

# APROVECHAMIENTO DEL EXPELLER DE CHÍA (SALVIA HISPANICA L.) COMO POTENCIAL FUENTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS GENERADOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON PAPAÍNA COMERCIAL

J. Cotabarren<sup>1</sup>, F. Kise<sup>2</sup>, M. Tellechea<sup>1</sup>, G. Kreymborg<sup>3</sup>, J. Lorenzo<sup>4</sup>, A. Rosso<sup>2</sup>,  
D. Obregón<sup>1</sup> y M. Parisi<sup>2</sup>

1. CIProVe, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 115 s/n, La Plata, Buenos Aires, Argentina; 2. PIEPVas, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Ruta 5 y Avenida Constitución, Luján, Buenos Aires, Argentina, [parisimonica@unlu.edu.ar](mailto:parisimonica@unlu.edu.ar); 3. Industrias GREENBORG S.R.L., Alem 1208, Lincoln. Buenos Aires; 4. Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus Universitari 08193, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España.

## RESUMEN

En las últimas décadas los procesos industriales para la obtención de aceites a base de semillas han cobrado gran importancia en el mercado, generando como producto secundario del proceso de extrusado-prensado en frío una masa compacta denominada expeller. En el caso de la chía (*Salvia hispánica* L.) el expeller obtenido mediante el procesamiento de semillas es empleado como alimento balanceado para el ganado. Si bien el estudio de las ventajas nutricionales que otorga la incorporación de semillas de chía en la dieta humana se encuentra en auge, no se presentan hasta la fecha investigaciones para la reutilización del expeller producto del procesamiento industrial. El objetivo de nuestro trabajo es el estudio de los biopéptidos generados mediante hidrólisis enzimática a partir de expeller de chía, con el fin de generar un valor agregado a dicho material y brindar en un futuro la posibilidad de reutilizarlo e insertarlo en el mercado como suplemento alimenticio. Siguiendo este objetivo se realizó la hidrólisis enzimática del expeller de chía durante veinte horas con papaína comercial (10 UE/mg), alcanzando un grado de hidrólisis de 15,2% estimado por el método de pH-STAT y determinación de péptidos solubles. Se observó que la hidrólisis se producía en las primeras dos horas del proceso, resultado que además se confirmó por SDS-PAGE. Este hidrolizado fue fraccionado por ultrafiltración obteniendo tres fracciones peptídicas de tamaños: mayor a 10 kDa, entre 3 y 10 kDa y menor a 3 kDa, en las cuáles se estimó la actividad antioxidante *in vitro* por el método de DPPH encontrando que tanto la muestra de partida como las distintas fracciones presentaban elevada actividad antirradicalaria. Se encontró que la concentración de expeller de chía sin tratamiento que producía un 50% de actividad antirradicalaria (IC50) era de 641.61 µg/ml, mientras que para los hidrolizados de peso molecular entre 3 y 10 kDa el IC50 era de 312.22 µg/ml, observándose que esta fracción de hidrolizado de expeller de chía presentaba péptidos con mayor actividad que el expeller de partida. No se observó incremento significativo en la actividad antioxidante en la fracción de peso molecular mayor a 10 kDa ni en la inferior a 3 kDa, probablemente debido a la baja concentración obtenida en el tiempo de hidrólisis en este último caso. Finalmente se realizó un estudio proteómico mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de los hidrolizados a distintos tiempos y se evaluó en distintos rangos de pesos moleculares la aparición y desaparición de señales correspondientes a los péptidos generados por la hidrólisis enzimática. Finalmente, en este trabajo comprobamos la generación de un elevado contenido proteico del hidrolizado de chía generado con papaína comercial y confirmamos la presencia de péptidos bioactivos con actividad antioxidante en las fracciones generadas, presentando un marco inicial para continuar el estudio de dichos péptidos y evaluar su posible incorporación como suplementos dietarios en matrices alimentarias.

