



Capacidad antioxidante *in vitro* del liofilizado de la pulpa y cáscara del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* (jengibre)

Jhony Diaz-Flores¹, Roberto O. Ybañez-Julca¹, Daniel Asunción-Alvarez¹, Iván M. Quispe-Díaz¹, Percy Asmat-Marrufu²

Información del artículo

Historia del artículo

Recibido: 28/11/2019
Aprobado: 06/12/2019

Autor corresponsal

Roberto O. Ybañez-Julca
rybanez@unitru.edu.pe

Financiamiento

Autofinanciado

Conflictos de interés

Ninguno

Citar como

Diaz - Flores J, Ybañez-Julca RO, Asunción-Alvarez D, Quispe-Díaz IM, Asmat-Marrufu P. Capacidad antioxidante *in vitro* del liofilizado de la pulpa y cáscara del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* (jengibre). Rev Peru Med Integrativa. 2019;4(4):121-6.

Resumen

Objetivo. Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* del liofilizado de la pulpa y cáscara del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* (jengibre) mediante los ensayos DPPH, FRAP y TBARS. **Materiales y métodos.** Se separó la pulpa y la cáscara de los rizomas de *Z. officinale*, se preparó un macerado con solución hidroalcohólica (70:30 EtOH:H₂O), y luego de rotaevaporar, se liofilizó. La capacidad antioxidante de los liofilizados se evaluó según porcentaje de inhibición del radical DPPH y el poder antioxidante de reducción férrica (FRAP), así como la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica *in vitro* mediante el ensayo TBARS. **Resultados.** Los extractos liofilizados de la pulpa y cáscara evidenciaron moderada capacidad antioxidante, siendo similar según porcentaje de inhibición del radical DPPH (46,5 y 45,6% respectivamente). Sin embargo, mediante el ensayo FRAP la cáscara presentó una capacidad antioxidante de 31,09 µg/mL expresados como equivalentes de trolox (ET) en comparación a la pulpa (22,96 µg ET/mL). Además, solo el liofilizado de cáscara del rizoma de *Z. officinale* a bajas concentraciones (0,1, 0,2 y 0,3 mg/mL) es capaz de reducir significativamente ($p < 0,01$) la peroxidación lipídica *in vitro*. **Conclusión.** La cáscara del rizoma de *Z. officinale* posee mayor capacidad antioxidante en comparación con la pulpa según los ensayos FRAP y TBARS; sin embargo, la inhibición de radicales DPPH fue la misma tanto en la cáscara como en la pulpa.

Palabras clave: Liofilización; Captador de radicales libres; Antioxidantes; Jengibre; TBARS (Fuente: DeCS).

In vitro antioxidant capacity of freeze dried pulp and peel of the rhizome of *Zingiber officinale Roscoe* (ginger)

Abstract

Objective. To evaluate the *in vitro* antioxidant capacity of the freeze-dried pulp and peel of the rhizomes of *Zingiber officinale Roscoe* (ginger) using the DPPH, FRAP and TBARS assays. **Materials and Methods.** The pulp and peel were separated from the rhizomes of *Z. officinale*, then a macerate was prepared with a hydroalcoholic solution (70:30 EtOH: H₂O), and after rotary evaporation, lyophilized. The antioxidant capacity of lyophilisates was evaluated according to the percentage of DPPH radical inhibition and the ferric reduction antioxidant power (FRAP), as well as the ability to inhibit lipid peroxidation *in vitro* using the TBARS assay. **Results.** Freeze-dried pulp and peel extracts showed moderate antioxidant capacity, being similar according to the percentage of DPPH radical inhibition (46.5% and 45.6% respectively). However, utilizing the FRAP assay, the peel presented an antioxidant capacity of 31.09 µg/mL expressed as Trolox Equivalents (ET) compared to the pulp (22.96 µg ET / mL). Also, only the freeze-dried peel of *Z. officinale* at low concentrations (0.1, 0.2 and 0.3 mg / mL) can significantly reduce $p < 0.01$ lipid peroxidation *in vitro*. **Conclusion.** The rhizome peel of *Z. officinale* has a higher antioxidant capacity compared to the pulp according to the FRAP and TBARS assays, however; DPPH radical inhibition was the same in both the peel and pulp.

