



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Determinación de la capacidad antioxidante de bayas y frutos del bosque

Alumna: Laura Palacios Colón

Junio, 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN



Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE BAYAS Y FRUTOS DEL BOSQUE

Laura Palacios Colón

Junio, 2017

INDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	6
2.1 Importancia de los fitoquímicos en la alimentación.....	6
2.2 Frutos silvestres y bayas.....	7
2.3 Antioxidantes y radicales libres.....	8
2.3.1 Qué son los radicales libres y los antioxidantes.....	8
2.3.2 Clasificación de antioxidantes.....	9
2.4 Compuestos fenólicos.....	11
2.5 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante.....	14
2.5.1 Contenido total en compuestos fenólicos (TPC).....	16
2.5.2 Contenido total en flavonoides (TFC).....	17
2.5.3 Ensayos de la capacidad antioxidante.....	18
2.5.3.1 ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2´ -azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico).....	18
2.5.3.2 Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	20
3. Objetivos.....	20
4. Parte experimental.....	20
4.1 Reactivos.....	20
4.2 Instrumentación.....	22
4.3 Muestras y preparación.....	22
4.3.1 Pretratamiento de muestra.....	22
4.3.2 Extracción de los compuestos fenólicos.....	23
4.4 Contenido total de fenoles (TPC), contenido total de flavonoides (TFC) y ensayos de la capacidad antioxidante.....	23
4.4.1 Contenido total en compuestos fenólicos (TPC).....	23
4.4.2 Contenido total en flavonoides (TFC).....	25
4.4.3 ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2´ -azino-bis (3etilbenzotiazolin-6 sulfónico).....	25
4.4.4 Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	27
5. Resultados	28

5.1 Interpretación de los resultados.....	35
6. Conclusión.....	38
7. Bibliografía.....	40

1. RESUMEN

El propósito de este Trabajo de Fin de Grado titulado “Determinación de la capacidad antioxidante de bayas y frutos del bosque”, ha sido realizar un estudio de la capacidad antioxidante de dos especies seleccionadas de frutos silvestres, recolectadas en su hábitat natural, en la provincia de Jaén; *Crataegus monogyna Jacq* (majoletas) y *Arbutus unedo* (madroños).

Para ello, se realiza el análisis de fenoles y flavonoides; mediante los siguientes métodos: contenido total de polifenoles (método de Folin-ciocalteu), contenido total de flavonoides, así como la evaluación de la capacidad antioxidante, utilizando dos ensayos *in vitro*: ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo). La técnica empleada para la determinación de la capacidad antioxidante en el trabajo, ha sido espectrofotometría UV-Visible.

De los frutos rojos comestibles, los madroños presentan una mayor actividad antioxidante, mientras que las majoletas tienen niveles inferiores. Los datos obtenidos completan los datos existentes en bibliografía, y aportan información útil para el consumidor, debido al interés que despiertan hoy en día las propiedades de nuevos frutos silvestres. La investigación y la ciencia informan que dichos antioxidantes reducen riesgo de desarrollar enfermedades: las más significativas son: envejecimiento, aterosclerosis, catarata senil, cáncer, insuficiencia renal aguda (Porkorny et al., 2004)

ABSTRACT

The purpose of this work entitled "Determination of the antioxidant capacity of berries and fruits of the forest" has been to study the antioxidant capacity of two selected species of wild fruits collected in their natural habitats in the city of Jaén; *Crataegus monogyna* Jacq and *Arbutus unedo*.

To do this, we performed the phenol and flavonoid analysis, using the following methods: Total content of polyphenols (Folin-ciocalteu method), total content of flavonoids, as well as the evaluation of antioxidant capacity, using two in vitro tests: ABTS (

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, diammonium salt) and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). I have used UV-Visible spectrophotometry to determine the antioxidant capacity.

Of the edible red fruits, *Arbutus unedo* present a greater antioxidant activity, whereas the *Crataegus monogyna* Jacq. have lower levels. The data obtained complete the current knowledge of this fruits, which is important due to the great interest of these foods. Scientific reports indicate that these antioxidants reduce the risk of developing diseases the most significant are: aging, atherosclerosis, senile cataract, cancer, acute renal failure. (Pokorny et al., 2004)

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Importancia de los fitoquímicos en la alimentación.

Actualmente, los científicos y especialistas en nutrición, sugieren que los fitoquímicos, sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, ofrecen muchos beneficios para la salud, cuando se consumen como parte de la dieta habitual. Los fitoquímicos constituyen la evolución más reciente del término “alimentos funcionales” y enfatiza las fuentes vegetales de la mayoría de los compuestos preventivos de enfermedades como el cáncer y el envejecimiento (Chasquibol et al., 2003).

Una clasificación de los compuestos fitoquímicos es la siguiente (Chasquibol et al., 2003):

Terpenos: los terpenos funcionan como antioxidantes, protegiendo a los lípidos y a la sangre contra el ataque de radicales libres. Los terpenos más interesantes son los carotenoides y los limonoides.

Fenoles: estos fitonutrientes incluyen un numeroso grupo de compuestos que han sido sujetos a una extensa investigación como agentes preventivos de enfermedades. Este grupo incluye a los flavonoides y sus subgrupos: las antocianidinas, las catequinas, los ácidos gálicos y las isoflavonas.

Tocoferoles y tocotrienoles: La actividad antioxidante de estos fitoquímicos, es debida principalmente a su habilidad para donar sus hidrógenos a los radicales libres.

En la dieta mediterránea, las frutas, las verduras y el aceite de oliva, son alimentos ricos en compuestos fitoquímicos y compuestos fenólicos, que proporcionan diversos efectos beneficiosos para la salud (Tur, 2004). Estos efectos positivos se han asociado a la acción de algunos componentes antioxidantes de estos alimentos naturales. Las bayas y los frutos del bosque son, por regla general, ricos en compuestos fenólicos. Los fenoles, metabolitos

secundarios sintetizados por las plantas, presentan una alta capacidad antioxidante.

2.2 Frutos silvestres y bayas

Los frutos silvestres y bayas se encuentran entre las fuentes habituales de antioxidantes en la dieta. Estos compuestos son ricos en compuestos fenólicos, especialmente en flavonoides, los cuales se caracterizan por su capacidad antioxidante, entre otras propiedades (Martínez, 2014).

En la actualidad, los frutos silvestres y hierbas se utilizan todavía para hacer mermeladas caseras y postres para consumo y venta de productos locales. (Tardío et al., 2006). A modo de ejemplo, la tabla 1 muestra aquellos frutos silvestres mayoritarios en la península (Ruiz, 2014).

Plantas/arbustos silvestres	Fruto silvestre	Uso alimentario
<i>Arbutus unedo</i> L.	Madroño	Frutos crudos, licores, otras bebidas
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	Majuela o majoleta	Fruto crudo
<i>Fragaria vesca</i>	Fresa silvestre	Fruto crudo
<i>Malus sylvestris</i>	Miller maillo	Frutos almacenados, frutos crudos, licores, otras bebidas
<i>Prunus avium</i> L.	Morrino	Frutos crudos, licores, otras bebidas
<i>Prunus cerasus</i>	Guinda	Frutos crudos, licores, otras bebidas
<i>Prunus dulcis</i> (Miller)	Almedra	Frutos almacenados
<i>Prunus insititia</i> L.	Ciruela silvestre	Fruto crudo
<i>Prunus spinosa</i> L.	Endrina	Frutos almacenados, frutos crudos, licores, otras bebidas
<i>Ribes uva-crispa</i> L.	Uva de espino	Frutos almacenados, frutos crudos, licores, otras bebidas
<i>Rubus idaeus</i> L.	Frambueso	Fruto crudo
<i>Rubus ulmifolius</i> L.	Zarza, moras	Frutos almacenados, frutos crudos, licores, otras bebidas

Tabla 1. Frutos silvestres utilizados en la alimentación humana (Ruiz, 2014).

Para la realización de este trabajo, se seleccionaron dos frutos rojos de la familia rosácea: *Crataegus monogyna* Jacq. (majoleta) y de la familia ericáceus: *Arbutus unedo* (madroño).

- ***Crataegus monogyna* Jacq. (Majuelo)**; también conocidos como espino, son pequeños árboles y arbustos que crecen naturalmente en Europa y en el norte de África. Flores, hojas y frutos de *Crataegus monogyna* son conocidos por sus usos, especialmente contra enfermedades cardiovasculares, y también se han utilizado en la medicina popular como una cura para el estrés, el nerviosismo y el sueño (Chang et al., 2002).



Figura 1. Frutos de *Crataegus monogyna* Jacq.

- ***Arbutus Unedo* L. (Madroño)**; Florece a finales de verano principio de otoño. El madroño es una baya, que permanece largo tiempo en el árbol, en estado de madurez es de color rojo, con la pulpa amarillenta (figura 2). Las semillas son pequeñas, pardas y angulosas. Los madroños se pueden consumir en estado crudo, son muy dulces y muy sabrosos (Ruiz, 2014).



Figura 2. Frutos de *Arbutus Unedo* L.

2.3 Antioxidantes y radicales libres.

2.3.1 Qué son los radicales libres y los antioxidantes.

Los **radicales libres** son moléculas que poseen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre obtiene el electrón que necesita, la molécula estable que se lo transfiere se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, ocasionándose una reacción en cadena que destruye nuestras células (Finkel & Holbrook, 2000).

La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté en su entorno provocando un gran daño a moléculas, membranas y tejidos celulares. Un radical libre puede afectar a 1 millón de moléculas durante la reacción en cadena (Zamora, 2007). En la tabla 2 se realiza una clasificación de los radicales libres.

Clasificación	Radical libre	Abreviatura
Especies reactivas de oxígeno	Oxígeno singulete	$^1\text{O}_2$
	Ion superóxido	O_2^\bullet
	Radical hidroxilo	OH^\bullet
	Peróxido de hidrogeno	H_2O_2
	Radical alcoxi y peroxi	RO^\bullet Y ROO^\bullet
	Radical hidroperóxido	ROOH^\bullet
	Óxido nítrico	NO^\bullet
Especies reactivas de nitrógeno	Dióxido nítrico	NO_2^\bullet
	Peroxinitrito	$\text{ONOO}^{\bullet-}$

Especies reactivas de azufre	Radical tiilo	RS^{\bullet}
Especies reactivas de cloro	Ácido hipocloroso	HOCl

Tabla 2. Clasificación y abreviatura de los radicales libres (Fernández, et al., 2009).

Un **antioxidante** es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones, que son captados por estos radicales libres. El problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que mantener un exceso de radicales libres durante un largo tiempo, ya que pueden provocar daños a muchas moléculas (Finkel & Holbrook, 2000). En la figura 3, se representa un esquema donde se muestra la interacción que produce un radical con un antioxidante.

