



Comunicación

## **Efecto del tamaño de partícula sobre la capacidad antioxidante de un subproducto de guayaba (*Psidium guajava* L.)**

Effect of particle size on the antioxidant capacity of guava (*Psidium guajava* L.) byproduct

Jorge Geovanny **Figuerola Hurtado\***, María Alejandra **Armijos Piedra**,  
Elizabeth Lourdes **Pérez Cuenca**

Universidad Técnica Particular de Loja, Departamento de Ciencias Agropecuarias y Alimentos.  
San Cayetano Alto, Calle Marcelino Champagnat, s/n, Loja, Ecuador.

\*Autor para correspondencia: jgfigueroa@utpl.edu.ec

Aceptado 08-October-2012

### **Resumen**

El presente estudio buscó determinar el efecto del tamaño de partícula ( $> 1000$  y  $< 2000$   $\mu\text{m}$ ,  $> 500$  y  $< 1000$   $\mu\text{m}$ ,  $> 250$  y  $< 500$   $\mu\text{m}$  y  $< 250$   $\mu\text{m}$ ) sobre la extracción de compuestos con propiedades antioxidantes a partir de un subproducto de guayaba (*Psidium guajava* L.), constituido por piel con pulpa adherida de guayaba deshidratada. La extracción se realizó mediante agitación dinámica utilizando etanol al 57 %, regulado su pH a 2 con HCl. Se determinó que no existió diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en el rendimiento de extracción, obteniendo un valor promedio de  $46,4 \pm 5,9$  %. Se cuantificó el potencial antioxidante mediante los métodos ABTS, FRAP, DPPH y fenoles totales. El tamaño de partícula que permitió una mayor capacidad antioxidante fue la fracción comprendida  $> 500$  y  $< 1000$   $\mu\text{m}$  para FRAP, ABTS, fenoles totales y  $< 250$   $\mu\text{m}$  para DPPH.

**Palabras claves:** capacidad antioxidante, guayaba, rendimiento, subproductos, tamaño de partícula.

### Abstract

The objective of this study was to analyze the effect of particle size ( $> 1000$  &  $< 2000$   $\mu\text{m}$ ,  $> 500$  &  $< 1000$   $\mu\text{m}$ ,  $> 250$  &  $< 500$   $\mu\text{m}$  and  $< 250$   $\mu\text{m}$ ) on extraction of compounds with antioxidant properties from guava (*Psidium guajava* L.) by-product constituted by dehydrated fruit peel with remanent pulp. The extraction was performed by dynamic maceration with ethanol 57 %, adjusted to pH 2 with HCl. Statistical analysis of the data showed that no significant difference ( $p > 0,05$ ) in extraction yield, with an average value of  $46.4 \pm 5.9$  %. The antioxidant potential was measured by ABTS, FRAP, DPPH and total phenols methods. The higher antioxidant capacity by FRAP, ABTS and total phenols was obtained with particles between  $> 500$  and  $< 1000$   $\mu\text{m}$ , whereas particles with  $< 250$   $\mu\text{m}$  produced the higher DPPH values.

**Keywords:** antioxidant capacity, by-products, guava, particle size, yield.

### INTRODUCCIÓN

Las frutas son ricas en compuestos bioactivos, destacando los antioxidantes, como fenoles, carotenoides, entre otros (Bravo, 1998; Stahl y Sies, 2005); estos están asociados con la disminución del riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer (Temple, 2000), por lo cual se ha incrementado el interés, debido a que estudios demuestran que el consumo frecuente de antioxidantes, especialmente los flavonoides, tienen capacidad de captar radicales libres causantes del estrés oxidativo (Heim *et al.*, 2002) y además proporcionan gran parte del sabor y color a las frutas (Ross y Kasum, 2002).