Keywords: Freeze Drying; Free Radical Scavengers; Antioxidants; Ginger; TBARS (Source: MeSH).

¹ Laboratorio de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

² Laboratorio de Referencia Regional de La Libertad, Trujillo, Perú

Introducción

Un radical libre se define como cualquier especie atómica o molecular capaz de poseer existencia independiente, que contiene uno o más electrones no emparejados en uno de sus orbitales moleculares⁽¹⁾. Las especies reactivas se forman como productos del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células⁽²⁾.

Las especies de oxígeno reactivo (ROS) son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^*) entre otras, se generan endógenamente como en el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial, o pueden surgir de interacciones con fuentes exógenas tales como compuestos xenobióticos⁽³⁾. El estrés oxidativo se considera un desequilibrio entre las especies pro y antioxidantes, lo que resulta en daño molecular y celular. El estrés oxidativo cumple un papel crucial en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad^(4,5).

Por otro lado, los efectos negativos del estrés oxidativo pueden ser neutralizados por antioxidantes, los cuales son moléculas naturales o sintéticas que evitan una formación excesiva de ROS o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas y/o moléculas. La defensa antioxidante implica una variedad de estrategias, tanto enzimáticas, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, tioredoxina reductasa y glutatión peroxidasa (GPx), y no enzimáticas, que incluyen tocoferoles, carotenos, ascorbato, glutatión (GSH), ubiquinol y flavonoides⁽⁶⁾.

El nombre común «jengibre» representa la planta culinaria y medicinal *Zingiber officinale Roscoe* (Zingiberaceae) que tiene una rica historia de uso en todo el mundo. Todavía no se conoce el origen exacto del jengibre, pero el consenso general es que India o la selva tropical del sur de Asia es la verdadera región indígena de su origen⁽⁷⁾. De acuerdo con el reporte de producción mundial de jengibre del año 2016, Perú produjo 4479 toneladas posicionándose en el puesto 18 a nivel mundial⁽⁸⁾.

Estudios previos con *Zingiber officinale* demostraron que esta especie exhibía varios efectos benéficos, entre los que destaca como anticancerígeno⁽⁹⁻¹¹⁾, antiemético⁽¹²⁾, gastroprotector^(13,14), antibacteriano⁽¹⁵⁾, antiagregante plaquetario⁽¹⁶⁾, antihipertensivo⁽¹⁷⁾, entre otros importantes efectos.

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del liofilizado de la pulpa y cáscara del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* (jengibre) mediante los métodos DPPH, FRAP y TBARS.

Materiales y métodos

Material químico

El ácido (\pm)-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) y el 1,1,3,3-tetraetoxipropano fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St Luis, MO, USA). El ácido tricloroacético (TCA) fue de Fisher Chemical; el dodesilsulfato de sodio (DDS) de ICN Biochemical Inc, y n-butanol de Riedel-de Haën. El ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina), 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorhidrato (ABAP), ácido acético, acetato de sodio, cloruro de hierro hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) y ácido clorhídrico (HCl) fueron de Merck- Perú.

Material vegetal

Los rizomas de *Zingiber officinale Roscoe* fueron recolectados en el distrito de Huabal, provincia de Jaén, región Cajamarca; con coordenadas de latitud sur $7^{\circ} 18' 1.39''$; longitud oeste $79^{\circ} 20' 6.856''$ a 180 m de altitud. La recolección de los rizomas fue en el mes de diciembre del 2017. Inmediatamente realizada la recolección y adquisición, los rizomas fueron llevados al laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. Luego, la muestra se secó a temperatura ambiente durante dos semanas, bajo sombra, hasta que la humedad final de la muestra no varió en más de 5%.

