

## Actividad antioxidante de compuestos aislados del residuo no-volátil del aceite esencial de naranja

Por I. Vargas-Arispuro<sup>1\*</sup>, B. I. Sanz<sup>2</sup>, M. A. Martínez-Téllez<sup>1</sup> y E. Primo-Yúfera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carr. a la Victoria, Km. 0,5, Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora 83000, México.

<sup>2</sup>Instituto de Tecnología Química, Universidad Politécnica de Valencia - CSIC. Avda. de los Naranjos, s/n. 46022 Valencia, España.

### RESUMEN

#### Actividad antioxidante de compuestos aislados del residuo no-volátil del aceite esencial de naranja.

Existe un creciente interés en la industria alimentaria y en la medicina preventiva por la búsqueda de «antioxidantes naturales», por lo que nos planteamos evaluar la actividad antioxidante del residuo no volátil del aceite esencial de naranja contra la oxidación del aceite de oliva sin refinar y de reciente extracción. Mediante destilación del aceite esencial de naranja se obtuvo el residuo no-volátil, el cual se fraccionó en columna de sílica gel 60. La actividad antioxidante fue medida por el valor de peróxidos producidos por el aceite de oliva al provocar la oxidación por calentamiento a 70 °C durante 48 h.

Se aislaron seis compuestos mediante HPLC preparativo de los cuales cuatro tuvieron actividad antioxidante. Usando métodos espectroscópicos se identificaron  $\alpha$ -tocoferol y tres flavonas metoxiladas. Con este estudio se confirmó que la fracción no volátil del aceite esencial de naranja contiene antioxidantes naturales diferentes al  $\alpha$ -tocoferol.

**PALABRAS-CLAVE:** Aceite esencial de naranja — Alfa-tocoferol — Antioxidante natural — Flavonoide.

### SUMMARY

#### Antioxidant activity of isolated compounds in non-volatile residue from orange essential oil.

There has been a growing interest in the food industry and in preventive medicine to search for «natural antioxidants». Therefore the objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of the non-volatile residue of essential orange oil in the oxidation of unrefined and freshly extracted olive oil. Essential orange oil was distilled to obtain a non-volatile residue and fractionated on a Silica Gel 60 column. The antioxidant activity was determined by measuring peroxide value obtained after heating olive oil at 70 °C for 48 h.

Six compounds were isolated and purified, four of these had antioxidant activity.  $\alpha$ -tocopherol and three methoxylated flavones were identified using spectroscopic methods. This study confirmed that non-volatile fractions of essential orange oil contain natural antioxidants different from  $\alpha$ -tocopherol.

**KEY-WORDS:** Alpha-tocopherol — Essential orange oil — Flavonoid — Natural antioxidant.

### 1. INTRODUCCIÓN

Butilhidroxianisol (BHA)<sup>®</sup> y butilhidroxitolueno (BHT)<sup>®</sup>, son antioxidantes sintéticos tradicionalmente utilizados en la industria alimenticia con una gran demanda por contar con características de efectividad, bajo costo y alta estabilidad. Sin embargo, en los últimos años su uso se ha visto disminuido debido a la sospecha de ser carcinogénicos (Ito, 1985) y a su posible mutagenicidad (Namiki, 1990).

Recientemente se ha presentado un gran interés en la industria alimenticia y en la medicina preventiva por la búsqueda de antioxidantes naturales (Vinson y Hontz, 1995) principalmente por aquellos obtenidos de extractos vegetales (Loliger, 1991). Aunado esto, a la tendencia de los consumidores por adquirir productos naturales que para tener esta característica requieren de antioxidantes naturales que sustituyan a los tradicionalmente utilizados (Cuvelier y col., 1994).

La presencia de antioxidantes en extractos de plantas y vegetales ha sido ampliamente demostrada (Kramer, 1985; Kayoko y Nakatani, 1989; Tsuda y col. 1994; Yoshihiko y col. 1995; Kanner y col., 1994). Actualmente la industria alimenticia puede disponer de un antioxidante natural obtenido de extractos de *Rosmarinus officinalis* L. (Kamler y col., 1994). El aceite esencial de naranja tiene una marcada estabilidad a la oxidación que se atribuye a la presencia de  $\alpha$ -tocoferol encontrado en el flavedo (Waters y col., 1976), sin embargo pensamos en la posibilidad de encontrar otros compuestos antioxidantes en este aceite.

