

# DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONÓIDICOS DE CUATRO ESPECIES VEGETALES DE LA REGIÓN ANDINA DE BOLIVIA

Felipe Chuquimia<sup>1</sup>, J Antonio Alvarado<sup>1\*</sup>, J Mauricio Peñarrieta<sup>1,2,3</sup>, Björn Bergenståhl<sup>3</sup>, Björn Åkesson<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia, <sup>2</sup>Biomedical Nutrition, Pure and Applied Biochemistry, Lund University, Lund, Sweden, <sup>3</sup>Food Technology, Lund University, Lund, Sweden.

**Key Words:** Antioxidant capacity, food andean species, Bolivia

## ABSTRACT

In the present work the measurement of the antioxidant capacity and the quantification of flavonoids and phenolic compounds are carried out in four vegetable species of the Andean region of Bolivia with the purpose of reevaluating our ancestral foods and in this way, in a future to be able to take advantage of its nutritious and biological properties. The selected plants are used as foodstuff, in particular in times of famine. The selected plants are: the rhizome of Chijura (*Stangea rhizantha*); the root of the cactus Achacana (*Neowerdermannia vorwerckii*) and the white basal leaves in form of rose of Siki (*Hipochoeris meyeniana* var. *brachylepis*) and Amañoke (*Ombrophytum subterraneum Asplund*), a parasite eatable plant that grows on roots of *Lepidophyllum quadrangulare*. The Total Antioxidant Capacity TAC was determined by two methods ABTS (2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfonic acid) and FRAP (Ferric Reduction Ability of Plasma). The Total Poliphenols were determined by the method of Folin-Ciocalteu and the Total Flavonoids were determined as catechin equivalents. The higher values of antioxidant activity were observed in amañoke. / *En el presente trabajo se realizó la determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoidicos de cuatro especies vegetales de la región andina de Bolivia con el fin de revalorizar algunos de nuestros alimentos ancestrales y, de esta manera, en un futuro poder aprovechar sus propiedades alimenticias y biológicas. Las plantas seleccionadas son utilizadas en la alimentación humana de la región, en particular en épocas de escasez. Las plantas son: Chijura (Stangea rhizantha), un rizoma comestible; Achacana (Neowerdermannia vorwerckii), una cactácea andina, cuya raíz se utiliza como alimento; Siki (Hipochoeris meyeniana var. brachylepis), planta con hojas basales en forma de roseta, cuyas bases blancas son comestibles; Amañoke (Ombrophytum subterraneum Asplund), una balanoforácea comestible parásita de las raíces de Lepidophyllum quadrangulare. La Capacidad Antioxidante Total TAC fue determinada por los métodos ABTS (2,2' Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-acido sulfonico) y FRAP (poder antioxidante de reducción férrica). Los Polifenoles Totales fueron determinados por el método de Folin-Ciocalteu y los Flavonoides Totales fueron determinados como equivalente de catequina. Los valores mas altos de actividad antioxidante encontrados corresponden al amañoke.*

Corresponding author: [jaalvki@gmail.com](mailto:jaalvki@gmail.com)

## INTRODUCCIÓN

Desde que los seres humanos llegaron a América, especialmente a la región andina, se encontraron con ecosistemas diversos y complejos en los cuales tuvieron que adaptarse para sobrevivir en las condiciones existentes. El camino a seguir fue utilizar las especies vegetales y animales y desarrollar los medios de la producción de alimentos. En el proceso de utilización de los recursos genéticos, los seres humanos fueron domesticando diferentes plantas y animales. La gran variación ecológica de los Andes les proveyó suficiente material para seleccionar granos, raíces, frutas, hortalizas y tubérculos adaptados desde la costa, hasta alturas sobre los 4000 msnm. La población trató de asegurarse alimentos para los periodos de escasez utilizando productos silvestres<sup>1</sup>. Entre los alimentos a los que los habitantes de la puna recurrieron en estas épocas de carestía estuvieron las especies que investigamos en el presente estudio.

El presente trabajo pretende despejar el potencial de algunas raíces andinas silvestres, como ser; *Neowerdermannia vorwerckii*, *Ombrophytum subterraneum*, *Hipochoeris meyeniana var.brachylepis* y *Stangea rhizantha* aportando nuevos datos relacionados con la capacidad antioxidante, los fenoles y flavonoides totales de estas cuatro especies.

