



Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas

ISSN: 1870-0195

rmcf@afmac.org.mx

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

México

Martínez-Cruz, Nieves del Socorro; Arévalo-Niño, Katiushka; Verde-Star, María Julia; Rivas-Morales, Catalina; Oranday-Cárdenas, Azucena; Núñez-González, Ma. Adriana; Morales-Rubio, Ma. Eufemia
Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora)

Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 42, núm. 4, octubre-diciembre, 2011, pp. 66-71

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57922783007>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Comunicación Técnica

Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora)

Anthocyanins and anti free-radical activity of *Rubus adenotrichus* Schltdl (blackberry)

Nieves del Socorro Martínez-Cruz,¹ Katiushka Arévalo-Niño,² María Julia Verde-Star,³ Catalina Rivas-Morales,³ Azucena Oranday-Cárdenas,³ Ma. Adriana Núñez-González,³ Ma. Eufemia Morales-Rubio¹

¹Departamento de Biología Celular y Genética, Laboratorio de Micropropagación

²Instituto de Biotecnología

³Departamento de Química, Laboratorio de Química Analítica y Fitoquímica
Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Resumen

Se determinó el contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas en extracto metanólico de frutos de *Rubus adenotrichus* así como la capacidad para inhibir radicales libres por métodos colorimétricos. Se cuantificaron e identificaron antocianinas por HPLC. Los resultados de los análisis colorimétricos fueron: fenoles 29.23 ± 1.4 mg equivalentes de ácido gálico (GAE), flavonoides 5.26 ± 0.25 mg equivalentes de catequina (CE) y antocianinas 12.3 mg por cada gramo de fruto seco. Se identificó la antocianina cianidina-3-glucósido con t_R 60.6 min, por este método se obtuvieron 11.5 mg de antocianinas como equivalentes de cianidina-3-glucósido por g de fruto seco. La CE_{50} de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) fue 148 $\mu\text{g/mL}$, el estándar fue vitamina C con una CE_{50} de 18.7 $\mu\text{g/mL}$. El alto contenido de antocianinas en esta especie nos permite recomendar su uso como antioxidante.

Abstract

Phenols, flavonoids and anthocyanins content was determined in the *Rubus adenotrichus*' fruit methanol extract, as well as the ability to inhibit free radicals by colorimetric methods. Anthocyanins were quantified and identified by HPLC. The colorimetric test results were: phenol 29.23 ± 1.4 mg gallic acid equivalents (GAE), flavonoids 5.26 ± 0.25 mg catechin equivalents (CE) and 12.3 mg anthocyanins per each gram of dried fruit. It was identified the cyanidin-3-glucoside anthocyanin with t_R 60.6 min, by this method was obtained 11.5 mg of anthocyanins as the equivalent of cyanidin-3-glucoside per g of dry fruit. The CE_{50} of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was 148 $\mu\text{g/mL}$, the standard was vitamin C with an EC_{50} of 18.7 $\mu\text{g/mL}$. The high content of anthocyanins in this specie allows us to recommend its use as an antioxidant.

Palabras clave: *Rubus adenotrichus* Schltdl, fenoles, antocianinas, HPLC, DPPH

Key words: *Rubus adenotrichus* Schltdl, phenols, anthocyanins, HPLC, DPPH

Correspondencia

M.C.A. Nieves del Socorro Martínez Cruz
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León
Av. Universidad S/N, Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
Tel -Fax: 81-83-294110 Ext 6468
e-mail: nievesmartinezcruz@yahoo.com

