



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

FoodUPV
INSTITUTO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Capacidad antioxidante de diferentes fracciones del
algarrobo y su fruto determinada mediante métodos in vitro
e in vivo.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Tortajada Martínez, Sara

Tutor/a: Pérez Esteve, Edgar

Cotutor/a: Barat Baviera, José Manuel

Director/a Experimental: Castillejo Montoya, Noelia

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES FRACCIONES DEL ALGARROBO Y SU FRUTO DETERMINADA MEDIANTE MÉTODOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Sara Tortajada Martínez, Noelia Castillejo Montoya, Édgar Pérez Esteve, José Manuel Barat Baviera

RESUMEN

El aprovechamiento de subproductos en la industria alimentaria se ha convertido en un pilar fundamental de la sostenibilidad, y cada vez más, las empresas buscan formas innovadoras de valorizar sus productos. En este sentido, el algarrobo se considera un árbol frutal infrautilizado, que presenta un alto potencial por su resistencia al calor y la sequía. Estudios previos han demostrado además el alto contenido en polifenoles de la algarroba, los cuales podrían otorgarle propiedades funcionales. En el presente estudio se ha evaluado el contenido en polifenoles mediante Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante de diferentes fracciones del algarrobo y su fruto mediante métodos *in vitro* (DPPH, ORAC) e *in vivo* (*C. elegans*). Entre las fracciones estudiadas encontramos: vaina verde, germen, epispermo, harina de vaina madura y hoja. Los resultados indican un alto contenido en polifenoles de todas las fracciones estudiadas, siendo más elevado en las vainas verdes y el epispermo. Además, se observó una gran capacidad antioxidante de todas las muestras estudiadas mediante los dos métodos *in vitro*. Por último, mediante el método *in vivo* se demostró un efecto protector de todas las fracciones del algarrobo y su fruto frente a todos los estresores estudiados, siendo el epispermo la fracción de la cual se obtuvieron mejores resultados. Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad antioxidante de las diferentes fracciones y una posible vía para su aprovechamiento, además de la capacidad de *C. elegans* de actuar como modelo para este tipo de ensayos.

Palabras clave: Algarroba, *Ceratonia siliqua* L., subproductos, capacidad antioxidante, alimento funcional, DPPH, ORAC, Folin-Ciocalteu, *C. elegans*

RESUM

L'aprofitament de subproductes en la indústria alimentària s'ha convertit en un pilar fonamental de la sostenibilitat, i cada vegada més, les empreses busquen formes innovadores de valorar els seus productes. En este sentit, la garrofera es considera un arbre fruiter infrautilitzat, que presenta un alt potencial per la seua resistència a la calor i la sequera. Estudis previs han demostrat a més l'alt contingut en polifenols de la garrofa, els quals podrien atorgar-li propietats funcionals i

antioxidants. En el present estudi s'ha avaluat el contingut en polifenols mitjançant Folin-Ciocalteu i la capacitat antioxidant de diferents fraccions de la garrofera i el seu fruit mitjançant mètodes *in vitro* (DPPH, ORAC) i *in vivo* (*C. elegans*). Entre les fraccions estudiades trobem: baina verda, germen, episperm, farina de baina madura i fulla. Els resultats indiquen un alt contingut en polifenols de totes les fraccions estudiades, sent més elevat en les baines verdes i el episperm. A més, es va observar una gran capacitat antioxidant de totes les mostres estudiades mitjançant els dos mètodes *in vitro*. Finalment, mitjançant el mètode *in vivo* es va demostrar un efecte protector de totes les fraccions de la garrofera i el seu fruit enfront de tots els estressors estudiats, sent el episperm la fracció de la qual es van obtenir millors resultats. Estos resultats posen de manifest la capacitat antioxidant de les fraccions i una possible via per al seu aprofitament, a més del possible ús de *C. elegans* per a esta mena d'assajos.

Paraules clau: Garrofa, *Ceratonia siliqua* L., subproductes, capacitat antioxidant, aliment funcional, DPPH, ORAC, Folin-Ciocalteu, *C. elegans*

ABSTRACT

The use of by-products in the food industry has become a fundamental pillar of sustainability, and companies are increasingly looking for innovative ways to valorize their products. In this sense, carob is considered an underutilized fruit tree, which has a high potential due to its resistance to heat and drought. Previous studies have also demonstrated the high polyphenol content of carob, which could provide it with functional and antioxidant properties. In the present study, the polyphenol content was evaluated by Folin-Ciocalteu and the antioxidant capacity of different fractions of the carob tree and its fruit by *in vitro* (DPPH, ORAC) and *in vivo* (*C. elegans*) methods. Among the fractions studied were: green pod, germ, episperm, mature pod flour and leaf. The results indicate a high polyphenol content in all the fractions studied, being higher in the green pods and the episperm. In addition, a high antioxidant capacity was observed for all the samples studied by the two *in vitro* methods. Finally, the *in vivo* method demonstrated a protective effect of all the carob fractions and its fruit against all the stressors studied, with the episperm being the fraction with the best results. These results show the antioxidant capacity of the fractions and a possible way to take advantage of them, in addition to the possible use of *C. elegans* for this type of assays.

Key words: Carob, *Ceratonia siliqua* L., by-products, antioxidant capacity, functional food, DPPH, ORAC, Folin-Ciocalteu, *C. elegans*

1. INTRODUCCIÓN

El algarrobo (*Ceratonía siliqua* L.) es un árbol de la familia *Leguminosae* que ha sido cultivado desde la antigüedad en la zona del Mediterráneo. Este se caracteriza por su capacidad de resistir altas temperaturas y condiciones de sequía (Martins-Loução, 1990). Por ello, ante las amenazas que plantea el cambio climático en la actualidad, como la disminución de la disponibilidad del agua y la degradación de los suelos, existe un creciente interés en cuanto al uso de este cultivo en programas de reforestación y restauración del suelo (Martins-Loução *et al.*, 2024).

Las vainas de algarroba se han utilizado históricamente para alimentación animal debido a su alto contenido energético y su bajo precio. En la actualidad, la algarroba encuentra su principal aplicación en la producción del aditivo alimentario goma de garrofín (E-410), el cual se extrae del endospermo de la semilla y se emplea como espesante y gelificante natural. Sin embargo, el algarrobo se considera un árbol frutal infrautilizado, por ello se están llevando a cabo diversas líneas de investigación que permitan un mejor aprovechamiento tanto del árbol como de su fruto (Martins-Loução *et al.*, 2024).

Las vainas de algarroba están constituidas por dos partes principales: la pulpa (90% de masa) y las semillas (10% de masa). A su vez la semilla consta de tres partes: la cáscara (epispermo), el endospermo y el germen. El epispermo, que constituye el 30-33% de la semilla, se caracteriza por su alto contenido en fibra y polifenoles, los cuales le otorgan un gran potencial antioxidante. El endospermo está constituido principalmente de galactomanano y constituye el 42-46% de la semilla. Por último, el germen, que constituye el 23-25% de la semilla, es una gran fuente de proteínas y aminoácidos (Laaraj *et al.*, 2023; Albertos *et al.*, 2015).

