 0,06 mM. Se dejaron reposar durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se mide la absorbancia a 516 nm. De la misma forma se efectuó para la muestra de extracto en agua.

Para la recta patrón se siguió el mismo procedimiento, usando 100 μ L de disolución 1 mM de trolox como patrón, con concentraciones desde 0,05 mM hasta 0,8 mM.

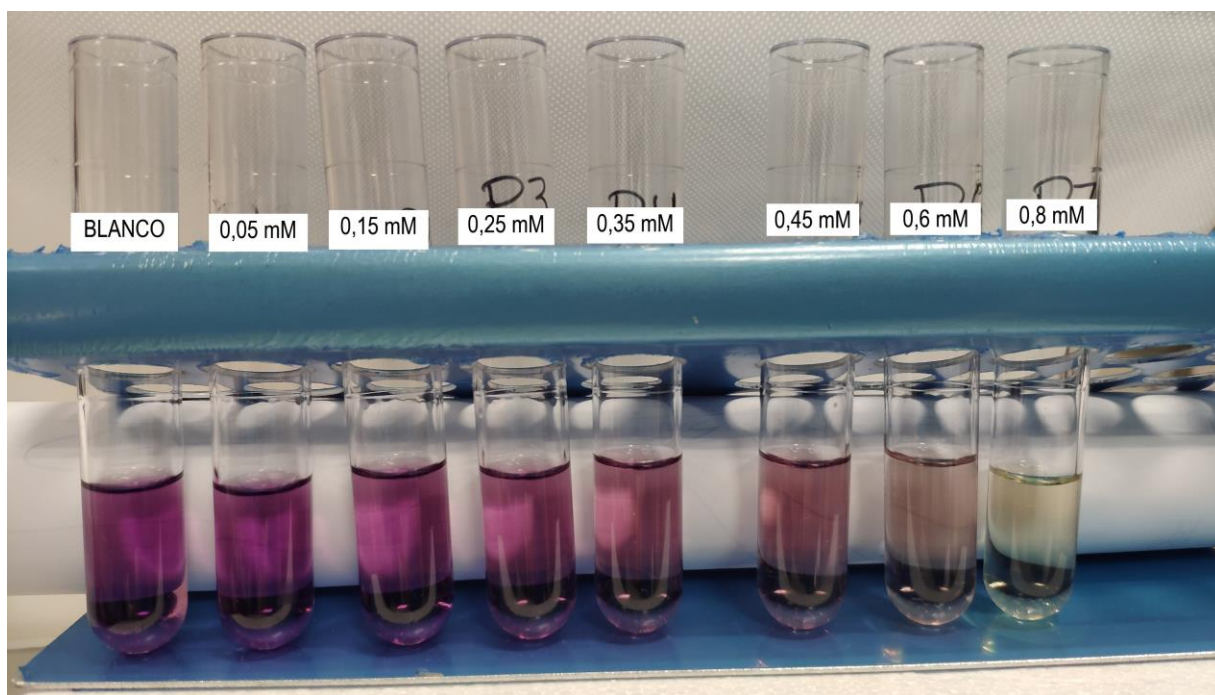


Imagen 6. Recta de calibrado del ensayo DPPH con diferentes concentraciones de trolox (patrón).

En la imagen 6, al igual que con el ensayo ABTS, se produce una disminución del color conforme aumenta la concentración de trolox debido a la capacidad antioxidante de este compuesto.

3.8. Análisis cromatográfico

La preparación de la muestra para el análisis cromatográfico consistió en la disolución de 5 mg de extracto seco (en este caso el extraído con metanol) en 1 mL de metanol en un eppendorf. Después, se usó un baño de ultrasonidos durante 3 minutos para disolver completamente la muestra. Con la ayuda de una jeringa, se recogió toda la disolución, cambié la aguja por un microfiltro y recogí el filtrado en un vial topacio.

Mediante el mismo procedimiento, realicé otra preparación de la muestra, con la diferencia de que se disolvió el extracto seco extraído con agua en 90% agua destilada y 10% de metanol.

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) se realizó con un Agilent Series 1100 con un detector diodo array G1315B y un espectrómetro de masas con trampa de iones (Esquire 6000, Bruker Daltonics) usando un electrospray. La columna analítica de fase inversa utilizada fue una Luna Omega Polar C18 de 150×3.0 mm y 5 µm de tamaño de partícula (Phenomenex) y un cartucho de seguridad Polar C18 (Phenomenex) de 4×3.0 mm.

Se inyectaron 10 µL de la muestra preparada para el análisis HPLC-MS (detallado anteriormente). Se preparó una curva de calibración con oleuropeína con concentraciones desde los 5 hasta los 100 µg mL⁻¹. El cromatograma se registró a 240 nm.

4. RESULTADOS

4.1. Contenido total en polifenoles (TPC)

En la figura 12 se pueden observar los datos obtenidos en la recta de calibrado para el ensayo TPC, así como la regresión lineal, encontrando una buena linealidad en los puntos. Como se puede ver, la absorbancia obtenida por cada punto de la recta va aumentando conforme aumenta la concentración del ácido gálico (patrón), algo que concuerda con lo observado en la imagen 3, donde se ve como aumenta la coloración conforme aumenta la concentración del patrón. La recta patrón se hizo por triplicado, por lo que cada punto de la figura 12 se corresponde con la media.

