

Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante y los efectos sinérgicos entre vitamina C, ácidos fenólicos y flavonoides mediante FRAP

In vitro evaluation of antioxidant activity and synergistic effects between vitamin C, phenolic acids and flavonoids using FRAP

Henry GUIJA-GUERRA, Emilio GUIJA-POMA, Ana Lucía TÁCUNA CALDERÓN

Universidad de San Martín de Porres. Facultad de Medicina Humana. Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Lima – Perú.

Recibido: 29/octubre/2025. Aceptado: 8/diciembre/2025.

RESUMEN

Introducción: Los antioxidantes son compuestos que tienen la propiedad impedir el efecto nocivo que ejercen los radicales libres en el ser humano, estas propiedades antioxidantes son dependientes de las interacciones que pudiesen ocurrir cuando se combinan dos o tres de estas sustancias.

Objetivo: El objetivo del presente estudio fue determinar el comportamiento antioxidante de las combinaciones de ácidos fenólicos y flavonoides en presencia y ausencia de vitamina C.

Materiales y métodos: El presente estudio es de tipo *in vitro* analítico, experimental y de corte transversal. Se utilizaron soluciones metanólicas 100 μ M de ácido gálico, ácido ferúlico, catequina y epicatequina, así mismo, la solución acuosa 100 μ M de vitamina C. Para la evaluación de la actividad antioxidante se prepararon combinaciones binarias y ternarias de ácidos fenólicos (100 μ M) y flavonoides (100 μ M) en ausencia y presencia de tres concentraciones de vitamina C: 100, 200 y 300 μ M. La actividad antioxidante se evaluó utilizando la técnica FRAP y los resultados se expresan como nmoles de Fe^{2+} liberados. Se consideró efecto sinérgico cuando la actividad antioxidante experimental era mayor que la actividad antioxidante calculada teóricamente, expresada

como nmoles de Fe^{2+} liberados. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en tres días diferentes.

Resultados: Las combinaciones binarias y ternarias en las que estuvo presente el ácido gálico fueron las que mostraron mayor actividad antioxidante y mayor efecto sinérgico; en ausencia de vitamina C la combinación binaria ácido gálico (100 μ M) y catequina (100 μ M) liberó + 5,51 nmoles de Fe^{2+} , pero en presencia de vitamina C (100 μ M) se incrementó a + 6,73 nmoles de Fe^{2+} , mientras que en la combinación ternaria ácido ferúlico (100 μ M), catequina (100 μ M) y ácido gálico (100 μ M) la liberación de Fe^{2+} fue + 2,41 nmoles, mientras que en presencia de vitamina C (200 μ M) se incrementó a + 6,92 nmoles de Fe^{2+} liberado.

Conclusiones: La vitamina C modificó muy discretamente la actividad antioxidante de los fenoles ácidos y flavonoides, así como, de las combinaciones binarias y ternarias de estos compuestos. La combinación binaria integrada por ácido gálico y catequina fue la que mostró el mayor efecto sinérgico, que se incrementó adicionalmente con la presencia de ácido ascórbico.

PALABRAS CLAVE

Catequina, ácido gálico, radicales libres, antagonismo, fitoquímicos.

ABSTRACT

Introduction: Antioxidants are compounds that have the ability to counteract the nocive effects of free radicals in the human body. These antioxidant properties depend on the in-

Correspondencia:
Henry Guija Guerra
hguijag@usmp.pe.

teractions that may occur when two or three of these substances are combined.

Objective: The aim of this study was to determine the antioxidant behavior of combinations of phenolic acids and flavonoids in the presence and absence of vitamin C.

Materials and methods: This study is an in vitro analytical, experimental, and cross-sectional study. Methanolic solutions of 100 μ M gallic acid, ferulic acid, catechin, and epicatechin, as well as an aqueous solution of vitamin C, were used. To evaluate antioxidant activity, binary and ternary combinations of phenolic acids (100 μ M) and flavonoids (100 μ M) were prepared in the absence and presence of three concentrations of vitamin C: 100, 200, and 300 μ M. Antioxidant activity was assessed using the FRAP technique, and the results are expressed as nmoles of Fe^{2+} released. A synergistic effect was considered present when the experimental antioxidant activity was greater than the theoretically calculated antioxidant activity, expressed as nmoles of Fe^{2+} released. All determinations were performed in triplicate on three different days.

Results: The binary and ternary combinations containing gallic acid showed the highest antioxidant activity and the greatest synergistic effect, while those without gallic acid generally exhibited antagonistic effects. The presence of vitamin C in the reaction medium had a slight effect on the antioxidant activity and greater synergistic effect; in the absence of vitamin C the binary combination gallic acid (100 μ M) and catechin (100 μ M) released + 5.51 nmoles of Fe^{2+} , but in the presence of vitamin C (100 μ M) it increased to + 6.73 nmoles of Fe^{2+} , while in the ternary combination ferulic acid (100 μ M), catechin (100 μ M) and gallic acid (100 μ M) the release of Fe^{2+} was + 2.41 nmoles, while in the presence of vitamin C (200 μ M) it increased to + 6.92 nmoles of Fe^{2+} released.

Conclusions: Vitamin C had a very slight effect on the antioxidant activity of the phenolic acids and flavonoids, as well as on the binary and ternary combinations of these compounds. The binary combination of gallic acid and catechin showed the greatest synergistic effect, which was further increased by the presence of ascorbic acid.

