

Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes*

Total phenols and antioxidant capacity estimated with DPPH/ABTS assays in roses on preservative solutions

Nadia Zenil Lugo¹, Ma. Teresa Colinas León^{1§}, Cecilio Bautista Bañuelos², Tito Roque Vázquez Rojas¹, Héctor Lozoya Saldaña¹ y Ma. Teresa Martínez Damián¹

¹Instituto de Horticultura-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco km. 38.5. 56230, Chapingo, Estado de México. Tel. 9521500. Ext. 5224. (zeluna@hotmail.com; cecilio_bautistaver@hotmail.com; tvazro@correo.chapingo.mx; picti87@gmail.com; teremd13@gmail.com). [§]Autor para correspondencia: lozcol@gmail.com.

Resumen

Tallos de rosa ‘Freedom’ se evaluaron en dos soluciones preservantes: 8-citrato de hidroxiquinoleina (HQC) y Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag (CHRYSAL) en un pulso de 24 h a temperatura ambiente (24 ± 2 °C, 75 % HR) y agua como testigo. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue un tallo floral. Se evaluó la vida de florero, el contenido de fenoles totales con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu la capacidad antioxidante total (caT) con los ensayos DPPH y ABTS tanto en hoja como en pétalo. Se realizó el ANOVA y correlaciones simples entre la caT y el contenido de fenoles, y entre ambos ensayos. Los resultados muestran que las soluciones preservantes promueven un aumento en la caT y contenido de fenoles totales en hoja, pero no en pétalo. Las hojas de los tallos florales tratados con CHRYSAL presentaron los mayores contenidos de fenoles totales y caT, mientras que el testigo los menores. La vida media de florero fue de: 13, 11 y 9 días para los tratados con CHRYSAL, HQC y el testigo, respectivamente. El contenido de fenoles totales presentó una estrecha relación positiva ($\alpha \geq 0.01$) con la caT: 0.87 y 0.85 medida con el ABTS y 0.92 y 0.85 con el DPPH en hoja y pétalo respectivamente y también ambos métodos se correlacionaron entre sí positiva y significativamente ($r=0.91$) en hoja y ($r=0.93$) en pétalo.

Abstract

Rose stems ‘Freedom’ were evaluated in two preservative solutions: 8-hydroxyquinoline citrate (HQC) and Chrysal CLEAR[®] Professional 2 T-bag (CHRYSAL) in a pulse of 24 h at room temperature (24 ± 2 °C, 75% HR) and water as control. A completely randomized design with four replications was used; the experimental unit was a flower stem. Vase life, total phenolic content with the colorimetric method Folin-Ciocalteu, total antioxidant capacity (caT) with DPPH and ABTS assays in both leaf and petal was evaluated. ANOVA and simple correlations between caT and content of phenols and between both assays was made. The results show that preservative solutions promote an increase in caT and total phenolic content in leaf, but not in petal. The leaves of the flowering stems treated with CHRYSAL had the highest contents of total phenols and caT, while control the lowest. The average vase life was 13, 11 and 9 days for those treated with CHRYSAL, HQC and control, respectively. The total phenolic content showed a strong positive relation ($\alpha \geq 0.01$) with caT: 0.87 and 0.85 measured with ABTS and 0.92 and 0.85 with DPPH in leaf and petal respectively and also both methods were correlated positively and significantly with each other ($r=0.91$) in leaf and ($r=0.93$) in petal.

* Recibido: enero de 2014
Aceptado: junio de 2014

Palabras claves: *Rosa hybrida* L., estrés oxidativo, vida de florero 'Freedom'.

Keywords: *Rosa hybrida* L., oxidative stress, vase life 'Freedom'.

Introducción

Como resultado del proceso natural de senescencia, así como de los diferentes tipos de estrés a los que están sometidas las rosas de corte durante su almacenamiento y/o transporte, se presenta un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y una pérdida de la capacidad antioxidante (Zimmermann y Zentgraf, 2004). Las ERO son altamente dañinas para la célula, ya que al reaccionar con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, estos modifican su estructura y función y ocasionan alteraciones metabólicas que conducen a la muerte celular (Sato *et al.*, 2001), lo cual merma la calidad, vida de anaquel y valor comercial de las rosas (Hodges *et al.*, 2004).

La vida de florero de las rosas (*Rosa hybrida* L.) es generalmente corta (Ichimura *et al.*, 1999), para incrementarla se han desarrollado soluciones preservantes de gran aceptación comercial, los más efectivos en lograrlo son los que se usan a nivel consumidor (Ichimura *et al.*, 2006). En clavel (*Dianthus caryophyllus*) y crisantemo (*Dendratema morifolium*) se ha demostrado que la utilización de soluciones preservantes por tiempos cortos entre 3 y 24 h con compuestos que actúen como secuestradores de radicales libres disminuyen los niveles de ERO e incrementan la vida de florero (Baker *et al.*, 1977; Zheng y Guo, 1998) ya que aumentan los niveles de antioxidantes y enzimas implicadas en la defensa antioxidativa (Zheng y Guo, 1998).

Los antioxidantes son compuestos que retardan o previenen la oxidación de otras moléculas y su papel principal es terminar con las reacciones de oxidación e inhibir otras reacciones oxidándose ellos mismos. Con el fin de proteger a las membranas y organelos celulares de los efectos dañinos causados por las ERO, la planta posee mecanismos de defensa antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos distribuidos en los organelos celulares. Enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7), ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) son ejemplos de mecanismos enzimáticos; mientras que algunas moléculas de bajo peso molecular tales como: fenoles, ascorbato, glutatión, α -tocoferol y β -caroteno, pertenecen a los mecanismos no enzimáticos (Bowler *et al.*, 1994).

