

Artículo Original

Nueva fuente de antioxidantes para el control de pardeamiento enzimático: una alternativa para la reducción de pérdidas en poscosecha de frutas

Luz M. Alzate T.¹, Diana M. Arteaga G.², Carlos A. Guerreño E.³, Benjamín A. Rojano⁴.

■ RESUMEN

Las frutas frescas y las hortalizas han tenido un aumento en la demanda durante la última década a raíz de la evidencia que correlaciona su ingesta regular con un menor riesgo de desarrollar varias enfermedades crónicas y degenerativas. Además, existe una tendencia igual sobre el consumo de dichos alimentos de una forma mínimamente procesadas [Dudley, Das, Mukherjee & Das, 2009].

Como contraposición, se encuentra un constante deterioro que sufren las frutas y hortalizas frescas a causa de cambios, reacciones o descomposición que pueden dar lugar a la degradación del color, la textura y el sabor. Las reacciones de pardeamiento enzimático son una de las principales causas del deterioro en estos productos naturales y determinan en gran medida su calidad y valor económico [Wootton-Beard, Moran & Ryan].

Teniendo en cuenta el interés de propiciar un aporte a la solución de la comercialización de frutas sanas, saludables y con poca transformación, surge esta investigación para estudiar las propiedades antioxidantes de la cáscara, la semilla y la pulpa de algarrobo, y su aplicación en frutas susceptibles a este tipo de reacciones como tercera fase de una investigación sobre la obtención de conservantes naturales a partir esta planta nativa. El objetivo fue evaluar la capacidad antioxidante del algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) sobre frutas susceptibles al pardeamiento enzimático. El estudio en particular parte de realizar una caracterización fisicoquímica de la cáscara, la semilla y la pulpa del algarrobo. Posteriormente, se analizó el contenido de fenoles y su capacidad antioxidante mediante el método Oxygen Radical Absorbance Capacity –ORAC– para,

1 Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos, GRIAL. Corporación Universitaria Lasallista. A. A. 50130 Medellín, Antioquia.

2 Empresas de Alimentos INGAL. Cra 45 Sur N.º 41 - 135. Envigado, Antioquia.

3 TecnoParque Colombia Nodo Rionegro. SENA. Calle 41 No. 5A 3-24.

4 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; *Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: lualzate@lasallistadocentes.com

finalmente, estudiar su aplicación sobre la manzana y el banano, como frutas de referencia del pardeamiento enzimático analizando los índices de pardeamiento y el cambio de color normalizado.

Mediante el análisis ANOVA se pudo identificar que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las 4 variables (ácido ascórbico, semilla, pulpa y cáscara) y se evidenció un alto poder de inhibición ante las reacciones de pardeamiento enzimático en las dos frutas analizadas; fue más efectiva la inhibición sobre el banano, utilizando la semilla del algarrobo, y sobre las manzanas, utilizando la pulpa.

Palabras clave: (*Hymenaea courbaril* Linneaus), antioxidante, pardeamiento enzimático, ORAC, índice de pardeamiento, polifenoloxidasas.

A new source of antioxidants to control enzymatic browning: an alternative to reduce post-harvest losses in fruits

ABSTRACT

Fresh fruits and vegetables have had an increase of their demand during the last decade, because there is evidence of the correlation between their consumption and lower risks of chronic and degenerative diseases. Besides, there is a similar trend to consume such food in minimally processed

ways [Dudley, Das, Mukherjee & Das, 2009]. On the other hand, there is a constant deterioration suffered by fresh fruits and vegetables due to changes, reactions or decomposition that degrade their color, texture and taste. Enzymatic browning reactions are one of the main causes of the deterioration of these natural products and are crucial to define their quality and economic value [Wootton-Beard, Moran & Ryan].

