



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## *ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE LA FRESA (FRAGARIA x ANANASSA) Y SU RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE  
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA.

ALUMNA: Andrea Tarazona Roch

TUTORA ACADEMICO: Eva García Martínez

*Curso Académico: 2019/2020*

VALENCIA, 25 de Noviembre de 2020

# **ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE LA FRESA (*Fragaria x ananassa*) Y SU RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN EN COMPUESTOS BIOACTIVOS.**

A.Tarazona y E. García-Martínez

## **RESUMEN**

En las frutas existen gran cantidad de compuestos fitoquímicos interesantes para ser utilizados con aplicaciones industriales. Estos compuestos parecen deber su bioactividad fundamentalmente a su capacidad antioxidante, que ayuda a la prevención de algunas patologías. Por otra parte, son menos conocidas otras propiedades beneficiosas para la salud relacionadas con la protección frente al daño oxidativo, como es la actividad antiinflamatoria. Dentro de las frutas, la fresa se considera una fuente importante de compuestos bioactivos, siendo los polifenoles los más importantes. En este trabajo se ha realizado un estudio bibliográfico actualizado sobre la composición en compuestos bioactivos de la fresa y su relación sobre las propiedades funcionales de la misma, concretamente sobre su actividad antioxidante y antiinflamatoria. Finalmente se han propuesto diferentes metodologías *in vitro* para determinar ambas propiedades: Ensayo ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), FRAP (Capacidad antioxidante para Reducir el ion Férrico), TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox) y DPPH (2,2 -Diphenyl-1-picrilhydrazil) para determinar la actividad antioxidante; y el método del porcentaje de inhibición de la lisis osmótica de los eritrocitos y de la captación de radicales libres de óxido nítrico en macrófagos murinos para analizar la actividad antiinflamatoria.

**PALABRAS CLAVE:** actividad antiinflamatoria, compuestos bioactivos, actividad antioxidante, fresa, polifenoles.

## **RESUM**

En les fruites hi ha gran quantitat de compostos fitoquímics interessants per a ser utilitzats amb aplicacions industrials. Estos compostos pareixen deure el seu bioactivitat fonamentalment a la seua capacitat antioxidant, que ajuda a la prevenció d'algunes patologies. D'altra banda, són menys conegudes altres propietats beneficioses per a la salut relacionades amb la protecció front al dany oxidatiu, com és l'activitat antiinflamatòria. Dins de les fruites, la maduixa es considera una font important de compostos bioactius, sent els fenòlics els més importants. En este treball s'ha realitzat un estudi bibliogràfic actualitzat sobre la composició en compostos bioactius de la maduixa i la seua relació sobre les propietats funcionals de la mateixa, concretament sobre la seua activitat antioxidant i antiinflamatòria. Finalment, s'han proposat diferents metodologies in vitro per a determinar estes propietats: Assaig ORAC (Capacitat d'Absorció de Radicals d'Oxigen) , FRAP (Capacitat antioxidant per a Reduir l'ió Fèrric) , TEAC (Capacitat antioxidant equivalent a Trolox) i DPPH (2,2 -Diphenyl- 1-picrilhydrazil) per a determinar l'activitat antioxidant; i mètode del percentatge d'inhibició de la lisi osmòtica dels eritròcits i de la captació de radicals lliures d'òxid nítric en macròfags murinos per a analitzar l'activitat antiinflamatòria.

**PARAULES CLAU:** activitat antiinflamatòria, compostos bioactius, activitat antioxidant, maduixa, polifenols.

## **ABSTRACT**

In fruits there are many interesting phytochemical compounds to be used with industrial applications. These compounds seem to owe their bioactivity mainly to their antioxidant capacity, which helps to prevent some pathologies. On the other hand, other beneficial health properties related to protection against oxidative damage, such as anti-inflammatory activity, are less well known. Within fruits, strawberries are considered an important source of bioactive compounds, being phenolics the most important. In this work, an updated bibliographic study has been carried out on the composition in bioactive compounds of strawberry and its relation to its functional properties, specifically on its antioxidant and anti-inflammatory activity. Finally, different *in vitro* methodologies have been proposed to determine both properties: ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity), FRAP (Ferric Ion Reduction Antioxidant Capacity), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) and DPPH (2,2 -Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assays to determine the antioxidant activity; and method of the percentage of inhibition of the osmotic lysis of erythrocytes and of the capture of free radicals of nitric oxide in murine macrophages to analyze the anti-inflammatory activity.

**KEY WORDS:** anti-inflammatory activity, bioactive compounds, antioxidant activity, strawberry, polyphenols.

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>9</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Compuestos bioactivos de la fresa.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Propiedades funcionales de la fresa.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de la fresa .....</b>	<b>13</b>
<b>3.4. Métodos <i>in vitro</i> de análisis de la actividad antioxidante .....</b>	<b>15</b>
3.4.1. Método ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) .....	16
3.4.2. Método FRAP (Capacidad antioxidante para reducir el ion férrico).....	16
3.4.3. Método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) .....	17
3.4.4. Método DPPH.....	17
<b>3.5. Métodos <i>in vitro</i> de análisis de la actividad antiinflamatoria.....</b>	<b>18</b>
3.5.1. Método de porcentaje de inhibición de la lisis osmótica de los eritrocitos .....	19
3.5.2. Método de captación de radicales libres de óxido nítrico en macrófagos murinos.....	19
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>20</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se conoce que muchas de las patologías que afectan a la salud de las personas son consecuencia de procesos inflamatorios y del desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes que se conoce como estrés oxidativo, esto a su vez está relacionado con una amplia variedad de enfermedades crónico-degenerativas (Wootton-Beard et al., 2011).

El consumo de frutas y verduras es esencial en el mantenimiento de la salud no solo por suministrar nutrientes necesarios y esenciales para las funciones del organismo sino, porque muchos de sus metabolitos secundarios tienen diversas actividades funcionales, como por ejemplo actividad antioxidante y antiinflamatoria (Ramos, Romeo, Wärnberg, & Marcos, 2010).

