

ARTÍCULO ORIGINAL

Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica**Antioxidant and antibacterial activities of six fruits peels from Pica oasis**

Julio Benites Vélchez^{1,2}, Rodrigo Díaz García¹, José López Vivar^{1,2}, Sandra Gajardo Solari^{1,2}, Francisca Kusch Fuschlocher^{1,2}, Mauricio Rojas Arredondo¹

¹Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad Arturo Prat. Iquique, Chile

²Instituto de Etnofarmacología (IDE). Universidad Arturo Prat. Iquique, Chile

Dirección para correspondencia: Julio Benites Vélchez. Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad Arturo Prat. Av. Arturo Prat 2120. Iquique, Chile. Tel.0056-057-394275.
E mail: julio.benites@unap.cl

Recibido para publicación en 11/08/11

Aceptado en 3/06/11

RESUMEN

Se estudiaron seis cáscaras de frutos del oasis de Pica: *Citrus reticulata* x *Citrus paradise*, *Mangifera indica*, *Citrus sinensis*, *Psidium guajava*, *Citrus grandis* and *Citrus aurantifolia*. Las infusiones preparadas fueron comparadas en cuanto al contenido de polifenoles por el método de Folin Ciocalteu y a sus propiedades atraparoras de radicales, mediante dos métodos diferentes (hemólisis inducida por AAPH y DPPH). Al correlacionar el contenido polifenólico con la capacidad antioxidante se encontró una asociación positiva para todos los frutos en estudio. Los extractos mostraron un efecto protector del daño oxidativo sobre eritrocitos humanos superior al té verde ($p < 0.01$). Además, a los extractos se le ha probado la actividad antimicrobiana mediante la difusión de papel del disco y el método de dilución en caldo, exhibiendo la inhibición moderada de bacterias patógenas humanas.

Palabras Clave: Frutas cítricas, *Mangifera indica*, *Psidium guajava*, actividades antioxidante y antibacteriana.

ABSTRACT

Six fruits peels of Pica oasis were studied: *Citrus reticulata* x *Citrus paradise*, *Mangifera indica*, *Citrus sinensis*, *Psidium guajava*, *Citrus grandis* and *Citrus aurantifolia*. Infusions were compared in terms antioxidant capacity with Folin-Ciocalteu method and free radical scavenger properties, using two different methods (AAPH and DPPH-induced haemolysis). Upon correlating the polyphenolic contents with the

antioxidant capacity a positive association for all fruits was found. All extracts showed a protective effect against oxidative damage on human erythrocytes greater than that of green tea ($p < 0.01$). Furthermore, the extracts were tested for its antimicrobial activity using paper disc diffusion and the dilution broth method, exhibiting moderate inhibition of human pathogenic bacteria.

Key Words: Citrus fruit, *Mangifera indica*, *Psidium guajava*, antioxidant and antibacterial, activities.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales como remedios naturales para prevenir y curar varios tipos de patologías difieren de comunidad en comunidad.¹ El propósito de la ciencia en la búsqueda de compuestos con actividad antioxidante y nuevos antibióticos depende del conocimiento de estas plantas medicinales y sus extractos. Por muchos años, la medicina ha dependido de del uso exclusivo de hojas, flores y cortezas de las plantas; sólo recientemente se han generado estudios referentes al uso medicinal de los frutos y las cáscaras de estos.²

Según la OMS, una planta medicinal es “toda especie vegetal en la que todo o una parte, está dotada de actividad farmacológica que puedan ser usadas para propósitos terapéuticos o como precursores para síntesis de drogas”. Hasta la actualidad cerca del 30 % o más de las drogas farmacológicas modernas son derivadas directamente o indirectamente de plantas. El valor comercial de varias drogas y derivados farmacéuticos de

bosques tropicales en el mundo esta proyectado en 20 billones de dólares al año.¹

Las enfermedades infecciosas continúan siendo el objetivo mayor para las instituciones de salud, compañías farmacéuticas y gobiernos de todo el mundo (cerca de 50000 muertes cada día), especialmente con el creciente incremento de resistencia por parte de bacterias patógenas.

