

## 32TCA. Efecto de las condiciones de procesamiento en la concentración de bioactivos y la actividad antioxidante de arazá (*Eugenia stipitata*) osmo-deshidratada

### Effect of the processing conditions on the bioactive content and antioxidant activity of osmo-dehydrated araza (*Eugenia stipitata*)

Camilo Andrés Reyes<sup>1</sup>, Juliana Gamboa-Santos<sup>1</sup>, Jonh Jairo Mendez<sup>2</sup>, Maria Cecilia Lanari<sup>1</sup>.

1 CIDCA, UNLP, Buenos Aires. Argentina 2 UT, Facultad de Ciencias, GIPRONUT. Ibagué, Tolima. Colombia. e-mail: chaca0926@gmail.com

#### Resumen

El objetivo de este trabajo fue optimizar las condiciones de proceso (temperatura,(T); tiempo de residencia,(t); concentración soluto deshidratante, (C)) para la deshidratación osmótica (DO) de arazá mediante la metodología de superficie de respuesta, maximizando las concentraciones de bioactivos (polifenoles, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico) y la actividad antioxidante para obtener un producto con óptimos niveles de calidad nutricional. La relación entre los indicadores físico-químicos y nutricionales y las condiciones de procesamiento (temperatura 20-40 °C, tiempo de residencia 60-180 min, concentración de solutos 20-60 °Brix (Bx)) en las porciones de fruta analizadas se determinaron mediante la metodología de superficie de respuesta múltiple a partir de un diseño experimental Box-Behnken. Las variables respuesta se maximizaron para obtener una función de conveniencia que optimizara el proceso en función de la calidad nutricional. Las condiciones de tratamiento de DO que dieron lugar a los valores óptimos de los indicadores analizados fueron: 34,16 °C, 20 °Bx, y 60 min, con una deseabilidad de 0,94 lo cual garantiza niveles fisicoquímicos y nutricionales elevados en el arazá osmo-deshidratado.

Palabras clave: arazá; deshidratación osmótica; optimización; función de conveniencia

#### Abstract

The objective of this work was to optimize the process conditions (temperature(T); residence time (t); solute content (C)) for the osmotic dehydration (DO) of araza to obtain a product with high nutritional quality. The relationship between the bioactive (polyphenols, flavonoids, carotenoids, ascorbic acid) contents or the antioxidant activity and the processing conditions (temperature 20-40 °C, residence time 60-180 min, solutes concentration 20-60 °Brix (Bx)) was determined in fruit pieces by multiple response surface with a Box-Behnken experimental design. The response variables were maximized to obtain a convenience function that optimized the process according to the nutritional indicators. The optimal processing conditions were: 34.16 °C, 20 °Bx, and 60 min, with a desirability value of 0.94, which guarantees high physicochemical and nutritional levels in osmo-dehydrated araza.

Keywords: araza; osmotic dehydration; optimization; convenience function

#### 1. Introducción

El arazá (*Eugenia stipitata*; ES) es una fruta tropical de la zona amazónica de Brasil y Colombia muy apreciada por su color amarillo intenso, características sensoriales exóticas y altos niveles de jugosidad. Esta fruta tiene alto contenido de antioxidantes fenólicos, carotenoides y vitamina C que le otorgan propiedades antioxidantes, antimutagénicas y antígenotóxicas. Actualmente se consume fresco o en jugos, ya que su fragilidad y corta vida útil limitan sus posibilidades de comercialización. Para solucionar este problema deben utilizarse técnicas de preservación que permitan aumentar su vida útil sin deteriorar sus propiedades sensoriales y nutricionales como la

deshidratación osmótica (DO). Este método proporciona una remoción parcial del agua en el alimento mediante un tratamiento térmico suave que favorecería la preservación de bioactivos termosensibles.