Fecha de recepción: 6 de mayo de 2011

Fecha de recepción de modificaciones: 4 de agosto de 2011

Fecha de aceptación: 29 de agosto de 2011

Introducción

Rubus es uno de los géneros más diversos de plantas y se distribuye en todo el mundo, la diversidad de este género se manifiesta en la gran variedad de frutos y su pigmentación.¹ Los frutos de las especies del género *Rubus* contienen compuestos fenólicos a los cuales se les reconoce como agente quimiopreventivos, las antocianinas entran en este grupo,² se ha encontrado una gran variación en el contenido de antocianinas así como en la capacidad antioxidante.^{3,4,5,6} Diversos estudios epidemiológicos indican que el consumo de productos vegetales como frutas y verduras, con altos contenidos de compuestos fenólicos, reducen la propensión a enfermedades cardíacas, cerebrovasculares y disminuyen la tasa de mortalidad por cáncer.^{7,8} Genotipos de *Rubus* de origen mexicano han sido reportados con actividad antioxidante y antiinflamatoria.⁹

En la actualidad hay un interés creciente en los antioxidantes, en particular en aquellos que previenen los efectos nocivos de los radicales libres en el cuerpo humano, existe preferencia por los antioxidantes naturales y no de fuentes sintéticas.¹⁰ En un estudio de tres especies de plantas del género *Rubus* de Etiopía, se reporta una elevada actividad anti radicales libres¹¹, los resultados obtenidos de la actividad antioxidante de estas plantas pueden contribuir a los usos que como agente antidiabético le otorgan en ese país.⁵ *Rubus adenotrichus* es una planta silvestre cuyo fruto es conocido como mora o zarzamora por lo que su uso es a nivel rural, si bien se conocen propiedades de otras especies del mismo género, de ésta existen pocos reportes de sus metabolitos secundarios con actividad antioxidante,^{12,13,14} su hábitat se localiza en zonas montañosas de México, Ecuador y Costa Rica, no se han encontrado reportes de estudios a la población mexicana de esta especie. Es importante el estudio de metabolitos secundarios con actividad anti radicales libres de frutos silvestres para su posible aplicación como nutraceutico en la industria alimenticia, para la formulación de medicamentos así como para la caracterización de fuentes asequibles y con alto contenido de antioxidantes naturales. Por lo anterior el objetivo de este estudio fue determinar el contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas mediante métodos colorimétricos y cromatográficos; así como, la actividad anti radical por el método de DPPH del extracto metanólico de fruto de *R. adenotrichus* colectado en Veracruz, México.

Material y método

Material biológico

La recolección de frutos silvestres de zarzamora se realizó en el mes de julio de 2009 en el municipio de Tlacolulan del estado de Veracruz, México. La muestra se transportó en un termo a -4°C, posteriormente, se congeló a -70°C hasta su liofilización. La identificación taxonómica de la especie fue realizada en el Herbario del Instituto de Ecología en Xalapa, Veracruz, México,

el espécimen fue registrado con el número de voucher XAL-106448 para referencias futuras.

Reactivos químicos

Todas las sustancias químicas utilizadas fueron de grado analítico a menos que se indique lo contrario. Metanol, acetonitrilo, ácido fosfórico, agua y cianidina 3-glucósido (kuromanin) fueron grado HPLC y se obtuvieron en Fluka, Sigma-Aldrich Co.

Preparación de extractos

Los frutos congelados se liofilizaron (liofilizador Labconco freeze dryer 5), después se molieron en una licuadora (Osterizer modelo 4108), obteniéndose 0.8960 g (en balanza analítica). La extracción de las sustancias polares se hizo de acuerdo al método descrito en la literatura¹⁵ con algunas modificaciones, la muestra se depositó en un matraz erlenmeyer, se agregó metanol acidificado (0.01% HCl), posteriormente se agitó durante 15 min a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno y protegido de la luz, se filtró utilizando vacío para recuperar el disolvente, la muestra fue extraída 3 veces más en iguales condiciones. Los extractos se concentraron en rotaevaporador (Büchi RII) a 40°C, el extracto se recuperó totalmente y el volumen se completó a 100 mL en matraz aforado, se centrifugó y el sobrenadante se filtró en una membrana nylon con poro de 0.45 µm, por último, se guardó en un frasco ámbar a -20°C hasta su análisis.