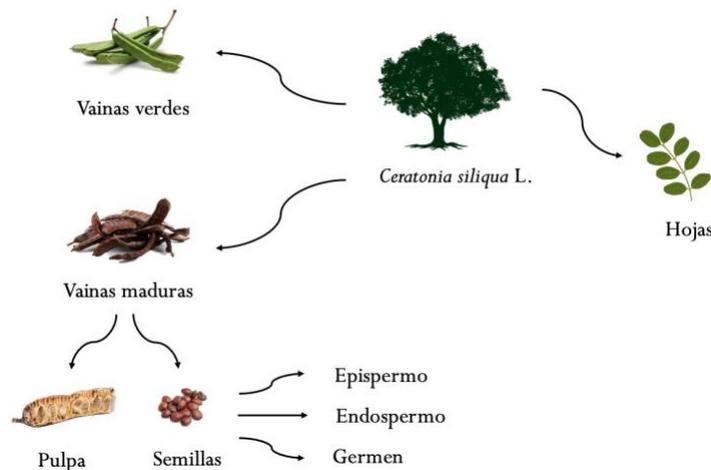


FIGURA 1. Esquema de las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto.

Estudios previos indican que los productos de algarroba tienen un gran potencial para ser utilizados como ingrediente alimentario funcional, debido a sus componentes fitoquímicos con propiedades funcionales, propiedades aromatizantes y beneficios nutricionales (Brassesco *et al.*, 2021). La mayoría de los efectos beneficiosos para la salud de la algarroba y sus extractos se han asociado a la presencia de polifenoles, concretamente los ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido sinápico y ácido ferúlico), los flavonoides (catequina, epicatequina, miricetina, quercetina y apigenina) y los taninos (ácido tánico, digaloil-glucosa y trigaloil-glucosa). Estos polifenoles, como antioxidantes naturales, tienen la capacidad de proteger los componentes celulares del daño oxidativo, dando como resultado la reducción del riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas y degenerativas asociadas al estrés oxidativo (Ioannou *et al.*, 2023). Ikram *et al.* (2023) demostraron diversos beneficios de estos componentes sobre la salud humana, como efectos anti-diabéticos, efectos contra el cáncer y efectos contra la hiperlipidemia entre otros.

En la actualidad, los métodos más utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante son los estudios *in vitro* debido a su rapidez y sencillez. De ellos, son los métodos espectrofotométricos los que ofrecen una sencilla estimación del contenido fenólico total y la actividad antioxidante de las muestras. Concretamente encontramos el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), el ácido 2, 2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), y la capacidad de reducción del hierro (FRAP) entre otros métodos. La actividad antioxidante está directamente relacionada con el contenido fenólico, por lo que es habitual la determinación del contenido en polifenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu. Para una correcta evaluación de la actividad antioxidante es necesario la realización de dos o más ensayos espectrofotométricos, ya que cada uno de los mismos se basa en un mecanismo de acción diferente y los resultados pueden variar significativamente (Ioannou *et al.*, 2023).

Sin embargo, estos métodos *in vitro* no consideran parámetros bioquímicos, metabólicos y otros parámetros fisiológicos imprescindibles para este tipo de análisis. Por el contrario, los estudios *in vivo* permiten medir diferentes variables biológicas y fisiológicas, así como el metabolismo de las matrices y su biodisponibilidad (Martins *et al.*, 2016). Estos ensayos *in vivo* se han realizado principalmente mediante modelos de animales mamíferos (ratones, peces, conejillos de indias y conejos) debido a que comparten la mayoría de órganos y tienen vías de desarrollo similares a los humanos. No obstante son costosos, llevan mucho tiempo y conllevan ciertos problemas éticos. Por otro lado, los ensayos mediante células eucariotas no permiten replicar la complejidad de un organismo vivo (Hunt, 2016).

Por ello, se ha estudiado el uso de pequeños animales no mamíferos para este tipo de ensayos, como el *Caenorhabditis elegans*.

C. elegans es un nematodo mayoritariamente hermafrodita de aproximadamente 1 mm de largo que se alimenta de hongos y bacterias del suelo. Su transparencia, anatomía simple, ciclo de vida corto, facilidad de cultivo y alta tasa de reproducción son algunas de sus numerosas ventajas, además de contar con sistema digestivo, reproductivo, endocrino, sensorial y neuromuscular (Tejeda-Benitez & Olivero-Verbel, 2016). Los ensayos de supervivencia de *C. elegans* son una herramienta clave para estudiar procesos fisiológicos, incluido el envejecimiento, la resistencia al estrés y la inmunidad. En concreto, los ensayos de resistencia al estrés proporcionan información valiosa sobre la interacción entre el estrés interno o externo y los procesos biológicos. Algunos de los más utilizados son los ensayos de estrés oxidativo con agua oxigenada (H_2O_2), estrés térmico, estrés osmótico y estrés ultravioleta (UV) (H. H. Park *et al.*, 2017). Los ensayos de estrés térmico y UV también permiten evaluar el estrés oxidativo, ya que el estrés térmico promueve la producción de radicales libres y el estrés UV induce al nematodo a producir especies reactivas de oxígeno (Huang *et al.*, 2024). En los últimos años se ha comenzado a evaluar la capacidad antioxidante de diferentes compuestos mediante el uso de *C. elegans*, como en los estudios de Huang *et al.* (2024) y Song *et al.* (2020).

El objetivo del presente trabajo final de máster es determinar la capacidad antioxidante de diferentes fracciones del algarrobo y su fruto mediante metodología *in vitro* con los ensayos Folin-Ciocalteu, DPPH y ORAC e *in vivo* mediante el nematodo *C. elegans* evaluando diferentes tipos de exposiciones (barrera, fisiológica, completa) frente a diferentes estresores (UV, calor y H_2O_2).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Los reactivos 2,2-difenil-1-picrilhidracilo(DPPH), Folin-Ciocalteu, fluoresceína, trolox, ácido gálico y 2,2'-Azobis(2-metilpropionamida)dihidrocloruro (AAPH) utilizados en los ensayos de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (España). El hidróxido de sodio (NaOH), hipoclorito sódico (NaClO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los reactivos utilizados para el crecimiento de los nematodos (NGM) (3 g/L NaCl, 2,5g peptona, 17 g/L agar, 1 M tampón fosfato potásico [25 mL], 1 M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ [1 mL], 1 M de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [1 mL] y [1 mL] 5% de colesterol en etanol), K-medium (32 mM KCl, 51 mM NaCl) y tampón M9 (3 g/L KH_2PO_4 , 6 g/L Na_2HPO_4 , 5 g/L NaCl, 1 mL 1 $MgSO_4$) fueron

adquiridos en Scharlab (España), excepto el colesterol (95% p/p), que fue suministrado por Acros Organics (España).

2.2 Material vegetal y métodos de extracción

La harina de vaina madura, el epispermo y germen fueron suministrados por G.A. Torres S.L. (Turís, España). Las vainas verdes y las hojas fueron recolectadas durante el mes de abril de diferentes árboles de Enguera (Valencia).

Para extraer los compuestos fenólicos, se homogeneizaron 2 gramos de las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto (vainas verdes, germen, epispermo, harina de vainas maduras y hojas) con 15 mL de agua:etanol (50:50; v:v). A continuación, los tubos de muestras se sumergieron en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente durante 10 minutos, manteniendo la temperatura con bloques de hielo. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 8500 rpm a 21°C. El sobrenadante se filtró y se recogió, y el pellet se homogeneizó con 15 mL de agua:etanol (50:50; v:v). Las muestras se sometieron de nuevo a ultrasonidos y se centrifugaron. A continuación, se filtró el sobrenadante, se recogió y se mezcló con el del primer paso. El pellet se homogeneizó con 15 mL de agua:acetona (30:70; v:v) y se sometió a ultrasonidos y centrifugado en las mismas condiciones. Finalmente, se mezclaron los tres sobrenadantes, se evaporó la fracción orgánica (etanol y acetona) y se resuspendió con agua destilada hasta 25 mL para evitar que esta fracción afecte al nematodo.

