Chất chống oxy hóa từ thực vật và phương pháp phân tích trong nghiên cứu

Bùi Văn Tú

1. Đặt vấn đề

Từ thực tiễn cuộc sống, con người đã biết tìm ra được nhiều loại thực vật vừa có tác dụng dinh dưỡng, vừa có tác dụng điều trị bệnh tật. Thực vật cũng là một nguồn tuyệt vời chứa các chất chống oxi hóa. Các hợp chất phenolic, là những chất chống oxi hóa tự nhiên, được phát hiện phổ biến trong các loại thực vật. Chúng đã được báo cáo là có nhiều chức năng sinh học quý bởi vì chúng có khả năng trì hoãn hiệu quả quá trình oxi hóa chất béo và do đó góp phần cải thiện chất lượng và dinh dưỡng của thực phẩm. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh được các phần của thực vật chứa nhiều chất chống oxi hóa như: Flavonoids, tannins, vitamins, quinines, coumarins, lignan, ligin và các hợp chất phenolic khác. Vì vậy, thực vật sẽ là một nguồn nguyên liệu tốt để thu nhận và ứng dụng các chất có hoạt tính sinh học.

Việt Nam nằm ở vùng khí hậu nhiệt đới thuộc Đông Nam Á. Hệ thực vật vô cùng phong phú và đa dạng với xấp xỉ 2.500 loài thực vật được nhận diện. Nhiều loại thực vật trồng ở Việt Nam đã được sử dụng trong y học, dược liệu từ lâu đời vì những đặc tính sinh học đa dạng của nó. Thực vật dược liệu trồng ở Việt Nam cũng nhận được sự quan tâm đặc biệt của các nhà nghiên cứu trong vài thập kỷ qua. Có thể nói Việt Nam có nguồn thực dồi dào phục vụ tốt cho lĩnh vực thực phẩm cũng như dược phẩm.

2. Thực vật có hoạt tính chống oxy hóa

2.1. Trà xanh

Chè có tên khoa học là *Camelha sinensis*. Đó là loại đồ uống quen thuộc ở Việt Nam và nhiều nước châu Á từ hàng ngàn năm. Về sau nước chè cũng là đồ uống phổ biến ở các nước khác trên khắp thế giới.

Trong những năm gần đây, nhờ áp dụng các phương pháp nghiên cứu khoa học hiện đại, người ta thấy tác dụng sinh học của nước chiết lá chè chủ yếu là do các polyphenol, trong đó, quan trọng là các dẫn xuất của catechin như epicatechin, epigalocatechin, epicatechingalat và epigalocatechin-galat. Chính các polyphenol trên là tanin trong lá chè.

Tác dụng sinh học của các polyphenol trong dịch chiết lá chè xanh được giải thích là do chúng có tác dụng khử các gốc tự do, giống như tác dụng của các chất chống oxy hoá. Các gốc tự do được sinh ra và tích luỹ trong quá trình sống, là nguyên nhân dẫn đến bệnh tật và làm tăng tốc độ quá trình lão hoá cơ thể con người.

Ngày nay, người ta đã tìm thấy tác dụng của polyphenol chè ở những mức độ khác nhau đối với các bệnh ung thư, tim mạch, cao huyết áp, đường ruột, bệnh răng và có tác dụng làm chậm quá trình lão hoá, tăng tuổi thọ. Polyphenol chè còn được sử dụng có hiệu quả và an toàn trong công nghiệp thực phẩm để thay thế các chất chống oxy hoá tổng hợp, như BHA, BHT dễ gây tác dụng phụ có hại. Nhờ những tác dụng quý giá như trên của các polyphenol chè, nên chúng có giá trị cao trên thị trường hiện nay.