**PALABRAS CLAVE:** Salvia hispánica, hidrolizados, péptidos bioactivos.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha acrecentado la búsqueda y revalorización de sustratos provenientes de fuentes naturales que presenten constituyentes y/o productos derivados aplicables al desarrollo de alimentos, los cuales incidan en la nutrición mediante el aporte simultáneo de efectos benéficos para la salud. En ese contexto se encuentra la chía (*Salvia hispánica* L.), especie vegetal originaria del sudeste de EEUU y noroeste de América Central (México, Guatemala), cuyas semillas han sido consumidas por los pueblos asentados en esas regiones desde épocas precolombinas habiendo constituido un elemento básico de la dieta de los pueblos azteca y del oeste norteamericano. En nuestro país, su creciente expansión en las provincias del noroeste puede representar un cultivo tendiente a generar diversificación de la producción agrícola, con el consecuente impacto socioeconómico en dicha región. Así, las cualidades nutricionales de la semilla de chía y de los productos derivados de la misma han comenzado a ser revalorizados dado su elevado contenido de ácidos grasos  $\omega$ -3, fibra dietaria, proteínas y antioxidantes, ofreciendo una nueva

oportunidad para mejorar la nutrición humana.

La cantidad de trabajos científicos acerca de las ventajas nutricionales de la chía están creciendo rápidamente alrededor del mundo ya que se le utiliza como ingrediente para hacer pan, barras energéticas, suplementos dietéticos y en la elaboración de dietas para animales, entre otros usos [1]. En cuanto a la calidad proteica de la semilla de chía es muy poco lo que se conoce ya que los estudios realizados son muy escasos; sin embargo, se sabe que contiene mayor cantidad de proteínas y mejor balance de aminoácidos que los granos usados tradicionalmente, como maíz, trigo y arroz. Se estima que en países subdesarrollados los vegetales son y seguirán siendo una importante fuente principal de proteínas, por lo que existe la necesidad de incrementar la producción agrícola de cultivos que sean capaces de suministrar a la población una ingesta balanceada y adecuada de nutrientes. En la actualidad hay una vasta extensión de áreas sembradas que se extienden por diferentes zonas del territorio nacional ya sea en las provincias de Salta y Jujuy, además de Santiago del Estero, Chaco, Formosa y, en menor escala, en Entre Ríos. En el área norte -tanto NOA como NEA- hay sembradas unas 170.000 ha. En Paraguay se calculan entre 400.000 y 500.000 ha sembradas con chía, y también las hay en Bolivia (140.000 ha). Por otra parte, los subproductos de la industria alimentaria constituyen un problema serio en el tratamiento y la disposición final de residuos en gran parte del mundo. Es por eso que en la actualidad se están aplicando medidas para aprovechar y revalorizar los subproductos generados, creando nuevas fuentes de riqueza que aporten una mayor rentabilidad económica al proceso industrial.

En los últimos años se ha observado también un creciente interés en el desarrollo de nuevos ingredientes funcionales que incluyan péptidos o hidrolizados proteicos con demostrado efecto beneficioso sobre procesos que ocurren a nivel cardiovascular, gastrointestinal e inmunológico. Hasta la actualidad la mayoría de los péptidos bioactivos descritos y comercializados a nivel mundial proceden de proteínas lácteas [2] [3] [4]. Los péptidos bioactivos se definen como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en la salud [5] ejerciendo su acción sobre el sistema cardiovascular, digestivo, endocrino, inmunológico y nervioso [6]. Se han descrito varias actividades fisiológicas asociadas, entre ellas la actividad antimicrobiana [7], antioxidante [8], inmunomoduladora [9], opioide [10], antihipertensiva [11] [12] y péptidos inhibidores de la enzima Dipeptidil Peptidasa-4 (DPP-4) [13] [14]. estudios epidemiológicos destacan la importancia de los compuestos antioxidantes de origen natural en la prevención del cáncer y de enfermedades cardiovasculares. Estos compuestos podrían reducir los radicales libres producidos por el estrés oxidativo, con incidencia directa en el incremento de los riesgos de desarrollar ciertas patologías. Los péptidos antioxidantes podrían disminuir también el daño oxidativo tanto en alimentos preparados (usándolos como antioxidantes naturales) así como en las células del organismo cuando éstos son ingeridos en la dieta [15]. Se ha demostrado que los biopéptidos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína precursora y pueden ser liberados y activados por digestión gastrointestinal *in vivo*, por fermentación microbiana o por hidrólisis enzimática [16].