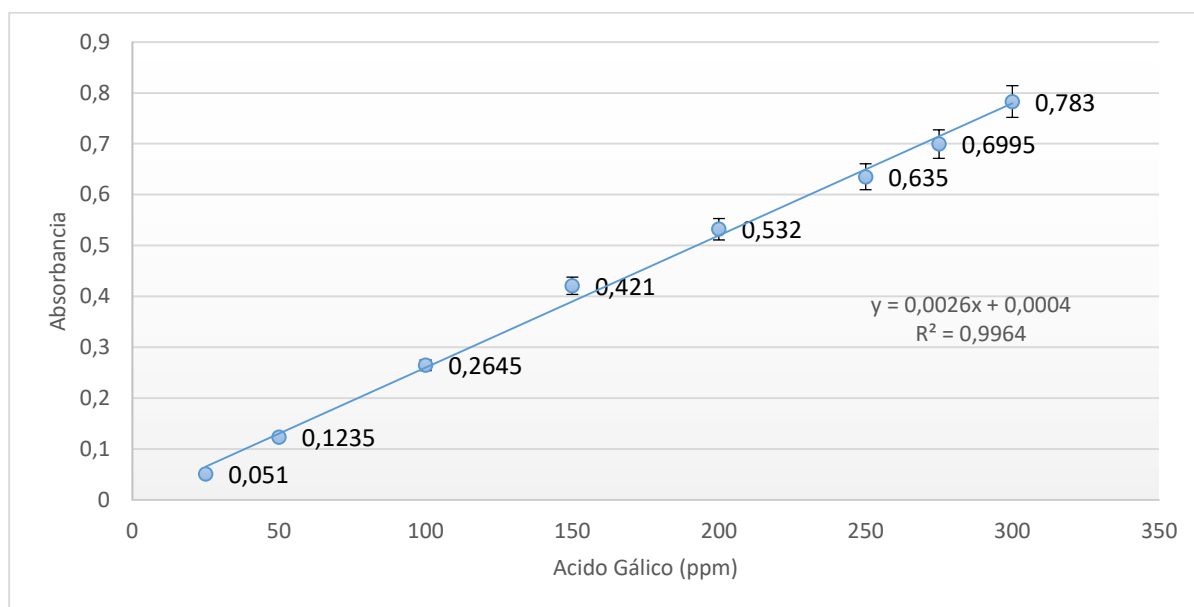


Figura 12. Recta de calibrado y regresión lineal de los datos obtenidos del ensayo TPC con la desviación estándar para cada punto.

Esta tabla siguiente (tabla 3) muestra los resultados obtenidos en el ensayo TPC, expresando los resultados en miligramos de ácido gálico equivalente por cada gramo de extracto seco.

Muestras	mg GAE/g DE
Extracto metanólico 1 (2 mg/mL)	95,80
Extracto metanólico 2 (2 mg/mL)	88,53
Extracto acuoso 1 (2 mg/mL)	95,60
Extracto acuoso 2 (2 mg/mL)	100,04

Tabla 3. Resultados obtenidos del ensayo TPC.

En cuanto a la media de los resultados, obtengo para los extractos en metanol de $92,09 \pm 5,14$ mg GAE/g DE, y para los extraídos con agua obtengo $97,79 \pm 3,14$ mg GAE/g DE.

4.2. Contenido total en flavonoides (TFC)

En la figura 13 se puede ver los valores de la recta patrón obtenido en el ensayo TFC, observándose, al igual que con el ensayo TPC, como la absorbancia aumenta conforme aumenta la concentración del patrón (quercetina). Esto corresponde con la imagen 4, donde también aumentaba la coloración amarilla conforme aumentaba la concentración del patrón. Se observa una buena linealidad y también los valores de la regresión lineal. La recta de calibrado se realizó por triplicado, siendo los puntos mostrados en la figura 13 la media.