Ciurzynska *et al.*, (2016) informaron que las condiciones de operación (tiempo de residencia, t; temperatura, T; concentración del agente deshidratante, C) tienen un papel fundamental en la concentración de nutrientes, por consiguiente, la aplicación exitosa de esta metodología al arazá requiere un conocimiento detallado de la influencia de dichos parámetros en la concentración de antioxidantes presentes y en su actividad.

En este contexto el objetivo de este trabajo fue optimizar las condiciones de proceso (T, t, C) para la DO de arazá mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) y la función de deseabilidad, maximizando las concentraciones de polifenoles, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico y la actividad antioxidante para obtener un producto con calidad nutricional óptima.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Selección de la fruta y deshidratación osmótica (DO)

Los frutos de arazá frescos y lavados (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) se pelaron y cortaron a lo largo de su eje longitudinal en segmentos de 2 cm de espesor.

Las porciones de fruta se deshidrataron con soluciones de sacarosa comercial (Ledesma, Jujuy, Argentina; 20, 40 y 60 °Bx) en una relación muestra/solución 1:10 (p/p) en un agitador termostatzado (FERCA Modelo TT 400, Argentina) con agitación constante (100 ciclos/min) durante 60, 120 y 180 min a 20, 30 y 40 °C. Posteriormente, las muestras se secaron con papel absorbente en condiciones estandarizadas y se pesaron. La ganancia de sólidos solubles (SG, %), la reducción de peso (WR, %) y la pérdida de agua (WL, %) para las combinaciones de tiempo, temperatura y concentración de sacarosa se determinaron con las Ecs. (1-3).

$$WR_t = \frac{(m_0 - m_t)}{m_0} * 100 \quad (1)$$

$$WL_t = WC_0 - WC_t * \left(1 - \frac{WR_t}{100}\right) \quad (2)$$

$$SG_t = TS_0 * \left(1 - \frac{WR_t}{100}\right) - TS_0 \quad (3)$$

Donde  $m$  es la masa de muestra (g),  $WC$  es el contenido de humedad (g/g, %) y  $TS$  es el contenido de sólidos totales (g/g, %) para los tiempos 0 y t.

### 2.2 Caracterización de las muestras

La humedad de las muestras frescas y osmo-deshidratadas se determinó gravimétricamente a 70 °C (AOAC, 2002). El contenido de sólidos solubles se analizó a 25 °C por refractometría (Hanna Instruments HI96801, USA).

### 2.3 Extracción de antioxidantes

La extracción de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Saura-Calixto *et al.*, 2007.

Se extrajeron 5 g de la muestra con 20 ml de solución metanol/agua (50:50, v/v; pH 2; E1) con agitación constante durante 60 min, posteriormente se centrifugó a 2500 g por 10 min. El residuo resultante se extrajo con 20 ml de acetona/agua (70:30, v/v; E2) en las mismas condiciones descritas previamente. La capacidad antioxidante y la concentración de bioactivos se analizaron en una alícuota de la solución resultante de combinar E1 y E2.

#### 2.3.1 Concentración de compuestos bioactivos

##### 2.3.1.1 Polifenoles totales (PT)

La concentración de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Schlesier *et al.*, 2002). Se combinaron 0,2 ml del extracto líquido de arazá con 2 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% (p/v) y 0,2 ml de reactivo Folin-Ciocalteu (1:1) (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina). Luego de 30 min se midió la absorbancia a 725 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS (Seisakusho Ltd., Kyoto, Japón).

Los PT se expresaron como mg de ácido gálico equivalente (EAG)/gramos de materia seca (g.m.s) por medio de una curva de calibración (0,05-0,3 mg ac. gálico/ml).