#### OBJETIVOS

En el presente trabajo se propone la producción de péptidos bioactivos mediante técnicas enzimáticas, a partir de subproductos de la industria de la chía, con el fin de generar nuevos ingredientes para la formulación de alimentos funcionales. Se pretende optimizar el proceso de hidrólisis, caracterizar las fracciones peptídicas por técnicas electroforéticas y espectrometría de masas MALDI-TOF/MS y realizar una evaluación preliminar de la actividad antioxidante de dichos péptidos.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Material de partida: Se utilizó como material de partida el producto secundario del proceso de extrusado-prensado en frío de semillas de chía; una masa compacta denominada expeller provista por el Ing. Gustavo Kreymborg de Industrias Greenborg SRL.

Se preparó un extracto crudo (EC) suspendiendo 10.0 g de expeller en 250 ml de buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4. La suspensión fue procesada de manera intermitente en frío, empleando un "mixer" y filtrada con gasa luego de incubar 1 h a 200 rpm y temperatura ambiente. El producto filtrado fue clarificado por centrifugación durante 1 h a 10000 rpm y 4°C, obteniendo del sobrenadante el EC.

Obtención de hidrolizados proteicos: Para la hidrólisis enzimática se utilizó papaína comercial (Sigma-Aldrich, USA) en relación Enzima/Sustrato de 10 U/mg, con incubación a 45°C y 150 rpm en agitador orbital. La reacción de hidrólisis se detuvo por calentamiento a 95°C durante 15 min para inactivar la enzima y se tomaron muestras a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min, seguida por centrifugación de 30 min a 9000 rpm y 4°C. A los sobrenadantes se les determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford, expresando el resultado en µg/ml, referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich). El grado de hidrólisis de las distintas fracciones fue estimado mediante el método pH-STAT [17] y por determinación de péptidos solubles en TCA [18].

Separación de las fracciones del hidrolizado por ultrafiltración: Se realizó luego un proceso de ultrafiltración de los productos de hidrólisis obtenidos en los distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 min)

utilizando membranas Amicon con valores de corte que permitieron retener los componentes de peso molecular superior a 10 kDa, entre 10 - 3 kDa e inferior a 3 kDa (AMICON® YM-10 e YM-3, Millipore, USA) (Pouliot et al., 2005). Se separaron 3 fracciones que se caracterizaron por electroforesis, se realizaron los espectros de masa y en las que se evaluó en realizaron ensayos preliminares para la determinación de la actividad antirradicalaria con DPPH

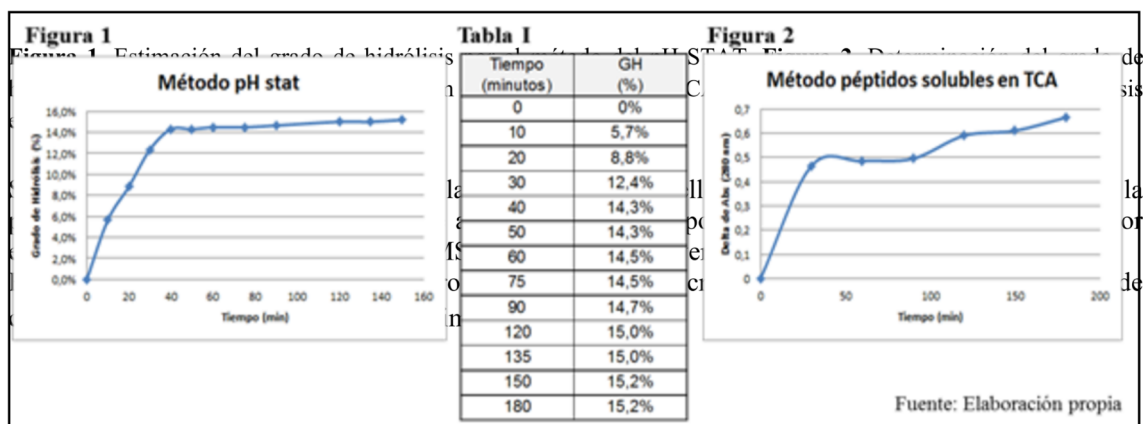
**Caracterización de los hidrolizados por análisis electroforético:** Para poder estimar la masa molar aparente de las proteínas presentes en el EC y en las distintas fracciones de hidrolizado, se preparó un gel de poliacrilamida (12 %) en condiciones desnaturizantes (duodecil sulfato de sodio y tricina en el tampón catódico). Los patrones de masa molecular (Sigma Marker Wide Range, MW 6,5 – 200 kDa) y las muestras se disolvieron en un tampón que contenía buffer Tris (0,0625 mol·L<sup>-1</sup>), SDS (2%, m/v), glicerol (10%, v:v), β-mercaptoetanol (5%, v:v) y azul de bromofenol (0,006%, m/v). Las electroforesis se desarrollaron en un equipo vertical, Mini-Protean III Dual Slab Cell (BIO-RAD), sembrando en cada calle aproximadamente 30 µg de muestra.