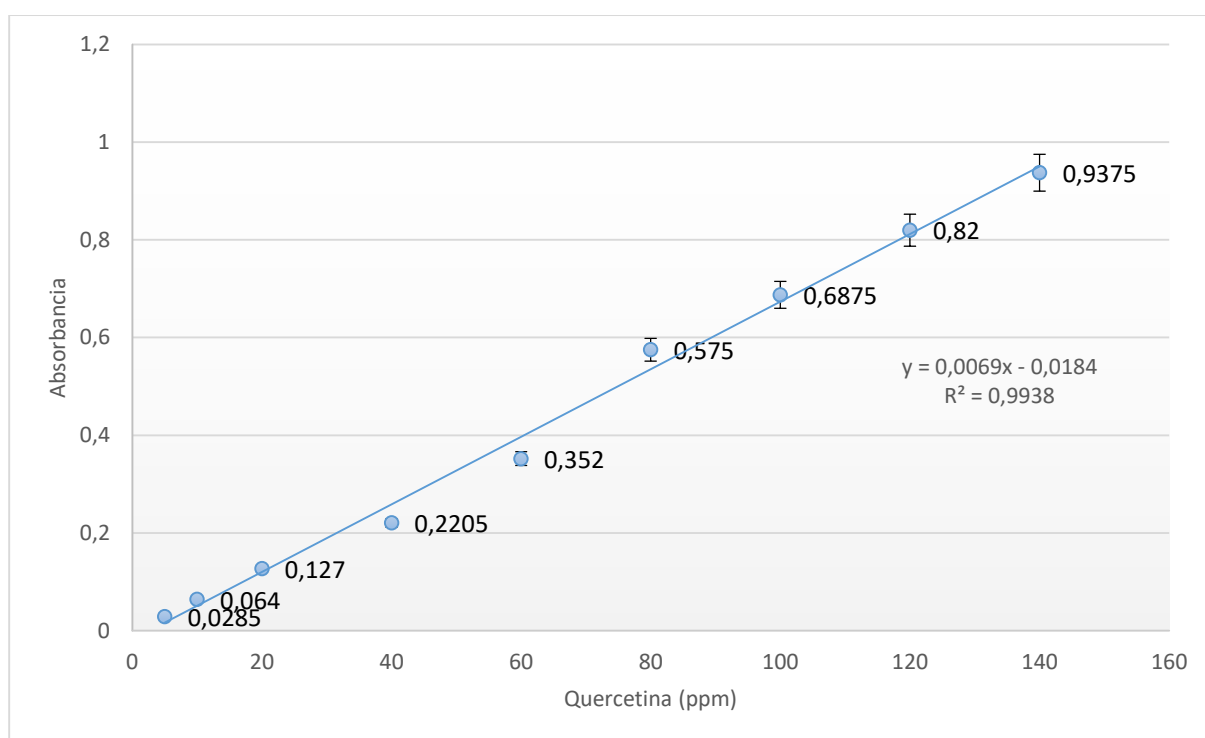


Figura 13. Recta de calibrado y regresión lineal de los datos obtenidos del ensayo TFC con la desviación estándar para cada punto.

En ésta tabla 4, se muestran los resultados obtenidos en este ensayo para los dos medios con los que se han extraído los flavonoides, expresándose el resultado en miligramos de quercetina por cada gramo de extracto seco.

Muestras	mg quercetina/g DE
Extracto metanólico 1 (2 mg/mL)	23,39
Extracto metanólico 2 (2 mg/mL)	22,00
Extracto acuoso 1 (5 mg/mL)	33,21
Extracto acuoso 2 (5 mg/mL)	32,77

Tabla 4. Resultados obtenidos del ensayo TFC.

Por tanto, los resultados finales (medias) han sido los siguientes: para la muestra con la extracción en metanol ha sido de $22,68 \pm 0,98$ mg quercetina/g DE, mientras que para la extracción con agua ha sido $32,99 \pm 0,31$ mg quercetina/g DE.

4.3. Ensayos ABTS y DPPH

En las siguientes figuras 14 y 15 podemos ver las rectas de calibrado con sus respectivos valores tanto de absorbancia como de concentración de trolox para los ensayos ABTS y DPPH, así como la regresión lineal. Como vemos, las absorbancias van disminuyendo conforme aumenta la concentración en trolox, algo que también se puede ver en las imágenes 5 y 6 con la coloración de las disoluciones. Se puede apreciar que existe un buen coeficiente de correlación.

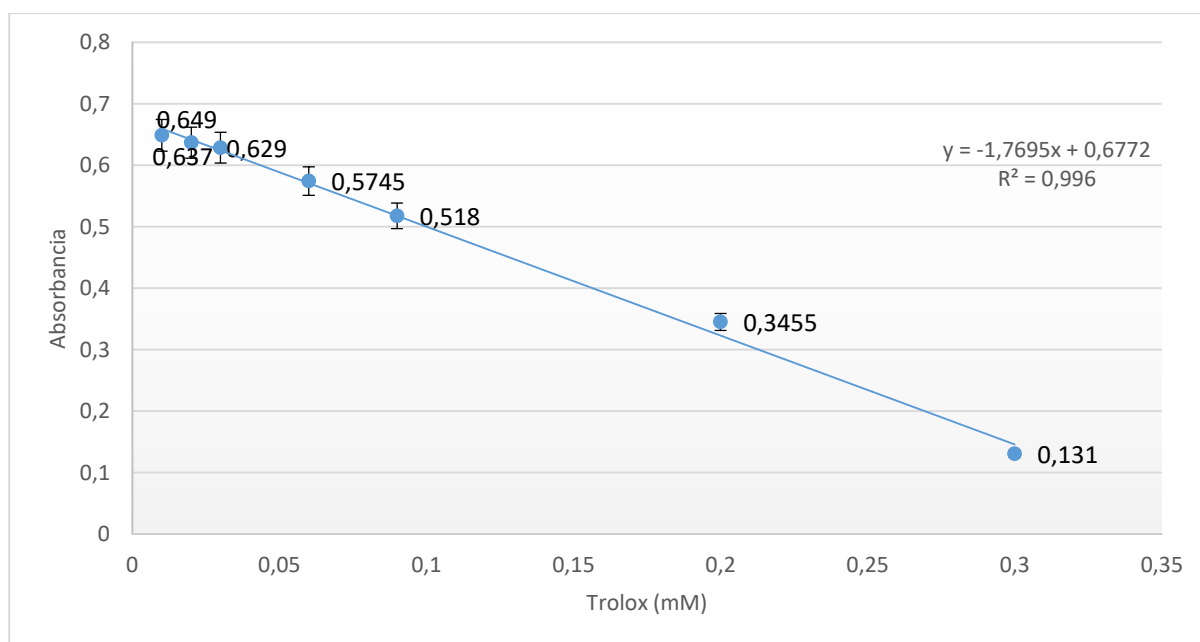


Figura 14. Recta de calibrado y regresión lineal de los datos obtenidos del ensayo ABTS con la desviación estándar para cada punto.