Por otro lado, la ingesta de frutas y vegetales esta asociado con bajas incidencias de enfermedades degenerativas.³ Estos efectos protectores están asociados a los compuestos antioxidantes que contienen los alimentos, frutas de climas tropicales y sub- tropicales. Hay muchos estudios sobre la acción de compuestos fenólicos en alimentos que previenen el cáncer y enfermedades cardiacas.⁴ Estos compuestos son preferentemente oxidados en el medio biológico y funcionan como nutrientes antioxidantes, protegiendo al organismo contra el estrés oxidativo.

El oasis de Pica esta situado en pleno desierto de Atacama, en donde las plantas y frutos se caracterizan por estar expuestos a altos índices de radiación y temperatura, que los hacen poseedores de mecanismos antioxidantes muy desarrollados como medida protectora frente a su medio ambiente. Existen factores abióticos y bióticos que generan situaciones de estrés en las plantas, como la falta de agua, la exposición a la

radiación solar o el ataque de herbívoros. En cada una de estas situaciones ambientales existe un comportamiento metabólico diferente que condiciona la producción y la variabilidad de los metabolitos secundarios. Dentro de estos metabolitos, los compuestos polifenólicos juegan un rol preponderante en prácticamente todas las interacciones de la planta con su entorno. Es así que individuos de una misma especie que crecen en diferentes medios tienen variaciones en la síntesis de sus compuestos fenólicos. Por lo tanto, la producción de polifenoles está afectada por los incrementos de temperatura, las radiaciones UV-B y la falta de agua.⁵ El objetivo de este trabajo es determinar la actividad antioxidante y antibacteriana de frutos del oasis de Pica para su posterior incursión en la industria alimentaria y la posibilidad de desarrollar nuevos fitofármacos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de las frutas. Las frutas: Tángelo (híbrido ínter específico de *Citrus reticulata* con *Citrus paradise*) Mango (*Mangifera indica*), Naranja (*Citrus sinensis*), Guayaba (*Psidium guajava*), Pomelo (*Citrus grandis*) y Limón (*Citrus aurantifolia*) fueron colectadas a 114 kilómetros al interior de Iquique, en el oasis de Pica.

Tabla 1. Resumen de las 5 plantas analizadas cultivadas en el oasis de Pica

Familia	Nombre Científico	Nombre común
Rutaceae	<i>Citrus reticulata x Citrus paradise</i>	Tángelo
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	Naranja
Rutaceae	<i>Citrus aurantifolia</i>	Limón
Rutaceae	<i>Citrus grandis</i>	Pomelo
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i>	Mango
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Guayaba

Liofilización. Las frutas frescas, se pelaron y las cáscaras se congelaron por 2 días, a una temperatura que oscila entre 0 y 4° C. Se llevaron a un liofilizador marca Virtis Benchtop K., mediante ciclos de congelación- evaporación, eliminándose la totalidad del agua libre contenida en el producto original. El liofilizado fue guardado en frascos ámbar hasta su uso.

Obtención de los extractos acuosos. Las cáscaras de los frutos en estudio, fueron molidas en un mortero, y se pesaron en una balanza analítica marca Sartorius modelo MC210S, 2 g de cáscaras frescas y liofilizadas por separado en un vaso precipitado. Se le agregó 200 mL de agua hervida calentado en un baño termostático marca Fisatom modelo 102, dejándola reposar por 3 minutos. Se filtró en caliente, obteniéndose soluciones al

1% que se almacenaron a temperatura de 0 a 4° C en frascos ámbar hasta su uso.

Determinación de la actividad atrapadora de radicales libres. Se utilizaron soluciones metanólicas de DPPH marca SIGMA, a una concentración de 20mg/L de extractos acuosos de cáscaras frescas y de cáscaras liofilizadas al 1%. Como control se utilizó una infusión de Té verde 1%. (2 g disueltos en 200 mL de agua).