**ACHACANA, ASPECTOS GENERALES** Nombre Botánico: *Neowerdermannia vorwerckii*; Familia: Cactáceae; Nombre común: Achacana



Fig. 1 Ejemplares de achacana

La achacana es una cactácea que es consumida por el campesino de las regiones de altura de los Andes. Es una especie silvestre que no es cultivada, sino crece en áreas donde la agricultura es difícil por el clima, la falta de agua y por las condiciones topográficas adversas<sup>6</sup>. El nombre de “Achacana” corresponde a la cactácea, *Neowerdermannia vorwerckii*, la cual presenta como característica tallos aéreos esferoidales y aplastados, que en las estaciones secas se presentan enterrados quedando apenas perceptibles, mientras que en primavera y verano sobresalen hasta una altura de 6 cm<sup>6</sup>. Se dispone de pocos trabajos de investigación que nos proporcionen la composición centesimal de ésta cactácea (Calderon et al, 1987).

**AMAÑOKE, ASPECTOS GENERALES** Nombre Botánico: *Ombrophytum subterraneum* Asplund sin; Familia: Balanophoraceae; Nombres comunes: amañote, ñoke, amaloque<sup>7</sup>.



Fig. 2 Ejemplares de amañoke

Es una balanoforácea subterránea que fue descrita por el botánico sueco Eric Asplund bajo el nombre de *Juelia subterránea* Asplund en un estudio realizado a partir de la visita de este botánico a la población de Corocoro (La Paz). Otra cita de esta planta fue dada por el botánico La Barre, el cuál rescató su nombre de “amañoke”. En la actualidad el nombre más generalizado en el Altiplano boliviano, es “ñoke” de posible origen aimara mientras que en el quechua actual de Cochabamba, se designa con el termino “amalloke”<sup>7</sup>. Esta planta es muy buscada por los médicos nativos, callawayas, que le asignan propiedades medicinales como remedio para afecciones cardiacas, pulmonares y estomacales. También es muy apreciada y comida cruda en las regiones andinas.

**CHIJURA, ASPECTOS GENERALES** Nombre Botánico: *Stangea rhizanth*; Familia: Valerianaceae; Nombres comunes: Chijura, condorallu<sup>10</sup>, chicuro<sup>11</sup>.



Fig. 4. Ejemplares de chijura

Se emplea en la alimentación humana: se pela y come el rizoma crudo o cocido. En febrero, el rizoma es más dulce y se prepara junto con papa “wayk’a”. En tiempos de escasez, el rizoma puede servir como sustituto de la papa<sup>10</sup>. Un estudio ha optimizado un método de obtención de oligofructanos a partir de la raíz de chijura (*Stangea rhizantha*).

**SIKI, ASPECTOS GENERALES** Nombre Botánico: *Hipochaeris meyeniana var. brachylepis*; Familia: Asteraceae; Nombres comunes: Siki, Ponqayo Siki, jake Siki<sup>10</sup>



Fig. 5 Ejemplares de siki

Es una planta geófito, se desarrolla en verano o con la llegada de las lluvias; cuando las hojas se comienzan a secar, aparecen las flores. Se emplea en la alimentación humana en la región andina central de Bolivia. Se comen las bases blancas de las hojas<sup>10</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TAC, Polifenoles totales y Flavonoides totales en las cuatro muestras

Método	Extracto	Amañoke	Achacana	Chijura	Siki
FRAP	*Buffer	53,26 ± 1,42	1,39 ± 0,08	1,19 ± 0,02	1,66 ± 0,06
	*Acetónico	6,92 ± 0,92	0,05 ± 0,001	0,22 ± 0,008	0,65 ± 0,002
ABTS	*Buffer	5,14 ± 0,28	0,39 ± 0,01	0,30 ± 0,03	1,23 ± 0,01
	*Acetónico	9,17 ± 0,75	0,09 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Fenoles Totales	*Buffer	6,03 ± 0,08	0,09 ± 0,007	0,14 ± 0,003	0,10 ± 0,001
	*Acetónico	1,08 ± 0,14	0,08 ± 0,006	0,07 ± 0,001	0,18 ± 0,001
Flavonoides Totales	*Buffer	23,02 ± 0,98	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,006
	*Acetónico	2,90 ± 0,32	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,23 ± 0,01

