

(S8-O131)

METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN FRUTAS Y HORTALIZAS

JARA PÉREZ-JIMÉNEZ ⁽¹⁾ y FULGENCIO SAURA-CALIXTO* ⁽¹⁾

⁽¹⁾Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto del Frío, CSIC

c/ José Antonio Novais, 10. 28040 Madrid, España

Tlf. 34 91 549 23 00

Fax 34 91 549 36 27

*E-mail: fsaura@if.csic.es

Palabras clave: capacidad antioxidante – frutas – verduras – FRAP – ABTS – DPPH - ORAC

RESUMEN

La capacidad antioxidante puede considerarse actualmente un factor a tener en cuenta en análisis nutricional de frutas y verduras y en la determinación de variaciones en procesos post-cosecha.

Como la capacidad antioxidante total de una muestra viene determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos antioxidantes, así como por el modo de acción concreto de cada uno de ellos, es necesario utilizar procedimientos adecuados en la extracción de antioxidantes y en la medida de capacidad antioxidante.

Respecto a la extracción, es necesario combinar al menos dos mezclas de disolventes con distinta polaridad, para facilitar la extracción de todos los compuestos antioxidantes. La utilización sucesiva de metanol/agua 50:50 v/v pH=2 y acetona/agua 70:30 v/v frente al uso de un solo disolvente ha proporcionado los mejores resultados en la extracción de antioxidantes en diversos productos vegetales. También se deben analizar la capacidad antioxidante presente en el residuo de estas extracciones, muchas veces ignorados, pero que pueden ser superior a la presente en el sobrenadante debido a la presencia de antioxidantes asociados a paredes celulares y macromoléculas.

Por otro lado, los métodos más usados para medir capacidad antioxidante son el FRAP, basado en la capacidad de reducción férrica y los de ABTS, DPPH y ORAC, basados en la captación de distintos radicales libres. Se han estudiado distintos aspectos que influyen en su aplicación, como puede ser el disolvente empleado en la extracción o la presencia de compuestos no antioxidantes que pueden actuar como interferencias. Así, ciertos aminoácidos y ácidos urónicos no antioxidantes presentes en alimentos vegetales, pueden mostrar un efecto interferente en estos ensayos, particularmente en el ORAC.

Finalmente, se abordan las distintas formas de expresión de resultados de capacidad antioxidante, ya sean basadas en la comparación con los valores obtenidos para un patrón a un tiempo fijo o basadas en medidas cinéticas.

METHODOLOGY FOR THE EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY IN FRUITS AND VEGETABLES

Keywords: antioxidant capacity-fruits-vegetables-FRAP-ABTS-DPPH-ORAC

ABSTRACT

Antioxidant capacity may be considered in nutritional analysis of fruits and vegetables and in the determination of variations in post-recollection processes.

Since antioxidant capacity of a sample depends on synergistic interactions among different antioxidant compounds, as well as on the way of action of each one of them, it is necessary to use adequate procedures in the extraction of antioxidants and in the determination of antioxidant capacity.

As regards to the extraction, it is necessary to combine at least two mixtures of solvents with different polarity, to achieve a complete extraction of all the antioxidant compounds. The use of methanol/water 50:50 v/v pH=2, followed by acetone/water 70:30 v/v instead of an only solvent has provided the best results in the extraction of antioxidants in several plant foods. It must be also analysed the antioxidant capacity present in the residue of these extractions, usually ignored, but that may be higher than the one present in the supernatant, due to the presence of antioxidants associated to cell walls and macromolecules.

On the other hand, the most used methods to determine antioxidant capacity are FRAP, based on ferric reducing power and ABTS, DPPH and ORAC, based on the scavenging of different free radicals. Different aspects that influence these assays have been studied, such as solvent used for extraction or the presence of non-antioxidant compounds that may behave as interferences. In this way, certain non-antioxidants aminoacids and uronic acids present in plant foods, may show an interfering effect in these assays, particularly in ORAC.