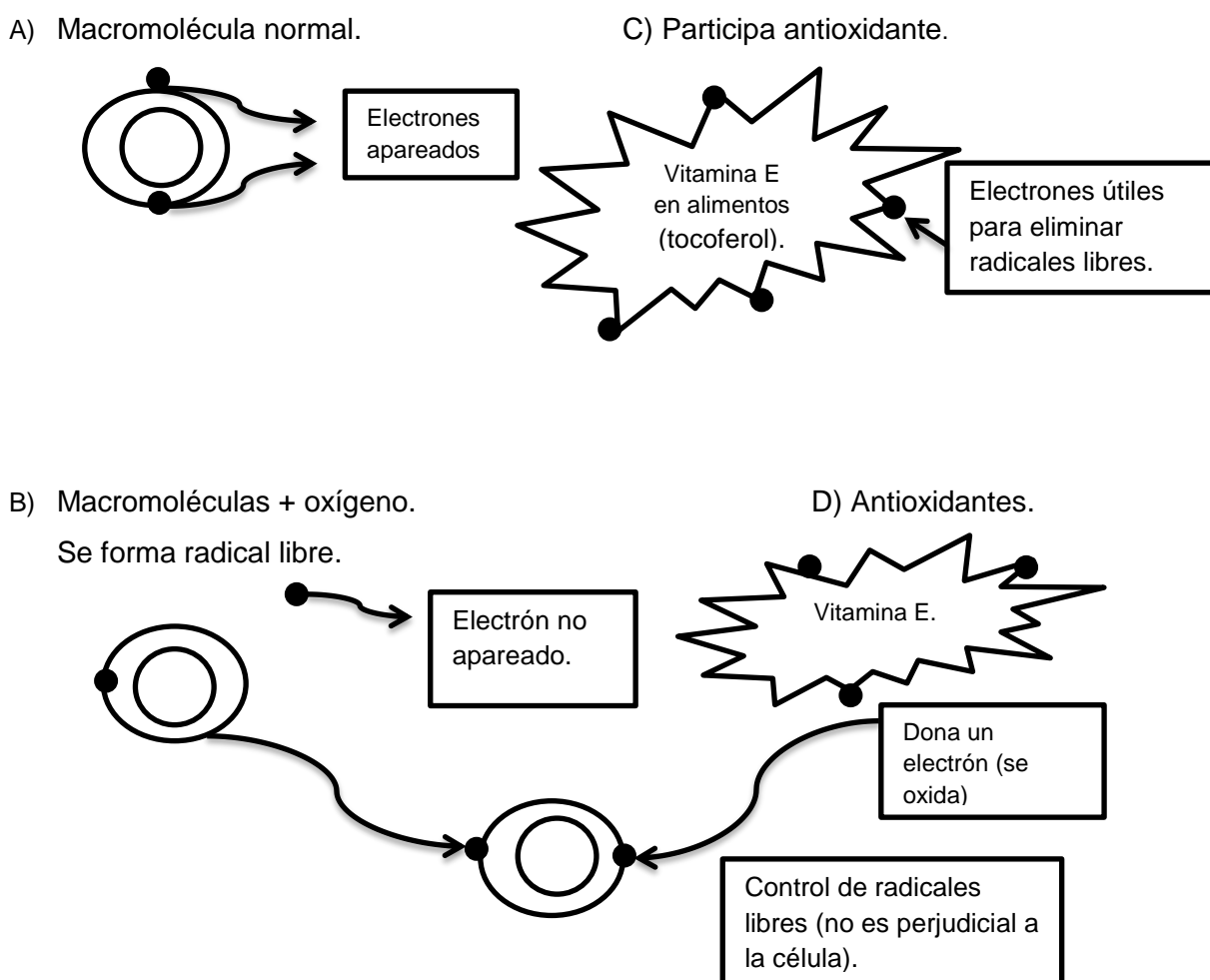


Figura 3. Interacción entre un radical libre y un antioxidante (Coronado et al., 2015).

2.3.2 Clasificación de antioxidantes.

Los antioxidantes son sustancias que forman parte de los alimentos, y que pueden prevenir los efectos adversos de radicales libres sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos (Patthamakanokporn et al., 2008).

Los efectos dañinos de los radicales libres están controlados en el organismo mediante antioxidantes de origen endógeno (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ceruloplasmina, ácido úrico, bilirrubina, glutatión...) y exógeno a través de la dieta (grupo de compuestos fenólicos, vitamina E, vitamina C, escualeno, carotenoides, selenio) (Oliveras, 2005).

Según su mecanismo de reacción los antioxidantes se pueden clasificar en (Oliveras, 2005):

- **Primarios:** impiden la formación de radicales libres, detienen la reacción en cadena y se comportan como captadores de estos radicales libres, como es el caso de la vitamina C, E y de polifenoles como el resveratrol.
- **Secundarios:** interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres o desplazan las especies reactivas. De este modo, se inhibe la generación de radicales libres, como es el caso del ácido ascórbico y de los carotenos.
- **Terciarios:** reparan el daño causado a las moléculas por los radicales libres o eliminan aquellos que se han dañado. Modifican el potencial redox sobre todo los antioxidantes como la vitamina C, polifenoles y selenio.

La mayoría de compuestos antioxidantes actúan por un único mecanismo. Sin embargo, los polifenoles pueden tener acciones combinadas. El poder antioxidante de los compuestos fenólicos depende del número de anillos fenólicos, del número y posición de los grupos hidroxilos que posee la molécula y de los dobles enlaces presentes, ya que estabilizan los radicales libres al ceder un hidrogeno de sus grupos hidroxilos (Konga et al., 2003), (Oliveras, 2005).

2.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son una de las categorías más importantes de fitoquímicos. Sus propiedades antioxidantes presentes en sustratos vegetales pueden mejorar la funcionalidad de los alimentos (Oliveras, 2005).

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo utilizados como mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés, radiación UV, temperaturas extremas y parásitos, entre otras (Muñoz et al., 2007).

La cantidad de compuestos fenólicos presentes en una planta depende de varios factores como: la variedad, condiciones de cultivo, estado de maduración así como las condiciones de proceso (pelado, troceado, fritura) y almacenamiento. Por otro lado, su distribución en los tejidos de las plantas, a nivel celular y subcelular, no es uniforme, ya que las capas exteriores contienen mayores cantidades que las interiores (Romero, 2012).

En general, los compuestos fenólicos como antioxidantes, son multifuncionales y actúan según la mayoría de los mecanismos (Oliveras, 2005). Estos compuestos se engloban según su estructura química en: flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles (Ochoa & Ayala, 2004).

Los **flavonoides** son metabolitos secundarios polifenólicos y constituyen pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño causado por agentes oxidantes. El organismo no puede producir estas sustancias químicas, por lo que tiene que ser obtenidas por la alimentación. Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-Gyorgy en 1930.

En su estructura química contiene un número variable de grupos hidroxilos. Los flavonoides comparten una estructura común de difenilpiranos, compuesto por dos anillos fenilos unidos a través de un anillo pirano (figura 4) (Martínez et al., 2002).

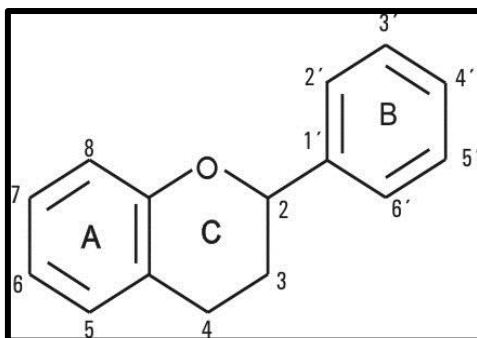


Figura 4. Estructura básica de un flavonoides (Martínez et al., 2002).

Esta estructura básica puede dar lugar multitud de patrones según la sustitución de grupos hidroxilos y grupos carbonilos en el anillo de pirano. La actividad antioxidante de los flavonoides depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Martínez et al., 2002).

Se han descrito más de 5000 flavonoides diferentes, que se subdividen en antoxantinas (pigmentos blancos, amarillos e incoloros) y antocianinas (pigmentos rojos, azules o púrpuros). La clasificación que realiza La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, 2006) se clasifican según su estructura y vía metabólica, en flavonoides simples, isoflavonoides y neoflavonoides. En la tabla 3, se realiza una clasificación de los flavonoides en relación a sus fuentes de alimentación. Los flavonoides pueden actuar como antioxidantes primarios o secundarios (Ochoa & Ayala, 2004).

Flavonoides	Grupo	Compuesto	Alimento
Antoxantinas	Flavonoles	Quercetina	Lechuga, aceitunas y cebollas
		Kemferol	Piel de fruta
		Miricetina	Apio
	Flavonas	Luteolina	Piel de manzana
		Apigenina	
		Crisina	
		Rutina	
	Flavanoles	Sibelina	
		Catequina	Vino tinto
		Epicatequina	Té
Flavanonas	Galocatequina		
	Fisetina	Cítricos(limón, lima y mandarina)	
	Mesperodina	Uvas	
	Naringenina	Cítricos (piel)	
Isoflavonas	Taxifolin	Soja	
	Genisteina		
	Daidzeína		
		Gliceteina	
		Pelargonidina	Frambuesa

Antocianinas	Antocianidinas	Delfinidina Cianidina Petunidina Peonidina Malvidina	Cereza Bayas Vino tinto Uva roja Uva
---------------------	----------------	--	--

Tabla 3. Clasificación de los flavonoides y fuentes de alimentación (Ochoa & Ayala, 2004).

Los **ácidos fenólicos** pertenecen al grupo de fenoles más simple. La estructura química consta de un anillo aromático con un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo. Según su estructura se clasifican en derivados del ácido benzoico (C₆-C₁) (tabla 4) o del ácido cinámico (C₆-C₃) (tabla 5). Por repetición de estas estructuras (C₆-C₁) o (C₆-C₃) se forman estructuras poliméricas, taninos hidrolizables, malvina y lignina, hay tanino que pueden ser saludables para las personas, pero en general son tóxicos. (Sánchez, 2008).

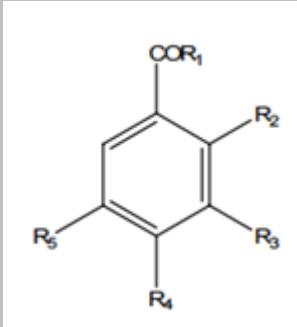
Ácido benzoico; C ₆ -C ₁	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
	OH	H	OH	OH	OH	Ácido gálico
	OH	OH	H	H	H	Ácido salicílico
	OH	H	OH	OH	H	Ácido portocatóquico
	OH	H	OCH ₃	OH	H	Ácido vanílico
	OH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Ácido siringico
	H	H	OCH ₃	OH	H	vanillina
	H	H	H	OCH ₃	H	Anisaldehído

Tabla 4. Estructura química de ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico.

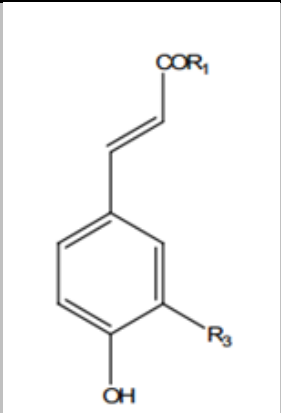
Ácido benzoico; C ₆ -C ₁	R ₁	R ₃	
	OH	OH	Ácido caféico
	OH	H	Ácido p-cumárico
	OH	OCH ₃	Ácido ferúlico
	Ácido tartárico	OH	Ácido cafeil- tartárico
	Ácido quínico	OH	Ácido clorogénico

Tabla 5. Estructura química de ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico.

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

Los mecanismos por los que actúan todos estos compuestos varían dependiendo de su concentración y del tipo de compuestos presentes en los alimentos (Pedrielli & Skibted, 2002).

2.5 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante, no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. Debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil del antioxidante, por lo que es recomendable utilizar varios métodos, para facilitar la comparación de los resultados. En la práctica se han desarrollado gran cantidad de métodos. Las condiciones ideales que debe reunir un procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante son: tener un mecanismo químico definido y un punto final, evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomos de hidrogeno, ser adaptable para medir antioxidantes hidrófilos y lipofílicos. (Romero, 2012).

Los más populares son los basados en técnicas espectroscópicas de ultravioleta-visible, basándose en reacciones colorimétricas, estas técnicas son

fácil de usar, rápidas y precisas, lo que nos permite obtener valores cuantitativos en poco tiempo.

