

Determinación del potencial nutracéutico de frutos de *Ardisia compressa* K. colectados en Xicotepec de Juárez, Puebla

LÓPEZ-YERENA, Anallely*†, GUERRA-RAMÍREZ, Diana, VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, Alma Y. y GONZÁLEZ-LÓPEZ, Julio

Universidad Tecnológica de Xicotepec de Juárez. Av. Universidad Tecnológica No. 1000, Tierra Negra, 73080 Xicotepec de Juárez, Pue

Recibido Enero 5, 2017; Aceptado Marzo 2, 2017

Resumen

Ardisia compressa K, es un arbusto que crece en las zonas tropicales de México. Es característico del municipio de Xicotepec de Juárez, en la Sierra Norte del estado de Puebla. El objetivo de este trabajo fue determinar el valor nutracéutico de frutos de *A. compressa* K. silvestres y con manejo agronómico. El contenido de fenoles totales (CFT) se determinó por el método de Folin-Ciocalteu; las antocianinas totales se determinaron por el método diferencial de pH. Mientras que la capacidad antioxidante fue evaluada por los ensayos ABTS y FRAP. Todos los métodos se adaptaron a microplacas. Los resultados muestran que los frutos de *A. compressa* K. correspondientes a las accesiones que no fueron fertilizadas (A1 y A2) presentaron el más alto contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante. Además, el contenido de antocianinas en los frutos es superior al encontrado en frutos de arándano y zarzamora, los cuales en diversos reportes presentan un considerable contenido de antioxidantes. En conclusión los frutos de *A. compressa* K. son una fuente natural rica en principios bioactivos.

Myrcinaceae, fenoles totales, antocianinas, alimentos funcionales

Abstract

Ardisia compressa K. is a shrub growing in tropical regions of Mexico, which represent a characteristic crop of Xicotepec de Juárez, in the north zone of the state of Puebla. The main of this article is to determine the nutraceutical value of *A. compressa* K. wild fruits as well agronomic managed fruits collected in Xicotepec de Juárez, Puebla. To determine the content of total phenols (CFT), the Folin-Ciocalteu method was used; the anthocyanins determination was carried out by difference of pH. While the antioxidant activity was determined by the ABTS and FRAP assays. All methods were adapted to microplates. The results show that *A. compressa* K. fruits corresponding to the accessions that were not fertilized (A1 and A2) presented the highest content of total phenols and antioxidant capacity. Also, the anthocyanins determined in fruits were superior to those found in cranberry and blackberry fruits, which, in different reports showed a high antioxidant contend. In conclusion, *A. compressa* K. fruits are a natural source of bioactive principles.

Myrcinaceae total phenols, anthocyanins, functional foods

Citación: LÓPEZ-YERENA, Anallely, GUERRA-RAMÍREZ, Diana, VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, Alma Y. y GONZÁLEZ-LÓPEZ, Julio. Determinación del potencial nutracéutico de frutos de *Ardisia compressa* K. colectados en Xicotepec de Juárez, Puebla. Revista de Sistemas Experimentales 2017, 4-10: 49-56

*Correspondencia al Autor (Correo electrónico: almays54@hotmail.com)

†Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El reino vegetal representa una fuente de antioxidantes naturales entre los que destacan los compuestos fenólicos, los cuales presentan propiedades antioxidantes (Sarikurkcu *et al.*, 2009). Los radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno (iones superóxido, hidroxilo y el peróxido de hidrógeno) son moléculas altamente reactivas que se generan de manera normal durante el metabolismo celular (Saeed, Khan y Shabbir, 2012). Particularmente, un exceso de radicales libres ocasiona daños celulares al unirse covalentemente a ciertas proteínas, lípidos, enzimas y al ADN participando en el desarrollo de diversos desórdenes como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Halliwell, 2006; Halliwell, 2007). Por lo tanto, los antioxidantes, obtenidos de fuentes naturales, han cobrado gran interés al contrarrestar los efectos producidos por los radicales libres (Gulcin, 2012).

