

20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones
**Evaluación de la Bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes de la planta
aromática: Tomillo limón**

Ramírez Garay, Elba Lucia; elbilu_ramirez@hotmail.com

Facultad de Ciencias y Tecnología

Universidad Nacional de Itapúa

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes del tomillo limón (*Thymus x citriodorus* L.). Para eso se realizaron simulaciones *in vitro* del proceso de digestión gástrica y gastrointestinal, evaluando la cantidad de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.

Estos extractos permitieron evaluar la cantidad de compuestos bioactivos que se consiguió solubilizar de la matriz de la planta a lo largo del proceso de digestión (fracción bioaccesible). Para tener una idea del potencial antioxidante de la planta, los extractos obtenidos por simulación del proceso digestivo fueron siempre comparados con extractos preparados con etanol 70%.

La actividad antioxidante fue evaluada a través de la capacidad de secuestro de radicales DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y de la especie reactiva de oxígeno anión superóxido (O₂•⁻).

Se detectó actividad antioxidante en todos los extractos del tomillo. Sin embargo, la actividad antioxidante después de la simulación de la digestión gastrointestinal fue estadísticamente inferior a la obtenida en los extractos etanólicos. Esta diferencia sugiere que la simulación de la digestión gastrointestinal pudo haber originado una pérdida de compuestos bioactivos o que, en esas condiciones, los compuestos bioactivos no hayan sido extraídos de la matriz de la planta. No obstante, a pesar de ser inferior a la de los extractos en etanol, la actividad antioxidante obtenida después de la simulación de la digestión sugiere que el tomillo todavía puede desempeñar un papel importante en la defensa antioxidante, en particular actuando en la desactivación de especies reactivas de oxígeno que se puedan formar en el aparato digestivo.

Palabras clave: Bioaccesibilidad, Tomillo limón, Actividad antioxidante, Digestión gastrointestinal.

Introducción

Las plantas aromáticas, especias y extractos vegetales son productos generalmente reconocido como seguros (GRAS) una vez que son desde hace mucho tiempo usados en alimentos para conferir sabor y ayudar en la conservación (Shan *et al.*, 2007; Tiwari *et al.*, 2009).

Entre estas plantas aromáticas se encuentra el tomillo limón (*Thymus citriodorus* L.) que es un híbrido entre el tomillo poleo (*Thymus pulegioides*) y el tomillo común (*Thymus vulgaris*). Es una de las Lamiáceas ampliamente cultivadas en la región del Mediterráneo siendo utilizada hace siglos en la medicina y en la cocina tradicional como condimento en los alimentos (Pereira *et al.*, 2013). En Portugal son muy utilizada las hojas frescas o secas para condimentar comidas cocidas, ensaladas y salsas, se consumen como infusión y se producen jarabes para ingrediente de bebidas refrescantes. Es una de las plantas aromáticas que más se cultivan de norte a sur de ese país con un 41% de producción registrado en el año 2009 (Morujo, 2012).

Numerosos estudios han sido realizados con el objetivo de evaluar las propiedades bioactivas de las plantas aromáticas, principalmente sus propiedades antioxidantes, bien como el de identificar los componentes de estas plantas que son

responsables por esa actividad. La función antioxidante de varios compuestos bioactivos en los alimentos ha atraído mucho la atención debido al papel que estos pueden tener en la prevención de varias enfermedades crónico-degenerativas. Recientemente, fue afirmado que el efecto benéfico de los alimentos sobre la salud humana puede relacionarse con la actividad antioxidante de compuestos bioactivos presentes en ellos (Gülçin, 2012).

Los compuestos bioactivos son definidos como componentes de los alimentos que influyen en la actividad fisiológica o celular, resultando en un efecto benéfico para la salud (Kris-etherton *et al.*, 2004). Estos compuestos no son nutrientes porque no son esenciales para la vida y generalmente se encuentran en pequeñas cantidades en los alimentos. Sin embargo, diversos estudios epidemiológicos sugieren que los compuestos bioactivos contribuyen para reducir el riesgo de varias enfermedades (Kris-etherton *et al.*, 2002).