2.3 Compuestos fenólicos totales

Se mezcló una alícuota de 15,8 µL de los extractos con 158 µL de Folin-Ciocalteu (1:10) en una microplaca de 96 pocillos. Tras 3 minutos de incubación en condiciones de oscuridad, se añadieron 126 µL de solución de carbonato sódico, y la mezcla se incubó durante 1 hora en oscuridad. A continuación, se midió la microplaca a 765 nm utilizando un lector de microplacas VANTASTAR (BMG LabTech, Ortenberg, Alemania). La cuantificación mediante una curva estándar osciló entre 50 y 750 ppm de ácido gálico, y los resultados se expresaron como g EAG (equivalentes de ácido gálico) / 100 g de producto de algarroba.

2.4 Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó mediante los métodos DPPH y ORAC utilizando un lector de microplacas VANTASTAR (BMG LabTech, Ortenberg, Alemania).

2.4.1 DPPH

Una alícuota de 30 μL de los extractos se mezcló con 270 μL de DPPH en una microplaca de 96 pocillos, y la mezcla se incubó durante 1 hora en la oscuridad. Después se determinó la absorbancia de la muestra a 515 nm. A partir de estos valores se calcularon los g ET (equivalentes de Trolox) /100 g de producto de algarroba utilizando una curva estándar de Trolox que oscilaba entre 10 y 80 ppm.

2.4.2 ORAC

El ensayo ORAC utilizando fluoresceína (FL) se realizó según lo descrito por [Dávalos *et al.* \(2004\)](#) con ligeras modificaciones. Se utilizó una microplaca de 96 pocillos, introduciendo en cada uno 20 μL de la muestra a varias concentraciones realizadas en tampón fosfato 75 mM (pH 7,4), 70 μL de 200 nM de fluoresceína y se incubó la mezcla durante 15 minutos a 37 °C en oscuridad. Tras añadir 110 μL de AAPH 250 mM, se midió la fluorescencia cada minuto durante 100 minutos, utilizando 485 nm para la excitación y 538 nm para las longitudes de onda de emisión. Para hallar el área bajo la curva (AUC), se integró la curva de fluorescencia relativa. Los valores ORAC-FL de las muestras se utilizaron para calcular los g ET (equivalentes de Trolox) / 100 g de producto de algarroba utilizando una curva estándar de Trolox que oscilaba entre 2 y 100 μM .

2.5 Actividad funcional con *C. elegans*

2.5.1 Cepa y mantenimiento

La cepa utilizada para el estudio fue la cepa silvestre N2 de *C. elegans*. El nematodo fue cultivado y crecido en placas de agar NGM con una siembra masiva o en césped de *Escherichia coli* cepa OP50 (incubación 37°C-24 h) como alimento. Se realizaron subcultivos regulares con el fin de evitar el hacinamiento y mantener la población de *C. elegans*. Para todos los experimentos, los hermafroditas adultos se sincronizaron al mismo estadio larvario utilizando una solución alcalina de hipoclorito (0,6 M NaOH, 1% NaClO) y se cultivaron a 20°C en oscuridad durante 3 días hasta alcanzar el estado adulto.

2.5.2 Letalidad

Los ensayos de letalidad para los diferentes extractos se realizaron en placas de 24 pocillos con un volumen final de 1 mL de medio líquido, compuesto de 500 μL de gusanos extraídos previamente mediante K-medium, 50 y 100 μL de los diferentes extractos y 450 y 400 μL de K-medium respectivamente. Los controles negativos (500 μL de gusanos y 500 μL de K-medium) se incluyeron por cuadruplicado en la placa.

Para el ensayo se utilizaron los cinco extractos de diferentes partes del algarrobo y su fruto (vainas verdes, germen, epispermo, harina de vaina madura y hoja) en diferentes concentraciones (50 y 100 $\mu\text{L/mL}$) y con tres tipos de exposiciones diferentes (completa, barrera y fisiológica). En el caso de la exposición completa, se expuso a los nematodos a los diferentes extractos durante 24 h a 20°C y se realizaron los diferentes ensayos de estrés. En el caso de la exposición barrera, se expuso a los nematodos a los diferentes extractos y a continuación se realizaron los diferentes ensayos de estrés. Por último, en el caso de la exposición fisiológica se expuso a los nematodos a los diferentes extractos durante 24 h a 20°C, se realizó el lavado del medio y se llevaron a cabo los diferentes ensayos de estrés. Las diferentes exposiciones se realizaron con el objetivo de conocer el efecto protector del medio de los diferentes extractos (efecto barrera), el efecto protector por el consumo de los extractos (efecto fisiológico) y la combinación de ambos (efecto completo).

Tras la exposición, se registró el número de gusanos vivos y muertos mediante inspección visual bajo un microscopio de disección estereoscópico (Motic, SMZ-161, Motic China Group CO., LT, China). Los nematodos se consideraron muertos si no respondían al estímulo al tocarlos con un alambre metálico. Los resultados se expresaron como el porcentaje de gusanos muertos respecto al número total de nematodos en cada pocillo (tasa de letalidad).

2.5.2.1 Estresores

Para la realización de los ensayos de letalidad de *C. elegans* se utilizaron diferentes estresores, concretamente la radiación UV, el calor y el H_2O_2 .

La exposición a la radiación UV se realizó mediante una lámpara UV a 254 nm (UVGL-55 hand-held UV Lamp, UVP, Upland, Ca, EEUU). Tras la realización de ensayos previos se determinó que el tiempo de exposición idóneo para la evaluación de la capacidad antioxidante de los diferentes extractos era de 20 minutos, ya que se logró una alta mortalidad en los controles negativos.

La exposición al calor se realizó mediante la exposición de los nematodos a una temperatura de 37°C durante 2 h en una estufa, siendo monitoreado el estado de estos cada 30 minutos. Al igual que en el caso anterior, las condiciones del ensayo fueron determinadas por pruebas realizadas previamente.

La exposición al H_2O_2 se realizó mediante la aplicación de una concentración de 65 mM de este compuesto sobre los diferentes pocillos durante 20 minutos. Al igual que en los anteriores casos, la concentración y tiempo de ensayo seleccionados se determinaron en base a ensayos previos.

La exposición a la radiación UV se realizó para los cinco extractos (vainas verdes, germen, epispermo, harina de vaina madura y hoja). En cambio, la exposición al calor y al H₂O₂ se aplicó únicamente sobre el extracto de epispermo.

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando Statgraphics Plus (v. 19.1.2 Stat-Technologies Point technologies. Inc., Warrenton, VA, EE. UU.). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple y múltiple en un experimento de dos y tres factores respectivamente, donde las variables fueron la concentración, el tipo de exposición y el tipo de subproducto de algarroba. Se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey para separar las medias y la significación estadística se evaluó al nivel de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de compuestos fenólicos totales

Con el objetivo de determinar la cantidad de compuestos fenólicos totales para las diferentes fracciones del algarroba y su fruto se llevó a cabo el método Folin-Ciocalteu. Tal y como se muestra en la **Figura 2**, el producto que presentó una mayor cantidad de compuestos fenólicos fue el epispermo ($4,8 \pm 0,3$ g EAG/100g producto), seguida de la vaina verde ($4,08 \pm 0,15$ g EAG/100g producto), la hoja ($2,656 \pm 0,003$ g EAG/100g producto), la harina de vaina madura ($1,65 \pm 0,04$ g EAG/100g producto) y el germen ($1,47 \pm 0,05$ g EAG/100g producto). A su vez, se observa que todas las fracciones presentan diferencias significativas entre sí, a excepción del germen y la harina de vaina madura (D).