Los antioxidantes pueden inactivar los radicales mediante dos posibles vías, el resultado final es el mismo pero difieren en la cinética y en las reacciones colaterales (Huang et al., 2005):

- **Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).**

La reacción es como se muestra en la figura 5, siendo X^{\bullet} el radical libre y AH el antioxidante, el nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial. Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpia de disociación del grupo donador de hidrogeno en la molécula antioxidante. Las reacciones HAT dependen del pH y del solvente, y normalmente son muy rápidas (Huang et al., 2005).



Figura 5. Reacción de transferencia de átomos de hidrogeno (Huang et al., 2005).

- **Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (SET).**

En estas reacciones el antioxidante transfiere un electrón para reducir el radical como se representa en la figura 6. La reactividad de estas reacciones se basa en la desprotonación y el potencial de ionización del grupo funcional reactivo, estas reacciones también dependen del pH y son lentas. Cuando $AH^{\bullet +}$ tiene suficiente tiempo de vida, las reacciones secundarias representan una interferencia significativa para el ensayo, son reacciones muy sensibles a la contaminación de trazas (Ramírez, 2011).

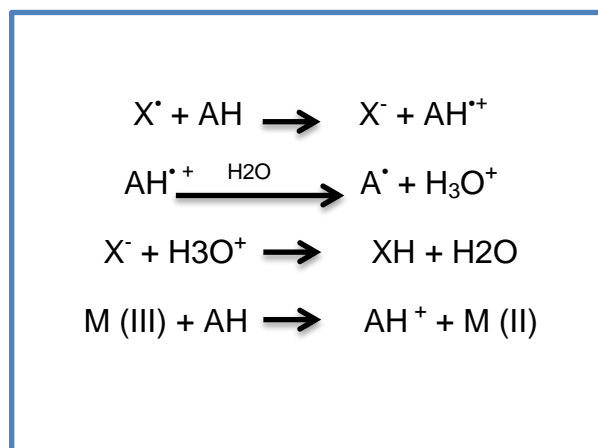


Figura 6. Mecanismo de reacción SET, X^{\bullet} es el radical libre y AH es el antioxidante.

Entre los ensayos para la determinación de la actividad antioxidante, el método DPPH $^{\bullet}$ es el más simple y el más rápido. Por otra parte, el ensayo ABTS $^{\bullet+}$ se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Por lo tanto, estos son los métodos más empleados.

A continuación, se detallan los métodos que se utilizan en este trabajo: contenido total de polifenoles (método de Folin-ciocalteu), contenido total de flavonoides, ensayos *in vitro*: ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo).

2.5.1 Contenido total en compuestos fenólicos (TFC)

El ensayo Folin-Ciocalteu, es el método más usado para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos. Es el más común debido a su simplicidad, a la disponibilidad comercial del reactivo, y por ser un procedimiento ya estandarizado (Singleton et al., 1998). Inicialmente, fue aplicado al análisis de proteínas, tomando como ventaja la actividad del reactivo frente al residuo de proteína, tirosina (que contiene un grupo fenol). Muchos años después este ensayo se extendió al análisis de fenoles totales en vino y desde entonces se le ha encontrado muchas aplicaciones.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene

molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con los compuestos fenólicos presentes en la muestra, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Gutiérrez et al., 2008). El molibdeno es reducido en el complejo mediante la reacción de transferencia de electrones entre el Mo (IV) y el reductor como se muestra en la figura 7 (Huang et al., 2005).

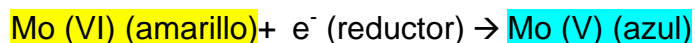


Figura 7. Reacción de transferencia de electrones entre el Mo (IV) y el reductor (Huang et al., 2005).

Los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico de color amarillo, al ser reducido por los compuestos fenólicos dan lugar a complejos de color azul intenso de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. La coloración azul producida posee una absorción máxima entorno a 765nm y la transferencia de electrones se realiza a un pH básico (Gutiérrez et al., 2008).

2.5.2 Contenido total en flavonoides (TFC).

Para la determinación del contenido total de flavonoides, los métodos más comunes se basan en la espectrofotometría de ultravioleta-visible (Ulubele et al., 2005). Este método, propuesto inicialmente por Cristo y Müller (1960) para el análisis de materiales a base de hierbas, ha sido varias veces modificado. Dos ensayos espectrofotométricos, determinan la formación de complejos de aluminio para la determinación del contenido total en flavonoides en alimentos y en plantas de diferentes familias. El método se determina a una absorbancia de 410-430 nm después de añadir $AlCl_3$, pero se observó que solo era selectivo para flavonoles y flavanonas.

Para mejorar el método, una investigación varió las condiciones experimentales, tras la reacción de complejación Al-flavonoide.

Se distinguen dos procedimientos. En el primer procedimiento, se añade $AlCl_3$ en un intervalo de concentración de 2-10 % (m/v) en una solución ácida, las

medidas espectrofotométricas se realizaban después de 2-60 minutos a una absorbancia máxima de 404 nm, tras la adición de AlCl_3 . Se utilizaba diferentes patrones internos (quercetina, rutina, galangina...). En el segundo procedimiento, la reacción de complejación se lleva a cabo en presencia de NaNO_2 en medio alcalino. El método estaba basado en la nitración de cualquier anillo aromático que lleve un grupo catecol, después de añadir Al (III) se formó un complejo de color amarillo que se volvió rojo tras la adición de NaOH, el valor de la absorbancia se midió a 510 nm. En este procedimiento se prefiere la catequina como patrón interno.

La aplicación de ambos procedimientos a muestras naturales daba diferentes resultados en cuanto a su contenido de flavonoides. Por lo tanto, el contenido de la expresión "total de flavonoides" no es adecuada. Los resultados de los dos métodos dependen de la estructura de los flavonoides presentes en las muestras (Pękal & Pyrzyńska, 2014).

2.5.3 Ensayos de la capacidad antioxidante

2.5.3.1 ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))

Este ensayo fue desarrollado por (Miller et al., 1993) como un método simple y eficaz para determinar la capacidad antioxidante.

La captación de radicales libres es el principal mecanismo de acción, por lo que se trata de una reacción de transferencias de electrones (SET). Uno de los radicales más utilizados es el ABTS (Sal diamónica del Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) (Pokorny et al., 2004).

El ensayo se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical causada por la presencia de donantes de hidrógeno o de electrones procedentes de los compuestos fenólicos. En ausencia de este tipo de compuestos, el ABTS^{*+} es estable, de color azul, en presencia de compuesto fenólicos, el radical ABTS^{*+} reacciona fuertemente con un donador de átomos

de hidrogeno, convirtiéndose en ABTS no coloreado (Prior et al., 2005). (Figura 8).

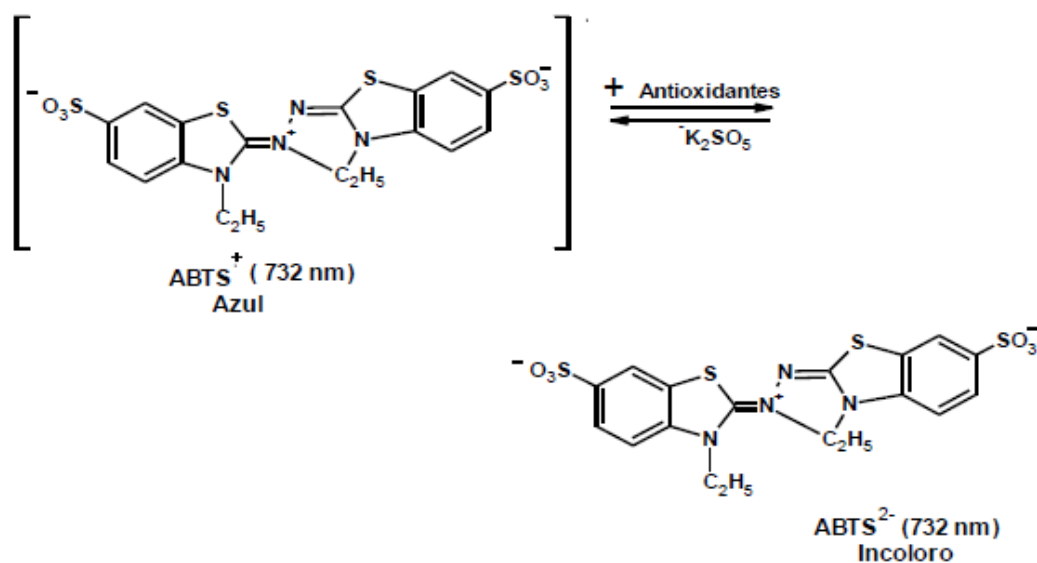


Figura 8. Estructura del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ antes y después de la reacción con el antioxidante (Zuleta et al., 2009).

El método para la generación del radical catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$, implica la producción directa del cromóforo $\text{ABTS}^{\bullet+}$ verde-azul (figura9), a través de la reacción entre ABTS y persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Éste presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera, el grado de decoloración color verde-azul se cuantifica como un decrecimiento en la absorbancia a 734 nm. Este decrecimiento depende de la duración de la reacción, del tipo y de la concentración de antioxidantes presentes en la muestra (Shahidi & Zhong, 2015).

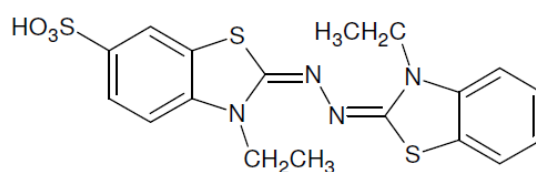


Figura 9. Estructura del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Prior et al., 2005).

2.5.3.2 Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH[•] es el más rápido, es simple y menos costoso en comparación con otros métodos. Este método fue propuesto por Marsden Blois (1958) (Blois, M., 1958), quien demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH[•] y dentro de sus modificaciones posteriores destaca la de Brand-Williams.

El proceso de evaluación de la capacidad antioxidante por DPPH consiste en la deslocalización del electrón desapareado, el cual le otorga un color violeta caracterizado por una banda de absorción en torno a 520 nm, en solución metanólica. Cuando el DPPH entra en contacto con un antioxidante, se produce la forma reducida del DPPH con la producción de la pérdida de color, y por tanto pérdida de absorbancia (Muñoz et al., 2007). De esta manera, la capacidad antioxidante que tienen las muestras se cuantifica midiendo el grado de decoloración que éstas provocan en una solución metanólica.

El radical DPPH[•] es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados estables y además comercialmente disponibles (Prior et al., 2005). La figura 10 muestra el mecanismo por el cual el DPPH[•] acepta un hidrogeno de una molécula antioxidante.