Introduction

As a result of the natural process of senescence, as well as different types of stress to which roses are subjected, during storage and transport, it presents an increase in reactive oxygen species (ERO) and a loss of antioxidant capacity occurs (Zimmermann and Zentgraf, 2004). ERO are highly noxious to the cell, since the reaction with lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids, these alter its structure and function and cause metabolic changes that lead to cell death (Sato *et al.*, 2001), which reduces quality, shelf life and market value of the Roses (Hodges *et al.*, 2004).

The vase life of roses (*Rosa hybrida* L.) is usually short (Ichimura *et al.*, 1999), to increase it, preservative solution of great commercial acceptance have been developed; the most effective in achieving this are those used at the consumer level (Ichimura *et al.*, 2006). In Carnation (*Dianthus caryophyllus*) and chrysanthemum (*Dendratema morifolium*) has been shown that the use of preserving solutions for short times, between 3 and 24 h with compounds that act as scavengers of free radicals reducing ERO levels and increasing the vase life (Baker *et al.*, 1977; Zheng and Guo, 1998), since it increases the levels of antioxidants and enzymes involved in antioxidant defense (Zheng and Guo, 1998).

Antioxidants are compounds that slow or prevent the oxidation of other molecules and its main role is to terminate the reactions and inhibit other oxidation reactions by oxidizing themselves. In order to protect cell membranes and organelles from the noxious effects caused by ERO, the plant possesses antioxidant defense mechanisms both enzymatic and non-enzymatic distributed in cellular organelles. Enzymes such as superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), Catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) are examples of enzyme mechanisms; While some molecules of low molecular weight such as phenols, ascorbate, glutathione, - tocopherol and β -carotene, are in the non-enzymatic mechanisms (Bowler *et al.*, 1994).

Los métodos analíticos utilizados para determinar los niveles de antioxidantes dependen de los tipos de compuestos de interés. Los antioxidantes pueden ser analizados ya sea como un grupo funcional, grupos de antioxidantes o como antioxidantes individuales. Como grupo funcional pueden ser cuantificados como la capacidad antioxidante total (caT) con cualquiera de los siguientes ensayos: ABTS (ácido 2, 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (2, 2'-Difenil-1-picrilhidrazilo), DMPD (dicloridrato de N, N-dimetilpifenilendiamina), FRAP (poder antioxidante de reducción ferrica), ORAc (capacidad de absorción de radicales oxígeno), TRAP (potencial antioxidante reactivo total), procedimientos quimioluminiscentes y ensayo antioxidante celular (Lako *et al.*, 2008), siendo los más usados el ácido 2, 2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico y el 2, 2'-Difenil-1-picrilhidrazilo (Kuskoski *et al.*, 2005).

Como grupo de antioxidantes, los principales ensayos incluyen la determinación del contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu y el contenido total de antocianinas por diferencia de pH y espectrofotometría. Mientras que técnicas como la cromatografía de gases, electroforesis capilar y cromatografía líquida con detección ultravioleta se utilizan para determinar los antioxidantes individuales en frutos, vegetales y otros extractos de plantas (Lako *et al.*, 2008).

En los últimos años se ha incrementado el interés en el campo de la nutrición, salud y medicina en los extractos crudos de frutas, vegetales, semillas, hojas, raíces y corteza ricos en fenoles debido a sus propiedades antioxidantes (Rice-Evans *et al.*, 1995; Kahkönen *et al.*, 1999; Picó, 2012). Sin embargo, en campos como la fisiología y tecnología poscosecha, y en particular las ornamentales, hay pocos estudios. De ahí que esta investigación tuvo por objetivos: evaluar el efecto de dos soluciones preservantes sobre la vida de florero, la capacidad antioxidante total y el contenido de fenoles totales; así como determinar la correlación entre el contenido de fenoles y la caT y entre los métodos ABTS y DPPH en pétalos y hojas de rosa.

Materiales y métodos

Material vegetal. Se cosecharon tallos florales de rosa 'Freedom' cultivadas en invernadero en Coatepec Harinas, Estado de México. Las flores se cortaron por la mañana entre las 7:00 y las 8:00 am, se les aplicó Floralife® 200 como solución pulso en la dosis que recomienda el producto. Se almacenaron en seco en la cámara fría para disminuir el calor

The analytical methods used to determine antioxidant levels depend on the types of compounds of interest. Antioxidants can be analyzed either as a functional group, antioxidants groups or as individual antioxidants. As functional group, these can be quantified as the total antioxidant capacity (caT) with any of the following assays: ABTS (2, 2'-azino-bis -3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazilo), DMPD (dicloridrato of N, N-dimethylphenilendiamina), FRAP (ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP (total reactive antioxidant potential), chemiluminescent procedures and cellular antioxidant assay (LAKO *et al.*, 2008), being widely used 2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid and 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Kuskoski *et al.*, 2005).

As a group of antioxidants, the main assay include the determination of total phenolic content by the Folin-Ciocalteu method and total anthocyanin content by pH difference and spectrophotometry. While techniques such as gas chromatography, capillary electrophoresis and HPLC with UV detection are used to determine the individual antioxidants in fruits, vegetables and other plant extract (Lako *et al.*, 2008).

In recent years the interest in the field of nutrition, health and medicine in crude extracts of fruits, vegetables, seeds, leaves, roots and bark rich in phenols, has been increasing due to its antioxidant properties (Rice-Evans *et al.*, 1995; Kahkönen *et al.*, 1999; Stang, 2012). However in areas such as physiology, and post-harvest technology, and particularly ornamental, there are few studies. Hence, this research had the following objectives: to evaluate the effect of two preservative solutions on vase life, total antioxidant capacity and total phenolic content; determine the correlation between phenols content and caT and between the ABTS and DPPH methods in rose petals and leaves.