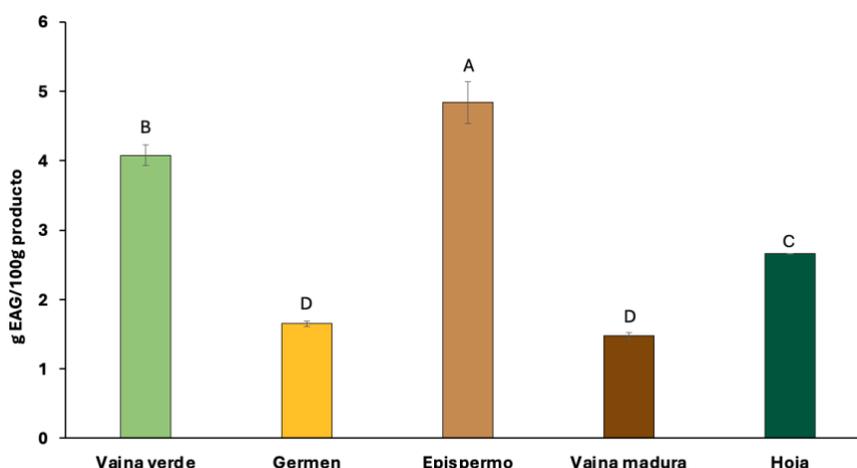


FIGURA 2. Resultados de la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el método Folin-Ciocalteu para los diferentes extractos de vaina verde, germen, epispermo, harina de vaina madura y hoja. Las barras con diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes fracciones con $P < 0,05$.

Resultados similares a los obtenidos se observaron en los estudios llevados a cabo por [Tounsi *et al.* \(2022\)](#) y [Rico *et al.* \(2019\)](#). Además, en estudios previos realizados sobre otros productos, se detectó un valor de 2,89 mg EAG/100g para el dátil fresco ([Biglari *et al.*, 2008](#)), 68,8 mg EAG/100g para la sandía ([Wu & Ng, 2008](#)), 565 mg EAG/100g para los arándanos y 1156 mg EAG/100g para el kiwi ([Park *et al.*, 2008](#)). Por tanto, en relación con los resultados obtenidos en el presente estudio podemos determinar que las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto tienen un gran contenido en compuestos fenólicos totales, superior al de otras frutas.

3.2 Determinación de la capacidad antioxidante

3.2.1 DPPH

La **Figura 3** muestra los resultados de la capacidad antioxidante obtenidos mediante el método DPPH. En este caso, el producto con mayor capacidad antioxidante fue la vaina verde ($11,683 \pm 0,015$ g ET/100g producto), seguida del epispermo ($10,8 \pm 0,5$ g ET/100g producto), la hoja ($8,40 \pm 0,14$ g ET/100g producto), la harina de vaina madura ($4,16 \pm 0,12$ g ET/100g producto) y el germen ($2,583 \pm 0,015$ g ET/100g producto). Se observa además que todas las fracciones estudiadas presentan diferencias significativas entre sí. En el estudio de [Cegledi *et al.* \(2024\)](#) se observaron resultados similares para diferentes extractos de hojas de algarrobo.

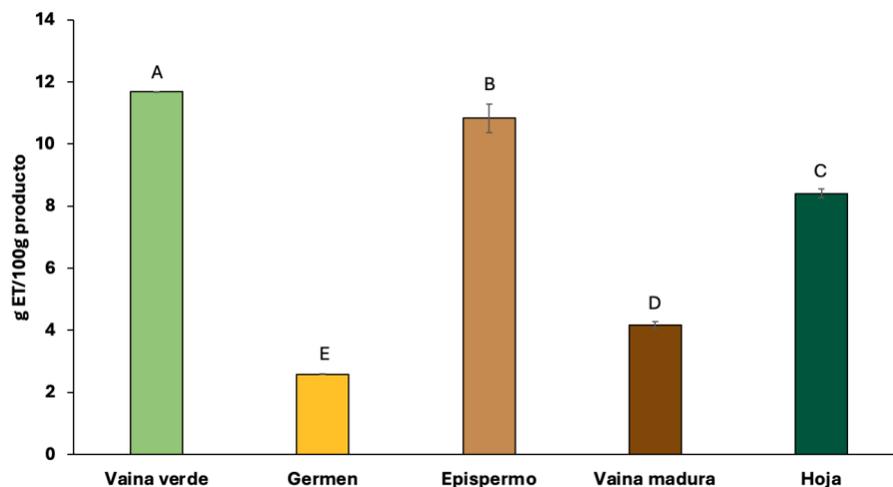


FIGURA 3. Resultados de la capacidad antioxidante obtenidos por el método DPPH para las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto (vainas verde, germen, epispermo, harina de vaina

madura, hoja). Las barras con diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes fracciones con $P < 0,05$.

Otros extractos de frutas con una gran capacidad antioxidante se han analizado mediante el mismo método, obteniéndose valores de entre 1,6 y 3,2 g ET/100g producto para extractos de frambuesa y de entre 2,3 y 4,4 g ET/100g para extractos de mora (Sariburun *et al.*, 2010). Por tanto, todas las fracciones del algarrobo y su fruto mostraron una alta capacidad antioxidante.

3.2.2 ORAC

La **Figura 4** muestra los resultados de capacidad antioxidante obtenidos mediante el método ORAC. En este caso, se observa que el epispermo presenta una capacidad antioxidante significativamente superior al resto ($45,1 \pm 0,7$ g ET/100g producto), lo cual coincide con lo observado en la determinación de compuestos fenólicos totales. Este valor es seguido por el germen ($14,3 \pm 0,9$ g ET/100g producto), la vaina verde ($13,3 \pm 0,8$ g ET/100g producto), la hoja ($9,2 \pm 0,8$ g ET/100g producto) y la harina de vaina madura ($9,0 \pm 0,4$ g ET/100g producto). Además, se encuentran diferencias significativas entre el epispermo (A), el grupo de vaina verde y germen (B) y el de harina de vaina madura y hoja (C). Valores similares a los obtenidos se han determinado en diferentes tipos de bayas comestibles (Li & Jeong, 2015). Por tanto, al igual que mediante el método DPPH podemos determinar que las fracciones del algarrobo y su fruto presentan una alta capacidad antioxidante.

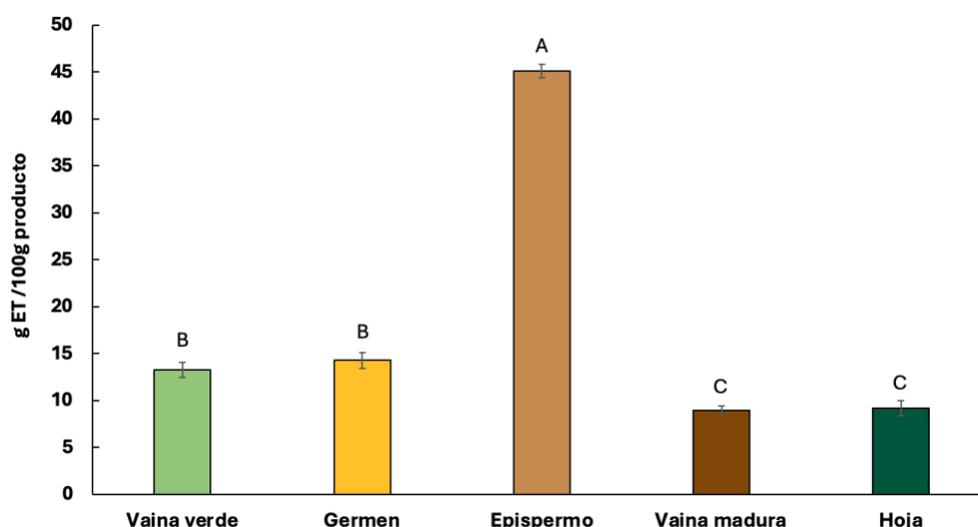


FIGURA 4. Resultados de la capacidad antioxidante obtenidos por el método ORAC para las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto (vaina verde, germen, epispermo, harina de vaina madura, hoja). Las barras con diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes fracciones con $P < 0,05$.

