

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FUNCIONAL
DE EXTRACTOS DE MORA Y FRESA
LIOFILIZADA**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: MIRIAM TARÍN FOLGADO

DIRECTORA: EVA GARCÍA MARTÍNEZ

CODIRECTORA: ISABEL ANDÚJAR PÉREZ

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2015



EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FUNCIONAL DE EXTRACTOS DE MORA Y FRESA LIOFILIZADA.

RESUMEN

Dentro de las frutas, la mora y la fresa, se consideran una importante fuente de compuestos fenólicos y otras sustancias antioxidantes. En este sentido, son ampliamente conocidas sus propiedades beneficiosas para promover la salud, jugando un papel esencial en la prevención de ciertas enfermedades relacionadas con el daño oxidativo. Se han demostrado muchas propiedades beneficiosas de los polifenoles, como su actividad antioxidante, antiinflamatoria o anticarcinogénica, entre otras. Sin embargo, ambas frutas son un recurso marcado por la estacionalidad de su cultivo y por una escasa vida útil, asociado a su alto contenido en agua, lo cual limita su disponibilidad. Con el fin de aumentar la vida útil, la industria agroalimentaria aplica tecnologías que permiten obtener alimentos en polvo de gran calidad, como es el caso de la liofilización. El uso de estas frutas en su forma liofilizada podría ser una buena estrategia para la obtención de alimentos funcionales ricos en compuestos antioxidantes. En este estudio se ha evaluado el efecto de la liofilización y de la adición de goma arábica (1,2%) sobre los principales compuestos bioactivos (fenoles y carotenoides) y la actividad antioxidante de fresa y mora. Los resultados mostraron que la liofilización parece una buena alternativa para obtener un producto en polvo con un alto contenido en compuestos bioactivos. La mora presentó mayor contenido en compuestos bioactivos que la fresa, así como una mayor actividad antioxidante. En la fresa el procesado no ocasionó cambios significativos en el contenido en fitoquímicos, mientras que en la mora se produjeron pérdidas en los fenoles. En general, la incorporación de goma arábica como aditivo tecnológico favoreció la estabilidad de los fitoquímicos estudiados, demostrando su acción encapsulante y protectora, y mejorando la actividad antioxidantes de los productos en polvo. Por otra parte, se realizaron ensayos *in vitro* de citotoxicidad en una línea celular de macrófagos murinos y se evaluó la inhibición de la producción de óxido nítrico en extractos hidrofílicos de mora y fresa liofilizadas con y sin goma arábica. Se observó que los extractos sin este soluto presentaban actividad inhibidora de la producción de óxido nítrico, pero esta actividad no se observaba en los extractos de las muestras con goma arábica.

PALABRAS CLAVE: fresa, mora, liofilización, goma arábica, fitoquímicos, actividad antiinflamatoria, actividad antioxidante.

Alumna: Miriam Tarín Folgado

Tutora Académica: Prof. Dña. Eva García Martínez

Cotutora: Isabel Andújar Pérez

Valencia, Septiembre 2015

ABSTRACT

Amongst the fruits, mulberry and strawberry are considered an important source of phenolic compounds and other antioxidants. In this sense, they are widely known for their beneficial health attributes, they play an essential role in preventing some specific diseases related with oxidative damage. These fruits have shown many beneficial properties due to the presence of polyphenols as antioxidants, anti-inflammatory or anticarcinogenic activity amongst others. However, both fruits are a resource marked by the seasonality of their cultivation and their short shelf life, associated with its high water content which limits their availability. In order to increase the shelf life, the food industry applies technologies to obtain high quality food powder, such as freeze drying. The use of these freeze dried fruits may be a good strategy to obtain functional foods rich in antioxidant compounds. This study has evaluated the effect of freeze drying and the addition of arabic gum (1.2%) on the main bioactive compounds (phenols and carotenoids) and antioxidant activity of strawberry and mulberry. The results show that freeze drying appears to be a good alternative to obtain a powder product with a high content of bioactive compounds. Mulberry had higher content of bioactive compounds and antioxidant activity than strawberry. Processing the strawberry didn't caused significant changes in the phytochemical content, while in the blackberry caused losses in phenols. In general, the addition of arabic gum as technological additive favored stability of the studied phytochemicals, showing encapsulant and protective action, and improving the antioxidant activity of the product powder. Moreover, *in vitro* cytotoxicity assays were performed in a murine macrophage cell line and the inhibition of nitric oxide production in hydrophilic extracts of mulberry and strawberry freeze-dried with and without solutes was evaluated. We observe that solute-free extract showed inhibitory activity of nitric oxide production, but this activity was not observed in the extracts of the samples with Arabic gum.

KEY WORDS: strawberry, mulberry, freeze drying, arabic gum, phytochemicals, anti-inflammatory, antioxidant activity.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar mi más sincero agradecimiento a mi tutora y cotutora Eva María García Martínez e Isabel Andújar Pérez, por darme la posibilidad de realizar este proyecto, por ayudarme en todo momento y confiar en mí.

Darle las gracias también a mis compañeros que a lo largo de la carrera me han acompañado y ayudado a seguir adelante durante esta etapa. A Susana de la Fuente, con quien ha sido un placer trabajar con ella durante la realización de este trabajo y por ayudarme en todo momento. A Alberto Yuste del Carmen por transmitirme sus conocimientos, sus consejos, su gran sabiduría y paciencia.

A mi familia y a Claudio por ofrecerme su apoyo incondicional, por animarme a seguir adelante con mis sueños y por ofrecerme sus consejos siempre que lo he necesitado. Sin ellos no habría sido posible.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1 MATERIA PRIMA.....	5
2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	5
2.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	6
2.3.1 Extracción de compuestos fitoquímicos hidrofílicos	6
2.3.2 Extracción de compuestos fitoquímicos liposolubles	7
2.3.3 Extracción actividad biológica	7
2.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	7
2.4.1 Contenido en agua (x_w)	7
2.4.2 Compuestos bioactivos	8
2.4.2.1 Fenoles Totales	8
2.4.2.2 Carotenoides Totales	9
2.4.3 Actividad antioxidante (AOA)	9
2.4.3.1 Método ABTS	9
2.4.3.2 Método FRAP	10
2.4.3.3 Método DPPH	10
2.5 ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	11
2.5.1 Cultivo de la línea celular RAW 264.7 y pase de células	11
2.5.2 Ensayos de citotoxicidad celular	12
2.5.2.1 Evaluación de la citotoxicidad por MTT	12
2.5.3 Determinación de la producción de NO	13
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
4. RESULTADOS	14
4.1 EFECTO DE LA LIOFILIZACIÓN Y DE LA ADICIÓN DE GOMA ARÁBIGA	14
4.1.1 Contenido humedad (x_w)	14
4.1.2 Contenido en compuestos fitoquímicos	15
4.1.3 Actividad antioxidante de los extractos	19
4.2 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS FITOQUÍMICOS Y LA ACTIVIDAD	

ANTIOXIDANTE.....	22
4.2.1 Análisis de correlación en extractos de fresa	22
4.2.2 Análisis de correlación en extractos de mora	23
5. RESULTADOS ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>.....	24
5.1. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y CITOTOXICIDAD.....	24
5.2. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO	25
6. CONCLUSIONES.....	26
7. BIBLIOGRAFIA	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura utilizada en el trabajo para denominar a las diferentes muestras.

