

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE TRES FRUTAS DE ALTO CONSUMO EN EL TOLIMA

Antioxidant potential of agroindustrial residues from three high consumption fruits in Tolima

RESUMEN

Este trabajo evaluó las propiedades antioxidantes de los residuos agroindustriales de mora de castilla (*Rubus glaucus*), maracuyá (*Passiflora edulis*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), tres frutas de alto consumo en el Tolima mediante la determinación de la capacidad antiradical (ABTS y DPPH), Capacidad Antioxidante Total Hidrosoluble, Poder Reductor Férrico y Actividad Antinitrosativa. Los resultados fueron contrastados con el contenido fenólico total y de pigmentos antocianicos de cada uno de los subproductos estudiados, mostrando a los residuos de *R. glaucus* como el material con mayor aporte de compuestos antioxidantes.

PALABRAS CLAVES: Actividad antioxidante, contenido fenólico total *Cyphomandra betacea*, *Passiflora edulis*, *Rubus glaucus*, subproductos.

ABSTRACT

The antioxidant properties of agroindustrial residues from three high consumption fruits in Tolima: Andean blackberry (*Rubus glaucus*), Passion fruit (*Passiflora edulis*) and tree tomato (*Cyphomandra betacea*), were evaluated through the radical scavenging activity (ABTS and DPPH), Total Hydrosoluble Antioxidant Capacity, Ferric Reducing Power and Antinitrosative Activity. The results were contrasted with the phenolic and anthocyanic pigments contents from one each of the studied byproducts, showing the *R. glaucus* residues as the most suitable source of antioxidant compounds.

KEYWORDS: Antioxidant activity, by-products, total phenolic content, *Cyphomandra betacea*, *Passiflora edulis*, *Rubus glaucus*.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia cuenta con una privilegiada posición geográfica y una amplia gama de pisos térmicos. Estos dos factores favorecen una marcada vocación agrícola dentro de la cual el sector cafetero se constituye como uno de los renglones más importantes, no sólo dentro del mercado interno sino también dentro de la economía de exportaciones, ubicándose como el segundo productor a nivel mundial después de Brasil. Otros sectores de gran importancia son el frutícola y de flores.

Debido a las exigencias cada vez más crecientes del mercado, la transformación de los productos agrícolas se ha convertido en parte importante de los procesos industriales dentro de muchas empresas. Dichos procesos generan de forma ineludible residuos causantes de contaminación ambiental en aguas, suelos y atmósfera, que además ponen en peligro la salud humana y el nicho ecológico de muchas especies animales y vegetales.

Conscientes de esta problemática, diversos investigadores de diferentes partes del mundo han dedicado sus esfuerzos a evaluar diversas propiedades y usos de estos materiales con el fin de mitigar el impacto ambiental que generan, además de buscar posibles aplicaciones industriales que representen beneficios económicos. Algunas de las áreas dentro de las que se han centrado estas investigaciones son la obtención de combustibles [1], de saborizantes y compuestos aplicables a la industria de alimentos [2], [3], y de pesticidas [4], entre otras.

Los procesos oxidativos han sido relacionados con múltiples afecciones, dentro de las que se encuentran aquellas que involucran deterioro del sistema nervioso central [5], [6]; además son causantes de alteraciones de múltiples productos dentro de la industria alimenticia debido al detrimento de sus propiedades organolépticas. Como respuesta, este sector productivo debe recurrir al uso de algunos agentes antioxidantes de origen sintético como el Hidroxitolueno butilado (BHT) y el Hidroxianisol butilado (BHA), aunque existen sospechas

WILMER F. SÁNCHEZ

Lic. en Ciencias Naturales y educación Ambiental
Jóven Investigador
COLCIENCIAS-GIPRONUT
Universidad del Tolima
wilmerfernando@gmail.com