Las plantas aromáticas y las especias son ricas en polifenoles, en particular flavonoides, terpenoides, y otros compuestos volátiles. Muchos de estos compuestos poseen actividad antioxidante (Gulluce *et al.*, 2007).

Diversos estudios muestran que los alimentos derivados de plantas son ricos

en compuestos bioactivos. Gran parte de esos estudios se basa en ensayos *in vitro*, que simulan el proceso de digestión gastrointestinal donde posteriormente el compuesto presenta una determinada actividad, pero para que eso suceda es necesario que ese compuesto sea solubilizado de la matriz del alimento durante la digestión y que no sea degradado en ese proceso, quedando así biodisponible. A continuación es necesario que ese compuesto sea absorbido por las células del intestino y que no sea rápidamente inactivado por las enzimas de biotransformación humana.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes presentes en el tomillo limón.

Objetivos específicos

- Realizar una simulación *in vitro* de la digestión gástrica, gastrointestinal y la preparación de extracto en etanol 70% (actividad antioxidante total).
- Cuantificar los compuestos fenólicos totales en el extracto etanólico y en las muestras obtenidas después de la simulación de la digestión gástrica y gastrointestinal.
- Determinar la capacidad antioxidante en el extracto etanólico y en las muestras obtenidas después de la simulación *in vitro* de

la digestión gástrica y gastrointestinal, de modo a conferir cual es el impacto del proceso digestivo en las propiedades bioactivas del tomillo limón.

Materiales y Métodos

Reactivos y enzimas

Fueron utilizados los siguientes reactivos y enzimas; ácido ascórbico (Fisher Chemical), ácido gálico (Alfa Aesar, 99%), ácido clorhídrico (Panreac, 37%), alcohol etílico (Sigma-Aldrich, 99,8%), azul de nitrotetrazólio (NBT) (Sigma-Aldrich, 98%), bílis bovina deshidratada (Fluka Analytical), carbonato de sodio (Applichem Panreac, 99,5%), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) (Aldrich), etanol (Sigma-Aldrich, 99,8%), (NADH) nicotiamida adenina dinucleotídeo (Amresco), pancreatina de páncrea porcina (Sigma), pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma), reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck).

Preparación de muestras de la planta aromática.

Las muestras frescas fueron adquiridas comercialmente del supermercado.

Las plantas de tomillo limón fueron lavadas con agua corriente y se dejaron secar al abrigo de la luz y a temperatura ambiente. Una vez secas se retiraron las raíces, los tallos y las hojas marchitas y las hojas verdes fueron cortados finamente.

Preparación del extracto etanólico.

Para el extracto etanólico se pesaron las hojas de tomillo limón finamente cortado y se adiciono etanol 70% (p/v) en una proporción de 20 g de muestra para 100 mL de solvente. La muestra fue homogenizada con Ultra-turrax (T18, IKA) y posteriormente agitada con agitador en placa por 24 horas a temperatura ambiente. Luego el extracto fue centrifugado durante 30 minutos a 11000 g y a 4 °C, el sobrenadante fue recogido y distribuido en tubos eppendorf estériles (1,3 mL de extracto en cada tubo) siendo congelado hasta su posterior análisis.

Simulación *in vitro* de la digestión gástrica y gastrointestinal.