Materials and methods

Plant material: stem roses 'Freedom' grown in greenhouse of Coatepec Harinas, State of Mexico were harvested. The flowers were cut in the morning between 7:00 and 8:00 am and applied Floralife® 200 as a pulse solution at dose recommended by the product. Stored dry in the cold room to decrease the heat of the field and on the next day were taken

de campo y al día siguiente se trasladaron al laboratorio donde se cortaron a una longitud de $70 \text{ cm} \pm 1$, se defoliaron 20 cm en la base y se colocaron en agua ($\text{pH } 8.1$, $\text{CE } 0.28$ milimhos) por 2 h para hidratarlos.

Organización experimental: Se aplicaron dos preservantes como soluciones pulso por 24 h a temperatura ambiente ($24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$): a) citrato de 8-hidroxiquinoleina (HQC), un germicida efectivo utilizado en flores de corte (Reid, 2002), a 200 mg L^{-1} y b) Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag Floralife (CHRYSAL) el cual se preparó según las indicaciones del fabricante y adicionalmente se tuvo el testigo. Una vez aplicados los tratamientos a los tallos se les cortó un centímetro de la base y se colocaron individualmente en probetas graduadas de 250 mL conteniendo agua de la llave y se cambió ésta cada tercer día. Se realizó un muestreo destructivo antes de aplicar los tratamientos y a los 3, 6, 9 y 11 días de aplicados éstos. Las muestras tanto de pétalos como de hojas se guardaron en bolsas de plástico a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis. Se midió la vida de florero, la caT y el contenido de fenoles totales.

Obtención del extracto. Los pétalos se liofilizaron. Las hojas se evaluaron al salir de congelación, se les eliminó el margen y la vena central y el resto se trituroó finamente. Se pesaron 0.05 g de hoja y 0.005 g de pétalo; en ambos casos se adicionaron 10 mL de una solución etanol: agua destilada al 70% , el extracto de hoja se homogeneizó con un homogeneizador IKAT-25^a y se utilizó inmediatamente, en tanto que el de pétalo se agitó con un agitador Vortex[®], se tapó con parafilm[®] y se dejó reposar por 18 h en refrigeración a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Se prepararon dos extractos: uno para evaluar la caT y otro para los fenoles totales.

Variables evaluadas

Vida de florero. Se contó a partir del día en que las flores se colocaron en probetas hasta que el $\geq 50\%$ de los tallos florales por tratamiento presentaron al menos uno de los siguientes síntomas de senescencia: 1) cabeceo, ruptura y/o ahorcamiento del tallo floral; 2) marchitamiento y caída de pétalos; y 3) abertura del botón floral excesiva o nula (González-Aguilar y Zavaleta-Mancera, 2012 y elaboración propia).

Contenido de fenoles totales. Se utilizó el método descrito por Waterman y Mole (1994). Se tomaron $300 \text{ } \mu\text{L}$ del sobrenadante del extracto, 7.7 mL de agua destilada, 0.5 mL de Folin-Ciocalteu, después de 1 min y antes de 8 min se agregaron 1.5 mL de carbonato de sodio al 20% , esta mezcla se agitó, se dejó reposar 2 h en oscuridad y se tomó la

to the laboratory where these were cut to a length of $70 \text{ cm} \pm 1.20 \text{ cm}$ were defoliated at the base and placed in water ($\text{pH } 8.1$, $\text{EC } 0.28$ millimhos) for 2 h to hydrate.

Experimental arrangement: two preservatives as pulse solutions were applied for 24 h at room temperature ($24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$): a) 8-hydroxyquinoline citrate (HQC), an effective germicide used in cut flowers (Reid, 2002), 200 mg L^{-1} and b) Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag Floralife (CHRYSAL) which was prepared according to the manufacturer's instructions and additionally the control. Once applied the treatments to the stems, were cut off one centimeter from the base and placed individually in a test tube of 250 mL , containing tap water and was changed every third day. Destructive sampling was made before applying the treatments and at 3, 6, 9 and 11 days after applying them. Samples from both petals and leaves were kept in plastic bags at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. Vase life, caT and total phenolic content were measured.

Preparation of extracts: The petals were lyophilized. The leaves were evaluated upon coming out from freezing, the margin and the central vein were removed, and the rest was finely grinded. 0.05 g of leaf and 0.005 g of petal were weighed; in both cases 10 mL of an ethanol solution were added: distilled water 70% , the leaf extract was homogenized with a homogenizer IKAT-25 and was used immediately, while the petal was stirred with a Vortex[®] stirrer, covered with Parafilm[®] and left to settle for 18 h under refrigeration at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Two extracts were prepared, one to evaluate caT and the other for total phenols.

Variables evaluated

Vase life. it started counting from the day when flowers were placed in test tubes until $\geq 50\%$ of flowering stems per treatment had at least one of the following symptoms of senescence: 1) pitch, breaking and hanging of flower stem; 2) wilting and petal fall; and 3) excessive or zero opening of flower bud (González-Aguilar and Zavaleta-Mancera, 2012 and own elaboratio).

Content of total phenols. the method described by Waterman and Mole (1994) was used. $300 \text{ } \mu\text{L}$ of extract supernatant, 7.7 mL of distilled water, 0.5 mL of Folin-Ciocalteu, after 1 minute and before 8 min were taken and added 1.5 mL of 20% sodium carbonate, at the mixture is stirred, allowed to settle for 2 h in the dark and the absorbance at 760 nm in a spectrophotometer (Spectronic Genesys[®] UV10) was

absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys® UV10). La cuantificación de los fenoles se realizó mediante una curva patrón de 20, 30, 40, 60 y 80 µg de ácido tánico. Los resultados se reportaron en mg de ácido tánico g⁻¹ de peso fresco (PF).