2.2. Lá ổi

Cây ổi là một trong những cây nhiệt đới được trồng khá phổ biến ở Việt Nam, từ vùng đồng bằng đến vùng núi trung du. Từ trước đến nay, người ta trồng ổi chủ yếu để lấy quả. Tuy nhiên, ngoài sản phẩm chính là quả, lá ổi cũng là một nguồn khá dồi dào và có nhiều tiềm năng sử dụng nhưng chưa được khai thác đúng mức. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng trong lá ổi chứa nhiều hợp chất quý có hoạt tính sinh học như: Hoạt tính chống oxi hóa, hoạt tính ức chế enzyme glucosidase, hoạt tính ức chế tyrosinase; [13],[12], [5],[7],[3]. Dịch chiết giàu polyphenol từ lá ổi có thể ứng dụng trong việc ngăn ngừa, hạn chế quá trình oxi hóa chất béo trên cơ thịt cá đã được báo cáo bởi nhóm tác giả Nguyễn Xuân Duy và Nguyễn Anh Tuấn, 2013 [4]; Ho Minh Hiep và cộng sự 2013 [6]. Vì vậy, lá ổi sẽ là một trong những nguồn thực vật hứa hẹn cung cấp các chất chống oxi hóa tự nhiên và mở rộng áp dụng trong một số lĩnh vực như thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm.

Theo kết quả nghiên cứu của Hui-Yin và Gow-Chin (2007) [7] thì dịch chiết từ lá ổi có hoạt tính chống oxi hóa và khả năng khử gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy dịch chiết từ lá ổi ở nồng độ 100 µg/ml ức chế 94,4- 96,2% sự oxi hóa chất béo trong mô hình axít linoleic. Witayapan et al. (2010) [15] cũng đã báo cáo rằng dịch chiết bằng nước nóng từ lá ổi thể hiện hoạt tính chống oxi hóa tương đương với Trolox là 20,41 mM/mg. Giá trị này cao hơn 8,7 lần so với BHT (Butylated hydroxy toluene) và 1,2 lần so với vitamin E.

2.3. Rau má

Rau má cũng là một loại dược thảo có tính bổ dưỡng rất cao, có nhiều sinh tố, khoáng chất, những chất chống oxy hóa, có thể dùng để dưỡng âm, cải thiện trí nhớ, làm chậm sự lão hóa, cải thiện vi tuần hoàn và chữa nhiều chứng bệnh về da.

Thành phần của rau má bao gồm những chất sau: beta caroten, sterols, saponins, alkaloids, flavonols, saccharids, calcium, iron, magnesium, manganese, phosphorus, potassium, zinc, các loại vitamins B_1, B_2, B_3, C và K.

Rau má chứa khá nhiều chất có hoạt tính sinh học như Saponin (asiaticosid, axit asiatic, madicassosid, axit madecassic. Các hợp chất của triterpene được ứng dụng nhiều trong các sản phẩm y, dược, thực phẩm, mỹ phẩm, nông nghiệp. Trên thế giới đã không chỉ nghiên cứu chiết xuất ra các hợp chất triterpen hỗn hợp trong rau má mà còn đi sâu nghiên cứu các thành phần trong hợp chất triterpene như asiatic, madecassic và asiaticoside để ứng dụng trong các lĩnh vực khác.

Saponin triterpen ở nồng độ 0.5mg có khả năng kháng với 04 chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus, E.Coli, Pseudomonas aeruginosa và Bacillus* subtilis và có hoạt tính chống oxy hóa với nồng độ từ 10 - 200µg/ml (3,0 - 17,828%), trong đó đạt cao nhất ở nồng độ 200µg/ml (17,828%).

2.4. Cacao

Cây cacao, là cây công nghiệp nhiệt đới, được trồng ở nhiều nơi trên thế giới. Ở Việt Nam, cây cacao được trồng nhiều ở tỉnh Tây Nguyên. Flavonoid là cũng là hợp chất có tính sinh học quan trọng được tìm thấy trong lá ca cao. Flavonoid là hợp chất chống oxy hóa, kháng khuẩn, giảm sự béo phì, chống đột biến, và các hoạt động chống lão hóa khác.