Una sustancia antioxidante es aquella que, encontrándose en bajas concentraciones en comparación a la concentración del sustrato oxidable, previene o retarda su oxidación (Sánchez-Moreno, 2002). Nuestro organismo dispone tanto de un sistema antioxidante endógeno como de otro exógeno. La primera línea de defensa del organismo incluye enzimas antioxidantes como la superóxido-dismutasa, la glutatión-peroxidasa, la glutatión-transferasa y la catalasa, entre otras. En ocasiones, cuando la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) es muy elevada, el sistema antioxidante endógeno no es efectivo por sí solo y necesita antioxidantes exógenos provenientes de la dieta, como la vitamina C, vitamina E, carotenoides, polifenoles y ciertos compuestos organosulfurados (Bellik, et al. 2012; Hadad & Levy, 2012), que principalmente, son compuestos donadores de hidrógeno, quelantes de metales relacionados con la oxidación y captadores de radicales libres (Birquete et al., 2009).

Por otra parte, la inflamación es un mecanismo homeostático que se desencadena ante una agresión en un tejido vascularizado, consta esencialmente de cinco etapas: liberación de mediadores, efecto de los mediadores, llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio, regulación del proceso inflamatorio y reparación. La principal finalidad es la reparación de la lesión tisular y la eliminación de las células y tejidos necróticos (Kumar et al., 2018). En general, la respuesta inflamatoria está

generada por los agentes inflamatorios, entre los que se encuentran barreras epiteliales, células (macrófagos) y proteínas circulantes (citoquinas, mediadores de inflamación, etc.) que reconocen al agente agresor e inician respuestas que dan lugar a la inflamación. Diferentes estudios han comprobado que con la ingesta de compuestos bioactivos se ve favorecida la homeostasis del cuerpo al ayudar a mantener un balance entre la inflamación y la antiinflamación, además de servir de complemento en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como pueden ser las crónicas no transmisibles (Espin & Balberan, 2005). En este sentido, algunos fitoquímicos como los carotenoides, compuestos fenólicos, alcaloides, compuestos nitrogenados y órganosulfurados pueden potenciar la respuesta inmune en procesos infecciosos crónicos o de inmunodeficiencia (Jantan, Ahmad, & Bukhari, 2015), al ser capaces de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias o bien mediante un incremento en la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas (Jantan et al., 2015).

Como se ha explicado, los antioxidantes se encuentran presentes en numerosas fuentes vegetales de la dieta y abarcan un amplio número de compuestos. A continuación, se enumeran los principales compuestos bioactivos presentes en los alimentos de origen vegetal.

- **Compuestos fenólicos:** Constituyen el grupo más abundante de sustancias bioactivas. Se encuentran en una amplia variedad de frutas y vegetales, principalmente coloridos. Son capaces de interferir en procesos bioquímicos y metabólicos asociados al desarrollo de enfermedades inflamatorias, pudiendo activar procesos detoxificantes (Arredondo Bruce & Amores Carrate, 2007), antivirales y antioxidantes. También están relacionados con la calidad sensorial de las frutas y verduras, contribuyendo al color, sabor y aroma. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), elagtaninos, alcoholes fenólicos y flavonoide. Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Los principales

subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Bellik et al., 2012; Manach et al., 2004).

- Vitamina C o ácido ascórbico: Es el antioxidante hidrosoluble más abundante en el plasma sanguíneo, es un inhibidor de la oxidación de los lípidos. Interviene en la formación del colágeno, absorción de hierro inorgánico, reducción de los niveles de colesterol en plasma y en el sistema inmune. Además, es capaz de detener problemas como la inflamación y el riesgo de padecer arteriosclerosis. Cabe destacar que la forma oxidada del ácido ascórbico, el ácido deshidroascórbico también posee actividad vitamínica, se absorbe más fácilmente ya que el pH fisiológico no se encuentra ionizado, es menos hidrofílico, y atraviesa mejor las membranas celulares (Miranda, 2011).

- Vitamina E o tocoferol: Se trata de un antioxidante liposoluble. Es necesaria en cantidades suficientes, ya que su principal papel es proteger las membranas celulares. Por lo tanto, es de gran importancia para frenar el envejecimiento (Birnete GA et al., 2009).

- Carotenoides: Son compuestos liposolubles, debido a su función transportadora en el plasma sanguíneo se ha considerado que algunos de ellos ( $\alpha$ -caroteno) podrían servir como biomarcadores para determinar la ingesta la relación entre dieta-enfermedad. Existe un efecto positivo entre los carotenoides y su acción preventiva de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y aquellas relacionadas con la edad (Jáuregui, De La Concepción Calvo Carrillo, & Romo, 2011). Los carotenoides que han atraído hasta la fecha más atención desde el punto de vista de la alimentación y la salud son los carotenoides con actividad de provitamina A ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina), el licopeno, la luteína y la zeaxantina, que suelen ser los mayoritarios en plasma y tejidos humanos (Meléndez-Martínez et al., 2014).

Las fresas (*Fragaria x ananassa*) son una de las frutas más consumidas en todo el mundo debido a sus propiedades sensoriales. Además son muy apreciadas en la dieta mediterránea por su alto contenido en nutrientes

esenciales y compuestos fitoquímicos beneficiosos. Con todo esto, el objetivo de este estudio ha sido realizar una revisión bibliográfica para estudiar la composición en compuestos bioactivos de la fresa y su relación con sus propiedades funcionales, concretamente con la actividad antioxidante y antiinflamatoria. Este estudio se ha completado evaluando los métodos de análisis más importantes para determinar ambas propiedades.

## **2. METODOLOGÍA**

La metodología utilizada para la actual revisión ha sido la realización de una búsqueda de documentación científica (libros, artículos, tesis...) utilizando buscadores web de plataformas digitales como Google Scholar, Polibuscador de la UPV, SciFinder y Scopus, así como páginas webs de organismos nacionales e internacionales.