Una vez preparadas las soluciones se agitaron en un vortex MIXTER modelo VM 300, se dejaron incubar por 30 minutos en un baño termostático marca Fisatom modelo 102, con agitación, y posteriormente, se realizó la lectura de las absorbancias a 517 nm en un espectrofotómetro Genesys-2 modelo ThermoSpectronic. El ensayo se realizó por quintuplicado.

Determinación de polifenoles totales. Se prepararon soluciones de ácido gálico marca Riedel-de Haën, a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 250 y 500 ppm, agregando 0, 1, 2, 3, 5 y 10 mL de la solución patrón a un matraz, y aforándose a 100 mL con agua destilada. Una vez preparadas las soluciones se agitaron en un vortex MIXTER modelo VM 300 y se dejaron a 20° C durante 1 hora. Se determinó la absorbancia de cada solución a 760 nm contra el blanco en un espectrofotómetro Genesys-2 modelo ThermoSpectronic.

Obtención de los glóbulos rojos. Se extrajeron 5 mL de sangre humana de voluntarios sanos, no fumadores, mediante punción venosa braquial tomada en ayunas. Se agregó 7 mL de NaCl al 0,9% y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga EBA-20 Hettich. Se separó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se lavó 3 veces con solución salina (NaCl 0,9%). Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos entre lavados.

Preparación de PBS pH 7,4. En un vaso precipitado de 1 L se agregó 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,15 g de Na₂HPO₄*12 H₂O, 0,2 g de K₂HPO₄ y 1,8 g de Glucosa. Se adicionó 900 mL de agua destilada y se agitó hasta total disolución. Se enrasó en 1000 mL en un matraz de aforo, ajustándose el pH con un pH-metro WTN pH 3301/set con HCl 0,1N o NaOH 0,1N (dependiendo del pH obtenido en la lectura). Se conservó a 4°C durante una semana. Cada vez que se utilizó, se debió ajustar el pH.

Preparación de la solución madre de Glóbulos Rojos. Se tomaron 1000 µL de los glóbulos rojos previamente lavados y se aforó a 250 mL con una solución tampón PBS (pH 7,4) en un matraz de aforo.

Viabilidad celular frente a los extractos. En tubos de ensayo se agregaron 750 µL de una solución de glóbulos rojos, se les adicionó 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 y 600 µL de extracto acuoso de cáscaras frescas y liofilizadas al 1 % p/v, y luego se completó con PBS. Una vez preparadas las soluciones se agitaron en un vortex MIXTER modelo VM 300 y se dejaron a 37° C en un baño termo-regulado Julabo SW 22 con agitación constante a 100 rpm por 3 horas. Se determinó la absorbancia de cada solución a 540 nm en un equipo Genesys-2 modelo ThermoSpectronic. El ensayo se realizó por quintuplicado.

Determinación de la actividad antihemolítica. Se tomaron 450 µL de una solución de 500 mM de AAPH. Esta solución se preparó, pesando 5 g de AAPH [2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride] Sigma Chemical Co., en balanza analítica Sartorius modelo MC210S y se agregó PBS a un matraz de aforo de 25 mL. El blanco para esta determinación y para el resto de las mediciones fueron llevadas a cabo con la hemólisis basal. Una vez preparadas las soluciones se agitaron en un vortex MIXTER modelo VM 300 y se

dejaron a 37° C en un baño termo-regulado Julabo SW 22 con agitación constante a 200 rpm por 3 horas. Se determinó la absorbancia de cada solución a 540 nm en un equipo Genesys-2 modelo ThermoSpectronic.

Determinación de la actividad antibacteriana. Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales, las cepas fueron sembradas previamente en agar Tripticasa de Soya Merck, (24 horas antes). Luego se picaron de 3 a 5 colonias y se inocularon en tubos conteniendo 3 mL de caldo Tripticasa de Soya Merck, incubándose en estufa de cultivo Memmert modelo 600 D06062 por 2 horas. La densidad bacteriana fue ajustada aproximadamente a 1.5×10^8 bacteria/mL usando el tubo N° 1 de la escala de MacFarland (0,5).