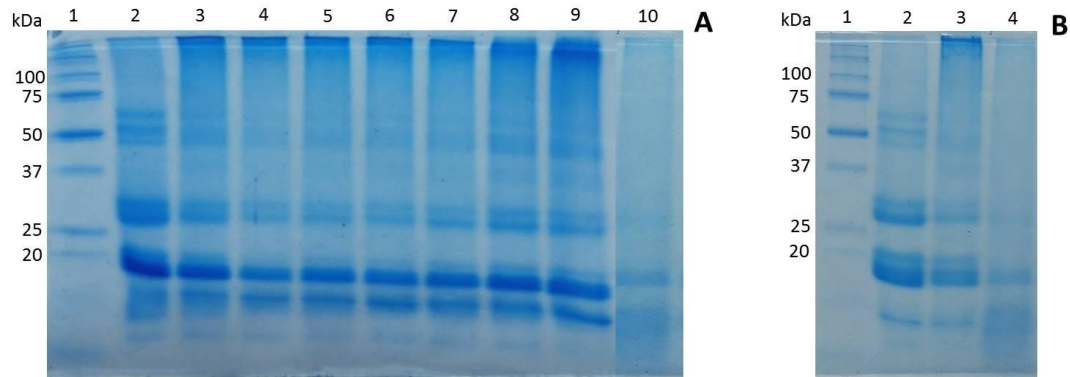
**Espectrometría de masas:** Se analizaron los espectros de masa de las distintas fracciones de los hidrolizados empleando un espectrómetro Bruker Ultraflex, equipado con láser de nitrógeno pulsado (337 nm), en modo de ion positivo lineal, voltaje de aceleración: 19 kV. Las muestras se prepararon mezclando iguales volúmenes de solución saturada de matriz (ácido 3,5-dimetoxy-4-hidroxicinámico) en 0,1% TFA en agua/acetonitrilo 2:1, y de 1-10 µM de solución de proteína. Se colocó 1 µl en una placa MTP 384 (Target plate polished steel, Bruker Daltonik GmbH) hasta su evaporación. Un kit de proteínas de masas moleculares conocidas se utilizó como estándar para la calibración de las masas.

**Actividad antioxidante:** Se estimó la capacidad antirradicalaria de los péptidos presentes en el EC y en los hidrolizados (120 min) por el método DPPH [19]. Dicho método se basa en una reacción cromogénica de captación del radical 2,2-difenil-1-picrylhidrazyl (DPPH) por los compuestos antioxidantes, produciendo un descenso de la absorbancia a 517 nm. Se calculó el valor IC50 que representa la concentración del péptido que produce el 50 % de neutralización del radical DPPH [20].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la hidrólisis enzimática de las proteínas presentes en el expeller de chíca. Se prepararon extractos proteicos de expeller de chíca con un contenido de proteínas de 1,4 mg/mL, estimados por el método de Bradford. La hidrólisis enzimática se realizó durante 20 h con Papaína comercial (relación E/S de 10 UE/mg), alcanzando un Grado de Hidrólisis (GH%) del 15,2% (150 minutos) estimado por el método de pH-STAT y como la absorbancia a 280 nm producida por los péptidos solubles en TCA (Fig.1 y 2, Tabla 1).