KEYWORDS

Catechin, gallic acid, free radicals, antagonism, phytochemicals.

INTRODUCCIÓN

Los flavonoides y ácidos fenólicos son compuestos de naturaleza orgánica ampliamente difundidos en la naturaleza¹⁻³, habiendo concitado la atención de su estudio por muchos investigadores debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Diversas investigaciones de tipo epidemiológico muestran que su ingesta podría tener efectos benéficos para

la salud. Se ha observado que un considerable número de enfermedades crónicas no transmisibles⁴⁻⁸ como, aterosclerosis, cáncer, diabetes mellitus, psoriasis etc., están estrechamente vinculadas con el estrés oxidativo, una condición caracterizada por que el ser humano no se encuentra en capacidad de bloquear eficientemente la acción dañina de los radicales libres.

Los radicales libres son moléculas que tienen uno o más electrones desapareados en su orbital externo, particularidad que los torna altamente reactivos y son capaces de oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, componentes muy importantes para que las células puedan realizar eficientemente sus funciones biológicas. El ser humano dispone de un sistema antioxidante cuya principal función es neutralizar la acción nociva de los radicales libres, este sistema de defensa está constituido por enzimas como el superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa, y compuestos no enzimáticos como el ácido úrico, glutatión, transferrina y eritrocupreína, pero no es adecuadamente eficiente para neutralizar los radicales libres, por cuyo motivo debe ingerir frutas y verduras^{9,10} que son una fuente considerable de compuestos antioxidantes cuyas estructuras son de diversa naturaleza ejerciendo su acción a través de diferentes mecanismos, algunos impiden que se generen los radicales libres, otros interrumpen la reacción en cadena de los radicales libres, así como, inhibiendo o activando vías de señalización celular¹¹⁻¹³.

Numerosos estudios epidemiológicos relacionan la ingesta de dietas ricas en frutas y verduras con la acción protectora que sus constituyentes que actúan previniendo diversas patologías^{7,8,12}, habiéndose adscrito esta acción benéfica a los compuestos con propiedades antioxidantes, entre los que se citan a la vitamina C, ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, tocoferoles, etc. Estos efectos se deberían a la acción concertada de varios compuestos antioxidantes, ya que ofrecen la posibilidad de que al tener estructuras diferentes también tendrían reactividad distinta y en consecuencia actuarían más eficientemente frente a los radicales libres.

Los ácidos fenólicos y especialmente los flavonoides constituyen un grupo de compuestos con propiedades antioxidantes que se encuentran estrechamente vinculados con la acción hipoglicemiante⁸, antibacteriana¹⁴, anticancerígena⁸, que lo ejercerían a través de sus propiedades antioxidantes, por cuyo motivo es importante estudiar los efectos que puedan mostrar las interacciones entre compuestos antioxidantes, así como, los efectos que puedan ejercer sobre medicamentos¹⁴, biomarcadores de inflamación¹⁵, microbiota intestinal¹⁶ o interacciones de compuestos fenólicos en frutas¹⁷, por cuyo motivo, el consumo de frutas, verduras y legumbres¹⁸ brinda la posibilidad de ingerir alimentos con elevado efecto antioxidante^{2,12,19}, actividad antibacterial²⁰ o prevenir enfermedades crónicas no transmisibles⁸. En tal sentido se ha observado que cuando se combinan compuestos antioxidantes ocurren resultados inesperados, ya que pueden producirse efectos aditivos, antagónicos o sinérgicos.

OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio consiste en investigar el comportamiento antioxidant de combinaciones binarias y ternarias de ácidos fenólicos y flavonoides en ausencia y presencia de vitamina C.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo *in vitro*, analítico, experimental y de corte transversal

Preparación de la solución de vitamina C

Diariamente se preparó la solución 0.1 mM de vitamina C con agua ultrapura inmediatamente antes de iniciar los experimentos, esta solución se colocó en tubos 16 x 100 mm con tapa rosca y se guardó en la refrigeradora, donde permaneció durante la ejecución del experimento.

Preparación de las soluciones de los compuestos antioxidantes

Los compuestos antioxidantes que se escogieron fueron dos flavonoides: catequina (CAT) y epicatequina (EPI) y dos ácidos fenólicos: ácido gálico (GAL) y ácido ferúlico (FER). Se prepararon soluciones metanólicas 0.1 mM de cada uno de los compuestos antioxidantes los que se guardaron en la congeladora a -12°C en tubos 16 x 100 mm con tapa rosca.

Determinación de la capacidad antioxidant.

Técnica FRAP

El fundamento de esta técnica¹⁷ reside en la reducción del complejo tripiridil triazina-férrica a su forma ferrosa que es de color azul. El reactivo FRAP se preparó midiendo 2,5 mL de una solución 10 mM de TPTZ [2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina] disuelta en HCl 40 mM, 2,5 mL de una solución acuosa 20 mM de cloruro férrico y 25 mL de tampón acetato 0,3 M a pH 3,6; este reactivo se preparó inmediatamente antes de realizar las determinaciones analíticas. Los tubos de ensayo se incubaron a 37°C durante 30 minutos, paralelamente se preparó un blanco que no contenía muestra. Se leyó la absorbancia a 593 nm en un espectrofotómetro Shimatzu de doble haz modelo UV-2550. Para realizar los cálculos se elaboró una curva de calibración utilizando diversas concentraciones de cloruro ferroso cuyo R^2 fue 0.9993. Los resultados se expresan como nmoles de Fe^{2+} liberado.