##### 2.3.1.2 Flavonoides Totales (FT)

Se determinaron mediante el método de Chang *et al.* (2002). Se mezclaron 300  $\mu\text{l}$  del extracto con 1500  $\mu\text{l}$  de agua destilada, 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  al 5% y, luego de 6 min se añadieron 180  $\mu\text{l}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10%. Luego de 5 min se agregaron 600  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaOH}$  1M y finalmente, el blanco y las muestras se completaron con 330  $\mu\text{l}$  de agua destilada. La absorbancia se midió a 510 nm después de 30 min de reacción. Los resultados se expresaron en mg de catequina (CAT)/g.m.s

##### 2.3.1.3 Carotenoides totales (CT)

Se extrajeron 2,5 g de muestra con 5 ml de hexano: acetona: etanol (2: 1: 1), luego de 2 min de agitación se agregaron 2 ml de agua destilada para lograr la separación de fases. La absorbancia del sobrenadante se midió a 454 nm. El contenido de carotenoides se expresó como mg  $\beta$ -caroteno/g m.s usando el coeficiente de extinción molar  $\epsilon_{\beta\text{-caroteno}} = 1.39 * 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Ordoñez-Santos *et al.*, 2014).

### 2.3.1.4 Ácido Ascórbico (AA)

Se extrajeron 2,5 g de muestra con ácido metafosfórico (HPO<sub>3</sub>; 50 g L<sup>-1</sup>; Carlo Erba SA, BCN, España). Luego los extractos se centrifugaron a 2000 g/5 min (Rolco CM 2036, Buenos Aires, Argentina).

La concentración de AA se determinó en el sobrenadante mediante HPLC (Waters, modelo R-414, Milford, 152 MA, EE. UU.). El método consiste en una elución isocrática con un detector UV-Visible (λ; 245 nm), utilizando AA (grado alimentario, Parafarm) como estándar externo. Antes de inyectar la muestra, los extractos se filtraron con papel de filtro de membranas miliporo de 0,45 μm.

La separación se realizó mediante una columna RP C18 (Symmetry, Waters, Dublín, Irlanda) a 25 ° C. La fase móvil fue una mezcla de 5 g L<sup>-1</sup> HPO<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>CN (acetonitrilo) 93:7 (Novakova *et al.*, 2008), con un caudal de 1 ml/min<sup>-1</sup>. La curva de calibración se determinó para un rango de concentraciones de 0,5-200 mg L<sup>-1</sup>.

### 2.3.2 Actividad antioxidante

#### 2.3.2.1 Capacidad de secuestro del radical DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

La capacidad de secuestro del radical DPPH • se determinó con el método de Brand Williams *et al.* (1995) utilizando etanol como solvente. Se mezclaron 100 μl de extracto con 3,9 ml de la solución DPPH. La disminución de la absorbancia a 517 nm se monitoreó espectrofotométricamente hasta alcanzar estado estacionario (80 min).

La actividad antioxidante (AOA) se calculó como porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación.

$$AOA(\%) = \frac{(DPPH_i - DPPH_t)}{DPPH_t} \times 100 \quad (4)$$

### 2.4. Diseño experimental y análisis estadístico

La influencia de la temperatura (T), el tiempo de residencia (t) y la concentración de la solución osmótica (C) en la concentración de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante del producto obtenido se analizó a partir de un diseño experimental Box-Behnken (Statgraphic 5.0, Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE.UU; **Tabla 1**).

**Tabla 1. Condiciones experimentales para la optimización de la deshidratación osmótica de los frutos de arazá.**

Ensayo	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración (°Bx)
A1	60	20	40
A2	120	20	60
A3	180	40	40
A4	120	30	40
A5	60	40	40
A6	60	30	60
A7	120	40	60
A8	120	30	40
A9	120	40	20
A10	180	30	20
A11	120	30	40
A12	120	20	20
A13	180	30	60
A14	60	30	20
A15	180	20	40

La relación entre las distintas variables dependientes (Y; PT, FT, CT, AA, DPPH) y las condiciones de operación se modeló con un polinomio de segundo orden (Ec. 5; Software Statgraphics).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \varepsilon \quad (5)$$

X<sub>1</sub> = T; X<sub>2</sub> = t; X<sub>3</sub> = C. β<sub>0</sub> = constante; β<sub>i</sub> y β<sub>ij</sub> = coeficiente de regresión de los efectos principales “i”, “j” y de las interacciones respectivamente;

Para realizar una optimización del proceso en su conjunto, los modelos con un coeficiente R<sup>2</sup>adj > 69% se sometieron a una optimización simultánea de todas las variables de respuesta, dando como resultado una superficie de respuesta múltiple, siguiendo la metodología descrita por Granato *et al.* (2010).