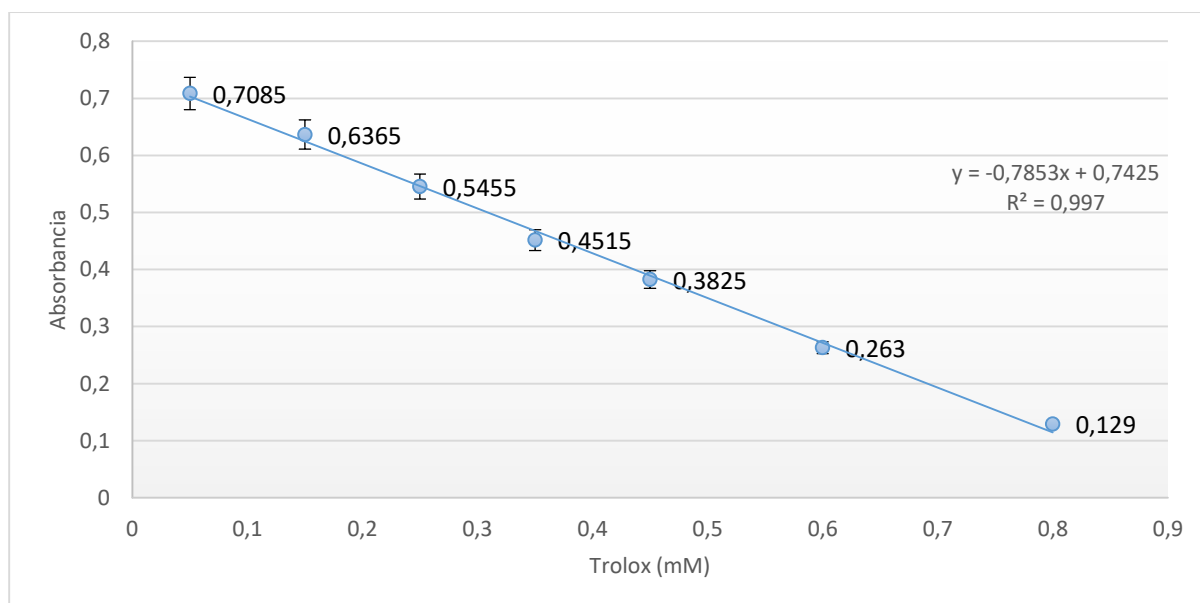


Figura 15. Recta de calibrado y regresión lineal de los datos obtenidos del ensayo DPPH con la desviación estándar para cada punto.

En las siguientes tablas 1 y 2 podemos ver los resultados obtenidos de las muestras, tanto de extracto metanólico como acuoso, con los resultados expresados en mmol equivalentes de trolox por cada 100 gramos de extracto seco.

Muestras	mmol trolox TE/100 g DE
Extracto metanólico 1 (0,25 mg/mL)	59,55
Extracto metanólico 2 (0,25 mg/mL)	52,15
Extracto metanólico 3 (0,15 mg/mL)	57,69
Extracto acuoso 1 0,25 (mg/mL)	68,19
Extracto acuoso 2 0,25 (mg/mL)	68,43
Extracto acuoso 3 0,15 (mg/mL)	67,57

Tabla 1. Resultados obtenidos del ensayo ABTS.

Muestras	mmol trolox TE/100 g DE
Extracto metanólico 1 (0,5 mg/mL)	43,62
Extracto metanólico 2 (0,5 mg/mL)	41,34
Extracto metanólico 3 (1 mg/mL)	41,49
Extracto acuoso 1 (0,5 mg/mL)	42,35
Extracto acuoso 2 (0,5 mg/mL)	45,91
Extracto acuoso 3 (1 mg/mL)	46,69

Tabla 2. Resultados obtenidos del ensayo DPPH.

En el caso del ensayo ABTS, obtengo una media de $56,37 \pm 3,85$ para el extracto en metanol, y una media de $68,06 \pm 0,44$ para el extracto acuoso.

Para el ensayo DPPH, he obtenido una media de $42,14 \pm 1,28$ para el extracto metanólico, y una media de $44,94 \pm 2,31$ para el extracto acuoso.

4.4. Comparación de los métodos de extracción

En las siguientes figuras 13, 14 y 15 podemos observar de forma gráfica una comparativa de los medios utilizados en los diferentes ensayos para poder compararlos.