Para la simulación de la digestión gástrica se siguió el procedimiento descrito por (Gião *et al.*, 2012). Así a los 10 g de hojas finamente cortadas de tomillo limón se le adicionaron 50 mL de agua, ajustándose el pH a 2,0 con HCl 1 M. Esta mezcla fue totalmente homogenizada en un Ultra-turrax (T18, IKA), adicionándose posteriormente 50 µL de solución de pepsina (25 mg/mL en HCl 0,1 M) por cada mililitro de muestra. Luego fueron incubadas en una incubadora orbital (Innova 4000 – Incubator Shaker), durante dos horas, con una agitación de 100 rpm y una temperatura de 37 °C. Al final de la incubación las muestras fueron centrifugadas (30 minutos a 11 000 g), siendo los sobrenadantes recogidos y

distribuidos en tubos eppendorf (1,3 mL de extracto en cada tubo) y almacenados a -20 °C.

Con respecto a la simulación de la digestión gastrointestinal se siguió el procedimiento descrito por (Gião *et al.*, 2012). La muestra también fue preparada conforme a lo descrito para la digestión gástrica. Posterior a la incubación con pepsina, se ajustó el pH de la muestra a 6,0 utilizando solución de NaHCO₃ 1M y se adicionó 250 µL de una solución mixta de pancreatina y bilis bobina (2 mg/mL de pancreatina y 12 mg/mL de bilis en NaHCO₃ 0,1 M) por cada mililitro de muestra. Luego fueron incubadas en una incubadora orbital (Innova 4000 – Incubator Shaker), durante dos horas, con una agitación de 100 rpm y una temperatura de 37 °C. Al final de la incubación las muestras fueron centrifugadas (30 minutos a 11 000 g), siendo los sobrenadantes recogidos y almacenados a -20 °C para su posterior análisis.

Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado por el método Folin–Ciocalteu, siguiendo una adaptación ya publicada por (Koşar *et al.*, 2008) con algunas modificaciones. Se adicionó 50 µL de la muestra con 3 950 µL de agua destilada y 250 µL de reactivo Folin–Ciocalteu. Posteriormente fue adicionado

750 μL de solución de carbonato de sodio 20% (peso/volumen). Las muestras fueron incubadas durante dos horas, a 25°C y en la oscuridad, después de ese tiempo la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm.

La concentración de fenoles totales fue determinado por interpolación de una recta de calibración utilizando ácido gálico como patrón (50 – 500 mg/L). Los resultados obtenidos fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por litro de extracto.

Determinación de la Actividad antioxidante DPPH

La capacidad antioxidante a través del ensayo de DPPH fue analizada de acuerdo con el método adaptado por (Micelli *et al.*, 2009). Así se mezclaron 500 μL de la muestra, con 3 mL de solución de DPPH• (24 mg/L en etanol). La mezcla fue agitada, midiéndose posteriormente la absorbancia a 517 nm (espectrofotómetro SPEKOL 1500) después de 30 minutos de incubación en oscuro y a temperatura ambiente. El porcentaje de secuestro fue determinado a través de la ecuación;

$$\% \text{Inhibición} = [(\text{Absorbancia sin muestra} - \text{Absorbancia con muestra}) / (\text{Absorbancia sin muestra})] \times 100$$

La capacidad de secuestro del radical DPPH• de la muestra fue determinada por interpolación de una recta de calibración

utilizando ácido ascórbico como patrón (0,14 mg/mL - 0,004375 mg/mL). Los resultados obtenidos fueron expresados en mg de equivalentes de ácido ascórbico/litro de extracto.

Secuestro del radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

La capacidad de la muestra para secuestrar el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) fue evaluada de acuerdo con el método descrito por (Royer *et al.*, 2011). Se adicionó 1 mL de la muestra, 1 mL de NADH 0,48 mM, 1 mL de NBT²⁺ 100 μM y por último, para iniciar la reacción se adicionó 100 μL de PMS 60 μM . Las muestras fueron incubadas en estufa a 30 °C, durante 15 minutos para finalmente medir la absorbancia a 560 nm. La actividad antioxidante fue determinada por interpolación de una recta de calibración con ácido gálico como patrón (0-73 μM).