ELIZABETH MURILLO

Químico, M.Sc.
Investigadora GIPRONUT
Universidad del Tolima
emurillo8@gmail.com

JONH JAIRO MÉNDEZ

Ph. D. Ciencias Químicas
Director GIPRONUT
Profesor titular
Universidad del Tolima
jmendez@ut.edu.co

Fecha Recepción: 9 de Septiembre de 2010

Fecha aceptación: 15 de Noviembre de 2010

de que estos dos compuestos son responsables de daños en el hígado y carcinogénesis [7], [8] Con este conocimiento, diversos autores han dedicado esfuerzos por demostrar el valioso potencial de algunos materiales subutilizados o de escaso interés comercial, como fuente de compuestos antioxidantes [9], [10], [11].

En este trabajo se evaluó, mediante el uso de diversas pruebas, la actividad antioxidante de los residuos agroindustriales de mora de castilla (*Rubus glaucus*), maracuyá (*Passiflora edulis*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), con el fin de dar un valor agregado a estos materiales y contribuir a la solución de los problemas de contaminación que puedan causar su inapropiada disposición final.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material residual

Semillas de mora, cáscaras de maracuyá y tomate de árbol, obtenidas en procesadoras locales de pulpa de fruta fueron secadas y trituradas para luego ser sometidas a maceración etanólica que permitió la obtención de sus extractos.

2.2 Metodología

2.2.1 Tamizaje Fitoquímico

Los extractos obtenidos fueron sometidos a un análisis fitoquímico preliminar que permitiera conocer los núcleos de metabolitos secundarios de mayor relevancia presentes en cada uno de ellos; en este propósito se utilizaron ensayos a la gota y pruebas cromatográficas, de acuerdo a la metodología clásica recomendada para tal efecto [12], [13], adaptadas por Murillo [14].

2.2.1.2 Determinación del contenido fenólico

La cuantificación de compuestos fenólicos se logró usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), de acuerdo a la metodología descrita por Dastmalchi et al. [15]. La absorbancia de las muestras se leyó a 760 nm, comparándola contra un blanco que contenía la mezcla de reactivos disueltos en agua. La densidad óptica de las muestras se interpoló en una curva de calibración preparada con ácido gálico. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico/gramo de vegetal seco (mgEAG/gvs).

2.2.3 Cuantificación de antocianos totales

Para la determinación del contenido de antocianos de los subproductos bajo estudio se siguió la metodología descrita por Giusti y Wrolstad [16]. La absorbancia final se determinó mediante la ecuación:

$$A = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 1.0} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 4.5}$$

El contenido de antocianos, expresado como miligramos equivalentes a cianidina-3-glucósido por gramo de material (mgEC3G/gvs), se calculó mediante la ecuación:

$$AM = \frac{AxPMxFDx 100}{(\epsilon x 1)}$$

Donde:

AM=Antocianos Monoméricos (mg/gvs)

A: Absorbancia

PM: Peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449.2)

FD: Factor de dilución

ϵ : Absortividad molar (26900)

2.2.4 Actividad antioxidante

2.2.4.1 Capacidad estabilizadora del radical ABTS

Para lograr este propósito se siguió la metodología descrita por Marquina et al. [17]. La capacidad estabilizadora del ABTS a tres concentraciones de ensayo para los extractos (50, 150 y 500 ppm) se determinó mediante la ecuación.

$$CEABTS = \left(\frac{A_{ABTS} - A_{6min}}{A_{ABTS}} \right) \times 100 \quad [18]$$

Donde:

CEABTS: capacidad estabilizadora del radical ABTS, expresada en porcentaje

AABTS: Absorbancia del ABTS antes de agregar la muestra

A_{6min} : Absorbancia de la mezcla reaccionante a los 6 minutos

Como patrón se utilizó ácido ascórbico (AA), (1,5 y 25 $\mu\text{g/mL}$), el cual fue sometido a las mismas condiciones del ensayo.