Capacidad antioxidante total. Se siguió la metodología descrita por Kuskoski *et al.* (2005), con modificaciones de Ozgen *et al.* (2006) y Thaipong *et al.* (2006). Éste método evalúa la actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+}) con el antioxidante presente en la muestra. El radical se obtuvo tras la reacción del ABTS^{•+} (7 mM) en buffer acetato de sodio 20 mM (pH 4.5) y persulfato de potasio (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (24±2 °C) y bajo oscuridad por 16 h y diluido en el mismo buffer hasta obtener una absorbancia de 0.70 (± 0.02) a 734 nm. La solución stock se mantiene estable a 4 °C por varias semanas y la dilución hasta por 72 h (Ozgen *et al.*, 2006).

Para el ensayo se colocaron 100 µL del extracto diluido (1:5 con etanol agua 70:30) en tubos de fondo plano, se adicionaron 3900 µL del radical ABTS^{•+} diluido, se agitaron manualmente y se dejaron reposar 2 h en la oscuridad, ya que según Ozgen *et al.* (2006) un tiempo de reacción largo provee una mejor estimación que un corto usando cualquiera de los dos métodos. Se dispuso de una curva de calibración donde el antioxidante sintético de referencia Trolox 1500 µM en etanol al 70%, se ensayó a una concentración de 0, 150, 300, 450, 600 y 750 µM (Thaipong *et al.*, 2006) en las mismas condiciones (100 µL de Trolox en 3900 µL del radical ABTS^{•+}).

Para el método del DPPH se siguió la metodología citada por Kuskoski *et al.* (2005). Se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) el cual se reduce en presencia de antioxidantes manifestándose un cambio de color. De forma similar al ABTS, se colocaron 100 µL de la muestra sin diluir en tubos de fondo plano, se adicionaron 3 900 µL del radical DPPH 100µM diluido en etanol al 80%, se agitaron y se mantuvieron en oscuridad por 2 h. La solución stock del radical DPPH[•] se preparó diariamente. La curva de calibración se realizó usando Trolox 1500 µM como estándar a una concentración de 0, 300, 600, 900, 1200 y 1500 µM en etanol al 70% (Thaipong *et al.*, 2006), en las mismas condiciones (100 µL de Trolox en 3 900 µL del radical DPPH[•]). La concentración de DPPH[•] en el medio de reacción se calculó por regresión

medida. Fenoles cuantificación se hizo usando una curva estándar de 20, 30, 40, 60 y 80 µg de ácido tánico. Los resultados se reportan en mg de ácido tánico g⁻¹ de peso fresco (PF).

Total antioxidant capacity. the methodology described by Kuskoski *et al.* (2005) was followed, with modifications by Ozgen *et al.* (2006) and Thaipong *et al.* (2006). This method evaluates the Trolox antioxidant activity equivalent (TEAC), based on the reduction of green / blue color produced by the reaction of the acid radical 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) with the antioxidant present in the sample. The radical was obtained after the reaction of ABTS^{•+} (7 mM) in sodium acetate buffer 20 mM (pH 4.5) and potassium persulfate (2.45 mM final concentration) and incubated at room temperature (24 ± 2 °C) and in darkness for 16 h and diluted in the same buffer till obtain an absorbance of 0.70 (± 0.02) at 734 nm. Stock solution is stable at 4 °C for several weeks and dilution for 72 h (Ozgen *et al.*, 2006).

For the assay 100 µL of diluted extract (1:5 with ethanol water 70:30) were placed in flat-bottomed tube, added 3 900 µL of the radical ABTS^{•+} diluted, stirred manually and allowed to settle for 2 h in the dark, according to Ozgen *et al.* (2006) a long reaction time provides a better estimate than a short time using any of the two methods. A calibration curve was used, where the synthetic antioxidant of reference Trolox 1500 µM in 70% ethanol, tested at a concentration of 0, 150, 300, 450, 600 and 750 µM (Thaipong *et al.*, 2006) in the same conditions (100 µL of Trolox in 3900 µL of radical ABTS^{•+}).

For the DPPH method followed the methodology cited by Kuskoski *et al.* (2005). Is based on reducing the absorbance measured at 515 nm of the radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) which is reduced in the presence of antioxidants manifesting a change in color. In a similar way to ABTS, 100 µL of the undiluted sample were placed in flat-bottom tubes, added 3 900 µL of the radical DPPH, 100µM diluted in 80% ethanol, stirred and kept in darkness for 2 h. The stock solution of radical DPPH[•] was prepared daily. The calibration curve was performed using 1500 µM Trolox as standard at a concentration of 0, 300, 600, 900, 1 200 and 1 500 µM in 70% ethanol (Thaipong *et al.*, 2006), under the same conditions (100 µL of Trolox in 3 900 µL of radical DPPH[•]). The concentration of DPPH[•] in the reaction was calculated by linear regression of the absorbance (nm) and the percentage of inhibition (%), since the reading of DPPH[•] recently prepared varies ± 40 nm. For

lineal entre la absorbancia (nm) y el porcentaje de inhibición (%) ya que la lectura del radical DPPH recién preparado varía ± 40 nm. Para ambos métodos, los resultados se expresaron como actividad antioxidante equivalentes de Trolox (TEAC) en mM de equivalentes de Trolox g^{-1} de peso fresco.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental estuvo representada por un tallo floral contenido en una probeta. Para el análisis bioquímico cada muestra se evaluó por cuatuplicado. El análisis de varianza se hizo con el paquete estadístico SAS versión 9, y la comparación de medias con la prueba Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r) se realizaron correlaciones simples del contenido de fenoles totales contra la capacidad antioxidante total medida por los ensayos ABTS y DPPH y entre ellos.

Resultados y discusión

Vida de florero. La vida de florero de los tallos florales tratados con HQC y Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag, fue de 11 y 13 días respectivamente; mientras que la del testigo fue de 9 días (Figura 1). Esto coincide con los resultados de Lukaszewska (1997) y Juárez *et al.* (2008), quienes demostraron la efectividad para mantener por más tiempo la vida de florero del HQC 200 mg L^{-1} en *Nerine bowdiana* y del Chrysal RVB[®] en rosa 'Black magic', respectivamente.

both methods, results are expressed as Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) in Trolox equivalents mM g^{-1} of fresh weight.