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es un fruto comestible usado como medicina tradicional por sus propiedades biológicas como antidiabéticas (Oh *et al.*, 2005) y antioxidantes (Thaipong *et al.*, 2006). Dentro de la producción de puré de guayaba se genera gran cantidad de subproductos; alrededor del 25 % del peso total de la fruta se desecha, provenientes de las diferentes etapas de producción: trituración 5 %, refinación 12 % y tamizado 8 %. Estos subproductos se convierten en un grave problema para la industria alimentaria, debido a que se debe incurrir en gastos adicionales para su

eliminación (Kong e Ismail, 2011), por lo que ha existido una tendencia en la explotación y utilización de subproductos en el desarrollo de ingredientes funcionales para la industria alimentaria (Schieber *et al.*, 2001; Amin y Mukhrizah, 2006).

La extracción de antioxidantes se puede realizar mediante maceración, alta presión o ultrasonido (Prasad *et al.*, 2009). La maceración dinámica es el método frecuentemente empleado (Soong y Barlow, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008; Maisuthisakul y Gordon, 2009; Kong *et al.*, 2010). El etanol es uno de los disolventes más utilizados para la extracción de flavonoides, ácidos fenólicos; y al compararlo con metanol no difiere significativamente (Prasad *et al.*, 2009). Para incrementar la extracción de antioxidantes y fenoles de subproductos de guayaba, se debe acidificar el etanol a pH de  $\leq 2$  (Makris *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2010).

Los métodos más usados para determinar la capacidad antioxidante en frutas frescas incluyen: 2,2'-azinobis (3-etil-2,3-dihidrobenzotiazol-6-sulfonato) ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ), conocido como ensayo ABTS (Leong y Shui, 2002); el método de decoloración del radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo ( $\text{DPPH}^{\bullet}$ ), que determina la actividad antirradicalaria (Brand-Williams *et al.*, 1995;

Gil *et al.*, 2002) y se conoce como método DDPH; el ensayo FRAP ('Ferric Reducing Ability of Plasma') basado en el "poder antioxidante" mediante la capacidad para reducir el ión férrico a ferroso a bajo pH (Benzie y Strain, 1996; Jiménez-Escrig *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2003); y ensayo de fenoles totales (Swain e Hillis, 1959; Robles-Sánchez *et al.*, 2007).

Este estudio buscó determinar el efecto del tamaño de partícula sobre la extracción de antioxidantes en la piel con pulpa adherida de guayaba deshidratada. Se seleccionó la guayaba por ser considerada una buena fuente de antioxidantes (Jiménez-Escrig *et al.*, 2001) y su utilización en la industria ecuatoriana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Ciencias Agropecuarias y Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.

### Tratamiento de las muestras

Las muestras de guayaba (*Psidium guajava* L.), con pulpa rosada, fueron adquiridas en el mercado local de la ciudad de Loja, (Ecuador) presentando una acidez de  $0,51 \pm 0,04$  % expresado como ácido cítrico y  $9,83 \pm 0,25$  % de sólidos solubles, equivalente a un estado de madurez comercial según requisitos de la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1911:2009 (INEN, 2009).

Se realizó un despulpado mecánico, trabajando con la piel y pulpa adherida resultante. Las muestras se deshidrataron en estufa de vacío JEIO TECH, modelo OV-12 (Jeio Tech Co. Ltd., Corea) a 60 °C a 20 kPa hasta llegar a una humedad cercana al 10 %, se trituró con un mortero y con ayuda de un vibrotamizador Retsch®, modelo AS 200 basic (Retsch® GmbH, Haan, Alemania) con tamices normalizados ASTM. Las siguientes fracciones

fueron obtenidas: > 1000 y < 2000 µm, > 500 y < 1000 µm, > 250 y < 500 µm y < 250 µm.

### Reactivos

Los reactivos TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina), ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), Folin-Ciocalteu y Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich®, Co. LLC. (St. Louis, Missouri, USA); y etanol de Panreac Química, S. L. U. (Barcelona, España). Todos grado analítico.

### Extracción de compuestos

Mediante maceración dinámica se trató 1,0 g de muestra con 50 mL de etanol al 57 % regulando su pH a 2,0 con HCl, ésto durante 3 h a 60 °C. Se pasó por una centrifuga marca CLAY ADAMS® Brand DYNAC® (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) a 2800 rpm por 30 minutos y el líquido sobrenadante se liofilizó en un equipo FreeZone® 12 (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA) y almacenó en viales de vidrio ámbar a -20 °C.