Preparación de los extractos

Para la extracción por maceración, se pesaron 400 g de rizoma del jengibre seco, luego se separó la cáscara manualmente con la ayuda de cuchillos y tijeras, y se cortaron en fragmentos de 1 cm^2 aproximadamente. Posteriormente, se adicionaron 2 litros de solución hidroalcohólica (70:30; EtOH:H₂O), y se mantuvieron a temperatura ambiente durante cinco días con agitación constante. Tanto el macerado de la pulpa y cáscara se filtraron (por separado) en un embudo Büchner al vacío utilizando papel Whatman. El extracto se concentró por rotaevaporación (Heidolph, Caframo LTD VV 2000) a 150-200 rpm, temperatura de 40 °C, en seguida se resuspendió en agua destilada, se congeló a -80 °C y se liofilizó. Los liofilizados se conservaron en refrigeración a 4 °C en frascos herméticamente cerrados⁽¹⁸⁾.

Capacidad antioxidante

Ensayo de capacidad de eliminación del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH)

De las diferentes diluciones del extracto liofilizado se tomaron 12,5 µL y se adicionaron 300 µL del reactivo DPPH 0,1 mM; además, se preparó un control (39,4 µg/mL del DPPH) y un blanco. Se protegió de la luz con papel aluminio y se dejó en reposo durante 15 minutos. Luego se realizaron las lecturas de las absorbancias a 517 nm, las mediciones se hicieron por triplicado y los valores se expresaron en porcentaje de inhibición del radical DPPH de acuerdo a la siguiente fórmula ⁽¹⁹⁾:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times \frac{(\text{Abs reactivo puro} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs reactivo puro}}$$

Ensayo del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

El ensayo de FRAP se realizó preparando soluciones madre de buffer acetato 300 mM (pH 3,6), solución TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM en HCl 40 mM y una solución de FeCl₃•6H₂O 20 mM. La solución de trabajo se preparó mezclando 25 mL de buffer acetato, 2,5 mL de solución de TPTZ y 2,5 mL de solución de FeCl₃•6H₂O (10:1:1, v/v/v), luego se incubó a 37 °C antes de cada ensayo ⁽²⁰⁾. Se realizó según el procedimiento informado por Rusu *et al.* En resumen, se incubaron 25 µL de muestra con 175 µL de reactivo FRAP en una placa de 96 pocillos durante 30 min en la oscuridad y la absorbancia se midió a 593 nm ⁽²¹⁾. Los valores se expresaron como equivalentes de trolox (ET), las mediciones fueron por triplicado.

Ensayo de las especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

Se utilizaron homogeneizados de yema de huevo como medio ricos en lípidos. Inicialmente, se añadieron 500 µL de este homogeneizado al 10% (p/v) y 100 µL de soluciones de muestra a ensayar. Luego se completó hasta 1 mL con agua destilada. Se añadieron 50 µL de solución de ABAP (0,07 M) diluido en agua destilada para inducir la peroxidación de lípidos. En seguida se adicionó 1,5 mL de TCA al 20% (pH 3,5) y 1,5 mL de TBA al 0,8% (p/v) en solución de DDS al 1,1% (p/v) y la mezcla resultante se agitó en vórtex y luego se calentó a 95 °C por 60 min. Después se enfrió a 2 °C, luego se añadieron 5 mL de n-butanol a cada tubo, se sometieron a vórtex y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. La absorbancia de la capa orgánica superior se midió a 532 nm. Todas las mediciones fueron por triplicado ⁽²²⁾. La curva de calibración se realizó con 1,1,3,3-tetraetoxipropano (malondialdehído - MDA), los valores se expresaron en nmol/mL de extracto.