Justificación

México es un país rico en biodiversidad. Entre sus recursos vegetales se encuentran muchas especies comestibles silvestres cuyas propiedades nutricionales y nutraceuticas no han sido estudiadas. Por lo anterior, es muy importante explorar estos recursos naturales para conocer los beneficios de su consumo y fomentar su propagación.

Problema

Ardisia compressa K. es un arbusto que crece en regiones tropicales y subtropicales del país que produce pequeños frutos de color morado intenso con sabor agridulce (Joaquín-Cruz *et al.*, 2017). Es un arbusto característico del municipio de Xicotepéc de Juárez, en la Sierra Norte del estado de Puebla, donde crece de manera silvestre y recibe el nombre común de acachul.

De acuerdo con Bhardwaj *et al.*, (2007) las especies vegetales silvestres son tolerantes tanto al estrés biótico como abiótico y tienen un valor nutricional superior a las especies cultivadas. A pesar de estas ventajas, dichas plantas permanecen sub-utilizadas y sin ser domesticadas (Ginvetti y Ogle, 2000). Particularmente, los frutos de acachul en Xicotepéc, son usados solamente para preparar licores, paletas, atoles y mermeladas. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar las cualidades nutraceuticas de los frutos de acachul colectados en el municipio de Xicotepéc de Juárez, Puebla con la finalidad de explorar nuevas alternativas de alimentos funcionales.

Hipótesis

Los frutos de *A. compressa* K. colectados en el municipio de Xicotepéc de Juárez, Puebla tendrán una alta capacidad antioxidante relacionada con su alto contenido fenólico.

Objetivos

Objetivo General

El objetivo de esta investigación fue evaluar las propiedades nutraceuticas de los frutos de acachul, silvestres y con manejo agronómico, mediante la cuantificación de fenoles y antocianinas totales, totales así como de su capacidad antioxidante.

Objetivos específicos

- Determinar el contenido de fenoles y antocianinas totales en frutos de acachul provenientes de arbustos silvestres y fertilizados
- Correlacionar el contenido fenólico de los frutos de acachul con su capacidad antioxidante.

Marco Teórico

El género *Ardisia* consta de aproximadamente 500 especies, de las cuales han sido aislados diversos metabolitos de interés alimenticio y farmacológico. Particularmente, *A. compressa* K., ha demostrado ejercer diferentes actividades biológicas (Kobayashi y De Mejía, 2005). Alonso-González *et al.* (2014), demostraron que los extractos acuosos de las hojas de sus hojas poseen actividad hipoglucemiante, además de presentar actividad antioxidante en el hígado, riñón y páncreas de ratas con diabetes tipo 2. Además, contiene compuestos bioactivos con potencial anticancerígeno. Por ejemplo, la administración de una infusión de las hojas ejerció una acción preventiva contra la citotoxicidad y genotoxicidad inducida por benomil en cultivos celulares de hepatocitos de ratas (Ramírez-Mares *et al.*, 1999). Asimismo, se observó que en ratas Wistar expuestas intraperitonealmente a dietilnitrosamina y acetilaminofluoreno, la administración de una infusión de las hojas previno la formación de tumores hepáticos (González De Mejía *et al.*, 2004). También se ha demostrado que los extractos acuosos de las hojas ejercen un efecto citotóxico en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer, como el colorrectal en células HT-29 y Caco-2 (González De Mejía *et al.*, 2006) y en el carcinoma hepatocelular en células HepG2 (Newell *et al.*, 2010).

Por otro lado, la ardisina aislada de *A. compressa* K. posee actividad antioxidante y antitumoral en modelos animales (González De Mejía *et al.*, 2002). La preincubación de ardisina con hepatocitos de rata, usado como control epigalocatequina, presentó propiedades antioxidantes que se manifestaron por el incremento de glutatión combinado, la reducción de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa y la formación de malondialdehído (Ramírez-Mares y González De Mejía, 2003).