Usando un hisopo estéril se inocularon las placas de agar Muller-Hinton Merck con cada cepa evaluada. Simultáneamente se prepararon discos estériles a los cuales se les adicionó de 100 - 400 µL de los extractos vegetales y el mismo volumen del solvente de extracción (blanco testigo). Una vez preparados los discos, se dejaron reposar por aproximadamente 5 minutos para permitir la evaporación del solvente de extracción. Todas las pruebas se hicieron por duplicado. Después, utilizando pinzas estériles se colocaron los discos en la superficie de la placa con el suficiente espacio entre los discos para que los halos de inhibición no se superpongan y permitan una adecuada medición. Las placas fueron incubadas a 37° C por 24 horas estufa de cultivo Memmert modelo 600 D06062. Luego se determinó la formación de halos de inhibición. El diámetro de cada halo de inhibición se midió usando una regla milimetrada (+/- 0,5 mm). Las cepas bacterianas utilizadas en este ensayo fueron *Staphilococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium*.

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados usando el software estadístico GraphPad INSTAT® versión 4.0 y presentados como medias \pm error estándar medio (S.E.M.) Se realizó análisis de varianza de una entrada (ANOVA) seguido del test de Bonferroni, en el cual $p < 0.05$ es significativo.

(***) = $P < 0.001$, (**) = $P < 0.01$, (*) = $P < 0.05$

RESULTADOS

Parte de nuestra investigación se centra en la evaluación del uso popular de las plantas medicinales que crecen en el altiplano chileno, el estudio de la composición química de los aceites esenciales y el análisis antimicrobiano de varias plantas que crece Chile y Perú.⁶⁻⁸

Este trabajo se reporta en el potencial uso de cáscaras de frutas del oasis de Pica con alta capacidad antioxidante y antimicrobiana como ingredientes en la industria alimentara y farmacéutica (fitofármacos).

La capacidad atrapadora de radicales libres. El ensayo de la capacidad atrapadora de radicales libres fue realizada de acuerdo al método desarrollado por Bonoli *et al.*, pero con pequeñas modificaciones.⁹ El ensayo de DPPH, nos mostro, que los extractos acuosos de cáscaras frescas al 1% p/v de las seis frutas que crecen en el oasis de Pica poseen un efecto similar al té verde ($p > 0,05$), exceptuando la cáscara de limón, que es significativamente menor que el control ($p < 0,01$). (Figura 1)

En la figura 2, los extractos acuosos de cáscaras liofilizadas al 1% p/v, presentaron una actividad mayor que el té verde, control ($p < 0,01$), excepto la cáscara de liofilizada de guayaba que presento una actividad similar

al control ($p > 0,05$). Estos resultados se deben a la presencia de polifenoles, especialmente flavonoides que juegan un rol importante en la fotoprotección de los frutos debido a la alta exposición a la luz solar. Se han reportado la presencia de Tangerina, Nobeltina, Quercetina y Hesperidina en las especies del genero Citrus.^{10,11} La potente actividad que presentó, tanto la cáscara fresca como liofilizada de Mangifera indica es el reflejo de las constituyentes de las piel de este fruto que presenta β -caroteno, esterres de ácido gálico, ácido ascórbico junto a flavonoides como la Mangiferina.³