La fracción volátil del aceite esencial de naranja ha sido estudiada ampliamente para caracterizar los compuestos aromáticos que transfieren el olor y sabor a los alimentos (Shaw, 1979; Wolford y col. 1977; Moshonas and Shaw, 1990) no sucede lo mismo con la fracción no-volátil, de la cual se desconocen sus usos potenciales. Para este trabajo, nos planteamos como objetivo el aislamiento e identificación de compuestos antioxidantes del residuo no-volátil.

láttil del aceite esencial de naranja utilizando el aceite de oliva sin refinar como material oxidante.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizó como materia prima el aceite esencial, obtenido como subproducto en la extracción industrial de jugo de naranja, mediante el método de prensado en frío.

Para los ensayos de oxidación se utilizó aceite de oliva sin refinar y de reciente extracción obtenido especialmente para este estudio.

Butilhidroxianisol (BHA)<sup>®</sup> (Aldrich Co. Milwaukee, USA) fue utilizado como antioxidante control.

### 2.1 Obtención de Extracto No-Volátil

Para la eliminación de volátiles 2 litros de aceite esencial de naranja se sometió a destilación fraccionada, trabajando a un rango de temperaturas de 85-95 °C con un vacío de 0.5 mmHg, obteniéndose el residuo no-volátil (RNV) que fue un material viscoso de color rojo muy oscuro.

### 2.2 Aislamiento de Fracciones Antioxidantes

Un primer fraccionamiento del RNV se llevó a cabo por cromatografía en columna. Posteriormente cada una de las fracciones antioxidantes fueron trabajadas en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) preparativo, para el aislamiento de compuestos.

a) Cromatografía en columna. Se cargaron 10 g del RNV disueltos en una mezcla de hexano-diclorometano (70:30) en una columna de 0.9 m de largo y 0.6 cm de diámetro, empacada con 0.5 kg de sílica gel 60 [Merck (0.063-0.3mm) 70-230 mesh ASTM] equilibrada con hexano-diclorometano (70:30). Las fracciones se eluyeron con 3 L de las siguientes mezclas de disolventes en orden de polaridad creciente, hexano-diclorometano 70:30; hexano-diclorometano 40:60; diclorometano; diclorometano-acetato de etilo 95:5; diclorometano-acetato de etilo 70:30; acetato de etilo; acetato de etilo-metanol 60:40; metanol. Se colectaron 25 fracciones que se concentraron a presión reducida y se almacenaron a 4 °C en atmósfera de nitrógeno hasta su análisis.

b) HPLC semipreparativo. Las fracciones fueron disueltas en hexano-acetato de etilo (80:20) o en metanol-agua (90:10) [Merck grado HPL C] según su polaridad, se agitaron por 1 min y se filtraron (Millipore GVHP 0.2). El filtrado inmediatamente fue inyectado en HPLC. La separación se hizo en un Waters

510 con detector de absorbancia Hewlet Packard 1040A de arreglo de diodos, columnas 250 x 7 mm, rellenas con Lichrospher Si-60, 5µm (F4 y F9) y Spherisorb ODS C<sub>18</sub>, 5µm (F21 y F22). Las condiciones de elución fueron las siguientes: para fase reversa metanol-agua 90:10 y 85:15, para fase normal hexano-diclorometano 80:20. Los compuestos colectados se evaporaron a sequedad bajo presión reducida a 40 y 70 °C según correspondiera al solvente de elución, se almacenaron a -20 °C en atmósfera de nitrógeno. Como criterio de pureza para cada uno de los compuestos aislados, se utilizó el HPLC analítico obteniendo el espectro UV a 254 nm en tres puntos del pico, haciendo un barrido de absorbancia en las ocho longitudes de onda que usa el detector de arreglo de diodos (Cuvelier y col. 1994).