Adicionalmente, la ardisina también ha mostrado una potente inhibición de la actividad catalítica de las topoisomerasas I y II (Ramírez-Mares *et al.*, 2004).

Metodología de Investigación

Tipo de Investigación

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 4 replicas experimentales y 3 repeticiones.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Los frutos maduros de acachul fueron colectados al azar, durante el mes de abril de 2017, en el municipio de Xicotepec de Juárez, Puebla. La accesión (A1) fue colectada en la zona centro de la ciudad de Xicotepec (843 msnm), los arbustos se encontraban sin manejo cultural. Otras dos accesiones fueron colectadas en la localidad de Mecatlán (750 msnm) (A2 y A3); las plantas de A2 estaban bajo condiciones de abono inorgánico (dosis 18-12-06).

Acondicionamiento de la muestra

Los frutos de acachul fueron trasladados al laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma Chapingo para su análisis. Después se ultracongelaron a -80 °C durante 24 h. Posteriormente, fueron liofilizados (-49 °C, 0.016 mBar por 48 h). La pulpa y cáscara fueron molidas en un nutrebulet hasta obtener un polvo, el cual se conservó en ausencia de luz y humedad hasta su análisis.

Obtención de extractos polares

La muestra de los frutos molidos (0.1 g) fue suspendida en 10 mL de una mezcla de metanol/agua (4:1 v/v), el pH se ajustó a 3.0 con ácido clorhídrico (HCl) al 10 %.

La extracción se llevó a cabo por agitación en vórtex (5 min, a 3000 rpm, Vórtex synergy, WVR International), sonicación (15 min) (Ultrasonic Cleaner 8890, Cole Parmer), incubación (30 min, 30 °C) (Orbital Prendo INO-650 M). Finalmente la mezcla fue centrifugada (1277 g, 15 min) (SOLBAT J-600, México) y los sobrenadantes fueron recuperados y aforados a 10 mL con el disolvente empleado para la extracción, conservándose en frascos ámbar y refrigerados (4 °C) para el análisis posterior de fenoles totales y capacidad antioxidante (Wang *et al.*, 2010). Cada muestra se procesó por triplicado.

Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales (CFT) fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) adaptado a microplacas. En cada pozo de una microplaca se mezclaron: una alícuota de la muestra a analizar (25 µL), agua destilada (125 µL), el reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 con agua destilada (20 µL) y Na₂CO₃ al 20 % (30 µL). La mezcla fue agitada y se dejó reposar durante 30 min en ausencia de luz, se leyó a 765 nm en un lector de microplacas multidetector con inyectores Synergy® HT, equipado con el software Gen5 de análisis de datos (Biotek Instruments Inc., Winoosky, VT, USA). La curva de calibración del ácido gálico se preparó en un rango de concentración de 0.001 a 0.01 mg mL⁻¹. La ecuación obtenida de la curva fue utilizada para determinar el CFT en las muestras de acachul. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG g⁻¹_{bs}).

Determinación de antocianinas

Se prepararon dos muestras de 0.1 g cada una (por triplicado), de los frutos liofilizados y molidos.

La primera muestra se disolvió en 5 mL de una disolución buffer pH 1; la segunda muestra se disolvió en 5 mL de una disolución buffer pH 4.5 (Lee *et al.*, 2005). Ambas muestras se agitaron en vórtex (15 min) y fueron centrifugadas (15 min, 2500 rpm). Se tomó una alícuota de 100 µL del sobrenadante y se colocó en un pozo de la microplaca, posteriormente se midió la adsorbancia absorbancia a 510 y 750 nm en un lector de microplacas. La concentración de pigmentos de antocianinas, se expresó como miligramos equivalentes de cianidina 3-glucósido por gramo de muestra en base seca (mgEc-3-G g⁻¹_{bs}), fue calculada como sigue:

Pigmento de antocianina (Equivalentes

$$\begin{aligned} &\text{de cianindina 3 – glucosido, mg } L^{-1} \\ &= (A * PM * FD * 103)(\epsilon \\ & * 0.38) \end{aligned}$$

Dónde:

- $A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 1.0 - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 4.5$
- $PM = 449.2 \text{ g mol}^{-1}$ de cianidina 3-glucósido
- $FD =$ Factor de dilución establecido.
- $\epsilon =$ Coeficiente de extinción molar de cianidina 3-glucosido ($26\,900 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
- $10^3 =$ factor de conversión de g a mg
- $0.38 \text{ cm} =$ longitud de trayectoria, factor de corrección por uso de microplacas.