Análisis estadístico

Se empleó el software GraphPad Prism (San Diego, USA) y para el análisis de los datos se realizó la prueba de ANOVA seguida del test de Bonferroni como prueba *post hoc*. Un valor de p < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

El porcentaje de inhibición de radicales DPPH (Figura 1A) máximo encontrado en la cáscara del rizoma de *Z. officinale* (45,6%) no fue significativamente diferente (p > 0,05) al encontrado en la pulpa (46,5%). Sin embargo, según el ensayo FRAP (Figura 2) la cáscara del rizoma de *Z. officinale* presentó capacidad antioxidante (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 y 0,6 mg/mL; 24,32; 22,55; 23,8; 32,13; 30,88 y 31,09 µg ET/mL respectivamente) significativamente mayor (p < 0,01) al de la pulpa (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 y 0,6 mg/mL; 19,84; 19,94; 19,42; 21,82; 22,96; 22,76 µg ET/mL respectivamente).

Finalmente, se demostró que solo el liofilizado de cáscara del rizoma de *Z. officinale* a bajas concentraciones (0,1; 0,2 y 0,3 mg/mL) es capaz de reducir significativamente (p < 0,01) la peroxidación lipídica *in vitro* inducida por 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorhidrato, respecto al control (Figura 3).

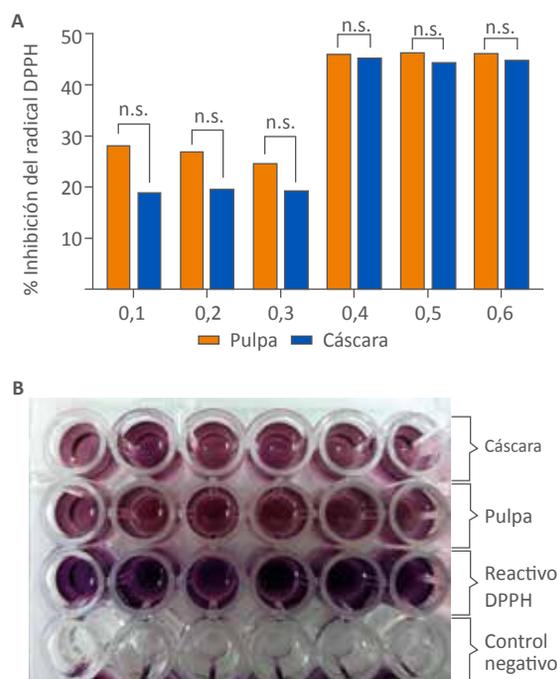


Figura 1. Capacidad antioxidante del liofilizado de la pulpa y cáscara del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* «jengibre», según (A) porcentajes de inhibición del radical DPPH. (B) Esquema experimental del ensayo DPPH en microplaca de 96 pocillos. n.s. = diferencia no significativa.

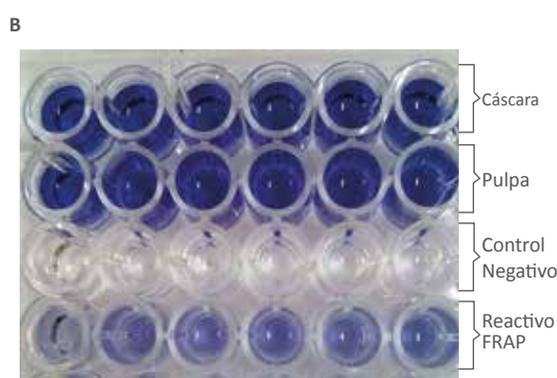
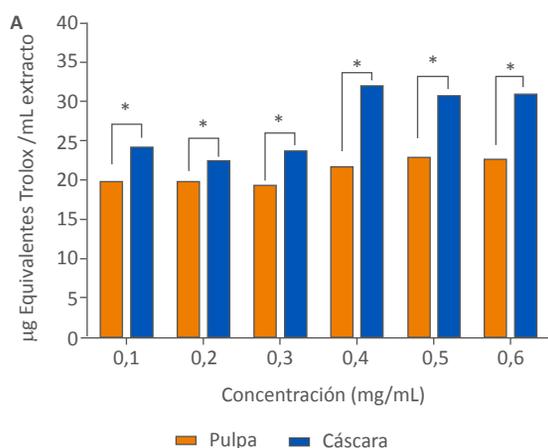


Figura 2. Capacidad antioxidante del liofilizado de la pulpa y cáscara del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* «jengibre» según (A) equivalentes de trolox ($\mu\text{g}/\text{mL}$ extracto). (B) esquema experimental del ensayo FRAP en microplaca de 96 pocillos. Diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$.