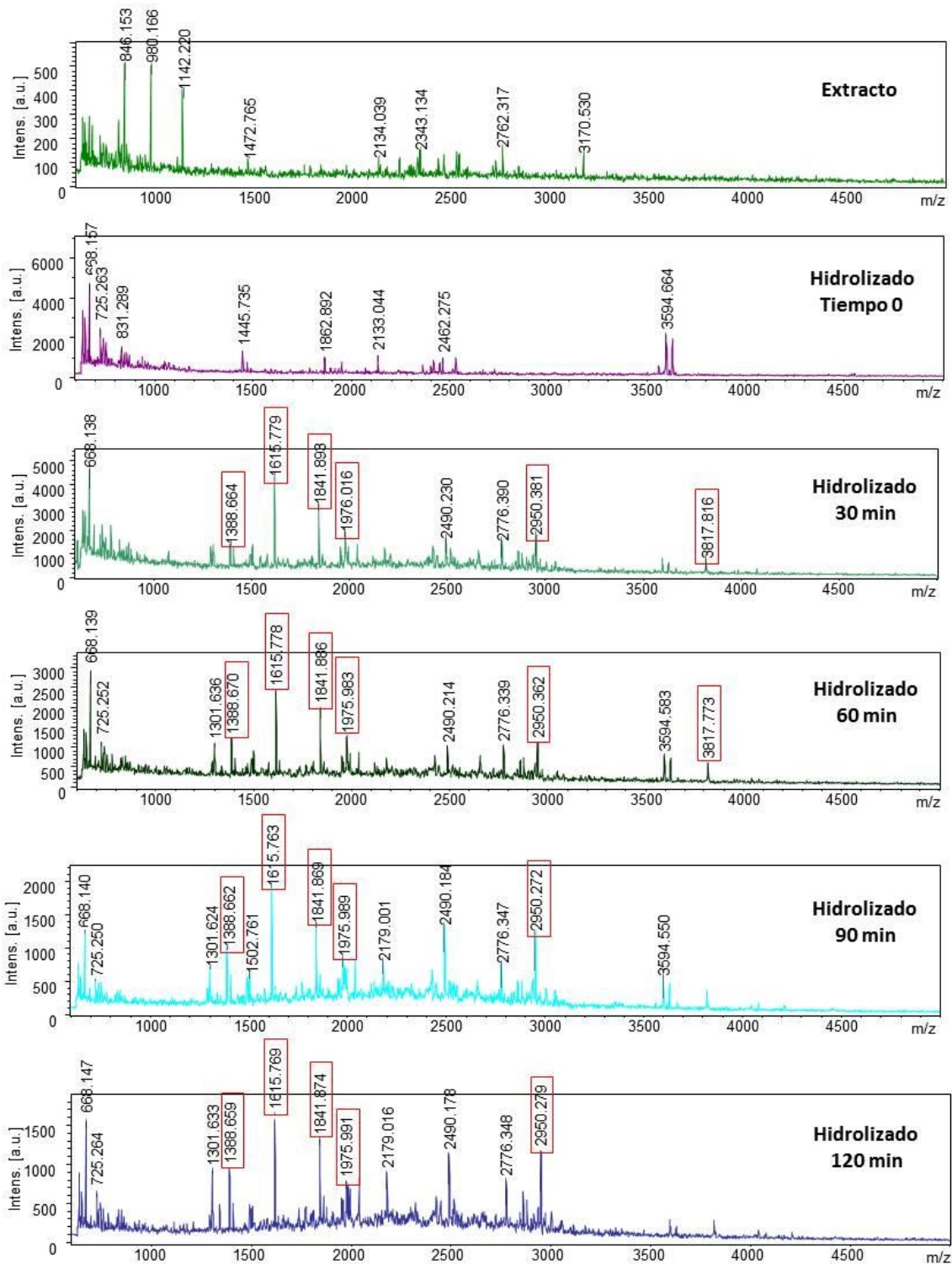


**Figura 3.** Gel SDS-PAGE al 12 % (A). Marcador de peso molecular, Sigma Marker Wide Range (1); Extracto de expeller de chía en buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4 (2); Hidrolizado a tiempo 0 (3); Hidrolizado a 30 min (4); Hidrolizado a 60 min (5); Hidrolizado a 90 min (6); Hidrolizado a 120 min (7); Hidrolizado a 150 min (8); Hidrolizado a 180 min (9); Hidrolizado a 20 hs (10). De todos los extractos se colocaron 30 µg de proteínas en el gel. Gel SDS-PAGE al 12 % (B). Marcador de peso molecular (1); Extracto de expeller de chía en buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4 (2); Hidrolizado a tiempo 180 min (3); Hidrolizado a 180 min + 3 hs a mayor concentración de papaína (4).

