

© 2020 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 23: 1-9, 2020.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>

## Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP)

Abigail Benítez-Estrada, Javier Villanueva-Sánchez\*,  
Guillermina González-Rosendo, Víctor Eduardo Alcántar-Rodríguez,  
Rubén Puga-Díaz y Adrián Guillermo Quintero-Gutiérrez

Departamento de Nutrición y Alimentos Funcionales, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Calle CEPROBI #8, Colonia San Isidro, Yautepec, 62731, Morelos, México. E-mail: \*jvillanuevas@ipn.mx

### RESUMEN

La determinación de la capacidad antioxidante es útil para valorar la calidad de un alimento, la cantidad de antioxidantes presentes en un sistema, o la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes en el cuerpo humano. Los métodos disponibles realizan la determinación del efecto potencial de las sustancias antioxidantes, presentes en los alimentos y en el organismo humano, contra las reacciones de oxidación. El objetivo fue comparar los resultados de la detección de la capacidad antioxidante total (CAT) en muestras de alimentos y plasma humano, mediante la quimioluminiscencia por fotosensibilización (PCL), en contraste con métodos que cuantifican la capacidad de absorción del radical de oxígeno (ORAC) y el poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). Se obtuvieron extractos hidrosolubles y liposolubles de salvado de arroz estabilizado (SAE) y de harina de *Ulva clathrata* (HUC). El plasma se obtuvo de muestras de sangre humana (PHU). Se procesaron tres muestras en cada caso. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de una vía y correlación de Pearson,  $p < 0.05$ . La CAT determinada mediante PCL fue: SAE  $246.37 \pm 5.37$ , HUC  $21.05 \pm 0.41$  y PHU  $90.59 \pm 1.17$  equivalentes Trolox (ET)  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  ó  $100 \text{ mL}$ ,  $p < 0.05$ ; ORAC: SAE  $5015.62 \pm 12.83$ , HUC  $852.37 \pm 3.45$  y PHU  $2563.31 \pm 39.47$  ET  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  ó  $100 \text{ mL}$ ,  $p < 0.05$ . FRAP: SAE  $519.37 \pm 0.04$ , HUC  $52.78 \pm 0.01$  y PHU  $90.26 \pm 0.01$  equivalentes  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{EFe}^{2+}$ )  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  ó  $100 \text{ mL}$ . Se observaron correlaciones entre PCL y ORAC,  $r = 0.99$ ; y la PCL y FRAP,  $r = 0.94$ , ambas estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). La PCL mostró ser un método confiable y alternativo para cuantificar la CAT, que se puede aplicar en estudios de alimentos y de intervenciones en salud.

**Palabras clave:** capacidad antioxidante total, fotoquimioluminiscencia, ORAC, FRAP.

### Determination of the total antioxidant capacity of food and human plasma by photochemiluminescence: Correlation with spectrophotometric (FRAP) and fluorometric (ORAC) assays

### ABSTRACT

The determination of antioxidant capacity is useful to value the quality of a food, the sum of antioxidants in a system, or the bioavailability of antioxidant compounds in the human body. The available methods determine the potential effect of antioxidant substances, present in food and in the human body, against oxidation reactions. The objective was to compare the total antioxidant capacity (TAC) of food samples and human plasma, by photochemiluminescence (PCL) in contrast to methods that quantify the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). Water-soluble and lipid-soluble extracts were obtained from stabilized rice bran (SRB) and *Ulva clathrata* flour (UCF). Plasma was obtained from blood human samples (HUP). Three samples were processed in each case. The results were analyzed with one-way analysis of variance and Pearson's correlation,  $p < 0.05$ . The results of TAC measurement were PCL, SRB  $246.37 \pm 5.37$ ; UCF  $21.05 \pm 0.41$  and HUP  $90.59 \pm 1.17$  Trolox equivalents (TE)  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  or  $100 \text{ mL}$ ,  $p < 0.05$ . With ORAC were: SRB  $5015.62 \pm 12.83$ ; UCF  $852.37 \pm 3.45$  and HUP  $2563.31 \pm 39.47$  TE  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  or  $100 \text{ mL}$ ,  $p < 0.05$ . FRAP: SRB  $519.37 \pm 0.04$ ; UCF  $52.78 \pm 0.01$  and HUP  $90.26 \pm 0.01$   $\text{Fe}^{2+}$  equivalents ( $\text{EFe}^{2+}$ )  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  or  $100 \text{ mL}$ . Correlations were observed between PCL-ORAC  $r=0.99$ ; and PCL-FRAP  $r=0.94$ , both statistically significant ( $p < 0.05$ ). PCL showed to be a reliable and alternative method to quantify TAC, which can be applied in food and health intervention studies.

**Keywords:** total antioxidant capacity, photochemiluminescence, ORAC, FRAP.

Artículo recibido el 14 de febrero del 2020.

Artículo aceptado el 23 de agosto del 2020.

## INTRODUCCIÓN

**L**os oxidantes son compuestos con tendencia a donar oxígeno a otras sustancias. Muchas especies reactivas de oxígeno son radicales libres. Un radical libre es cualquier especie química que tiene uno o más electrones no apareados. Como ocurre en las plantas, el cuerpo humano también se expone de modo constante a los oxidantes y/o radicales libres que se generan fisiológicamente. En las plantas, la producción de radicales libres aumenta durante el estrés biótico y abiótico, mientras que, en los seres humanos, los radicales libres se incrementan en procesos fisiopatológicos como la inflamación, el metabolismo de compuestos extraños o la radiación (Kasote, Katyare, Hegde & Bae, 2015). Los radicales libres pueden afectar adversamente varias clases importantes de moléculas biológicas como los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas, lo que altera el estado redox normal y aumenta el estrés oxidante (Phaniendra, Jestadi & Periyasamy, 2015). Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, contrarrestan los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno y se cree que ayudan a prevenir o retardar la progresión de muchas enfermedades no transmisibles que afectan a los seres humanos (Sun & Johnson, 2015). La cuantificación y demostración de las propiedades antioxidantes de los alimentos y sus productos son materia de interés para la agricultura, la industria, los investigadores, los médicos y los profesionales de la nutrición. La capacidad antioxidante total (CAT) se define como el potencial de una sustancia o compuesto para inhibir o dificultar la oxidación de un sustrato hasta en cantidades muy pequeñas (< 1%, comúnmente 1-1,000 mg/L). Su medición es útil para valorar la calidad de un alimento, la cantidad de antioxidantes en un sistema, o la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes en el cuerpo humano (López-Alarcón & Denicolab, 2013).