## Capacidad antioxidante total

Tabla 5.12 Comparación del TAC [ $\mu\text{mol/gmf}$ ] en diferentes especies

Muestras	ABTS			FRAP		
	Extracto buffer acetato	Extracto acetónico	Total	Extracto buffer acetato	Extracto acetónico	Total
Amañoke	5,14	9,17	14,31	53,26	6,92	60,18
Achacana	0,39	0,09	0,48	1,39	0,05	1,44
Chijura	0,3	0,07	0,37	1,19	0,22	1,41
Siki	1,23	0,23	1,46	1,66	0,65	2,31
Oca <sup>a)</sup>	1,38	1,65	3,03	0,74	0,83	1,57
Ullucu <sup>a)</sup>	0,34	0,04	0,38	0,37	0,06	0,43
Arracacha <sup>a)</sup>	0,4	0,05	0,45	0,45	0,02	0,47
papa <sup>a)</sup>	0,22	0,05	0,27	0,31	0,01	0,32
Espinaca <sup>b)</sup>	2	1,63	3,63	1,89	1,35	3,24

a) 21) Peñarrieta J. M., Alvarado J.A., Åkesson B. & Bergenståhl B. "Total Antioxidant Capacity in Andean food species from Bolivia" *Revista Boliviana de Química* 2005, 22, 89-93.

b) 23) Nilsson J., Pillai D., Önnings G., Persson C., Nilsson A. & Åkesson B. "Comparison of the ABTS and FRAP methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables." *Molecular Nutrition and Food Research*, 2005, 49, 239 – 246.

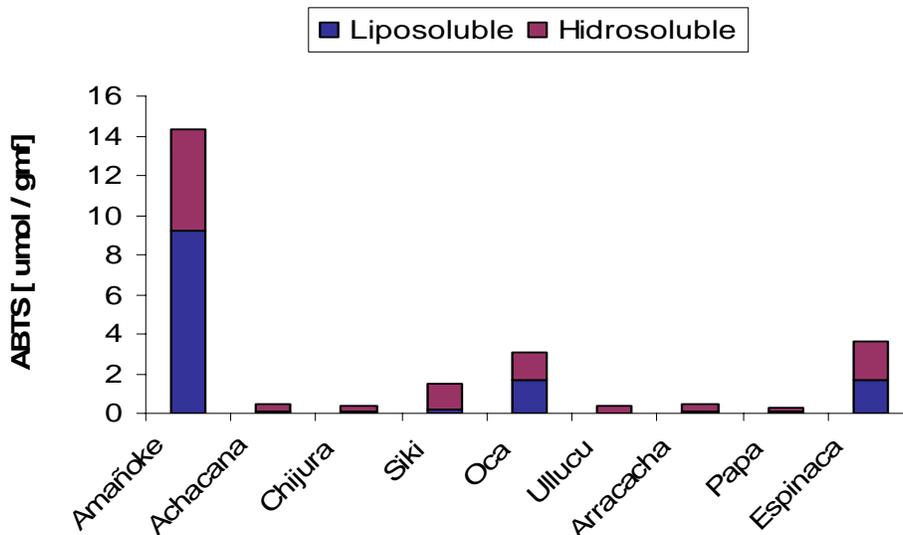


Fig. 5.14 Valores totales de ABTS y la contribución a ésta, de las fracciones hidrosolubles y liposolubles en diferentes especies.