Nguyễn Thị Quỳnh Hoa (2012) đã định lượng được hàm lượng một số flavonoid trong lá ca cao. Theo đó, hàm lượng rutin khoảng 1,92-23,03 mg/g, quercetin khoảng 0,25-12,1 mg/g tùy thuộc vào dung môi chiết [2]. Nghiên cứu khả năng chống oxy hóa trên cơ thịt cá bớp đã chỉ ra dịch chiết lá ca cao có khả năng hạn chế sự oxy hóa lipid bảo quản trong 9 ngày.

2.5. Cây sa kê

Sa kê có tên khoa học là *Artocarpus altilis* phân bố rộng rãi ở khu vực Thái Bình Dương: Indonesia, Malaysia đến Hawaii. Cây thích hợp với khí hậu nhiệt đới gió mùa nóng ẩm, mưa nhiều. Sa kê là một trong những loài cây lương thực có sản lượng cao. Quả sa kê có chứa thành phần tinh bột, khoáng chất, các acid amin thiết yếu. Sa kê được coi là cây đáp ứng cho nhu cầu thực phẩm của các dân tộc thiểu số và làm nguyên liệu cho một số ngành, chủ yếu là ngành công nghệ thực phẩm. Sa kê đã được người Pháp đưa vào Việt Nam từ Indonesia và được trồng tại miền Nam Việt Nam. Cây không sống được trong vùng khí hậu miền Bắc Việt Nam. Cây sa kê là một loại cây đặc biệt, tất cả các bộ phận của của cây không chỉ chứa các thành phần cơ bản như protein, lipid, vitamin… mà còn chứa các thành phần dược tính khác như flavonoid, stilbenoid, arylbenzofuron và jacalin. Những chất này rất có lợi cho quá trình tiêu hóa trong cơ thể con người. Lá, rễ và vỏ của cây sa kê được sử dụng như những vị thuốc truyền thống để điều trị bệnh gút, bệnh viêm gan, bệnh tăng huyết áp, bệnh rối loạn chức năng gan, bệnh tiểu đường và đặc biệt là khả năng chống oxy hóa của chúng [1].

2.6. Măng cụt

Măng cụt có tên khoa học là *Garcinia mangostana L*., thuộc họ Bứa (*Clusiaceae*), là loài cây ăn quả rất phổ biến thuộc ở Đông Nam Á, Ấn Độ, Sri LanKa. Cây măng cụt còn có tên gọi khác là cây măng, sơn trúc tử, người phương Tây gọi trái măng cụt là "nữ hoàng của các loại trái cây". Do thích hợp với khí hậu nóng ẩm nên ở Việt Nam cây măng cụt được trồng nhiều ở các tỉnh miền Đông Nam Bộ, đồng bằng sông Cửu Long.

Từ lâu vỏ măng cụt đã được sử dụng để làm thuốc điều trị các bệnh đau bụng, tiêu chảy, kiết lỵ, nhiễm trùng vết thương và ung nhọt mãn tính. Những hợp chất chủ yếu có hoạt tính trong vỏ măng cụt là xanthone và dẫn xuất của xanthone. Chúng thuộc loại hợp chất polyphenol và thường tìm thấy trong các cây thực vật bậc cao. Một vài chất trong số các hợp chất xanthone có khả năng chống oxy hóa cao, hoạt tính kháng viêm, hoạt tính kháng khuẩn. Vì vậy, trong thời gian gần đây các hợp chất xanthone chiết xuất từ vỏ măng cụt được sử dụng để sản xuất thực phẩm chức năng cũng như các sản phẩm khử trùng [1].

2.7. Một số thực vật khác có chứa chất chống oxy hóa

Ngoài những thực vật nêu trên, lá Dâm bụt (Hibiscus rosa-sinensis), lá Lốt (*Piper lolot*), lá Nhãn lồng (*Passiflora foetida)*, lá Khoai lang (*Lpomoea batatas*), Ngò rí (Coriandrum satinum), rau Bồ ngót (*Sauropus androgynus*), rau Răm (*Persicaria odorata*),

Nha đam (*Aloe vera*), lá Tía tô (*Perilla frutescens*), lá Sả (*Cymbopogon*), lá Mã đề (*Plantago*), lá Diếp cá (*Houttuynia cordata*), lá rau má (*Centella asiatica*), lá trầu không (*Piper betle*) cũng đã được nghiên cứu và chứng minh là có hoạt tính chống oxy hóa.