Experimental design: a completely randomized design with four replications was used; the experimental unit was represented by flower stem contained in a test tube. For the biochemical analysis of each sample was evaluated in quadruplicate. The analysis of variance was done with the statistical package SAS version 9 and the comparison of means with Tukey test ($\alpha \leq 0.05$). Using the Pearson correlation coefficient (r), simple correlations of total phenolic content against total antioxidant capacity measured by ABTS and DPPH assays were made among them.

Results and discussion

Vase life: the vase life of flower stems treated with HQC and Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag was 11 and 13 days, respectively; while control was 9 days (Figure 1). This coincides with the results of Lukaszewska (1997) and Juárez *et al.* (2008), who demonstrated the effectiveness to keep longer vase life of HQC 200 mg L^{-1} in *Nerine bowdiana* and Chrysal RVB[®] in rose 'Black magic', respectively.

Total antioxidant capacity and total phenolic content. As result of the application of the preservative solution was obtained a higher total antioxidant capacity and total

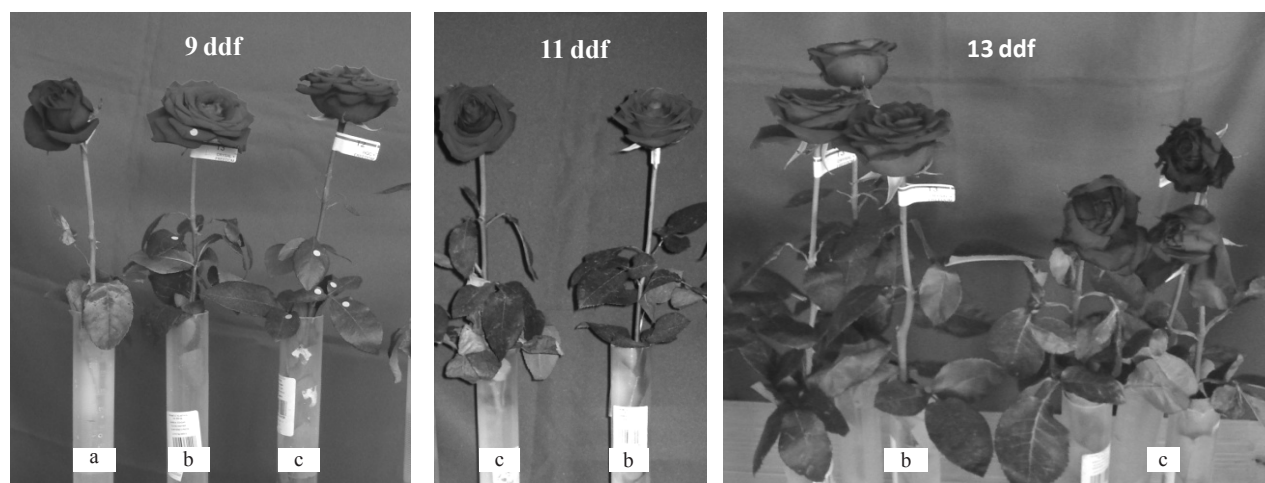


Figura 1. Tallos florales de rosa tratados con: a) agua; b) Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag; y c) citrato de 8-hidroxiquinoleína (HQC) a los 9, 11 y 13 días de florero (ddf).

Figure 1. Flowering stems of roses treated with: a) water; b) Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag; and c) citrate 8-hydroxyquinoline (HQC) at 9, 11 and 13 days of vase life (ddf).

Capacidad antioxidante total y contenido de fenoles Totales. Como resultado de la aplicación de las soluciones preservantes se obtuvo mayor capacidad antioxidante total y contenido de fenoles totales en hojas, pero no en pétalo ($\alpha \leq 0.05$), lo anterior se explica debido a que el deterioro de las hojas es más lento y puede ser revertido, como ocurre con la aplicación de algunos preservantes, mientras que la senescencia en pétalos es rápida e irreversible (Arora, 2008). Las hojas de los tallos tratados con Chrysal CLEAR Professional 2® T-bag presentaron mayor caT medida por ambos métodos y mayor contenido de fenoles totales que el testigo todos los días de medición, mientras que los tratados con HQC únicamente el día 6, pero igual al CHRYSAL (Cuadro 1).

phenolic content in leaves, but not in petal ($\alpha \leq 0.05$), the above was due to the deterioration of leaves is slower and can be reversed, as occurs with the application of some preservatives, while petal senescence is fast and irreversibly (Arora, 2008). The leaves from stems treated with Chrysal CLEAR Professional 2® T-bag had higher caT measured by both methods and higher total phenolic content than the control all measurement days, while those treated with HQC only the 6th, but equal to CHRYSAL (Table 1).

At day 11, in which, there were only the stems treated with the preservative solutions, the highest content of phenols and caT were recorded in the treatment with CHRYSAL,

Cuadro 1. Capacidad antioxidante total (mM de equivalentes de Trolox g⁻¹ de PF) determinada por los métodos ABTS y DPPH y contenido de fenoles totales (mg de ácido tánico g⁻¹ de PF) de hoja y pétalo de rosa 'Freedom' a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.

Table 1. Total antioxidant capacity (mM Trolox equivalents g⁻¹ of PF) determined by the ABTS and DPPH methods and total phenolic content (mg of tannic acid g⁻¹ of PF) of leaf and rose petal 'Freedom' at 3, 6, 9 and 11 days of vase.