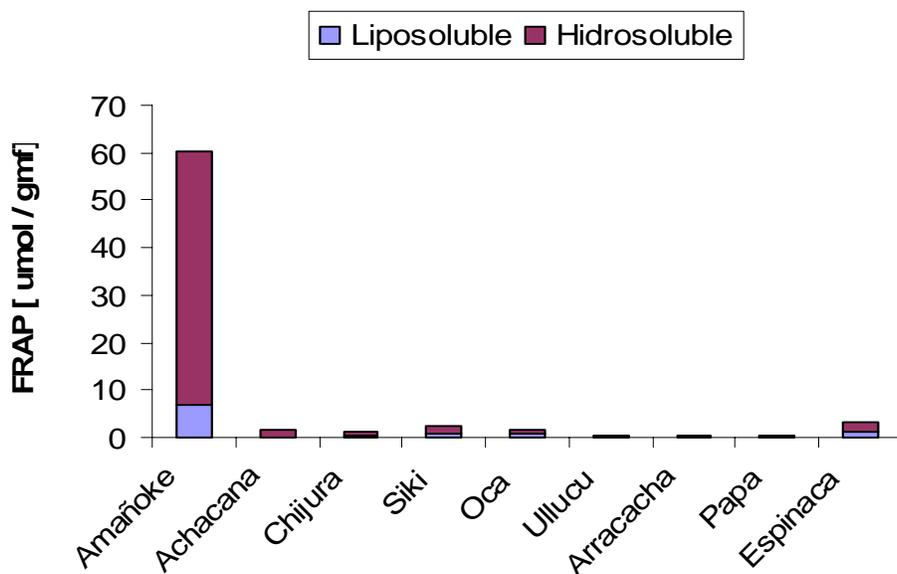


Fig. 5.15 Valores totales de FRAP y la contribución a ésta, de las fracciones hidrosolubles y liposolubles en diferentes especies.

Los resultados de la determinación de la capacidad antioxidante total en las muestras determinadas por los métodos FRAP y ABTS, en los extractos buffer acetato y extracto acetónico fueron variados. Los valores mas altos de TAC determinados por el método FRAP se observan en el amañoke en los extractos con buffer acetato y acetónico, 53.26 y 6.92  $\mu\text{mol trolox/ g}$  de muestra fresca respectivamente, como se muestra en la Tabla 5.11 mostrando ser considerablemente más altos que los valores de referencia. Los valores más bajos se determinaron en la chijura en los extractos buffer acetato y acetónico, 1.19 y 0.22  $\mu\text{mol trolox/ g}$  de muestra fresca respectivamente, mostrando ser de similar rango que la oca. Los valores más altos de TAC determinados por ABTS se observan en el amañoke en los extractos buffer acetato y acetónico, 5.14 y 9.17  $\mu\text{mol trolox/ g}$  de peso fresco respectivamente, mostrando ser considerablemente más altos que los valores de referencia.; mientras que los valores más bajos fueron determinados en la chijura 0.3  $\mu\text{mol trolox/ g}$  de muestra fresca en el extracto buffer acetato y 0.07  $\mu\text{mol trolox/ g}$  en el extracto acetónico de muestra fresca respectivamente, mostrando ser de similar rango que en el caso de la papa y del ullucu.

**Polifenoles Totales FT y Flavonoides Totales**

Tabla 5.13 Fenoles totales GAE [ $\mu\text{mol/gmf}$ ] y Flavonoides totales CE [ $\mu\text{mol/gmf}$ ] determinados en diferentes especies

Muestras	Fenoles totales	Flavonoides totales
Amañoke	7,11	25,92
Achacana	0,17	0,34
Chijura	0,21	0,32
Siki	0,28	0,45
Zanahoria <sup>a)</sup>	0,49	0,03
Papa <sup>a)</sup>	2,07	0,22
Lechuga <sup>a)</sup>	0,57	0,15
Coliflor <sup>a)</sup>	0,61	0,05
Espinaca <sup>a)</sup>	1,91	0,04

a) (24) Kyoung O. Kim D. Smith N. Schroeder D. "Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet" J. Sci. Food Agric. 85:1715-1724.