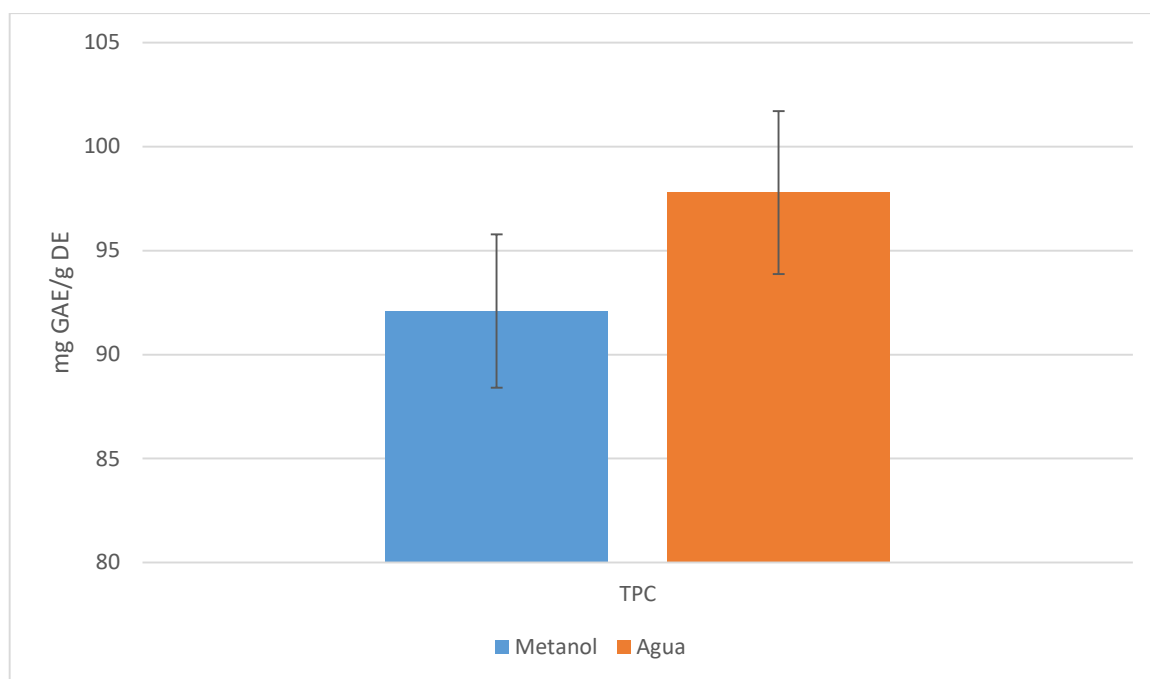


Figura 16. Gráfica comparativa de los medios utilizados en el ensayo TPC.

En el ensayo TPC (figura 13), se puede ver como en la extracción con agua se obtiene mayor cantidad de polifenoles en comparación con la extracción con metanol.

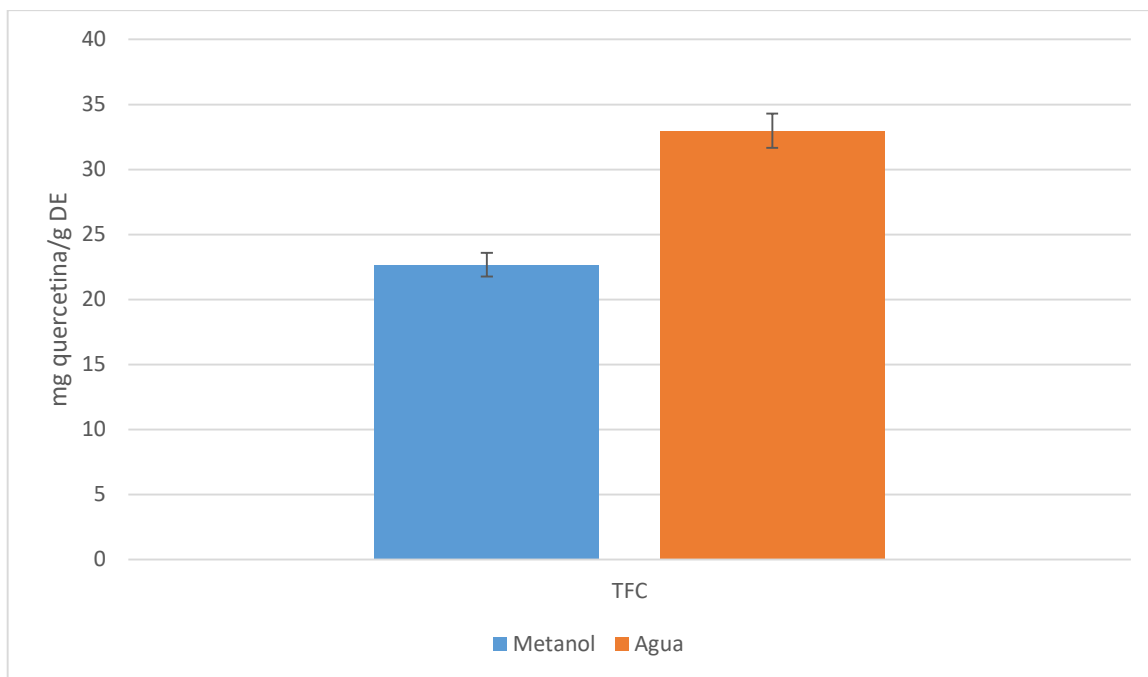


Figura 17. Gráfica comparativa de los medios utilizados en el ensayo TFC.

En la figura 14 del ensayo TFC, al igual que ocurría con el ensayo TPC, se obtienen mayores cantidades de flavonoides con la extracción con agua en comparación con la extracción con metanol.