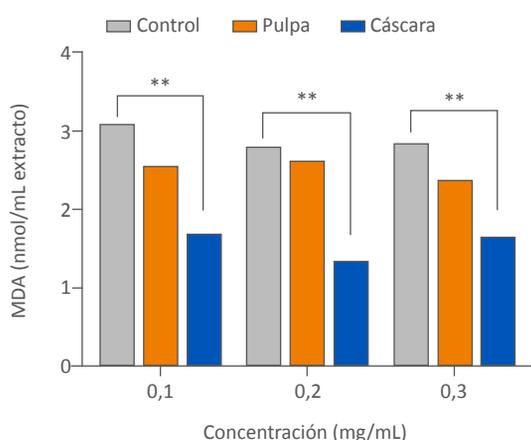


Figura 3. La Capacidad antioxidante del liofilizado de de la pulpa y cáscara del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* «jengibre» inhibe la peroxidación lipídica *in vitro* según el ensayo TBARS. Diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$ vs. control.

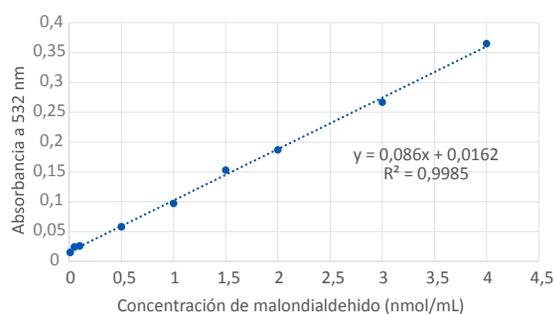


Figura 4. Curva de calibración de MDA (nmol/mL).

Discusión

La participación de los radicales libres en el envejecimiento está relacionada con su papel clave en el origen y la evolución de la vida. Los cambios de envejecimiento se atribuyen comúnmente al desarrollo, defectos genéticos, el medioambiente, enfermedades y un proceso de envejecimiento innato (IAP). Este último produce cambios de envejecimiento a un ritmo exponencialmente creciente con la edad, convirtiéndose en el principal factor de riesgo de enfermedad y muerte para los humanos⁽²³⁾. La teoría del estrés oxidativo en el envejecimiento y las enfermedades degenerativas de la edad da importancia al uso diario de compuestos y fitoquímicos naturales⁽²⁴⁾.

La planta de jengibre es capaz de sintetizar una gran cantidad de metabolitos secundarios de la planta que ofrecen enormes potenciales terapéuticos. Sin embargo, los dos grupos más numerosos de componentes son los componentes volátiles o los aceites esenciales que definen el aroma y el sabor de la planta y los componentes menos volátiles que cumplen un papel importante en el valor medicinal / nutracéutico de los rizomas de jengibre⁽⁷⁾.

Previamente se ha reportado que el extracto de acetato de etilo del rizoma de jengibre muestra un potencial eliminador de radicales directo contra 1,1-difenil-2-picirilhidrazilo (DPPH) con un valor de IC_{50} de 4.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ debido, probablemente, a la presencia de componentes fenólicos, gingerol y shoagol⁽²⁵⁾. Otro estudio evaluó las actividades *in vitro* de 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol y 6-shogaol para la eliminación de DPPH. Todos los compuestos estudiados exhibieron una buena capacidad de eliminación directa de radicales con valores de $IC_{50} < 50 \mu\text{M}$ ⁽²⁶⁾.