3. Hàm lượng polyphenol của thực vật

Hàm lượng polyphenol của thực vật được trình bày ở bảng sau:

STT	Loại thực vật	Đơn vị	Hàm lượng	Hàm lượng [11]
1.	Trầu không	mg GAE/g chất khô	188,19 **[14]**	
2.	Lá ổi	mg GAE/g chất khô	146,5 **[14]**	122,8
3.	Lá trà xanh	mg GAE/g chất khô	84,5 **[14]**	84,8
4.	Lá nhàu	mg GAE/g chất khô	11,7 **[14]**	
5.	Lá lốt	mg GAE/g chất khô	39,3 **[14]**	19,6
6.	Lá khoai lang	mg GAE/g chất khô	60,7 **[14]**	68,4
7.	Bột chiết cacao	mg GAE/g chất khô	21,33 **[2]**	

Nghiên cứu của Marja và cộng sự (1999) khi nghiên cứu 92 loại thực vật ăn được đã chỉ ra rằng hàm lượng polypenol giao động từ 0,2-155,3 mg GAE/g chất khô. Nhóm tác giả cũng đề xuất hàm lượng polyphenol lớn hơn 20 mg GAE/g chất khô thì có tính oxy hóa mạnh

4. Phương pháp phân tích

4.1. Xác định khả năng chống oxy hóa theo phương pháp DPPH:

Nguyên tắc: Các chất nghiên cứu có tác dụng chống oxy hóa theo cơ chế ức chế gốc tự do sẽ làm giảm màu của dung dịch DPPH. Xác định khả năng này bằng cách đo độ hấp thu ở bước sóng có hấp thu cực đại tại 517 nm. Cách tiến hành: Dùng 0.5 mg dung dịch chất cần khảo sát (nồng độ 200µg/ml, 150 µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml pha trong methanol) cho vào 2.5 ml dung dịch DPPH (nồng độ 50µg/ml pha trong methanol). Hỗn hợp được lắc đều và để ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thu sau 5, 10, 20, 30 phút ở bước sóng 517 nm, mỗi lần đo 3 lần lấy giá trị trung bình. Mẫu trắng được tiến hành trong cùng điều kiện nhưng không sử dụng Saponin triterpen. Khả năng ức chế gốc tự do (S%) được tính theo công thức sau:

$$S\ (\%) = [1 - (A^ts - A^tc)] \times 100$$

Trong đó: A^ts: Độ hấp thu của mẫu thử ở thời điểm t = 5 phút, 10 phút, 20 phút, 30 phút. A^tc: Độ hấp thu của mẫu trắng

4.2. Phương pháp năng lực khử

Nguyên tắc: Mẫu thử sẽ khử ion Fe^{3+} trong phân tử kali ferricyanid ($K_3[Fe(CN)_6]$) thành ion Fe^{2+} trong phân tử kali ferrocyanid ($K_4[Fe(CN)_6]$). Khi bổ sung $FeCl_3$, Fe^{3+} sẽ phản ứng với ion ferrocyanid tạo thành phức hợp ferris ferrocyanid ($K_4[Fe(CN)_6]_3$) màu xanh dương.

Quy trình khảo sát năng lực khử được tiến hành như sau: 1 ml mẫu thử ở các nồng độ khảo sát được bổ sung thêm 2,5 ml dung dịch đệm phosphate 0,2M (pH = 6,6), ủ ở nhiệt độ 50^0C, 20 phút. Sau đó, mỗi ống nghiệm được bổ sung thêm 2,5 ml dung dịch tricloacetic acid 10%. Lấy 2,5 ml dung dịch trên, thêm 2,5 ml nước cất hai lần, bổ sung 0,5 ml dung dịch $FeCl_3$ 0,1%. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 700 nm, giá trị mật độ quang OD phản ánh khả năng khử của mẫu. Giá trị mật độ quang càng cao chứng tỏ năng lực khử của mẫu càng cao.