Finally, the different ways of expressing antioxidant capacity results are considered, being based on the comparison with values obtained for a standard at a fixed time, or on kinetic measurements.

INTRODUCCIÓN

Las frutas y las hortalizas poseen distintos compuestos bioactivos, entre los que destacan los antioxidantes, compuestos de distinta naturaleza química, que incluyen a las vitaminas C y E, polifenoles, carotenoides y terpenoides, entre otros (Bravo, 1998; Yen et al., 2002; Hensley et al., 2004; Stahl et al., 2006) Estos compuestos se han relacionado con la prevención de distintos procesos crónicos, como la enfermedad cardiovascular, algunos desórdenes neurológicos y ciertos procesos inflamatorios (Scanner et al., 2004)

El contenido en compuestos antioxidantes de frutas y hortalizas y, por tanto, su capacidad antioxidante asociada, se puede ver afectado por factores fisiológicos, como la maduración, así como por factores tecnológicos, como las condiciones de conservación y procesado (Lindley, 1998; Helyes & Lugasi, 2006). Por tanto, es necesario poseer métodos optimizados para la determinación de capacidad antioxidante en estos productos y evaluar su evolución a lo largo de los distintos procesos post-cosecha.

Como la capacidad antioxidante total de una muestra viene determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos, así como por el modo de acción concreto de cada uno de ellos, es necesario combinar más de un método para evaluar de manera correcta la capacidad antioxidante de una muestra. En este sentido, durante los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos basados en distintos aspectos, como la reducción de metales (FRAP), la capacidad de captación de radicales peroxilo (ORAC, TRAP), de radicales hidroxilo (ensayo de la deoxirribosa), de radicales generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (ABTS, DPPH), en la cuantificación de productos generados durante la peroxidación lipídica (TBARs, oxidación de LDLs), etc. (Frankel & Meyer, 2000; Sánchez-Moreno, 2002; Aruoma, 2003)

Nuestro grupo ha realizado numerosos estudios sobre capacidad antioxidante de alimentos vegetales y de dietas completas, participando en análisis interlaboratorios y profundizando en el conocimiento sobre la medida de capacidad antioxidante mediante la modificación de algunos de los métodos existentes. El objetivo de este trabajo es plantear de manera general la metodología a seguir en la determinación de capacidad antioxidante de frutas y hortalizas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

La extracción de antioxidantes se realiza preferentemente sobre muestras de polvo seco el material vegetal. Para ello, frutas y verduras se someten a liofilización y molienda (tamaño partícula $\leq 0,5$ mm.). Para el secado de la muestra, caso de carecer de liofilizador, puede emplearse secado a varias temperaturas (máximo 60°C). Otros tipos de secado, y cualquier proceso térmico en atmósfera no modificada, conllevan pérdidas significativas de capacidad antioxidante.

Por la misma razón, para la molienda se recomienda el uso de molino centrífugo, o cualquier otro sistema (criomolienda, molienda en atmósfera reductora) que implique mínimo calentamiento de la muestra y tiempo de permanencia en atmósfera oxidante.

Extracción de antioxidantes

0,5 g de muestra son tratados con 20 mL de metanol/agua acidificados con HCl 2N (50:50 v/v, pH 2), tras lo que se agita durante 1h. Tras centrifugar, se recoge el sobrenadante y el residuo se trata con 20 mL de acetona/agua (70:30 v/v) y se vuelve a agitar durante 1h. Tras centrifugar, ambos sobrenadantes se combinan. La determinación de capacidad antioxidante

se lleva a cabo en las dos fracciones: líquida (sobrenadantes de la extracción) y sólida (residuos de la extracción)

La determinación de capacidad antioxidante en los sobrenadantes se efectúa directamente tomando alícuotas de los mismos. (Jiménez-Escrig et al., 2001; Saura-Calixto & Goñi, 2006)

Para determinar la capacidad antioxidante asociada a los residuos, se deben efectuar dos tratamientos diferentes sobre los mismos:

- Extracción de taninos hidrolizables (Hartzfeld et al., 2002). 200 mg del residuo se mezclan con 20 mL de agua y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A continuación, las muestras se incuban durante 20 hs a 85°C con agitación constante. Se centrifugan y se recogen los sobrenadantes. Después de dos lavados con agua destilada, el volumen final se lleva a 50 mL. En este sobrenadante se determina la capacidad antioxidante (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005)

- Extracción de taninos condensados (Reed et al., 1982). Los residuos de la extracción se tratan con HCl/butanol (5:95, v/v) a 100°C durante 3 hs y en este sobrenadante se determina la capacidad antioxidante (Taberner et al., 2006)

En síntesis, la determinación de la capacidad antioxidante total de una muestra vegetal requiere tres determinaciones: sobrenadantes de la extracción, hidrolizados de residuos con ácido sulfúrico e hidrolizados de residuos con butanol/HCl.

Determinación de capacidad antioxidante

Método FRAP. (Benzie & Strain, 1996; Pulido et al., 2000; Saura-Calixto & Goñi, 2006), 900 µL del reactivo FRAP, que contiene TPTZ, FeCl₃ y tampón acetato, se mezclan con 90 µL de agua destilada y 30 µL de la muestra o el blanco (los disolventes usados para la extracción). Tras incubarse a 37°C, se toman los valores de absorbancia a 595 nm a los 30 min, dado que a los 4 min, el tiempo que se toma habitualmente, la reacción para formar el complejo hierro-TPTZ aún no ha terminado (Pulido et al., 2000) Los resultados se expresan en µmoles equivalentes de Trolox (un análogo hidrosoluble de la vitamina E)/ g ms

Método DPPH. El método original (Brand-Williams et al., 1995) fue modificado en nuestro laboratorio para determinar parámetros cinéticos (Sanchez-Moreno et al., 1998) y ha sido aplicado a un amplio número de muestras vegetales (Jiménez-Escrig et al., 2001). A 3,9 mL de una solución metanólica de DPPH[•], ajustada hasta tener una absorbancia de 0,7, se le añaden 0,1 mL del extracto de la muestra. Se mide la absorbancia a 515 nm hasta que la reacción se estabiliza. El parámetro EC₅₀, que refleja la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH[•], se expresa en g ms/g DPPH[•]. También se calculan el tiempo necesario para alcanzar la EC₅₀ (t_{EC50}) y la eficiencia antirradicálica (AE = 1/EC₅₀ t_{EC50}).

Método ABTS. (Re et al., 1999) Tras añadir 100 µL de la muestra de Trolox a 3,9 mL de solución de ABTS^{•+} ajustada hasta una absorbancia de 0,7, las medidas de absorbancia a 658 nm. se toman cada 20 sg usando un espectrofotómetro hasta un tiempo total de 6 min. El porcentaje de inhibición de la absorbancia frente al tiempo se representa gráficamente, calculando el área bajo la curva entre 0 y 6 min. Los resultados se expresan en µmol equivalentes de Trolox/ g ms. Nuestro grupo ha modificado recientemente este método con el objetivo de obtener parámetros cinéticos similares a los del método DPPH y obtener así una información más completa sobre el comportamiento de los antioxidantes (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, *in press*)

Método ORAC. (Ou et al., 2001) 175 µL del extracto de la muestra o del blanco se mezclan con 120 µL de PBS pH 7.4 75 mM, 205 µL de una solución de AAPH 53 mM y 3 mL de una solución de fluoresceína 48 nM. La fluorescencia se registra hasta que llega a cero (longitud de onda de excitación 493 nm, longitud de onda de emisión 515 nm) en un

espectrofotómetro de fluorescencia equipado con una célula termostaticada a 37°C. Los resultados se calculan usando las diferencias de áreas bajo la curva entre el blanco y la muestra y se expresan como equivalentes de Trolox. Recientemente, nuestro grupo estudió algunos de los aspectos que pueden interferir en los distintos métodos de capacidad antioxidante, concluyendo que el ORAC era el más afectado por los mismos (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología previamente descrita ha sido aplicada por nuestro grupo a un gran número de muestras de origen vegetal, en particular, frutas y hortalizas. A continuación se presentan brevemente los principales resultados obtenidos.