2.2.4.2 Actividad estabilizadora del radical DPPH

La capacidad para estabilizar el radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) se midió siguiendo la metodología propuesta por Braca et al. [19]. Una curva patrón preparada con ácido ascórbico (1-25 $\mu\text{g/mL}$) se utilizó para comparar la habilidad de los constituyentes de las muestras para estabilizar el radical. Los valores de actividad antioxidante, a las distintas concentraciones de trabajo, se calcularon mediante la ecuación:

$$\%CEDPPH = \left(\frac{A_B - A_M}{A_B} \right) \times 100 \quad [20]$$

Donde:

CEDPPH: Capacidad estabilizadora del radical DPPH, expresada en porcentaje.

AB: Absorbancia del blanco

AM: Absorbancia de la mezcla reaccionante

A partir de estos valores se estimó el 1 concentración capaz de inhibir el 50% del radical (CI_{50}), tanto de las muestras como del patrón.

2.2.4.3 Capacidad antioxidante total hidrosoluble (CATH)

Se midió la CATH de las muestras de acuerdo a la metodología sugerida por Prieto et al. [21]. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva de calibración preparada con ácido ascórbico (25-500 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados obtenidos se expresaron como miligramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de material seco (mgEAA/gvs), mediante la siguiente ecuación:

$$CATH = \frac{LIC \text{ (ppm)} \times VTE}{\text{peso de muestra}}$$

Donde:

CATH: Capacidad Antioxidante Total Hidrosoluble (mgEAA/gvs)

LIC: Lectura Interpolada en la Curva de calibración

VTE: Volumen Total de Extracto

Para el cálculo final debe tenerse en cuenta el factor de dilución.

2.2.4.4 Poder Reductor Férrico (PRF)

Se siguió la metodología propuesta por Oyaizu [22]. Los valores de Absorbancia fueron interpolados en una curva de calibración preparada con ácido ascórbico (5-50 ppm) bajo las mismas condiciones de ensayo y los resultados expresados como mgEAA/gvs.

2.2.4.5 Actividad antinitrosativa

La capacidad de los extractos (500ppm) para inhibir la formación de óxido nítrico se midió siguiendo la metodología propuesta por Giraldo et al. [23]. La actividad antinitrosativa se estimó de acuerdo a la ecuación:

$$\% \text{ AION} = \left[\frac{A_0 - A_M}{A_0} \right] \times 100 \text{ [24]}$$

Donde:

% AION: corresponde a la actividad inhibitoria del óxido nítrico

A0: es la absorbancia del control

AM: es la absorbancia de la mezcla reaccionante

Como patrón de referencia se usó ácido gálico (25 y 50 ppm, 1 mL).

2.2.4.6 Análisis estadístico

En todas las pruebas se utilizaron tres réplicas de cada material residual. Cada réplica se analizó individualmente y los datos son reportados como la

media de tres determinaciones ($n=3 \times 3$) \pm SD ($n=3 \times 3$). La relación entre los diferentes ensayos de actividad antioxidante se describió a través del coeficiente de correlación (r).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Tamizaje fitoquímico

La metodología aplicada para la identificación de los principales metabolitos secundarios, permitió observar la presencia, en todos los extractos, de carbohidratos reductores (Benedict) y compuestos de naturaleza fenólica, tales como polifenoles (Folin-Ciocalteu), flavonoides (Shinoda), fenilpropanoides (Arnou). Triterpenos y/o esteroides (Lieberman Burchard y Salkowsky) se detectaron en *P. edulis* y *R. glaucus*; esta última mostró además antraquinonas (Bornträger) e iridoides (Vainillina) y taninos condensados (FeCl_3 , Gelatina-Sal). La presencia de alcaloides sólo pudo ser establecida en *P. edulis* (Dragendorff, Mayer, Tanred). Los ensayos a la gota en todos los casos fueron confirmados a través de cromatografía de capa fina.