Determinación de la capacidad antioxidante

Ensayo ABTS

El ensayo ABTS descrito por Re *et al.* (1999) adaptado a microplacas fue utilizado para medir la capacidad antioxidante en extractos de frutos de acachul. La disolución ABTS^{•+} se generó por la reacción de ABTS (7.4 mM) y persulfato de sodio (2.6 mM). Esta disolución se dejó reposar durante 16 h y finalmente fue diluida para obtener una absorbancia entre 0.7 y 1.2, para lo cual se tomaron 600 μL y se aforaron a 10 mL con metanol. Posteriormente, en los pozos de la microplaca se mezclaron 20 μL de muestra o curva patrón y 180 μL de la disolución ABTS^{•+}. Como blanco se emplearon 200 μL de la disolución ABTS^{•+}. La microplaca se agitó y la mezcla de reacción se dejó reposar durante 10 min protegida de la luz, finalmente la absorbancia fue medida a 734 nm en el lector de microplacas. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET g}_{\text{bs}}^{-1}$). La ecuación obtenida de la curva de calibración de Trolox fue utilizada para determinar la capacidad antioxidante de las muestras. El intervalo de la curva de calibración de Trolox fue de 4.99 a 59.93 μM .

Ensayo FRAP

El ensayo FRAP descrito por Benzie y Strain (1996) adaptado a microplacas de 96 pozos, fue utilizado para medir el poder reductor de los extractos de frutos de acachul. Se prepararon las siguientes disoluciones: buffer pH 3.6 (4.624 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 18.2 mL $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), TPTZ (2, 4, 6 Tripiridil-s-triazina) 10 mM en HCl 40 mM y disolución $\text{FeCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. La disolución FRAP fue preparada al momento de su uso mezclando en proporción 10:1:1 la solución buffer, solución TPTZ y $\text{FeCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

En una microplaca se colocaron 20 μL de extracto o de la curva de Trolox, 180 μL de la disolución FRAP y 60 μL de agua destilada, como blanco fueron inyectados 200 μL de la disolución FRAP y 60 μL de agua destilada. Después de 30 s se midió la absorbancia a 600 nm en el lector de microplacas. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET g}_{\text{bs}}^{-1}$). La ecuación obtenida de la curva de calibración de Trolox fue utilizada para determinar la capacidad antioxidante de las muestras. El intervalo de la curva de calibración de Trolox fue de 3.84 a 46.10 μM .

Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza y comparación de medias de tratamientos (Tukey, 0.05) mediante el paquete estadístico SAS (versión 9.4).

Resultados

Cuantificación de Fenoles Totales

Como se observa en Cuadro 1, los frutos de las accesiones A1 y A3, cuyos arbustos no tuvieron manejo agronómico, presentaron el mayor contenido de fenoles totales ($p \leq 0.05$). En un estudio previo de frutos de *A. compressa* K., colectados en San Andrés Tuxtla, Veracruz (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015), se encontró un mayor CFT (8025.2 mg EAG 100 $\text{g}_{\text{bs}}^{-1}$). Sin embargo las accesiones de acachul presentaron mayor CFT que los frutos de arándano, zarzamora y fresa (9.44 ± 0.22 , 5.58 ± 0.18 y 2.72 ± 0.18 mg EAG $\text{g}_{\text{bs}}^{-1}$, respectivamente). Por lo tanto, los frutos de acachul presentan mejor potencial nutraceutico que los berries (arándano, mora y fresa) (Ding *et al.*, 2006; Tulipani *et al.*, 2008).