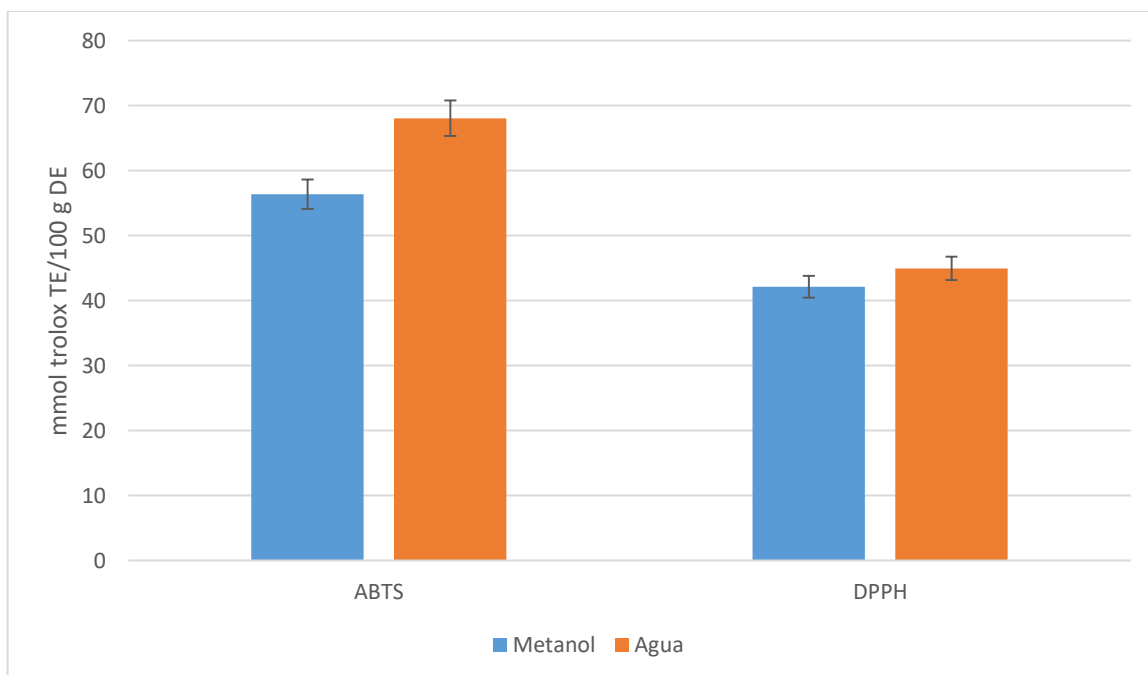


Figura 18. Comparativa gráfica de los dos medios empleados para la determinación de la capacidad antioxidante de los dos métodos utilizados.

Como podemos observar en la figura 15, se han obtenidos mayores capacidades antioxidantes (ABTS y DPPH) cuando la extracción se realizó con agua en comparación a realizarla con metanol, algo que concuerda con los ensayos TPC Y TFC, ya que en estos se obtuvieron mayores cantidades de polifenoles y flavonoides en la extracción con agua, por lo que estas deberían de tener más capacidad antioxidante al tener más cantidad de antioxidantes.

4.5. Composición química

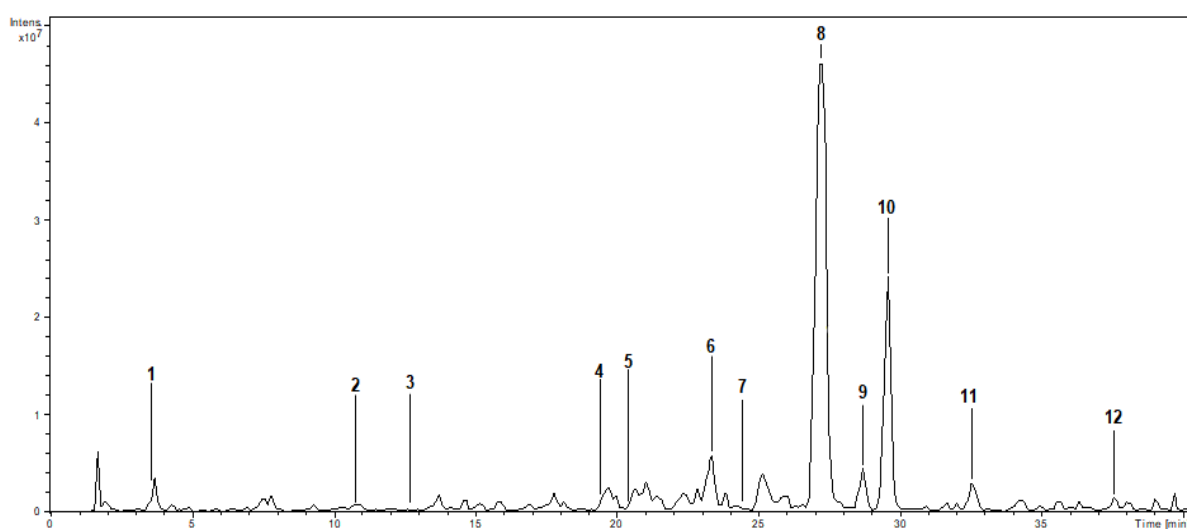


Figura 19. Cromatograma obtenido del HPLC-MS.