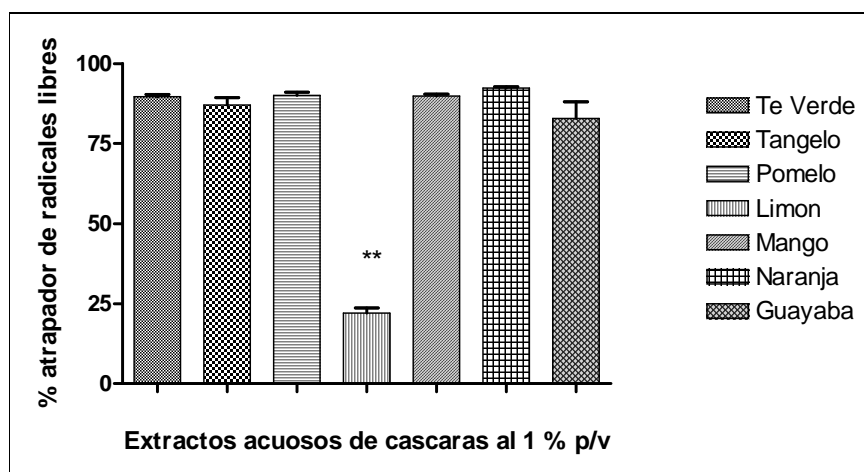


Figura 1. Determinación de la capacidad atrapadora de radicales libres de extractos acuosos de cáscaras frescas de frutos del oasis de Pica

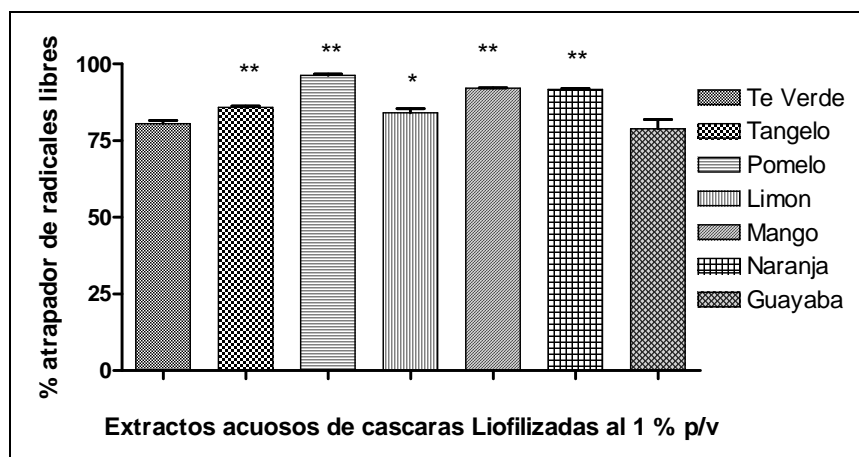


Figura 2. Determinación de la capacidad atrapadora de radicales libres de extractos acuosos de cáscaras liofilizadas de frutos del oasis de Pica

Determinación de Polifenoles. El contenido total de polifenoles en cáscaras frescas y liofilizadas del oasis de Pica fueron evaluados con el reactivo Folin-Ciocalteu según el método de Singleton y Rossi (1965), con ácido gálico como estándar.¹² El contenido de fenoles totales de los cáscaras estudiadas se observa en la Tabla 2. Se realizó una comparación entre la concentración de polifenoles en cáscaras frescas y liofilizadas de frutos

del oasis de Pica, observándose que los extractos acuosos de cáscaras liofilizadas tienen valores similares al control (hojas de té verde), excepto el liofilizado de cáscara de mango que presenta una concentración de polifenoles significativamente mayor que el control. Los extractos acuosos de cáscaras frescas presentaron una concentración menor al control (hojas de té verde).

Tabla 2. Determinación de la concentración de polifenoles en cáscaras frescas y liofilizadas del oasis de Pica

Extracto acuoso al 1%	* TEAG(cáscaras frescas)	* TEAG (cáscaras liofilizadas)
Té verde	---	1054 ± 36,2
Mango	732,6 ± 23,9	3968,2 ± 217
Pomelo	645,9 ± 31,5	830,2 ± 31,8
Guayaba	600,5 ± 41,9	911,7 ± 30,9
Naranja	307,4 ± 27,9	988,9 ± 32,7
Tangelo	206,6 ± 16,5	1103,8 ± 1,9
Limón	79,80 ± 13,7	886,5 ± 25,1