3.2 Contenido fenólico y de pigmentos antocianicos

El tamizaje fitoquímico dejó ver a los subproductos estudiados como importantes fuentes de metabolitos secundarios, especialmente aquellos de naturaleza fenólica como polifenoles, flavonoides y antocianos, entre otros. Este grupo de compuestos está ampliamente difundido en el reino vegetal y son importantes constituyentes de la dieta humana. La comunidad científica les atribuye propiedades biológicas tales como la acción antimutagénica y anticarcinogénica [25], cardioprotectora [26] y antimicrobiana [27], así como poder antioxidante [28].

Además de nutrientes esenciales como minerales y vitaminas, las frutas son alimentos ricos en compuestos fenólicos [29], especialmente pigmentos antocianicos de demostrada actividad antioxidante [30]. La tabla 1 presenta el contenido fenólico y de pigmentos antocianicos en los residuos evaluados.

Muestra	Fenoles totales (mgEAG/gvs)	Antocianos totales (mgEC3G/gvs)
<i>P. edulis</i>	8.646 \pm 0.08	0.094 \pm 0.01
<i>R. glaucus</i>	126.9 \pm 0	1.594 \pm 0.097
<i>C. betacea</i>	14.51 \pm 0.11	0.575 \pm 0.16

Tabla 1. Contenido fenólico y de pigmentos antocianicos en los residuos de *P. edulis*, *R. glaucus* y *C. betacea*.

Se observa que el material residual de *R. glaucus* es el mayor aportante de fitofenoles, con un valor superior a los valores sumados de *C. betacea* y *P. edulis*. Si bien el contenido de pigmentos antocianicos no es muy alto en todos los subproductos evaluados, si guarda una proporcionalidad directa con el contenido fenólico en cada caso.

3. Actividad antioxidante

3.3.1 Actividad estabilizante de radicales libres

Los resultados de la actividad antiradical de los extractos de los materiales residuales de *P. edulis*, *R. glaucus* y *C. betacea* se muestran en la tabla 2.

Muestra	Actividad Antiradical						DPPH (CI ₅₀)
	CEABTS (%)						
	Concentración (ppm)						
	1	5	25	50	150	500	
<i>P. edulis</i>	----	----	----	4.24 ± 0.62	28.8 ± 0.32	45.5 ± 0.13	747.9 ± 0.66
<i>R. glaucus</i>	----	----	----	93.1 ± 0.35	93.3 ± 0.71	94.05 ± 0.28	18.23 ± 0.45
<i>C. betacea</i>	----	----	----	32.5 ± 0.57	50.6 ± 0.46	94.1 ± 0.16	117.9 ± 0.52
AA	23.4 ± 0.35	31.4 ± 0.59	93.9 ± 0.48	-----	-----	-----	10.24 ± 0.98

Tabla 2. Actividad antiradical frente A DPPH y ABTS de de los residuos de *P. edulis*, *R. glaucus* y *C. betacea* comparada con el ácido ascórbico (patrón)

A pesar de que los valores de las pruebas de actividad antiradical se expresan en unidades diferentes, se puede ver una clara correlación entre el contenido fenólico y de antocianos totales (tabla 1) y la actividad antioxidante en los tres residuos evaluados (tabla 2), apareciendo las semillas de *R. glaucus* como el material de mayor potencialidad antioxidante. Cabe recordar que Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante mecanismos como neutralización del oxígeno singlete [31], actividad quelante de metales [32] y estabilización de radicales libres [33].

Parece importante mencionar que la CI₅₀ (18.2± 0.45 para el DPPHµg/mL), resulta destacable si se le compara al del ácido ascórbico (10.24± 0.98µg/mL), un antioxidante natural ampliamente reconocido y aplicado en la industria.

Para los valores de actividad estabilizante de ABTS se hace evidente una clara dependencia de la variable respuesta, capacidad estabilizante del radical, con la concentración del extracto en los tres extractos, mostrando de nuevo al material residual de *R. glaucus* como el más efectivo a las tres concentraciones probadas (actividad mayor al 90%).