A partir de los datos obtenidos del cromatograma y consultando la bibliografía, en la figura 23 se pueden apreciar los compuestos fenólicos encontrados y caracterizados de la muestra de hoja de olivo.

Nº	t _R (min)	[M-H] ⁻ m/z	m/z (% base peak)	Identificación asignada
1	3.6	315	MS ² [315]: 153 (100), 135 (33.6), 123 (15.6) MS ³ [315→153]: 185 (21.3), 123 (100)	Glucósido de hidroxitirosol
2	10.7	377	MS ² [377]: 197 (100), 153 (20.6) MS ³ [377→197]: 153 (100)	Oleuropeína aglicona
3	12.7	593	MS ² [593]: 593 (100), 473 (60.8), 353 (39.2) MS ³ [593→473]: 383 (12.9), 353 (100) MS ⁴ [593→473→353]: 353 (100), 325 (42), 297 (44.4)	Vicenin-2 (apigenin- 6,8-di-C-glucoside)
4	19.4	609	MS ² [609]: 609 (100), 301 (74.5) MS ³ [609→301]: 179 (95.7), 151 (100)	Rutina
5	20.4	623	MS ² [623]: 623 (100), 461 (69.3), 315 (2.3) MS ³ [623→461]: 315 (44.6), 161 (16.5), 135 (100)	Verbascósido
6	23.4	701	MS ² [701]: 539 (100), 377 (10.4), 307 (7.5), 275 (13.3) MS ³ [701→539]: 507 (27.7), 377 (25.7), 371 (20.8), 327 (17.2), 307 (100) MS ⁴ [701→539→307]: 275 (100), 139 (54.6), 111 (36)	Glucósido de la oleuropeína
7	24.4	447	MS ² [447]: 301 (100), 285 (10.4), 151 (4.3) MS ³ [447→301]: 271 (63.6), 179 (66.7), 151 (100)	Quercetina-O- rhamnósido

8	26.8	539	MS ² [539]: 377 (100), 307 (55.5), 275 (76.2) MS ³ [539→307]: 275 (100), 139 (29.3), 113 (17.1), 111 (23.8) MS ⁴ [539→307→275]: 139 (100), 113 (94.9)	Oleuropeína
9	28.8	539	MS ² [539]: 377 (100), 307 (50.8), 275 (48.4) MS ³ [539→307]: 275 (100), 139 (31.7), 111 (16) MS ⁴ [539→307→275]: 113 (100)	Oleuropeína isómero
10	29.6	539	MS ² [539]: 377 (58.8), 307 (96.3), 275 (100) MS ³ [539→307]: 307 (7.8), 275 (100), 139 (27.8), 113 (6.1) MS ⁴ [539→307→275]: 139 (100), 113 (25.4)	Oleuropeína isómero
11	32.5	523	MS ² [523]: 361 (100), 291 (51.8), 259 (35.7) MS ³ [523→361]: 291 (100), 259 (79.5), 223 (11.3) MS ⁴ [523→361→291]: 259 (40.6), 171 (29.3), 143 (25.8), 139 (90.1), 111 (100)	Ligstrósido
12	37.4	877	MS ² [877]: 878 (42.5), 715 (59.5), 701 (40), 613 (19.6), 539 (100) MS ³ [877→539]: 377 (55.3), 375 (21.6), 345 (16.9) 307 (100), 275 (50.3) MS ⁴ [877→539→307]: 275 (100)	Oleuropeína hexósido glucurónido

Tabla 5. Caracterización de los compuestos encontrados en el extracto analizado.

Tal y como podemos ver en la tabla 5 y en el cromatograma (figura 19), podemos ver los compuestos más importantes y mayoritarios encontrados en la muestra, de los cuales destacan la oleuropeína y sus isómeros, que son los compuestos 8, 9 y 10, que se pueden ver en el cromatograma (figura 16) muy destacados, ya que son los mayoritarios.

Para su caracterización, se ha hecho uso de la bibliografía (Llorent-Martínez et al., 2015), y con la ayuda de los fragmentos obtenidos por el MS se han podido caracterizar fácilmente. El mayoritario, la oleuropeína (compuesto 8), se ha identificado por comparación de su espectro de masas y tiempo de retención con el de un patrón; este compuesto presentaba $[M-H]^-$ a m/z 539 y fragmentos a m/z 377, 307 y 275, característicos de la oleuropeína. Además, podemos concluir que es el componente mayoritario en la muestra debido a que destaca en el cromatograma.

También se pueden ver que los compuestos 9 y 10 presentan la misma fragmentación que la oleuropeína, por lo que se caracterizaron como isómeros. La presencia de isómeros de la oleuropeína en extractos de hoja ya ha sido descrita con anterioridad (Llorent-Martínez et al., 2015).

El compuesto 2 muestra un $[M-H]^-$ a m/z 377, con los fragmentos característicos a m/z 197 y 153, lo que corresponde con la oleuropeína aglicona (la cual presenta 162 Da menos que la oleuropeína, lo que se debe a la falta del hexósido presente en oleuropeína).

El compuesto 6 muestra un $[M-H]^-$ a m/z 701, que indica que es un glucósido de la oleuropeína, ya que se compone de una molécula de oleuropeína (539) y un hexósido (162).