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Concentración de bioactivos

Las muestras expuestas a las distintas condiciones de t, T y C presentaron valores WL/SG (perdida de agua/ganancia de solutos) entre 1,61-3,29 g.

**Tabla 2. Efecto de las variables de proceso (t, T, C) en el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del arazá**

Tratamiento (t / T / C)	Polifenoles (PT)	Flavonoides (FT)	Carotenoides (CT)	Ácido ascórbico (AA)	DPPH
Control	31,04±0,63 <sup>e</sup>	16,02±0,33 <sup>e</sup>	68,56±1,01 <sup>e</sup>	495,01±56,96 <sup>c</sup>	80,17±2,01 <sup>f</sup>
A1 60/20/40	25,02±1,01 <sup>cd</sup>	11,44±0,22 <sup>cde</sup>	53,81±0,47 <sup>bcde</sup>	283,26±21,36 <sup>b</sup>	77,92±0,57 <sup>f</sup>
A2 120/20/60	17,45±0,92 <sup>a</sup>	7,13±0,06 <sup>abc</sup>	47,41±2,13 <sup>abcd</sup>	92,54±13,36 <sup>a</sup>	61,98±3,46 <sup>de</sup>
A3 180/40/40	15,35±0,16 <sup>a</sup>	4,51±0,17 <sup>a</sup>	33,02±1,11 <sup>a</sup>	42,53±0,17 <sup>a</sup>	34,59±0,17 <sup>a</sup>
A4 120/30/40	19,94±1,27 <sup>ab</sup>	10,99±0,73 <sup>bcde</sup>	58,27±1,42 <sup>cde</sup>	40,63±8,43 <sup>a</sup>	54,27±0,72 <sup>cd</sup>
A5 60/40/40	26,82±1,19 <sup>de</sup>	10,58±0,11 <sup>bcde</sup>	60,64±7,83 <sup>cde</sup>	228,59±19,19 <sup>b</sup>	66,34±2,11 <sup>e</sup>
A6 60/30/60	29,06±0,76 <sup>de</sup>	12,79±0,44 <sup>de</sup>	56,76±6,01 <sup>bcde</sup>	286,67±13,39 <sup>b</sup>	63,07±0,19 <sup>de</sup>
A7 120/40/60	22,17±0,61 <sup>bc</sup>	6,31±0,11 <sup>abc</sup>	38,99±1,42 <sup>ab</sup>	44,79±14,28 <sup>a</sup>	52,65±1,83 <sup>c</sup>
A8 120/30/40	20,15±0,34 <sup>ab</sup>	5,44±0,17 <sup>ab</sup>	42,01±2,36 <sup>abc</sup>	27,92±2,05 <sup>a</sup>	54,49±0,19 <sup>cd</sup>
A9 120/40/20	17,14±0,09 <sup>a</sup>	6,03±0,24 <sup>abc</sup>	46,04±2,03 <sup>abcd</sup>	119,54±6,74 <sup>a</sup>	63,48±1,54 <sup>de</sup>
A10 180/30/20	15,16±0,22 <sup>a</sup>	5,58±0,08 <sup>ab</sup>	41,94±2,13 <sup>abc</sup>	29,23±1,89 <sup>a</sup>	41,44±0,73 <sup>ab</sup>
A11 120/30/40	17,43±1,9 <sup>a</sup>	5,83±0,04 <sup>ab</sup>	49,35±0,27 <sup>abcd</sup>	103,99±5,97 <sup>a</sup>	59,62±0,46 <sup>d</sup>
A12 120/20/20	15,02±0,09 <sup>a</sup>	7,83±0,84 <sup>abcd</sup>	51,07±1,01 <sup>abcde</sup>	65,54±3,42 <sup>a</sup>	63,26±3,73 <sup>de</sup>
A13 180/30/60	16,53±0,52 <sup>a</sup>	3,85±0,17 <sup>a</sup>	38,48±3,15 <sup>ab</sup>	41,65±2,93 <sup>a</sup>	48,36±0,19 <sup>bc</sup>
A14 60/30/20	27,63±2,16 <sup>de</sup>	14,86±0,44 <sup>e</sup>	62,87±9,25 <sup>de</sup>	268,41±52,02 <sup>b</sup>	74,52±0,77 <sup>f</sup>
A15 180/20/40	15,29±0,09 <sup>a</sup>	10,58±0,15 <sup>bcde</sup>	42,15±0,22 <sup>abc</sup>	23,47±4,96 <sup>a</sup>	40,66±1,05 <sup>ab</sup>