El porcentaje de inhibición de la formación de azul de formazano fue evaluada a través de la expresión;

$$\% \text{Inhibición} = [(\text{Absorbancia sin muestra} - \text{Absorbancia con muestra}) / (\text{Absorbancia sin muestra})] \times 100$$

Los resultados fueron expresados en μmol equivalente de ácido gálico por litro de extracto.

Análisis estadística de los datos

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos fue efectuado recurriendo al *software* Microsoft Office Excel 2010® (Microsoft Corporation, Washington). En todos los test-t elaborados fue utilizado un nivel de significancia de 0,05, siendo que si $P < 0,05$ existen diferencias significativas entre las muestras.

Resultados y Discusión

Determinación de fenoles totales

A través del método Folin-Ciocalteu, fueron determinados los compuestos fenólicos totales, expresados en mg equivalente de ácido gálico por litro de extracto (Tabla A).

Tabla A. Compuestos fenólicos totales (media \pm desviación estándar) en los extractos etanólicos y en los extractos obtenidos por simulación de la digestión gástrica y gastrointestinal del tomillo limón.

Planta	Compuestos fenólicos totales (mg eq ác.gálico/L)		
	Extracto Etanólico	Digestión Gástrica	Digestión Gastrointestinal
Tomillo limón	1973 ^a ± 209	690 ^c ± 68	1058 ^b ± 42

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con el test t ($p < 0,05$). Las letras minúsculas significan diferencias significativas entre los diferentes extractos.

Los resultados arrojaron que a pesar de que la solubilización de los compuestos fenólicos no fue completa, siendo que el extracto en etanol fue el que presentó una concentración más elevada, un gran porcentaje de los compuestos fenólicos totales presentes en el tomillo limón

consigue ser solubilizada durante la digestión gastrointestinal.

Se verificó que el 35% de los compuestos fenólicos se solubilizaron durante la digestión gástrica, aumentando a 54% al final de la digestión total.

De acuerdo con lo descrito en diversos estudios, los compuestos fenólicos pueden ser o no extraídos o ser sensibles a las condiciones de digestión (Chiang *et al.*, 2013; Nimalaratne, 2015; Tagliacruz *et al.*, 2010). Algunos estudios realizados indican que las diferentes estructuras de los compuestos fenólicos le confieren un punto diferencial en lo que dice respecto a su comportamiento en el proceso digestivo. De esta forma, de acuerdo a su estructura, las pérdida pueden variar desde lo negligenciado hasta la degradación casi total (Gião *et al.*, 2012).

También se observó que el mayor porcentaje de compuestos fenólicos fue solubilizada durante la fase gástrica (cerca de 60 a 65% del total de compuestos fenólicos solubilizados durante la simulación de la digestión). Así, los compuestos fenólicos sometidos al proceso digestivo estaban presentes a partir de estómago, indicando que la digestión gástrica libera los compuestos funcionales de la matriz alimentaria, esto es, los vuelve bioaccesibles. A par de ser principalmente en el estómago que la extracción de los compuestos fenólicos

ocurre, el intestino también tiene la capacidad de liberarlos.

El aumento del contenido en compuestos fenólicos totales entre la fase final de digestión gástrica y la fase final de digestión gastrointestinal sugiere que esta transición facilita la liberación de los compuestos fenólicos de la matriz del alimento en el que está inserido, lo que puede ser explicado por el cambio de pH, por el efecto de las enzimas digestivas intestinales (Ribeiro, 2016), y principalmente en este ensayo, por el tiempo adicional de extracción, una vez que la realización de la etapa intestinal implica una duplicación del tiempo de extracción.

Determinación de la Actividad antioxidante.
Secuestro del radical DPPH*

El ensayo de secuestro del radical do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) determina la actividad antioxidante, expresada en mg equivalentes de ácido ascórbico/L de extracto. Los resultados obtenidos para los diferentes extractos se encuentran en la Tabla B.