Keeping in mind the interest of contributing to the solution of the commercialization of healthy and minimally transformed fruits, this research work appears to study the antioxidant properties of the peel, the seed and the pulp of the carob and its application on fruits susceptible to such reactions, as the third phase of a research work about the obtainment of natural conservants from this native plant. The objective was to evaluate the antioxidant capacity of carob (*Hymenaea courbaril* Linneaus) on fruits susceptible to enzymatic browning. The study, particularly, starts with a physical-chemical characterization of the peel, the seed and the pulp of the carob. Then, the content of phenols and their antioxidant capacity are analyzed by the use of the Oxygen Radical Absorbance Capacity –ORAC– method in order to, finally, study their application on apples and bananas as reference fruits that suffer from enzymatic browning, by analyzing the browning rates and the change of the normal color.

By means of the ANOVA analysis, a statistically significant difference ($p < 0,05$) between the four variables could be identified (ascorbic acid, seed, pulp and peel) and a high inhibition power before enzymatic browning was demonstrated in the two fruits analyzed. The inhibition was more effective by the use of the

carob's seed in bananas, and by the use of the pulp in apples.

Key words: (*Hymenaea courbaril* Linneaus), antioxidant, enzymatic browning, ORAC, browning rate, polyphenol oxidase.

Nova fonte de antioxidantes para o controle de envelhecimento enzimático: uma alternativa para a redução de perdas em pós-colheita de frutas

RESUMO

As frutas frescas e as hortaliças tiveram um aumento na demanda durante a última década a raiz da evidência que correlaciona sua ingestão regular com um menor risco de desenvolver várias doenças crônicas e degenerativas. Ademais, existe uma tendência igual sobre o consumo de ditos alimentos de uma forma minimamente processadas (Dudley, Dás, Mukherjee & Dás, 2009).

Como contraposição, encontra-se uma constante deterioração que sofrem as frutas e hortaliças frescas por causa de mudanças, reações ou decomposição que podem dar lugar à degradação da cor, a textura e o sabor. As reações de envelhecimento enzimático são uma das principais causas da deterioração nestes produtos naturais e determinam em grande parte sua qualidade e valor econômico (Wootton-Beard, Moram & Ryan).

Tendo em conta o interesse de propiciar um aporte à solução da comercialização de frutas sãs, saudáveis e com pouca transformação, surge esta investigação para estudar as propriedades antioxidantes da casca, a semente e a polpa de Jatobá, e sua aplicação em frutas susceptíveis a este tipo de reações como terceira fase de uma investigação sobre a obtenção de conservantes naturais a partir esta planta nativa. O objetivo foi avaliar a capacidade antioxidante do Jatobá (*Hymenaea courbaril* Linneaus) sobre frutas susceptíveis ao envelhecimento enzimático. O estudo em particular parte de realizar uma caracterização físico-química da casca, a semente e a polpa do Jatobá. Posteriormente, analisou-se o conteúdo de fenóis e sua capacidade antioxidante mediante o método Oxygen Radical Absorbance Capacity –ORAC– para, finalmente, estudar sua aplicação sobre a maçã e a banana, como frutas de referência do envelhecimento enzimático analisando os índices de envelhecimento e a mudança de cor normalizada.

Mediante a análise ANOVA se pôde identificar que existe uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as 4 variáveis (ácido ascórbico, semente, polpa e casca) e se evidenciou um alto poder de inibição ante as reações de envelhecimento enzimático nas duas frutas analisadas; foi mais efetiva a inibição sobre a banana, utilizando a semente do Jatobá, e sobre as maçãs, utilizando a polpa

Palavras chaves: (*Hymenaea courbaril* Linneaus), antioxidante, envelhecimento enzimático, ORAC, índice de envelhecimento, polifenoloxidase.

■ INTRODUCCIÓN

Unos de los factores críticos para la aceptación de los alimentos por parte de los consumidores son su apariencia y su color [Leon, Mery, Pedreschi & Leon, 2006] tanto en productos enteros como de IV generación en los cuales, las reacciones de pardeamiento enzimático son una de las principales causas del deterioro debido a la mala manipulación desde la poscosecha hasta el procesamiento final. La importancia del control de estas reacciones radica en que determinan en gran medida la calidad y el valor económico de las frutas y vegetales cosechados, almacenados y procesados [Guerrero, 2009].