\*Los resultados se expresaron como la media ± la desviación estándar de al menos 4 replicados. Las medias con supraindices iguales indican diferencias no significativas ( $P>0.05$ ). Control (Fruta fresca), PT (mg EAG/g m.s), FT (mg CAT/g m.s), CT (mg  $\beta$ -carot/g m.s), AA (mg AA/g m.s), DPPH (% AOA)

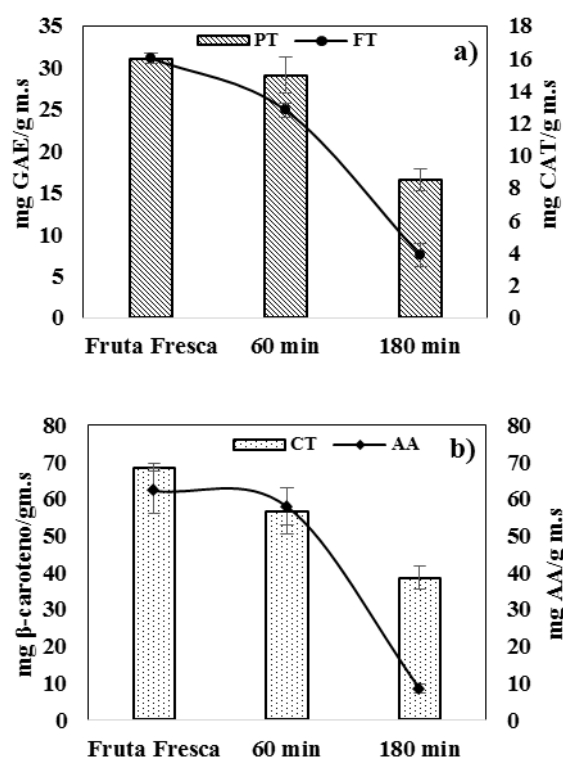
La **Tabla 2** muestra la influencia de la temperatura (T), tiempo de residencia (t) y concentración de la solución osmótica (C) correspondientes a los distintos tratamientos.

Se detectó que, tanto el contenido de bioactivos (PT, CT, FT, AA) como la capacidad de secuestro del radical DPPH (AOA) dependían únicamente del tiempo de residencia ( $P<0,05$ ).

Las frutas tratadas a  $t = 60$  min (A1, A5, A6, A14; **Tabla 2**) presentaron una concentración de bioactivos (PT, CT, FT) y de capacidad de secuestro del DPPH similares a los de la fruta fresca ( $P> 0.05$ ). Sin embargo, el aumento de "t" = 180 min (A3, A4, A8, A10 y A15) produjo una pérdida 30-40% en el contenido de PT, FT y CT y del 80% en AA (**Tabla 2, Figura 1(a,b,c)**) mientras que AOA disminuyó 30%.

La estabilidad de los compuestos bioactivos siguió el siguiente orden  $PT > CT > FT > AA$ .

La influencia del tiempo de residencia en AOA era independiente del tipo de bioactivo.