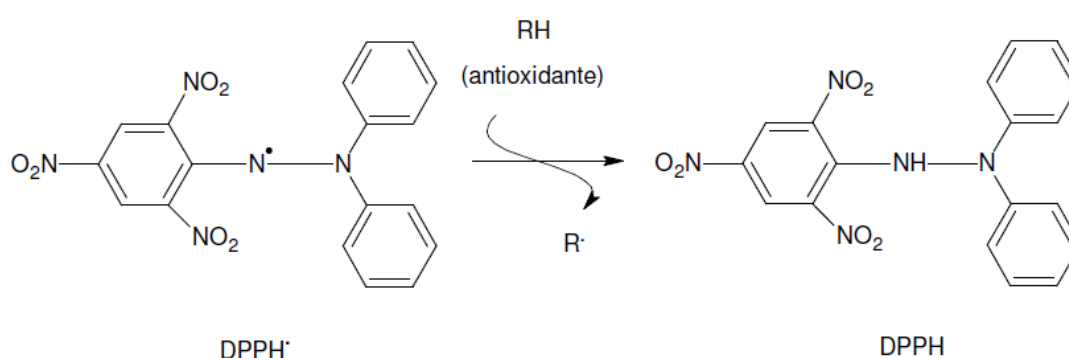


Figura 10. Reacción entre el DPPH[•] y un antioxidante (Moon & Shibamoto, 2009)

3. OBJETIVOS

Con la realización de este trabajo se pretende evaluar la capacidad antioxidante de dos frutos silvestres comestibles: majoletas (*Crataegus monogyna* Jacq) y madroños (*Arbutus Unedo L.*);

Dentro de este objetivo principal, los objetivos específicos son los siguientes:

- Revisión bibliográfica del trabajo a desarrollar.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de los dos frutos silvestres, mediante los métodos: contenido total de fenoles (TPC), contenido total de flavonoides (TFC), y ensayos *in vitro*: ABTS Y DPPH.
- Resultados de los antioxidantes que presentan los frutos en estudio.
- Los resultados obtenidos se compararán con los datos que se encuentren disponibles en bibliografía para otras bayas o frutos del bosque.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados en el trabajo experimental fueron de calidad “para análisis” obtenidos a través de Sigma-Aldrich. Los reactivos utilizados en los distintos métodos son:

Para el ensayo TPC: ácido gálico ($\geq 99\%$), carbonato sódico (99%), reactivo Folin-Ciocalteu.

Para el ensayo TFC: quercetina (95%), tricloruro de aluminio hexahidratado (99%), acetato potásico (99%).

Para el ensayo DPPH: ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (97%), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (97%).

Para el ensayo ABTS: ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (97%), persulfato potásico, sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (98%) y etanol (96%).

Reactivos comunes en todos los ensayos: metanol (>99%) y agua ultrapura (sistema de purificación de agua Milli-Q ultra pura de Millipore (Milford, EEUU)).

4.2 Instrumentación

Espectrofotómetro UV/Vis varian Cary 50 (agilent technologies, Santa Clara, EEUU); balanza analítica (Sartorius, Madrid, España); rotavapor R-210 baño de calor B-491 (Buchi, Prat de Llobregat, Barcelona, España); liofilizador PF04 (Thermo Savant); ultrasonidos (Bandelin sonores digital 10P) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) , mortero de ágata; batidora.

4.3 Muestras y preparación

Las muestras, en este caso dos frutos silvestres comestibles madroños y majoletas, se recogieron en noviembre/diciembre del 2016 en el parque del seminario (madroños) y en la vía verde (majoletas), ambas en la ciudad de Jaén. Tras su recolección, en bolsas transpirables, se congelaron -20°C, hasta su preparación para el análisis.

4.3.1 Pretratamiento de las muestras

La determinación de la capacidad antioxidante, se realiza sobre la pulpa de los frutos, por lo que hay que realizar un pre-tratamiento, que consiste en eliminar huesos, tallos y hojas. Una vez obtenida la pulpa, se liofiliza hasta sequedad (48 horas) a una temperatura -52°C y a una presión de 0.1 bar. Posteriormente, las muestras son molidas en un mortero de ágata para el caso de las majoletas (figura 11) y con una batidora de espas de acero inoxidable para el caso de los madroños y se almacenaron a -20°C hasta su extracción (Spínola et al., 2014).



Figura 11. Mortero de ágata, con el fruto liofilizado.

4.3.2 Extracción de los compuestos fenólicos

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se realizó una extracción sólido-líquido, para ello se pesaron 5 gramos de muestra seca, y se extrajo con 100 mL de metanol usando para ello el baño ultrasonidos durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los extractos se filtraron a través de filtros de pliegues y se concentraron hasta sequedad a presión reducida en un rotavapor. Los extractos resultantes se recogieron en viales de 2 mL y se congelaron a -20°C hasta su análisis.

4.4 Contenido total de fenoles (TPC), contenido total de flavonoides (TFC) y ensayos de la capacidad antioxidantes.

4.4.1 Contenido total de fenoles (TPC).

El contenido total de compuesto fenólicos se determinó por el método de Folin-ciocalteu, según el procedimiento (Spínola et al., 2014).

La descripción del procedimiento del método TPC se detalla en la figura 12.

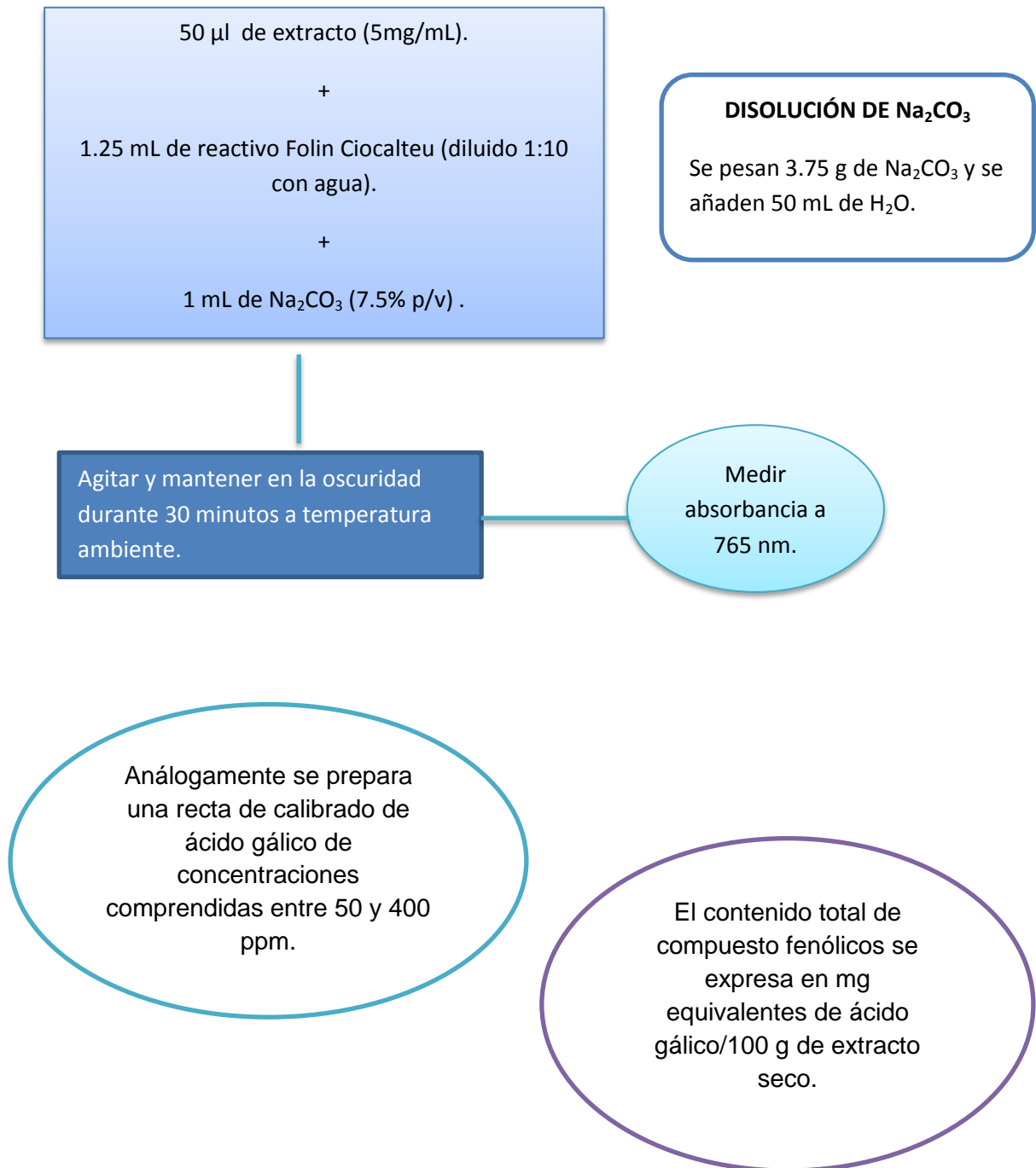


Figura 12. Descripción del procedimiento del método TFC.

4.4.2 Contenido total de flavonoides (TFC).

El contenido total de flavonoides se determinó mediante el siguiente procedimiento (Spínola et al., 2014):

Procedimiento: 0.5 mL de extracto metanólico (10 mg/mL) fueron mezclados con 1.5 mL de metanol, 2.8 mL de agua destilada, 0.1 mL de CH_3COOK (1 mol/L), y 0.1 mL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10% p/v en metanol) figura 13. Después de 30 minutos de reacción mantenida en la oscuridad y a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 415 nm. Análogamente y en las mismas condiciones se preparó una recta de calibrado de quercetina de concentraciones comprendidas entre 50 y 150 ppm. El contenido total de flavonoides se expresa como mg equivalente de quercetina /100 g de extracto seco.

El método descrito por Spínola especifica una concentración de 2.5mg/mL en la preparación de las muestras. En el caso de las muestras a analizar, al contener menos flavonoides se preparó un extracto de mayor concentración 10 mg/mL.

PREPARACION DE LAS DISOLUCIONES.

Se pesa 0.9914 g de CH_3COOK y se añade 10 mL de metanol.
Se pesa 1 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se añade 10 mL de metanol.

Figura 13. Preparación de disoluciones del método TFC.

4.4.3 Ensayo ABTS (sal diamonica del Ácido 2.2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico).

El ensayo de ABTS, se determinó según el procedimiento (Gouveia & Castilho, 2011). Con alguna modificación en la concentración del extracto metanólico, el procedimiento descrito por Gouveia especifica una concentración de 10mg/mL para las muestras. Las muestras a analizar contenía más cantidad de estos compuestos, por lo que, se realizó una dilución de concentración 2.5 mg/mL para las majoletas y 1 mg/mL para los madroños.

El radical $ABTS^{\cdot+}$ se generó a partir de la descripción detallada en la figura 14 (Ramírez, 2011), y el método del ensayo ABTS se detalla en la figura 15.