En primer lugar, ha consistido en una búsqueda basada en las palabras clave de este trabajo: actividad antiinflamatoria, compuestos bioactivos, actividad antioxidante, fresa, nutraceuticos y polifenoles. Con el fin de realizar una búsqueda acotada en el tiempo y lo más actualizada posible, los artículos referenciados datan entre los años 2010 y 2020.

Una vez obtenidos todos los documentos relevantes de esta primera búsqueda, se procesó la información y se estructuró el trabajo. Este proceso de búsqueda se realizó varias veces con el objetivo de ampliar la información necesaria para profundizar en ciertos temas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Compuestos bioactivos de la fresa

Como ya se ha comentado, la fresa es una buena fuente de compuestos fitoquímicos, de los cuales los polifenoles son el grupo principal (Tabla 1). También destaca su alto contenido de vitamina C (de Pabón et al., 2012).

Tabla 1. Composición química de la fresa por 100 gramos (Moreiras, y Carbajal, 2013, Miller et al., 2019).

<b>Nutrientes</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valores</b>
<i>Kcal</i>	Kcal	35
<i>Agua</i>	g	89,6
<i>Hidratos de Carbono</i>	g	7
<i>Glucosa</i>	g	2,6
<i>Fructosa</i>	g	2,3
<i>Sacarosa</i>	g	1,3
<i>Proteínas</i>	g	0,7
<i>Lípidos</i>	g	0,5
<i>Fibra</i>	g	2,2
<i>Ca</i>	mg	25
<i>Fe</i>	mg	0,8
<i>I</i>	mg	8
<i>Mg</i>	mg	12
<i>Zn</i>	mg	0,1
<i>Na</i>	mg	2
<i>K</i>	mg	190
<i>P</i>	mg	26
<i>Ácido fólico</i>	µg	60
<i>Tiamina</i>	mg	0,02
<i>Riboflavina</i>	mg	0,04
<i>Vitamina B6</i>	mg	0,06
<i>Vitamina C</i>	mg	60
<i>Carotenos</i>	µg	4
<i>Antocianinas</i>	mg	73
<i>Flavonoles</i>	mg	9,1
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>	mg	5,7
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>	mg	7,1

Además, la fresa contiene vitamina E, ácido fólico y carotenoides y es una fuente de manganeso, yodo, magnesio, cobre, hierro y fósforo (Giampieri et al., 2012; Pineli et al., 2011). Dentro de los polifenoles, son ricas flavonoides, especialmente antocianidinas, responsables de su color (Miller et al., 2019). En la figura 1 se describen los polifenoles más importantes de esta fruta (Lopes-Da-Silva et al., 2002). En diferentes variedades de fresa, se han reportado más de 25 pigmentos de antocianina diferentes, siendo la pelargonidina el principal (Lopes-Da-Silva et al., 2002). Las fresas también poseen un contenido menor de otros compuestos fenólicos, como los flavonoles (kaempferol-3-malonilglucósido y quercetina), ácidos fenólicos (ácido hidrobenczoico y ácido hidroxinámico) y taninos hidrolizables (Elagitaninos) (Aaby et al., 2007; Giampieri et al., 2014).

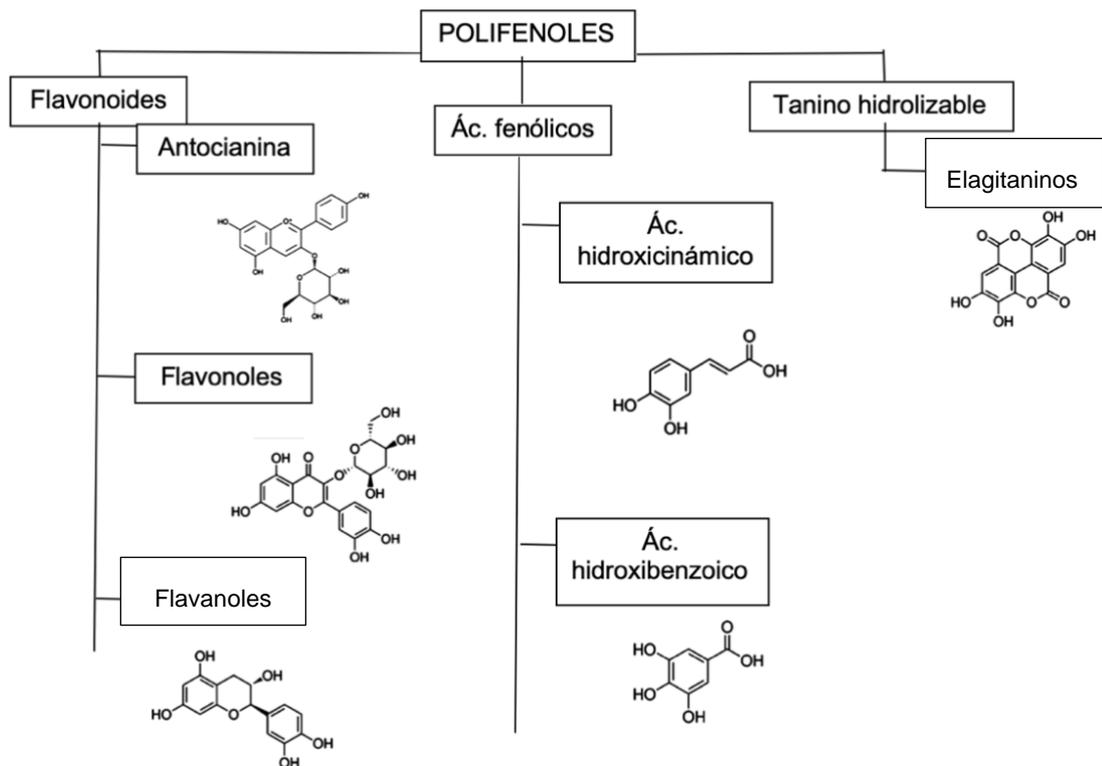


Figura 1. Principales polifenoles de la fresa (Lopes-Da-Silva et al., 2002).