Cálculo de las acciones sinérgicas de los antioxidantes

Para realizar los cálculos de las acciones sinérgicas de las combinaciones de ácidos fenólicos, flavonoides y vitamina C se evaluaron las actividades antioxidantes con la técnica FRAP lo que constituyó el resultado experimental, mientras que la actividad antioxidant teórica de las diversas combinaciones

se realizó sumando las actividades antioxidantas individuales de cada integrante de las combinaciones y en caso que la actividad antioxidant experimental fuese mayor que la calculada teóricamente se consideró como efecto sinérgico y efecto antagónico en caso contrario.

Análisis estadístico

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como medias, la comparación se hizo mediante el *t* de Student pareada para cada reacción y el ajuste para descartar falsos positivos se hizo utilizando la Prueba de Benjamini-Hochberg. La diferencia entre las medias con un $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

RESULTADOS

Se evaluó la actividad antioxidant de las muestras utilizando la técnica FRAP habiéndose observado que el ácido gálico fue el que mostró la mayor capacidad antioxidant mientras que el ácido ferúlico exhibió el menor valor, pero si incluimos al ácido ascórbico, este compuesto tuvo una capacidad antioxidant notablemente menor que los compuestos previamente citados, conforme se observa en la tabla 1.

Las combinaciones de ácido ferúlico y tres concentraciones de ácido ascórbico mostraron un discreto efecto sinérgico que era dependiente de las concentraciones de ácido ascórbico, mientras que las combinaciones de catequina con ácido ascórbico no modificaron la actividad antioxidant correspondiendo este comportamiento prácticamente a una actividad de índole aditivo. El efecto que causó la combinación de ácido ascórbico y epicatequina permitió observar un efecto antagónico en las tres concentraciones de ácido ascórbico utilizadas, en cambio, las combinaciones de ácido ascórbico con ácido gálico no mostraron ninguna variación de la actividad antioxidant, es decir, la actividad antioxidant observada fue de tipo ligeramente sinérgico como se muestra en la tabla 1.

Cuando se evaluó la capacidad antioxidant de las combinaciones binarias de los cuatro compuestos motivo del presente estudio se observó que la combinación binaria integrada por ácido gálico-catequina fue la que mostró el más elevado efecto sinérgico siguiéndole en eficiencia la mixtura ácido gálico-epicatequina y aun ligeramente menor la combinación ácido gálico-ácido ferúlico, mientras que las combinaciones ácido ferúlico-catequina, ácido ferúlico-epicatequina y catequina-epicatequina mostraron valores ostensiblemente menores.

El ácido ascórbico tuvo un comportamiento caracterizado generalmente por disminuir el efecto sinérgico de aquellas combinaciones binarias integradas exclusivamente por los ácidos fenólicos y flavonoides. La presencia de ácido ascórbico en la combinación ácido ferúlico-epicatequina la tornó ligeramente antagónica, efecto que fue más evidente en la combinación binaria catequina-epicatequina, aún más noto-

Tabla 1. Valores FRAP de ácidos fenólicos, flavonoides y vitamina C. Combinaciones binarias con vitamina C

Combinaciones	Valor FRAP liberado (nmoles Fe ²⁺)	Valor FRAP teórico esperado (nmoles Fe ²⁺)	Diferencia	valor p (t test)	Relación
FER (100)	7,74				
GAL (100)	16,17				
CAT (100)	12,70				
EPI (100)	14,11				
ASC (100)	3,31				
ASC (200)	6,34				
ASC (300)	9,91				
CAT (100) + ASC (100)	15,76	16,01	-0,25	0,43179	No significativo
CAT (100) + ASC (200)	19,36	19,04	+0,32	0,04138	Sinergismo
CAT (100) + ASC (300)	22,59	22,61	-0,02	0,90015	No significativo
EPI (100) + ASC (100)	15,24	17,41	-2,17	0,00370	Antagonismo
EPI (100) + ASC (200)	18,92	20,45	-1,53	0,02479	Antagonismo
EPI (100) + ASC (300)	21,51	24,02	-2,51	0,00025	Antagonismo
FER (100) + ASC (100)	11,53	11,04	+0,49	0,04310	Sinergismo
FER (100) + ASC (200)	15,30	14,08	+1,22	0,00014	Sinergismo
FER (100) + ASC (300)	18,99	17,64	+1,34	0,00055	Sinergismo
GAL (100) + ASC (100)	19,40	19,48	-0,08	0,82897	No significativo
GAL (100) + ASC (200)	23,28	22,51	+0,77	0,00968	Sinergismo
GAL (100) + ASC (300)	27,49	26,08	+1,41	0,00020	Sinergismo

* FER = ácido ferúlico, GAL = ácido gálico, CAT = catequina, EPI = epicatequina, ASC = vitamina C, 100, 200 y 300 μ M.