El compuesto 12 muestra un $[M-H]^-$ a m/z 877, que constituye la suma de los fragmentos m/z 539 (oleuropeína), 162 (hexósido) y 176 (glucurónido).

A parte de la oleuropeína, se han podido identificar otros componentes minoritarios, como en el caso del compuesto 1, caracterizado como glucósido de hidroxitirosol, que presenta un $[M-H]^-$ de 315, con los fragmentos 153 y 123.

5. CONCLUSIONES

En primer lugar, en cuanto a la extracción de los componentes fenólicos, a la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que se extraen mayores cantidades de éstos con una extracción con agua en lugar de una extracción con metanol. Esto se debe a que la oleuropeína, el compuesto fenólico mayoritario en la muestra, muestra una mayor solubilidad en agua que en metanol.

Pasando a la capacidad antioxidante, en cuanto al ensayo ABTS se observa una diferencia significativa a favor de la extracción con agua en lugar de la extracción con metanol, lo cual resulta lógico sabiendo que con los extractos de agua se ha extraído mayor cantidad de compuestos fenólicos, sobre todo la oleuropeína que es la mayoritaria y que presenta mayor afinidad con el agua.

En cuanto al ensayo DPPH, existe cierta diferencia entre la extracción con metanol y agua, siendo mayor en la de agua, pero no se puede concluir que sea significativa, ya que considerando las desviaciones estándar de los resultados la diferencia es muy leve.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede demostrar el alto contenido en compuestos fenólicos en los comprimidos de extracto de hoja de olivo, por lo que se puede considerar que estos complementos alimenticios puedan tener potenciales efectos beneficiosos para la salud. Además, se puede concluir que el compuesto fenólico mayoritario en esta muestra es la oleuropeína, con lo que la ingesta de productos a base de hojas de olivo estará compuesta mayormente por este compuesto fenólico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ávalos, García, A. y Pérez-Urria, Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145.
- Blois, M. (1958). *Antioxidant determination by the use of a stable free radical*. *Nature*; 4617, 1198-1200
- Chang, C.C.; Yang, M.H.; Wen, H.M.; Chern J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10 (3), 178–182.
- Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26 (8), 1001–1043.
- Gil Ruiz, P. (2002). *Productos naturales*. Universidad de Navarra: Pamplona.
- Gouveia, S. & Castilho, P. C. (2011). *Antioxidant potential of Artemisia argentea L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition*. *Food Res. Int.*, 44 (6), 1620–1631.
- Kasprzak, M. M.; Erxleben, A.; Ochocki, J. (2015). Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Adv.* 5 (57), 45853–45877.
- Llorent-Martínez, E. J.; Gouveia, S.; Castilho, P. C. (2015). *Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of Laurisilva forest species*. *Industrial Crops and Products* 64, 135-151.
- Mammen, D.; Daniel, M. (2012). A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chem.* 135 (3), 1365–1368.

- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84 (4), 407–412.

- Moon, J.K.; Shibamoto, T. (2009). *Antioxidants assays for plant and food components*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 1655-1666.

- Muñoz, A. M^a. y Ramos, F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista Horizonte Médico*, 7(1), 23-31.

- Ochoa, C. & Ayala, A. (2004). *Los flavonoides y su aplicación en la industria de alimentos*. *Ingeniería y Competitividad*. 6 (2): 93 – 104.

- Oliveras López, M. J. (2005). Calidad del aceite de oliva virgen extra. Antioxidantes y función biológica. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

- Patthamakanokporn, O.; Puwastien, P.; Nitithamyong, A.; Sirichakwal, P. (2008). *Changes of antioxidant activity and totalphenolic compounds during storage of selected fruits*. *J Food Composition Analysis*. 21, 241-8.

- Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. (2004). *Antioxidantes de los alimentos: aplicaciones prácticas*. Ed, Acribia: Zaragoza.

- Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), 4290–4302.

- Pyrzynska, K.; Pękal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Anal. Methods*. 5 (17), 4288–4295.

- Ramírez Anaya, J. (2011). Influencia de las técnicas culinarias sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en hortalizas de la dieta mediterránea. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

- Romero del Soto, M. D. (2012). Estudios de farmacotecnia y desarrollo en formas de dosificación de vegetales deshidratados para su aplicación en pediatría y personas de la tercera edad. Tesis doctoral, Granada.

- Sánchez-Paniagua López, M. (2008). Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

- Schaich, K. M.; Tian, X.; Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J. Funct. Foods*. 18, 782–796.

- Shahidi, F.; Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods*. 18, 757–781.

- Spínola, V.; Llorent-Martínez, E. J.; Gouveia, S.; Castilho, P. C. (2014). *Myrica faya*: A new source of antioxidant phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 62 (40), 9722–9735.

- Sullivan, López-González, J., Prado, García, H., Aguilar, Cázares, D., Molina, Guarneros, J. A., Mandoki, J.J y Medina, Morales, F. (2000). Efecto en el ciclo celular de líneas de adenocarcinoma pulmonar por cumarina y 7-hidroxycumarina. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 13(4), 192-197.

- Zuleta A., Esteve M., Frigola A. (2009). *ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chemistry*; 114, 310-316.