Tabla 2. Valores medios de contenido de agua (x_w) y su correspondiente desviación estándar, expresado en g de agua/ 100 g de muestra.

Tabla 3. Valores medios de actividad antioxidante, en mmol Trolox Equivalente/100 g sólidos de fruta, y desviación estándar en el extracto 1 de las muestras de fresa.

Tabla 4. Valores medios de actividad antioxidante, en mmol Trolox Equivalente/100 g solutos de fruta, y desviación estándar en el extracto 1 de las muestras de mora.

Tabla 5. Valores medios de actividad antioxidante, en mmol Trolox Equivalente/100 g sólidos de fruta, y desviación estándar en el extracto 2 de las muestras de fresa.

Tabla 6. Valores medios de actividad antioxidante, en mmol Trolox Equivalente/100 g solutos de fruta, y desviación estándar en el extracto 2 de las muestras de mora.

Tabla 7. Actividad antioxidante total, en mmol Trolox Equivalente/100 g solutos de fruta, y desviación estándar de las muestras de fresa y mora.

Tabla 8. Coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante por el método FRAP, ABTS y DPPH, y los fenoles y carotenoides de la fresa.

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante total por el método FRAP, ABTS y DPPH, con los fenoles y carotenoides de la mora.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Equipo en el que se realizó la liofilización de las muestras (a); muestra liofilizada en bandeja (b)

FIGURA 2. Ejemplo de extracto 1 de mora y fresa frescas.

FIGURA 3. Ejemplo de extractos 1 y 2 de muestras de fresa (a) y mora (b)

FIGURA 4. Fotografía de la línea celular RAW 264.7

FIGURA 5. Reducción de MTT a formazán.

FIGURA 6. Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico/100 g sf) de las diferentes muestras de fresa.

FIGURA 7. Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico/100 g sp) de las diferentes muestras de mora.

FIGURA 8. Contenido en carotenoides totales ($\mu\text{g } \beta\text{-caroteno}/100 \text{ gsf}$) de las diferentes muestras de fresa.

FIGURA 9. Contenido en carotenoides totales ($\mu\text{g } \beta\text{-caroteno}/100 \text{ gsf}$) de las diferentes muestras de mora.

FIGURA 10. Evaluación de la citotoxicidad celular por medio de la reducción de MTT a formazán. (A) Evaluación de la viabilidad celular de fresa liofilizada sin solutos y con solutos. (B) Evaluación de la viabilidad celular de mora liofilizada sin solutos y con solutos. Los datos se expresan como la media \pm error estándar. Las diferencias de cada dosis de cada muestra respecto al control se determinaron por medio del análisis de varianza ANOVA seguido del test de la t de Dunnett, siendo **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$; ns = diferencias no significativas.

FIGURA 11. Evaluación de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7. (A) Evaluación de la inhibición de la producción de NO de fresa liofilizada sin solutos y con solutos. (B) Evaluación de la inhibición de la producción de NO de mora liofilizada sin solutos y con solutos. Los datos fueron obtenidos a partir de cuatro experimentos independientes y se expresan como la media \pm desviación estándar. La significación estadística de las diferencias de cada dosis respecto al control se determinaron por medio del análisis de varianza ANOVA seguido del test de la t de Dunnett (siendo * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) ; ns = diferencias no significativas.

1. INTRODUCCIÓN

Las frutas suponen uno de los alimentos más importantes para mantener una dieta equilibrada. Su consumo nos aporta nutrientes esenciales y sustancias fitoquímicas, llamadas también compuestos bioactivos. Estos compuestos se encuentran en pequeñas cantidades en algunos alimentos y carecen de valor nutritivo, confiriendo a las frutas distintas propiedades organolépticas (Nile y Park, 2014). Su importancia radica en que ejercen un efecto beneficioso para la salud, debido a la relación que existe entre su capacidad antioxidante y la prevención de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Giampieri *et al.*, 2012).

En relación al año 2013, el consumo de frutas se ha reducido alrededor de un 2,2% a nivel nacional (MAGRAMA, 2013). Dada la situación, se plantea la necesidad de establecer campañas para incentivar el consumo de frutas y verduras. Uno de los ejemplos más actuales son las campañas de “cinco al día” o mediante “fruta y verdura de aquí y ahora” (MAGRAMA, 2014). En cambio, los frutos rojos están ganando popularidad en el mercado europeo debido a su sabor, su atractivo físico y a las interesantes propiedades saludables que poseen. Por ello su cultivo y demanda se está incrementando cada vez más. Un ejemplo de ello es Noruega, tal y como detalló BAMA en el simposio “Fresh and Life” el consumo ha aumentado un 45% respecto al año 2012, de tal forma que el 30% de la población consume estos frutos a la semana (FEPEX, 2015)

El motivo del aumento del consumo de frutos rojos se debe en gran medida al conocimiento por parte de los consumidores de los beneficios que aportan estas frutas. Diferentes estudios describen que dichos frutos poseen una gran capacidad antioxidante que ayuda a combatir el estrés oxidativo y la inflamación, previniendo así el desarrollo de numerosas enfermedades cardiovasculares y cánceres (Stoner *et al.*, 2008; Aqil *et al.*, 2012). Las reacciones químicas de oxidación (pérdida electrones, captación de oxígeno o cesión de hidrogeno) y reducción (captación electrones o pérdida oxígeno) se producen constantemente en nuestro organismo. Es necesario que haya un correcto equilibrio entre oxidación-reducción pues en caso contrario podría dar lugar a una producción incontrolada de radicales libres (Elejalde, 2001). Un radical libre es una especie química con uno o más electrones desapareados, su estructura es inestable y reactiva por lo que pueden dañar las moléculas del cuerpo humano y alterar algunos procesos celulares, produciendo un desequilibrio y por tanto estrés oxidativo (Kaur y Kapoor, 2001; Gawlik-Dziki, 2012). Para contrarrestar esta excesiva producción de radicales libres, el organismo cuenta con un sistema de defensa antioxidante celular que comprende antioxidantes endógenos. La función de los antioxidantes es anular la reactividad de radicales libres. Sin embargo en ocasiones no son suficiente los propios antioxidantes endógenos por lo que es necesario suministrar antioxidantes exógenos a través de la dieta (Avello y Suwalsky, 2006). Por este motivo los frutos rojos tienen un papel esencial ya que poseen compuestos bioactivos con una gran capacidad antioxidante (Costa *et al.*, 2013).