### 2.3 Identificación Estructural de los Antioxidantes

La elucidación estructural de los compuestos colectados en el HPLC semipreparativo se realizó por espectrometría de masa (MS), infrarrojos (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN).

a) Espectrometría de MS. Los espectros de masas se obtuvieron en un Hewlet Packard 8988 (70ev, espectro/s) por introducción directa de una pequeña cantidad de producto (alrededor de 10<sup>-7</sup> g) colocada en un capilar. La temperatura de la cámara de ionización fue 60 °C inicial por 3 min, rampa de 30 °/min hasta 300 °C.

b) Los espectros de IR se obtuvieron en un Perkin-Elmer 781, los compuestos fueron analizados en pastilla de KBr. También se utilizó un CGL-FTIR Hewlet-Packard 5965A, para los compuestos menos polares.

c) Espectros de <sup>13</sup>CRMN y <sup>1</sup>HRMN se obtuvieron en un equipo Varian 400 Hz, solubilizando los compuestos en cloroformo deuterado y usando tetrametilsilano como estándar interno.

### 2.4 Ensayos de Actividad Antioxidante

El método utilizado para medir el deterioro oxidativo del aceite fue el descrito por Akiyoshi y Hajime (1991), el cual modificamos para utilizarse con aceite de oliva, la determinación consiste en medir la cantidad de peróxidos producidos después de someter el aceite de oliva y la muestra a condiciones de oxidación (temperatura de 70 °C durante 48h). Las fracciones obtenidas de la columna se prepararon a 3000 ppm solubilizándose en 1 ml de diclorometano o acetona, según fue su solubilidad, se adicionó 1g de aceite de oliva, se homogeneizó y se colocó en estufa a 70 °C durante 48h. Transcurrido este tiempo, se determinó la cantidad de peróxidos producidos utilizando el método 34048 para valor de

peróxidos (POV) de la AOAC sec. grasa y aceites 28.022 de 1980.

El POV expresado en meq de oxígeno/kg de aceite, se convirtió a porcentaje de oxidación, considerando al blanco/control como el 100% de la oxidación. Para todos los ensayos se prepararon dos controles, uno que contenía el antioxidante comercial (BHA 200 ppm) y otro como blanco que contenía el aceite más el disolvente, se realizaron tres repeticiones para cada muestra. Para los compuestos aislados se siguió el mismo procedimiento, reduciendo la concentración del producto a ensayar a 600 y 200 ppm con el fin de saber si se tenían efectos de concentración.

## 2.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de rango múltiple de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el fraccionamiento del extracto crudo en cromatografía en columna se obtuvieron 25 fracciones de las cuales cuatro presentan mayor poder antioxidante (F4, F9, F21 y F22) comparado con el control y teniendo como referencia a BHA. El control presentó el más alto valor de peróxidos de todos los tratamientos, indicando la máxima intensidad de la oxidación. Los bajos valores de peróxido para las cuatro fracciones comparadas con el control indican el poder antioxidante de las fracciones. La F4, F9, F21 y F22 fueron respectivamente 1.3, 1.8, 1.4 y 1.2 veces menos efectivas que BHA (Fig 1).

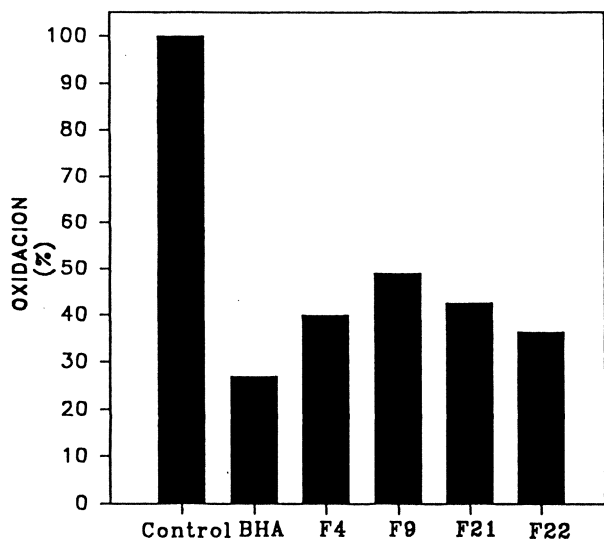


Figura 1

Efecto de fracciones del residuo no-volátil del aceite esencial de naranja sobre la oxidación del aceite de oliva. El porcentaje de oxidación es la media de tres muestras obtenidas por el valor de peróxidos producidos a 70 °C. Las fracciones se evaluaron a 3000 ppm y BHA a 200 ppm.