Tabla B Actividad antioxidante (media \pm desviación estándar) detectada por el ensayo DPPH en los extractos etanólicos y en los extractos obtenidos por simulación de la digestión gástrica y gastrointestinal del tomillo limón.

mg Eq de ácido ascórbico/L de extrato

Planta	Extracto Etanólico	Digestión Gástrica	Digestión Gastrointestinal
--------	--------------------	--------------------	----------------------------

Tomillo limón	1559,24 ^a \pm 2,05	58,49 ^c \pm 2,37	71,99 ^b \pm 1,26
----------------------	------------------------------------	----------------------------------	-------------------------------

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con el test t ($p < 0,05$). Las letras minúsculas significan diferencias significativas entre los diferentes extractos.

Del total de compuestos presentes en las muestras con capacidad de secuestrar el radical DPPH*, apenas una pequeña fracción se encuentra soluble y activa al final de la digestión gástrica y gastrointestinal. Con efecto, en el tomillo limón se verificó que la actividad antioxidante al final del paso gástrico y gastrointestinal fueron muy bajos, cerca de 4% y 5% respectivamente en comparación de la actividad del extracto etanólico.

La cantidad de compuestos antioxidantes solubilizada durante la etapa gástrica tuvo un peso muy superior (cerca del 81%) en el total de antioxidantes solubilizados que en el transcurso de la digestión gastrointestinal. Tal y como fue referido anteriormente, la diferencia de resultados obtenidos en ambas etapas de la digestión puede deberse a las diferencias de pH, tiempo de extracción y a las actividades de varias enzimas que iban siendo adicionadas. Todos estos factores pueden interferir con la solubilización de los compuestos o con su estabilidad y actividad.

La baja actividad antioxidante que se verifica en los extractos obtenidos por simulación de la digestión en relación al

extracto etanólico puede resultar, por un lado, de una diferencia en la solubilización de los compuestos antioxidantes que resultan de las diferentes condiciones en que estos extractos son realizados. Por otro lado, esta diferencia también puede reflejar una menor estabilidad de los compuestos fenólicos en las condiciones de digestión. Con efecto, las condiciones de digestión pueden transformar los compuestos fenólicos en diferentes formas estructurales, siendo que estas diferencias pueden originar resultados de actividades antioxidantes distintos (Ribeiro, 2016).

Algunos autores analizaron la actividad antioxidante de algunas plantas de la familia de las Lamiaceae, incluyendo el tomillo, y atribuyeron su actividad de secuestrar el radical DPPH[•] a los compuestos fenólicos, en particular, a los flavonoides (Economou *et al.*, 1991; Spiridon *et al.*, 2011; Škerget *et al.*, 2005).

Determinación de la actividad antioxidante por secuestro del radical anión superóxido. La capacidad de secuestro del radical anión superóxido es un ensayo con elevada relevancia biológica dada la posibilidad de formación in vivo de este radical. Los valores del radical anión superóxido de las muestras analizadas se encuentran en la tabla C.

Tabla C Actividad antioxidante (media \pm desviación estándar) detectada por el ensayo de secuestro de radical superóxido en los extractos etanólicos y en los extractos obtenidos por simulación de la digestión gástrica y gastrointestinal del tomillo limón.

Planta	Capacidad de secuestro de O ₂ ^{-•} (mmol eq. de ác.gálico/L de extracto)		
	Extracto Etanólico	Digestión Gástrica	Digestión Gastrointestinal
Tomillo	90,61 ^a \pm	27,52 ^c \pm	63,05 ^b \pm 6,67
limón	18,41	2,55	

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con el test t ($p < 0,05$). Las letras minúsculas significan diferencias significativas entre los diferentes extractos.

Todas las muestras presentaron capacidad de secuestrar el radical anión superóxido. Se verificó una vez más, que la actividad antioxidante después de la simulación de la digestión fue inferior al del extracto etanólico y que esta actividad aumentó durante la etapa gastrointestinal. Así, la capacidad de secuestro del radical superóxido al final del paso gástrico representó cerca del 44% de la actividad de secuestro registrado al final de la digestión total.