Las enzimas que catalizan el pardeamiento pertenecen a las óxido-reductasas. La polifenol-oxidasa –PPO– cataliza el paso inicial de la oxidación de compuestos fenólicos presentes en frutas y verduras a quinonas, las cuales sufrirán más adelante polimerización para producir pigmentos insolubles y oscuros conocidos como melaninas [Guerrero, 2009] que les darán a estas un color café, haciéndolas inaceptables para el consumo.

La industria de alimentos actualmente emplea diferentes sustancias químicas como ácido ascórbico, bisulfito de sodio, ácido cítrico, entre otros, y tratamientos térmicos como el escaldado y la pasteurización para contrarrestar este fenómeno [Primo Yufera, 1998]. Sin embargo, esto no representa una solución deseable en especial por la tendencia que hoy en día tienen las personas hacia el consumo de frutas y verduras mínimamente procesadas [Sloan, 2010], lo que hace necesaria la búsqueda de fuentes naturales para tal fin.

El fruto del algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) llamado comúnmente Jatobá, del que se conocen sus múltiples propiedades antibacteriales, antimicóticas, antiparasitarias, y nutricionales [Galera, 2000; Nutrition, 2007], posee una gran cantidad de sustancias químicas halladas en las diferentes partes de la misma [Acero Duarte, 2005; Barrero Barrero, 2004], por lo que se constituye en una fuente interesante de investigación con respecto a la obtención de inhibidores del pardeamiento enzimático, que puedan ser usados en alimentos sin que representen un riesgo potencial para la salud del consumidor. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue el de evaluar la capacidad antioxidante del fruto de algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) sobre frutas susceptibles al pardeamiento enzimático como el banano y la manzana.

■ MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se emplearon la cáscara, las semillas y la pulpa del algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*), como inhibidores de pardeamiento enzimático. El algarrobo utilizado fue adquirido en la Central Mayorista de Antioquia, proveniente de occidente de Antioquia.

El estudio se realizó con frutos de banano (*Cavendish valery*) los cuales fueron obtenidos de la Central Mayorista de Antioquia de la ciudad de Medellín provenientes de la zona de Urabá. La selección de los bananos se basó en la forma, tamaño y grado de madurez N.º 5 [Guerrero, 2009]. Se empleó, además, manzana Red Delicious (*Malus Communis*) proveniente de Chile y adquirida en

supermercado de gran superficie. El criterio de selección de dichas frutas fue su gran velocidad de pardeamiento al contacto con el aire [Nguyen, Ketsa & van Doorn, 2003].

Para los análisis químicos se emplearon reactivos de grado analítico de diferentes casas comerciales: Sigma, Aldrich y Merck.

MÉTODOS

Caracterización del banano y la manzana

El contenido de sólidos solubles (°Brix) fue determinado de acuerdo con el método AOAC (1990) 932.12 con un refractómetro Leicca auto ABBE (escala de 0-32 %) a temperatura ambiente. La acidez titulable se determinó volumétricamente con NaOH 0.1N mediante el método AOAC (1990) 22.070 [Guerrero, 2009]. El valor del pH fue medido con un potenciómetro Schott de acuerdo con el método AOAC (1990) 981.12, la actividad acuosa [Aw] con un higrómetro de punto de rocío a 25 °C [Aqualab Decagón serie 3TE]; el color se determinó utilizando el espectrocolorímetro X-RITE, modelo SP60, el iluminante D65 y el observador de 10° como referencia; las medidas se tomaron con componente especular incluida. A partir de los espectros de reflexión se obtuvieron las coordenadas de color del CIE-L*a*b. L* es un indicador de la luminosidad, a* [cromaticidad verde (-) a rojo (+)] y b* [cromaticidad azul (-) a amarillo (+)].

Preparación del algarrobo para los análisis químicos y para el índice de pardeamiento enzimático

Las semillas y las cáscaras fueron molidas por separado, usando un molino de disco dentado [Ateindus, Bogotá, Colombia] y utilizando una malla de 1 micra acoplada al mismo. Los sólidos obtenidos y la pulpa del algarrobo fueron empacados en bolsas plásticas y almacenados en un cuarto a 45 % de humedad relativa y 20 °C.