Los métodos estandarizados para su medición se pueden clasificar en ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno y ensayos basados en la transferencia de electrones (Shahidi & Zhong, 2015). Entre los primeros, se ubica la capacidad de absorción de los radicales de oxígeno (ORAC, del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity), este método analiza la capacidad de los compuestos antioxidantes (fenólicos y no fenólicos) para atrapar al radical peroxilo (ROO•), responsable de la oxidación de los lípidos en los alimentos. En este ensayo, los radicales ROO• generados por un iniciador de radicales libres, reaccionan con una sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente; el antioxidante compite mediante un mecanismo de transferencia de hidrogeniones con la sonda fluorescente, manteniéndose la fluorescencia. El resultado se obtiene calculando el área bajo la curva de fluorescencia, y se expresa como equivalentes micromolares de Trolox (ET μmol) por mL (para líquidos) o por g (para productos sólidos) (Zapata, Piedrahita & Rojano, 2014).

Otro método usual es la capacidad de reducción del hierro (FRAP, del inglés Ferric Reducing Antioxidant Power), que

evalúa el efecto combinado de las defensas antioxidantes no enzimáticas que se encuentran presentes en los fluidos biológicos, como un índice de la capacidad de resistir el daño oxidante. Este método se desarrolla bajo condiciones ácidas (pH 3.6). En presencia de antioxidantes, la forma férrica del compuesto hierro-tripiridyl-triazina (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) se reduce a la forma ferrosa (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ). El compuesto Fe<sup>2+</sup>-TPTZ produce una coloración azul intensa que tiene una absorción máxima de 593 nm (Benzie & Strain, 1996). Los resultados del ensayo FRAP, se ha visto que correlacionan con los antioxidantes presentes en plantas o frutos (Benzie & Devaki, 2017).

Recientemente, la fotoquimioluminiscencia (PCL, del inglés Photo-sensitized Chemiluminescence) ha emergido como alternativa capaz de investigar en un solo sistema, la capacidad antioxidante total de compuestos hidrofílicos (ACW, del inglés Antioxidant Capacity Water-soluble) y lipofílicos (ACL, del inglés Antioxidant Capacity Lipid-soluble). El término quimioluminiscencia se define como la emisión de luz ultravioleta, luz visible, o radiación infrarroja de una molécula o átomo, como resultado de la transición de un estado electrónicamente excitado que ha ocurrido en una reacción química. Esta reacción química produce suficiente energía para inducir la transición de su estado inerte a un estado electrónico excitado. La CAT se cuantifica por combinación de la excitación de fotones y la detección de compuestos luminosos por la quimioluminiscencia (Bauerfeind, Hintze, Kschonsek, Killenberg & Böhm, 2014; Wesolowska & Džugan., 2017). El principio de la PCL se basa en una reacción fotoquímica inducida por la luz UV-A (365 nm), que consta de dos pasos (Popov & Lewin, 2005):

- a) Absorción de luz, excitación del sustrato:  $S + hv \rightarrow S^*$ , seguidos de la generación de radicales libres y/u oxígeno singulete.  
 $S^* + O_2 \rightarrow S^+ \cdot + O_2^- \cdot \rightarrow S^* + O_2 \rightarrow S + {}^1O_2$ .
- b) El luminol (3-aminofthalhidrazida, L) actúa como fotosensibilizador, produce el anión aminoftalato en estado excitado, seguido de quimioluminiscencia:  
 $LH + hv \rightarrow L \cdot + O_2 \cdot \rightarrow N_2 + AP_2^- + hv_2$ .

La capacidad antioxidante de la muestra es cuantificada por comparación con una curva de calibración con ácido ascórbico o TROLOX® y en unidades equivalentes al estándar.

La información sobre su aplicación y correlación de resultados con otros métodos es aún limitada y discutible (Bauerfeind *et al.*, 2014; Benzie & Choi, 2014).

El potencial antioxidante de los alimentos está directamente relacionado con la presencia de compuestos bioactivos en la matriz alimentaria. Actualmente se buscan nuevas fuentes alimenticias de compuestos bioactivos. El salvado de arroz (SA) es un subproducto del proceso de pulimento del arroz que comúnmente se destina a la alimentación animal, aunque en

los últimos años, se ha investigado por sus posibles beneficios para la salud (Gul, Yousuf, Singh, Singh & Wani, 2015). El SA contiene antioxidantes como tocoferoles, tocotrienoles, y  $\gamma$ -Orizanol, compuestos que prometen su uso como ingrediente funcional en enfermedades cardiovasculares (Sharif, Butt, Anjum & Khan, 2014). *Ulva clathrata* es un alga verde de la familia Ulvaceae. Es una buena fuente de fibra dietética soluble, ácidos grasos polinsaturados de alta calidad y carotenoides; puede emplearse eficientemente como ingrediente en alimentos para humanos y animales (Elizondo *et al.*, 2016). Por otro lado, se han desarrollado ensayos para determinar la capacidad antioxidante total de la sangre (Sun & Johnson, 2015). La CAT del plasma considera la acción acumulada de todos los antioxidantes presentes y podría ayudar en la evaluación de factores fisiológicos, ambientales y nutricionales del estado redox en los seres humanos (Ghiselli, Serafini, Natella & Scaccini, 2000). El objetivo fue comparar los resultados de la detección de la capacidad antioxidante total en muestras de alimentos y plasma humano, mediante la fotoquimioluminiscencia (PCL), en contraste con ORAC y FRAP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio experimental de validación de resultados con diferentes métodos, para analizar la validez y fiabilidad de la PCL.