3.3 Letalidad

3.3.1 Radiación UV

La **Figura 5** muestra la tasa de letalidad de *C. elegans* frente a la radiación UV cuando se realiza una exposición completa a los extractos. En primer lugar, mediante el control podemos observar que en ausencia de las diferentes fracciones de algarroba la letalidad de *C. elegans* fue de un 98%. En cambio, tras la exposición a ambas concentraciones de las fracciones del algarrobo y su fruto se observa una reducción de la letalidad de alrededor de un 90% para todos los extractos, logrando una reducción de hasta un 95% en el caso del epispermo. En este sentido, la mayor reducción de la letalidad se observó en el epispermo, seguida del germen, la vaina verde, la harina de vaina madura y la hoja. Con la aplicación de una concentración de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de extracto observamos diferencias significativas entre el control (A), extracto de hoja (B), harina de vaina madura (C), epispermo (D) y el grupo de vaina verde y germen (CD), los cuales no presentan diferencias estadísticas entre ellos. En cuanto a la concentración de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, existen diferencias significativas entre el control (A), la hoja (B), el grupo de vaina verde, germen y harina de vaina madura (BC) y el epispermo (C). En cuanto a las dos concentraciones aplicadas de los diferentes extractos, se observa que solamente presentan diferencias significativas los extractos de vaina verde y harina de vaina madura.

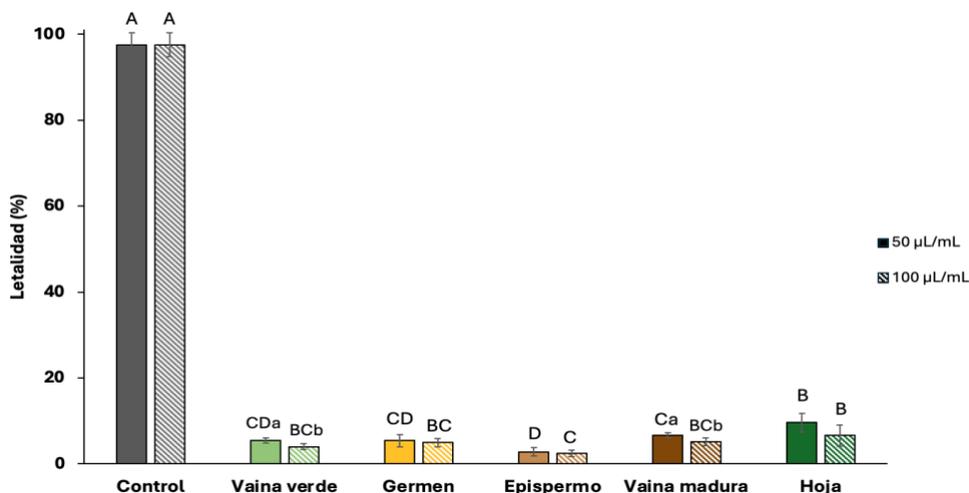


FIGURA 5. Efecto de las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto sobre la letalidad de *C. elegans* frente a una exposición completa a los extractos mediante luz UV. Las barras con diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes fracciones con $P < 0,05$. Las barras con diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes concentraciones aplicadas con $P < 0,05$. La ausencia de letras minúsculas indica que no existen diferencias significativas.

Tras los notables resultados positivos obtenidos en el ensayo se evaluó el mecanismo de protección correspondiente a la protección física proporcionada por el medio (efecto barrera) y a la protección biológica proporcionada por el consumo de los extractos por parte del nematodo (efecto fisiológico).

En la **Figura 6** se observa la tasa de letalidad de *C. elegans* frente a la radiación UV evaluando la protección que le otorga el medio al nematodo. Con la aplicación de los extractos de las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto se logró una reducción general de un 60% de la letalidad, a excepción del epispermo que redujo la letalidad hasta un 95%. Para ambas concentraciones no se encuentran diferencias significativas entre los extractos de vaina verde, germen, harina de vaina madura y hoja (B), pero sí entre estos, el control (A) y el extracto de epispermo (C). De la misma forma, únicamente se observan diferencias significativas en cuanto a la concentración aplicada en el caso de la vaina verde.

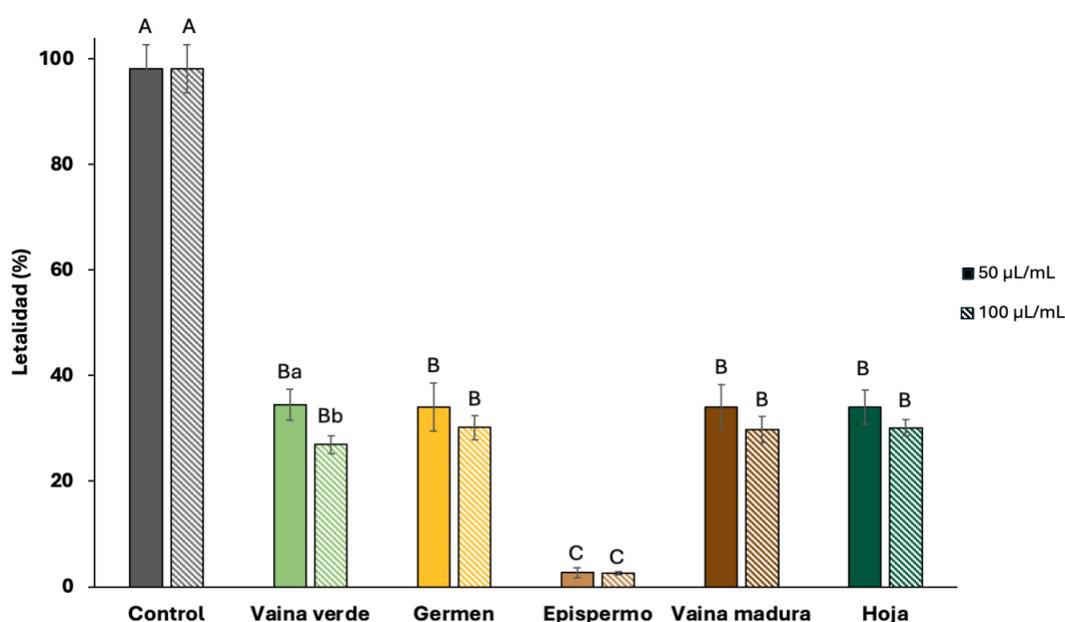


FIGURA 6. Efecto de las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto sobre la letalidad de *C. elegans* frente a una exposición barrera a los extractos mediante luz UV. Las barras con diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes fracciones con $P < 0,05$. Las barras con diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes concentraciones aplicadas con $P < 0,05$. La ausencia de letras minúsculas indica que no existen diferencias significativas.