3.3.2 Capacidad antioxidante total hidrosoluble (CATH) y Poder Reductor Férrico (PRF)

Las propiedades reductoras de un producto natural están generalmente asociadas con la presencia de agentes antioxidantes capaces de interrumpir las reacciones en cadena de los radicales libres por donación de átomos de hidrógeno [34]. Dos métodos que sirven para demostrar lo anterior son los que miden la CATH y el poder reductor férrico; el primero mide la habilidad reductora de metales de transición (Molibdeno), y el segundo la capacidad de reducir el Fe^{*3} a Fe⁺². Los resultados de estas dos determinaciones aparecen en la tabla 3.

Muestra	CATH (mgEAA/gvs)	P RF (mgEAA/gvs)
<i>P. edulis</i>	6.99±0.11	0.113 ± 0.08
<i>R. glaucus</i>	68.6±0.33	15.7 ± 0.31
<i>C. betacea</i>	7.98±0.17	1.16 ± 0.23

Tabla 3. CATH y Poder Reductor Férrico de los residuos de *P. edulis*, *R. glaucus* y *C. betacea*.

Los valores consignados en la tabla 3 permiten inferir que la matriz con mayor capacidad reductora de iones metálicos es el material residual de *R. glaucus* (CATH = 68.6 ± 0.33 mgEAA/gvs y PRF = 68.6 ± 0.33 mgEAA/gvs), en contraposición el material con menor capacidad reductora es el constituido por las cáscaras de *P. edulis* (CATH= 6.99 ± 0.11 mgEAA/gvs y PRF 0.113 ± 0.08 mgEAA/gvs).

3.3.3 Actividad antinitrosativa

Las especies reactivas del nitrógeno, y especialmente el óxido nítrico (NO), también están ampliamente relacionadas con los procesos oxidativos en el cuerpo humano y por ende con múltiples afecciones de salud como procesos inflamatorios, cáncer y otras afecciones [35], debido a esto resulta de particular interés establecer la capacidad antinitrosativa dentro del perfil antioxidante de un producto natural. En la figura 1 pueden observarse los resultados de la actividad antinitrosativa de los tres residuos evaluados y del compuesto utilizado como patrón de referencia.

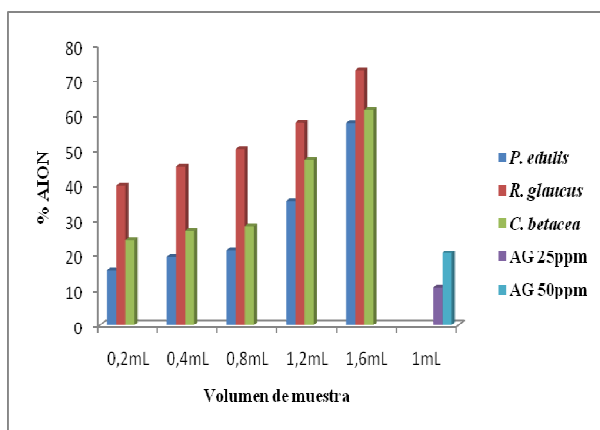


Figura 1. Actividad inhibitoria del óxido nítrico de los residuos *P. edulis*, *R. glaucus* y *C. betacea* comparada con el ácido gálico.