Las fresas (*Fragaria x ananassa* Duch) son uno de los frutos rojos más consumidos y más populares que existen. La fresa es rica en micronutrientes como la vitamina C y componentes fitoquímicos como los compuestos fenólicos (Pineli *et al.*, 2011). Éstos compuestos tienen un especial interés ya que influyen en la calidad organoléptica y en propiedades beneficiosas para la salud. Su contenido está influenciado por diversos factores tales como el genotipo, el grado

de madurez, factores ambientales y condiciones de almacenamiento (Pinto *et al.*, 2008; Hernanz *et al.*, 2007; Ayala-Zavala *et al.*, 2004; Cordenunsi *et al.*, 2002). Uno de los compuestos fenólicos más importantes en las fresas son las antocianinas, se trata de un grupo de pigmentos solubles en agua con propiedades antioxidantes responsables del atractivo color rojo de las fresas. Las principales antocianinas presentes son pelargonidin-3-glucoside y cyanindin-3-glucoside (Crecente-Campo *et al.*, 2012). Esta actividad antioxidante de las antocianinas ha sido demostrada en varios estudios y se ha demostrado que ayudan a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cánceres por poseer propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y quimioprotectores (Meiers *et al.*, 2001; Bagchi *et al.*, 2004). Además de antocianinas, las fresas contienen taninos hidrosolubles (elagitaninos) y taninos condensados (proantocianinas). Otros compuestos fenólicos presentes en concentraciones más bajas en las fresas son los ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico y elágico), ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico), flavonoles (quercetina, kaempferol y myricetina), flavan-3-ols (catequina, epicatequina) (Aaby *et al.*, 2012). El ácido elágico tiene un interés particular debido a la evidencia de su potencial quimiopreventivo, anti-inflamatorio, antioxidante y efectos antibacterianos. Por otro lado, el ácido gálico se considera un potente antioxidante siendo su actividad antioxidante tres veces la de la vitamina C o E, aunque se encuentra en concentraciones muy bajas (Nile y Park, 2014).

Las moras (*Morus* spp., familia Moraceae) se encuentran en zonas que tienen un clima tropical, subtropical y templado (Yu *et al.*, 2013). Existen varias especies del género *Morus*, siendo las más conocidas morera blanca (*Morus alba* L.), morera negra (*Morus nigra* L.) y la morera roja (*Morus rubra* L.). Las moreras se cultivaban por sus hojas, ya que servían como alimentos para los gusanos de seda (Vijayan, 2010). Sin embargo, cada vez se consumen más sus frutos y su producción ha aumentado debido a su sabor, aroma, valor nutritivo y contenido de compuestos bioactivos que presenta (Liang *et al.*, 2012). En este sentido las moras son una fuente rica de ácidos orgánicos y compuestos monoterpénicos, siendo los grupos mayoritarios de compuestos bioactivos encontrados en las moras. Dentro del grupo de compuestos fenólicos, las clases más importantes son flavonoles (rutina, quercetina, hiperósido) y antocianinas, seguido por los ácidos cinámicos (clorogénico, cumárico, ferúlico), catequinas y ácidos benzoicos (ácido gálico y elágico) (Donno *et al.*, 2015). Estos compuestos, están relacionados con los efectos positivos que aportan en la salud de quien los consume, especialmente en personas con diabetes. En este sentido, estudios *In vitro* e *In vivo* demostraron que la mora tiene actividad inhibidora de la α -glucosidasa reduciendo así los niveles de glucosa en sangre (Wang *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado mediante estudios *in vitro* que estos compuestos tienen un efecto antiinflamatorio. Dicho efecto varía según el contenido y el tipo de compuesto fenólico mayoritario que presente la fruta. De entre todos ellos, las antocianinas fueron los que presentaron mayor actividad antiinflamatoria (Wang y Mazza, 2002; Ling y Tang, 2008).

De esta forma, las fresas y las moras pueden tratarse de un claro ejemplo de alimentos funcionales debido a que son alimentos que se consumen como parte de una dieta normal y contienen componentes biológicamente activos, ofreciendo beneficios para la salud y reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades (Calvo *et al.*, 2011). No obstante, su corta vida útil y estacionalidad dificulta en gran medida el consumo de estas frutas durante todo el año, además las condiciones de almacenamiento y distribución adversas hacen a los compuestos

bioactivos vulnerables a la degradación, causando una reducción en su funcionalidad y disponibilidad (Garti y McClements, 2012).

La extracción, encapsulación de compuestos bioactivos y elaboración de nutracéuticos puede ser una posible solución a dicho problema. Los procesos de encapsulación han sido utilizados como respuesta a la pérdida de viabilidad de aquellos componentes activos que se encuentran en los alimentos funcionales, teniendo como objetivo protegerlos de las condiciones del medio el cual hace que disminuya su efecto beneficioso. Dicho proceso consiste en proteger un material activo que puede estar en estado sólido, líquido o gas, cubriéndolos con un agente encapsulante (Madene *et al.*, 2006). La encapsulación es una de las técnicas más utilizadas para la elaboración de alimentos funcionales y nutracéuticos, por lo que su uso e investigación ha aumentado en estos últimos años (Gouin, 2004). Estos productos son elaborados a partir de alimentos que combinan la idea de alimentos o nutriente con la de producto farmacéutico y poseen cierta capacidad curativa o beneficiosa en la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades. Existe una diferencia entre alimentos y medicamentos. Sin embargo, cada vez es más claro que también es posible obtener productos con efectos beneficiosos para prevenir enfermedades a través de los alimentos (Calvo *et al.*, 2011). Es posible obtener nutracéuticos extrayendo los compuestos bioactivos de las frutas. Mediante la extracción es posible aislar dichos compuestos solubles de su material vegetal en diferentes disolventes. Dicha extracción parece dependiente del tipo de disolvente utilizado y de su polaridad, por ello resulta un elemento clave para lograr una extracción eficaz. Diversos autores han utilizado varios disolventes para la extracción de compuestos bioactivos, como por ejemplo los compuestos fenólicos de frutas y verduras. Los más utilizados han sido agua, metanol, etanol, acetona y sus mezclas con agua (Michiels *et al.*, 2012; Nack y Shahidi, 2006)

Estos nutracéuticos tienen numerosos efectos terapéuticos para quien los consumen, tales como efectos antiobesidad, cardiovasculares, efectos antidiabéticos, mejora inmunológica y anti-inflamatorias (Kuppusamy *et al.*, 2014). Dichos productos son comercializados en forma de píldoras, pastillas, cápsulas o polvo para el consumo humano como complemento nutricional (Cruzado y Cedrón, 2012).