En la **Figura 7** podemos observar los resultados de letalidad de *C. elegans* frente a la radiación UV evaluando la protección que le otorga el consumo de los extractos al nematodo. Este consumo reduce la letalidad alrededor de un 40% de forma

general, logrando la mayor reducción con la aplicación de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de epispermo (54%). Con el uso de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ se observan diferencias significativas entre el control (A), el extracto de harina de vaina madura y germen (B), hoja y vaina verde (C), y epispermo (D). En cambio, con el uso de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ solamente se observan diferencias significativas entre el control (A), el grupo de vaina verde, germen, harina de vaina madura y hoja (B) y el epispermo (C). En este caso, se observan diferencias significativas entre las dos concentraciones estudiadas en el extracto de germen y epispermo.

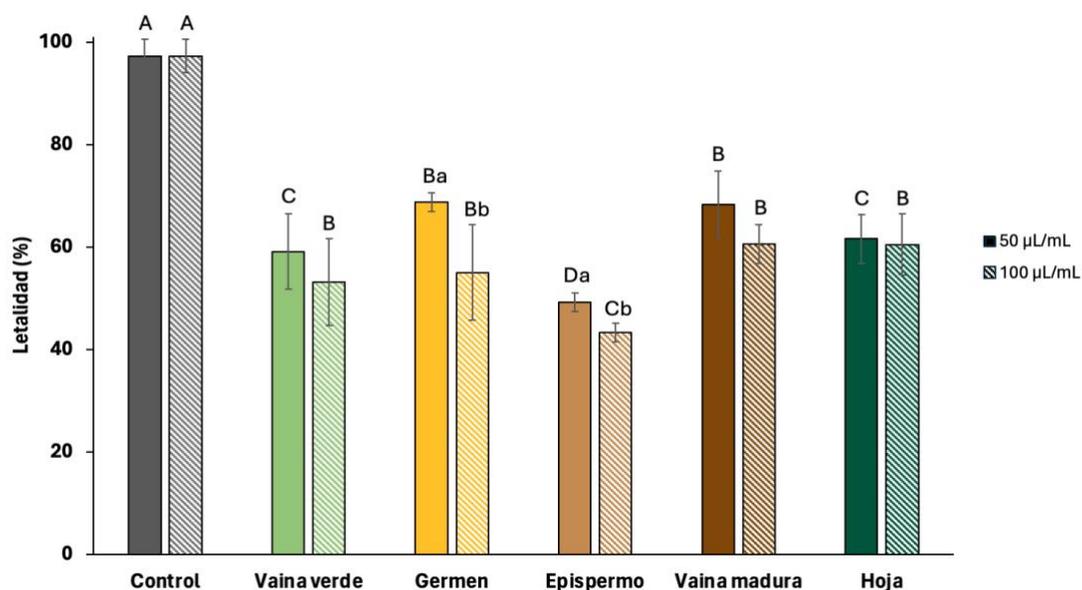


FIGURA 7. Efecto de las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto sobre la letalidad de *C. elegans* frente a una exposición fisiológica a los extractos mediante luz UV. Las barras con diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes fracciones con $P < 0,05$. Las barras con diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes concentraciones aplicadas con $P < 0,05$. La ausencia de letras minúsculas indica que no existen diferencias significativas.

Como conclusión, se puede afirmar que en todos los casos existen diferencias significativas entre los controles negativos y la aplicación de los diferentes extractos, demostrando la capacidad de estos para reducir el estrés oxidativo. De igual forma, se observa que la suma del efecto barrera y fisiológico se correlaciona con los datos obtenidos en la exposición completa, a excepción del epispermo que mostró una mayor disminución de la letalidad. De forma general se observa un menor rendimiento de los extractos de harina de vaina madura y hoja, seguidos de la vaina verde y el germen y por último el epispermo. Estos resultados tienen una mayor concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo ORAC que con los obtenidos en el ensayo DPPH. Por tanto, los resultados obtenidos están en

consonancia con estudios previos que indican que ORAC es el mejor método para cuantificar la actividad antioxidante. El ensayo DPPH es sencillo y rápido, pero no refleja con precisión la capacidad antioxidante en sistemas biológicos complejos al centrarse en el nitrógeno, tener la zona radical altamente obstaculizada y ser muy sensibles al entorno de reacción (Schaich *et al.*, 2015). De la misma forma el ensayo de Folin-Ciocalteu no es específico ya que otras sustancias pueden reducir el reactivo y obtener resultados sesgados (Sadeer *et al.*, 2020).

Por último, se realizó el ANOVA multifactorial para determinar el impacto de los tres factores, así como sus interacciones, en la letalidad de *C. elegans*. En este sentido, en la **Tabla 1** observamos los valores de F-ratio y p-value obtenidos para el ensayo de letalidad frente a la radiación UV. En primer lugar, el p-value muestra que todos los factores (concentración, extracto, exposición) presentan una influencia significativa ($P < 0,05$) sobre la letalidad. El valor de F-ratio es directamente proporcional al efecto estadístico de cada factor en la variable respuesta. En base a este parámetro, observamos que el tipo de exposición (completa, barrera, fisiológica) fue el factor que más influyó en la letalidad, seguido del tipo de extracto estudiado (vainas verdes, germen, epispermo, harina de vaina madura, hoja) y por último la concentración (50 y 100 $\mu\text{L/mL}$).

TABLA 1. F-ratio y p-value de los efectos principales e interacciones de las variables analizadas en el ANOVA multifactorial para los resultados de letalidad de *C. elegans* tras la aplicación de radiación UV.

Factor	F-ratio	p-value
A: Concentración	34,17	0,0000
B: Extracto	85,26	0,0000
C: Exposición	1955,76	0,0000
INTERACCIONES		
AxB	0,11	0,3560
AxC	5,37	0,0063
BxC	19,96	0,0000

En cuanto a las interacciones, observamos que la interacción entre la concentración y la exposición (AxC) y entre el extracto y la exposición (BxC) presentan una influencia significativa ($P < 0,05$) sobre la variable respuesta, lo cual no ocurre entre la interacción de concentración y extracto (AxB). En relación con el valor de F-ratio, la interacción de factores que presenta una mayor influencia sobre la letalidad es la de extracto y exposición (BxC), seguido de concentración y exposición (AxC), y por último concentración y extracto (AxB).

3.3.2 Calor

Tras los favorables resultados obtenidos frente a la luz UV, y tras comprobar que la vía de exposición era más importante que el tipo de extracto empleado, se procedió a estudiar exclusivamente el efecto del epispermo, por ser el que mostró ligeramente mejores resultados.

En la **Figura 8** observamos la tasa de letalidad de *C. elegans* frente al calor cuando se realizan diferentes tipos de exposiciones con el extracto de epispermo. Con la aplicación de ambas concentraciones de epispermo observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el control y la exposición fisiológica (A), las cuales presentan una letalidad de alrededor del 60%. Sí se detectaron, en cambio, diferencias estadísticamente significativas entre éstas y la exposición completa y barrera (B), logrando en este caso la reducción de alrededor de un 20% de la letalidad, siendo esta reducción de menor magnitud que frente a otros estresores estudiados. De igual manera, en ningún caso se encontraron diferencias significativas entre las dos concentraciones estudiadas. Estos datos demuestran que los extractos de algarroba también protegen frente a este tipo de estrés físico.