ria cuando el ácido ascórbico estuvo presente en la combinación ácido gálico-epicatequina cuyo efecto sinérgico en ausencia de ácido ascórbico era de +5,46 descendió a +1,49, +1,55 y +0,95 en presencia de las tres concentraciones utilizadas de esta vitamina. La combinación sinérgica de ácido ferúlico-ácido gálico que era de +3,02 disminuyó con la concentración 100 μ M de vitamina C, pero se mantuvo el efecto sinérgico cuando se utilizó las otras concentraciones. Con respecto a la combinación binaria ácido gálico-catequina cuyo efecto sinérgico en ausencia de ácido ascórbico era de +5,51 se elevó ligeramente a +6,42 y 6,73 con las concentraciones 100 y 200 μ M de esta vitamina, pero descendió a +5,22 con la concentración 300 μ M. La única combinación binaria en que la presencia de ácido as-

cóbico produjo efecto sinérgico fue aquella conformada por ácido ferúlico-catequina conforme se muestra en la tabla 2.

La evaluación de la actividad antioxidante de las cuatro combinaciones integradas por los cuatro compuestos del presente estudio permitió observar que solamente aquellas en las que estuvo presente el ácido gálico mostraron la mayor actividad antioxidante correspondiendo el valor más elevado a la combinación ternaria integrada por ácido gálico-epicatequina-catequina, así mismo, estas combinaciones también mostraron una ligera acción sinérgica, en cambio, aquella combinación en la que no estuvo presente el ácido gálico (catequina-epicatequina-ácido ferúlico) mostró efecto antagonista conforme puede observarse en la tabla 3.

Tabla 2. Valores FRAP de combinaciones binarias de ácidos fenólicos, flavonoides en presencia y ausencia de vitamina C

Combinaciones	Valor FRAP liberado (nmoles Fe ²⁺)	Valor FRAP teórico esperado (nmoles Fe ²⁺)	Diferencia	valor p (t test)	Relación
CAT (100) + EPI (100)	26,23	26,81	-0,58	0,35057	No significativo
CAT (100) + EPI (100) + ASC (100)	27,40	30,11	-2,72	0,00000	Antagonismo
CAT (100) + EPI (100) + ASC (200)	30,31	33,15	-2,84	0,00000	Antagonismo
CAT (100) + EPI (100) + ASC (300)	32,91	36,72	-3,81	0,00000	Antagonismo
FER (100) + CAT (100)	20,72	20,44	+0,28	0,64777	No significativo
FER (100) + CAT (100) + ASC (100)	25,95	23,74	+2,20	0,02767	Sinergismo
FER (100) + CAT (100) + ASC (200)	29,63	26,78	+2,86	0,00575	Sinergismo
FER (100) + CAT (100) + ASC (300)	32,40	30,34	+2,05	0,10479	No significativo
FER (100) + EPI (100)	21,84	21,84	0,00	1,00000	No significativo
FER (100) + EPI (100) + ASC (100)	24,07	25,15	-1,08	0,00264	Antagonismo
FER (100) + EPI (100) + ASC (200)	28,24	28,18	+0,05	0,90152	No significativo
FER (100) + EPI (100) + ASC (300)	30,93	31,75	-0,82	0,09287	No significativo
FER (100) + GAL (100)	26,93	23,91	+3,02	0,02351	Sinergismo
FER (100) + GAL (100) + ASC (100)	29,15	27,21	+1,94	0,01060	Sinergismo
FER (100) + GAL (100) + ASC (200)	33,90	30,25	+3,66	0,00460	Sinergismo
FER (100) + GAL (100) + ASC (300)	36,88	33,81	+3,07	0,01697	Sinergismo
GAL (100) + CAT (100)	34,38	28,87	+5,51	0,00033	Sinergismo
GAL (100) + CAT (100) + ASC (100)	38,59	32,18	+6,42	0,00020	Sinergismo
GAL (100) + CAT (100) + ASC (200)	41,94	35,21	+6,73	0,00023	Sinergismo
GAL (100) + CAT (100) + ASC (300)	43,99	38,78	+5,22	0,00260	Sinergismo
GAL (100) + EPI (100)	35,73	30,28	+5,46	0,00041	Sinergismo
GAL (100) + EPI (100) + ASC (100)	35,08	33,58	+1,49	0,00055	Sinergismo
GAL (100) + EPI (100) + ASC (200)	38,17	36,62	+1,55	0,00014	Sinergismo
GAL (100) + EPI (100) + ASC (300)	41,13	40,19	+0,95	0,00015	Sinergismo

* FER = ácido ferúlico, GAL = ácido gálico, CAT = catequina, EPI = epicatequina, ASC = vitamina C, 100, 200 y 300 μ M.

El efecto que ejerció el ácido ascórbico sobre la combinación ternaria conformada por ácido gálico-ácido ferúlico-catequina, fue la que mostró el mayor efecto sinérgico de todas las combinaciones ternarias siendo este efecto de +6,92 correspondiendo a aquella en que el ácido ascórbico estuvo pre-

sente con una concentración 200 μ M, mientras que el efecto del ácido ascórbico sobre las combinaciones: ácido gálico-ácido ferúlico-epicatequina y ácido gálico-catequina-epicatequina mostraron un efecto sinérgico perceptiblemente menor, en cambio, la combinación ternaria integrada por ácido ferú-

Tabla 3. Valores FRAP de combinaciones ternarias de ácidos fenólicos, flavonoides en ausencia y presencia de vitamina C