### Medición del rendimiento

Para determinar el rendimiento de extracción se usó el método de Zhang *et al.* (2007). Luego de la centrifugación el sobrenadante se evaporó a sequedad usando un rotaevaporador BÜCHI, modelo R-200 (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza) a 60 °C y se liofilizó en un FreeZone® 12 (Labconco Corporation) para obtener el extracto. El rendimiento de extracción se calculó como porcentaje de la materia prima.

### Determinación de la capacidad antioxidante

Para determinar DPPH se usó la metodología de Brand-Williams *et al.* (1995), ABTS por Arnao *et al.* (2001), FRAP con el método de Benzie y Strain (1996) y fenoles totales con la técnica de Swain e Hillis (1959), todos modificados por Thaipong *et al.* (2006).

### Análisis estadístico

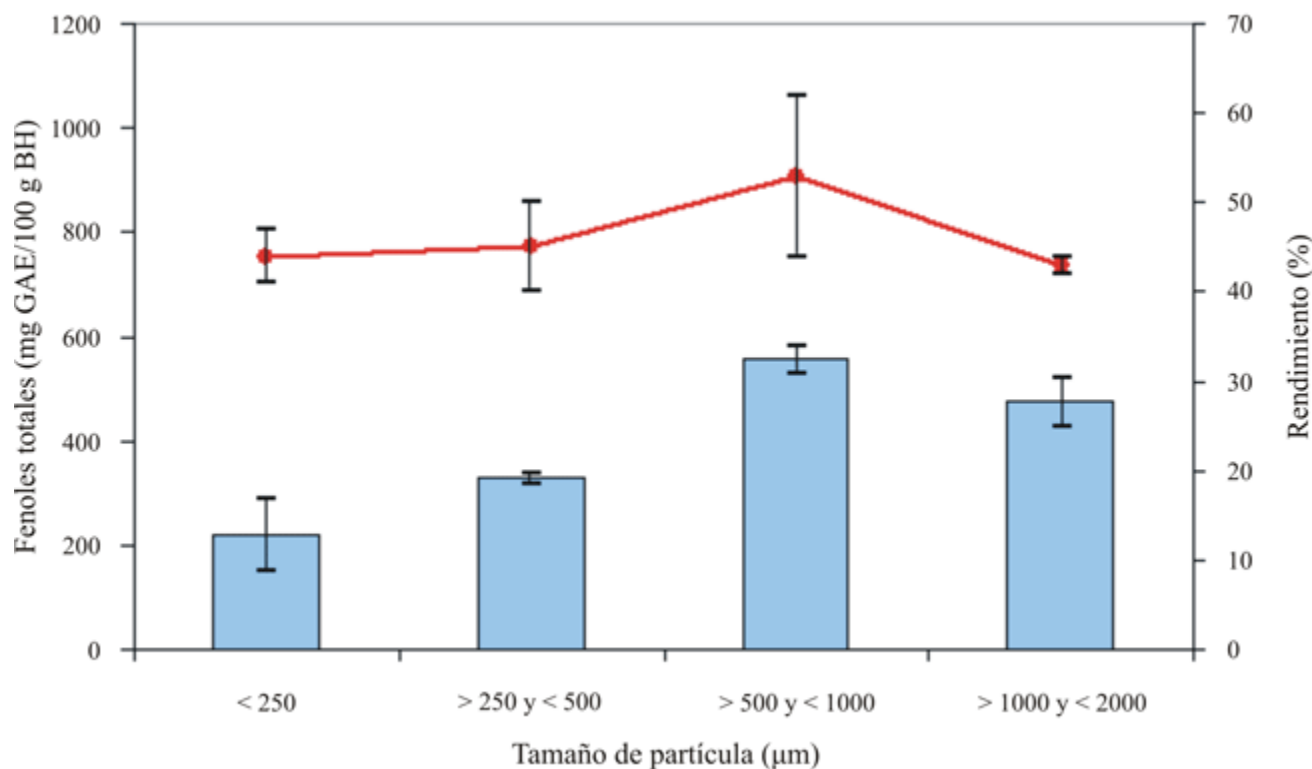
El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas entre ellas fueron establecidas a través de la prueba de Tukey con el programa Minitab® Statistical Software,

versión 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA). Se consideró  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Medición del rendimiento