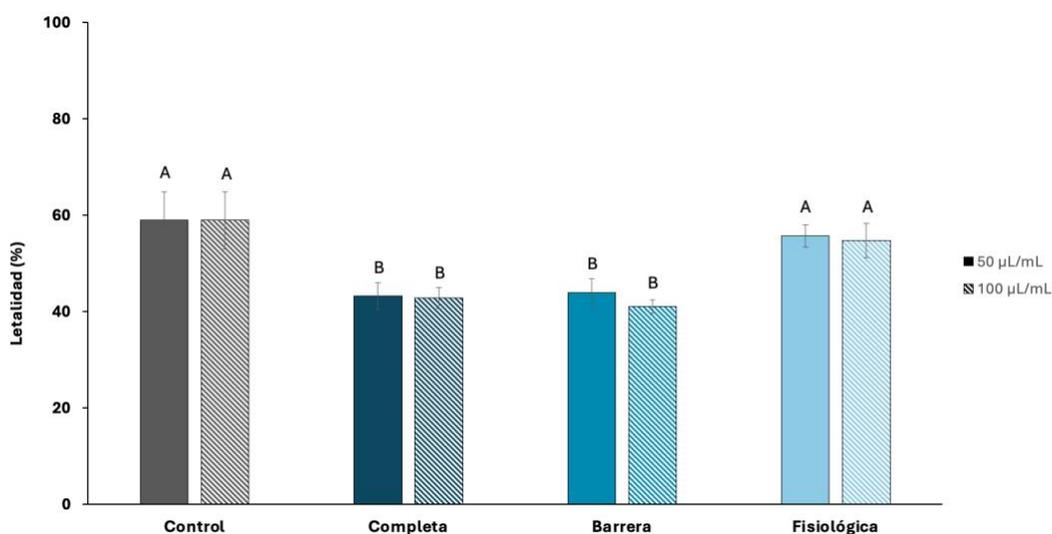


FIGURA 8. Efecto del epispermo sobre la letalidad de *C. elegans* frente al estresor térmico. Las barras con diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes exposiciones con $P < 0,05$. Las barras con diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes concentraciones aplicadas con $P < 0,05$. La ausencia de letras minúsculas indica que no existen diferencias significativas.

En la **Tabla 2** observamos los valores de F-ratio y p-value obtenidos para los dos factores estudiados en el caso del ensayo frente al estrés térmico (concentración y exposición). En este caso, el p-value muestra que solamente el tipo de exposición presenta una influencia significativa ($P < 0,05$) sobre la letalidad. En cuanto a la interacción entre la concentración y la exposición (AxB) observamos que no presenta una influencia significativa ($P < 0,05$) sobre la variable respuesta.

TABLA 2. F-ratio y p-value de los efectos principales e interacciones de las variables analizadas en el ANOVA multifactorial para los resultados de letalidad de *C. elegans* tras la aplicación de calor.

Factor	F-ratio	p-value
A: Concentración	1,83	0,1934
B: Exposición	61,46	0,0000
INTERACCIONES		
AxB	0,52	0,6049

3.3.3 H_2O_2

La **Figura 9** muestra la tasa de letalidad de *C. elegans* frente al peróxido de hidrógeno, un estresor químico, cuando se realizan diferentes tipos de exposiciones con el extracto de epispermo. En primer lugar, podemos observar que en ausencia de epispermo (control), la letalidad ronda el 70%. En este caso, podemos observar resultados de letalidad similares cuando el nematodo consumió el epispermo (exposición fisiológica). En cambio, sí notamos un cambio sustancial en el caso de la exposición completa y barrera, logrando una reducción de alrededor del 50% de la letalidad. Concretamente, con el uso de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de epispermo no se detectan diferencias significativas entre la exposición fisiológica y el control (A), pero sí entre estos y la exposición completa y barrera (B). En base a estos resultados se puede afirmar entonces que con el uso de esta concentración, fue el efecto barrera el que contribuyó únicamente al efecto de la exposición completa. En el caso del uso de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de epispermo, se observan diferencias significativas entre el control (A), exposición fisiológica (B) y exposición completa y barrera (C).

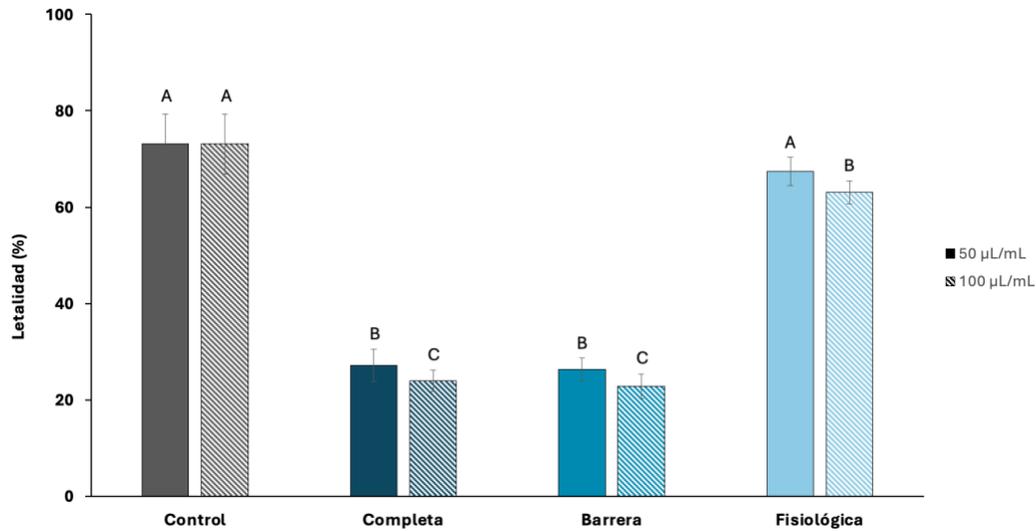


FIGURA 9. Efecto del epispermo sobre la letalidad de *C. elegans* frente al estresor H_2O_2 . Las barras con diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes exposiciones con $P < 0,05$. Las barras con diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas entre las diferentes concentraciones aplicadas con $P < 0,05$. La ausencia de letras minúsculas indica que no existen diferencias significativas.

En la **Tabla 3** observamos los valores de F-ratio y p-value obtenidos para los dos factores estudiados en el caso del ensayo frente a H_2O_2 (concentración y exposición). Al igual que en el caso anterior, el p-value muestra que solamente el tipo de exposición presenta una influencia significativa ($P < 0,05$) sobre la letalidad. En cambio, en este caso sí observamos una influencia significativa ($P < 0,05$) de la interacción entre la concentración y la exposición (AxB) sobre la variable respuesta.

TABLA 3. F-ratio y p-value de los efectos principales e interacciones de las variables analizadas en el ANOVA multifactorial para los resultados de letalidad de *C. elegans* tras la aplicación de H_2O_2 .

Factor	F-ratio	p-value
A: Concentración	0,53	0,4773
B: Exposición	610,76	0,0000
INTERACCIONES		
AxB	5,48	0,0139

Por último, cabe mencionar que Wang *et al.* (2020) estudiaron el efecto de extractos de naranja sobre la letalidad de *C. elegans* frente a la radiación UV, logrando una reducción de hasta un 36%. Un estudio similar realizado por Luo *et al.* (2019) sobre extractos de hojas de olivo frente al estrés térmico muestra una reducción de la letalidad de un 10%. De igual forma, el estudio realizado por Hu *et al.* (2021) sobre la capacidad antioxidante de una medicina herbal china mostró una reducción de la letalidad de hasta un 33% frente al uso de H₂O₂. Estos resultados muestran en todos los casos una reducción de la letalidad menor que con el uso de las fracciones del algarrobo y su fruto estudiadas, por lo que se demuestra el gran efecto protector que presentan los extractos de esta especie botánica, corroborando el gran interés que tienen desde el punto de vista de la funcionalidad.

4. CONCLUSIONES

El presente estudio ha confirmado la gran actividad antioxidante de todos los extractos de algarrobo y su fruto, y por tanto su alto potencial como alimento funcional. Tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo* realizados ha destacado el extracto de epispermo, el cuál es un subproducto que en la actualidad no presenta ningún tipo de aprovechamiento. Además del epispermo, otro producto que no es consumido y ha mostrado resultados positivos son las hojas de algarrobo, lo que supone una importante fuente de valorización de ambos subproductos.