Pruebas de identificación preliminares

Prueba del cloruro férrico

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregaron tres gotas de solución de FeCl₃ 1%, se observó la coloración que apareció inmediatamente y se comparó con un blanco del extracto libre de reactivo y con un blanco de agua destilada con cloruro férrico.¹⁶

Prueba de Shinoda

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregó un trocito de magnesio y 3 gotas de HCl concentrado, se observó la coloración que apareció inmediatamente para determinar la presencia del grupo de benzopirona.¹⁷

Espectroscopia Ultravioleta-Visible

Los fenoles absorben en la región ultravioleta (UV). En el caso de los fenoles de tipo flavonoides se presentan 2 bandas de absorción características:¹⁸ la banda del anillo aromático A con un máximo de absorción en el rango 240-285 nm (banda benzoi) y otra banda del anillo B con máximo de absorción en el rango 300-550 nm (banda cinamoil). Una muestra del extracto se analizó en el espectrofotómetro ultravioleta visible (Beckman Coulter DU 650), se hizo un barrido de 200 a 800 nm de longitud de onda para identificar los grupos funcionales considerando la longitud de onda de máxima absorción.

Identificación y cuantificación de antocianinas por HPLC

La cuantificación e identificación de antocianinas se realizó por HPLC. Se utilizó un equipo SHIMADZU SPD-10AV con detector UV-VIS, y una columna C-18 fase reversa de 250 mm de longitud, diámetro de 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μ m (Phenomenex Gemini). El método,¹⁹ consistió en inyectar 20 μ L de muestra a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 520 nm. Para este análisis se utilizaron dos fases móviles, el disolvente A fue acetonitrilo, el disolvente B fue ácido fosfórico 4% en agua, el gradiente de elución utilizado fue: 0 min 94% B, 55 min 75% B, 65 min 75% B, 70 min 94% B. La velocidad de flujo utilizada fue 1 mL/min, como estándar se utilizó kuromanin chloride (cloruro de cianidina-3-glucósido).

La identificación en el extracto de cianidina-3-glucósido se realizó por comparación del tiempo de retención que presentó el estándar y la muestra utilizando idénticas condiciones para ambos análisis.

Cuantificación de antocianinas por pH diferencial

La cuantificación de antocianinas también se realizó por el método de pH diferencial.²⁰ Este es un método espectrofotométrico que se basa en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras). Se prepararon diluciones del extracto metanólico con solución buffer pH 1.0 de cloruro de potasio y con solución buffer pH 4.5 de acetato de sodio. Se midió la absorbancia de cada muestra a la longitud de onda de máxima absorbancia (λ_{max} =515 nm) y a 700 nm. De la ecuación de Lambert-Beer se obtiene $C=A/\epsilon L$, C es la concentración molar, A es la absorbancia, ϵ corresponde a la absorbancia molar o coeficiente de extinción molar (constante física para especies moleculares en un solvente a una determinada longitud de onda, se pueden utilizar los valores de absorbancia molar para pigmentos purificados tomados de la literatura), L es la longitud de recorrido en cm. La concentración en mg/L puede ser determinada multiplicando por el peso molecular (PM) del pigmento y por el factor de dilución (FD). Para el cálculo del contenido de antocianinas se utiliza el peso molecular y la absorbancia molar del pigmento antociano presente en mayor proporción, en este caso es la cianidina (PM 449.2 y ϵ 26900).

Por lo anterior la concentración de antocianinas monoméricas se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = (A)(PM)(FD)(1000)/\epsilon(1)$$

La absorbancia (A) se calculó de la forma siguiente:

$$A = (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH}=1.0} - (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH}=4.5}$$

La concentración de antocianinas totales se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = A'(PM)(FD)(1000)/\epsilon(1)$$