4.3. Phương pháp chiết polyphenol:

Phương pháp chiết polyphenol được điều chỉnh như sau: Lấy 5 g mẫu ở mỗi độ chín và tiến hành nghiền trong dung dịch acetone 90%. Sau đó, tăng lên thể tích 25 mL bằng dung dịch acetone. Tiến hành ly tâm dịch nghiền trong 20 phút với tốc độ 6,000 vòng/phút.

Thu lấy phần dịch trong (dịch chiết) và bảo quản ở -20^0C để phân tích. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần.

Xác định hàm lượng polyphenol: Hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu. Đường chuẩn gallic acid được xây dựng bằng cách chuẩn bị các dung dịch chuẩn gallic acid (0, 20,40, 60, 80, 100 µg/L). Hàm lượng polyphenol được xác định dựa trên đường chuẩn gallic acid và được biểu thị bằng mg gallic acid tương đương (GAE)/100 g chất tươi. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần

5. Cơ chế chống oxy hóa

5.1. Cơ chế hoạt động của các hợp chất chống oxy hóa polyphenol

5.1.1. Cơ chế chuyển nguyên tử hydro (Hydrogen Atomic Transfer-HAT)

Trong cơ chế này, chất chống oxy hóa, được ký hiệu là ArOH, sẽ khống chế các gốc tự do (ví dụ: gốc peroxyl ROO•) bằng cách chuyển một nguyên tử hydro của nhóm OH trong ArOH sang gốc tự do ROO•:

$$ROO^{\bullet} + ArOH \longrightarrow ROOH + ArO^{\bullet}$$

Gốc phenoxyl (ArO•) tạo thành có thể được ổn định nhờ vào sự chuyển một nguyên tử hydro ở xa hơn để tạo thành quinone hoặc phản ứng với gốc tự do khác bao gồm cả các gốc phenoxyl khác. Với sự phát triển liên tục như vậy sẽ tạo ra một chuỗi các phản ứng. Cơ chế HAT phù hợp với kiểu phân cắt đồng ly của liên kết O-H trong hợp chất polyphenol. Phản ứng này có thể xảy ra trên mỗi nhóm OH của hợp chất polyphenol (ArOH) và nó phụ thuộc vào năng lượng phân ly liên kết (Bond Dissociation Enthalpy − BDE) của nhóm OH và enthalpy của phản ứng. Năng lượng phân ly liên kết (BDE) thể hiện độ bền nhiệt động của liên kết O–H trong hợp chất polyphenol. BDE thấp thì liên kết O−H dễ dàng bị cắt đứt và nguyên tử hydro dễ dàng chuyển đến kết hợp với gốc tự do, điều này sẽ đóng vai trò rất quan trọng trong phản ứng chống oxy hóa [1].

5.1.2. Cơ chế chuyển một electron chuyển proton (Single Electron TransferProton Transfer − SET−PT)

Cơ chế này gồm hai quá trình (phản ứng 1.2), trong quá trình thứ nhất một electron từ polyphenol chuyển sang gốc tự do và quá trình thứ hai là chuyển một proton.

$$ROO^{\bullet} + ArOH \longrightarrow ROO^{-} + ArOH^{+\bullet} \longrightarrow ROOH + ArO^{\bullet}$$

Cơ chế SET−PT được quyết định bởi khả năng chuyển electron, được đặc trưng bởi năng lượng ion hóa (Ionization Energy − IE). Trong quá trình thứ hai của cơ chế này thì liên kết O−H phân cắt theo kiểu dị ly, được đặc trưng bởi năng lượng phân ly proton (Proton Dissociation Enthalpy – PDE), nó tỏa nhiệt mạnh đối với hợp chất phenolic [47, 48]. Ngoài ra, dung môi cũng ảnh hưởng đến enthalpy phản ứng của quá trình thứ nhất. Vì vậy, dung môi cần phải đưa vào nghiên cứu để thu được một sự mô phỏng tốt về đặc điểm phản ứng oxy hóa của hợp chất polyphenol [8].