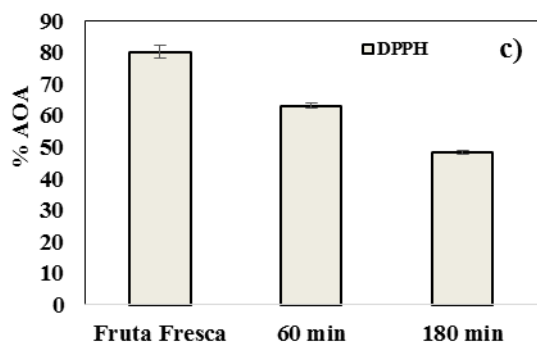


Figura 1. Efecto del tiempo de residencia (60 y 180 min) en la concentración de compuestos bioactivos: Polifenoles totales (PT), Flavonoides totales (FT), b) Carotenoides totales (CT) Ácido ascórbico (AA), c) Estabilización del radical DPPH\*

### 3.1 Ajuste de la ecuación del modelo de regresión

La **Tabla 3** muestra las ecuaciones obtenidas que describen la relación entre las variables dependientes y las condiciones operativas (T, t y C). Los resultados del análisis de regresión indicaron que el ajuste de los datos experimentales al modelo (Ec. 5) fue bueno  $R^2$  (96,1%).

En todos los casos se detectó que el tiempo de residencia tuvo un efecto antagónico ( $P < 0.05$ ; **Tabla 3**) en las respuestas analizadas, que fue parcialmente compensado por el termino cuadrático en PT y AA.

**Tabla 3.** Ecuaciones de regresión para el ajuste del modelo de las diferentes variables estudiadas durante la DO de arazá

Variables	Ecuación del modelo ajustado	$R^2$ (%)	$R^2_{adj}$ (%)
PT	$25,691 - 0,259*t + 0,0007*t^2$	96,43	89,99
FT	$17,198 - 0,133*t$	75,26	69,82
CT	$24,86 - 0,039*t$	86,67	72,84
AA	$142,013 - 1,664*t + 0,004*t^2$	96,82	91,12
DPPH	$124,809 - 0,306*t$	95,66	87,86

### 3.2 Optimización

Para mejorar el proceso de secado osmótico teniendo en cuenta todas las variables estudiadas, las respuestas combinadas se optimizaron numéricamente mediante la función de deseabilidad (Granato *et al.*, 2010; **Tabla 4**).

Los valores más altos de deseabilidad (0,83 - 0,95) correspondieron a tratamientos con tiempos de residencia 60 min, temperatura entre 20 y 40 °C y

concentraciones entre 20 y 60 °Bx (A1, A5, A6 y A14; **Tabla 4**).

**Tabla 4.** Valores predichos y observados para la función de deseabilidad durante los diferentes ensayos de DO en arazá

Ensayo	Deseabilidad	
	Predicha	Observada
A1	0,84	0,83
A2	0,40	0,39
A3	0,00	0,01
A4	0,38	0,41
A5	0,86	0,83
A6	0,84	0,84
A7	0,26	0,26
A8	0,38	0,25
A9	0,34	0,35
A10	0,06	0,08
A11	0,38	0,37
A12	0,32	0,18
A13	0,17	0,15
A14	<b>0,94</b>	<b>0,95</b>
A15	0,00	0,11

Los valores óptimos de las variables respuesta para una  $t = 60$  min,  $T = 34,16$  °C y  $C=20$  °Bx se mostraron en la **Tabla 5** para una deseabilidad 0,94.

**Tabla 5.** Valores óptimos de las variables respuesta de DO según la función de deseabilidad (0,94)

Variables	Valores óptimos
PT	26,73
FT	12,92
CT	63,55
AA	286,67
DPPH	77,00

La **Figura 3** muestra la dependencia de la función de deseabilidad con; (a) tiempo de residencia y concentración de la solución deshidratante a la temperatura óptima (34,16 °C); (b) tiempo de residencia y temperatura a C óptima (20°Bx).