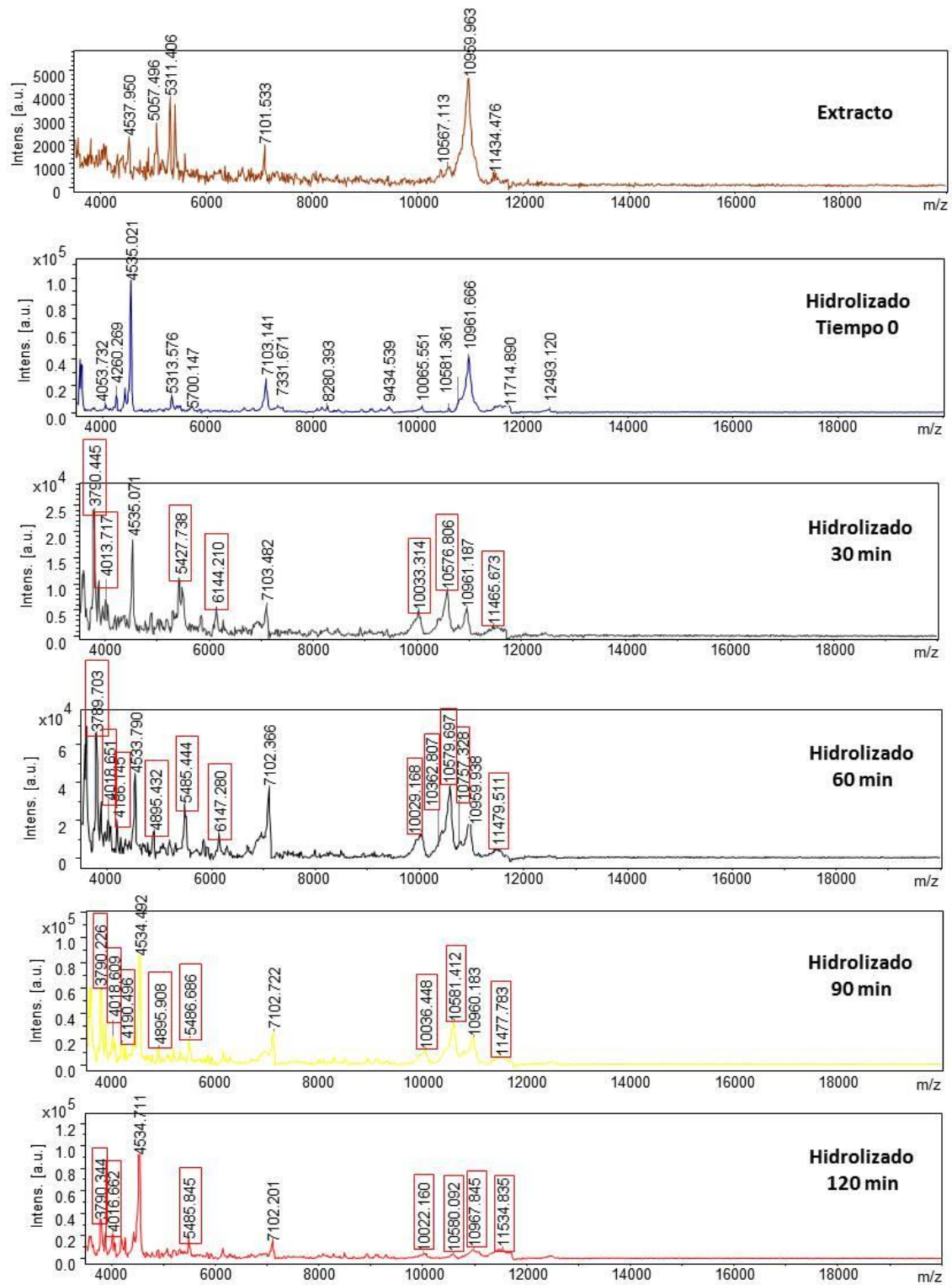
Como puede observarse en las corridas electroforéticas a diferentes tiempos, sólo es apreciable notablemente la hidrólisis luego de 20 hs. o cuando se agrega mayor cantidad de enzima.