Dentro de lo observado en la figura 1 cabe destacar la clara relación entre volumen de extracto aplicado y la respuesta obtenida (% AION). De nuevo puede verse la notoria superioridad de las semillas de *R. glaucus* sobre los materiales residuales provenientes de *P. edulis* y *C. betacea*; a cada uno de los volúmenes probados.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La notable actividad estabilizante de radicales libres, así como la capacidad para reducir iones metálicos y neutralizar al óxido nítrico, evidenciada en las semillas de *Rubus glaucus*, encuentran soporte en la amplia gama de metabolitos secundarios que posee, especialmente en aquellos de naturaleza fenólica, todo lo cual perfila a dicho material residual como el de mayor potencialidad antioxidante. Se encontró una marcada relación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante expresada por cada uno de los materiales estudiados. Este trabajo se constituye en una propuesta alternativa para dar un manejo ambiental más amigable a este tipo de materiales residuales, lo cual destaca el valor agregado que se le puede dar a estos como fuentes de compuestos bioactivos de interés industrial. De acuerdo a los resultados observados en las semillas de *R. glaucus*, se hace necesario identificar los metabolitos responsables de dicha actividad.

5. BIBLIOGRAFÍA

[1] W. Parawira, J. S. Read, B. Mattiasson and L. Björnsson, "Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion," *Biomass and Bioenergy*, vol. 32, pp. 44 – 50, 2008.

[2] B. Rivas Torres, B. Aliakbarian, P. Torre, P. Perego, J. M. Domínguez, M. Y. Zilli and A. Converti "Vanillin bioproduction from alkaline hydrolyzate of corn cob by *Escherichia coli* JM109/pBB1," *Enzyme*

and *Microbial Technology*, vol. 44, pp. 154–158, 2009.

[3] D. Di Gioia, L. Sciubba, L. Setti, F. Luziatelli, M. Ruzzi, D. GZanichelli and F. Fava, "Production of biovanillin from wheat bran," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 41, pp. 498–505, 2007.

[4] M. L. Cayuela, P.D. Millner, S. L. F. Meyer and A. Roig, "Potential of olive mill waste and compost as biobased pesticides against weeds, fungi, and nematodes," *Science of the Total Environment*, vol. 399, pp. 11 – 18, 2008.

[5] B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, *Free radicals en: Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 1998.

[6] P. Angulo, D. Díaz, J. Espinoza, V. Fernández, M. Figueroa y A. Galarza, "Implicaciones farmacológicas y toxicológicas del óxido nítrico en la inflamación intestinal II: Enteritis inducida por AINES como modelo experimental para el estudio científico de la flora medicinal peruana," *Rev. de Cien. Vet.*, vol.17 No 3, pp. 21-26, 2001.

[7] H. C. Grice, "Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 24, pp. 1127–1130, 1986.

[8] H.P. Wichi, "Tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium," *Food and Chemical Toxicology*, vol.26, pp. 717–723, 1988.

[9] B. Sultana, F. Anwar, M. Rafique Asi and S. A. Shahid Chatha. "Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil," *Grasas y Aceites*, vol. 59 No 3, pp. 205-217, 2008.

[10] A. C. Oliveira, I. Barros Valentim, C. A. Silva, E. J. Henriques Bechara, M. Paes de Barros, C. Marinho Mano and M. O. Fonseca Goulart, "Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues," *Food Chemistry*, vol. 115, pp.469–475, 2009.

[11] S. A. Shahid Chatha, F. Anwar, M. Manzoor and B. Jawad-Ur-Rehman. "Evaluation of the antioxidant activity of rice bran extracts using different antioxidant assays," *Grasas y Aceites*, vol. 57 No 3, pp. 328-335, 2006.

[12] G. A. Sanabria. *Análisis fitoquímico preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación de cuarenta plantas de la familia Compositae*. Bogota: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia, 1983.

[13] X. A. Domínguez. *Métodos de investigación fitoquímica*. México/Buenos Aires: Centro regional de ayuda técnica, 1973.

[14] E. Murillo Perea, *Guía metodológica para la investigación fitoquímica preliminar en plantas medicinales*. Ibagué: Universidad del Tolima, 2004.