Accesión	Fenoles Totales (mg EAG g ⁻¹)	Antocianinas (mg cyd g ⁻¹)	ABTS (μmol ET g ⁻¹)	FRAP (μmol ET g ⁻¹)
A1	63.21 a ± 8.6	29.0 a ± 1.47	626.31 a ± 10.6	407.73 a ± 13.5
A2	56.69 b ± 5.7	26.64 a ± 0.69	512.73 b ± 23.2	293.63 c ± 13.4
A3	62.85 a ± 7.5	27.92 a ± 2.05	615.13 a ± 8.1	340.64 b ± 18.7

Tabla 1 Fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante de frutos de *A. compressa* K. de Xicotepec, Puebla

Determinación de antocianinas totales

Los frutos de las accesiones analizadas no presentaron diferencias significativas en el contenido de antocianinas ($p \leq 0.05$), ver Cuadro 1, además se determinó que las antocianinas representan entre el 15 y 18 % de los fenoles totales (Fig. 1). El contenido de antocianinas totales en frutos de acachul es similar a encontrado en zarzamora, grosella negra y arándano (2669.7 ± 190.7 , 2071.1 ± 94.9 y 2108.1 ± 177.7 mg EVC $100 \text{ g}_{\text{bs}}^{-1}$, respectivamente) (Lee, *et al*, 2015). Todas las accesiones de acachul presentaron mayor contenido de antocianinas totales en comparación con arándano, zarzamora y fresa (24.38 ± 0.75 , 3.99 ± 0.08 y 1.16 ± 0.12 mg EC $\text{g}_{\text{bs}}^{-1}$, respectivamente).

Capacidad antioxidante

Los resultados obtenidos por el ensayo ABTS indican que los frutos con mayor capacidad antioxidante corresponden a las accesiones A1 y A3, lo cual coincide con su mayor contenido fenólico (Cuadro 1). En el ensayo FRAP se obtuvieron diferencias significativas entre las accesiones analizadas, donde la A1 presentó mayor CA y los frutos A3 la menor. Con los dos métodos empleados para la determinación de la actividad antioxidante de las frutas se mostraron valores altos, lo cual podría estar relacionado con el alto contenido fenólico y de antocianinas (Fig. 2).

Todas las accesiones de acachul analizadas presentaron mayor capacidad antioxidante que arándano, zarzamora y fresa (14.98 ± 0.49 , 11.48 ± 1.32 y 4.44 ± 0.45 mmol ET $100 \text{ g}_{\text{bs}}^{-1}$, respectivamente) analizadas por el ensayo ABTS (Huang *et al.*, 2012).

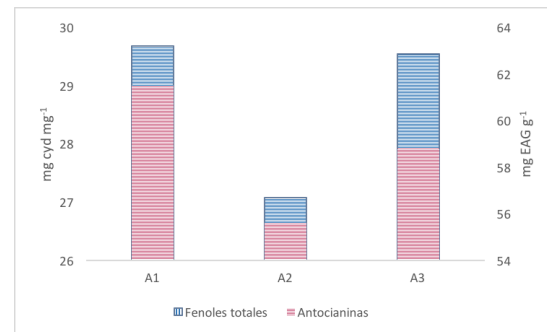


Figura 1 Contenido de fenoles totales y antocianinas en frutos de *A. compressa* K..

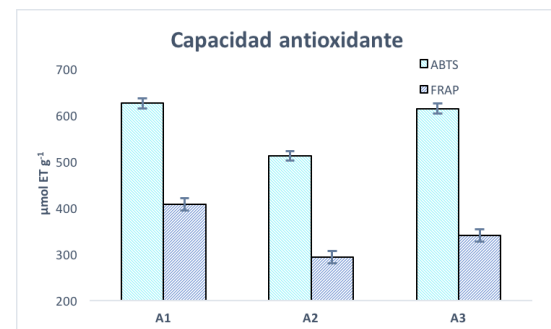


Figura 2 Capacidad antioxidante en frutos de *A. compressa* K. por los ensayos ABTS y FRAP

Conclusiones

A. compressa K. tiene un alto valor nutraceutico ya que sus frutos son una fuente rica de principios bioactivos como las antocianinas y fenoles, por lo que podría ser aprovechado como un ingrediente para obtener alimentos funcionales.