Combinaciones	Valor FRAP liberado (nmoles Fe ²⁺)	Valor FRAP teórico esperado (nmoles Fe ²⁺)	Diferencia	valor p (t test)	Relación
CAT (100) + GAL (100) + EPI (100)	46,32	42,98	+3.34	0,00002	Sinergismo
CAT (100) + GAL (100) + EPI (100) + ASC (100)	48,62	46,28	+2.33	0,03414	Sinergismo
CAT (100) + GAL (100) + EPI (100) + ASC (200)	51,82	49,32	+2.50	0,05905	No significativo
CAT (100) + GAL (100) + EPI (100) + ASC (300)	55,22	52,89	+2.33	0,08097	No significativo
FER (100) + CAT (100) + EPI (100)	31,72	34,54	-2.83	0,00001	Antagonismo
FER (100) + CAT (100) + EPI (100) + ASC (100)	35,09	37,85	-2.76	0,03707	Antagonismo
FER (100) + CAT (100) + EPI (100) + ASC (200)	38,08	40,88	-2.80	0,02067	Antagonismo
FER (100) + CAT (100) + EPI (100) + ASC (300)	40,72	44,45	-3.73	0,00951	Antagonismo
FER (100) + CAT (100) + GAL (100)	39,02	36,61	+2.41	0,01447	Sinergismo
FER (100) + CAT (100) + GAL (100) + ASC (100)	45,37	39,91	+5.46	0,00019	Sinergismo
FER (100) + CAT (100) + GAL (100) + ASC (200)	49,86	42,95	+6.92	0,00015	Sinergismo
FER (100) + CAT (100) + GAL (100) + ASC (300)	52,54	46,51	+6.02	0,00040	Sinergismo
FER (100) + GAL (100) + EPI (100)	40,05	38,01	+2.04	0,00004	Sinergismo
FER (100) + GAL (100) + EPI (100) + ASC (100)	42,10	41,32	+0.77	0,30999	No significativo
FER (100) + GAL (100) + EPI (100) + ASC (200)	46,22	44,35	+1.87	0,00794	Sinergismo
FER (100) + GAL (100) + EPI (100) + ASC (300)	48,96	47,92	+1.04	0,25690	No significativo

* FER = ácido ferúlico, GAL = ácido gálico, CAT = catequina, EPI = epicatequina, ASC = vitamina C 100, 200 y 300 µM.

lico-catequina-epicatequina en presencia de las tres concentraciones de ácido ascórbico exhibió un ligero efecto antagonista conforme se observa en la tabla 3.

En la tabla 4 se muestran los ajustes falsos positivos de interacciones utilizando la Prueba Benjamini-Hochberg que corroboran los resultados que se han mostrado en el presente estudio y que permite adoptar una apropiada decisión sobre la naturaleza de las interacciones observadas.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha evaluado el efecto de la vitamina C sobre la actividad antioxidante de ácido ferúlico, ácido gálico, catequina y epicatequina, así como, de sus combinaciones binarias y ternarias. Los compuestos ácidos fenólicos y flavonoides son metabolitos secundarios de particular importancia para la salud humana^{12,21,22}, se encuentran presentes en frutas y verduras^{2,12,19,23}, por cuyo motivo, la naturaleza

de las combinaciones de estas sustancias pueden afectar las propiedades benéficas de estos alimentos.

Considerando la actividad antioxidante de cada uno de los compuestos antes citados, se observó que el ácido gálico tuvo la actividad más elevada que los otros compuestos, resultado que es análogo al hallado por otros autores²⁴ quienes también observaron que el ácido gálico tenía una actividad antioxidante similar al ácido rosmarínico y a la quercetina, y fue más elevada que el ácido cafeico, ácido clorogénico y rutina. En otro estudio²⁵ cuyo objetivo era investigar la interacción entre el resveratrol y otros compuestos fenólicos mostraron que el ácido gálico tenía una actividad mayor que la catequina, resultado que era similar al que hemos obtenido en el presente trabajo, así mismo, en el mencionado estudio se mostró además que la actividad antioxidante del ácido gálico era mayor que el ácido cafeico y resveratrol, pero algo menor que la quercetina.

Tabla 4. Ajuste de Falsos Positivos (FP) de Interacciones mediante Prueba Benjamini–Hochberg (BH)