*TEAG= Equivalente de Ácido Gálico mg/100 mL

DISCUSIÓN

Actividad antihemolítica. Al liberarse el hierro desde la hemoglobina, este actúa como pro-oxidante. Además juega un rol importante como agente catalítico redox (reacción de Fenton y de Haber-Weiss). La liberación del hierro desde los hematíes pueden aumentar el efecto pro-oxidante de hidropéroxidos provenientes de la reacción del oxígeno y el AAPH. La peroxidación lipídica mediada por radicales libres es una de las causas más importantes en la destrucción y daño en las membranas, debido a que los ácidos poli-insaturados de la membrana celular son degradados a través de este proceso oxidativo con el consecuente rompimiento de la integridad de la membrana.^{2,14}

Las concentraciones utilizadas en el ensayo de la actividad antihemolítica fueron en base la determinación de la viabilidad de los extractos frente a los eritrocitos humanos. Se determinó que a las concentraciones superiores 0,2 % p/v, producían un porcentaje de hemólisis cercano al 40 % en todas los extractos y liofilizados (no se muestra los resultados de actividad hemolítica de los extractos). En base a estos datos se decidió usar un rango de concentración desde 0,067-0,116 % p/v para evaluar la actividad antihemolítica de los extractos frente al generador de radicales peróxido AAPH usando como modelo glóbulos rojos humanos.

Con la utilización de los extractos acuosos de cáscaras frescas y liofilizadas, se obtuvieron buenos resultados como inhibidores de la hemólisis inducida por el AAPH (Figura 3 y 4). El extracto acuoso de cáscara fresca y liofilizada de *Mangifera indica* fue el que presentó mayor actividad inhibitoria de la hemólisis de eritrocitos en todas las concentraciones testeadas ($p < 0,001$). El extracto acuoso de cáscaras frescas y liofilizadas de *Citrus grandis* presentó una actividad similar al control té verde ($p > 0,05$). En cuanto a los demás extractos acuosos de cáscaras frescas y liofilizadas, éstos presentaron una actividad inhibitoria de la hemólisis dosis dependiente, pero las cáscaras liofilizadas presentaron menor actividad que los extractos acuosos frescos. Este fenómeno es explicado por el aumento en la concentraciones de los metabolitos secundarios presentes en las cáscaras que una vez liofilizados disminuye el agua y aumentan su disponibilidad, lo que generaría una actividad pro-oxidante tanto de los polifenoles, vitamina C y posible presencia de metales de transición (Fe^{2+} , Cu^{+} , Zn^{2+}) los que en presencia de radicales peróxido inducido por el AAPH aumentarían el daño oxidativo por generación de radicales OH^* , debido a la mayor disponibilidad de los cationes de los metales trazas presentes en la cáscaras.