5.1.3. Cơ chế chuyển proton mất electron (Sequential Proton Loss Electron Transfer − SPLET)

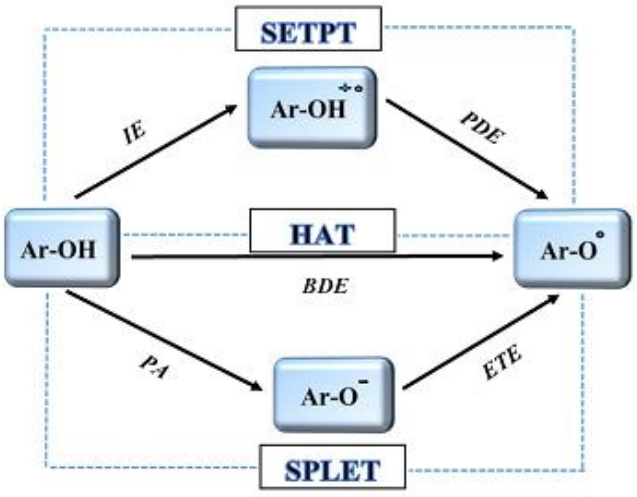
Trong cơ chế SPLET thì một proton bị mất và tiếp theo đó là sự chuyển electron. Hai đại lượng nhiệt động học bao gồm ái lực proton (Proton Affinity – PA) và năng lượng chuyển electron (Electron Transfer Enthalpy – ETE) là hai thông số đặc trưng cho quá trình này. Cơ chế này được xét trong điều kiện pH cụ thể [9], [10].

$$ArOH \longrightarrow ArO^{-} + H^{+}$$

$$ArO^{-} + RO_2^{\bullet} \longrightarrow RO_2^{-} + ArO^{\bullet}$$

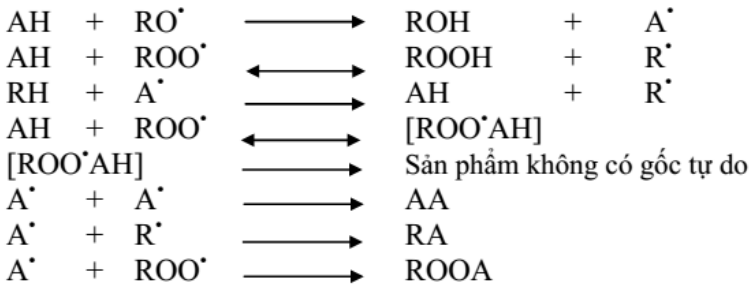
$$RO_2^{-} + H^{+} \longrightarrow ROOH$$

Các cơ chế chống oxy hóa có thể được tóm tắt ở sơ đồ sau:



6. Ứng dụng của các chất chống oxy hóa tự nhiên

- Hạn chế quá trình oxy hóa lipid của thực phẩm: Các hợp chất polyphenol sẽ chuỗi phản ứng oxy hóa bằng cách cho gốc tự do điện tử của chúng. Cơ chế chống oxy hóa lipid của polyphenol được trình bày như sau:



Trong đó: RO^*, ROO^*, A^* là các gốc tự do; AH là chất chống oxy hóa nguồn gốc tự nhiên.

- Chống biến đen cho tôm:

Tyrozine, phenylalanin → Melanin

Xúc tác cho quá trình này là enzyme polyphenolaxxydaza. Việc sử dụng các hợp chất chống oxy hóa tự nhiên có tác dụng ức chế hoạt động của enzyme này. Điều này đã được chứng minh trong nghiên cứu của Nguyễn Xuây Duy và cộng sự [3]