Combinaciones	Decisión	FP (Prueba BH)	Resultado
CAT (100) + ASC (200)	Sinergismo	0,064249	No significativo
EPI (100) + ASC (100)	Antagonismo	0,009494	Evidencia sólida
EPI (100) + ASC (200)	Antagonismo	0,043014	Evidencia leve
EPI (100) + ASC (300)	Antagonismo	0,000967	Evidencia sólida
FER (100) + ASC (100)	Sinergismo	0,065210	No significativo
FER (100) + ASC (200)	Sinergismo	0,001023	Evidencia sólida
FER (100) + ASC (300)	Sinergismo	0,001637	Evidencia sólida
FER (100) + GAL (100)	Sinergismo	0,042033	Efecto aditivo
GAL (100) + ASC (200)	Sinergismo	0,020403	Efecto aditivo
GAL (100) + ASC (300)	Sinergismo	0,000894	Evidencia sólida
GAL (100) + CAT (100)	Sinergismo	0,001223	Evidencia sólida
GAL (100) + EPI (100)	Sinergismo	0,001335	Evidencia sólida
CAT (100) + EPI (100) + ASC (100)	Antagonismo	0,000001	Evidencia sólida
CAT (100) + EPI (100) + ASC (200)	Antagonismo	0,000004	Evidencia sólida
CAT (100) + EPI (100) + ASC (300)	Antagonismo	0,000003	Evidencia sólida
CAT (100) + GAL (100) + EPI (100)	Sinergismo	0,000219	Evidencia sólida
FER (100) + CAT (100) + ASC (100)	Sinergismo	0,046644	Efecto aditivo
FER (100) + CAT (100) + ASC (200)	Sinergismo	0,013575	Efecto aditivo
FER (100) + CAT (100) + EPI (100)	Antagonismo	0,000128	Evidencia sólida
FER (100) + CAT (100) + GAL (100)	Sinergismo	0,028460	Efecto aditivo
FER (100) + EPI (100) + ASC (100)	Antagonismo	0,007089	Evidencia sólida
FER (100) + GAL (100) + ASC (100)	Sinergismo	0,021563	Efecto aditivo
FER (100) + GAL (100) + ASC (200)	Sinergismo	0,011318	Efecto aditivo
FER (100) + GAL (100) + ASC (300)	Sinergismo	0,032297	Efecto aditivo
FER (100) + GAL (100) + EPI (100)	Sinergismo	0,000361	Evidencia sólida
GAL (100) + CAT (100) + ASC (100)	Sinergismo	0,000962	Evidencia sólida
GAL (100) + CAT (100) + ASC (200)	Sinergismo	0,000976	Evidencia sólida
GAL (100) + CAT (100) + ASC (300)	Sinergismo	0,007310	Evidencia sólida
GAL (100) + EPI (100) + ASC (100)	Sinergismo	0,001699	Evidencia sólida
GAL (100) + EPI (100) + ASC (200)	Sinergismo	0,001145	Evidencia sólida

* FER = ácido ferúlico, GAL = ácido gálico, CAT = catequina, EPI = epicatequina, ASC = vitamina C 100, 200 y 300 μ M.

Tabla 4 continuación. Ajuste de Falsos Positivos (FP) de Interacciones mediante Prueba Benjamini–Hochberg (BH)

Combinaciones	Decisión	FP (Prueba BH)	Resultado
GAL (100) + EPI (100) + ASC (300)	Sinergismo	0,000978	Evidencia sólida
CAT (100) + GAL (100) + EPI (100) + ASC (100)	Sinergismo	0,055948	No significativo
FER (100) + CAT (100) + EPI (100) + ASC (100)	Antagonismo	0,059115	No significativo
FER (100) + CAT (100) + EPI (100) + ASC (200)	Antagonismo	0,038117	Evidencia leve
FER (100) + CAT (100) + EPI (100) + ASC (300)	Antagonismo	0,020777	Evidencia leve
FER (100) + CAT (100) + GAL (100) + ASC (100)	Sinergismo	0,001030	Evidencia sólida
FER (100) + CAT (100) + GAL (100) + ASC (200)	Sinergismo	0,000901	Evidencia sólida
FER (100) + CAT (100) + GAL (100) + ASC (300)	Sinergismo	0,001402	Evidencia sólida
FER (100) + GAL (100) + EPI (100) + ASC (200)	Sinergismo	0,018029	Efecto aditivo

* FER = ácido ferúlico, GAL = ácido gálico, CAT = catequina, EPI = epicatequina, ASC = vitamina C 100, 200 y 300 µM.

La mixtura binaria integrada por ácidos fenólicos y flavonoides permitió mostrar que todas las combinaciones en las que estuvo presente el ácido gálico exhibieron efectos sinérgicos a diferencia de las otras combinaciones que exhibían efectos inclusive antagonicos; estos resultados son similares al mostrado por otros autores¹⁸ quienes utilizando combinaciones binarias con componentes diferentes a los que hemos utilizado tales como: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido rosmarínico, quercetina y rutina mostraron un notable efecto sinérgico siendo el más elevado aquel que estuvo constituido por ácido gálico y ácido cafeico.

En un estudio en que se evaluó mixturas binarias de resveratrol con otros compuestos fenólicos se pudo observar que utilizaron concentraciones 250 µM de ácido gálico, ácido cafeico, quercetina y catequina; la mixtura que mostró la mayor actividad antioxidante fue la integrada por resveratrol-quercetina, evaluada con la técnica FRAP, correspondiendo a la combinación resveratrol-ácido gálico la siguiente más elevada, pero el cálculo del índice de combinación permitió mostrar que la combinación catequina-resveratrol fue la única que exhibió efecto sinérgico, mientras que las otras combinaciones con resveratrol mostraron efectos antagonicos.

En una investigación sobre los efectos que ejerció el ácido ascórbico sobre los jugos de granada-nectarina y uva²⁶, así como, sobre las fracciones que fueron separadas de ambos jugos que estuvieron constituidas por compuestos fenólicos y antocianinas, permitió mostrar que la adición de ácido ascórbico en las concentraciones del 50, 100 y 200% de las recomendaciones diarias de esta vitamina a ambos jugos incrementó sus actividades antioxidantes evaluadas con las técnicas DPPH y FRAP; pero cuando se adicionó ácido ascórbico en las concentraciones antes mencionadas a la fracción

fenólica separada del jugo de uva se observó efectos que eran inversamente proporcional a la concentración de la vitamina C, ya que cuando se utilizó el 50 % de la recomendación diaria de esta vitamina mostró efecto sinérgico disminuyendo notablemente este efecto al utilizar el 100 % y se tornó antagonica cuando se utilizó el 200 % de la recomendación diaria de la vitamina C.