Una de las opciones para la elaboración de nutracéuticos es emplear la técnica de liofilización. Durante la liofilización, el producto se congela convirtiendo la mayor parte del agua a estado sólido (hielo) que posteriormente es eliminado mediante la sublimación a baja temperatura y presión, obteniendo finalmente un producto en polvo concentrado con baja actividad del agua (a_w). De esta forma, eliminando el agua se retardan o inhiben los procesos de degradación bioquímicos del producto y por consecuencia aumenta su estabilidad. Se trata de un método de deshidratación con un especial interés debido a la sencillez del proceso, a la reducción de volumen del producto, facilidad de manejo, y por ofrecer una calidad superior de producto final. Al llevarse a cabo a bajas temperaturas se preserva el sabor, color y apariencia, asimismo reduce al mínimo la degradación de la calidad nutricional del producto al no someterse a tratamientos térmicos. (Guio *et al.*, 2000). Así pues, la liofilización es una de las técnicas más adecuadas para la deshidratación de los productos sensibles al calor. Además, puede ser utilizada para la encapsulación de compuestos bioactivos. (Fang y Bhandari, 2010; Munin y Edwards-Lévy, 2011)

El producto resultante de la liofilización de frutas es un polvo concentrado de aproximadamente 2% de humedad, que puede presentar dificultades de manejo y estabilidad debido a su elevada higroscopicidad y termoplaticidad en presencia de elevadas temperaturas y humedad (Adhikari *et al.*, 2004). Además, se pueden desarrollar fenómenos característicos del estado gomoso de los materiales amorfos, tales como pegajosidad, colapso estructural y apelmazamiento. La Tg (temperatura de transición vítrea) marca la temperatura a la que el material pasa de estado vítreo a gomoso, siendo mayor cuanto mayor es el peso molecular de los solutos del producto. Por tanto en el caso del producto en polvo que presenta menor contenido de agua su Tg será menor, dando lugar a los fenómenos antes mencionados (Roos, 1995). Esto hace aconsejable agregar solutos de alto peso molecular, como la goma arábica, para aumentar la estabilidad del producto en polvo. Estos solutos ejercen como encapsulantes, evitando la oxidación de los componentes y ejerciendo como barrera frente a la adsorción de agua. Así se evita el problema de apelmazamiento al aumentar su Tg y reduce su carácter higroscópico. De esta forma, se ha comprobado que la adición de goma arábica en el proceso de liofilización incrementa la estabilidad y mejora las condiciones de conservación del producto obtenido, retrasando el cambio de estado de vítreo a gomoso (Singthong *et al.*, 2009; Gabas *et al.*, 2007; Krishnan *et al.*, 2005; Mosquera *et al.*, 2010)

La goma arábica es un hidrocoloide producido por el exudado de plantas del género *Acaci* y presenta una alta solubilidad en agua, por lo que es un agente de encapsulación eficaz, capaz de formar una matriz seca en los procesos de deshidratación, atrapando en su interior los compuestos evitando su contacto con el aire (Gabas *et al.*, 2007; Mosquera *et al.*, 2010). Tiene numerosas aplicaciones alimentarias, como estabilizantes de espumas y emulsiones, fijación de sabores, clarificante en vinos, para retrasar la cristalización de azúcares en confitería, elaboración de productos lácteos y emulsificante en bebidas (Iniesta y Ramírez, 2005; Gracia, 1991)

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la liofilización y de la adición de goma arábica sobre los principales compuestos bioactivos y actividad antioxidante de fresa y mora. Para ello se han extraído y cuantificado los principales compuestos bioactivos liposolubles e hidrosolubles y se ha analizado la actividad antioxidante de cada uno de los extractos obtenidos. Además se realizarán ensayos *in vitro* de citotoxicidad en una línea celular de macrófagos murinos y se evaluará la posible actividad antiinflamatoria de los extractos estudiando la inhibición de la producción de ácido nítrico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIA PRIMA

Las fresas (*Fragaria ananassa*) empleadas para este estudio fueron adquiridas en un supermercado local de Valencia, procedentes de Huelva. Mientras que las moras (*Morus alba*) fueron recogidas de las moreras situadas en el campus de la Universidad Politécnica de Valencia. Las frutas se seleccionaron por observación visual teniendo en cuenta diversos factores, tales como madurez, ausencia de daños superficiales, color, apariencia física y tamaño, con el fin de obtener una muestra homogénea. Para la obtención de fruta en polvo liofilizada, en una parte de las muestras, se utilizó como aditivo tecnológico goma arábiga (Sigma-Aldrich).

2.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE FRUTA

Las frutas fueron lavadas con agua, se les eliminó el pedúnculo y se trituraron mediante una mezcladora eléctrica (Thermomix, TM 21 Vorwerk, España) a velocidad 4 durante 1 minuto. El puré de cada fruta obtenido se distribuyó en 3 lotes, uno se destinó a análisis en fresco, otro se congeló para su posterior liofilización y el tercer lote se le añadió goma arábiga, en una proporción de 1,2 g /100 g puré fruta, según estudios previos (Mosquera et al, 2009) previamente a su congelación y posterior liofilización.

Las muestras de los lotes 2 y 3 que iban a ser liofilizadas se dispusieron en bandejas formando una capa de 0,5 cm de espesor y se congelaron a -45°C (Liebherr Mediline 7083 207-00) durante 48 h hasta su liofilización, la cual se realizó con un liofilizador (Telstar Lioalfa-), a 0,021 Pa y -59 °C durante 48 h (Figura 1a). Las muestras deshidratadas obtenidas (Figura 1b), se trituraron hasta obtener un producto en polvo homogéneo.



FIGURA 1. Equipo en el que se realizó la liofilización de las muestras (a); muestra liofilizada en bandeja (b)

La muestra fresca de fresa y mora se denominó F y M, respectivamente; las muestras liofilizadas de fresa y mora FL y ML y las muestras liofilizadas con goma arábica de fresa y mora FLG y MLG, tal y como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Nomenclatura utilizada en el trabajo para denominar a las diferentes muestras.

Muestra	Nomenclatura
Fresa fresca	F
Mora fresca	M
Fresa liofilizada	FL
Mora liofilizada	ML
Fresa liofilizada con goma arábica	FLG
Mora liofilizada con goma arábica	MLG

2.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE FRUTA.

Con la intención de favorecer la extracción de los compuestos bioactivos hidrofílicos y lipofílicos de las frutas estudiadas, cada muestra se sometió a dos extracciones utilizando disolventes con distinta polaridad, tal y como se detalla a continuación.

2.3.1 Extracción de compuestos fitoquímicos hidrofílicos

Para la extracción se siguió la metodología descrita por Tomás-Barberán *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Se empleó como disolvente de extracción de los compuestos hidrofílicos una mezcla metanol: agua (70:30, v/v). Este disolvente mostró los mejores resultados en estudios previos para la extracción de compuestos fenólicos (Farinha, 2014; Spaggiari, 2014). Se pesó 1 g de muestra y se le adicionó 9 mL de disolvente metanol: agua (70:30, v/v). Se homogeneizó durante 20 minutos mediante agitación magnética. Seguidamente, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min a 20°C (Selecta Medifriger-BL, España). Finalizado el tiempo se recuperó el sobrenadante (Extracto 1, Figura 2 y 3) y a este extracto se le midió el contenido en fenoles totales (apartado 2.4.2.1) y la actividad antioxidante (apartado 2.4.3).