### Muestras de alimentos

Se obtuvieron tres muestras de salvado de arroz Morelos variedad A2010 del molino de arroz de San José del municipio de Jojutla, situado al sur de Morelos, México. El salvado de arroz fue previamente pasado por malla 50 y estabilizado por calor húmedo a 90 °C durante 30 min (SAE). Las tres muestras de HUC fueron proporcionadas por Aonori Aquafarms Company Inc. ubicada en Baja California, México.

### Plasma humano

Para reducir las variaciones en los resultados de la CAT, se consideró la selección de un voluntario de 24 años aparentemente saludable con un índice de masa corporal (IMC) de 24.4 m/kg<sup>2</sup> sin antecedentes de alguna enfermedad crónica o aguda, consumo de alcohol, drogas o tabaco. Se le pidió al participante voluntario que ayunara de 8 a 12 h previas al estudio; se recolectaron tres muestras consecutivas de sangre por punción venosa utilizando un sistema al vacío (BD-Vacutainer®, México). Las muestras de sangre se fraccionaron mediante centrifugación a 2,500 x g durante 15 min para obtener el plasma humano (PHU). Se obtuvo el consentimiento informado de acuerdo con directrices éticas.

### Extracción de compuestos liposolubles

Las muestras del SAE y HUC se pesaron (10 g c/u) y, por separado, se agitaron durante 48 h con metanol al 100% en condiciones oscuras y a temperatura ambiente. Se filtraron para evitar interferencias en la medición de la CAT. Para concentrar

los extractos y llevar a un volumen de 50 mL, se utilizó un rotoevaporador (R-100, Buchi latinoamericano, SP, Brasil). Cada extracto obtenido por triplicado se almacenó a -10 °C bajo condiciones oscuras; los residuos se utilizaron para la extracción de compuestos solubles en agua.

### Extracción de compuestos solubles en agua

Para cada ensayo (n = 3 x 3), se pesó 1 g de muestra del SAE, se agitó con 10 mL de hexano (100%) durante 2 min y se decantó. El residuo se mezcló con acetona/agua/ácido acético [70/ 29.5/ 0.5] durante 1 h a 4 °C. Después se centrifugó a 112 x g a 4 °C, se decantó de nuevo y se repitió el tratamiento precipitando, para combinar los sobrenadantes. Los compuestos antioxidantes solubles en agua de HUC, se extrajeron con ácido acético 0.1 M aplicando el procedimiento ya descrito. Enseguida, los diferentes extractos, obtenidos por triplicado, de cada muestra, se vaciaron en tubos y homogeneizaron agitando en un equipo Vortex a 1,500 x g para ser almacenados en la oscuridad a -10 °C hasta su cuantificación.

### ORAC

Se aplicó el método sugerido por Prior *et al.* (2003); preparando lo siguiente: (a) una solución stock con 44 mg de fluoresceína sódica en 100 mL de amortiguador salino de fosfatos ([PBS] por sus siglas del inglés phosphate buffered saline) 0.075 M, pH 7.0, (b) una disolución de trabajo con 0.165 mL de solución de stock y 25 mL de PBS y (c) solución con 600 mg de 2, 2' azobis (2-amidinopropano) diclorhidrato disuelto en 10 mL de PBS (AAPH). Las soluciones stock, de trabajo y AAPH se almacenaron en la oscuridad a -20 °C hasta que se usaron en el análisis de la CAT. Se utilizó una solución de ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) diluido en PBS como estándar. Durante cada prueba analítica se mezclaron 50  $\mu$ L de la solución de trabajo, 50  $\mu$ L del blanco, estándar o muestra, y se añadieron 25  $\mu$ L de la solución de AAPH. La CAT se determinó con un lector de placas con filtros de fluoresceína FLx800™ (excitación a 485 nm y emisión a 535 nm) (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA). La ecuación para la curva de calibración obtenida fue  $y = 0.3375x - 9.8552$ ,  $r^2 = 0.9978$ . Los resultados se expresaron como ET  $\mu$ mol /100 g ó 100 mL de muestra.

### FRAP

Fue aplicado el método sugerido por Benzie & Strain (1996). El reactivo FRAP se preparó con: amortiguador de acetato de 0.3 M, pH 3.6; solución 10 mM de Tris (2-pyridyl)-s-triazina (TPTZ) en HCl 40 mM; y FeCl<sub>3</sub> 20 mM, en proporción 10:1:1. Las disoluciones se mantuvieron cubiertas de la luz durante el desarrollo del ensayo. En viales de color ámbar de 3 mL, se vaciaron 30  $\mu$ L de disolución de muestra o calibración, 90  $\mu$ L de reactivo FRAP y 90  $\mu$ L de agua destilada. Los viales se incubaron en baño María a 37 °C durante 30 min. Muestras por triplicado de 200  $\mu$ L de cada frasco se vaciaron en microplacas de 96 pozos. Las absorbancias se determinaron a 593 nm en

un lector multimodal de microplacas Synergy® HT (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA). La potencia reductora se expresa a partir de una curva estándar preparada con 0 a 5 M de Fe SO<sub>4</sub> y 7 H<sub>2</sub>O. La ecuación para la curva de calibración fue  $y = 0.0015x + 0.1347$ ,  $r^2 = 0.9961$ . Los resultados se expresaron como EFe<sup>2+</sup> μmol 100 g ó 100 mL de muestra.

**PCL**

La capacidad antioxidante de la PCL se mide por separado para compuestos liposolubles (ACL), e hidrosolubles (ACW) con uso de un estuche de reactivos e indicaciones del proveedor del equipo semiautomatizado Photochem® (Analytik Jena AG, Alemania).

**ACL.** Las soluciones de reacción fueron preparadas mezclando 2.29 mL de reactivo 1 (metanol), 200 μL de reactivo 2 (solución amortiguadora), 25 μL de reactivo 3 (luminol). En cada ensayo, se mezclaron y midieron con 10 μL de cada muestra (PHU sin diluir; SA 1:100 y HUC 1:10 diluidas con reactivo 1). El detector mide la proporción de la luminiscencia que se genera durante 180 s.