Según el ensayo de FRAP, en un estudio previo⁽²⁷⁾ se reportó que el compuesto 6-gingerol reveló una alta actividad reductora de FRAP ($IC_{50} \pm \text{SEM} [\mu\text{M}]$: $5 \pm 0,4$). En

otra investigación se demostró los valores de FRAP de los extractos etanólicos fueron 7,2-8,0 veces mayores que los de los extractos acuosos para dos variedades de rizomas ⁽²⁸⁾. Interesantemente, se encontró que la cáscara liofilizada de *Z. officinale* fue capaz de inhibir la peroxidación lipídica *in vitro*, esto concuerda con estudios realizados *in vivo* en los que se demostró que los niveles de MDA en ratas diabéticas tratadas con jengibre disminuyeron significativamente y que la capacidad antioxidante del plasma aumenta significativamente ⁽²⁹⁾. Por otro lado, también se demostró que *Z. officinale* disminuye significativamente la peroxidación lipídica inducida por Fe²⁺ en cerebro de ratas de una manera dependiente de la dosis ⁽³⁰⁾.

Previamente se sabe que la actividad antioxidante del jengibre seco es mayor que en el fresco, debido a que su

contenido fenólico también es mayor ⁽³¹⁾. Además, que la liofilización conduce a una mayor retención de gingeroles, compuestos fenólicos y flavonoides totales y mejores actividades antioxidantes ⁽³²⁾.

La identificación de compuestos naturales para la prevención de trastornos asociados con ROS es una estrategia importante para la terapia antioxidante. La supresión de la producción de ROS por gingeroles y shogaol puede atribuirse a varias acciones farmacológicas del jengibre ⁽³³⁾.

Se concluye que el liofilizado de la cáscara del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* (jengibre) posee mayor capacidad antioxidante en comparación con la pulpa según los ensayos FRAP y TBARS, sin embargo; la inhibición de radicales DPPH fue la misma tanto en la cáscara como en la pulpa.

Referencias bibliográficas

1. Thannickal V, Fanburg B. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279(6): L1005-28. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005.
2. Dorado C, Rugerio C, Rivas S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2003; 46(6): 229-235.
3. Ray P, Huang B, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012; 24(5): 981-990. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
4. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WPP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol*. 2018; 9. doi:10.3389/fphar.2018.01162.
5. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13:757-772. doi:10.2147/CIA.S158513.
6. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009; 46(5-6): 241-281. doi: 10.3109/10408360903142326.
7. Habtemariam S. The chemical and pharmacological basis of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) as potential therapy for diabetes and metabolic syndrome. *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases*. 2019; 639-687. doi:10.1016/b978-0-08-102922-0.00018-3.
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Global production of ginger in tons in 2016. Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
9. Lee HS, Seo EY, Kang NE, Kim WK. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2008; 19(5), 313-319. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.05.008.
10. Lee SH, Cekanova M, Baek SJ. Multiple mechanisms are involved in 6-gingerol-induced cell growth arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mol Carcinog*. 2008;47(3):197-208. doi:10.1002/mc.20374.
11. Ling H, Yang H, Tan SH, Chui WK, Chew EH. 6-Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor-κB activation. *Br J Pharmacol*. 2010; 161(8):1763-1777. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00991.x.
12. Vutyavanich T, Kraissarin T, Ruangsri R. Ginger for nausea and vomiting in pregnancy: randomized, doublemasked, placebo-controlled trial. *Obstet. Gynecol*. 2001; 97: 577-582.
13. Al-Yahya MA, Rafatullah S, Mossa JS, Ageel AM, Parmar NS, Tariq M, 1989. Gastroprotective activity of ginger *Zingiber officinale rocs*, in albino rats. *Am. J. Chin. Med*. 1989; 17: 51-56.
14. Yamahara J, Mochizuki M, Rong HQ, Matsuda H, Fujimura H. The anti-ulcer effect in rats of ginger constituents. *J. Ethnopharmacol*. 1988; 23: 299-304.
15. Miri P, Bae J, Lee DS. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother. Res*. 2008; 22:1446-1449.
16. Liao YR, Leu YL, Chan YY, Kuo PC, Wu TS, 2012. Anti-platelet aggregation and vasorelaxing effects of the