### 3.2. Propiedades funcionales de la fresa

La tabla 2 resume algunos de los beneficios para la salud relacionados con el consumo de fresas. Como puede observarse, destaca su papel en la prevención de la inflamación, el estrés oxidativo y las enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cánceres, diabetes tipo 2, obesidad y neurodegeneración (Hannum, 2004).

*Tabla 2. Propiedades funcionales de la fresa.*

Propiedades	Efectos en la salud	Referencias
Antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminuye el riesgo de formación de radicales libres.</li> <li>- Disminuye el riesgo de sobreactividad de oxidantes sistemáticos.</li> <li>- Aumenta la resistencia a la hemólisis en eritrocitos.</li> </ul>	<p>(Nile &amp; Park, 2014)            (Forbes-Hernandez et al., 2016)            (Giampieri e al., 2014)            (Nile &amp; Park, 2014)</p>
Antiinflamatoria	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminuye la respuesta inflamatoria postprandial.</li> <li>- Disminuye la proteína C reactiva.</li> <li>- Disminuye la interleucina- 6 y la interleucina 1.</li> </ul>	<p>(Nile &amp; Park, 2014)            (Forbes-Hernandez et al., 2016)</p>
Cardioprotectora	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminuye el riesgo de hipertensión.</li> <li>- Reducen el colesterol total y LDL.</li> <li>- Disminuye los factores de riesgo cardiovasculares.</li> </ul>	<p>(Basu &amp; Lyons, 2012)            (Forbes-Hernandez et al., 2016)            (Giampieri e al., 2014)            (Basu et al., 2014)            (McDougall &amp; Stewart, 2005)</p>
Antidiabética	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminuye el riesgo de padecer diabetes tipo 2.</li> <li>- Disminuye la respuesta a la insulina.</li> </ul>	<p>(Battino et al., 2009)            (Giampieri e al., 2014)            (McDougall &amp; Stewart, 2005)</p>
Antiobesidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumenta la producción de TNF<math>\alpha</math> (factor de necrosis tumoral).</li> <li>- Iguala los perfiles lipídicos.</li> </ul>	<p>(Giampieri e al., 2014)</p>

También se ha comprobado que el consumo de fresas disminuye la oxidación lipídica y del ADN, el nivel de triglicéridos, el colesterol total y en particular el colesterol LDL, que es el que se deposita en las paredes de las

arterias y venas, formando la placa de ateroma y pudiendo llegar a ocasionar su obstrucción. Mientras que aumenta el nivel del colesterol HDL, que es el que contribuye a la eliminación del colesterol LDL de las paredes internas de las venas, lo que en definitiva disminuye el riesgo de sufrir trombosis o infarto de miocardio (Alvarez-Suarez et al., 2014). Por otro lado, se ha demostrado que la fresa es capaz de mantener equilibrados los marcadores de inflamación ayudando al equilibrio del estado oxidativo, aumenta la respuesta inmunológica y a la producción de TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) (Giampieri et al., 2014) contribuyendo a la mejora en las personas que padecen obesidad. Además, se ha comprobado que las fresas tienen propiedades para combatir la diabetes manteniendo un equilibrio en el perfil lipídico, disminuyendo el riesgo de padecer diabetes tipo 2 y a su vez, disminuye los factores de riesgo cardiovasculares. Respecto a la capacidad antioxidante y antiinflamatoria tiene numerosos efectos en la salud que serán desarrollados con mayor profundidad en el siguiente apartado (Forbes-Hernandez et al., 2016; Giampieri et al., 2014; Nile & Park, 2014).

### **3.3. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de la fresa**

Como ya se ha comentado, los radicales libres endógenos y las fuentes exógenas son importantes en la patología de ciertas enfermedades (Gülçin & Beydemir, 2013). En varios estudios, los componentes bioactivos de la fresa demostraron una amplia gama de efectos beneficiosos como antioxidantes naturales al disminuir la concentración ROS, quelar los iones metálicos y neutralizar o eliminar los radicales libres, junto con la mejora de la funcionalidad mitocondrial y la inhibición del daño del ADN y la peroxidación de lípidos (Diamanti et al., 2014; Giampieri et al., 2014; Giampieri et al., 2012).

Estudios en humanos han sugerido que la ingesta de fresas aumenta las defensas antioxidantes endógenas. Por ejemplo, se ha observado el aumento de la capacidad antioxidante en plasma sanguíneo después de la administración de fresas frescas y congeladas (Azzini et al., 2010; Zhang et al., 2010). De manera similar, Romandini et al. (2013) encontraron que el consumo de fresas mejoró la capacidad antioxidante plasmática y protegió

contra el daño de las proteínas plasmáticas en sujetos sanos. Además, se redujo el nivel de hiperactividad oxidante sistémica en el plasma (Prymont-Przyminska et al., 2014). El consumo de fresas también se ha visto que produjo una mejora en el estado antioxidante plasmático y una disminución de la tasa de mortalidad de las células mononucleares en voluntarios sanos (Tulipani et al., 2011, 2014).