**ACW.** Las soluciones de reacción fueron preparadas mezclando 1.49 mL de reactivo 1, 1 mL de reactivo 2 (solución amortiguadora), 25 μL de reactivo 3, (luminol) y 10 μL para cada una de las muestras del SAE con agua destilada 1:5; HUC y PHU sin diluir. El detector mide la proporción de la luminiscencia generada durante 250 s.

La capacidad antioxidante de cada muestra fue cuantificada de manera automática por comparación con el estándar mediante el software PCLlasoft 5.1 incluido en el equipo. Para la determinación de la CAT en las muestras de alimentos y de plasma se preparó una curva de calibración con mediciones en serie de disoluciones estándar a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 nmol de ácido ascórbico (ACW) y Trolox (ACL), respectivamente. El ensayo con la PCL no se restringe a un rango de temperaturas. Un valor de  $r^2$  mayor de 0.95 se consideró válido en cada determinación. Las ecuaciones que se generaron como base de cálculo de la CAT, en el mismo equipo, fueron: ACW,  $y = -2.21902x^2 + 55.12627x + 16.67729$ ,

$r^2 = 0.9983$ ; ACL,  $1/y(x) = -0.09053/x^2 + 1.64585/x + 0.81036$ ,  $r^2 = 0.9997$ . Se aplicó la fórmula sugerida por Lai *et al.* (2012) para homologar las unidades de expresión de resultados de los diferentes extractos ACW+ACL, y favorecer el contraste entre métodos en ET μmol / 100 g ó 100 mL de muestra.

**Análisis estadístico**

Se calcularon medidas de tendencia central y dispersión a partir de la cantidad de muestras analizadas mediante cada uno de los métodos (n = 3 x 3). Se evaluó la repetibilidad de las pruebas mediante el cálculo de coeficientes de variación (cv). Se compararon promedios mediante análisis de varianza de una vía. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) de las mediciones obtenidas utilizando el software estadístico IBM SPSS v. 22 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Se estableció un nivel de significancia  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Este estudio mostró que los resultados de la CAT en muestras de alimentos y plasma humano, obtenidos por la PCL, son comparables con otros métodos comúnmente usados. En la Tabla I se pueden observar los promedios de la CAT estimados en cada tipo de muestra analizada por cada uno de los métodos y los cv obtenidos durante el proceso de medición.

Como se muestra en la Tabla I, el análisis indica que los valores de la capacidad antioxidante total difieren en magnitud entre los métodos utilizados para este trabajo, al tiempo que presentan una tendencia similar de resultados en los diferentes métodos. Fue posible establecer un mismo orden de magnitud en las estimaciones de los distintos métodos utilizados para cuantificar la CAT, UCF < HUP < SRB. En el proceso de calibración de cada una de las técnicas, el cv no alcanzó el 5%, por lo que podría considerarse un nivel adecuado de fiabilidad del proceso de medición.

En el estudio, se pudieron observar correlaciones entre los resultados obtenidos por la PCL y ORAC,  $r = 0.99$  (Figura 1), así como entre la PCL y el FRAP,  $r = 0.95$  (Figura 2), ambos  $p < 0.05$ . Aunque los materiales analizados difieren en composición química, los resultados coinciden con estudios

**Tabla I. Comparación de la capacidad antioxidante total de muestras de alimentos y plasma humano por PCL, ORAC y FRAP.**

Muestra	PCL <sup>1</sup>	cv %	ORAC <sup>2</sup>	cv %	FRAP <sup>3</sup>	cv %
SAE	246.37 ± 5.37 <sup>c</sup>	2.10	5015.62 ± 12.83 <sup>c</sup>	0.26	519.37 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.01
HUC	21.05 ± 0.4 <sup>1a</sup>	1.87	852.37 ± 3.45 <sup>a</sup>	0.41	52.78 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02
PHU	90.59 ± 1.17 <sup>b</sup>	1.29	2563.31 ± 39.47 <sup>b</sup>	1.54	90.26 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.01
p (F)	< 0.001		< 0.001		< 0.001	

Los resultados se describen como promedio ± DE. SAE = salvado de arroz estabilizado, HUC = harina de *Ulva clathrata*, PHU = plasma humano. <sup>1-2</sup> ET μmol / 100 g ó 100 mL. <sup>3</sup> EFe<sup>2+</sup> μmol/100 g ó 100 mL. cv = Coeficiente de variación; p (F) valores de significación estadística mediante ANOVA, F (6-2) gl para analizar tendencia por columna. <sup>a-c</sup> Letras diferentes por columna describen diferencias significativas mediante prueba de Tukey 4gl, n = 3 x 3.

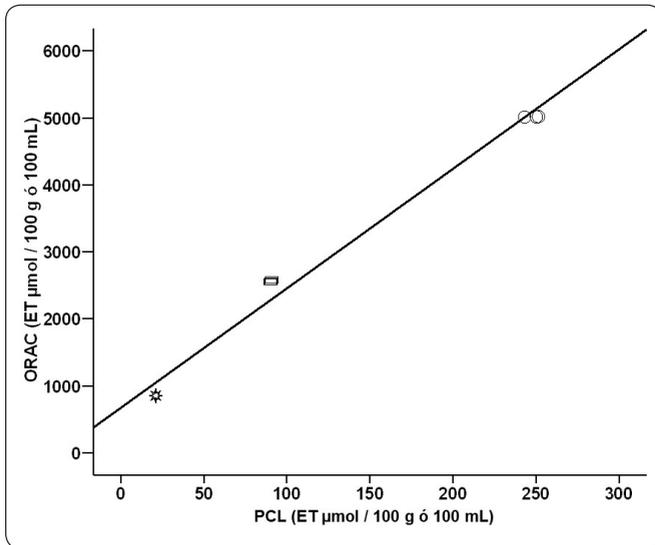


Figura 1. Correlación de promedios de la capacidad antioxidante total (CAT) obtenidos mediante los métodos PCL y ORAC.  $r = 0.99$ ,  $p < 0.05$ . ET Equivalentes Trolox,  $\circ$  salvado de arroz estabilizado,  $\square$  plasma humano,  $*$  Harina de *U. calthrata*.