El análisis de las cuatro fracciones en HPCL revelan diversos picos para cada una de ellas (Fig. 2) cada pico fue colectado en HPLC preparativo. Los compuestos aislados ya purificados se analizan por MS, IR y RMN de protón y carbono. La identificación se dedujo de los datos estructurales comparando con la bibliografía (Pretsch y col., 1990).

De la F4 se aisló un compuesto (Fig. 2 pico I) que después de evaporarse quedó como líquido cristalino, y de acuerdo a los datos espectrales se identificó como  $\alpha$ -tocoferol, este compuesto fue anteriormente aislado del flavedo de naranja (Waters y col. 1976; Newhall y Ting, 1965), en este trabajo confirmó su conocida actividad antioxidante, retardando la oxidación del aceite de oliva en un 57% a 600 ppm y 52 % a 200 ppm, comparándola con el control (Fig. 3), estos valores coinciden con los obtenidos por Yoshihiko y col. (1995) al medir la peroxidación de metil-linoleato, donde  $\alpha$ -tocoferol retarda la oxidación alrededor del 60%. El aislar este compuesto del aceite esencial de naranja, nos sirvió junto con BHA como punto de comparación del poder antioxidante de los otros compuestos aislados en este estudio. De esta misma fracción se aisló otro compuesto (Fig. 2 pico II) que después de evaporarse fue un polvo de color blanco, sus espectros sugieren la estructura de un éster del ácido linoleico con un alcohol insaturado, su espectro de MS presenta fragmentos a  $m/z$ (%): 397(29), 396(45), 296(16), 213(27), 95(100), 81(89), 69(68), 55(39), 43(19). IR  $\nu_{max}$  destacan las señales a 3463; 1723, 1166  $cm^{-1}$  y de  $^1H$ RMN destaca  $\delta$  4.5 y 4.7 ppm que corresponden a protones unidos a oxígeno, en cuanto a  $^{13}C$ RMN  $\delta$  173.911 y 173.554 ppm que indican la presencia de 2 grupos carbonilo del tipo éster que son confirmadas con las señales del protón. Tentativamente puede considerarse un éster del ácido linoleico con un alcohol insaturado, de carácter lignano. La identificación completamente de este compuesto sigue en estudio. Este compuesto no retrasa de una manera importante la oxidación del aceite de oliva ya que éste tuvo una oxidación mayor del 90% comparada con el control (Fig. 3).

De la F9 se aislaron dos compuestos que no se pudo seguir su estudio por encontrarse en cantidades muy pequeñas con las cuales no fue posible obtener sus espectros y hacer ensayos de oxidación.

De la F21 se obtuvo un compuesto (Fig. 2 pico III) que al secarse fue un polvo amarillo claro, con un peso molecular de 300, su espectro de MS, IR,  $^1H$ RMN y  $^{13}C$ RMN coinciden con los descritos en la bibliografía para el ácido 8, 11, 13 - abietatrien - 18 oico (Pretsch y col., 1990). Este compuesto no presentó retraso de la oxidación del aceite de oliva en los dos tratamientos probados (600 y 200 ppm Fig. 3). Esta baja eficiencia puede deberse a la presencia del grupo COOH demostrado por Cuvelier y col. (1992) en ácidos benzoicos.