FIGURA 2. Ejemplo de extracto 1 de mora y fresa frescas.

2.3.2 Extracción de compuestos fitoquímicos liposolubles

Para la extracción de compuestos fitoquímicos liposolubles se siguió la metodología descrita por Barba *et al.* (2006), para ello el precipitado resultante de la extracción 1 con metanol:agua (70:30, v/v) se realizó una segunda extracción utilizando como disolvente una disolución de hexano:acetona:etanol (50:25:25, v/v/v) para así poder obtener el extracto 2. En primer lugar se pesó el precipitado obtenido y se añadió disolvente de extracción en proporción 1:10 (p/v). La extracción se realizó de la misma manera que se ha descrito en 2.3.1. A este extracto se le denominó Extracto 2 (Figura 3) y se le midieron carotenoides totales (apartado 2.4.2.2) y la actividad antioxidante (apartado 2.4.3).



FIGURA 3. Ejemplo de extractos 1 y 2 de muestras de fresa (a) y mora (b)

2.3.3 Extracción actividad biológica

Para la obtención del extracto que será utilizado en los ensayos *in vitro*, se pesaron alrededor de 2 gramos de muestra liofilizada con y sin adición de goma arábica. Se añadió 30 mL de disolvente metanol:agua (70:30 v/v) y se homogenizó durante 20 minutos en agitación magnética. Posteriormente, se centrifugó a 20°C y 9000 rpm durante 10 minutos. Se repartió el sobrenadante obtenido en matraces corazón para después eliminar el disolvente que pudiera contener mediante evaporación introduciéndolos en un rotavapor durante 10 minutos. Seguidamente, se procedió a eliminar el agua que pudiera contener introduciéndolos en el liofilizador durante 24 horas.

El extracto seco obtenido liofilizado se disolvió con PBS para obtener una concentración de 100 mg/mL.

2.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

2.4.1 Contenido en agua (x_w)

En cada muestra se determinó el contenido de humedad según el procedimiento descrito en AOAC (1997) para alimentos ricos en azúcares. Esta determinación se basa en la pérdida de peso de la muestra bajo condiciones específicas. Para su determinación se pesaron alrededor de 2 g de cada muestra en cápsulas de vidrio empleando una balanza analítica de sensibilidad 0,1

mg. Se colocaron en una estufa de vacío (Vacioterm, J.P. Selecta) a una temperatura de $60 \pm 1^\circ\text{C}$ con una presión menor a 100 mm Hg hasta alcanzar un peso constante. Los resultados se expresaron en g agua/ 100 g muestra.

2.4.2 Compuestos bioactivos

A todas las muestras obtenidas se les analizó, por triplicado, el contenido en fenoles totales y carotenoides. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado. Se calculó la media y la desviación estándar. Con fines comparativos, todos los resultados se expresaron referidos a 100 g de solutos de fruta (sf), aplicando la ec. 1.

$$m_i = \frac{m \left(\frac{m_m + v \cdot \rho}{m_m} \right)}{m_m \cdot (1 - X_w) \cdot X_{sf/st}} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde:

m_i : cantidad de compuesto analizado (mg/100 g sf)

m : cantidad de compuesto analizado en el extracto (mg/g disolución)

m_m : masa de muestra analizada (g)

v : volumen de disolvente de extracción (mL)

ρ : densidad del disolvente de extracción (g/mL)

X_w : humedad de la muestra analizada (g agua/g muestra)

$X_{sf/st}$: (g solutos de fruta/g solutos totales) en la muestra analizada

2.4.2.1 Fenoles totales

El análisis de los fenoles totales presentes en las muestras se llevó a cabo en el extracto 1, a través del ensayo Folin-Ciocalteu, según Benzie y Strain (1999) y Selvendran y Ryden (1990). El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. A pH básico los complejos formados se reducen dando lugar a un color azul intenso capaz de ser medido por espectrofotometría.

Para su determinación, se añadió 250 μl del extracto 1 obtenido a 15 mL agua bidestilada y 1,25 ml de reactivo Folin-Ciocalteu. Esta mezcla se dejó reposar durante 8 min, evitando el contacto con la luz. Pasado el tiempo se le añadió 3,75 mL de una disolución de carbonato de sodio 7,5% (p/v) y agua bidestilada hasta 25 mL. Tras 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente, se procedió a medir la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Electron Corporation USA).

Con el mismo procedimiento se preparó una recta de calibrado tomando como patrón disoluciones de ácido gálico (Sigma–Aldrich, Alemania) a diferentes concentraciones. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico (AG)/ 100 g sf.

2.4.2.2 Carotenoides Totales

El análisis de los carotenoides totales presentes en las muestras se llevó a cabo en el extracto 2. Para su determinación se siguió la metodología descrita según la norma AOAC (1996).

Para ello se adicionaron 15 mL de agua bidestilada a 100 ml del extracto 2, después se prosiguió a homogenizarlo en un agitador Vortex durante 2 minutos. Al finalizar el tiempo, se pudo observar la separación de fases. De la fase liposoluble se cogieron 600 μ L, se llevó a sequedad con Nitrógeno y se disolvió en 1 mL de disolución THF:ACN:MeOH (15:30:55, v/v/v). A continuación, se midió la lectura de la absorbancia a 446 nm, con un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Electron Corporation USA). Para la cuantificación se utilizó una recta de calibrado de β -caroteno (Fluka, España) como patrón. Los resultados se expresaron como mg de β -caroteno/100 g sf.

2.4.3 Actividad antioxidante (AOA)

A cada uno de los extractos obtenidos para la cuantificación de los compuestos fitoquímicos se les midió la actividad antioxidante mediante tres métodos diferentes: ABTS, FRAP y DPPH.

2.4.3.1 Método ABTS

Se trata de uno de los métodos de evaluación de actividad antioxidante más adecuado para los compuestos que presentan una absorbancia máxima cercana al espectro infrarrojo (700-750 nm) como el caso de las antocianinas (Moon y Shibamoto, 2009).

El radical ABTS \bullet + se genera a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) mediante oxidación por persulfato de potasio (Prior, 2005). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. Una vez generado el radical la medida se realiza mediante un ensayo de post-adición. En el ensayo de post-adición se forma el radical en ausencia de la muestra y así, cuando se añade la sustancia antioxidante se produce un descenso en la señal debido a la disminución de la concentración del radical (Prior *et al.*, 2005).

Para la realización de este método se siguió la metodología descrita por Re *et al.* (1999); Arnao *et al.* (2001) y Thaipong *et al.* (2006). Para ello, se prepara una disolución de ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2,45mM, dicha solución se mantiene a temperatura de refrigeración y al abrigo de la luz 12-16horas, condiciones necesarias para la formación del radical catiónico ABTS \bullet +. Antes de iniciar la lectura de la absorbancia se realiza una dilución de la solución de ABTS \bullet + en etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0,7 Una vez alcanzado este valor de absorbancia, se adicionaron 10 μ L de extracto y a continuación se midió la absorbancia a 734 nm a tiempo cero y a tiempo 1 minuto mediante un espectrofotómetro UV-visible, (Thermo Electron Corporation, USA).