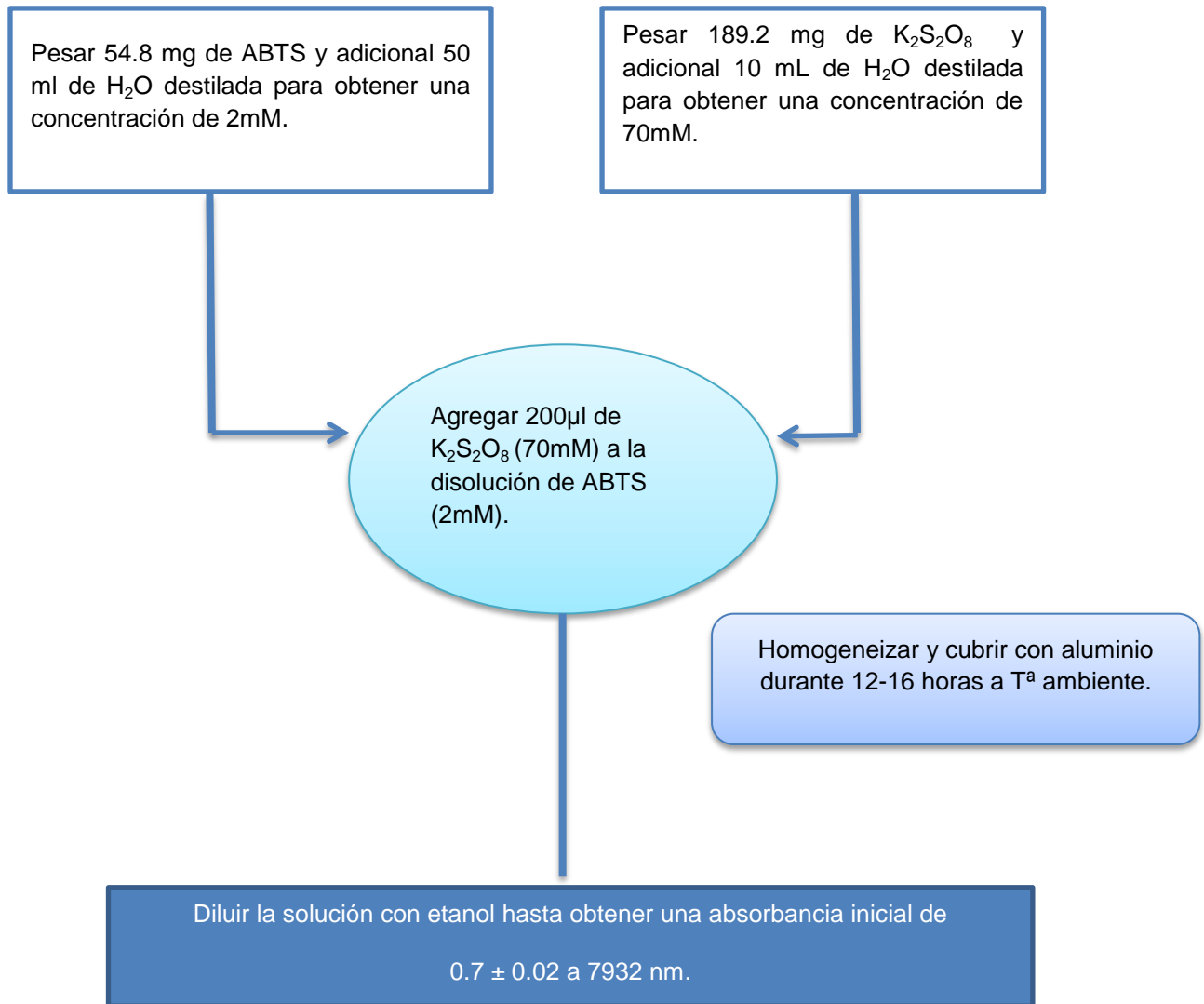


Figura 14. Descripción del procedimiento, para generar el radical $ABTS^{\cdot+}$ según el procedimiento (Ramírez, 2011) .

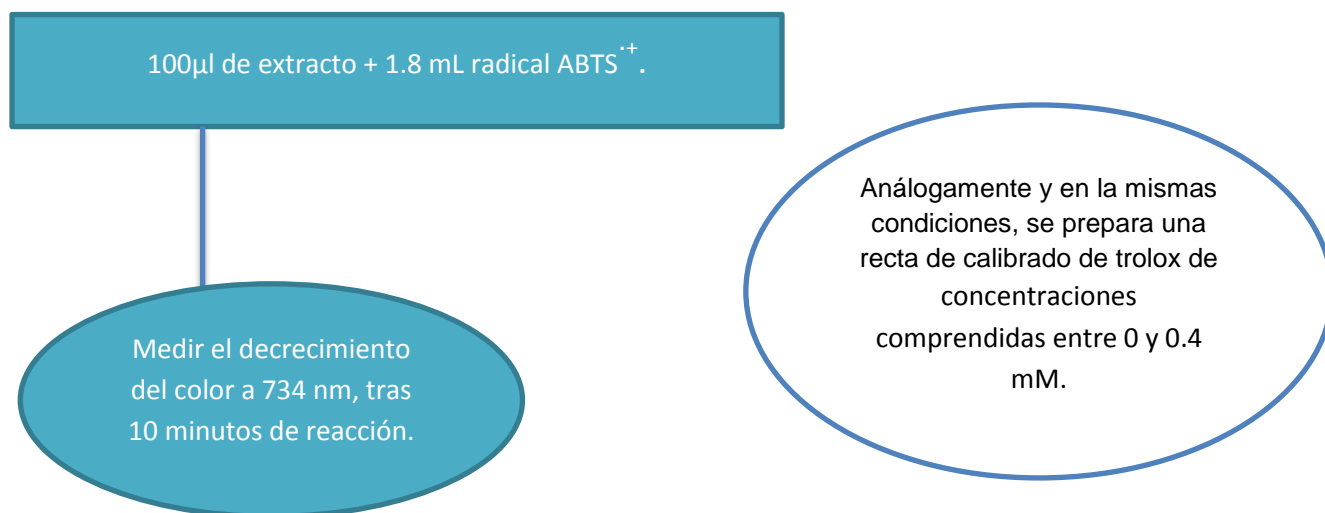


Figura 15. Descripción del procedimiento del ensayo ABTS.

4.4.4 Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-pirilhidrazilo).

El ensayo de ABTS, se determinó según el procedimiento (Spínola et al., 2011) con modificación en la concentración del extracto metanólico.

Procedimiento del ensayo: a 100 µl de extracto metanólico (majoletas, 10mg/mL y madroños, 2,5 mg/mL) se le adicionaron 3.5mL de 0.06 mM DPPH. Tras 30 minutos de reacción mantenida en la oscuridad y a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 516nm. Análogamente y en las mismas condiciones, se prepara una recta de calibrado de trolox de concentraciones comprendidas entre 0 y 0.8 mM.

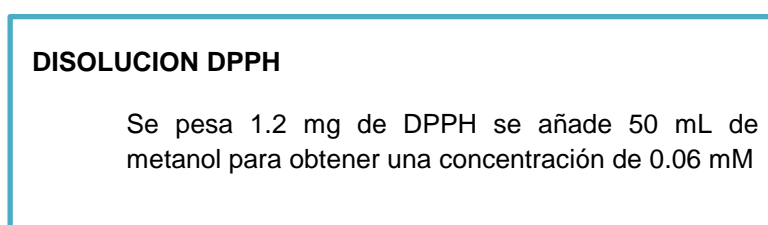


Figura 16. Preparación de la disolución procedimiento del ensayo DPPH.

En ambos ensayos ABTS y DPPH, la capacidad antioxidante, se expresa como mmol de trolox/100 g de extracto seco.

5. RESULTADOS

Los datos de los distintos métodos se muestran a continuación.

Contenido total de fenoles (TPC)

En la figura 17, se muestra la recta de calibrado, con los datos obtenidos del método TPC. Se representa absorbancia frente a concentración de ácido gálico (ppm). La absorbancia del blanco fue 0.082.

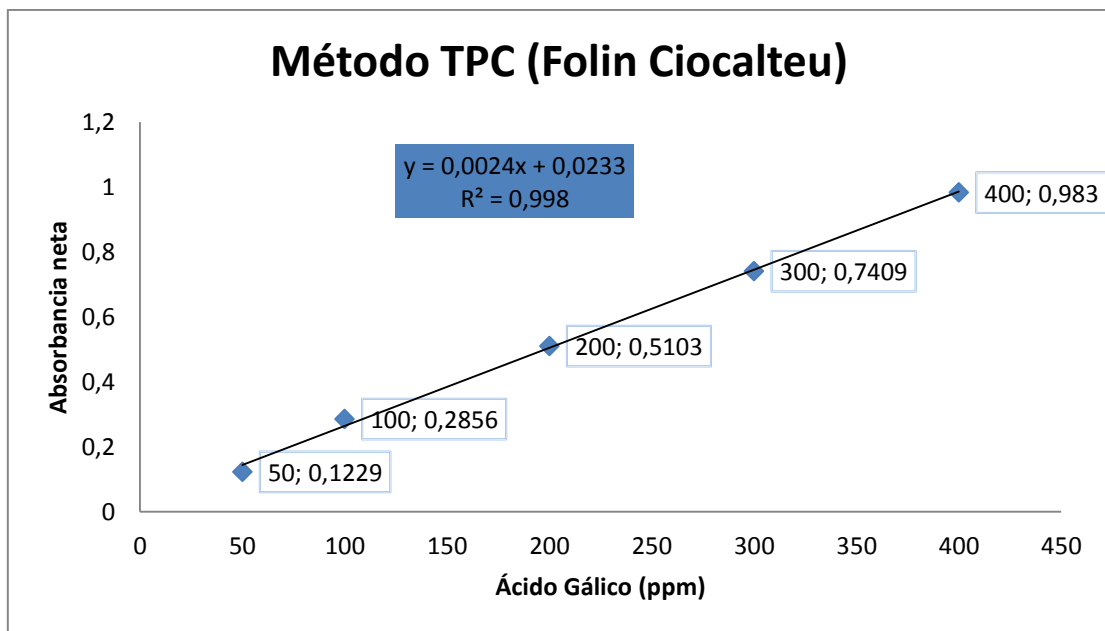


Figura 17. Datos obtenidos del método TPC. Regresión lineal y recta de calibrado.

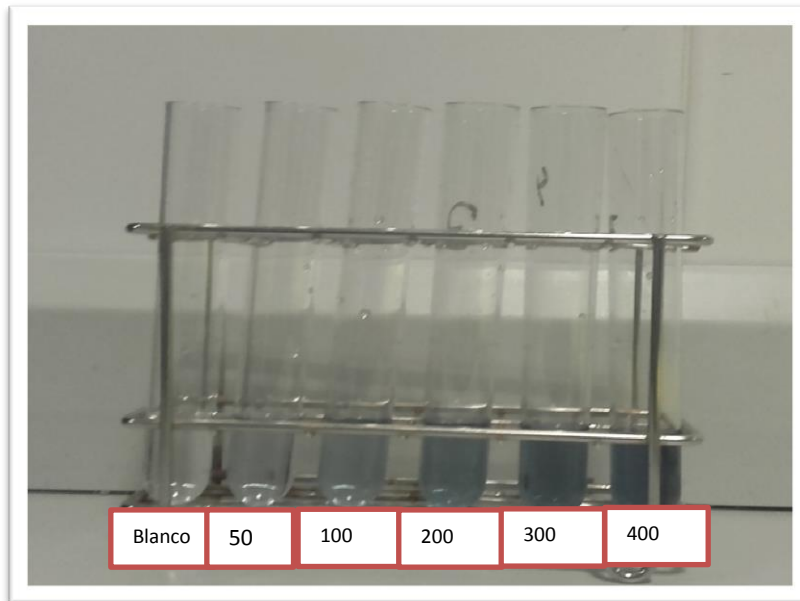


Figura 18. Método TPC en diferentes concentraciones de ácido gálico (ppm). Aumenta en la intensidad del color conforme aumenta la concentración de ácido gálico.

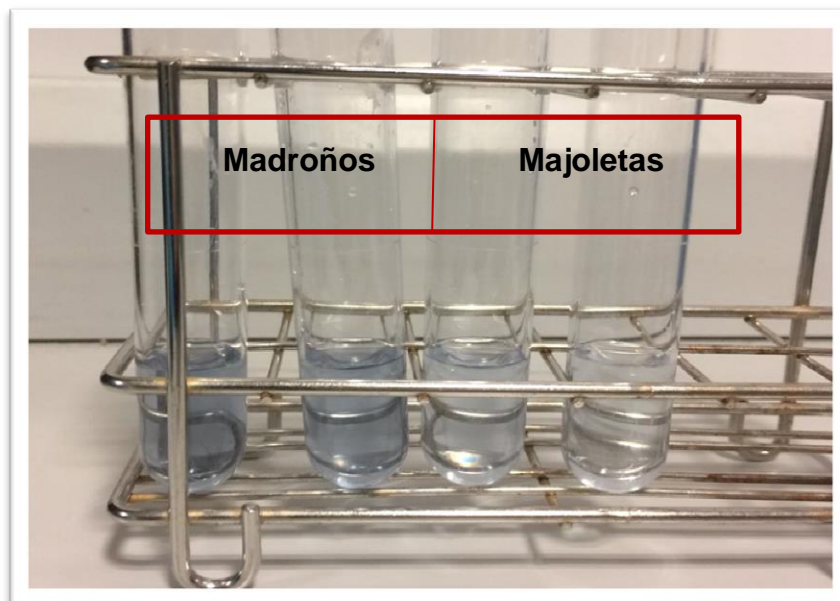


Figura 19. Método TPC en las muestras, madroños y majoletas.