Ddf/Tratamiento	Hoja			Pétalo		
	ABTS	DPPH	Fenoles	ABTS	DPPH	Fenoles
Día 3						
CHRYSAL	2 988 a	2 150 a	21.2 a	6 538 a	4 749 a	45.1 a
HQC	1 801 b	1 342 b	16.1 b	6 422 a	4 716 a	42.9 a
Testigo	1 701 b	1 215 b	14.4 b	5 978 a	4 170 a	40.5 a
DMSH	663	331	3.4	1 670	1 246	11.7
Día 6						
CHRYSAL	4 395 a	2 736 a	32.2 a	5 631 a	4 099 a	34.1 a
HQC	3 178 a	2 253 a	29.2 a	5 623 a	3 971 a	33 a
Testigo	2 136 b	1 417 b	17.7 b	5 427 a	3 807 a	31.5 a
DMSH	1 201	706	8.8	1 973	1 370	11.9
Día 9						
CHRYSAL	3 819 a	2 973 a	31.1 a	5 365 a	4 122 a	35.2 a
HQC	3 090 ab	2 473 ab	25.51 ab	4 755 a	3 774 a	33.3 a
Testigo	2 340 b	1 800 a	19.8 b	4 606 a	3 306 a	31.6 a
DMSH	1 138	982	9.1239	1 322	1 008	12.7
Día 11						
CHRYSAL	4 346 a	2 422 a	22.3 a	8 748 a	5 610 a	54.6 a
HQC	3 406 b	1 880 b	19.1 b	5 345 a	4 075 a	42.6 a
DMSH	831	512	2.7	5 352	2 517	27.3

Valores con la misma letra en el sentido de las columnas son estadísticamente iguales, según Tukey ($p \leq 0.05$). Ddf= días de florero; HQC= citrato de 8-hidroxiquinoleína; CHRYSAL= Chrysal CLEAR Professional 2® T-bag Floralife; testigo= agua; DMSH= diferencia mínima significativa honesta; CV= coeficiente de correlación; ABTS= capacidad antioxidante total determinada con el radical 2, 2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺); DPPH= capacidad antioxidante total determinada con el radical radical 2, 2-difeni 1-1-picrilhidracilo (DPPH[•]).

Al día 11, en el cual solo quedaban los tallos tratados con las soluciones preservantes, el mayor contenido de fenoles y de caT se registró en el tratamiento con CHRYSAL, con diferencias significativas en hoja, aunque no en flor, a las vez

with significant differences in leaf; although not in flower, at the time that lasted 2 more days in vase than those treated with HQC. According to Howard *et al.* (2000), the content of phenolic compounds present in plants, is influenced by

que duraron 2 días más en florero que los tratados con HQC. Según Howard *et al.* (2000), el contenido de compuestos fenólicos presentes en los vegetales, está influenciado por el tipo de cultivar, las condiciones agronómicas, estado de madurez, así como el manejo y tratamientos poscosecha a los que son sometidos. González-Aguilar y Zavaleta-Mancera (2012), reportaron que la aplicación de CaCl_2 a la solución de florero de dos variedades de gerbera promovió la acumulación de fenoles y retrasó la senescencia.

De manera similar, en este estudio, se considera que un mayor contenido de fenoles y de la caT en las hojas de las rosas tratadas con las soluciones preservantes (Cuadro 1) pudo proteger las células del daño oxidativo, y retrasó la senescencia. Scandalios (2005), sugiere que un aumento en la síntesis de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, ascorbato, α -tocoferol, carotenoides y fenoles disminuyen los daños oxidativos ocasionados por las ERO lo que se cree retarda el proceso de senescencia. Los compuestos fenólicos contrarrestan el efecto de los radicales libres, ya que poseen un amplio espectro de actividad bioquímica como antioxidantes y secuestradores de éstos (Proestos *et al.*, 2005).

Correlación entre la capacidad antioxidante total y el contenido de fenoles totales. En el Cuadro 2, se observa una relación lineal positiva y significativa entre la caT obtenida por ambos ensayos (DPPH y ABTS) y el contenido de fenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu. El coeficiente de correlación (r) entre los fenoles y la caT medida con el ensayo ABTS fue de 0.87 y 0.85 y con el DPPH de 0.92 y 0.85 para hoja y pétalo, respectivamente. Dudonné *et al.* (2009), en un estudio en 30 especies diferentes de plantas, en las que se incluye *R. damasena*, encontraron entre la caT y el contenido de fenoles totales un r de 0.94 con DPPH y 0.97 con ABTS. Vinokur *et al.* (2006), también reportaron una correlación positiva y significativa de 0.79 con DPPH en 12 cultivares de rosa y Youwei y Younghong (2007) de 0.96 con ABTS en *R. rugosa*. Los compuestos fenólicos son considerados el principal grupo fitoquímico que contribuye a la actividad antioxidante de las plantas (Balasundram *et al.*, 2006), esto explica la relación lineal positiva y significativa entre el contenido de fenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu y la caT obtenida por los ensayos DPPH y ABTS encontrada en este experimento (Cuadro 2).

Dicha relación no fue completamente lineal ya que el método de Folin-Ciocalteu es específico para compuestos fenólicos, y la actividad antioxidante también puede ser exhibida por compuestos no fenólicos (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

the type of cultivar, agronomic conditions, stage of maturity, as well as management and postharvest treatments to which they are subjected. González-Aguilar and Zavaleta-Mancera (2012) reported that the application of CaCl_2 to the vase solution of two varieties of gerbera promoted the accumulation of phenols and delayed senescence.

Similarly, in this study, it is considered that a higher content of phenols and caT in the leaves of roses treated with the preservative solution (Table 1) could protect cells from oxidative damage, and delayed senescence. Scandalios (2005) suggests that an increase in the synthesis of non-enzymatic antioxidants such as glutathione, ascorbate, α -tocopherol, carotenoids and phenols reduce oxidative damage from ERO, that is believed to retard the process of senescence. Phenolic compounds counteract the effect of free radicals, since they have a wide spectrum of biochemical activity as antioxidants and sequestrants of these (Kuskoski *et al.*, 2005).