De acuerdo a los resultados presentados en la Fig. 1, el tamaño de partícula no tuvo efecto sobre el rendimiento de extracción de la materia soluble en etanol al 57 %. Se encontró un valor ligeramente mayor cuando se trabajó con la fracción  $> 500$  y  $< 1000 \mu\text{m}$ , pero sin ser diferente significativamente ( $p > 0,05$ ). El rendimiento promedio fue de  $46,4 \pm 5,9 \%$ .



$n = 3$ .

Las barras corresponden al contenido de fenoles totales y la curva al rendimiento porcentual.

**Figura 1.-** Relación de fenoles totales y rendimiento de extracción en subproducto de guayaba.

### Capacidad antioxidante

Al analizar los resultados obtenidos en la técnica DPPH (Cuadro 1), se observó que no hubo diferencia significativa para los distintos tamaños ( $p > 0,05$ ) y el valor mayor fue para la fracción  $< 250 \mu\text{m}$ . Al comparar el resultado obtenido de  $86,5 \mu\text{mol Trolox equivalentes/g}$  base húmeda ( $\mu\text{mol TE/g BH}$ ) con los indicados por Thaipong *et al.* (2006) de  $16,2$  a  $32,0 \mu\text{M TE/g BH}$  para pulpa de 4 genotipos de guayaba ('Allahabad Safeda', 'Fan Retief', 'Ruby Supreme' y una de selección avanzada) se evidenció un valor muy superior para la piel.

La actividad antioxidante medida por ABTS para la fracción  $> 500$  y  $< 1000 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ) fue de  $49,3 \mu\text{mol TE/g BH}$ , valor superior a los determinados por Thaipong *et al.* (2006) de  $22,3$  a  $37,9 \mu\text{M TE/g BH}$  en pulpa para los 4 genotipos citados, e inferior a los de Rojas-

Barquera *et al.* (2008) de  $96 \mu\text{mol TE/g BH}$  en fracción comestible de guayaba var. Pera, y Restrepo-Sánchez *et al.* (2009) de  $63$  a  $118 \mu\text{mol TE/g BH}$  (a diferentes temperaturas de extracción) en puré de pulpa mas corteza de guayaba roja.

De los tamaños de partículas estudiados sobresalió la fracción  $> 500$  y  $< 1000 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ) con la que se obtuvo una mayor extracción de antioxidantes por el método FRAP (Cuadro 1) con un valor de  $58,6 \mu\text{mol TE/g BH}$ . Este resultado fue mayor a los encontrados por Thaipong *et al.* (2006) en extractos de 4 genotipos de guayaba de  $15,5$  a  $33,3 \mu\text{M TE/g BH}$ , similar al indicado por Rojas-Barquera *et al.* (2008) de  $54,7 \mu\text{mol TE/g BH}$  para la variedad Pera, e inferior a los obtenidos por Restrepo-Sánchez *et al.* (2009) de  $86$  a  $147 \mu\text{mol TE/g BH}$  en puré de pulpa mas corteza.

**Cuadro 1.-** Actividad antioxidante en subproducto de guayaba.

Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	DPPH ( $\mu\text{mol TE/g BH}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE/g BH}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol TE/g BH}$ )
$> 1000$ y $< 2000$	$74,8 \pm 11,6^a$	$38,3 \pm 4,5^a$	$51,9 \pm 8,6^{ab}$
$> 500$ y $< 1000$	$73,9 \pm 15,2^a$	$49,3 \pm 14,5^a$	$58,6 \pm 14,0^a$
$>250$ y $< 500$	$62,6 \pm 6,2^a$	$30,8 \pm 6,6^{ab}$	$35,3 \pm 4,1^b$
$< 250$	$86,5 \pm 9,3^a$	$15,2 \pm 1,9^b$	$36,6 \pm 5,4^{ab}$

Cada valor es la media con la desviación estándar de tres réplicas experimentales.