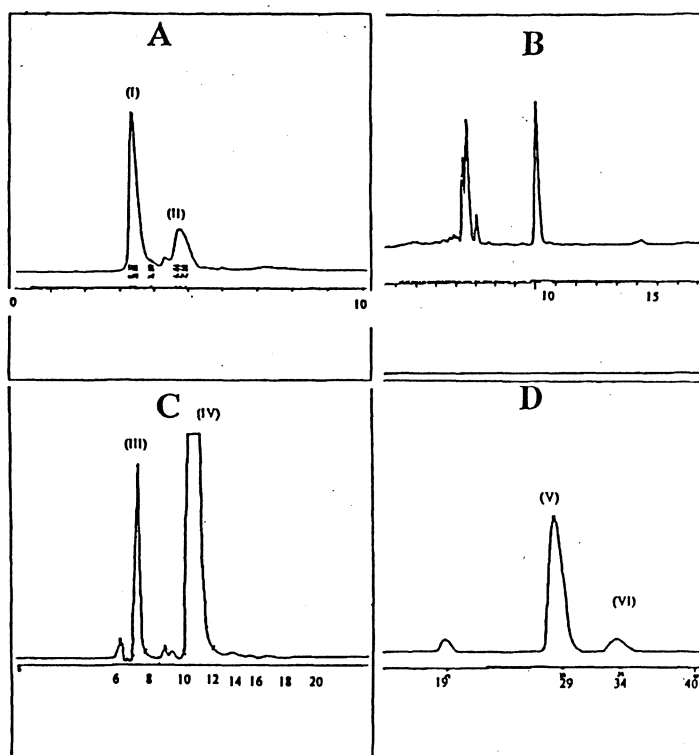


Figura 2

Cromatogramas de HPLC de las fracciones antioxidante del residuo no-volátil del aceite esencial de naranja.

- (A). F4, columna Licrospher Si-60 (5 $\mu$ m), eluyente hexano-acetato de etilo (75:25). Se aislaron (I)  $\alpha$ -tocoferol, (II) no identificado.  
 (B). F9, columna Licrospher Si-60 (5 $\mu$ m), eluyente hexano-acetato de etilo (80:20). De esta fracción se aislaron productos en cantidades insuficientes para realizar el análisis e identificarse.  
 (C). F21, columna Spherisorb ODS C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m), eluyente metanol-agua (90:10). Se aislaron (III) ác. dehidroábietico, (IV) hexametoxiflavona.  
 (D). F22, columna Spherisorb ODS C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m), eluyente metanol-agua (90:10). Se aislaron (V) heptametoxiflavona, (VI) pentametoxiflavona.

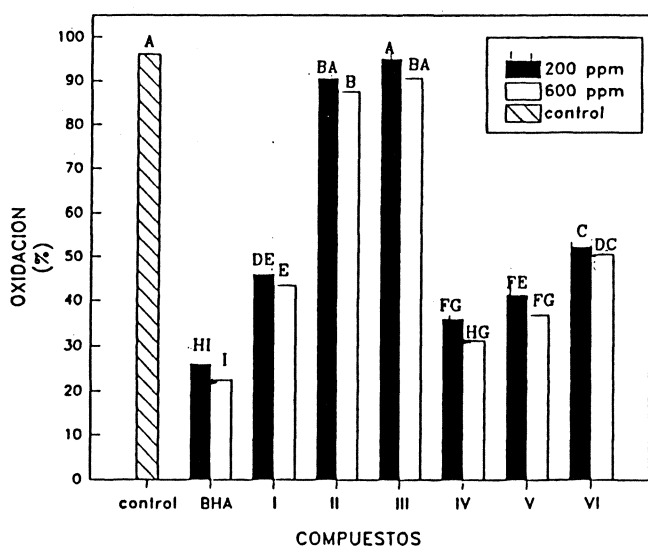


Figura 3

Oxidación del aceite de oliva tratado con 200 y 600 ppm de los compuestos aislados del residuo no-volátil del aceite esencial de naranja y BHA, medido por el valor de peróxidos producidos a 70 °C.  
**BHA.**— 3-t-butil-4-hidroxianisol, **I.**  $\alpha$ -tocoferol, **II.** no identificado, **III.** ác. dehidroábietico, **IV.** Hexametoxiflavona, **V.** heptametoxiflavona, **VI.** pentametoxiflavona. Letras diferentes representan diferencia estadística entre compuestos ( $P \leq 0.05$ ).