Extracción de antioxidantes

En la bibliografía existen una gran cantidad de disolventes descritos para la extracción de antioxidantes de alimentos vegetales. Entre ellos, aparecen el etanol, el metanol, la acetona y mezclas de los mismos con agua en diferentes proporciones (Yilmaz & Toledo, 2006; Pellegrini et al., 2007). Sin embargo, nuestro grupo ha seleccionado, tras numerosas pruebas, el procedimiento de extracción de antioxidantes mediante dos tratamientos sucesivos con mezclas de distintos disolventes (metanol/agua 50:50 v/v pH 2 y acetona/agua 70:30 v/v) como el más eficiente de manera genérica para frutas y hortalizas y otras muestras vegetales. Así, por ejemplo, cuando este procedimiento se aplicó al salvado de trigo, los valores de capacidad antioxidante obtenidos fueron superiores a los de la extracción sólo con cada una de estas dos mezclas o con metanol, acetona y etanol combinados con agua (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005)

Así mismo, se debe tener en cuenta la capacidad antioxidante asociada a los residuos de las extracciones acuosas-orgánicas, normalmente ignorada. Sin embargo, estos compuestos antioxidantes, aunque no estarían disponibles en el intestino delgado, sí podrían ser fermentados en el colon por la microflora presente en el mismo, liberando una capacidad antioxidante (Saura-Calixto et al., 2006) En ciertos productos de origen vegetal, la capacidad antioxidante asociada a estos compuestos presentes en el residuo, ya sean taninos hidrolizables, como en el caso de cereales (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005) o taninos condensados, como en el caso del cacao y derivados (Tabernero et al., 2006) constituye una fracción muy importante de la capacidad antioxidante total de las muestras.

Determinación de capacidad antioxidante. Expresión de resultados

Nuestro grupo ha estudiado distintas variables que se deben tener en cuenta al aplicar los métodos de capacidad antioxidante previamente enumerados (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006), concluyendo, en primer lugar, que las comparaciones entre resultados de capacidad antioxidante sólo se pueden hacer para un mismo método y para muestras obtenidas con los mismos disolventes. Por otro lado, ciertos compuestos no antioxidantes presentes en alimentos vegetales, como algunos aminoácidos y ácidos urónicos, pueden actuar como interferencias, proporcionando resultados sobreestimados, por lo que su contenido debería ser evaluado antes de aplicar estos métodos, particularmente en el caso del ORAC (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006).

La Tabla 1 muestra los resultados de capacidad antioxidante obtenidos para distintas frutas y hortalizas por nuestro grupo, aplicando los métodos previamente presentados. Se puede observar cómo estos métodos resultan útiles para muestras con características diversas, ya sean hortalizas directamente analizadas (alcachofa), distintas fracciones de un alimento

(piel y pulpa de guayaba), subproductos de industrias hortofrutícolas (orujos de uva tinta y blanca) o mezclas de alimentos (frutas y verduras de la dieta española).

Por otro lado, resulta interesante remarcar que, al evaluar la capacidad antioxidante de una muestra, siempre se deben combinar al menos dos métodos, al estar basados en distintos fundamentos. En concreto, y tal y como se ha hecho con las muestras mostradas en la Tabla 1, se debería combinar el FRAP, al medir la capacidad de reducción de Fe, con alguno de los otros métodos, que determinan la capacidad de captación de radicales libres.

Por otro lado, respecto a la expresión de resultados de capacidad antioxidante, se puede observar cómo en tres de los métodos empleados- FRAP, ABTS, ORAC- los resultados se expresan en $\mu\text{mol Trolox/g ms}$. El Trolox es un análogo hidrosoluble de la vitamina E y se debe señalar, en primer lugar, que su elección como estándar de capacidad antioxidante es arbitraria. En este sentido, trabajos de nuestro grupo han utilizado en su lugar vitamina C y E como estándares de capacidad antioxidante (Pulido et al., 2003) Por otro lado, también hay que remarcar que, aunque distintos métodos expresen sus resultados en equivalentes Trolox, los valores no son comparables entre sí, al estar basados estos métodos en diferentes reacciones de los antioxidantes; por ejemplo, los valores de FRAP suelen ser considerablemente superiores a los de ABTS, como se puede ver en la Tabla 1.