Con respecto a las mixturas ternarias en el presente estudio se pudo observar que solamente aquellas en las que estuvo presente el ácido gálico mostraron un ligero efecto sinérgico, mientras que en un estudio sobre los efectos antioxidantes sinérgicos de algunos compuestos flavonoides y fenólicos²⁴ se observó que de todas las combinaciones ternarias estudiadas las que mayores efectos sinérgicos mostraron fueron las combinaciones de ácido gálico 150 µM, quercetina 150 µM y ácido clorogénico 600 µM, y aquella conformada por ácido gálico 150 µM, quercetina 150 µM y rutina 150 µM.

La presencia de ácido ascórbico en la presente investigación afectó ligeramente la actividad antioxidante individual de los ácidos fenólicos y flavonoides, correspondiendo la combinación integrada por ácido ferúlico-ascorbato la que mostró un ligero efecto sinérgico; mientras que en un estudio sobre mixturas de antioxidantes polifenólicos como quercetina, ácido ferúlico y hesperetina con ácido ascórbico²⁷ los autores mostraron que la evaluación realizada con la técnica DPPH les permitió concluir que todas las combinaciones resultaron tener efecto antagonico.

En otra investigación sobre mixturas de flavonoides y ácido ascórbico los autores²⁸ realizaron el estudio evaluando la actividad antioxidante utilizando la técnica DPPH habiendo observado que las combinaciones conformadas por

quer cetina (3,8 μ M)-ascorbato (2,9 μ M) y la constituida por naringina (606 μ M) y ascorbato (2,9 μ M) fueron las únicas que exhibieron efecto sinérgico, mientras que el resto de flavonoides que se combinaron con ascorbato como la rutina, hesperetina, hesperidina, naringina chalcona, naringina dihidrochalcona y naringenina mostraron efecto antagonista.

Es probable que las combinaciones binarias en las que interviene el ácido ascórbico puedan explicarse admitiendo que estas interacciones sean dependientes del potencial de oxidación²⁹, es decir, el efecto sinérgico sería ocasionado por reacciones acopladas a la regeneración de un compuesto con mayor potencial de oxidación lo que se haría a expensas de otro con menor potencial de oxidación, a través de la transferencia de hidrógeno.

Es de considerable importancia la necesidad de explicar de una manera más precisa la naturaleza íntima de las interacciones que han sido descritas por diversos investigadores lo que permitirá realizar nuevas investigaciones y descubrir nuevas propiedades de los flavonoides y ácidos fenólicos.

CONCLUSIONES

El efecto que produjo el ácido ascórbico sobre los fenoles ácidos y flavonoides fue dependiente de la naturaleza de los fitoquímicos antes citados, habiendo producido los más elevados efectos sinérgicos en las combinaciones binarias y ternarias de los fenoles ácidos y flavonoides. El ácido gálico mostró la mayor actividad antioxidante que los otros compuestos fitoquímicos y en todas las combinaciones en que participó incrementó la capacidad antioxidante y elevó el efecto sinérgico, la presencia de ácido ascórbico incrementó adicionalmente dichos efectos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos las facilidades que nos brindó la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres para ejecutar el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cabral de Oliveira A, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova.* 2009;32(3): 689-702.
2. Reddy CVK, Sreeramulu D, Raghunath M. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International.* 2010;43: 285-288. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.006>
3. Sytařová I, Orsavová J, Snopka L, Mlčeka J, Byczyński L, Mišurcová L. Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times. *Food Chemistry.* 2020;310: 125784
4. Mohd Zain H, Abd Hamid MA, Yahaya N, Nik Mohamed Kamal NNS. Polyphenolic diversity in different ethanolic extract of Malaysian *Heterotrigona itama* propolis: Correlation with antioxidant and cytotoxic properties. *Pharmacological Research - Natural Products.* 2025-100371. <https://doi.org/10.1016/j.prenap.2025.100371>
5. Rana K, Gautam P. A Review on Antioxidants as Therapeutic in Use of Oxidative Stress and Neurodegenerative Disease. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance.* 2022;13(1):77-82. <https://www.researchgate.net/publication/360263926>
6. Godos J, Carota G, Caruso G, Micek A, Frias-Toral E, Giampieri F, et al. Molecular mechanisms underlying the neuroprotective effects of polyphenols: implications for cognitive function. *EXCLI Journal.* 2025; 24:1262-1294. <https://dx.doi.org/10.17179/excli2025-8779>
7. Carvalho F, Vargas A, Lahlou RA, Bárbara E, Santos I, Fonseca C, et al. Effects of Cherry Consumption on Metabolic Health: A Pilot Clinical Study on Healthy Adults. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 8891. <https://doi.org/10.3390/ijms26188891>
8. Picos-Salas MA, Cabanillas-Bojórquez LA, Leyva-López N, Elizalde-Romero CA, Bernal-Millán MJ, Contreras-Angulo LA et al. Flavanones: bioavailability and role in modulation of oxidative stress and inflammation in cancer, type-2 diabetes, and cardiovascular diseases. *Phytochem Rev* (2025). <https://doi.org/10.1007/s11101-025-10137-2>
9. Guija-Guerra H, Guija-Poma E. Radicales libres y sistema antioxidante. *Horiz Med (Lima)* 2023; 23(2): e2158. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2023.v23n2.12>
10. Ifeanyi OE. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci.* 2018;4(2): 123-133. <http://dx.doi.org/10.22192/ijcrms.2018.04.02.019>
11. Long Y, Shi H, Ye J, Qi X. Exploring Strategies to Prevent and Treat Ovarian Cancer in Terms of Oxidative Stress and Antioxidants. *Antioxidants* 2025; 14, 114. <https://doi.org/10.3390/antiox14010114>
12. Vierci GE, Ferro EA. Capacidad antioxidante total vinculada a la ingesta de frutas y verduras en adultos jóvenes de Asunción, Paraguay. *Nutr Hosp* 2019;36(1):118-124. <http://dx.doi.org/10.20960/nh.02074>
13. Ansari WA, Srivastava K, Nasibullah M, Khan MF. Reactive oxygen species (ROS): sources, generation, disease pathophysiology, and antioxidants. *Discov. Chem.* 2025; 2:191. <https://doi.org/10.1007/s44371-025-00275-z>
14. Hossain A, Park HC, Park SW, Park SC, Seo MG, Her M, et al. Synergism of the Combination of Traditional Antibiotics and Novel Phenolic Compounds against *Escherichia coli*. *Pathogens.* 2020; 9: 811. doi:10.3390/pathogens9100811
15. López González LA, González Correa CH, Astudillo Muñoz EY, Jaramillo López MF. Efecto del consumo de polifenoles sobre biomarcadores de inflamación y endotoxemia en personas con obesidad: una revisión sistemática. *Nutr Clín Diet Hosp.* 2025; 45(1): 157-167. DOI: 10.12873/451lopez
16. Aliyah R, Daud NA, AS'AD S, Marita M, Rasyid H, Bukhari A, Aminuddin. Effect of extra virgin olive oil on inflammatory markers