*Tabla 3. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de la fresa.*

<b>Actividad antioxidante</b>	<b>Referencias</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Controla la reacción oxidativa.</li> <li>- Mejora la capacidad antioxidante del plasma.</li> <li>- Protege a las proteínas plasmáticas del daño de los radicales.</li> </ul>	<p>(Romandini et al., 2013) (Zhang et al., 2010)</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Controla el daño en el ADN y la hemólisis oxidativa.</li> <li>- Aumenta la oxidación de lípidos plasmáticos</li> </ul>	<p>(Tulipani et al., 2014)</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibición de la hemólisis oxidativa</li> </ul>	<p>(Tulipani et al., 2011)</p>
<b>Actividad antiinflamatoria</b>	<b>Referencias</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reduce la respuesta a la insulina</li> </ul>	<p>(Ellis, Edirisinghe, Kappagoda, &amp; Burton-Freeman, 2011)</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Atenúa los cambios inflamatorios relacionados con el estrés oxidativo.</li> <li>- Atenúa significativamente la respuesta inflamatoria posprandial al disminuir los niveles de PCR e IL-6.</li> </ul>	<p>(Edirisinghe et al., 2011)</p>

En cuanto a la actividad antiinflamatoria, los compuestos fenólicos son los principales compuestos responsables de esta actividad en las fresas (Miller et al., 2019). Se han conseguido respuestas inflamatorias postprandiales e insulina inducida por comidas mediadas por bebidas de fresa en humanos (Tabla 3) (Edirisinghe et al., 2011). Según el estudio de Edirisinghe et al., (2011) la fresa redujo significativamente la respuesta a la insulina y atenuó la respuesta inflamatoria posprandial al disminuir las concentraciones de IL-6 (interleucina 6) y proteína C reactiva (PCR) (Edirisinghe et al., 2011). En otro

trabajo similar, la ingestión sistemática de bebida de fresa y de otros alimentos ricos en polifenoles evitaron factores inflamatorios inductores presentes en la comida (Ellis et al., 2011). Los resultados mostraron que la bebida atenuó significativamente la IL-1  $\beta$  (Interleucina 1) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) -1 con una moderada disminución de la IL-6 en sangre (Ellis et al., 2011).

### **3.4. Métodos *in vitro* de análisis de la actividad antioxidante**

El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen una gran capacidad de métodos para determinar la capacidad antioxidante de los alimentos. La actividad antioxidante viene determinada por interacciones sinérgicas entre las diferentes sustancias que muestran esta actividad, así como por el modo de acción concreto de cada una de ellas, por lo que no hay un acuerdo en el mejor método a utilizar para su análisis, aconsejándose combinar más de un método para evaluar de manera correcta la capacidad antioxidante de una muestra (Pérez-Jiménez et al., 2008). La principal reacción de los antioxidantes con los radicales libres sucede deteniendo el proceso de oxidación, esto puede ocurrir de dos maneras: a través de la reacción de transmisión de un átomo de hidrógeno (HAT, Hidrogen Atom Transfer) o por la transferencia de un electrón (SET, Single Electron Transfer) (Prior et al., 2005).

Teniendo esto en cuenta, se han planteado una serie de condiciones que debería reunir un procedimiento estandarizado de medida de la capacidad antioxidante *in vitro* (Wu et al., 2004):

- Evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomos de hidrógeno.
- Especificar el sustrato de oxidación.
- Tener un mecanismo y un punto final definido.
- Tener una buena reproducibilidad.

- Ser adaptable para medir antioxidante hidrofílicos y lipofílicos.
- Usar distintas fuentes de radicales.

Sin embargo, no existe ningún método en la actualidad que reúna todas estas características y es difícil que llegue a ser posible evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método. A continuación, se describe el fundamento de los métodos más importantes para evaluar la actividad antioxidante en alimentos.

#### **3.4.1. Método ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)**

Este método está basado en el mecanismo HAT, consiste en medir la capacidad de afinidad de un radical específico, el peróxido. El proceso consiste en atacar a la molécula de fluoresceína, dando lugar a la eliminación del color rojo fluorescente que ésta emite. En el caso de que haya presencia de compuestos antioxidantes, estos reaccionan con los radicales y el color de la fluoresceína se mantiene. De esta manera, es posible comparar la disminución de la fluorescencia en presencia y en ausencia de un antioxidante (Karadag et al., 2009; Niki, 2010).

Como ventajas del método ORAC cabe destacar su alta sensibilidad, precisión y reproducibilidad (Ndhlala et al., 2010). Sin embargo, uno de los inconvenientes frente a otros métodos es que requiere aproximadamente 60 minutos más de reacción que otros ensayos. (Karadag et al., 2009).

#### **3.4.2. Método FRAP (Capacidad antioxidante para reducir el ion férrico)**

El ensayo FRAP es un método de espectrofotometría basado en la reacción SET, concretamente en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica (2,4,6-tripiridil-s-triazina) que es incoloro, al complejo ferroso de color azul por un antioxidante a pH a 3,6. Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm (Fernández-Pachón et al., 2006).

Como ventajas de este método se puede decir que es sencillo y económico. Sin embargo, no mide los antioxidantes que contienen grupos SH (un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno), ya que estos compuestos no son capaces de reducir el hierro férrico a un complejo ferroso, siendo esta reducción la base del método (Benzie & Strain, 1996).

### **3.4.3. Método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)**

El ensayo TEAC es un método espectrofotométrico basado en reacciones SET, en el cual el principal proceso es la inhibición de la absorbancia del catión radical de ABTS<sup>+</sup> (2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (Shahidi & Zhong, 2015) por parte de los antioxidantes. Durante este proceso se forman cationes radicales de ABTS generándose un radical intermedio que reacciona con el ABTS para formar el catión radical ABTS<sup>+</sup> (Peixinho & Santrock, 2011). Los cationes radicales son neutralizados mediante la transferencia de electrones u átomos de hidrogeno, el catión radical pierde color y disminuye la absorción espectrofotométrica y puede monitorizarse a 415, 645, 734 y 815 nm. Cuando esto ocurre quiere decir que hay presencia de sustancias antioxidantes.

Además, cabe destacar que este método es útil para el estudio de antioxidantes liposolubles e hidrosolubles (Shahidi & Zhong, 2015)

### **3.4.4. Método DPPH**

El fundamento de este método se basa en medir la capacidad de una muestra de captar radicales libres, consiste en una reacción que al mismo tiempo es de transferencia de electrones y de átomos de hidrógeno (SET y HAT). Su principio se sustenta en el empleo de la molécula DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) es un radical libre estable. Cuando el color violeta del radical desaparece quiere decir que la disolución de DPPH• ha reaccionado con los antioxidantes, a través de la donación de hidrógeno para formar la molécula estable DPPH-H. Este cambio de color es controlado mediante espectrofotometría a la longitud de onda de 515 nm (Alam et al., 2013).