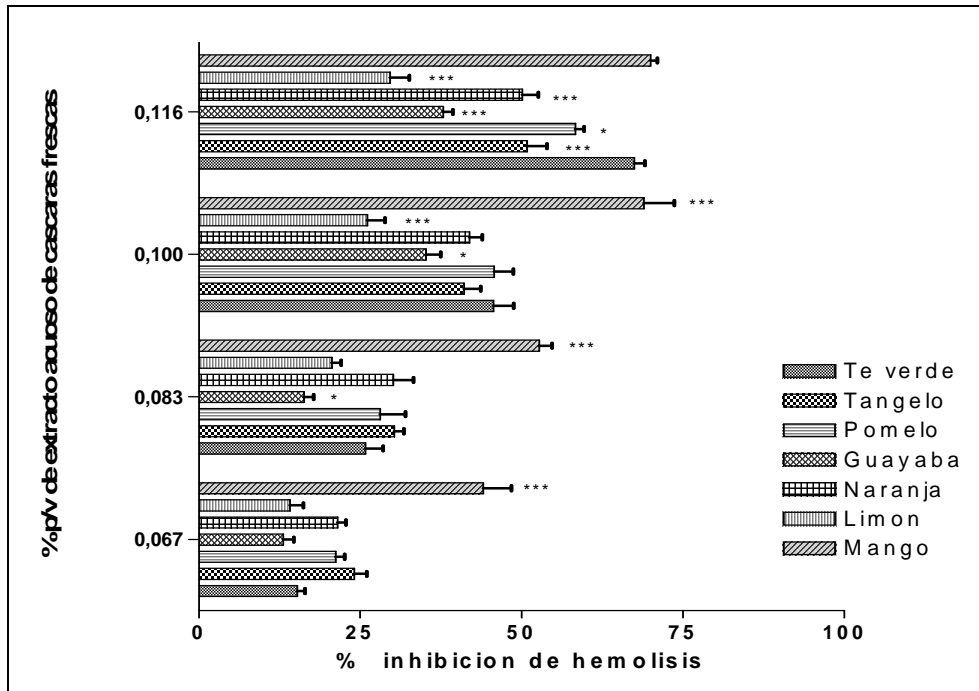


Figura 3. Determinación de la inhibición de la hemólisis en RBC inducida por AAPH por extractos acuosos de cáscaras frescas de frutos del oasis de Pica

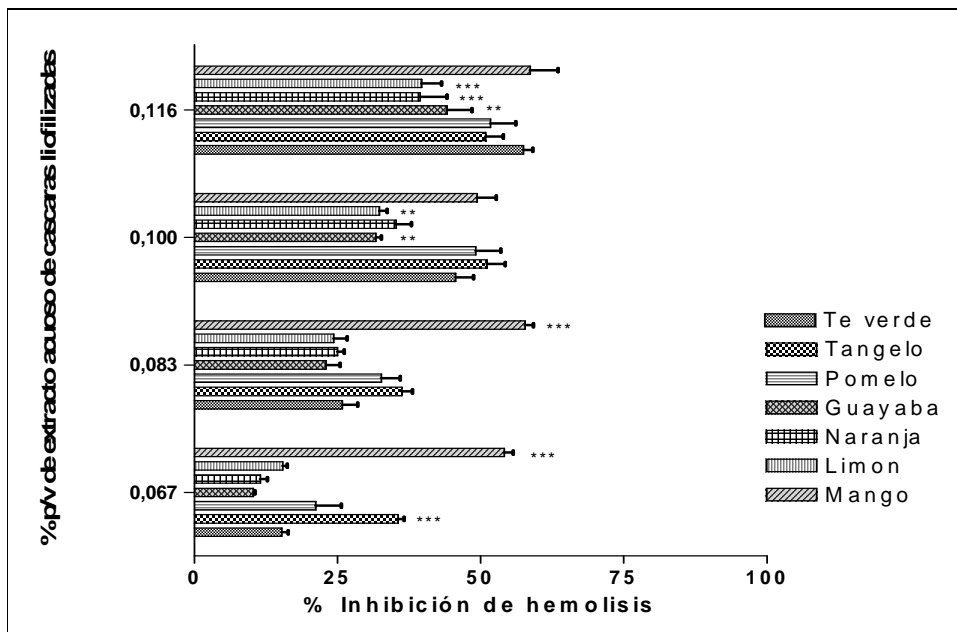


Figura 4. Determinación de la inhibición de la hemólisis en RBC inducida por AAPH por extractos acuosos de cáscaras liofilizadas de frutos del oasis de Pica

Actividad antibacteriana. Los extractos de las cáscaras de las frutas tangelo, mango, naranja, guayaba, pomelo y limón fueron evaluados para determinar la actividad

antibacteriana frente a dos cepas Gram negativas y dos cepas Gram positivas. Los extractos de mango y guayaba presentaron actividad a la concentración de 35

mg de extracto puro frente a *E. coli* ATCC 25922 con un halo de inhibición de $14 \pm 0,6$ mm y $10 \pm 0,3$ mm respectivamente. Frente a *Enterococcus faecalis* tanto el extracto de cáscara de mango y guayaba presentaron actividad con un halo de inhibición de 10 mm a la concentración de 35 mg. Frente a *S. aureus* ATCC 25923 sólo el extracto de *M. indica* presentó actividad antibacteriana con un halo de inhibición de $13 \pm 0,5$ mm a la concentración de 700 µg.