Contenido total de flavonoides (TFC)

En la figura 20, se muestra la curva de calibración, con los datos obtenidos del método TFC. Se representa la absorbancia neta (la absorbancia del blanco fue 0.0585) frente concentración de quercetina (ppm).

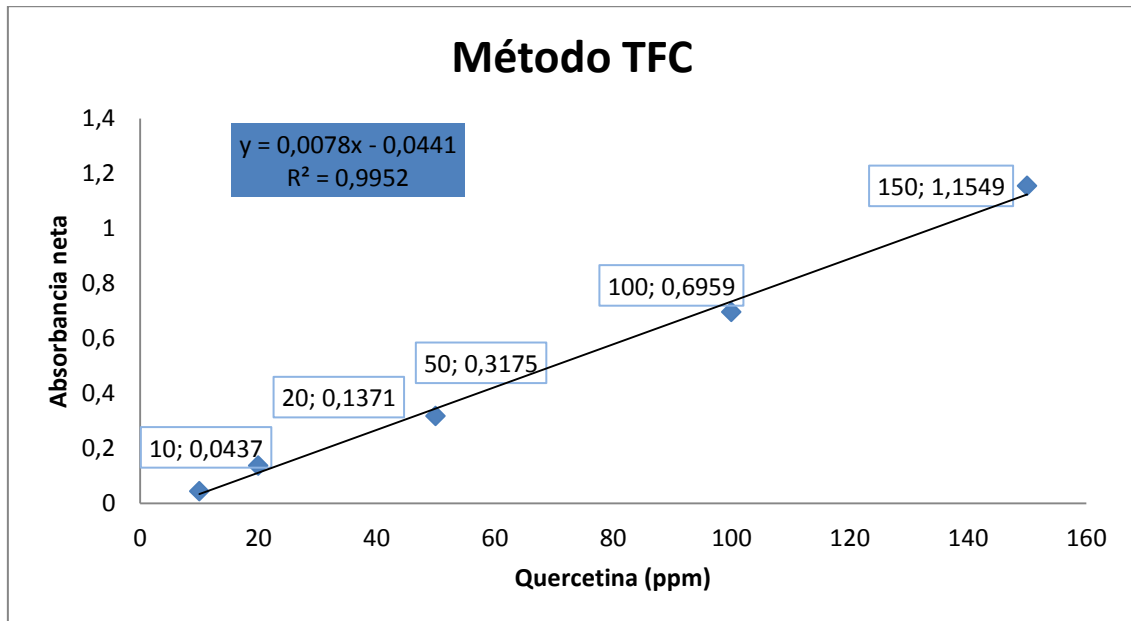


Figura 20. Datos obtenidos del método TFC. Regresión lineal y curva de calibración.

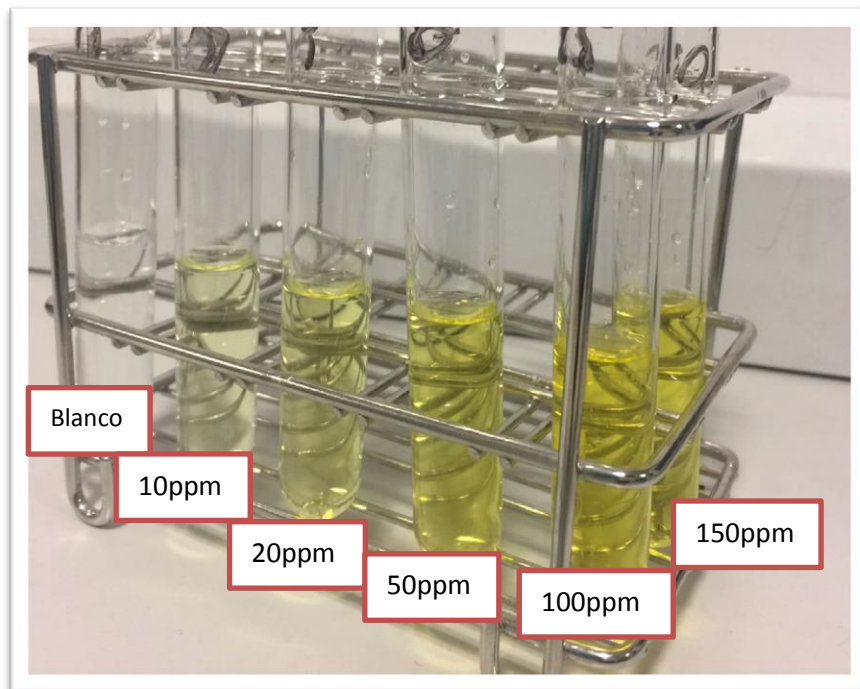


Figura 21. Método TFC en diferentes concentraciones de quercetina. Aumenta la intensidad del color, al aumentar la concentración de quercetina.

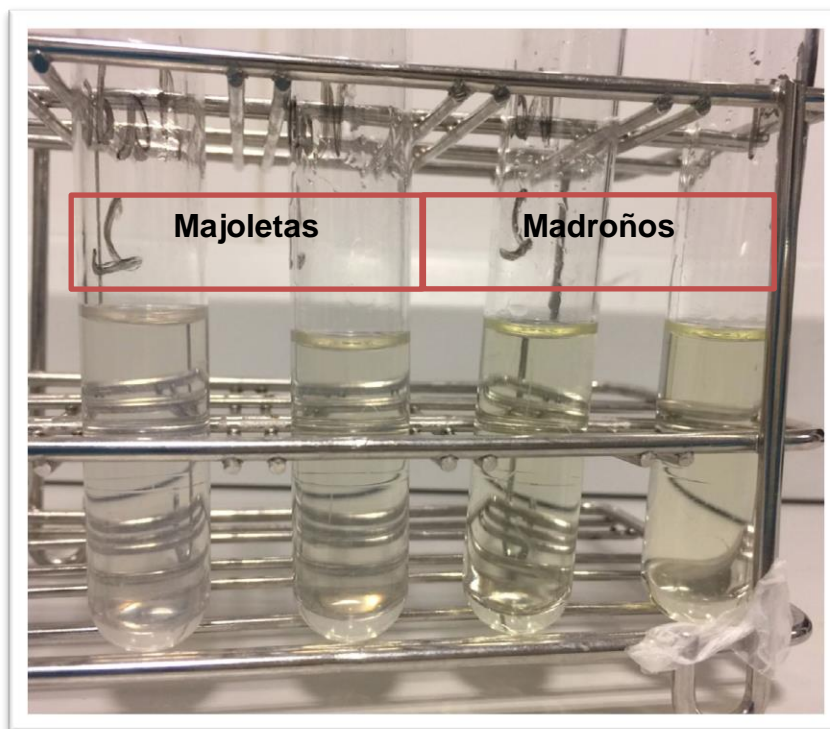


Figura 22. Método TFC en las muestras, madroños y majoletas.

**Ensayo ABTS (sal diamónica del ácido 2.2-azino-bis(3-
etilbenzotiazolin-6-sulfónico)).**

En la figura 23, se muestra la curva de calibración, con los datos obtenidos del ensayo ABTS. Se representa la absorbancia frente concentración de trolox (mM).

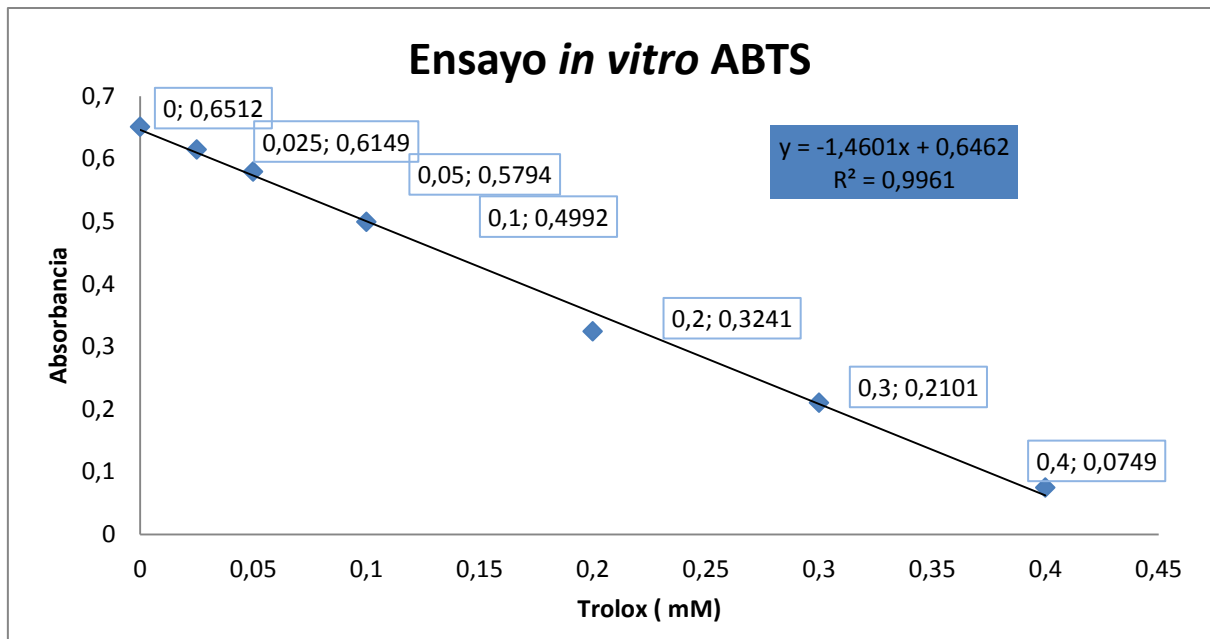


Figura 23. Recta de calibrado de trolox para en ensayo ABTS.

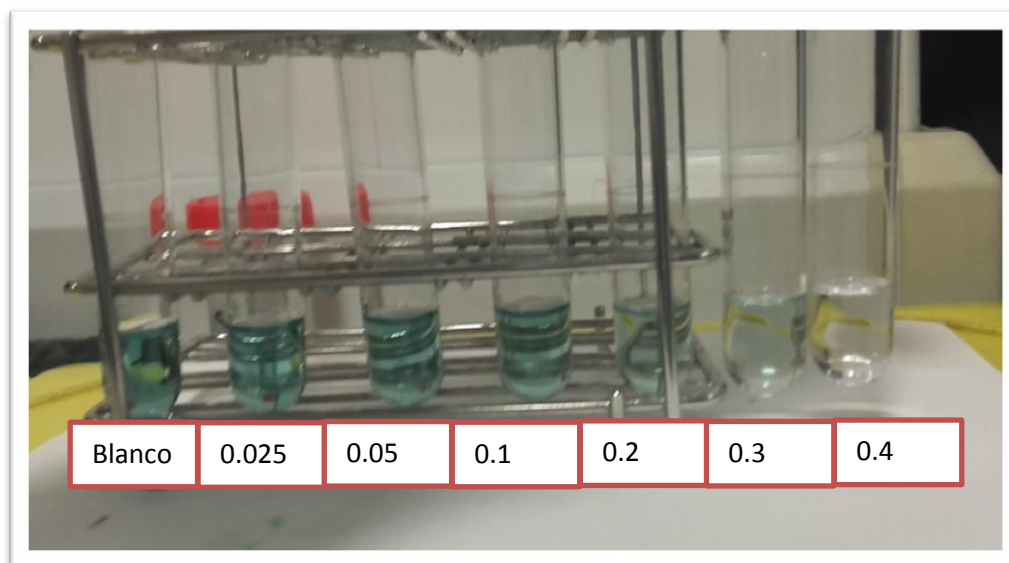


Figura 24. Ensayo ABTS en diferentes concentraciones de trolox (mM). Disminuye la intensidad del color, al aumentar la concentración de trolox.