En la tabla 4 se han resumido las principales ventajas e inconvenientes de los métodos anteriormente descritos para determinar la actividad antioxidante.

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de los métodos para determinar la actividad antioxidante.

<b>MÉTODO</b>	<b>VENTAJA</b>	<b>INCONVENIENTE</b>
<i>ORAC</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mide concretamente la capacidad de captación de un ROS.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiempo elevado de análisis (60 min más que otros métodos).</li> </ul>
<i>FRAP</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es sencillo, barato y fácilmente automatizable.</li> <li>- Es rápido, generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 minutos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No mide los antioxidantes que contienen grupos SH, ya que estos no reducen de forma efectiva el Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>.</li> <li>- En el caso de algunos polifenoles se han descrito reacciones más lentas, llegando a requerir 30 minutos.</li> </ul>
<i>TEAC</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La decoloración evita interferencias debidas a compuestos intermedios y evita una errónea estimación.</li> <li>- Es económico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El radical ABTS no se encuentra en nuestro organismo, por lo que representa una fuente no fisiológica.</li> <li>- Algunas reacciones requieren de un mayor tiempo para alcanzar el estado final.</li> </ul>
<i>DPPH</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es un rápido y sencillo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sólo puede disolverse en medio orgánico.</li> </ul>

Para estandarizar los resultados reportados en varios estudios, se usa como unidad el equivalente de Trolox (TE); así, la actividad antioxidante de una muestra se expresa en términos de micromoles de equivalentes de Trolox por 100 g de muestra (TE/100 g).

### **3.5. Métodos *in vitro* de análisis de la actividad antiinflamatoria.**

Como ya se ha comentado, existe una estrecha relación entre el proceso de oxidación de biomoléculas y la estimulación de la respuesta inflamatoria. Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria de una muestra pueden

estudiarse diferentes biomarcadores, el fundamento de los ensayos más utilizados en alimentos se describen a continuación.

### **3.5.1. Método de porcentaje de inhibición de la lisis osmótica de los eritrocitos**

Uno de los fenómenos nocivos que ocurren durante el proceso inflamatorio es la desnaturalización de proteínas de membrana y la lisis de los glóbulos rojos y de los lisosomas. De esta manera, la estabilización de la membrana lisosomal resulta importante para limitar la respuesta inflamatoria para prevenir la liberación de las enzimas lisosomales que dañan el tejido afectado y agravan la respuesta inflamatoria (Ghumre y col., 2017). Puesto que la membrana de los glóbulos rojos es similar a la membrana lisosomal, es posible determinar la capacidad estabilizadora de una muestra al evaluar su capacidad para evitar la hemólisis de los glóbulos rojos en condiciones hipotónicas (Cannon, 2006). Esta estabilidad es clave, ya que puede llegar a limitar la respuesta inflamatoria (Gadamsetty et al., 2013; Vadivu & Lakshmi, 2008). Por estos motivos, se ha visto que este método *in vitro* puede resultar útil para determinar la actividad antiinflamatoria de vegetales (Chowdhury et al., 2014; Fernández, A et al., 2007).

### **3.5.2. Método de captación de radicales libres de óxido nítrico en macrófagos murinos**

El empleo de la línea celular de macrófagos de ratón es otro de los métodos celulares que se utilizan para evaluar la respuesta inflamatoria. El procedimiento es similar al que se lleva a cabo con macrófagos humanos. Para determinar la actividad antiinflamatoria de los compuestos a estudiar se realizan ensayos tanto de medida de la expresión como de la secreción de mediadores que están implicados en la respuesta inflamatoria (Fu et al., 2013; Kuo et al., 2011; Otterbein et al., 2000; Xie et al., 2011). Normalmente el resultado es la secreción de citoquinas proinflamatorias como son el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), la interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ), entre ellas interleucina- 10 (IL-10) (Chanput, Mes et al.,2010; Huang et al.,2012; Pei & Gunsch, 2013; Singh et al., 2005).

## 4. CONCLUSIONES

La fresa es un alimento muy apreciado no solo por sus cualidades organolépticas sino también por su contenido en compuestos bioactivos, destacando su contenido en polifenoles (sobre todo antocianinas) y vitamina C. Esta composición está directamente relacionada con las propiedades funcionales de esta fruta, que hacen que su consumo tenga múltiples efectos beneficiosos para la salud: destacando su papel en la prevención de la inflamación, el estrés oxidativo y las enfermedades cardiovasculares, antidiabéticas, ciertos tipos de cánceres, obesidad y neurodegeneración.

En cuanto a la evaluación de las propiedades antioxidantes, dado que los compuestos bioactivos pueden ejercer su acción mediante mecanismos diversos y en un mismo alimento puede haber mezclas de diferentes antioxidantes con distintos mecanismos de acción o establecer reacciones sinérgicas, es conveniente emplear varios métodos para poder considerar todos los posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes en un alimento, valorando además las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos. Igualmente, para la evaluación de la actividad antiinflamatoria pueden emplearse diferentes marcadores de inflamación, siendo los más utilizados para el estudio en alimentos el porcentaje de inhibición de la lisis osmótica de los eritrocitos y la captación de radicales libres de óxido nítrico en macrófagos murinos.