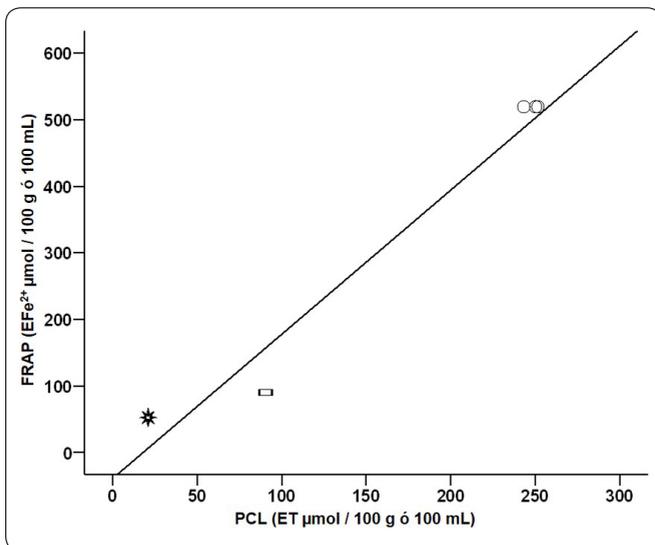


Figura 2. Correlación de los promedios de la capacidad antioxidante total (CAT) obtenidos mediante los métodos PCL y FRAP,  $r = 0.94$ ,  $p < 0.05$ . ET Equivalentes Trolox,  $\circ$  salvado de arroz estabilizado,  $\square$  plasma humano,  $*$  Harina *U. calthrata*.

previos donde se aplican algunos de los métodos utilizados en este reporte, por ejemplo, Karmowski, Hintze, Kschonsek, Killenberg & Böhm (2015) describieron una correlación significativa entre la suma de carotenoides y el análisis basado en cuantificación de la vitamina E y la PCL en muestras de aceites vegetales. Bauerfeind *et al.* (2014) compararon los resultados de diferentes métodos, entre ellos la PCL,

FRAP y ORAC, para evaluar la actividad antioxidante de los carotenoides extraídos de concentrados de tomate, encontrando diferencias en los resultados, como dependencia de la estructura química (presencia de dobles enlaces y grupos funcionales) y del contenido de agua en las muestras. Las revisiones del tema indican que no existe un método cuantitativo universal y simple para determinar exactamente la capacidad antioxidante total (Prior, Wu & Schaich, 2005; Pisoschi & Negulescu, 2011; Moharram & Youssef, 2014). Su determinación en muestras de extractos complejos se realiza habitualmente por diferentes métodos complementarios, que evalúan diversos mecanismos de acción. Mercado, de la Rosa, Wall-Medrano, López & Álvarez-Parrilla (2013) han señalado que la capacidad antioxidante total de una sustancia biológica (alimento, tejido o líquido orgánico) está determinada por las interacciones que ocurren entre diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción.

Los resultados obtenidos en este estudio, a pesar de ser fiables, requieren una cuidadosa interpretación basada en los mecanismos y dinámicas de la acción antioxidante que los subyace. En los alimentos, valores similares de la CAT, incluso medidos utilizando el mismo método, pueden deberse a la presencia de diferentes moléculas antioxidantes con diferente reactividad hacia la fuente oxidante (Apak *et al.*, 2013). Por otro lado, algunas veces, los términos actividad antioxidante y capacidad antioxidante se utilizan indistintamente, aunque tienen diferentes significados. La actividad antioxidante corresponde a la constante de la tasa de un solo antioxidante contra un radical libre dado. La capacidad antioxidante es una medida de los moles de radicales libres captados por una solución de prueba específica, independiente de la actividad de cualquier antioxidante presente en la mezcla. La cooperación entre diferentes antioxidantes ofrece una mayor protección contra el ataque de especies reactivas que cualquier compuesto solo. La medición de la CAT se hace relevante porque integra el potencial antioxidante como expresión principal de la actividad de uno o varios biocompuestos presentes al mismo tiempo (Apak, Özyürek, Güçlü & Capanoglu, 2016).

Las mediciones de la CAT se han realizado en muestras de origen alimenticio: plantas, extractos de plantas, preparados obtenidos después de la hidrólisis de los componentes de la planta, frutas, hortalizas, alimentos procesados y bebidas (Aguilar, Gavino, Baragaño, Hevia & Gavino (2007). Se ha señalado que la aplicación de diferentes métodos para medir la capacidad antioxidante del salvado de arroz, entre los que se incluye el FRAP y ORAC, no son equivalentes debido a la diferencia de sensibilidades hacia distintos antioxidantes (Niki, 2010). Por otro lado, Omata, Yoshida & Niki (2010), utilizando el método ORAC, evaluaron la capacidad antioxidante tanto en muestras de frutas como en el plasma humano después de su consumo, encontrando correlaciones significativas, lo que significa que la aplicación de ese método es válida para evaluar exposiciones.