Para su cuantificación se preparó una recta de calibrado previamente con diferentes concentraciones de Trolox (Sigma–Aldrich, Alemania) en un intervalo de 1-25 ppm (mg/L) utilizando el disolvente de extracción correspondiente a cada extracto. Los resultados se expresaron como milimoles de Trolox equivalente /100g sf.

2.4.3.2 Método FRAP

Este método se basa en el poder de la sustancia antioxidante en reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , el cual tiene menor poder antioxidante. De esta forma, se determina la actividad antioxidante de manera indirecta. El complejo férrico-2, 4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Se trata de un método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del Fe^{2+} . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta la señal de absorbancia. (Prior *et al.*, 2005).

Para la realización de este método se siguió la metodología descrita por Benzie y Strain (1996); Pulido *et al.* (2000) y Thaipong *et al.* (2006). De esta forma, en una cubeta espectrofotométrica se mezclaron 900 μ L de reactivo FRAP, con 30 μ L de agua bidestilada y 30 μ L de extracto. El reactivo FRAP se preparó previamente con 2,5 mL de TPTZ 10 mM/L en 40 mM HCL, 2,5 mL de $FeCl_3$ 20 mM (preparado diariamente) y 25 mL de tampón acetato 0,3 M (pH=3,6), manteniendo el reactivo FRAP en baño a 37°C durante todo el análisis. Seguidamente se midió la absorbancia a 593 nm mediante un espectrofotómetro UV-visible, (Thermo Electron Corporation, USA). Se preparó un blanco de la misma manera pero empleando disolvente de extracción en lugar de muestra.

Se preparó una recta de calibrado previamente con diferentes concentraciones de Trolox (Sigma–Aldrich, Alemania) en un intervalo de 1-25 ppm (mg/L) utilizando el disolvente de extracción correspondiente a cada extracto. Los resultados se expresarán como milimoles de Trolox equivalente /100g sf.

2.4.3.3 Método DPPH

El objetivo de este método es evaluar la capacidad de un antioxidante en neutralizar el compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), dicho compuesto es un radical estable con una coloración intensa violeta y con una absorbancia de 517 nm, por lo que su concentración puede determinarse con métodos espectrofotométricos. De esta forma, se procede a determinar la concentración inicial de DPPH y la concentración final al añadir la sustancia antioxidante para así determinar si existe una disminución de la señal debido a la disminución de la concentración de DPPH debido a la cesión de electrones de la especie antioxidante, teniendo por tanto una mayor actividad antioxidante (Antolovich *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2005)

Para su realización se siguió la metodología descrita por Brand-Williams *et al.* (1995) y Sanchez-Moreno *et al.* (2003). Se colocaron 3 mL de reactivo DPPH (0,030 g/L en metanol, Sigma-Aldrich, Germany) en una cubeta espectrofotométrica y se adicionaron 30 μ L de extracto. Seguidamente se leyó la absorbancia a 517 nm (espectrofotómetro UV-visible, Thermo Electron Corporation USA) a tiempo cero y a los 2,5 minutos, cuando la reacción se ha estabilizado.

El resultado se expresó en % DPPH que se calculó según la ecuación (2):

$$\% \text{ DPPH} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

Siendo:

A_{control} = absorbancia a tiempo 0 minutos; A_{muestra} = absorbancia a tiempo 2,5 minutos.

Por otro lado, se realizó una recta de calibrado con Trolox (Sigma–Aldrich, Alemania) que permitió expresar el porcentaje de inhibición del DPPH de forma cuantitativa (milimoles de Trolox equivalente /100 g sf).

2.5 ENSAYOS *IN VITRO*

2.5.1. Cultivo de la línea celular RAW 264.7 y pase de células

La línea celular RAW 264.7 (Figura 4) es una línea de macrófagos murinos obtenida a partir del líquido ascítico generado por un tumor inducido en ratones macho Balb/C mediante inyección intraperitoneal del virus de la leucemia Abselon (A-MuLV). Se trata de células de la Colección Europea de Cultivos Celulares (European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, GB) proporcionadas por la unidad de cultivos del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de València.

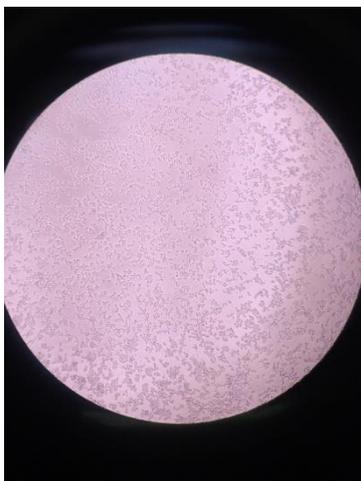


FIGURA 4. Fotografía de la línea celular RAW 264.7

El cultivo se realizó en frascos de 75 cm² con medio DMEM GlutaMAX 1 g/L glucosa suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomycin) y se incubaron a 37 °C en un incubador celular (Thermo Scientific Forma Steri-Cycle, Ohio, Estados Unidos) con atmósfera controlada al 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las células crecen fijadas en la superficie del frasco, aunque algunas pueden crecer en suspensión.

Cada 2 días se realizó un pase de células, para ello se eliminó el medio de cultivo mediante aspersion y se añadió 5 mL de medio 10% SFB. Mediante un raspador se hizo un raspado de la superficie del frasco para recuperar las células. Finalizado el raspado, se traspasó 5 mL a un tubo tipo "falcon" que contenía previamente 5 mL del medio 10 % SFB. A continuación, se cogió 1 mL, se pasó a un frasco nuevo que contenía 7 mL de 10% de SFB y se metió en la incubadora durante 48 h

El recuento celular se realizó tiñendo las células con el colorante vital Trypan blue (Sigma-Aldrich) añadiendo 180µL del colorante a 20 µL de células y empleando una cámara de Neubauer-Improved (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania) para su recuento. Una vez obtenido el número de células por mililitro, se siembran en placas de 96 pocillos a una concentración de 60.000 células por pocillo. A las 24 h se cambia el medio de cultivo a medio con un 0,5% de SFB y se dejan las células en reposo en el incubador durante 2 h.

2.5.2. Ensayos de citotoxicidad celular.

Del extracto liofilizado obtenido previamente con una concentración de 100 mg/mL, se realizaron diferentes diluciones para poder estudiar la toxicidad de las muestras a diferentes concentraciones y así determinar cuál de ellas no resulta toxica. De esta forma, se observó la toxicidad partiendo de diluciones hechas a partir de concentraciones de 100, 10 y 1 mg/mL como datos iniciales. Las concentraciones varían en función de los resultados obtenidos.

2.5.2.1. Evaluación de la citotoxicidad por MTT.

Se siguió el protocolo descrito por Mosmann (1983). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la reducción de MTT a formazán mediante una reacción catalizada por las enzimas succinildeshidrogenasas mitocondriales. La señal generada por esta reacción depende directamente del grado de activación de las células.