La absorbancia (A') se calculó como se indica a continuación:

$$A' = (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH}=1.0}$$

Cuantificación de fenoles y flavonoides

Para la cuantificación de fenoles se utilizó una modificación del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. El reactivo Folin-Ciocalteu está formado por una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico que se reducen en presencia de fenoles y forman óxidos azules de tungsteno y molibdeno.^{21,22} La solución estándar fue ácido gálico en una concentración de 400 ppm en metanol y agua destilada 1:1, se prepararon diluciones por triplicado del extracto metanólico y del estándar, de cada una de estas diluciones y del blanco se depositaron 250 μ L en un tubo de ensaye, se agregaron 500 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu recién preparado (dilución 1:10), se mezclaron y se dejaron reposar 5 min, se agregaron 500 μ L de solución de carbonato de sodio (7%), se mezclaron y se dejaron reposar 90 min a 23°C en oscuridad. Posteriormente, se realizó la lectura de la absorbancia a 750 nm. El resultado se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de fruto seco.

La cuantificación de flavonoides se hizo de acuerdo al ensayo colorimétrico del cloruro de aluminio²³, con algunas modificaciones. Se utilizó como estándar una solución de catequina de 400 ppm disuelta en metanol y agua 1:1. Se prepararon diluciones por triplicado del extracto metanólico y del estándar, de cada una de estas diluciones y del blanco se depositó en tubos de ensaye 150 μ L. Se agregaron 40 μ L de solución de NaNO₂ (5%), se homogeneizó y se dejó reposar 5 min, se adicionaron 40 μ L de solución de AlCl₃ (10%), se mezcló y se dejó reposar 1 min, se agregaron 250 μ L de solución de NaOH (1M) y por último se adicionaron 750 μ L de agua destilada, se mezcló y se realizó la lectura de absorbancia a 510 nm. El resultado se expresó como mg de equivalentes de catequina (CE) por gramo de fruto seco.

Actividad antirradical (DPPH)

Para la determinación de la actividad antirradical se utilizó una modificación del método 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).²⁴ Este método evalúa la actividad de las sustancias frente a una solución alcohólica de DPPH de color violeta intenso, cuya intensidad disminuye de acuerdo a la cantidad de sustancias que contenga la muestra con capacidad de neutralizar a este radical libre. La solución de DPPH que se utilizó fue 0.1 mM en etanol, se preparó inmediatamente antes de ser utilizada y se protegió de la luz para evitar su degradación. Como estándar se utilizó solución de vitamina C (1 mg en 1 mL de metanol) protegida de la luz, se prepararon diluciones del estándar y del extracto metanólico.

Se adicionó a cada tubo de ensaye 750 μ L de solución de DPPH y 250 μ L de cada una de las disoluciones de vitamina C ó del extracto. La solución resultante se agitó y se protegió de la luz, se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min, se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm, se utilizó etanol para ajustar a cero la lectura en el equipo. La actividad de eliminación del

radical se reportó como EC_{50} (concentración efectiva media necesaria para reducir el 50% del radical DPPH).

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de regresión lineal y se determinó el coeficiente de correlación para la cuantificación de fenoles, flavonoides, antocianinas y DPPH. Se reportan los valores medios \pm SD de cuatro réplicas.

Resultados y discusión

Pruebas preliminares

Las pruebas de identificación coloridas para fenoles y flavonoides que se realizaron al extracto fueron positivas. El análisis ultravioleta visible del extracto mostró una banda de absorción máxima entre 200 y 300 nm, que corresponde a la banda benzoil o banda II característica para el anillo aromático A de flavonoides, y otra banda a 515 nm que es la banda I o banda cinamoil y corresponde al anillo aromático B de la estructura flavonoide (Figura 1). El desplazamiento de esta última banda a longitud de onda mayor a 500 nm es característica para flavonoides del grupo de las antocianinas,^{25,26} comprobándose así la presencia en la muestra de antocianinas además de otras sustancias fenólicas.