Determinación de compuestos bioactivos (fenoles totales)

Se determinaron los fenoles totales a la cáscara, la semilla y la pulpa del algarrobo mediante el método de Folin Ciocalteu, el cual emplea como estándar para la curva de calibración el ácido gálico [Singleton, Orthofer, Lamuela-Raventos & Lester, 1999]. Dichos análisis fueron realizados en el laboratorio de Ciencias de los alimentos de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante a la cáscara, la semilla y la pulpa del algarrobo mediante el método ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) el cual consiste en medir la degradación oxidativa de la fluoresceína al reaccionar con generadores de radicales libres [Rojano, Gaviria, Gil, Sáez, Schinella & Tournier, 2008]. Estos análisis fueron igualmente realizados en el laboratorio de Ciencias de los alimentos de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Determinación del índice de pardeamiento en banano y manzana

Se prepararon soluciones al 1.0 % de la cáscara, de la semilla y de la pulpa independientemente, y una solución de ácido ascórbico grado alimenticio a la misma concentración.

Tanto el banano como la manzana se partieron en rodajas de 3 mm aproximadamente y se sumergieron en las diferentes soluciones descritas anteriormente, durante 3 minutos; luego de esto se procedió a leer las variables L^* , a^* y b^* en el espectrocolorímetro cada cinco minutos por un lapso de media hora para observar los cambios de color. Dichos ensayos se realizaron por triplicado.

Con los datos obtenidos se procedió a determinar el índice de pardeamiento usando las siguientes ecuaciones (Olivas, Mattinson & Barbosa-Canovas, 2007):

$$IPE = \frac{100 (x - 0.31)}{0.172}$$

Donde

$$x = \frac{a^* + 1.75 L}{5.645L^* + a^* - 3.0P12b^*}$$

Diseño experimental

Se utilizó el análisis de varianza de una vía para comparar el efecto de tres sustancias (cáscara, semilla y pulpa) que exhiben capacidad antioxidante sobre el pardeamiento enzimático en banano y manzana, comparados con ácido ascórbico como referencia. Las diferencias significativas se compararon por medio de la técnica de rangos múltiples, diferencia mínima significativa (LSD) Fisher con un nivel de confianza del 95 %.

La variable respuesta fue el índice de pardeamiento obtenido de medir las coordenadas de color L^* , a^* , b^* en el tiempo. Para el análisis se empleó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Caracterización del banano y la manzana

En la tabla 1 se presentan las características fisicoquímicas de las frutas evaluadas.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de las frutas evaluadas.

PARÁMETRO	BANANO (Cavendish valery)	MANZANA Red Delicious (Malus Communis)
Acidez Total [%]	0.7 ± 0,2	0,2637 ± 0,9
°Brix	10.8 ± 0,3	12,7 ± 0,5
pH	4.9 ± 0,1	4,0 ± 0,3
Actividad de agua	0.976 ± 0,1	1,025 ± 0,8

Determinación de compuestos bioactivos (fenoles totales)

En la tabla 2 se muestra el contenido de fenoles totales encontrados en las diferentes partes del algarrobo. Se observa claramente

que la semilla y la cáscara de algarrobo presentan niveles altos de fenoles, por lo que podría decirse que tienden a presentar buena capacidad antioxidante en comparación con la pulpa.

Tabla 2. Contenido de fenoles totales para los tres productos del algarrobo.

	Semilla	Cáscara	Pulpa
mg de Ácido Gálico / 100 g de material	12847	3671,4	337,4
Desviación Estándar	7,23	18,16	5,13
% Error	5,63	4,95	1,52

Los resultados anteriores son bastante altos comparados con los contenidos de estos mismos compuestos encontrados en maní tostado con piel, arándanos, vino rojo, té verde y bebida de chocolate, los cuales oscilan entre 100 -600 mg GAE/100 g. En cuanto a la semilla, su contenido de fenoles totales es equiparable al de la canela que es aproximadamente de 15000 mg GAE/100

g [Resurreccion, Sales, Potrebko, Francisco & Hitchcock, 2009].

Capacidad antioxidante

Los resultados obtenidos al evaluar la capacidad antioxidante por el método ORAC se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Medición de la capacidad antioxidante [ORAC].