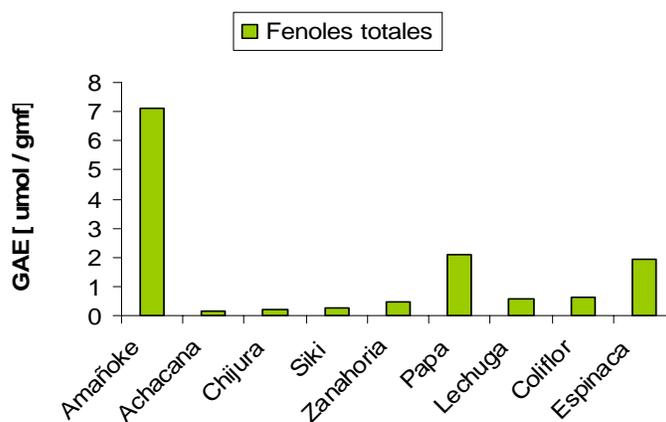


Fig. 5.16 Fenoles totales determinados en diferentes especies

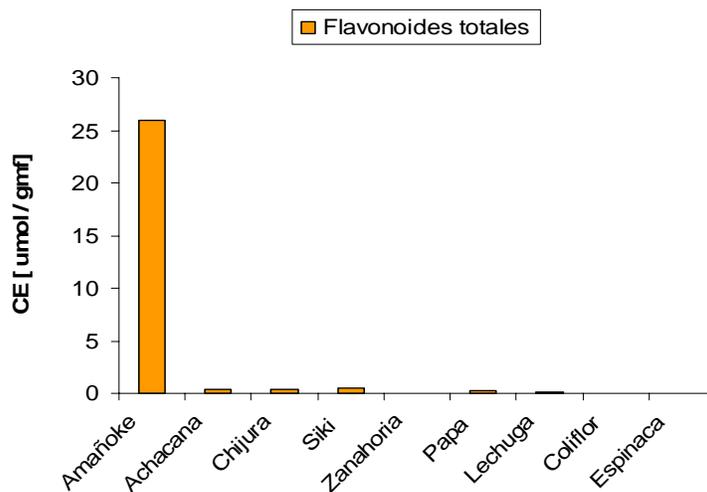


Fig. 5.17 Flavonoides totales determinados en diferentes especies.

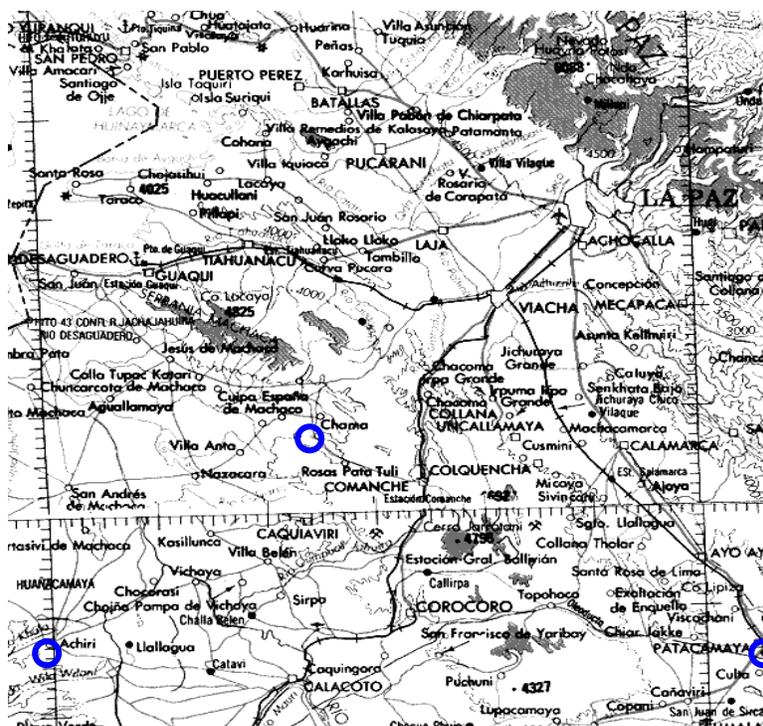
El contenido de Fenoles totales y flavonoides totales se expresó en  $\mu\text{mol}$  de los equivalentes de ácido gálico (GAE) y catequina (CE) por gramo de peso fresco, respectivamente. Los valores de FT más altos se observaron en el amañoke en ambos extractos con buffer acetato y acetónico, 6.03 y 1.08  $\mu\text{mol GAE/g}$  de peso fresco. Los valores más bajos de FT se observaron en la achacana, en el extracto buffer acetato, (0.09  $\mu\text{mol GAE/gmf}$ ) y en el extracto acetónico, (0.08  $\mu\text{mol GAE/gmf}$ ). El valor más alto evaluado por el método Flavonoides totales se observó en el amañoke en los extractos buffer acetato y acetónico, 23.02 y 2.9  $\mu\text{mol CE/g}$  de peso fresco. Los valores más bajos de

Flavonoides totales se observaron en la chijura en el extracto buffer acetato, (0.19  $\mu\text{mol CE/gmf}$ ) y en el extracto acetónico, (0.13  $\mu\text{mol CE/gmf}$ ). Este estudio muestra que el amañoke contiene una cantidad considerable de antioxidantes y compuestos polifenólicos, especialmente en contenido de flavonoides, en comparación con los valores de referencia, lo que confirma los estudios realizados en esta especie, sobre la presencia de la flavanona 5, 3', 4' - trihidroxi - 7  $\beta$ -glucosido<sup>12</sup>. Las especies chijura, achacana y siki presentan cantidades medias de antioxidantes y compuestos polifenólicos comparables con los valores de las especies de referencia.