Identificación y cuantificación de antocianinas por HPLC

En el extracto metanólico de *R. adenotrichus* se identificó la antocianina cianidina-3-glucósido por comparación del tiempo de retención del estándar con el pico que presenta la muestra, el t_R fue 60.6 min. Esta antocianina se ha encontrado en *R. adenotrichus* y en *R. glaucus*,¹² en *R. lanciniatus*, *R. idaeus*, *R. ursinus* x *R. idaeus*²⁷ y en varias especies de *Rubus* silvestres.¹ Para la cuantificación se hicieron diluciones del estándar y se construyó la curva de calibración por HPLC, el coeficiente de correlación fue 0.9967. El contenido de antocianinas para esta muestra de *R. adenotrichus* fue 11.5 mg/g de fruto seco. Se ha reportado un contenido de 680 mg de cianidina-3-glucósido en 100 g de materia seca de *R. adenotrichus*,¹² es decir 6.8 mg/g. El contenido que se obtuvo (11.5 mg/g) es 1.7 veces el reportado para la misma especie de Centroamérica¹² y alrededor de 6.5 veces el reportado para *R. idaeus*.²⁸ *R. adenotrichus* presenta un contenido mayor de cianidina-3-glucósido que de las otras antocianinas,¹² el aglicón cianidina muestra una elevada actividad antioxidante en comparación con la delfinina, malvidina, peonidina y petunidina,²⁹ característica que le proporciona al fruto de *R. adenotrichus* propiedades antioxidantes superiores.

Contenido de antocianinas pH diferencial

Las antocianinas también se cuantificaron por el método de pH diferencial, para ello se midió la absorbancia de la muestra diluida (1:10) con soluciones buffer, el resultado fue 12.3 mg de antocianinas/g de fruto seco. Se ha reportado el contenido de antocianinas para 5 especies del género *Rubus* determinado por

el mismo método,²⁷ 4 de estas especies presentaron valores que van de 5.69 a 11.92 mg/g de materia seca y solo *R. occidentalis* presentó un mayor contenido de antocianinas (34.65 mg/g) que el encontrado en este estudio para *R. adenotrichus* (12.3 mg/g).

Cuantificación de fenoles y flavonoides

El contenido de fenoles fue de 29.23 ± 1.4 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de fruto seco. Se ha reportado un contenido de 42.5 mg/g de fenoles para la misma especie colectada en Costa Rica.¹² Los valores reportados²⁷ para cinco especies de este género varían en un rango de 30.94 mg/g a 57.65 mg/g. El contenido de fenoles de la muestra estudiada (29.23 mg/g) es menor que los mencionados anteriormente pero es muy aproximado al contenido reportado para *Rubus lanciniatus* (30.94 mg/g).²⁷ Aunque el contenido de sustancias fenólicas es un indicativo de la actividad antioxidante de una muestra es muy importante analizar el contenido de algunos tipos de fenoles con actividad antioxidante elevada como es el caso de los flavonoides y específicamente de las antocianinas.

El contenido de flavonoides fue 5.26 ± 0.25 mg equivalentes de catequina (CE)/g de fruto seco, la literatura normalmente solo reporta el contenido de fenoles y de antocianinas para frutos del género *Rubus* pero no se reporta el contenido del total de flavonoides por lo cual no fue posible comparar con los presentes resultados.

DPPH

La concentración del extracto de *R. adenotrichus* que neutralizó el 50% de los radicales libres DPPH (CE_{50}) fue $148 \mu\text{g/mL}$, se utilizó como estándar vitamina C y la CE_{50} fue $18.7 \mu\text{g/mL}$. La vitamina C es una sustancia pura con actividad antioxidante muy alta. Los frutos del género *Rubus* presentan una actividad neutralizadora de los radicales libres elevada,^{27,12,13} en los cuales se evaluó esta actividad por un método diferente (Capacidad de Absorbancia del Radical Oxígeno, ORAC), prueba estandarizada y empleada por el Departamento Federal de Agricultura de Norteamérica para medir el potencial antioxidante de alimentos.