7. Kết luận

Việc nghiên cứu về chất chống oxy hóa nguồn gốc tự nhiên tại Việt Nam còn khá mới mẻ và hiện được đông đảo các nhà khoa học quan tâm. Các nghiên cứu tạp trung vào việc sàng lọc những thực vật có chứa các hợp chất polyphenol. Gần 200 loài thực vật đã được các tác giả trong và ngoài nước nghiên cứu về hàm lượng và thử khả năng chống oxy hóa thực phẩm và dược phẩm. Trong lĩnh vực thực phẩm chất chống oxy hóa có thể ứng dụng cho các nguyên liệu và sản phẩm giàu lipid như: bimbim, bánh quy, các sản phẩm chiên rán,…. Một số tác giả đã nghiên cứu chống oxy hóa cho thủy hải sản (cá thu, cá bớp, mực…), chống biến đen cho tôm và cho kết quả rất khả quan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Minh Thông (2016), *Nghiên cứu cấu trúc, khả năng chống oxy hóa của một số polyphenol và dẫn xuất trên nền fullerene (c60) bằng phương pháp hóa tính toán luận án tiến sĩ hóa lý thuyết và hóa lý*, Luận án Tiến sĩ, Đại học Huế.
2. Nguyễn Thị Huyền, Phạm Thị Kim Quyên, *Khả năng chống oxy hóa invitro của dịch chiết lá cacao và thử nghiệm hạn chế oxy hóa lipid trên cơ thịt cá bớp*, Tạp chí Nông nghiệp Việt Nam, tập 15, số 2: 214-224
3. Nguyễn Xuân Duy và Hồ Bá Vương (2013). *Hoạt tính chống oxi hóa và ức chế enzyme polyphenoloxidase của một số loại thực vật ăn được ở Việt Nam*. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 11(3): 364 - 372.
4. Nguyễn Xuân Duy và Nguyễn Anh Tuấn (2013). *Sàng lọc các thực vật có hoạt tính chống oxi hóa và áp dụng trong chế biến thủy sản*. Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ, 28: 59 - 68.
5. Dong-Hyun You, Ji-Won Park, Hyun-Gyun Yuk, and Seung-Cheol Lee (2011). *Antioxidant and Tyrosinase InhibitoryActivities of Different Parts of Guava* (*Psidium guajava L.*). Food Sci. Biotechnol., 20(4): 1095 - 1100.

6. Ho Minh Hiep, Nguyen Anh Tuan, Nguyen Xuan Duy (2013*). Studies on retardation of lipid oxidation in oil-fish meat during refrigerated storage by guava leaf extract. International conference on postharvest technology*, food chemistry and processing: "Developing the supply chain towards more healthy food", Ha Noi University of Agriculture, Nov. 11- 13rd, 2013, Ha Noi, Viet Nam.
7. Hui-Yin Chen and Gow-Chin Yen (2007). *Antioxidant activity and free radical - scavenging capacity of extracts from guava (Psidium Guajava L.)* leaves. Food Chemistry, 101: 686 - 694.
8. Jovanovic S.V., Steenken S., Hara Y., Simic M.G. (1996), "*Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity?*", J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 11, pp. 2497.
9. Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G. (1994), *"Flavonoids as Antioxidants"*, J. Am. Chem. Soc., 116(11), pp. 4846-4851.
10. Litwinienko G., Ingold K.U. (2003), *"Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (dpph*) in alcohols"*, *J. Org. Chem.*, 68(9), pp. 3433-3438.
11. Marja, P. Kahkonen, Anu, I. H., Heikki, J. V., Jussi-Pekka, R., Kalevi, p., Tytti, s. K., Marina, H. (1999). *Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds.* J. Agric. Food Chem., 47: 3954-3961.
12. Rosa Martha Pérez Gutiérrez, Sylvia Mitchell, Rosario Vargas Solis (2008). *Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology*. Journal of Ethnopharmacology, 117: 1 - 27.
13. Suganya Tachakittirungrod, Siriporn Okonogi and Sombat Chowwanapoonpohn (2007). *Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract.* Food Chemistry, 103(2): 381 - 388.
14. Truong Tuyet Mai, Nghiem Nguyet Thu, Pham Gia Tien and Nguyen Van Chuyen (2007), *Alpha-Tyrosinase Inhibitors*: A Fuorescence Quenching Study.J.Agric.Food Chem.,54:935-941.
15. Witayapan Nantitanon, Songwut Yotsawimonwat and Siriporn Okonogi (2010). *Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract.* LWT - Food Science and Technology, 43(7): 1095 - 1103.