Las medias que no comparten una letra en una misma columna son significativamente diferentes.

TE: Trolox equivalentes. BH: base húmeda.

### Contenido de fenoles totales

Para fenoles totales (Fig. 1) se evidenció un efecto por el tamaño de partícula, repitiéndose la fracción mencionada para ABTS y FRAP ( $> 500$  y  $< 1000 \mu\text{m}$ ) como la que

permitió un valor superior de  $557$  mg equivalente a ácido gálico por cada  $100$  g en base húmeda (mg GAE /100 g BH), siendo éste mayor a los resultados obtenidos por Thaipong *et al.* (2006) de  $170,0$  a  $344,9$  mg GAE/100 g BH; Rojas-Barquera *et al.* (2008)  $29,8$  mg GAE

/100 g BH; Thaipong *et al.* (2005) 345,0 mg GAE/100 g BH en pulpa blanca del clon de guayaba 'Allahabad Safeda' y menor al valor encontrado por Jiménez-Escrig *et al.* (2001) 763 mg GAE/100 g BH.

Solo para DPPH no se encontró efecto del tamaño de partícula sobre la capacidad antioxidante, pero se evidenció que se obtuvo un valor mayor para el tamaño de partícula < 250 µm; esto pudo ser consecuencia que con menores tamaños de partícula se incrementa la tasa de extracción, debido a que se disminuye la distancia de difusión del soluto dentro del sólido (Franco *et al.*, 2007) y se incrementa el área de contacto, contribuyendo a incrementar la transferencia de masa de los solutos de acuerdo con los principios generales de la Ley de Fick (Gião *et al.*, 2009). Esto no se cumplió para ABTS, FRAP y fenoles totales, lo que pudo deberse al tipo de compuestos extraídos. Herodež *et al.* (2003) encontraron que para el ácido ursólico y ácido oleanólico se obtiene mayor extracción para una tamaño de partícula de 0,315 - 0,400 mm comparado con 0,20 - 0,25 mm.

## CONCLUSIONES

Los resultados para ABTS, FRAP y fenoles totales demostraron que el tamaño de partícula tuvo efecto sobre la extracción de compuestos antioxidantes en subproductos de guayaba y por el contrario para el método DPPH no tuvo. La fracción de tamaño de partícula > 500 y < 1000 µm permitió la mayor extracción de compuestos con potencial antioxidante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arnao, Marino B.; Cano, Antonio and Acosta, Manuel. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 73(2):239-244.  
Amin, I. and O. Mukhrizah. 2006. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts

prepared from food-processing by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(5):778-784.

Benzie, Iris F.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1):70-76.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (LWT) - Food Science and Technology*. 28(1):25-30.

Bravo, Laura. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56(11):317-333.

Franco, Daniel; Pinelo, Manuel; Sineiro, Jorge and Núñez, María José. 2007. Processing of *Rosa rubiginosa*: extraction of oil and antioxidant substances. *Bioresource Technology*. 98(18):3506-3512.

Gião, Maria S.; Pereira, Cláudia I.; Fonseca, Susana C.; Pintado, Manuela E. and Malcata, F. Xavier. 2009. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chemistry*. 117(3):412-416.

Gil, María I.; Tomás-Barberán, Francisco A.; Hess-Pierce, Betty and Kader, Adel A. 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(17):4976-4982.

Guo, Changjiang; Yang, Jijun; Wei, Jingyu; Li, Yunfeng, Xu, Jing and Jiang, Yugang. 2003. Antioxidant Activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP, assay. *Nutrition Research*. 23(12):1719-1726.