## REFERENCIAS

- Aaby, K., Ekeberg, D., & Skrede, G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4395–4406. <https://doi.org/10.1021/jf0702592>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ: The Official*

*Publication of the Saudi Pharmaceutical Society, 21 2, 143–152.*

- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., González-Paramás, A. M., ... Battino, M. (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry, 25*(3), 289–294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.11.002>
- Arredondo Bruce, A., & Amores Carrate, J. (2007). La dieta mediterránea: ¿es cardioprotectiva? *Arch. Méd. Camaguey, 11*(4), 0–0.
- Azzini, E., Vitaglione, P., Intorre, F., Napolitano, A., Durazzo, A., Foddai, M. S., ... Maiani, G. (2010). Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects. *The British Journal of Nutrition, 104*(8), 1165–1173. <https://doi.org/10.1017/S000711451000187X>
- Basu, A., & Lyons, T. J. (2012). Strawberries, blueberries, and cranberries in the metabolic syndrome: clinical perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(23), 5687–5692. <https://doi.org/10.1021/jf203488k>
- Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., & Lyons, T. J. (2014). Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54*(6), 790–806. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608174>
- Battino, M., Beekwilder, J., Denoyes-Rothan, B., Laimer, M., McDougall, G. J., & Mezzetti, B. (2009). Bioactive compounds in berries relevant to human health. *Nutrition Reviews, 67*(suppl\_1), S145–S150. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00178.x>
- Bellik, Y., Hammoudi, S. M., Abdellah, F., Iguer-Ouada, M., & Boukraâ, L. (2012). Phytochemicals to prevent inflammation and allergy. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery, 6*(2), 147–158. <https://doi.org/10.2174/187221312800166886>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry, 239*(1), 70–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Biruete GA, Juárez HE, Sieiro OE, Romero VR, S. B. (2009). Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría, 76*(3), 136–145.
- Cannon, J. G. (2006). Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th Edition Edited by Laurence Brunton, John Lazo, and Keith Parker. McGraw Hill, New York. 2005. xxiii + 2021 pp. 21 x 26 cm. ISBN 0-07-142280-3. \$149.95. *Journal of Medicinal Chemistry, 49*(3), 1222. <https://doi.org/10.1021/jm058286b>
- Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R. A. M., Savelkoul, H. F. J., & Wichers, H. J. (2010). Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food & Function, 1*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1039/b920001a>

1(3), 254–261. <https://doi.org/10.1039/c0fo00113a>

- Chowdhury, A., Azam, S., Jainul, M. A., Faruq, K. O., & Islam, A. (2014). Antibacterial activities and in vitro anti-inflammatory (Membrane Stability) properties of methanolic extracts of gardenia coronaria leaves. *International Journal of Microbiology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/410935>
- de Pabón, L. M. C., Yahia, E. H., Cartagena, R., Peláez, C., Gaviria, C. A., & Rojano, B. A. (2012). Capacidad antioxidante de dos variedades de Fragaria x ananassa (weston) Duchesne (fresa) sometidas a variaciones en la nutrición vegetal. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 37–53.
- Diamanti, J., Mezzetti, B., Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Gonzalez-Alonso, A., ... Battino, M. (2014). Doxorubicin-induced oxidative stress in rats is efficiently counteracted by dietary anthocyanin differently enriched strawberry (Fragaria x ananassa Duch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3935–3943. <https://doi.org/10.1021/jf405721d>
- Edirisinghe, I., Banaszewski, K., Cappozzo, J., Sandhya, K., Ellis, C. L., Tadapaneni, R., ... Burton-Freeman, B. M. (2011). Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. *The British Journal of Nutrition*, 106(6), 913–922. <https://doi.org/10.1017/S0007114511001176>
- Ellis, C. L., Edirisinghe, I., Kappagoda, T., & Burton-Freeman, B. (2011). Attenuation of meal-induced inflammatory and thrombotic responses in overweight men and women after 6-week daily strawberry (Fragaria) intake. A randomized placebo-controlled trial. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18(4), 318–327. <https://doi.org/10.5551/jat.6114>
- Espin, J. C., & Balberan, F. T. (2005). Alimentos funcionales (EUFIC). In *Constituyentes bioactivos no nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicacion en alimentos funcionales*. Retrieved from <http://www.eufic.org/article/es/expid/basics-alimentos-funcionales/>
- Fernández, A., Arroyo A., J., Bonilla R., P., Tomás, G., Medina, F., Chenguayén, J., Marín, M., Béjar, E., & Huamán, O. (2007). Efecto antiinflamatorio in vitro y seguridad en ratas del extracto acuoso atomizado de la raíz de Krameria lappacea (ratanía) root. *Ciencia e Investigación*, Vol. 10, pp. 65–70.
- Fernández-Pachón, M<sup>a</sup> Soledad, Villaño, Débora, Troncoso, Ana M<sup>a</sup>, & García-Parrilla, M. C. (2006). *Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo*.
- Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparri, M., Afrin, S., Bompadre, S., Mezzetti, B., Quiles, J. L., ... Battino, M. (2016). The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 Suppl

1, S46—59. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1051919>

- Fu, Y., Chen, J., Li, Y.-J., Zheng, Y.-F., & Li, P. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. *Food Chemistry*, *141*(2), 1063–1071. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.089>
- Gadamsetty, G., Maru, S., Tyagi, A., & Chakravarthula, S. N. (2013). Anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant effects of methanolic extracts of *Drypetes sepiaria* (Euphorbiaceae). *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines*, *10*(5), 274–282. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.9>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. (2014). Strawberry and human health: effects beyond antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(18), 3867–3876. <https://doi.org/10.1021/jf405455n>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., González-Paramàs, A. M., ... Battino, M. (2014). An anthocyanin-rich strawberry extract protects against oxidative stress damage and improves mitochondrial functionality in human dermal fibroblasts exposed to an oxidizing agent. *Food & Function*, *5*(8), 1939–1948. <https://doi.org/10.1039/c4fo00048j>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., González-Paramàs, A. M., Santos-Buelga, C., Bompadre, S., ... Battino, M. (2012). Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria × ananassa*) extract against UV-A irradiation damage on human fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(9), 2322–2327. <https://doi.org/10.1021/jf205065x>
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *28*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Gülçin, I., & Beydemir, Ş. (2013). Phenolic compounds as antioxidants: carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *13*(3), 408–430. <https://doi.org/10.2174/138955713804999874>
- Hadad, N., & Levy, R. (2012). The synergistic anti-inflammatory effects of lycopene, lutein,  $\beta$ -carotene, and carnosic acid combinations via redox-based inhibition of NF- $\kappa$ B signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, *53*(7), 1381–1391. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.078>
- Hannum, S. M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408690490263756>