	Semilla	Cáscara	Pulpa
μmol de Trolox / 100 g de material	22217,3	15812,5	7253,4
Desviación estándar	8,06	3,98	1,38
% Error	3,63	2,52	1,91

Los resultados anteriores muestran que la semilla y la cáscara de algarrobo presentan valores ORAC altos equiparables con los

exhibidos por algunos frutos rojos. Los resultados son acordes con los valores de fenoles totales que se muestran en la tabla 2.

Determinación del índice de pardeamiento enzimático

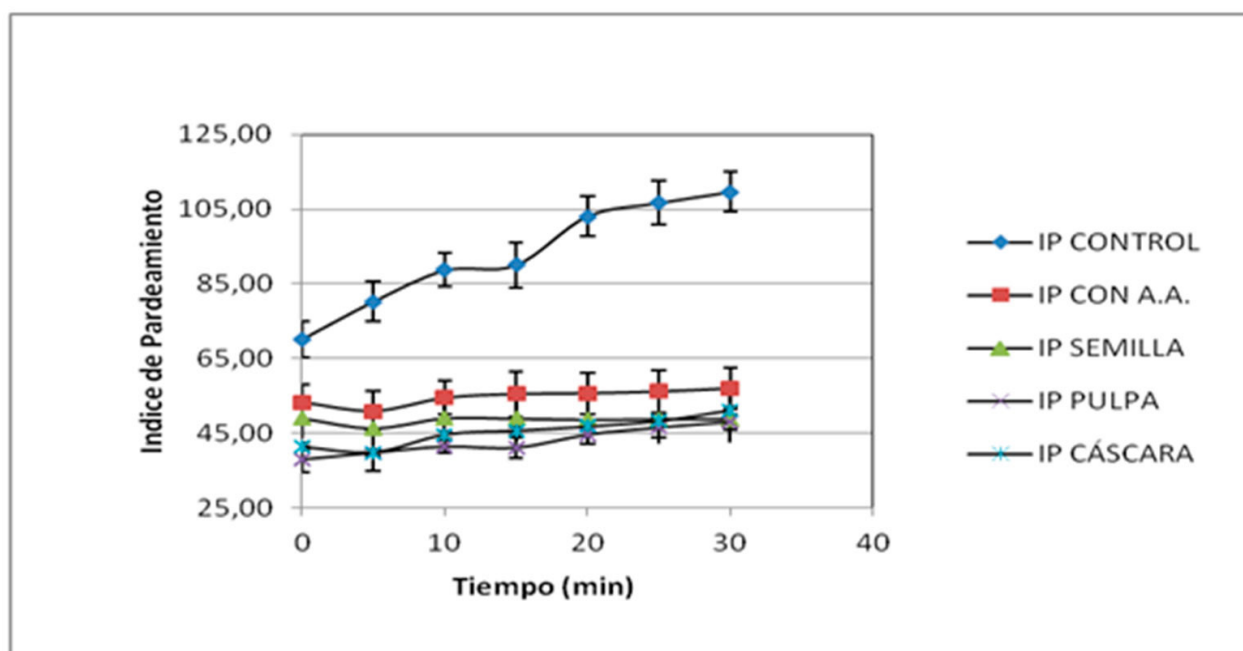
Mediante el análisis ANOVA se pudo identificar que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las medias del índice de pardeamiento enzimático de las 4 variables analizadas (ácido ascórbico, semilla, pulpa y cáscara) con un nivel del 95,0 % de confianza. Para determinar cuáles medias son o no significativamente diferentes entre sí, se empleó la prueba de rangos múltiples y la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con esto, se identificó que no existe diferencia significativa entre la pulpa, la semilla y el ácido ascórbico.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del IPE para cada una de las frutas analizadas.

■ Determinación del Índice de pardeamiento para manzana

La figura 1 muestra el comportamiento de la capacidad protectora de cada antioxidante en el tiempo actuando sobre manzana. El poder protector de la semilla, la pulpa y la cáscara es mayor (índices de pardeamiento bajos) en comparación con el ácido ascórbico (índices de pardeamiento altos). La tendencia del poder protector de las sustancias de estudio concuerda con los valores ORAC reportados en este estudio.