- Heim, Kelly E.; Tagliaferro, Anthony R. and Bobilya, Dennis J. 2002. Flavonoid antioxidant: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(10):572-584.
- Herodež, Špela Stangler; Hadolin, Majda; Škerget, Mojca and Knez, Željko. 2003. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*. 80(2):275-282.
- INEN. 2009. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Frutas frescas. Guayaba. Requisitos. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1911:2009.
- Jiménez-Escrig, Antonio; Rincón, Mariela; Pulido, Raquel and Saura-Calixto, Fulgencio. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 49(11):5489-5493.
- Kong, K.W. and Ismail, A. 2011. Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry. *Food and Bioprocess Technology*. 89(1):53-61.
- Kong, Kin Weng; Ismail, Abdul Razak; Tan, Seok Tyug; Prasad, Nagendra Krishna Murthy and Ismail, Amin. 2010. Response surface optimisation for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product. *International Journal of Food Science & Technology*. 45(8):1739-1745.
- Leong, L.P. and Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*. 76(1):69-75.
- Maisuthisakul, Pichaon and Gordon, Michael H. 2009. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*. 117(2):332-341.
- Makris, Dimitris P.; Boskou, George and Andrikopoulos, Nikolaos K. 2007. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*. 98(15):2963-2967.
- Oh, Won Keun; Lee, Chul Ho; Lee, Myung Sun; Bae, Eun Young; Sohn, Cheon Bae; Oh, Hyuncheol; Kim, Bo Yeon and Ahn, Jong Seog. 2005. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology*. 96(3):411-415.
- Prasad, Nagendra K.; Yang, Bao; Zhao, Mourming; Wang, Biao S.; Chen, Feng and Jiang, Yueming. 2009. Effects of high-pressure treatment on the extraction yield, phenolic content and antioxidant activity of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp. *International Journal of Food Science & Technology*. 44(5):960-966.
- Restrepo-Sánchez, Diana Chavely; Narváez-Cuenca, Carlos Eduardo y Restrepo-Sánchez, Luz Patricia. 2009. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova*. 32(6):1517-1522.
- Ribeiro, S.M.R.; Barbosa, L.C.A.; Queiroz, J.H.; Knödler, M. and Schieber, A. 2008. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*. 110(3):620-626.
- Robles-Sánchez, Maribel; Gorinstein, Shela; Martín-Belloso, Olga; Atiazarán-García, Humberto; González-Aguilar, Gustavo y Cruz-Valenzuela, Reinaldo. 2007. Frutos tropicales mínimamente procesados: potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia*. 32(4):227-232.
- Rojas-Barquera, D.R.; Narvaez-Cuenca, E.C. y Restrepo-Sánchez, L.P. 2008. Evaluación del contenido de vitamina C, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) de las variedades Pera, Regional Roja y Regional

- Blanca. En Memorias de Lagrotech (Red tecnológica y química de productos industriales latinoamericanos), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. pp. 49-60.
- Ross, Julie A. and Kasum, Christine M. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. 22:19-34.
- Schieber, A.; Stintzing, F.C. and Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends in Food Science & Technology*. 12(11):401-413.
- Soong, Yean Yean and Barlow, Philip J. 2006. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*. 97(3):524-530.
- Stahl, Wilhem and Sies, Helmut. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1740(2):101-107.
- Swain, T. and Hillis, W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.-The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 10(1):63-68.
- Temple, Norman J. 2000. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*. 20(3):449-459.
- Thaipong, Kriengsak; Boonprakob, Unaroj; Cisneros-Zevallos, Luis and Byrne, David H. 2005. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. 36(Suppl.4):254-257.
- Thaipong, Kriengsak; Boonprakob, Unaroj; Crosby, Kevin; Cisneros-Zevallos, Luis and Byrne, David Hawkins. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(6-7):669-675.
- Zhang, Shou qin; Bi, Hui min and Liu, Chang jiao. 2007. Extraction of bio-active components from *Rhodiola sachalinensis* under ultrahigh hydrostatic pressure. *Separation and Purification Technology*. 57(2):277-282.