- constituents of the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Molecules*. 2012; 17: 8928–8937.
17. Liu Q, Liu J, Guo H, Sun S, Wang S, Zhang Y, et al. [6]-Gingerol: a novel AT1 antagonist for the treatment of cardiovascular disease. *Planta Med*. 2013; 79: 322–326.
 18. Asunción-Álvarez D, Ybañez-Julca R. Efecto del liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L. “mango kent”, sobre memoria espacial y la lipoperoxidación en membranas neuronales de *Rattus norvegicus* Sprague Dawley ovariectomizadas. *Rev Peru Med Integrativa*. 2018; 3(1):18-25.
 19. Ganoza M, Costilla N, Velásquez S, Polo M. Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de extractos de especies vegetales de Cachicadán, La Libertad-Perú. *Perspectiva*. 2015; 16: 203–8.
 20. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70–6. doi:10.1006/abio.1996.0292.
 21. Rusu M, Gheldiu M, Mocan A, Moldovan C, Popa S, Tomuta I, et al. Process Optimization for Improved Phenolic Compounds Recovery from Walnut (*Juglans regia* L.) Septum: Phytochemical Profile and Biological Activities. *Molecules*. 2018; 23(11): 2814. doi:10.3390/molecules23112814.
 22. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*. 2004; 85: 633–40. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.024.
 23. Harman D. Free Radical Theory of Aging: An Update: Increasing the Functional Life Span. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1067(1): 10–21. doi:10.1196/annals.1354.003.
 24. Harman D. Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease processes. In: Johnson JE, Jr Walford R, Harman D, Miquel J (eds) *Free radicals, aging and degenerative diseases*. Alan R. Liss, New York. 1986: 3–49.
 25. Rani MP, Krishna MS, Padmakumari KP, Raghu KG, Sundaresan A. *Zingiber officinale* extract exhibits antidiabetic potential via modulating glucose uptake, protein glycation and inhibiting adipocyte differentiation: an in vitro study. *J. Sci. Food. Agric*. 2012; 92 (9): 1948–1955.
 26. Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J. Ethnopharmacol*. 2010; 127 (2): 515–520.
 27. Nile SH, Park SW. Chromatographic analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and xanthine oxidase inhibitory activities of ginger extracts and its reference compounds. *Ind Crops Prod*. 2015; 70: 238–244. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.033.
 28. Yeh H, Chuang C, Chen H, Wan C, Chen T, Lin L. Bioactive components analysis of two various gingers (*Zingiber officinale Roscoe*) and antioxidant effect of ginger extracts. *LWT-Food Sci Technol*. 2014; 55(1): 29–334. doi:10.1016/j.lwt.2013.08.003.
 29. Afshari AT, Shirpoor A, Farshid A, Saadatian R, Rasmii Y, Saboory E, et al. The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation in rats. *Food Chem*. 2007; 101(1): 148–153. doi:10.1016/j.foodchem.2006.01.013.
 30. Oboh G, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. Antioxidant and inhibitory effect of red ginger (*Zingiber officinale* var. *Rubra*) and white ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) on Fe²⁺ induced lipid peroxidation in rat brain in vitro. *Exp Toxicol Pathol*. 2012; 64(1-2): 31–36. doi:10.1016/j.etp.2010.06.002.
 31. Li Y, Hong Y, Han Y, Wang Y, Xia L. Chemical characterization and antioxidant activities comparison in fresh, dried, stir-frying and carbonized ginger. *J. Chromatogr. B*. 2016; 1011: 223–232. doi:10.1016/j.jchromb.2016.01.009.
 32. An K, Zhao D, Wang Z, Wu J, Xu Y, Xia G. Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. *Food Chem*. 2016; 197: 1292–1300. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.033.
 33. Badreldin HA, Gerald B, Musbah OT, Abderrahim N. Some phytochemical: pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): a review of recent research. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 409–420.