## SECCION EXPERIMENTAL

### COLECTA DE MUESTRAS

Las especies *Hipchoeris meyeniana var.brachylepis* y *Neowerdermannia vorwerckii* fueron colectadas en la localidad Chama, provincia Ingavi del departamento de La Paz (Fig. 9) en Febrero y Marzo del 2007 respectivamente. La especie *Ombrophytum subterraneum* fue recolectada en la feria de la localidad de Patacamaya, provincia Aroma del departamento de La Paz (Fig. 9) en Abril del 2007. La especie *Stangea rhizantha* fue colectada en la localidad de Achiri, provincia Pacajes del departamento de La Paz (Fig. 9) en Febrero del 2007. Todos los viajes de colecta de muestras realizados, fueron financiados por el proyecto "Antioxidantes en Alimentos de Bolivia" ASDI/SAREC.



### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Para determinar la actividad antioxidante total (TAC) se utilizó el método de ABTS [ 2,2'-azinobis (ácido 3-etil-benzotiazolina-6- ácido sulfónico) ], y el método modificado FRAP (poder antioxidante de reducción férrica). Ambos son métodos espectrofotométricos, las lecturas de la absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer, modelo: Lamda 25 UV / VIS, Spectro meter a 25°C. El compuesto estándar que se utilizó fue el trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-ácido de tetrametilcroman-2-carboxílico) soluble en agua. Para la determinación del TAC se trabajó con los extractos acetónico y soluble en buffer acetato.

### MÉTODO ABTS

Según la metodología el radical ABTS<sup>•+</sup> se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,42 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) y en la oscuridad durante 16 h. Este reactivo se mantiene estable por 2 a 3 días si se guarda en la oscuridad. Una vez formado el radical ABTS<sup>•+</sup> se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm y 25°C. La absorbancia se

mide cada 30 s después de la adición de 1.0 ml de la solución ABTS<sup>+</sup> a 100 µl de muestra, homogenizada durante 30 s en forma continua durante 6 minutos. La disminución de la coloración es expresada como el porcentaje de inhibición de ABTS, la cual es comparada con una curva estándar del antioxidante sintético de referencia, trolox (20-200µmol/l). Los resultados se expresan como µmol de trolox equivalente por gramo de muestra fresca .

#### MÉTODO FRAP

El complejo amarillo de Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) fue reducido al complejo azul de Fe<sup>2+</sup>-TPTZ por el electrón que dona una sustancia, en medio ácido. Cualquier electrón donado por una sustancia con una alta reactividad y un bajo potencial redox, puede llevar a la formación del complejo azul Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> TPTZ. El reactivo FRAP es una mezcla de 0.1 mol/l de buffer acetato de sodio (pH 3.6), 10 mmol/l TPTZ y 20 mmol/l de cloruro férrico (10:1:1, v:v:v). Una vez mezcladas, 900 µl de la disolución FRAP y 90µl de agua y 30 µl de muestra, se midió la absorbancia inmediatamente después de la adición de la muestra cada 20 s durante 10 minutos a 593 nm a 25 °C. El blanco consiste en 120 µl de agua y 900 µl de reactivo. La absorbancia final de las muestras, fueron comparadas con una curva estándar de trolox (100-1000 µmol/l). Los resultados fueron expresados como µmol de trolox equivalente por gramo de muestra fresca <sup>21</sup>.

#### DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Para determinación de Polifenoles Totales se trabajó con los extractos acetónico y el de buffer acetato.

#### MÉTODO DE FOLIN & CIOCALTEAU

El método de Folin-Ciocalteu es utilizado para determinar los Polifenoles Totales utilizando el reactivo Folin - Ciocalteu (solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfowolfrámico) que oxida los compuestos polifenólicos a fenolatos en medio alcalino, formando un complejo de molibdeno - tungsteno de color azul.

Se mezcló 20µl de muestra, 1µL solución Folin & Ciocalteu (0,2 N) y 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g/l). La mezcla es homogenizada y calentada a 45 °C, se mide la absorbancia a 765 nm. La absorbancia final de cada muestra es comparada con una curva estándar de ácido gálico (40-200 mg/l). Los resultados fueron expresados como µmol equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra fresca <sup>22</sup>.

#### DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES.

Para determinar los Flavonoides Totales se trabajó con los extractos acetónicos y de buffer acetato obtenidos de las muestras estudiadas. El contenido de Flavonoides Totales se determinó de acuerdo al método descrito por Zhishen. Las muestras son mezcladas con AlCl<sub>3</sub> y NaNO<sub>2</sub>, formándose un complejo flavonoide- aluminio de color rosado en medio alcalino. La solución se obtiene a partir del 30 µl de NaNO<sub>3</sub> (10 %), 60 µl de AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (20%), 200 µl de NaOH (1M) y 400 µl de agua son agregados a 100 µl de cada muestra, las lecturas de absorbancia se realizaron a 510 nm, 5 minutos después de la adición de la muestra, cada 20 s durante 1 minuto. La absorbancia final de cada muestra fue comparada con una curva patrón de catequiza (69-689 µmol/l). Los resultados fueron expresados como µmol equivalente de catequina (CE) por gramo de muestra fresca <sup>22</sup>.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales al Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) U.M.S.A., así mismo a la Agencia Sueca para el desarrollo Internacional (ASDI/SAREC) por su colaboración.

#### REFERENCIAS

1. Tapia M., (1990) Cultivos andinos subexplotados y su aporte en la alimentación; FAO/RLALC. Lima, Perú.
2. Valcárcel L.E. (1949). Historia de la cultura antigua del Perú. Tomo I. Vol.2, cap.26.
3. García, E. y Beck S. (2006) "Puna" Botánica Económica de los Andes Centrales. La Paz Bolivia.
4. Calderón J. (1987) "La Achacana (Neowerdermannia vorwerckii) Determinación de sus nutrientes". Revista Ecológica en Bolivia. Instituto de Ecología, **10**, 65-70 La Paz – Bolivia.
5. Cárdenas M. (1969) "Manual de plantas económicas de Bolivia", Imprenta Icthus, Cochabamba, Bolivia.
6. Hansen, B. (1980) Balanophoraceae. En Flora Neotropica, Monograph 23.
7. Bernal M., Henry Yesid y Correa Q., Jaime Enrique (1994) Especies vegetales promisorias del Convenio Andrés Bello. Santafé de Bogotá: Guadalupe.
8. Pestalozzi H.U. (1998) "Flora Ilustrada Altoandina", Herbario Nacional de Bolivia, Cochabamba.

9. Buendía L., Artica L. (2005) "Obtención de oligofruktanos a partir de la raíz de chicuro y evaluación de sus características físico-químicas". [http://www.uncp.edu.pe/Facultades/Industrias/investigacion/2005\\_13.htm](http://www.uncp.edu.pe/Facultades/Industrias/investigacion/2005_13.htm)
10. KuskoskiI, E. y Asuero G.; Troncoso, A. (2005) "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos" *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Vol. 25, No.4 Campinas Oct./Dec. 2005
11. Peñarrieta J.M., Alvarado J.A., Åkesson B. and Bergenståhl (2005) "Total Antioxidant Capacity in Andean food species from Bolivia". *Revista Boliviana de Química* Vol. 22, No. 1- 2005.
12. Peñarrieta J.M., Alvarado J.A., Bergenståhl B. and Åkesson B. (2007) "Spectrophotometric methods for the measurement of total phenolic compounds and total flavonoids in Foods". *Revista Boliviana de Química* Vol. 24, No. 1- 2007.
13. Nilsson J., Pillai D., Önning G., Persson C., Nilsson A. and Åkesson B. "Comparison of the ABTS and FRAP methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables." *Molecular Nutrition and Food Research*, 2005, 49, 239 – 246.
14. Kyoung O. Kim D. Smith N. Schroeder D. "Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet" *J. Sci. Food Agric.* 85:1715-1724.
15. Benzie, I. F. F., Strain, J. J., (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70–76.
16. Montaldo, Alvaro, (1991) "Cultivo de raíces y tubérculos tropicales", IICA.
17. Stratil P., Borivoj Kledjus B., y Kubaň V. (2006) Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables-Evaluation of Spectrophotometric Methods. *JAFc*, **54**, 607-616.
18. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang M., and Rice-Evans C., (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay *Free Radical Biol. Med.* 26, 1231–1237.
19. Singleton V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomoldybic- Phosphotungstic Acid Reagents, *Am. J. of Enol. and Vitic.* 16, 144-158.Fenoles Totales