El DPPH, por su parte, al estar basado en la determinación de parámetros cinéticos, se expresa en unidades diferentes, considerando los gramos de muestra necesarios para captar un gramo del radical. Así, cuanto más antioxidante sea una muestra, menor será su valor EC_{50} . A su vez, esta información se complementa con la proporcionada por el parámetro $t_{EC_{50}}$, que considera el tiempo necesario para captar el radical y la eficacia antiradicálica, AE, que toma en consideración los dos anteriores. Es decir, los parámetros cinéticos pueden determinar no sólo la cantidad de antioxidante necesaria para detener un proceso de oxidación, sino también la velocidad del proceso y su eficiencia.

Nuestro grupo ha desarrollado recientemente una modificación para incluir estos parámetros cinéticos en el método ABTS (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, *in press*). Este método se ha basado tradicionalmente en medidas a un tiempo fijo de 6 minutos en el que, no obstante, muchos antioxidantes no han completado su reacción con el radical (Prior et al., 2005). La Tabla 2 muestra un ejemplo de la aplicación de este procedimiento al orujos de uva tinta y blanca. Se puede observar cómo ambas muestras necesitan 13 minutos para completar su reacción con el radical a la concentración correspondiente al EC_{50} , por lo que sería necesario aplicar esta aproximación cinética para tener un conocimiento más completo sobre el comportamiento antioxidante de estas muestras.

CONCLUSIONES

Para conseguir una extracción más eficiente de antioxidantes en frutas y hortalizas es necesario combinar el uso sucesivo de distintos disolventes con diferente polaridad. Se debe determinar también la capacidad antioxidante asociada a los residuos de las extracciones acuoso-orgánicas. Para tener un conocimiento completo de la capacidad antioxidante de una muestra, es necesario combinar al menos dos métodos de capacidad antioxidante, uno basado en la capacidad de reducción de metales y otro en la de captación de radicales libres. Así mismo, los métodos basados en la determinación de parámetros cinéticos complementan la información sobre el comportamiento antioxidante de una muestra proporcionada por métodos basados en medidas a un tiempo fijo. Las comparaciones de capacidad antioxidante entre dos muestras sólo son válidas para valores obtenidos en el mismo disolvente y con el mismo método de determinación.

AGRADECIMENTOS

Las investigaciones descritas en este trabajo han sido realizadas con el apoyo económico del Ministerio de Educación y Ciencia de España (proyecto AGL 2004-07579-C04-01/ALI) J. Pérez-Jiménez agradece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas la concesión de una beca I3P, financiada por el Fondo Social Europeo.

ABREVIATURAS

ABTS: 2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid
 DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
 FRAP: Ferric reducing antioxidant power
 LDLs: Low-density lipoproteins
 ORAC: Oxygen radical absorbance capacity
 ms: materia seca
 TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances
 TRAP: Total Radical-trapping Antioxidant Parameter

BIBLIOGRAFÍA

- Aruoma, O.I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation research*, 523-24: 9-20
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70–76.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11): 317-33
- Frankel, E.N. & Meyer, A.S. 2000. Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1925-41
- Hartzfeld, P.W.; Forkner, R.; Hunter, D.M.; Hagerman, A.E. 2002. Determination of hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1785-90
- Helyes, L. & Lugasi, A. 2006. Formation of certain compounds having technological and nutritinal importance in tomato fruits during maturation. *Acta alimentaria*, 35 (2): 183-93
- Hensley, K.; Benaksas, E.J.; Bolli, R.; Comp, P.; Grammas, P.; Hmadheydari, L. 2004. New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 36: 1-15
- Jiménez-Escrig A, Rincón M, Pulido R, Saura-Calixto F. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11): 5849-53
- Jiménez-Escrig, A.; Dragsted, L.O.; Daneshvar, B.; Pulido R.; Saura-Calixto, F. 2003. In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effects on biomarkers of antioxidants in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (18): 5540-45
- Lindley, M.G. 1998. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 9 (8/9): 336-40