- and intestinal microbiota in chronic kidney disease patients. *Nutr Clín Diet Hosp.* 2024; 44(3):244-252. DOI: 10.12873/443aliyah
17. Freeman BL, Eggett DL, Parker TL. Synergistic and Antagonistic Interactions of Phenolic Compounds Found in Navel Oranges. *Journal of Food Science.* 2010; 75(6): C570-6. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01717.x
 18. Vera V, Crovetto M, Valladares M, Oñate G, Fernández M, Espinoza V, et al. Consumo de frutas, verduras y legumbres en universitarios chilenos. *Rev Chil Nutr* 2019; 46(4): 436-442. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000400436>
 19. Guija Guerra H, Troncoso Corzo L, Guija Poma E. Actividad antioxidante del fruto de *Rubus sparsiflorus* (Shiraca). *Nutr Clín Diet Hosp.* 2023; 43(1):56-63. DOI: 10.12873/431guija
 20. Prakasa S, Srinivasan V, Packiaraj G. HPLC analysis, phytochemical screening, in-vitro antioxidant and antibacterial activity of *Annona muricata* L. fruit extracts. *Trends Phytochem. Res.* 2023; 7(2): 117-126. <https://doi.org/10.30495/tpr.2023.1984564.1335>
 21. Castro-Alatorre NC, Jiménez-Martínez C, Girón-Calle J, Garzón AG, Drago SR, Vioque J. Polyphenol profile and associated antioxidant, antiproliferative and anti-inflammatory activities of Mexican *Opuntia* fruits. *Food Bioscience* 2025;73:107577. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107577>
 22. Kenner J. Food Polyphenols as Preventive Medicine. *Antioxidants.* 2023;12:2103. <https://doi.org/10.3390/antiox12122103>
 23. Guija Guerra H, Troncoso Corzo L, Guija Poma E. Interacción entre el ion cúprico y el fruto del camu camu (*Myrciaria dubia*): Generación de radicales libres. (*Nutr Clín Diet Hosp.* 2025; 45(1):241-249).
 24. Hajimehdipoor H, Shahrestani R, Shekarchi M. Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research Journal of Pharmacognosy* 2014;1(3): 35-40.
 25. Skroza D, Mekinic' IG, Svilovic' S, Simat V, Katalinic V. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2015;38:13-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.06.013>
 26. Bolling BW, Chen Y, Oliver Chen C-Y. Contributions of phenolics and added vitamin C to the antioxidant capacity of pomegranate and grape juices: synergism and antagonism among constituents. *International Journal of Food Science and Technology* 2013;48: 2650-2658. doi:10.1111/ijfs.12261
 27. Aoun M, Makris DP. Binary mixtures of natural polyphenolic antioxidants with ascorbic acid: impact of interactions on the anti-radical activity. *International Food Research Journal* 2012;19(2): 603-606.
 28. González EA, Nazareno MA. Antiradical action of flavonoid-ascorbate mixtures. *Food Science and Technology* 2011;44:558-564. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.017>
 29. Peyrat-Maillard MN, Cuvelier ME, Berset C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists Society* 2003;80: 1007-1012. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0812-z>