Al final de digestión gástrica la capacidad de secuestro del radical fue cerca de 30% de la actividad antioxidante del extracto etanólico, habiendo este valor aumentado a 70% al final de la digestión total. Esta capacidad de secuestrar el radical puede atribuirse a los compuestos fenólicos presentes que contribuyen para esta actividad, en particular a la presencia de algunos compuestos específicos.

Conclusiones

Todos los extractos del tomillo limón en estudio poseen capacidad antioxidante en

los dos ensayos efectuados. Sin embargo, la actividad antioxidante después de la simulación de la digestión fue estadísticamente inferior a la obtenida en el extracto etanólico. Lo que apoya la hipótesis de que la extracción con solvente puede no ser el mejor método para evaluar las actividades biológicas, en particular la actividad antioxidante de los alimentos. En los ensayos efectuados la actividad antioxidante detectada en ambas fases de la digestión fue inferior a la del extracto etanólico, esto apunta al sentido de que la digestión gastrointestinal no consiguió extraer todo el potencial antioxidante de esta planta o llevar a la destrucción de algunos de sus compuestos bioactivos, por lo que la actividad antioxidante obtenida sugiere que el tomillo limón todavía pueda desempeñar un papel importante en la defensa antioxidante, en particular actuando en la desactivación de especies reactivas de oxígeno que se puedan formar en el aparato digestivo.

Bibliografía

Chiang, C., Kadouh, H. & Zhou, K., (2013). Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion. *Food Science and Technology*, **51(2)**: 417-422.

Economou, K. D., Oreopoulou, V. & Thomopoulos, C. D., (1991). Antioxidant activity of some plant extracts of the family

Labiatae. *Journal of American Oil Chemists Society*, **68**: 109-113.

Gião, M., *et. al.*, (2012). Effect of *in vitro* digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia sp.* and *Satureja Montana*. *Food Chemistry*, **131**: 761-767.

Gülçin, I., (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, **86**: 345-391.

Gulluce, M. *et. al.*, (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. *Food Chemistry*, **103(4)**:1449-1456.

Koşar, M., Göger, F. & Başer, K. H. C., (2008). *In Vitro* Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 2369-2374.

Kris-etherton, P. M., *et. al.*, (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, **113 (suppl)**: 71-88.

Kris-etherton, P. M., *et. al.*, (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The antioxidant and antiinflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, **24**: 511-538.

Micelli, N., *et. al.*, (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 6570-6577.

Morujo, N. C. (2012). *Epam*. Recuperado el 15 de Julio de 2018, de Empreender na Fileira das plantas aromáticas e medicinais em Portugal: <http://epam.pt/producao-de-pam-em-mpb/>

Nimalaratne, L. A., (2015). Antioxidants in Chicken Egg Yolk: Effects of Cooking, Storage and Gastrointestinal Digestion. Edmonton: University of Alberta.

Pereira, O., *et. al.*, (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *Food Research International*, **54**: 1773-1780.

Ribeiro, M., (2016). Influência do processo digestivo na atividade antioxidante de alimentos funcionais. Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, Lisboa, Portugal. 29-43.

Royer, M., Diouf, P. & Stevanovic, T., (2011). Polyphenols content and radical scavenging capacities of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. *Food and Chemical Toxicology*, **49(9)**: 2180-2188.

Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J. D. & Corke, H., (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **117(1)**: 112-119.

Škerget, M., *et. al.*, (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Control*, **15**: 549-557.

Spiridon, I., Bodirlau, R. & Teaca, C., (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Central European Journal of Biology*, **6**: 388-396.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D. & Conte, A., (2010). *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, **120(2)**: 599-606 ref.30.

Tiwari, B. K., *et. al.*, (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57(14)**: 5987-6000.