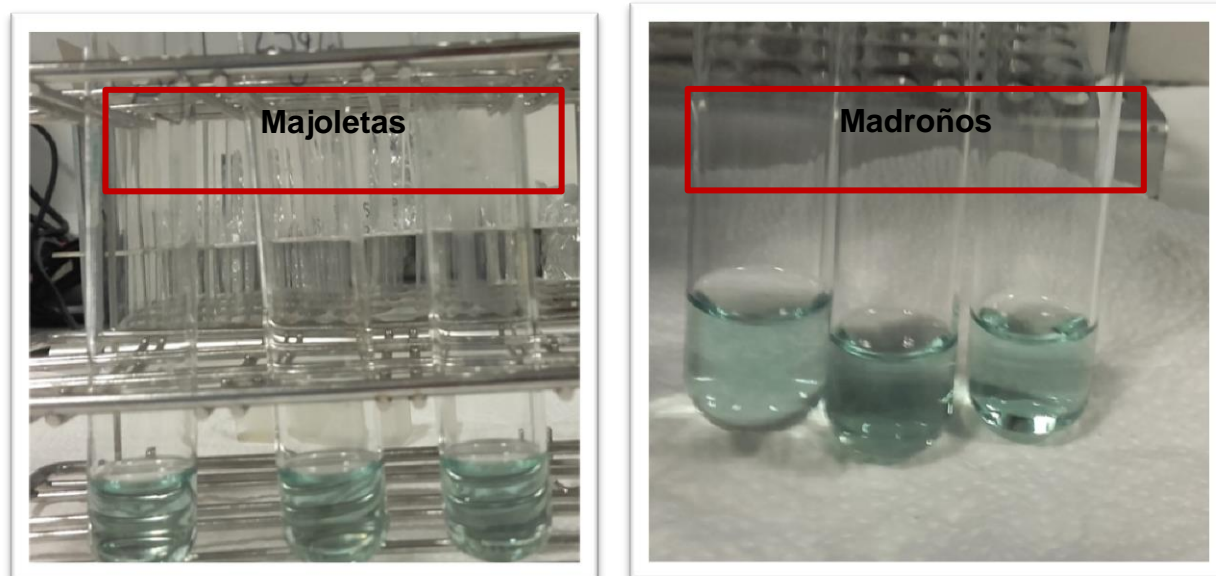


Figura 25. Ensayo ABTS en las muestra majoletas y madroños.

Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-pirilhidrazilo).

En la gráfica de la figura 26, se muestra la curva de calibración, con los datos obtenidos del ensayo DPPH. Se representa la absorbancia frente concentración de trolox (mM).

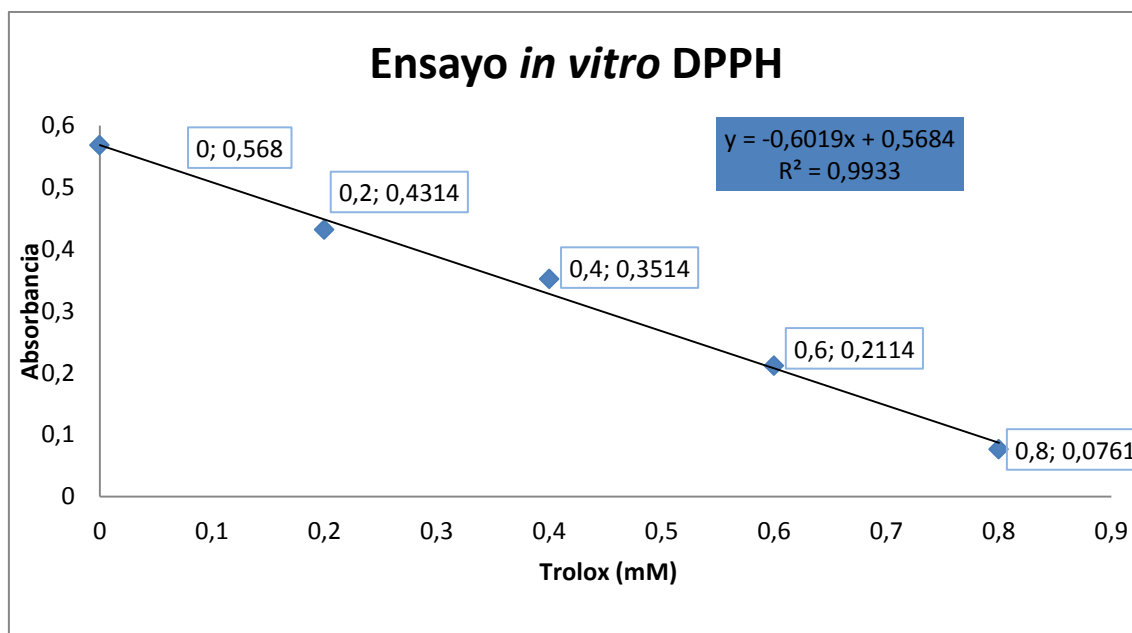


Figura 26. Recta de calibrado de trolox para en ensayo DPPH.

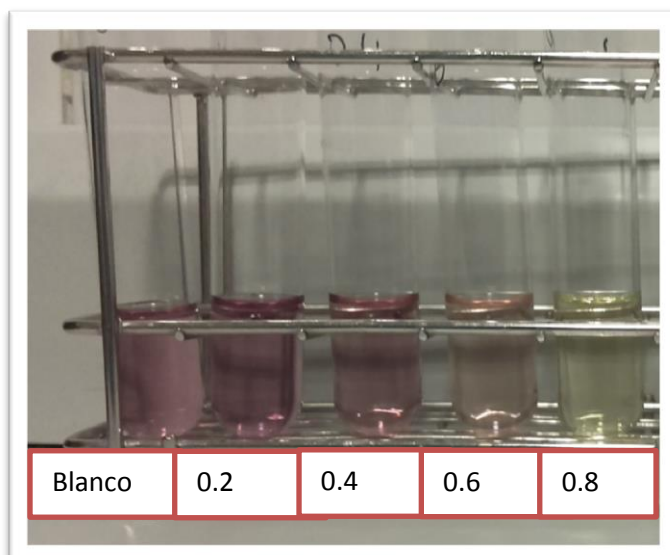


Figura 27. Ensayo DPPH en diferentes concentraciones de trolox (mM). Disminuye la intensidad del color, al aumentar la concentración de trolox.

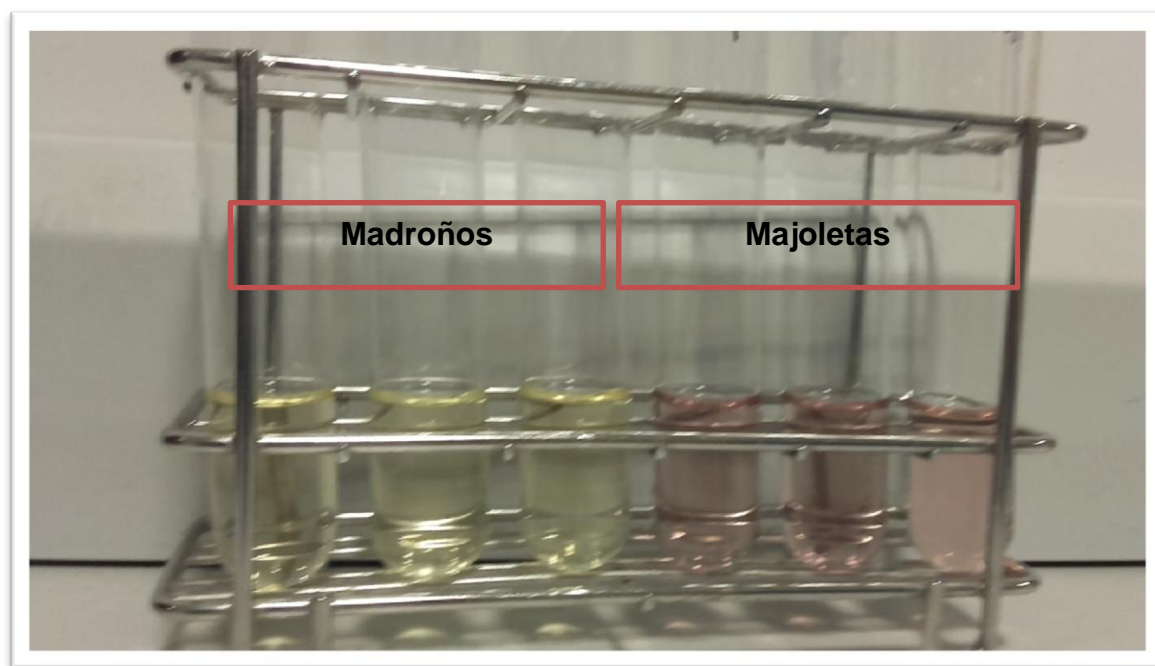


Figura 28. Ensayo DPPH en las muestra majoletas y madroños.

5.1 Interpretación de los resultados

Con el fin de realizar una interpretación objetiva de los resultados obtenidos en los distintos análisis, éstos se realizaron por duplicado en el caso de contenido total de polifenoles (TPC) y contenido total de flavonoides (TFC), y por triplicado en los ensayos ABTS y DPPH.

En la tabla 8, se representan los resultados en los diferentes ensayos, indicando la media y la desviación estándar obtenidas de los análisis correspondientes a 2 extracciones diferentes.

	TPC	TFC	DPPH	ABTS
Madroños	2698.54±188.16	251.98 ±1.66	22.84± 0.43	28.88± 0.37
Majoletas	1132.55±124.09	217.29±1.84	4.48 ± 0,21	7.34 ±0.34

Tabla 8. Resultados obtenidos de los diferentes métodos.

Los resultados del TPC están expresados en mg ácido gálico/100 gramos de extracto seco; del TFC como mg de quercetina/100 gramos de extracto seco; los ensayos DPPH y ABTS están expresados en mmoles de trolox/100 gramos de extracto seco.

Los resultados del método de Folin Ciocalteu, revelan un potencial antioxidante muy elevado en el fruto madroño, su alto contenido en compuestos bioactivos, hace que la capacidad antioxidante de este fruto sea comparable e incluso superior a la de otros frutos silvestres considerados como potentes antioxidantes.

El fruto *Arbutus unedo* presenta un contenido total de polifenoles de 2698 mg de ácido gálico/100 gramos de extracto seco; duplicando el contenido total de polifenoles presentes en *Crataegus monogyna* Jacq. (Tabla 9).