Se han sugerido factores que causan confusión y hacen difícil la comparabilidad de la PCL como: las diferencias en principios, condiciones de medición y variaciones en resultados (Rácz, Papp, Balogh, Fodor & Heberger, 2015). Se ha descrito que ORAC y PCL son métodos que permiten la estimación de la capacidad antiradical por competencia. ORAC utiliza una sonda de referencia para evaluar la capacidad de eliminar los radicales libres que se producen, no evalúa las características de los antioxidantes y no necesariamente muestra la capacidad de suprimir la oxidación; i.e. anti-oxidación (Dorta *et al.*, 2015). En la PCL, un fotosensibilizador (luminol) se excita ópticamente para producir el radical del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), entonces la muestra que contiene compuestos antioxidantes neutraliza una parte de  $O_2^{\cdot-}$  y, por último, los radicales restantes se cuantifican por comparación con un estándar de ácido ascórbico o Trolox (Gramza-Michalowska, Sidor, Regula & Kulczynski, 2015).  $O_2^{\cdot-}$  es uno de los radicales libres más importantes en el cuerpo humano que ha sido implicado en la iniciación de reacciones de oxidación asociadas al envejecimiento y juega un papel importante en la formación de otras especies reactivas de oxígeno. Ambos ensayos, ORAC y PCL, son sensibles a la transferencia de átomos de hidrógeno (Zielińska, Olejnik, Dobrowolska & Grajek, 2007), esta propuesta podría explicar la alta correlación de datos derivados de la aplicación de estos dos métodos en las muestras de alimentos y plasma de este estudio. En el ensayo con el FRAP se monitorea una única reacción de transferencia de electrones a través del cambio de color que se produce a medida que se reduce el oxidante. El aumento de la absorbancia indica una mayor potencia reductora, posiblemente asociada con el contenido de compuestos fenólicos (Rodríguez-Bonilla, Gandía-Herrero, Matencio, García-Carmona & López-Nicolás, 2017). El estudio confirmó que el ensayo con el FRAP es simple, rápido, robusto y no requiere equipo especializado, aunque se ha señalado que puede no ser aplicable para detectar todos los antioxidantes (Wesolowska & Dżugan, 2017).

En este trabajo, las mediciones de la CAT fueron contrastadas en muestras de alimentos, como el salvado de arroz, la harina de *U. clathrata* y en el plasma humano. Estudios en animales y humanos sugieren la importancia del consumo antioxidante en la reducción de la incidencia, prevención o control de enfermedades degenerativas (Shanmugam, Selvaraj & Poomalai, 2016). Los antioxidantes de la dieta, que han sido asociados a la prevención de enfermedades, se encuentran principalmente en frutas, hortalizas y alimentos integrales (Huang, 2018).

De las muestras analizadas por los tres métodos, los valores más altos de la CAT fueron observados en el SAE. Estos resultados sugieren, a la luz de estudios experimentales anteriores, que el SAE contiene varios tipos de antioxidantes y en diversas proporciones expresadas como mayor potencial (Goufo, Ferreira, Trindade & Rosa, 2015). Los tocoles (entre ellos los tocoferoles y tocotrienoles) y los oryzanoles, son los principales antioxidantes que se encuentran en el SA. Los oryzanoles y

tocotrienoles presentan mayor actividad antioxidante que los tocoferoles y la proporción de estos compuestos varía con el tipo de cultivo (Gul *et al.*, 2015). En este sentido, un estudio *in vitro* mostró que el perfil de los componentes bioactivos del SAE, extraído de siete variedades de arroz, difería en su efecto potencial sobre el crecimiento de las células tumorales, resaltando su potencial como ingrediente o como alimento funcional (Forster *et al.*, 2013).

En muestras biológicas como el plasma, se presentan compuestos heterogéneos con diferente actividad antioxidante, por lo que se puede argumentar que el estado antioxidante está mejor representado por la CAT que por la sola actividad de uno de los antioxidantes (Apak *et al.*, 2016). Los valores de la CAT en el plasma humano, expuestos en este trabajo, están limitados a muestras de un tipo de fluido humano, obtenidas en forma casual, de un único sujeto, y no deben considerarse en modo alguno como resultado de un estudio de bioaccesibilidad o biodisponibilidad. La biodisponibilidad es un concepto más amplio, que incluye el estudio de la bioaccesibilidad, la absorción, el metabolismo, distribución y bioactividad de moléculas o compuestos en un tejido clave (Galanakis, 2017), tema que rebasa los objetivos de este trabajo.

Los valores más altos de absorción para reducir la oxidación se observaron en los extractos de salvado de arroz ( $p < 0.05$ ). En el estudio, guardando las proporciones y la especie analizada, el poder reductor obtenido en muestras del SAE ( $519.37 \pm 0.04 \text{ EFe}^{2+} \mu\text{mol}/100 \text{ g}$ ) fue menor de  $57.23 \text{ EFe}^{2+} \mu\text{mol} / \text{g}$  como fue descrito en una revisión de Sohail, Rakha, Sadiq, Jawad & Rashid (2017). El poder de reducción del extracto del SAE indica probablemente, que los compuestos antioxidantes, como los tocoferoles y tocotrienoles, fueron donantes de un electrón, capaces de reducir los lípidos intermediarios oxidados de modo que actuaron como antioxidantes primarios y secundarios (Meenakshi, Umayaparvathi, Arumugan & Balasubramanian, 2011). Bajo este principio, el ensayo con el FRAP se ha aplicado tanto para evaluar la biodisponibilidad de antioxidantes en los alimentos como para investigar los efectos del cultivo, almacenamiento, procesamiento, condiciones de cocción sobre el contenido total de antioxidantes en los alimentos e incluso utilizarse como herramienta de control de calidad para detectar la adulteración de los alimentos (Benzie & Choi, 2014).

Las algas pueden ser consideradas como una buena fuente de compuestos bioactivos con actividad antioxidante (Amorim, Lage & López, 2012). En las algas marrones, rojas, y verdes, se han encontrado compuestos antioxidantes, antiviral, antimicóticos, antimicrobianos, antitumorales y antiinflamatorios (Singh, Kumari & Reddy, 2015). Información disponible sobre *U. clathrata* cultivada bajo sistemas agrícolas de mediana y gran escala en México, indica que es una fuente de fibra dietética soluble, ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides y minerales, puede ser una fuente valiosa de proteína y se utiliza

como ingrediente en alimentos destinados para seres humanos y animales (Peña, Mawhinney, Ricque & Cruz, 2011). Las algas verdes de *U. clathrata* se cosechan para preparar “Aonori”, una pasta que puede ser incluida en una amplia variedad de platos como, ensaladas crudas, sopas, galletas, alimentos y condimentos (Aguilera, Casas, Carrillo, González & Pérez, 2005). En un estudio de extractos de algas obtenidas frente a la costa de Irán, se encontró que *U. clathrata* exhibió un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, ambos fuertemente correlacionados con el alto poder antioxidante determinado por el ensayo de actividad atrapadora del radical 2,2-difenil-picrilhidrazilo (DPPH\*) (Farasat, Khavari, Nabavi & Namjooyan, 2014).