Los siguientes tres compuestos (IV, V, VI de la Fig. 2) aislados de F21 y F22 fueron flavonas, que después de secarse quedaron como polvo en diferentes tonos de amarillos, identificándose la primera flavona como 3, 5, 6, 7 - tetrametoxi - 2 - (3,4-dimetoxifenil - 4H - 1 benzopiran - 4 - ona. (3,3',4',5,6,7 hexametoxiflavona): MS, el ion molecular  $m/z$ : 402[M<sup>+</sup>, 33]. <sup>1</sup>HMRN destacan  $\delta$  7.724-7.707 ppm (d),  $\delta$  7.007-6.985 ppm (d),  $\delta$  6.752 ppm (s), 4(H)  $\delta$  4.017 ppm (s),  $\delta$  3.976 ppm (s),  $\delta$  3.926 ppm (s),  $\delta$  3.871 ppm (s) (18H). <sup>13</sup>CRMN destacan 56.074 ppm, 56.210 ppm, 56.385 ppm, 60.026 ppm 61.627 ppm, esta flavona fue aislada anteriormente de *Thymus vulgaris* por Tatum, (1972), este compuesto retrasó la oxidación del aceite de oliva en 69% a 600 ppm y 60% a 200 ppm (Fig. 3). El siguiente compuesto aislado, todos sus datos espectrales coinciden con los de la bibliografía para el compuesto 3, 5, 6, 7, 8 - pentametoxi - 2 (3, 4 - dimetoxifenil) - 4 H - 1 - benzopiran - 4-ona (3,3', 4', 5, 6, 7, 8 - heptametoxiflavona), este compuesto anteriormente aislado de *Linaria japonica* (Otsuka, H. 1992), en este estudio retarda la oxidación del aceite de oliva en 65% a 600 ppm y 57% a 200 ppm. El último compuesto se identificó como 5, 6, 7, 8 - tetrametoxi - 2 (4-metoxifenil) - 4 H - 1 - benzopiran - 4 - ona (4', 5, 6, 7, 8; pentametoxiflavona), flavona ais-

lada por Harbone y Marby (1982). Este compuesto retarda la oxidación del aceite de oliva en 50% a 600 ppm y 45% a 200 ppm (Fig. 3). La interpretación de espectros de RMN de flavonas metoxiladas han sido reportadas por Panichpol y col., 1978 y por Roitman y James, 1982.

Los porcentajes de retraso de la oxidación del aceite de oliva por las tres flavonas aisladas en este estudio, coinciden con lo publicado Kayoko y Nakatani (1989) para flavonas metoxiladas aisladas de *Thymus vulgaris* L., encontrando que éstas tienen más actividad que  $\alpha$ -tocoferol. En nuestro caso dos de las tres flavonas retrasaron la oxidación en mayor proporción que  $\alpha$ -tocoferol. La actividad antioxidante de flavonas metoxiladas puede deberse a la presencia del grupo carbonil en el anillo central de la molécula y la 2,3-doble enlace, que en conjunto participan en la estabilización del radical ariloxil, demostrado por Foti y col. (1996) al comparar la relativa eficiencia antioxidante (RAE) de flavan-e-ol y flavonas en sistemas micelares. Cuvelier y col. (1992), encontraron que la presencia de grupos metoxi en las posiciones *orto* en monofenoles, incrementan substancialmente la eficiencia antioxidante, fundamentándolo en que la sustitución en esta posición por grupos alquilo o metoxilo, incrementan la estabilidad del radical ariloxil y esto se traduce en acción antioxidante. Pudiendo ser esta misma situación para las flavonas aisladas en este trabajo.

En una reciente revisión de antioxidantes dietarios y su relación en la prevención de enfermedades realizada por Gordon (1996), describió a las flavonas polimetoxiladas como compuestos con actividad anticarcinogénica y antitumoral, utilizando para este fin el mismo mecanismo que los antioxidantes del tipo de la vitamina C,  $\alpha$ -tocoferol y quercitín.

Cuatro de los seis compuestos aislados en este estudio demostraron que retardan la oxidación del aceite de oliva, presentan menor valor de peróxidos que el control en ambos tratamientos (600 y 200 ppm). El análisis estadístico de los datos de oxidación, señala diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) por efecto de la concentración. La estabilidad del aceite de oliva fue proporcional a la concentración de los cuatro agentes antioxidantes aislados.

#### 4. CONCLUSIÓN

De los seis compuestos aislados en este estudio, únicamente en el  $\alpha$ -tocoferol aislado del flavedo de naranja se había probado su actividad antioxidante, atribuyéndole la estabilidad del aceite frente a la oxidación a este compuesto. En este trabajo, se aislaron junto con  $\alpha$ -tocoferol, tres flavonas que tienen actividad antioxidante, por lo que pensamos que la estabilidad del aceite esencial de naranja no debe

atribuirse únicamente al  $\alpha$ -tocoferol, sino a una actividad sinérgica de todos los compuestos antioxidantes que tiene este aceite.

#### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Técnico especialista D. Manuel Adelantado la asistencia en la obtención de espectros de MS, IR y RMN.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Akiyoshi, H. Toshihiro, K. and Hajime O. (1991).—Antioxidative effect of a leaf extract from *Quercus actissima* Carr on lard and fish oil. *Agric. Biol. Chem.* **55**(5), 1396-1398.
- AOAC.—Official methods of analysis (1980). Oils and fats. meth. 28.022, 440.
- Cuvelier, E., Hubert, R. and Berset, C. (1992).—Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(2), 324-325.
- Cuvelier, E., Berset, C. and Hubert, R. (1994).—Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* **42**, 665-669.
- Foti, M., Piattelli, M., Tiziana, M. and Ruberto, G. (1996).—Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 497-501.
- Gordon, H. (1996).—Dietary Antioxidants in Disease Prevention. *Natural Product Reports*, pp. 265-272.
- Harbone, J. B. and Marby, T. J. (1982).—The Flavonoids *Advances in Research*. Chapman and Hall Ltd. pp. 19-132.
- Ito, N., Fukushima, S. and Tsuda, A. (1985).—Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response of BHA, BHT and other antioxidants. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* **15**, 109-150.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. and Kinsella, J. (1994).—Natural antioxidants in grape and wines. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 64-69.
- Kayoko, M. and Nakatani, N. (1989).—Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Agric. Biol. Chem.* **53**(11), 3043-3045.
- Kramer, R. E. (1985).—Antioxidants in clove. *JAOCS.* **62**(1), 111-113.
- Loliger, J. (1991).—«The Use of Antioxidants in Foods». In «Free Radicals and Food Additives»; Auroma, O. I., Halliwell, B. (Eds). Taylor and Francis: London New York. pp. 121-150.
- Moshanas, G and Shaw, E. (1990).—Flavor and composition comparison of orange essences and essence oils produced in the United States and Brazil. *J. Agric. Food Chem.* **38**(3), 799-801.
- Namiki, M. (1990).—Antioxidants/Antimutagens in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29**, 273-275.
- Newhall, F. and Ting, U. (1965).—Isolation and identification of  $\alpha$ -tocoferol, a vitamine E factor, from orange flavedo. *J. Agric. Food Chem.* **13**(3), 281-284.

- Otsuka, H. (1992).—Isolation of isolinariins A and B, new flavonoid glycosides from *Linaria japonica*. J. Nat. Prod. **55**(9), 1252-1255.
- Panichpol, K., Waterman, P. G. (1978).—Novel flavonoids from stem of *Popowia cauliflora*. Phytochem. **17**, 1363-1367.
- Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, S., Simon, W. 1990.—Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Versión español de J. Castells. Ed. Alhambra. España.
- Roitman, J. N. and James, L. F. (1985).—Chemistry of toxic range plants. Highly oxygenated flavonol methyl ethers from *Gutierrezia microcephala*. Phytochem. **24**, 835-848.
- Shaw, E. P. (1979).—Citrus essential oils. Perfumer & Flavorist. **3**(6), 35-38.
- Tatum, J. H. (1972).—Isolation and identification of two flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L). Phytochem. **11**, 2783-2785.
- Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994).—Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Faseolus vulgaris* L. J. Agric. Food Chem. **42**, 248-251.
- Vinson, J. and Hontz, B. (1995).—Phenol Antioxidant Index: Comparative Antioxidant Effectiveness of Red and White Wines. J. Agric. Food Chem. **43**, 401-403.
- Waters, R., Keterson, J., and Braddock, R. (1976).—Method for determining the  $\alpha$ -tocopherol content of citrus oils. J. Food Sci. **41**, 370-371.
- Wolford, W., Keterson, W., and Attaway, J. (1977).—Physicochemical properties of citrus essential oils from Florida. J. Agric. Food Chem. **19**(6), 1097-1105.
- Yoshihiko, M., Kawabata, J., and Ryoya, N. (1995).—Antioxidative Caffeoylquinic Acid Derivatives in the roots of Burdock (*Arctium lappa* L). J. Agric. Food Chem. **43**, 2592-2595.

Recibido: Julio 1997  
Aceptado: Enero 1998