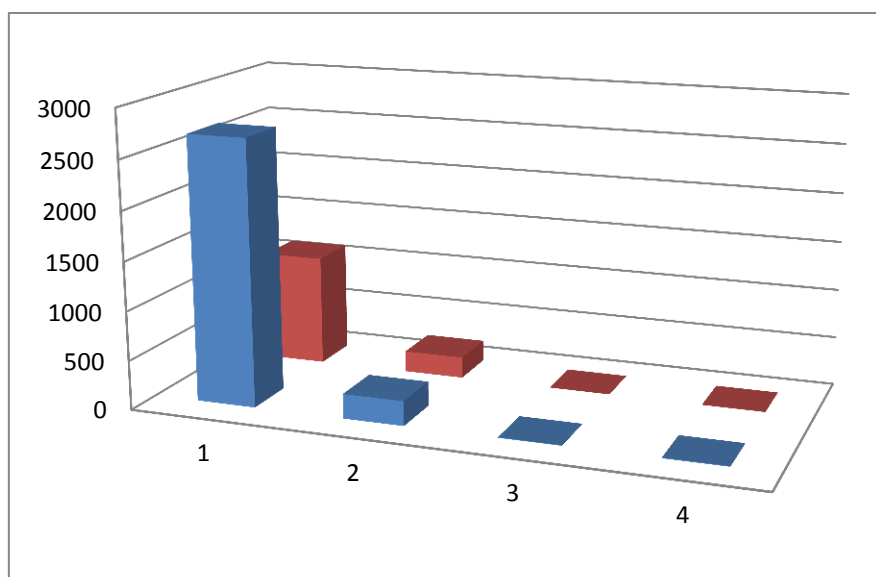


Tabla 9. Comparación en general de los frutos en estudio, el color azul representa *Arbutus unedo* y el color rojo representa *Crataegus monogyna* Jacq. Los números representan los distintos métodos; 1 TPC; 2 TFC; 3 DPPH; 4 ABTS.

Los resultados obtenidos en los diferentes métodos se han comparado con los resultados de otros estudios (tablas 5 y 6). Hay que tener en cuenta que el presente estudio se realiza con extractos de frutos liofilizados (extracto seco) y los estudios disponibles en bibliografía se realizan sobre fruta fresca.

<i>Arbutus unedo.</i>				
	Valores del presente estudio	(Ruiz, 2004)	(Ganhao et al., 2010)	(Alarcao et al., 2001)
TPC	2698 ± 188	1657± 410	428-586	1460± 90
TFC	251.98 ±1.66	37,8± 13,9	-----	-----
ABTS	28.88± 0.376	4,48± 3,22	5.03-6.57	-----
DPPH	22.84± 0.435	4,03± 1.33	-----	-----

Tabla 10. Resultados obtenidos y comparación con los datos encontrados en bibliografía.

<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.				
	Valores del presente estudio	(Ruiz,2014)	(Ganhao et al., 2010)	(Egea et al., 2010)
TPC	1132 ± 124	821 ± 346	450 - 2068	217 ± 28
TFC	217.29± 1.84	187 ± 140	25.9 ± 0.6	-----
ABTS	7.34± 0.34	3.77 ± 1.53	5.68 -19.66	-----
DPPH	4.48 ± 0.21	1.54 ± 0.48	-----	-----

Tabla 11. Resultados obtenidos y comparación con los datos encontrados en bibliografía.

Los resultados representados en las tablas 10 y 11, se expresan; TPC en mg ácido gálico /100 g de extracto y TFC en mg quercetina /100 g de extracto; y del ensayo ABTS y DPPH en mmol trolox / 100 g de extracto.

Las diferencias entre autores pueden ser debidas a las unidades para expresar los resultados, al origen de las muestras y a la conservación de los frutos, por lo tanto no son comparables.

Además de esta peculiaridad, hay varios factores que influye en la diversidad de resultados. Entre otros, el contenido de compuestos fenólicos varía según el disolvente usado en la extracción. Paladino, en 2008 realiza un estudio para observar si existe diferencias entre las extracciones empleando diferentes disolventes: agua a 90°C, acetona 75% a 30°C, metanol al 70% y etanol al 20%, ambas a 30°C, presentando entre ellas cambios significativos (Paladino, 2008).

Otros factores que influyen en la variación de los compuestos fenólicos son; el estado de maduración de los frutos y la parte de la planta utilizada. Además, el porcentaje de extracción es mayor para los frutos maduros disminuyendo en el estado intermedio y por último el verde (Hernández et al., 2015).

Los valores medios del presente estudio son más altos en comparación a los valores encontrados en diferentes bibliografías. Este hecho revela que la extracción es más eficiente cuando se usa polvo liofilizado, en comparación

con la muestra fresca, donde la homogenización durante la extracción es más difícil (Ruiz, 2014).

Los resultados obtenidos del método TFC (contenido total de flavonoides) difieren respecto a otras bibliografías consultadas. Esto puede ser debido a que el método es selectivo para flavanoles y flavanonas.

Por último, los resultados obtenidos del método TFC se comparan con los resultados de otras frutas tabla 8. Kuskoski, en 2005 realiza un estudio sobre la determinación de la capacidad antioxidante en pulpas de frutas.

Contenido de polifenoles totales			
Acerola	580.1 ± 4.6	Piña	21.7 ± 4.5
Mora	118.9 ± 2.1	Mango	544.9 ± 7.3
Uva	117.1 ± 0.6	Granola	84.6 ± 5.8
Guayaba	83.0 ± 1.3	Fresa	132.1 ± 3.8

Tabla 12. Contenido de polifenoles totales en diferentes frutas. Los resultados están expresados en mg de ácido gálico /100 g de fruta fresca (Kuskoski, 2005).

En la tabla 12, se observan valores inferiores respecto a los madroños y a las majoletas. Por lo tanto, los madroños y las majoletas pueden considerarse como potentes antioxidantes.

6. CONCLUSION

En este trabajo, he observado un alto contenido de compuestos bioactivos en los frutos silvestres analizados, especialmente en *Arbutus unedo* (madroños). Los datos obtenidos indican que este potencial antioxidante es comparable, e incluso a veces superior, al de otros frutos considerados como potentes antioxidantes.

Con este trabajo se contribuye a demostrar que los frutos silvestres estudiados (consumidos de forma tradicional) son importantes fuentes naturales de nutrientes y de compuestos bioactivos. Asimismo, debido a su alta capacidad

antioxidante, los extractos de estos frutos podrían ser utilizados para alargar la vida útil de otros alimentos y mejorar sus propiedades beneficiosas.

Este trabajo viene a completar la escasa información disponible en bibliografía sobre estos frutos silvestres. De igual forma, los resultados obtenidos indican que dichos frutos serían una buena alternativa a otros alimentos, pudiendo incorporarlos en la dieta habitual, lo que contribuirá a revalorizar estos alimentos.

La realización de este trabajo de fin de grado me ha aportado conocimientos en cuanto a la importancia que tiene la alimentación en las personas. En concreto, el significado de los antioxidantes en la dieta. Además, he aprendido a buscar información y he puesto en uso los conocimientos adquiridos en estos últimos años. Finalizo con una frase de F. Grande Covián: *“el hombre primero quiso comer para sobrevivir, luego quiso comer bien e incorporó la gastronomía a su modo cultural. Ahora además, quiere comer salud”*.

7. BIBLIOGRAFIA

Alarcao, E., Silva, M., Leitao, A., Azizheira, H., (2001).

The arbutus berry: Studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. Journal of Food Composition and Analysis. 14, 27-35.

Blois, M., (1958).

Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature; 4617:1198-1200

Chang, Q., Zuo, Z., Harrison, F., Chow, M.S.S.,(2002).

Hawthorn. The Journal of Clinical Pharmacology. 42, 605-612

Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I. Rivera D., Bazán, D., Aguirre R., Bravo M., (2003).

Alimentos funcionales o fitoquímico, clasificación e importancia. Pp. 9-20.

Coronado, M., Vega, S., Rey Gutiérrez L., Vázquez M. Radilla C., (2015)

Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana Rev Chil Nutr Vol. 42, N°2.

Fernández, J.M., Silva-Grigoletto, ME. Da., Túnez-Fiñana I., (2009).

Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. Rev Andal Med Deporte;2:19-34

Finkel., T. & Holbrook, N.J., (2000).

"Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing", en Nature. 408, pp. 239-247.

Ganhao, R., Estévez, M., Kylli, P., Heinonen, M., Morcuende, D., (2010).

Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58 (15), 8854-8861.

Gómez Romero, M., (2010).

Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2010.

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.

Gutiérrez Avella, D. M., Ortiz García, C.A., Mendoza Cisneros, A., (2008)

Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal Simposio de Metrología.

Hernandez Rodriguez, P., Pabón Baquero, L. C. y Rodriguez Alvarez, M.F., (2015)

Propiedades químicas y biológicas de Arbutus unedo: una planta con potencial medicinal. vol.49, n.1, pp. 144-155.

Huang D., Ou B., Prior R.L., (2005).

The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 53: 1841–1856.

IUPAC. (2006)

International Union of Pure and Applied Chemistry. *Nomenclature of Flavonoids*. Disponible:[http://iupac.org/fileadmin/user_upload/publications/recommendations/2013/rauter_prs.pdf].

Konga J.M., Chiaa L.S., Goha N.K., Chiaa T.F., Brouillard, R., (2003).

Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry. 64:923–933.

Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso A., Mancini-Filho, J., Fett, R., (2005).

Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciencia. Tecnología. Alimentos., vol.25, n.4, pp.726-732.

Martínez Flórez, S. J., González Gallego, J. M. Culebras y M. J. Tuñón.,(2002).

Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Nutr. Hosp. XVII (6) 271-278

Martinez Garcia, C.A., (2014).

Identificación de flavonoides con actividad antioxidante presentes en Alchornea coelophylla (Euphorbiaceae), Universidad tecnológica de pereira.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., (1993).

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., Ramos Escudero, D. F., Alvarado Ortiz Ureta, C. y Castaneda, B., (2007).

Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Rev. Soc. Quím. Perú., vol.73, n.3, pp. 142-149. ISSN 1810-634X.

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, 2005.

Paladino, S.C., (2008).

Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (Vitis vinifera L.) Tesis de maestría, La Rioja.

Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., Sirichakwal. P., (2008).

Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. J Food Composition Analysis. 2008; 21, 241-8.

Pedrielli P., Skibted L.H., (2002).

Antioxidant Synergy and regeneration Effect of Quercetin, (-)-Epicatechin, and (+)-Catechin on a α -Tocopherol in Homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. J agric. Food Chem.; 50, 7138-7144

Pekal A, Pyrzynska K., (2014).

Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. Food Analytical Methods. 1776–1782

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. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 4290-4302.

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.

Ruiz Rodríguez, B. M.,(2014).

Frutos silvestres de uso tradicional en la alimentación: evaluación de su valor nutricional, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Tesis doctoral, Madrid.

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.

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. *Myrica faya*. (2014).

A new source of antioxidant phytochemicals. J. Agric. Food Chem., 62 (40), 9722–9735,

Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M., Morales, R. (2006).

Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. Botanical Journal of the Linnean Society. 152, 27-71.

Tardío, J., Pascual, H., Morales, R. (2002).

Alimentos silvestres de Madrid: Guía de plantas y setas de uso alimentario tradicional en la Comunidad de Madrid. Ediciones La Librería. Madrid.

Tur, J.A. (2004).

Los antioxidantes en la Dieta Mediterránea. Revista Española de Nutrición Comunitaria. 10 (4), 198-207.

Ulubele A, Topcu G, Kolak U. (2005).

Labiatae flavonoids and their bioactiviy. Studies in Natural Products Chemistry. 30, 233-302.

Zamora, J. (2007).

Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. Rev Chil Nutr. 2007; 34 (1): 17-26.

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