La electroforesis es una técnica que nos permite ver la desaparición de fracciones proteicas de alto peso molecular contenidas en el extracto de chía cuando éste es sometido a hidrólisis con papaína, pero no permite evidenciar los péptidos de bajo peso molecular formados. Por ese motivo realizamos un análisis exhaustivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/MS, de este modo pudimos observar la presencia y aparición de picos que no eran observados por técnicas electroforéticas.

En la Figura 4 se aprecia el perfil proteico de las distintas fracciones mediante MALDI-TOF/MS en el rango comprendido entre 0.6 y 5 kDa, mientras que la Figura 5 muestra los espectros obtenidos entre 3.5 y 20 kDa.



**Figura 4.** Espectros de masas entre 0.6 y 5.0 kDa obtenidos para el extracto de expeller de chía y los hidrolizados con papaína a distintos tiempos. Se observan recuadrados en rojo los péptidos generados por hidrólisis enzimática.



**Figura 5.** Espectros de masas entre 3.5 y 20 kDa obtenidos para el extracto de expeller de chíya y los hidrolizados con papaína a distintos tiempos. Se observan recuadrados en rojo los péptidos generados por hidrólisis enzimática. No se observa en los espectros de masas picos mayores a 15 kDa. Eso es debido al rango y al método de adquisición de los espectros, siendo el objetivo principal localizar los péptidos menores a 10 kDa que se generan luego del proceso de hidrólisis enzimática.

En los espectros de masa (Fig. 4 y 5) se observa la aparición de péptidos pequeños que no estaban presentes en el extracto original. Dichos péptidos, recuadrados en rojo, fueron generados por hidrólisis enzimática con la proteasa comercial papaína en diferentes tiempos de incubación. La ventaja de la

espectrometría de masas es la observación de la aparición de picos desde los 30 min de hidrólisis. Considerando el grado de hidrólisis obtenido (15.2%) y siguiendo como objetivo la optimización del proceso de hidrólisis con la proyección de su potencial aplicación en la industria alimentaria, decidimos continuar la investigación empleando como muestra el hidrolizado obtenido a los 120 minutos. Este hidrolizado fue fraccionado por ultrafiltración obteniendo tres fracciones peptídicas de tamaños: mayor a 10 kDa, entre 3-10 kDa y menor a 3 kDa. Este hidrolizado fue fraccionado por ultrafiltración obteniendo tres fracciones peptídicas de tamaños: mayor a 10 kDa, entre 3 y 10 kDa y menor a 3 kDa, en las cuáles se estimó la actividad antioxidante *in vitro* por el método de DPPH (Tabla II).

**Tabla II.** Estimación de la actividad antirradicalaria de fracciones peptídicas obtenidas por hidrólisis enzimática de expeller de chíá.

Muestras	Valores de IC50 estimados con DPPH
Expeller de chíá sin tratamiento	641.61 µg/ml
Fracción de peso molecular entre 3-10 kDa	312.22 µg/ml

Se encontró que la concentración de expeller de chíá sin tratamiento que producía un 50% de actividad antirradicalaria (IC50) era de 641.61 µg/ml, mientras que para los hidrolizados de peso molecular entre 3-10 kDa el IC50 era de 312.22 µg/ml, observándose que esta fracción de hidrolizado de expeller de chíá presentaba péptidos con mayor actividad que el expeller de partida (48,66% mayor). No se observó incremento significativo en la actividad antioxidante en la fracción de peso molecular mayor a 10 kDa (cuyo IC50 fue similar al del expeller de partida) ni en la inferior a 3 kDa, probablemente debido a la baja concentración de péptidos obtenida en el tiempo de hidrólisis en este último caso.