Figura 1. Índice de pardeamiento para manzanas al ser sometidas a la acción de los diferentes antioxidantes. Cada símbolo representa la media y las barras verticales los valores de las desviaciones estándar para $n = 3$.

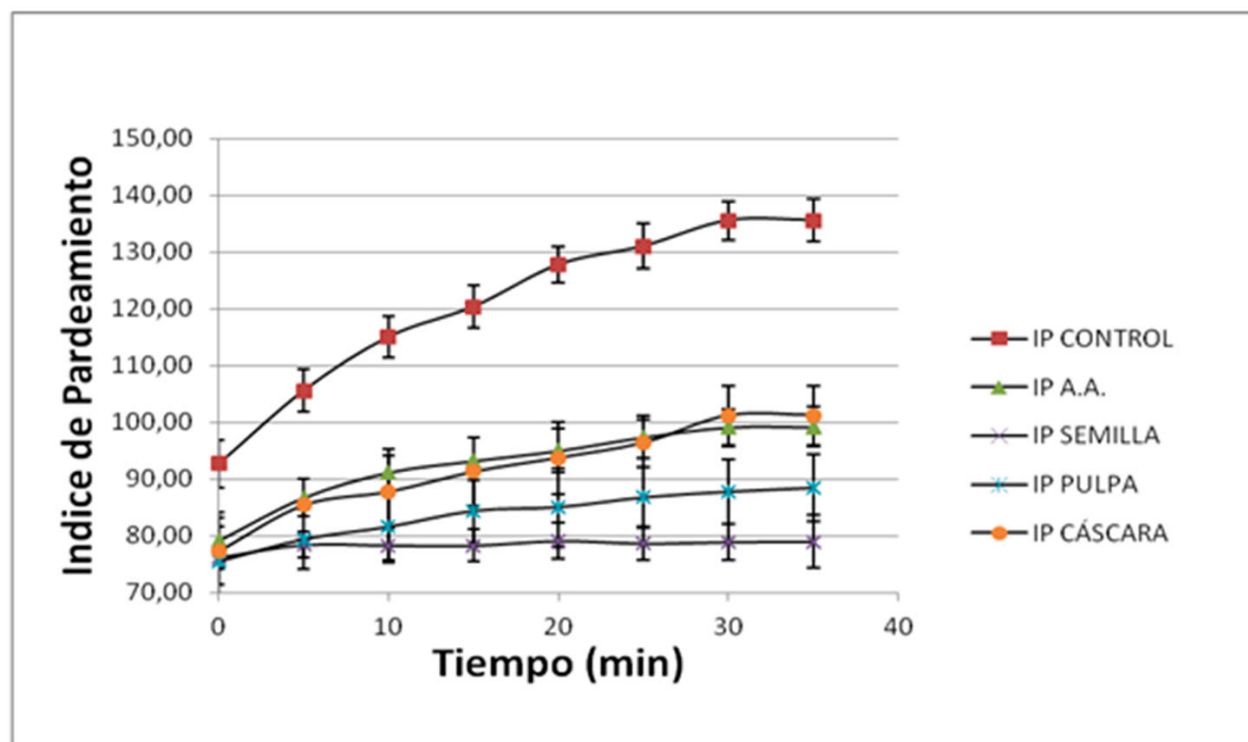


■ Determinación del Índice de pardeamiento para banano

La figura 2 muestra que la semilla exhibe mayor poder protector sobre reacciones de pardeamiento enzimático en banano que la cáscara, la pulpa y el ácido ascórbico como

referencia. Esto es acorde con los resultados de la capacidad antioxidante de la tabla 2. Con banano, la pulpa presenta una buena respuesta ante el desarrollo de las reacciones de pardeamiento y la cáscara se equipara al comportamiento del ácido ascórbico.

Figura 2. Índice de pardeamiento para bananos al ser sometidas a la acción de los diferentes antioxidantes. Cada símbolo representa la media y las barras verticales los valores de las desviaciones estándar para $n = 3$.



■ CONCLUSIONES

- Se comprobó que los compuestos bioactivos presentes en la pulpa, las semillas y la cáscara del algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) tienen poder antioxidante, evidenciado por

la disminución del índice de pardeamiento enzimático y correlacionado con el contenido de fenoles totales y la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno [ORAC].