- a) Concentración de sacarosa = 20 °Bx  
Temperatura = 34,16 °C

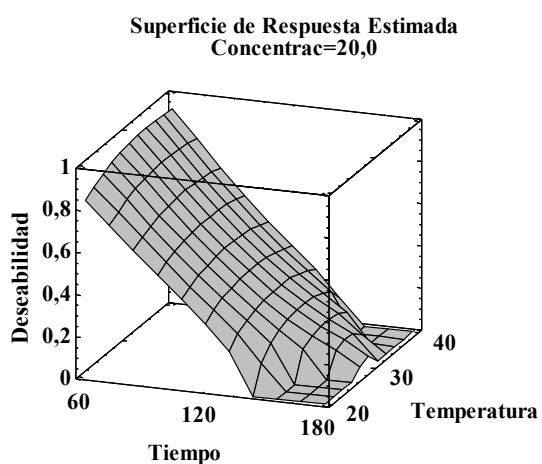
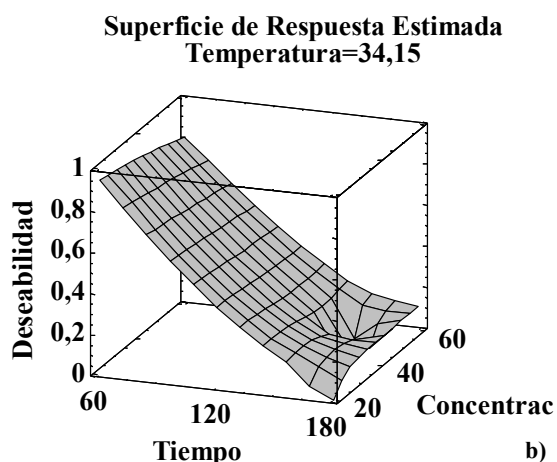


Figura 3. Relación entre la deseabilidad /t y a) C a 34,15 °C y b) T a 20 °Bx

#### 4. Conclusión

La influencia de las variables de proceso (t, T, C) en la concentración de los distintos bioactivos (PT, FT, CT, AA) y en la capacidad de secuestro del radical DPPH fue satisfactoriamente predicha mediante un modelo polinómico

Los resultados indicaron que la única variable de proceso que afectó significativamente y en forma negativa fue el tiempo de residencia. En el caso de PT y AA, este efecto se vio parcialmente compensado por su correspondiente término cuadrático.

Las condiciones de procesamiento óptimas obtenidas mediante la función de deseabilidad fueron:

Tiempo de inmersión = 60 min

#### 5. Referencias

AOAC. (2002). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 17th ed., William Horwitz Ed.; Gaithersburg.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). *Use of free radical method to evaluate antioxidant activity*. *Lebensm Wiss Technology*; 28:25-30.

Chang, C.; Yang, M.; Wen, H.; Chern, J. (2002). *Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 176-182.

Ciurzyńska, A.; Kowalska, H.; Czajkowska, K.; Lenart, A. (2016). *Osmotic dehydration in production of sustainable and healthy food*. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 186-192.

Granato, D.; Ribeiro, J.C.B.; Castro, I.A.; Masson, M.L. (2010). *Sensory evaluation and physicochemical optimization of soy-based desserts using response surface methodology*. *Food Chemistry*, 121(3), 899-906.

Novakova, L.; Solich, P.; Solichova, D. (2008). *HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids*. *Analytical Chemistry*, 27(10):942-58.

Ordoñez-Santos, L.E.; Aguilar, P.H.; Solarte, O.D.R.; Jaramillo, M.E.A. (2014). *Concentración de carotenoides totales en residuos de frutas tropicales*. *Producción+ limpia*, 9(1).

Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goñi, I. (2007). *Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet*. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.

Schlesier, K.; Harwat, M.; Bohm, V.; Bitsch, R. (2002). *Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods*. *Free Radical Research*, 36:177-87.