Correlation between total antioxidant capacity and total phenolic content: in Table 2, shows a positive linear relationship and significant between the caT obtained by both assays (DPPH and ABTS) and total phenolic content determined by the Folin-Ciocalteu. The correlation coefficient (r) between phenols and caT measured with ABTS assay was 0.87 and 0.85, and with DPPH 0.92 and 0.85 for leaf and petal, respectively. Dudonné *et al.* (2009), in a study of 30 different plant species, which includes *R. damasena*, found between the caT and total phenolic content an r of 0.94 with DPPH and 0.97 with ABTS. Vinokur *et al.* (2006) also reported a significant and positive correlation of 0.79 with DPPH in 12 rose cultivars and Youwei and Younghong (2007) of 0.96 with ABTS in *R. rugosa*. Phenolic compounds are considered the main phytochemical group that contributes to the antioxidant activity of plants (Balasundram *et al.*, 2006) this explains the significant and positive linear relationship between total phenolic content determined by the Folin-Ciocalteu and caT obtained by DPPH and ABTS assays found in this experiment (Table 2).

This relationship was not completely linear because the Folin-Ciocalteu method is specific for phenolics compounds and the antioxidant activity, also can be exhibited by non-phenolic compounds (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006). Furthermore it is possible that antagonists or synergistic interactions between phenolic and other metabolites that may affect activity can occur (Odabasoglu *et al.*, 2005).

Además es posible que se presenten interacciones antagonistas o sinergistas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos que pueden afectar la actividad (Odabasoglu *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Coeficientes de correlación lineal entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante total determinada por los métodos DPPH y ABTS en hojas y pétalos de rosa 'Freedom' tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.

Table 2. Linear correlations coefficients between total phenolic content and total antioxidant capacity determined by DPPH and ABTS methods in leaves and rose petals 'Freedom' treated with two preservative solutions at 3, 6, 9 and 11 days vase.

Correlación	Días de florero				
	3	6	9	11	Total
ABTS y fenoles					
Hoja	0.87*	0.93**	0.93**	0.97*	0.87**
Pétalo	0.93**	0.84*	0.96**	0.94*	0.85**
DPPH y fenoles					
Hoja	0.90**	0.95**	0.91**	0.93*	0.92**
Pétalo	0.87*	0.87*	0.93**	0.97*	0.85**

*, **= significativo ($p \leq 0,05$ y $0,01$, respectivamente). ABTS= capacidad antioxidante total determinada con el radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+}); DPPH= capacidad antioxidante total determinada con el radical radical 2, 2-difenil 1-1-picrilhidracilo (DPPH[•]).

Correlación entre los métodos DPPH y ABTS

A pesar de las diferencias metodológicas, los resultados obtenidos por ambos métodos permiten alcanzar conclusiones prácticamente similares (Kuskoski *et al.*, 2005). Las correlaciones obtenidas por regresión lineal entre ambos ensayos (ABTS y DPPH) fueron altamente significativas en los cuatro días de medición: 0.91 en hoja y 0.93 en pétalo (Cuadro 3). Dudonné *et al.* (2009), en extractos acuosos de 30 plantas, al correlacionar ambos métodos encontraron resultados similares ($r=0.91$). Lo cual indica que la capacidad antioxidante total de extractos de *Rosa sp.*, puede medirse indistintamente con cualquiera de estos ensayos.

Dichos métodos se correlacionan entre si ya que se basan en una de las estrategias más aplicadas en la medida *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, la cual consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, por lo que el cambio de la intensidad del color ocurre de forma proporcional con la concentración de antioxidantes de la muestra (Kuskoski *et al.* (2005).

Correlation between DPPH and ABTS methods

Despite methodological differences, the results obtained by both methods allow to reach similar conclusions (Kuskoski *et al.*, 2005). The correlations obtained by linear regression between both assays (ABTS and DPPH) were highly significant in the four days of measurement: 0.91 in leaf and 0.93 in petal (Table 3). Dudonné *et al.* (2009), in aqueous extracts of 30 plants, by correlating both methods found similar results ($r=0.91$). This indicates that the total antioxidant capacity of extracts from *Rosa sp.*, can be measured with either of these trials.

Such methods are correlated to one another, since are based on one of the most applied strategies *in vitro* measure of the total antioxidant capacity of a compound, mixture or food, which is to determine the antioxidant activity before chromogenic substances of radical nature, so that the change of color intensity occurs in proportion to the concentration of antioxidants in the sample (Kuskoski *et al.* (2005).

Cuadro 3. Coeficientes de correlación lineal entre los ensayos ABTS y DPPH, en hojas y pétalos de rosa 'Freedom' tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.

Table 3. Linear correlation coefficients between ABTS and DPPH assays, in leaves and rose petals 'Freedom' treated with two preservative solutions at 3, 6, 9 and 11 days of vase.

	Días de florero				
	3	6	9	11	Total
Hoja					
ABTS Y DPPH	0.98**	0.97**	0.90**	0.98**	0.91**
Pétalo					
ABTS Y DPPH	0.93**	0.93**	0.91**	0.97*	0.93**

*, **= significativo ($p \leq 0.05$ y $0,01$, respectivamente). ABTS= capacidad antioxidante total determinada con el radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+}); DPPH= capacidad antioxidante total determinada con el radical radical 2,2-difenil 1-1-picrilhidracilo (DPPH[•]).

Conclusions

Floral stalks of rose treated with the preservative solutions to a consumer level had higher total phenolic content and total antioxidant capacity in leaves, which was reflected in the maintenance for longer vase life. Both in petal and leaf the total phenolic content and total antioxidant capacity

Conclusiones

Los tallos florales de rosa tratados con las soluciones preservantes a nivel consumidor tuvieron mayor contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante total en sus hojas, lo cual se reflejó en el mantenimiento por más tiempo de la vida de florero. Tanto en pétalo como en hoja el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante total, así como los ensayos DPPH y ABTS se correlacionaron positiva y significativamente, indicando que dichos ensayos pueden utilizarse independientemente como métodos analíticos para determinar niveles de antioxidantes.