- Se observó un mejor control de pardeamiento enzimático con las diferentes sustancias empleadas del algarrobo que con el ácido ascórbico, tanto en la manzana como en el banano, aunque en la primera, la disminución general del pardeamiento es comparativamente mayor que en el banano, si se analiza desde el punto de vista del control (fruta sola).

- Se determinó un alto poder de inhibición ante las reacciones de pardeamiento enzimático evidenciadas en el banano (*Cavendish valery*) y en la manzana Red Delicious (*Malus Communis*), dos frutas bastante afectadas por esta reacción causante de pérdidas industriales en la manufactura de alimentos.

- Para la manzana, el mejor efecto protector se observó al utilizar la pulpa como inhibidor de pardeamiento, seguido de la cáscara y la semilla. Lo anterior debido al mecanismo de reacción de la polifenoloxidasas que puede actuar sobre mono o difenoles.

- En el banano, el mejor efecto se observó al utilizar la semilla como inhibidor de pardeamiento, hecho que se relaciona con el alto contenido de fenoles totales y su alto valor de ORAC. Esta correspondencia obedece a un mecanismo de reacción sobre difenoles (Guerrero, 2009).

- Muchos científicos creen que es la combinación de los polifenoles y no un simple componente el que provee los efectos benéficos para la salud (Resurrección et al., 2009). Desde esta afirmación pueden argumentarse los resultados obtenidos con la pulpa de algarrobo, los cuales fueron mejores en la inhibición del pardeamiento enzimático

por encima de la cáscara en el banano y por encima de la semilla y la cáscara en la manzana, comparando los valores más altos de estos últimos en cuanto a fenoles totales y a ORAC.

- Comparando los contenidos fenólicos de las partes del algarrobo estudiadas y los contenidos de otros productos alimenticios como maní, vino, té, entre otros, se puede concluir que el algarrobo es una fuente excelente de antioxidantes, con los respectivos beneficios que esto trae para la salud desde el punto de vista de consumo de una fruta nativa o como materia prima para diversos alimentos funcionales que puedan desarrollarse a partir del fruto.

■ BIBLIOGRAFÍA

Acero Duarte, L. E. (2005). *Plantas útiles de la cuenca del Orinoco*. Bogotá: Ecopetrol.

Barrero Barrero, D. (2004). *Vegetación del territorio CAR: 450 Especies de sus llanuras y montañas*. Bogotá: Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR.

Dudley, J., Das, S., Mukherjee, S., & Das, D. K. (2009). Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20 443-452.

Galera, F. M. (2000). Las especies del género *Prosopis* [algarrobos] de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. . Argentina: FAO.

- Guerrero, C. A. (2009). Inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (Cavendish valery) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, [Tesis] Maestría en Ciencias de los Alimentos [p. 91]. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- Leon, K., Mery, D., Pedreschi, F., & Leon, J. (2006). Color measurement in L a b units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084-1091.
- Nguyen, T. B. T., Ketsa, S., & van Doorn, W. G. (2003). Relationship between browning and the activities of polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 30(2), 187-193.
- Nutrition, R. T. (2007). Jatobá. Carson City: Rain Tree.
- Olivas, G. I., Mattinson, D. S., & Barbosa-Canovas, G. V. (2007). Alginate coatings for preservation of minimally processed Gala™ apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 89-96.
- Primo Yufera, E. (1998). *Química de los alimentos*. Madrid: Síntesis.
- Resurrección, A. V. A., Sales, J. M., Potrebko, I., Francisco, M. L. L. D., & Hitchcock, H. L. (2009). Peanuts: Bioactive Food in a Shell *Food Technology*, 12(09), 30-36.
- Rojano, B., Gaviria, C., Gil, A., Sáez, J., Schinella, G., & Tournier, H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 15(1), 169-177.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., & Lester, P. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, vol. 299 [pp. 152-178]: Academic Press.
- Sloan, E. (2010). A New Vegetable Medley. *Food Technology*, 64(11), 17.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. 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(1), 217-224.