Agradecimiento

Al Dpto. de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, en especial al Dr. Benito Reyes Trejo, responsable del laboratorio de Productos Naturales por la facilidades otorgadas; a la UT de Xicotepec de Juárez, especialmente al M. en A., Leonardo I. Pérez Escamilla, por el tiempo brindado para la realización de este proyecto.

Referencias

- Benzie, I. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292
- Ding, M., Feng, R., Wang, S.Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B.H. & Shi X., (2006). Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J. Biol. Chem.*, 281(25):17359-17368. doi:10.1074/jbc.M600861200.
- González De Mejía, E., Ramírez-Mares M.V. & Nair M.G. (2002). Topoisomerase I and II enzyme inhibitory aqueous extract of *A. compressa* K. and ardisin protect against benomyl oxidation of hepatocytes. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 7714-7719.
- González De Mejía, E., Ramírez-Mares M.V., Arce-Popoca E., Wallig M. & Villa-Trevino S., (2004). Inhibition of liver carcinogenesis in Wistar rats by consumption of an aqueous extract from leaves of *A. compressa* K.. *Food Chem. Toxicol.* 42: 509- 516.
- González De Mejía, E., S. Chandra, M.V. Ramírez-Mares & Wang W., (2006). Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *A. compressa* K. extracts and their effect on human colon cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1191-1203.
- Gulcin I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Arch. Toxicol.* 86 345–391.
- Halliwell B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* 401 1–11.
- Halliwell B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97 1634–1658.
- Huang, W. Y., Zhang, H. C., Liu, W. X., & Li, C. Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 13(2), 94-102. doi:10.1631/jzus.B1100137
- Ibarra-Manríquez, G. & Tenorio-Cornejo, G. (2010). Diversidad de frutos de los árboles del bosque tropical perennifolio de México. *Acta Botánica Mexicana*, 90, 51–104.
- Kobayashi, H. & De Mejia E., (2005). The genus *Ardisia*: A novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals. *J. Ethnopharmacol.*, 96: 347- 354.
- Lee, S. G., Vance, T. M., Nam, T. G., Kim, D. O., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2015). Contribution of Anthocyanin Composition to Total Antioxidant Capacity of Berries. *Plant Foods Hum Nutr*, 70(4), 427-432. doi: 10.1007/s11130-015-0514-5
- Naczek, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 95-111.
- Newell, A.M.B., Yousef, G. G., Lila, M.A., Ramírez-Mares M.A. & González de Mejia E. (2010). Comparative in vitro bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 130. 536–544

Ramírez-Mares, M.V. & De Mejía E.G, (2003). Comparative study of the antioxidant effect of ardisin and epigallocatechin gallate in rat hepatocytes exposed to benomyl and 1-nitropyrene. *Food Chem. Toxicol.*, 41: 1527-1535.

Ramirez-Mares, M.V., Chandra S. & De Mejía, E.G. (2004). In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *A. compressa* K. tea extracts and selected polyphenols. *Mutat. Res.*, 554: 53-65.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-1237.

Saeed, N., Khan, M.R. & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L., BMC Complement. Altern. Med. 12) 221.

Sarikurkcü, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G. & Mete, E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. Fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 47 (10), 2479–2483.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., de Vos, C.H.R., Capanoglu, E., Bovy, A. & Battino, M., (2008). Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *J. Agric. Food Chem.*, 56(3):696-704. doi:10.1021/jf0719959.

Wang, W., Bostic, T. R., & Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, 122(4), 1193-1198. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.114>