[15] K. Dastmalchi, D. Dorman, M. Kosarb and R. Hiltunen, "Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian

- balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract," *LWT*, vol. 40 No 240, pp. 239–248, 2007.
- [16] M. M. Giusti and R. E. Wrolstad, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, New York: Wrolstad REE; Jonh Wiley & sons, Unit F1.2.1-1.2.13, 2001.
- [17] V. Marquina, L. Araujo, J. Ruíz, A. Rodríguez-Malaver y P. Vit, "Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.)," *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, [online]. 58, 2008. Disponible:<http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v58n1/art14.pdf>
- [18] Los autores.
- [19] A. Braca, C. Sortino, M. Politi et al. "Anti-oxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*," *J. Ethnopharmacol*, vol. 792. pp. 379-381, 2002.
- [20] G. Zheng, L. Xu, P. Wu, H. Xie, Y. Jiang, F. Chen, X. Wei, "Polyphenols from longan seeds and their radical-scavenging activity," *Food Chemistry*, vol. 116, pp. 433–436, 2009.
- [21] P. Prieto, M. Pineda and M. Aguilar, "Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity trough the formation of a phosphomolibdenum complex: specific application to the determination of vitamin E," *Analytical Biochemistry*, vol. 269, pp. 337-341, 1999.
- [22] M. Oyaizu, "Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine," *Japanese journal of nutrition*, vol. 44, pp. 307-315, 1986.
- [23] B. Giraldo, M. M. Hernández, P. Angulo y C. Fuertes, "Actividad antinitrosativa y antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de *Uncaria tomentosa* Willd. D.C. (Uña de gato)," *Rev. Soc. Quím. Perú*, vol. 69 No 4, pp. 229-242, 2003.
- [24] B. Giraldo, M. M. Hernández, P. Angulo y C. Fuertes, "Actividad antinitrosativa y antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de *Uncaria tomentosa* Willd. D.C. (Uña de gato)," *Rev. Soc. Quím. Perú*, vol. 69 No 4, pp. 229-242, 2003.
- [25] M. Kampa, V. I. Alexaki, G. Notas, A. P. Nifli, A., Nistikaki, A. Hatzoglou, et al. "Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action," *Breast Cancer Research*, vol. 6, pp. R63–R74, 2004.
- [26] R. A. A. Caccetta, K. D. Croft, L. J. Beilin and I. B. Puddey, "Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 71, pp. 67–74, 2000.
- [27] M. Friedman, and H. S. Jurgens, "Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, pp. 2101–2110, 2000.
- [28] N. A. Soobrattee, V. S. Neergheen, , A. O. Luximan-Ramma, C. Auroma and T. Bahorum, "Phenolics as potencial antioxidants therapeutic agents: Mechanism and actions," *Mutation Research*. vol. 579, pp. 200-213, 2005.
- [29] J. B. Harborne and C. A. Williams, "Advances in flavonoid research since 1992," *Phytochemistry*, vol. 52, pp.481-504, 2000.
- [30] J. C. Espin, C. Soler-Rivas, H. J. Wichers and C. García-Viguera, "Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff," *J. Agric. Food Chem*, vol. 48, pp. 1588-1592, 2000.
- [31] S. Foley, S. Navaratnam, D. J. McGarvey, E. J. Land, T. G. Truscott and C. A. Rice-Evans, "Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, pp. 1202–1208, 1999.
- [32] J. E. Brown, H. Khodr, R. C. Hider, and C. A. Rice-Evans, "Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties," *Biochemical Journal*, vol. 330, pp. 1173–1178, 1998.
- [33] M. Lodovici, F. Guglielmi, C. Casalini, M. Meoni, V. Cheynier, and P. Dolara, "Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine," *European Journal of Nutrition*, vol. 40, pp. 74–77, 2001.
- [34] M. H. Gordon. *The mechanism of antioxidant action in Vitro*. B.J.F. Hudson (Ed), Food antioxidants London: Elsevier Applied Science, 1990, pp. 1-18.
- [35] A. Monaca, R. M. J. Palmer and E. A. Higgs, "Nitric oxide: physiology, path physiology and pharmacology," *Pharmacological Reviews*, vol. 43 pp. 109-142, 1991.