Se ha logrado una reducción de la letalidad del nematodo en todos los ensayos de estrés realizados. Concretamente se observa un mayor efecto de los extractos con la aplicación de luz ultravioleta, seguida del peróxido de hidrógeno y el calor. Aún así, el efecto de estos extractos ha sido mayor que el de otros extractos referenciados en la literatura científica. Podemos por tanto afirmar que las diferentes fracciones del algarrobo y su fruto ejercen un efecto protector sobre diferentes causas de estrés oxidativo en el nematodo *C. elegans*.

En cuanto a los resultados obtenidos en los diferentes ANOVAS multifactoriales realizados, se observa que todos los factores fueron estadísticamente significativos a excepción del factor concentración en los ensayos de letalidad realizados frente a calor y H₂O₂. En relación a la influencia de estos factores sobre la letalidad del nematodo, observamos que en los tres ensayos realizados el tipo de exposición fue el factor con mayor importancia, seguido del tipo de extracto únicamente en el ensayo con radiación UV y por último la concentración.

El hecho de que los resultados de los ensayos *in vivo* concuerden con los obtenidos en los ensayos *in vitro* realizados y en trabajos previos pone de manifiesto

que el uso del nematodo *C. elegans* es adecuado para la realización de ensayos *in vivo* para la evaluación de la actividad antioxidante.

En el futuro, se recomienda estudiar el uso de otras concentraciones y la aplicación de diferentes estresores y exposiciones. Asimismo, puede ser interesante la realización de otros ensayos para evaluar el estrés oxidativo (ROS), además de otros ensayos como los ensayos de movimiento, reproducción o de resistencia frente a patógenos lo que permitiría evaluar la actividad antimicrobiana de estos extractos.

5. REFERENCIAS

- Albertos, I., Jaime, I., Diez, A. M., González-Arnáiz, L., & Rico, D. (2015). Carob seed peel as natural antioxidant in minced and refrigerated (4 °C) Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *LWT*, 64(2), 650-656. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.037>
- Biglari, F., AlKarkhi, A. F., & Easa, A. M. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107(4), 1636-1641. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.033>
- Brassesco, M. E., Brandão, T. R., Silva, C. L., & Pintado, M. (2021). Carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): A new perspective for functional food. *Trends In Food Science & Technology*, 114, 310-322. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.037>
- Cegledi, E., Dobroslavić, E., Zorić, Z., Repajić, M., & Garofulić, I. E. (2024). Antioxidant Activity of Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Leaf Extracts Obtained by Advanced Extraction Techniques. *Processes*, 12(4), 658. <https://doi.org/10.3390/pr12040658>
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of food protection*, 67(9), 1939–1944. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.9.1939>
- Hu, Q., Liu, Z., Guo, Y., Lu, S., Du, H., & Cao, Y. (2021). Antioxidant capacity of flavonoids from *Folium Artemisiae Argyi* and the molecular mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Journal Of Ethnopharmacology*, 279, 114398. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114398>
- Huang, J., Qi, S., Sun, Q., Song, G., Tang, J., & Duan, Y. (2024). Antioxidant capacity of sesamol in *Caenorhabditis elegans* model system. *Food Production Processing And Nutrition*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00186-5>
- Hunt, P. R. (2016). The *C. elegans* model in toxicity testing. *JAT. Journal Of Applied Toxicology/Journal Of Applied Toxicology*, 37(1), 50-59. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>

- Ikram, A., Khalid, W., Zafar, K. W., Ali, A., Afzal, M. F., Aziz, A., Rasool, I. F. U., Al-Farga, A., Aqlan, F., & Koraqi, H. (2023). Nutritional, biochemical, and clinical applications of carob: A review. *Food Science & Nutrition*, 11(7), 3641-3654. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3367>
- Ioannou, G. D., Savva, I. K., Christou, A., Stavrou, I. J., & Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2023). Phenolic Profile, Antioxidant Activity, and Chemometric Classification of Carob Pulp and Products. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 28(5), 2269. <https://doi.org/10.3390/molecules28052269>
- Martins-Loução, M. A. (1990). Carob (*Ceratonia siliqua* L.). En *Biotechnology in agriculture and forestry* (pp. 658-675). https://doi.org/10.1007/978-3-642-74448-8_31
- Martins-Loução, M. A., Correia, P. J., & Romano, A. (2024). Carob: A Mediterranean Resource for the Future. *Plants*, 13(9), 1188. <https://doi.org/10.3390/plants13091188>
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends In Food Science & Technology*, 48, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.008>
- Laaraj, S., Salmaoui, S., Addi, M., El-Rhouttais, C., Tikent, A., Elbouzidi, A., Taibi, M., Hano, C., Noutfia, Y., & Elfazazi, K. (2023). Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Seed Constituents: A Comprehensive Review of Composition, Chemical Profile, and Diverse Applications. *Journal Of Food Quality*, 2023, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2023/3438179>
- Li, H., & Jeong, J. M. (2015). Antioxidant Activities of Various Berries Ethanolic Extract. *Korean Journal Of Medicinal Crop Science*, 23(1), 49-56. <https://doi.org/10.7783/kjmcs.2015.23.1.49>
- Luo, S., Jiang, X., Jia, L., Tan, C., Li, M., Yang, Q., Du, Y., & Ding, C. (2019). In Vivo and In Vitro Antioxidant Activities of Methanol Extracts from Olive Leaves on *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, 24(4), 704. <https://doi.org/10.3390/molecules24040704>
- Park, H. H., Jung, Y., & Lee, S. V. (2017). Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules And Cells*, 40(2), 90-99. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017>
- Park, Y., Jung, S., Kang, S., Heo, B. G., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Drzewiecki, J., Namiesnik, J., & Gorinstein, S. (2008). Antioxidants and proteins in ethylene-treated kiwifruits. *Food Chemistry*, 107(2), 640-648. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.070>
- Rico, D., Martín-Diana, A., Martínez-Villaluenga, C., Aguirre, L., Silván, J., Dueñas, M., De Luis, D., & Lasa, A. (2019). In vitro approach for evaluation of carob by-products as source bioactive ingredients with potential to attenuate metabolic syndrome (MetS). *Heliyon*, 5(1), e01175. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01175>
- Sadeer, N. B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>

- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, V. (2010). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. *Journal Of Food Science*, 75(4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01571.x>
- Schaich, K., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal Of Functional Foods*, 14, 111-125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Song, B., Zheng, B., Li, T., & Liu, R. H. (2020). Raspberry extract ameliorates oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* via the SKN-1/Nrf2 pathway. *Journal Of Functional Foods*, 70, 103977. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103977>
- Tejeda-Benitez, L., & Olivero-Verbel, J. (2016). *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology. En *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 1-35). https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_1
- Tounsi, L., Mkaouar, S., Bredai, S., & Kechaou, N. (2022). Valorization of carob by-product for producing an added value powder: characterization and incorporation into Halva formulation. *Journal Of Food Measurement And Characterization*, 16(5), 3957-3966. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01494-z>
- Wang, J., Deng, N., Wang, H., Li, T., Chen, L., Zheng, B., & Liu, R. H. (2020). Effects of Orange Extracts on Longevity, Healthspan, and Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, 25(2), 351. <https://doi.org/10.3390/molecules25020351>
- Wu, S., & Ng, L. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie/Food Science & Technology*, 41(2), 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.003>