Los altos contenidos de polifenoles, en especial los del tipo esqueleto C₆-C₃-C₆ (Flavonoides, flavonas, isoflavonas) serían los responsables de la actividad antibacteriana encontrada en estos ensayos. Los polifenoles representan uno de los componentes abundantes en las cáscaras de las especies vegetales mencionadas; estos compuestos tienen funciones de defensa en la planta, como agentes antimicrobianos, protección contra herbívoros, radiación UV y son potencialmente importantes en las especies que se encuentran en ambientes desérticos, siendo estas metabolitos los responsables de la actividad antibacteriana, atrapadora de radicales, actividad antihemolítica, lo que se corrobora con la presencia de altas concentraciones de polifenoles cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu.^{10,14-16}

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Arturo Prat por el apoyo brindado.

REFERENCIAS

1. Sharif MDM, Banik G R. Status and Utilization of Medicinal Plants in Rangamati of Bangladesh. *Res J Agric Biol Sci* 2006; 2(6): 268-273.
2. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah B D. Antioxidant activity and total polyphenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem*. 1998; 46: 4113-4117.
3. Ajila CM, Prasada Rao UJS. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 303 – 309.
4. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Revista Atenea de la Universidad de Concepción – Chile*. 2006; 494: 161 – 172.
5. Foyer CH, Mullineux PM. Causes of photooxidative stress and amelioration of defenses systems in plants. BocaRaton. CRC Press Inc. 1994.
6. Rojo L, Benites J, Rodrigues A, Venancio F, Ramalho L, Teixeira A, Feio S, Costa M C. Composition and Antimicrobial Screening of the Essential Oil of *Acantholippia deserticola* (Phil.ex F. Phil.) Moldenke. *J Essent Oil Res*. 2006; 18: 695-697.
7. Benites J, Moiteiro C, Miguel G, Rojo L, López J, Venâncio F, Ramalho L, Feio S, Dandlen S, Casanova H, Torres I. Composition and Biological Activity of the Essential Oil of Peruvian *Lantana camara*. *J Chil Chem Soc*. 2009; 54: 379-384.
8. Benites J, López J, Rojo L, Diaz P, Rojas M, Venâncio F, Moiteiro C. Chemical Composition of the Essential Oil of the Leaves and Steams of *Xenophyllum poposum*. *Chem Nat Compd*. 2011; 46: 838-839.
9. Bonoli M, Verardo V, Marcioli E, Caboni M. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J Agr Food Chem*. 2004; 52: 5195-5200.
10. Ma Y, Ye X, Hao Y, Xu G, Liu D. Ultrasound-assisted extraction of Hesperidin from peggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry* 2008; 15: 227 -232.
11. Ortuño A, Báidez A, Gómez P, Arcas M C, Porras I, García-Lidón A, Del Río J A. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*. 2006; 98: 351 – 358.
12. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*. 1965; 16(3):144-158.
13. Wang SY, Ballington J R. Free radical scavenging capacity and antioxidant enzyme activity in deerberry (*Vaccinium stamineum* L.). *LWT-Food Sci Technol*. 2007; 73: 1352-1361.
14. Ahn J, Kim Y, Seo E, Choi Y, Kim H. Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated nigh oleic sunflower oil. *J Food Engineering*. 2007; 84: 327 - 334.
15. Cuadra P and Harborne J B. Changes in epicuticular flavonoids and photosynthetic pigments as a plant response to UV-B-radiation. *Z Naturforsch*. 1996; 51c: 671-680.
16. Lachman J, Pronek D, Hejtmánková A, Dudjak J, Pivec V, Faitová K. Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Am Soc Hort Sci*. 2003; 30: 142 – 147.