Este método detecta solamente células vivas y se puede emplear para determinar la citotoxicidad, proliferación y activación celular.

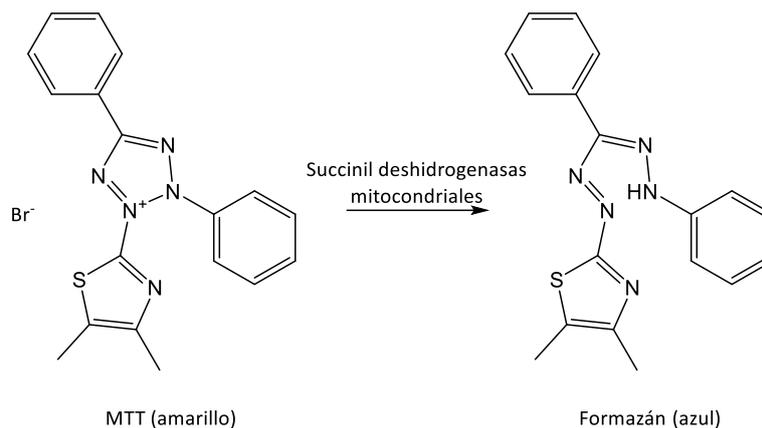


FIGURA 5. Reducción de MTT a formazán.

Pasado el tiempo de incubación de la placa con células se añaden 5 μL del extracto del liofilizado a distintas concentraciones (100, 10 y 1 mg/mL) obteniendo una concentración final en el pocillo de 2,5, 0,25 y 0,0025 mg/mL , respectivamente y se deja incubar durante 24 horas. A continuación, se añaden 20 μL MTT en cada pocillo a una concentración de 5 mg/mL , de esta forma obtenemos una concentración final en el pocillo de 0,5 mg/mL y se incuba durante 1 hora aproximadamente. Seguidamente, se comprueba la aparición de los depósitos de formazán, se elimina todo el volumen del pocillo y se añaden 200 μL de DMSO que disuelve los depósitos de formazán, dando lugar a una solución de un color azulado. Tras dejar la placa 1 h a temperatura ambiente, la absorbancia se mide a 570 nm y a 630 nm como longitud de onda de referencia en el lector de placas Bio-Rad iMark™ Microplate reader.

La viabilidad celular se determina según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{Am}{Ac} \times 100$$

Siendo Am la medida aritmética de la absorbancia de la muestra y Ac la media aritmética de la absorbancia del control.

2.5.3. Determinación de la producción de NO.

Según indica Pozo *et al.* (1998), el óxido nítrico (NO) es una molécula que actúa como un mensajero intercelular que regula la activación de plaquetas y las respuestas inmunes en el sistema nervioso central. Además, es una molécula citotóxica si es sintetizada por macrófagos activados que está implicada en la eliminación de bacterias, virus, protozoos y células tumorales.

Peter Griess describió en 1879 un método para la determinación de la producción de NO. El método se basa en la reacción química que se produce al adicionar una sulfanilamida a un medio ácido que contenga nitritos. En esas condiciones se forma una sal de diazonio. Al añadir N-(1-naftil)-etilendiamina se forma un cromóforo de grupos azo que puede detectarse espectrofotométricamente a 540 nm.

Así pues, transcurrido el tiempo de incubación de las células, se añadieron 5 μL del extracto

del liofilizado a distintas concentraciones en función de los datos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad. Se metió en la incubadora durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se estimularon con 20 µL LPS en cada pocillo. A las 24 h se tomaron 100 µL de sobrenadante y se pasaron a otra placa de 96 pocillos.

A esos 100 µL de sobrenadante se añadieron otros 100 µL de reactivo de Griess. Finalmente, se incubó la placa durante 10 min y se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de carácter simple con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$), para establecer las diferencias existentes entre las muestras. El análisis se realizó empleando el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.17. Por otra parte se realizaron análisis de correlaciones de Pearson entre la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos estudiados con un nivel de confianza del 95%.

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO DE LA LIOFILIZACIÓN Y DE LA ADICIÓN DE GOMA ARÁBIGA

4.1.1 Contenido en humedad.

En la siguiente tabla (Tabla 2) se describe la media y la desviación estándar, entre paréntesis, de los valores obtenidos de humedad (x_w) de las diferentes muestras estudiadas.

Tabla 2. Valores medios de contenido de agua (x_w) y su correspondiente desviación estándar, expresado en g de agua/ 100 g de muestra.

Muestra	x_w
F	90,78 (0,16)
FL	2,4 (0,2) ^a
FLG	2,29 (0,08) ^a
M	82,6 (0,4)
ML	1,53 (0,12) ^b
MLG	1,07 (0,17) ^a

^{a-b} Para cada fruta, la misma letra en superíndice indica los grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($p < 0,05$) entre las muestras liofilizadas.

La fresa fresca presentó unos valores de humedad de 90,78 g de agua/100 g de producto, valores que fueron similares a los encontrados por otros autores para la misma fruta fresca (Moraga *et al.*, 2006). Por su parte, la mora presentó un contenido en agua de 82,62 g de agua/100 g de producto, valor ligeramente superior a los reportados por otros autores (Ercisli y Orhan, 2007), probablemente debido al distinto estado de madurez u origen de las muestras utilizadas.

Las muestras de fresa en polvo, FL, presentaron valores de humedad de 2,4 g de agua/100 g de producto, ligeramente superiores ($p > 0,05$) a las muestras FLG con goma arábiga (2,29 g de

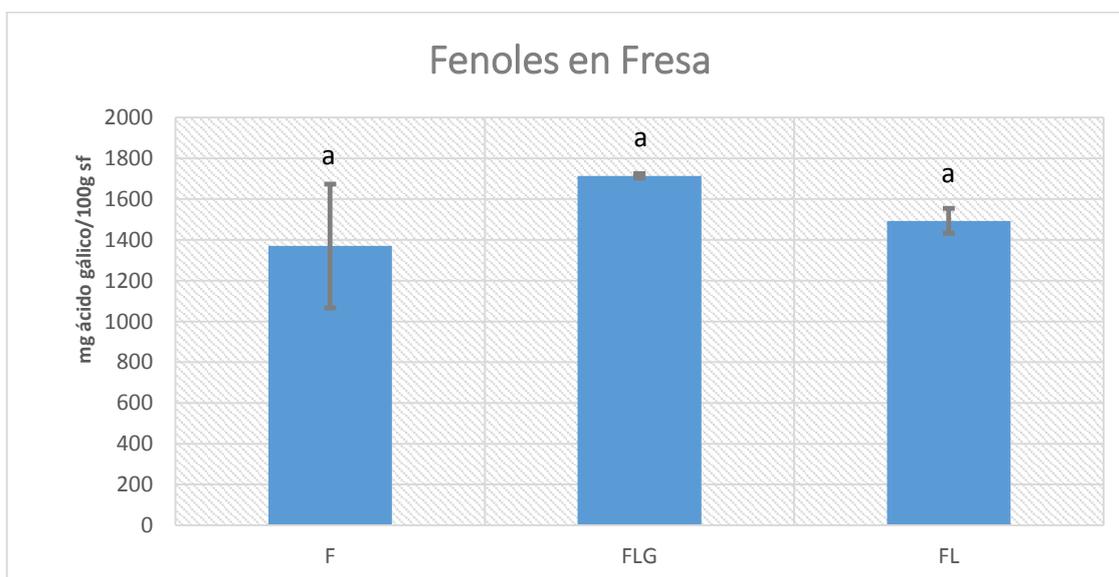
agua/100 g de producto). La liofilización de la mora permitió obtener muestras con menor humedad que con la fresa, obteniéndose valores de 1,53 y 1,07 g agua/ 100 g muestra, para ML y MLG, respectivamente. Se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el contenido de humedad en la mora liofilizada con goma arábiga en comparación con la mora liofilizada sin este soluto. Algunos estudios han evidenciado una disminución de humedad en productos liofilizados al adicionar solutos a la muestras, tales como goma arábiga o maltodextrina proporcionando una disminución del carácter higroscópico y mayor estabilidad fisicoquímica a los productos en polvo obtenidos (Mosquera, 2010).