Conclusiones

Los frutos que producen las plantas del género *Rubus* son fuente de metabolitos con actividad antioxidante, este estudio contribuye al conocimiento científico de los frutos silvestres de nuestro país al obtener información del contenido de estos metabolitos de trascendencia en el área alimenticia y de salud para el hombre. Los resultados obtenidos muestran que los frutos de *R. adenotrichus* (zarzamora) contienen compuestos fenólicos (29.23 ± 1.4 mg GAE/g de fruto seco) con capacidad de neutralizar radicales libres (CE_{50} fue $148 \mu\text{g/mL}$); aunado al alto contenido de antocianinas (11.5 - 12.3 mg/g de fruto seco) comparado con reportes del mismo género. *R. adenotrichus* contiene metabolitos con un valor potencial para el desarrollo de nutraceuticos y medicamentos; además, se recomienda su

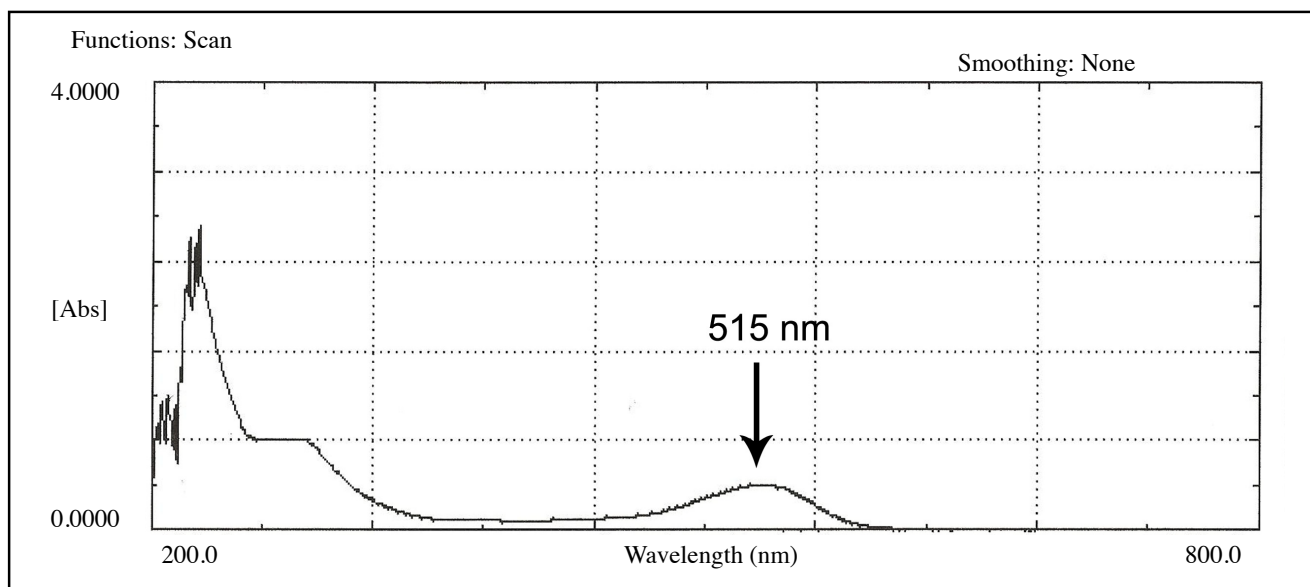


Figura 1. Espectro ultravioleta-visible de extracto metanólico de *R. adenotrichus*. Se observa la banda de absorción a 515 nm característica para antocianinas.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo, becario 46791.

Al Dr. Francisco Gerardo Lorea Hernández director de el Herbario del Instituto de Ecología de Xalapa Veracruz México, por la identificación taxonómica de la planta.