En este trabajo, los valores de la CAT en harina de *U. clathrata*., obtenidos por PCL y los otros métodos, resultaron ser los de menor magnitud en comparación con los determinados en las muestras del SAE. Con la debida reserva en la comparación de información, el valor medio obtenido por PCL ( $21.05 \pm 0.411$  ET  $\mu\text{mol}/100$  g) fue superior a los valores reportados de 1.268 hasta 3.53 ET  $\text{nmol}/100$  g en extractos de macroalgas obtenidas de la costa de Rumania, utilizando el mismo método (Bogdan-Stefan, Ticuta, Marioara, Monica & Emin, 2018).

### CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que las determinaciones de la CAT mediante fotoquimioluminiscencia, se correlacionan estadísticamente con los datos obtenidos mediante la aplicación de los métodos ORAC y FRAP. Aunque describen un amplio rango de variación, el estudio sirvió para confirmar un efecto de gradiente de la capacidad antioxidante entre diferentes tipos de muestras como de métodos de aplicación en la investigación de alimentos funcionales.

En resumen, la PCL demostró ser un método confiable y alternativo a métodos fluorométricos y espectrofotométricos para la medición de la capacidad antioxidante en muestras de alimentos y biológicas que pueden ser una alternativa para verificar el potencial de nuevos productos y en la evaluación de intervenciones alimentarias en salud.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Gloria Dávila de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas por sus valiosos consejos en la preparación del estudio. A Esther Ramírez-Moreno y Nelly Cruz-Cansino de la Universidad Autónoma de Hidalgo por sus apreciables comentarios sobre los métodos analíticos.

### DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Todos los autores revisaron la versión final del manuscrito. Los autores no tienen conflicto de interés con respecto a la investigación, autoría y/o publicación de este informe. El estudio fue financiado por el Instituto Politécnico Nacional a través de los proyectos: SIP-20150820 y SIP-20152172.

### REFERENCIAS

- Aguilar, C., Gavino, G., Baragaño, M., Hevia, P. & Gavino, V. (2007). Correlation of tocopherol, tocotrienol,  $\gamma$ -oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays. *Food Chemistry*, **102**, 1228-1232. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.07.012.
- Aguilera, M., Casas, M., Carrillo, S., González, B. & Pérez, F. (2005). Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* sp. as a potential food source. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 79-88. DOI: 10.1016/j.jfca.2003.12.012.
- Amorim, K., Lage, M. A. & López, J. (2012). Changes in bioactive compounds content and antioxidant activity of seaweed after cooking processing. *CyTA- Journal of Food*, **10(4)**, 321-324. DOI: 10.1080/19476337.2012.658871.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. I. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**, 997-1027. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04739.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K., Özyürek, M. & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, **85**, 957-998. DOI: 10.1351/PAC-REP-12-07-15.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. & Capanoglu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement: II. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed mode (electron transfer (ET)/HAT) and lipid peroxidation assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **64**. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04743.
- Bauerfeind, J., Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M. & Böhm, V. (2014). Use of photochemiluminescence for the determination of antioxidant activities of carotenoids and antioxidant capacities of selected tomato products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **62(30)**:7452-9. DOI: 10.1021/jf502019r.
- Benzie, I. F. & Choi, S. W. (2014). Antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. *Advanced Food and Nutrition Research*, **71**, 1-53. DOI: 10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8.
- Benzie, I. 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. DOI: 10.1006/abio.1996.0292.
- Benzie, I. F. & Devaki, M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations and applications. In *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*, 1st ed.; Apak, R., Capanoglu, E., Shahidi, F., Eds.; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2017; Chapter 5; ISBN 9781119135388.