- Huang, H., Fletcher, A., Niu, Y., Wang, T. T. Y., & Yu, L. (2012). Characterization of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression in macrophages and monocytes. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 61(12), 1329–1338. <https://doi.org/10.1007/s00011-012-0533-8>
- Jantan, I., Ahmad, W., & Bukhari, S. N. A. (2015). Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Frontiers in Plant Science*, 6, 655. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00655>
- Jáuregui, M. E. C., De La Concepción Calvo Carrillo, M., & Romo, F. P. G. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 61(3), 233–241.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>
- Kuo, C.-F., Su, J.-D., Chiu, C.-H., Peng, C.-C., Chang, C.-H., Sung, T.-Y., ... Chyau, C.-C. (2011). Anti-inflammatory effects of supercritical carbon dioxide extract and its isolated carnosic acid from *Rosmarinus officinalis* leaves. 59(8), 3674–3685. <https://doi.org/10.1021/jf104837w>
- Lopes-Da-Silva, F., De Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J., & Santos-Buelga, C. (2002). Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology*, 214(3), 248–253. <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0434-5>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- McDougall, G. J., & Stewart, D. (2005). The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *BioFactors*, 23, 189–195.
- Meléndez-Martínez, A. J., Mapelli-Brahm, P., Benítez- González, A., S. (2014). Archives of Biochemistry and Biophysics. 572:188-200.
- Miller, K., Feucht, W., & Schmid, M. (2019). Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: A brief overview. *Nutrients*, 11(7), 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu11071510>
- Miranda, I. (2011). *RENUT 2011 TEC\_15\_752-763.pdf* (p. 787). p. 787.
- Ndhkala, A. R., Moyo, M., & Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(10), 6905–6930. <https://doi.org/10.3390/molecules15106905>

- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(4), 503–515. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>
- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(2), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>
- Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., ... Choi, A. M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *6*(4), 422–428. <https://doi.org/10.1038/74680>
- Pei, R., & Gunsch, C. K. (2013). Inflammatory cytokine gene expression in THP-1 cells exposed to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *Environmental Toxicology*, 28(1), 51–60. <https://doi.org/10.1002/tox.20698>
- Peixinho, A. M. L., & Santrock, J. W. (2011). ANÁLISIS QUÍMICO DE ANTOCIANINAS EN FRUTOS SILVESTRES COLOMBIANOS. 11(2), 10–14. <https://doi.org/10.16194/j.cnki.31-1059/g4.2011.07.016>
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goni, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 41(3), 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
- Pineli, L. de L. de O., Moretti, C. L., dos Santos, M. S., Campos, A. B., Brasileiro, A. V., Córdova, A. C., & Chiarello, M. D. (2011). Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 11–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.05.004>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Prymont-Przyminska, A., Zwolinska, A., Sarniak, A., Wlodarczyk, A., Krol, M., Nowak, M., ... Nowak, D. (2014). Consumption of strawberries on a daily basis increases the non-urate 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of fasting plasma in healthy subjects. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 55(1), 48–55. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.13-93>
- Ramos, E., Romeo, J., Wärnberg, J., & Marcos, A. (2010). ¿Más que alimentos? *Alimentos Funcionales Aproximación a Un Anueva Alimentación*, 30–45.
- Romandini, S., Mazzoni, L., Giampieri, F., Tulipani, S., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.

- Y., ... Alvarez-Suarez, J. M. (2013). Effects of an acute strawberry (*Fragaria x ananassa*) consumption on the plasma antioxidant status of healthy subjects. *Journal of Berry Research*, 3(3), 169–179. <https://doi.org/10.3233/JBR-130055>
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137. <https://doi.org/10.1106/108201302026770>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Singh, U., Tabibian, J., Venugopal, S. K., Devaraj, S., & Jialal, I. (2005). Development of an in vitro screening assay to test the antiinflammatory properties of dietary supplements and pharmacologic agents. *Clinical Chemistry*, 51(12), 2252–2256. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.056093>
- Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Busco, F., Bompadre, S., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2011). Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative haemolysis in humans. *Food Chemistry*, 128(1), 180–186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.025>
- Tulipani, S., Armeni, T., Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Gonzalez-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., ... Battino, M. (2014). Strawberry intake increases blood fluid, erythrocyte and mononuclear cell defenses against oxidative challenge. *Food Chemistry*, 156, 87–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.098>
- Vadivu, R., & Lakshmi, K. S. (2008). In vitro and In vivo anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp *laurina*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 3(2), 121–124. <https://doi.org/10.3329/bjp.v3i2.956>
- Vinay Kumar Abul Abbas Jon Aster. (2018). *Robbins. Patología humana* (Vinay Kumar Abul Abbas Jon.C. Aster, Ed.). Elsevier.
- Wootton-Beard, P., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.033>
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026–4037. <https://doi.org/10.1021/jf049696w>
- Xie, C., Kang, J., Chen, J.-R., Nagarajan, S., Badger, T. M., & Wu, X. (2011). Phenolic acids are in vivo atheroprotective compounds appearing in the serum of rats after blueberry

consumption. 59(18), 10381—10387. <https://doi.org/10.1021/jf2025264>

Xu, S., Liu, Z., Huang, Y., Le, K., Tang, F., Huang, H., ... Liu, P. (2012). Tanshinone II-A inhibits oxidized LDL-induced LOX-1 expression in macrophages by reducing intracellular superoxide radical generation and NF- $\kappa$ B activation. *160*(2), 114—124. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.008>

Zhang, Y., Henning, S. M., Seeram, N. P., Gao, K., Lee, R., Wang, D. C., ... Kotlerman, J. (2010). Strawberry Consumption Is Associated with Increased Antioxidant Capacity in Serum. *Journal Of Medicinal Food*, 13(1), 116—122.