Referencias

1. Deighton N, Brennan R, Finn C, Davies HV. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J Sci Food Agric*. 2000; 80(9): 1307–1313.
2. Seeram NP. Berry fruits for cancer prevention: Current status and future prospects. *J Agric Food Chem*. 2008; 56: 630–635.
3. Garzón GA, Riedl KM, Schwartz SJ. Determination of anthocyanins, Total phenolic content, and antioxidant activity in andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *J Food Sci*. 2009; 74(3): 227–232.
4. Mertz C, Gancel A-L, Gunata Z, Alter P, Dhuique-Mayer C, Vaillant F, Pérez AM, Ruales J, Brat P. Phenolic compounds carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *J Food Compos Anal*. 2008; 22(5): 381–387.
5. Cuevas-Rodríguez EO, Yousef GG, García-Saucedo PA, López-Medina J, Paredes-López O, Lila MA. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated mexican blackberries (*Rubus* spp.). *J Agric Food Chem*. 2010; 58(12): 7458–7464.
6. Jordheim M, Enerstvedt KH, Andersen OM. Identification of cyanidin 3-O- β -(6''-(3-Hydroxy-3-methylglutaroyl) glucoside) and other anthocyanins from wild and cultivated blackberries. *J Agric Food Chem*. 2011; 59(13): 7436–7440.
7. Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischaemic heart disease in a Welsh population of men: the caerphilly study. *Am J Clin Nutr*. 1997a; 65(5): 1489–1494.
8. Hertog MGL, van Poppel G, Verhoeven D. Potentially anticarcinogenic secondary metabolites from fruit and vegetables. En: Tomás-Barberán FA, Robins RJ, editores. *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Oxford: Clarendon Press; 1997b. p. 313–329.
9. Cuevas-Rodríguez EO, Díaz VP, Yousef GG, García-Saucedo PA, López-Medina J, Paredes-López O, Gonzalez de Mejia E, Lila MA. Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(17): 9542–9548.
10. Abdalla AE, Roozen JP. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chem*. 1999; 64(3): 323–329.
11. Tadesse S, Asres K, Veeresham C. Antioxidant activities of three *Rubus* species growing in Ethiopia. *Ethiopian Pharm J*. 2007; 25 (2): 103–110.
12. Mertz C, Cheynier V, Günata Z, Brat P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(21): 8616–8624.
13. Acosta-Montoya O, Vaillant F, Cozzano S, Mertz C, Pérez AM, Castro MV. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl) during three edible maturity stages. *Food Chem*. 2010; 119(4): 1497–1501.

14. Gancel A-L, Feneuil A, Acosta O, Pérez AM, Vaillant F. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Res Int*. 2010; 44(7): 2243 – 2251.
15. Kim DO, Lee CY. Extraction and isolation of polyphenolics. En: Wrolstad RE, editors. *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: Wiley; 2002, p. I.1.2.1 – I.1.2.12.
16. Shriner RL, Fuson RC, Curtin DY. *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*. 1ª. ed. México: Limusa; 1982, p. 143-144.
17. Harborne JB. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. 3a ed. London: Chapman & Hall; 1998, p. 1-32.
18. Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A Review. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(3): 577-599.
19. Nicoué EE, Savard S, Belkacemi K. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(14): 5626-5635.
20. Giusti MM, Wrolstad RE. Unit F1.2: Anthocyanins. Characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE editors. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley and Sons; 2001. p. 1-13.
21. Singleton VL, Rossi Jr JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am J Enol Vitic*. 1965; 16(3): 144-158.
22. Kim DO, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem*. 2003; 81(3): 321-326.
23. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999; 64(4): 555-559.
24. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset E. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Tech*. 1995; 28(1): 25-30.
25. Hong V, Wrolstad RE. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J Agric Food Chem*. 1990; 38 (3): 708–715.
26. Robards K, Antolovich M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst*. 1997; 122(2): 11-34.
27. Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(12): 3495-3500.
28. Spazak B, Merino-Arevalo M, Vander Heyden Y, Krauze-Baranowska M, Maidan M, Fecka I, Glód D, Baczek T. HPLC analysis of polyphenols in the fruits of *Rubus idaeus* L. (Rosaceae). *Nat Prod Res*. 2010; 24(19): 1811-1822.
29. Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(2):502-509.