## CONCLUSIONES

En este trabajo preliminar se realizó la hidrólisis enzimática de las proteínas presentes en el expeller de chíá, residuo obtenido como producto secundario del proceso de extrusado-prensado en frío de las semillas. Se observó que la hidrólisis se produjo principalmente en las primeras 2 horas del proceso. Se encontró también que tanto la muestra de partida como las distintas fracciones del hidrolizado proteínico presentaban una elevada actividad antioxidante pero los mayores valores se producían en los hidrolizados de masa molecular entre 3-10 kDa. Estos resultados nos permiten concluir que el expeller de semillas de chíá contiene, no sólo hidrolizados proteicos de alto contenido en aminoácidos esenciales sino también péptidos con elevada actividad antirradicalaria que podrían ser empleados como una excelente fuente nutricional por su aporte de péptidos y antioxidantes naturales. En futuros estudios se intentará aislar y caracterizar los péptidos con actividad biológica de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] L.. Muñoz, A. Cobos, O. Díaz, J.. Aguilera, Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration, *J. Food Eng.* 108 (2012) 216–224.
- [2] Y. Oliva, S. Vega, Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas: propiedades y aplicaciones principales, *Rev Salud Anim.* 26 (2004) 151–162.
- [3] K.. Rutherford-Markwick, P.. Moughan, Bioactive peptides derived from food, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 955–966.
- [4] L. Sánchez-Rivera, D. Martínez-Maqueda, E. Cruz-Huerta, B. Miralles, I. Recio, Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides, *Food Res Int.* 63 (2014) 170–181.
- [5] D.D. Kitts, K. Weiler, Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery., *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 1309–1323.
- [6] C. Muro Urista, R. Alvarez Fernandez, F. Riera Rodriguez, A. Arana Cuenca, A. Tellez Jurado, Review: Production and functionality of active peptides from milk., *Food Sci. Technol. Int.* 17 (2011) 293–317. doi:10.1177/1082013211398801.
- [7] W. Aoki, K. Kuroda, M. Ueda, Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines, *J. Biosci. Bioeng.* 114 (2012) 365–370. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.05.001.
- [8] R. Vásquez-Villanueva, M.L. Marina, M.. García, Identification by hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry of peptides antioxidant capacity in food residues, *J. Chromat. A.* 1428 (2016) 185–192.
- [9] H. Hou, Y. Fan, B. Li, C. Xue, G. Yu, Z. Zhang, X. Zhao, Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of Alaska pollock frame, *Food Chem.*

- 134 (2012) 821—828. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.186.
- [10] A.R. Madureira, T. Tavares, A.M.P. Gomes, M.E. Pintado, F.X. Malcata, Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins., *J. Dairy Sci.* 93 (2010) 437–455. doi:10.3168/jds.2009-2566.
- [11] J. Chen, Y. Wang, Q. Zhong, Y. Wu, W. Xia, Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein., *Peptides*. 33 (2012) 52–58. doi:10.1016/j.peptides.2011.11.006.
- [12] T. Lafarga, R.E. Aluko, D.K. Rai, P. O'Connor, M. Hayes, Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats, *Food Res. Int.* 81 (2016) 91–99. doi:10.1016/j.foodres.2016.01.007.
- [13] O. Power, A.B. Nongonierma, P. Jakeman, R.J. FitzGerald, Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes., *Proc. Nutr. Soc.* 73 (2014) 34–46. doi:10.1017/S0029665113003601.
- [14] A.B. Nongonierma, R.J. FitzGerald, An in silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides., *Food Chem.* 165 (2014) 489–498. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.090.
- [15] S. Saadi, N. Saari, F. Anwar, A.A. Hamid, H. Mohd Ghazali, Recent advances in food biopeptides: production, biological functionalities and therapeutic applications., *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 80–116. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.003.
- [16] H. Korhonen, A. Pihlanto, Bioactive peptides: Production and functionality, *Int. Dairy J.* 16 (2006) 945–960. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.012.
- [17] J.M. Ezquerro, F.L. Garcia-Carreño, R. Civera, N.F. Haard, pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*), *Aquaculture*. 157 (1997) 251–262.
- [18] P.M. Nielsen, D. Petersen, C. Dambmann, Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis, *Food Chem. Toxicol.* 66 (2001) 642–646.
- [19] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Leb. Und-Technologie*. 28 (1995) 25–30.
- [20] D.S. Ștef, I. Gergen, T.I. Trașcă, M. Hărmănescu, Ș. Lavinia, B. Ramona, M.G. Hegheduș, Total antioxidant and radical scavenging capacities for different medicinal herbs, *Rom. Biotechnol. Lett.* 14 (2009) 4704–4709.