- Ou, B.; Hampsch- Woodill, M.; Prior, R.L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4619-26
- Pellegrini N, Colombi B, Salvatore S, Brenna OV, Galaverna G, Del Rio D, Bianchi M, Bennett RM, Brighenti F. 2007. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (1): 103-11
- Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. 2005. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 5036-40
- Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39: 791-800
- Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. Antioxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. *International Journal of Food Science and Technology*, *in press*
- Prior, R.; 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: 4290-302
- Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 3396-3402
- Pulido R, Hernández-García R, Saura-Calixto F. "Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet". *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(2003) 127-32
- Re, R.; Pellegrini, N.; Preteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. 1999 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 26 (9/ 10): 121-37
- Reed, J.; McDowell, R.E.; Van Soest, P.J.; Horvarth, P.J. 1982. Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33: 213-220
- Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A.; Saura-Calixto, F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 270-76
- Sánchez-Moreno, C. 2002. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8 (3): 121-39
- Saura-Calixto, F. & Goñi, I. 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94: 442-47
- Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goñi, I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101 (2): 492-501
- Stahl, W. & Sies, H. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids" *Biochemical and Biophysical Acts*, 1740: 101-07
- Stanner, S.; Hughes, J. & Buttriss, J. 2004. A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. *Public Health nutrition*, 7 (3): 407-22
- Taberero, M.; Serrano, J.; Saura-Calixto, F. 2006. The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 28-32
- Yen, G.C.; Duh, P.D. & Tsai, H.L. 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 79: 307-13

Yilmaz, Y. & Toledo, R.T. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 41-48

TABLAS

Tabla 1. Capacidad antioxidante de diferentes frutas y hortalizas.

Muestra		FRAP (μmol Trolox/g ms)	ABTS (μmol Trolox/g ms)	ORAC (μmol Trolox/g ms)	DPPH EC ₅₀ AE (g ms/g DPPH) ($\times 10^4$)	t _{EC50} (min)
<i>Frutas española*</i>	<i>dieta</i>	25,5 \pm 0,5	10,2 \pm 0,4	-----	-----	-----
<i>Hortalizas española*</i>	<i>dieta</i>	10,3 \pm 0,1	6,7 \pm 0,7	-----	-----	-----
lcachofa		343 \pm 25	-----	-----	128 \pm 3	27,6 \pm 1,1 2,9
Piel de guayaba		462 \pm 51	-----	-----	1,92 \pm 0,08	54,7 \pm 2,05 0,007
Pulpa de guayaba		238 \pm 7	-----	-----	3,7 \pm 0,06	30,7 \pm 2,6 0,009
Orujo de uva blanca**		466,1 \pm 43,6	355,4 \pm 30,3	522,6 \pm 33,2	2,19 \pm 0,08	37,6 \pm 2 121
Orujo de uva tinta**		312,4 \pm 12,8	227,9 \pm 14	353,9 \pm 28,2	2,87 \pm 0,07	35,7 \pm 1,2 98

Ref. Jiménez-Escrig et al., 2001; Jiménez-Escrig et al., 2003

* Valor medio de todas las frutas y verduras consumidas en la dieta española (Saura-Calixto & Goñi, 2006)

** Datos no publicados)

Tabla 1. Capacidad antioxidante de orujo de uva tinta y blanca por ABTS usando parámetros cinéticos

Muestra	ABTS		
	EC_{50} AE (g ms/g ABTS) ($\times 10^4$)		t_{EC50} (min)
Orujo de uva blanca	$0,35 \pm 0,01$	13,61 0,98	$\pm 0,21$
Orujo de uva tinta	$0,57 \pm 0,01$	13,95 0,36	$\pm 0,13$

Ref. Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, *in press*