- Bogdan-Stefan, N., Ticuta, N., Marioara, M., Monica, V. & Emin, C. (2018). Antioxidant capacity of some marine green macroalgae species fluid extracts. Sofia: *Surveying Geology & Mining Ecology Management (SGEM)*, **18(6.4)**, 63-70. DOI: 10.5593/sgem2018V/6.4/S08.009.
- Dorta, E., Fuentes, E., Aspée, A., Atala, E., Speisky, H., Bridi, R., Lissi, E. & López, C. (2015). The ORAC (oxygen radical absorbance capacity) index does not reflect the capacity of antioxidants to trap peroxy radicals. *Royal Society of Chemistry-Advances*, **5**, 39899-39902. DOI: 10.1039/C5RA01645B.
- Elizondo-Reyna, E., Medina-González, R., Nieto-López, M. G., Ortiz-López, R., Elizondo-González, R., Powell, M. S., Ricque-Marie, D. & Cruz-Suárez, L. E. (2016). Consumption of *Ulva clathrata* as a dietary supplement stimulates immune and lipid metabolism genes in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Phycology*, **28(6)**, 3667-3677. DOI: 10.1007/s10811-016-0889-1.
- Farasat, M., Khavari, R. A., Nabavi, S. M. & Namjooyan, F. (2014). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **13**, 163-170. PMID: 24734068.
- Forster, G. M., Raina, K., Kumar, A., Kumar, S., Agarwal, R., Chen, M. H., Bauer, J. E., McClung, A. M. & Ryan, E. P. (2013). Rice varietal differences in bioactive bran components for inhibition of colorectal cancer cell growth. *Food Chemistry*, **141**, 1545-1552. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.04.020.
- Galanakis, C. M. (2017). *Nutraceutical and functional food components. Effects of innovative processing techniques*. In C.M. Galanakis Ed. Chapter I. Introduction, 1-14. Cambridge: Academic Press. ISBN: 9780128096505.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, **29**, 1106-1114. DOI: 10.1016/s0891-5849(00)00394-4.
- Goufo, P., Ferreira, L., Trindade, H. & Rosa, E. (2015). Distribution of antioxidant compounds in the grain of the Mediterranean rice variety 'Ariete'. *CyTA - Journal of Food*, **13(1)**, 140-150. DOI: 10.1080/19476337.2014.923941.
- Gramza-Michałowska, A., Sidor, A., Reguła, J. & Kulczyński, B. (2015). PCL assay application in superoxide anion-radical scavenging capacity of tea *Camellia sinensis* extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **14**, 331-341. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.4.33.
- Gul, K., Yousuf, B., Singh, A. K., Singh, P. & Wani, A. A. (2015). Rice bran: nutritional values and its merging potential for development of functional food: a review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, **6(1)**, 24-30. DOI: 10.1016/j.bcdf.2015.06.002.
- Huang, D. (2018). *Dietary Antioxidants and Health Promotion. Antioxidants* (Basel, Switzerland), **7(1)**, 9. DOI: 10.3390/antiox7010009.
- Karmowski, J., Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M. & Böhm, V. (2015). Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence. *Food Chemistry*, **175**, 593-600. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.12.010.
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V. & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International Journal of Biological Sciences*, **11(8)**, 982-991. DOI:10.7150/ijbs.12096.
- Lai, C. H., Liou, S. H., Jaakkola, J. K., Huang, H. B., Su, T.Y. & Strickland, P. T. (2012). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons associated with traffic exhaust: The increase of lipid peroxidation and reduction of antioxidant capacity. *Aerosol and Air Quality Research*, **12**, 941-950. DOI: 10.4209/aaqr.2012.01.0021.
- López-Alarcón, C. & Denicolab, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta.*, **763**, 1-10. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.051.
- Meenakshi, S., Umayaparvathi, S., Arumugam, M. & Balasubramanian, T. (2011). *In vitro* antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **1 (S1)**, 66-70. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60126-3.
- Mercado, G., de la Rosa, L., Wall-Medrano, A., López, J. A. & Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, **28**, 36-46. DOI: 10.3305/nh.2013.28.1.6298.
- Moharram, H. A. & Youssef, M. M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: A review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, **11(1)**, 31-42. DOI: 10.12816/0025348.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, **9**: 503-515. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016.
- Omata, Y., Yoshida, Y. & Niki, E. (2010). Assessment of the antioxidant capacity of natural fruit extracts by inhibition of probe decay and plasma lipid peroxidation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**, 531-535. DOI: 10.1271/bbb.90717.
- Peña, A., Mawhinney, T. P., Ricque, D. & Cruz, L. E. (2011). Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chemistry*, **129**, 491-498. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.04.104.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B. & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, **30(1)**, 11-26. DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0.

- Pisoschi, A. M. & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemical and Analytical Biochemistry*, **1**, 106. DOI: 10.4172/2161-1009.1000106.
- Popov, I. & Lewin G. (2005). Photochemiluminescent detection of antiradical activity.VII. Comparison with a modified method of thermo-initiated free radical generation with chemiluminescent detection. *Luminescence*, **20(4-5)**, 321-325. DOI: 10.1002/bio.856.
- Prior, R. L., 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(10)**, 4290-4302. Review. DOI: 10.1021/jf0502698.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3273-3279. DOI: 10.1021/jf0262256.
- Rácz, A., Papp, N., Balogh, E., Fodor, M. & Heberger, K. (2015). Comparison of antioxidant capacity assays with chemometric methods. *Analytical Methods*, **7**, 4216-4224. DOI: 10.1039/C5AY00330J.
- Rodríguez-Bonilla, P., Gandía-Herrero, F., Matencio, A., García-Carmona, F. & López-Nicolás, J. M. (2017). Comparative study of the antioxidant capacity of four stilbenes using ORAC, ABTS+, and FRAP techniques. *Food Analytical Methods*, **10**, 2994-3000. DOI:10.1007/s12161-017-0871-9.
- Shahidi, F. & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity, *Journal of Functional Foods*, **18(B)**, 757-781. DOI: 10.1016/j.jff.2015.01.047.
- Shanmugam, T., Selvaraj, M. & Poomalai, S. (2016). Epigallocatechin gallate potentially abrogates fluoride induced lung oxidative stress, inflammation via Nrf2/Keap1 signaling pathway in rats: An *in-vivo* and *in-silico* study. *International Immunopharmacology*, **39**, 128-139. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.07.022.
- Sharif, M. K., Butt, M. S., Anjum, F. M. & Khan, S. H. (2014). Rice Bran: A novel functional ingredient, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **54(6)**, 807-816. DOI: 10.1080/10408398.2011.608586.
- Singh, R. P., Kumari, P. & Reddy, C. R. (2015). Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**, 1571-1586. DOI: 10.1007/s00253-014-6334-y.
- Sohail, M., Rakha, A., Sadiq, M., Jawad, M. & Rashid, S. (2017) Rice bran nutraceuticals: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57(17)**, 3771-3780. DOI: 10.1080/10408398.2016.1164120.
- Sun, M., & Johnson, M. A. (2015). Measurement of total antioxidant capacity in sub- $\mu$ L blood samples using craft paper-based analytical devices. *Royal Society of Chemistry - Advances*, **5(69)**, 55633-55639. DOI: 10.1039/C5RA06479A.
- Wesolowska, M. & Dżugan, M. (2017). The use of the PHOTOCHEM device in evaluation of antioxidant activity of polish honey. *Food Analytical Methods*, **10**, 1568. DOI: 10.1007/s12161-016-0715-z.
- Zapata, S., Piedrahita, A. M. & Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales de oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en Nutrición Humana*, **16**, 25-36. DOI: 10.17533/udea.penh.
- Zielińska, M., Olejnik, A., Dobrowolska, A. & Grajek, W. (2007). Effects of *Aronia melanocarpa* polyphenols on oxidative metabolism and apoptosis of neutrophils from obese and non-obese individuals. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **6 (3)**, 75-86.