Agradecimientos

Al ingeniero Anselmo Ángel Vázquez de la empresa Flores de Chiltepec SA de CV por su apoyo para la realización de este trabajo y aportación del material vegetal.

Literatura citada

- Arora, A. 2008. Biochemistry of flower senescence. *In*: Paliyath, G.; Murr, D.; Handa, A. K. and Lurie, S. (Eds.). Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers. Wiley-Blackwell Publishing. Nueva Delhi. 51-85 pp.
- Balasundram, N.; Sundram, K. and Sammar, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agroindustrial by products: Antioxidant activity. Occurrence and potential uses. *Food Chem.* 99(1):191-203
- Baker, J. E.; Wang, C. Y.; Liberman, M. and Hardenburg, R. E. 1977. Delay of senescence in carnations by a rhizobitoxine analogue and sodium benzoate. *HortScience.* 12:38-39.
- Bowler, C.; Van Camp, W.; Van Montagu, M. and Inzé, D. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13(3):199-218.
- Dudonné, S. X.; Vitarc, P.; Coutière, Woillez, M. and Mérillon, J. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* 57:1768-1774.
- González-Aguilar, S. y Zavaleta-Mancera, H. A. 2012. El CaCl₂ en la vida florero de gerbera: pigmentos, fenoles, lignina y anatomía del escape. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3(3):539-551.
- Hodges, D. M.; Lester, G. E.; Munro, K. M. and Toivonen, P. M. A. 2004. Oxidative stress. Importance for postharvest quality. *HortScience.* 39:924-929.
- Howard, L. R.; Talcott, S. T.; Brenes, C. H. and Villalon, B. 2000. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* Species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48(5):1713-1720.
- and the DPPH and ABTS assays were positively and significantly correlated, indicating that such assays can be used independently as analytical methods to determine antioxidant levels.

End of the English version



- Ichimura, K.; Taguchi, M. and Norikoshi, R. 2006. Extension of the vase life in cut roses by treatment with glucose, isothiazolinonic germicide, citric acid and aluminum sulphate solution. *Jpn. Agr. Res. Q.* 40:263-269.
- Ichimura, K.; Kojima, K. and Goto, R. 1999. Effects of temperature, 8-hydroxyquinoline sulphate and sucrose on the vase life of cut rose flowers. *Netherlands. Postharv. Biol. Technol.* 15:33-40.
- Juárez, H. P.; Colinas, L. M. T.; Valdez, A. L. A.; Espinosa, F. A.; Castro, B. R. y Cano, G. G. V. 2008. Soluciones y refrigeración para alargar la vida poscosecha de rosa cv. "Black magic". *Rev. Fitotec. Mex.* 31(3):73-77.
- Kahkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S. and Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agri. Food Chem.* 47:3954-3962.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A.; MMancini-Filho, J. y Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25(4):726-732.
- Lako, J.; Trenerry, V. C. and Rochfort, S. 2008. Routine analytical methods for use in South Pacific regional laboratories for determining naturally occurring antioxidants in food. *Int. Food Res. J.* 15(3):1-11.
- Liangxiong, X.; Youwei, Z.; Gang, L. and Yonghong, P. 2005. The antioxidant activities and their relationship with the relative polyphenols and flavonols contents of several flowers extracts. *Chin. Wild Plant Res.* 24:51-54.
- Lukaszewska A., J. 1997. Improving keeping qualities of Nerine cut flowers with preservatives. *Acta Hort.* 430:439-445.
- MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G. and Garg, M. L. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci. Food Agric.* 86(13):2046-2056.
- Odabasoglu, F.; Aslan, A.; Cakir, A.; Suleyman, H.; Karagoz, Y. and Bayir, Y. 2005. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia.* 76 (2):216-219.
- Ozgen, M.; Reese, R. N.; Tulio, A. Z.; Miller, A. R. and Scheerens, J. C. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.* 54:1151-1157.
- Picó, Y. 2012. Chemical analysis of food. Techniques and applications. Elsevier, Inc. London. 539-573 pp.
- Proestos, C.; Chorianopoulos, N.; Nychas, G. J. E. and Komaitis, M. 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agri. Food Chem.* 53:1190-1195.

- Reid, M. S. 2002. Postharvest handling systems: ornamental crops. *In: postharvest technology of horticultural crops*. University of California Agriculture and Natural Resources. Publication 3311. 345-358 pp.
- Sato, Y.; Murakami, T.; Funatsuki, H.; Matsuba, S.; Saruyama, H. and Tanida, M. 2001. Heat shock mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *J. Exp. Bot.* 52:1-7.
- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Medical Biol. Res.* 38:995-1014.
- Thaipong, K.; Boonprakoba, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L. and Hawkins, B. D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. An.* 19:669-675.
- Vinokur, Y.; Rodov, V.; Reznick, N.; Goldman, G.; Horev, B.; Umiel, N. and Friedman, H. 2006. Rose petal tea as an antioxidant-rich beverage: cultivar effects. *J. Food Sci.* 71(1):S42-S47.
- Waterman, P. G. and Mole, S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell. Cientific Publicatons, Oxford. 238 p.
- Youwei, Z. and Yonghong, P. 2007. Changes in antioxidant activity in *Rosa rugosa* flowers at different stages of development. *J. Crop Hort.* 35(4):397-401.
- Zheng, L. and Guo, W. 1998. Effects of cold dry storage on qualities of cut chrysanthemum flower. *Adv. Hortic.* 2:705-710.
- Zimmermann, P. and Zentgraf, U. 2004. Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Blattseneszenz w_hrend der Entwicklung von Pflanzen. *Gesunde Pflanz.* 5 6:208-217.