En todos los casos se consiguió un producto liofilizado en polvo con unos valores de humedad del orden de los sugeridos por otros autores para alimentos liofilizados (Fellows, 2000).

4.1.2 Contenido en compuestos fitoquímicos.

Hoy en día existe una gran variedad de frutas catalogadas como fuentes naturales de compuestos fenólicos, importantes por su reconocida actividad antioxidante. Este es el caso de los frutos estudiados en este trabajo. Como ya se ha comentado en la parte de Introducción, el consumo de alimentos ricos en estos compuestos se ha asociado a la reducción del riesgo a sufrir enfermedades cardiovasculares, apoplejías y ciertas formas de cáncer por sus compuestos fenólicos y elevada capacidad antioxidante (Klimczak *et al.*, 2007). Variados estudios reportan el poder curativo y el uso terapéutico de estos compuestos presentes en la fresa (Mudnic *et al.*, 2009; Tulipani *et al.*, 2009; O'Mahony, 2010).

El contenido de fenoles totales en las distintas muestras de fresa y mora se muestra en las figuras 6 y 7. Todos los resultados están expresados como mg de ácido gálico (AG)/ 100 g de sólidos de fruta.



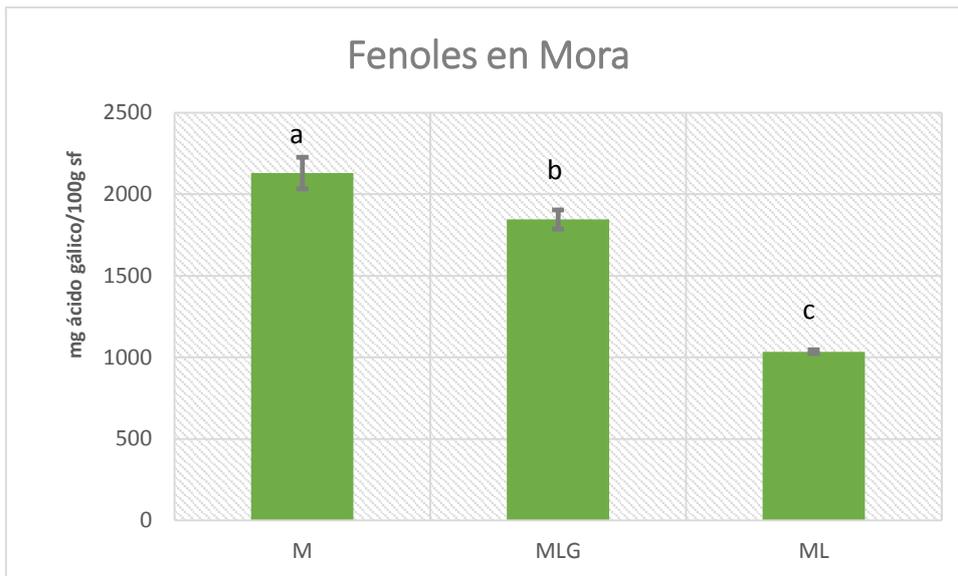
a-c: Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

FIGURA 6. Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico/100 g sf) de las diferentes muestras de fresa.

Los valores obtenidos en el contenido de fenoles totales para la fresa fresca fue de 126,32 mg de AG/ 100 g de fruta, valores ligeramente inferiores a los que obtuvieron en otros estudios sobre la fresa (Da Silva *et al.*, 2008). El contenido de fenoles totales de las frutas varía en función de la temperatura, genotipo, grado de madurez, tiempo de cosecha y el almacenamiento (Gunduz y Ozdemir, 2014).

Como puede observarse en la figura 6, la liofilización aumentó aunque no significativamente ($p > 0,05$) el contenido de fenoles totales de la fresa, en mayor medida en la muestras con goma arábica. Se produjo un aumento en estos compuestos de un 8,24% en FL y 26% en FLG. El aumento en compuestos fenólicos debido al proceso de liofilización ha sido observado en otros estudios (Wu *et al.*, 2010). Esto puede ser debido a la congelación de la materia prima previa a la liofilización. Durante la congelación se forman cristales de hielo capaces de romper la estructura celular, de esta forma se facilita la entrada del disolvente y por consiguiente mejorando la extracción de los compuestos fenólicos. De la misma manera, otros estudios han observado una mayor cantidad de compuestos fenólicos, como por ejemplo las antocianinas, en frutos justo después de la congelación, atribuyéndose a una mayor eficacia de su extracción a partir de frutas congeladas en comparación con la de las frutas frescas, esto se debe a una ruptura celular durante la congelación y descongelación. Leong y Oey (2012) encontraron un aumento de 22 a 108% de antocianinas totales después de la congelación en cerezas, nectarinas, melocotones y ciruelas. Diversos estudios explican que además, el secado por liofilización aumenta la porosidad del tejido del alimento haciendo que haya una mayor eficacia en la extracción de compuestos fenólicos (Vashisth *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2010). En la fresa liofilizada con goma arábica el aumento en estos compuestos fue mayor (25%). Este aumento respecto a la muestra sin este soluto podría deberse a la acción protectora del mismo, actuando como encapsulante de los compuestos fenólicos. Algunos estudios estudiaron el efecto protector de la adición de solutos de alto peso molecular. Sanchez *et al.* (2013) observó que el contenido de polifenoles de vino tinto liofilizado con maltodextrina preservó hasta un 97,8% el contenido fenólico de las muestras.

En la Figura 7 se observan los valores medios de fenoles totales de las muestras de mora. En general el contenido en fenoles totales de la mora fue mayor que en la fresa. La mora es un alimento rico en compuestos fenólicos confiriéndole efectos beneficiosos en la salud (Özgen *et al.*, 2009).

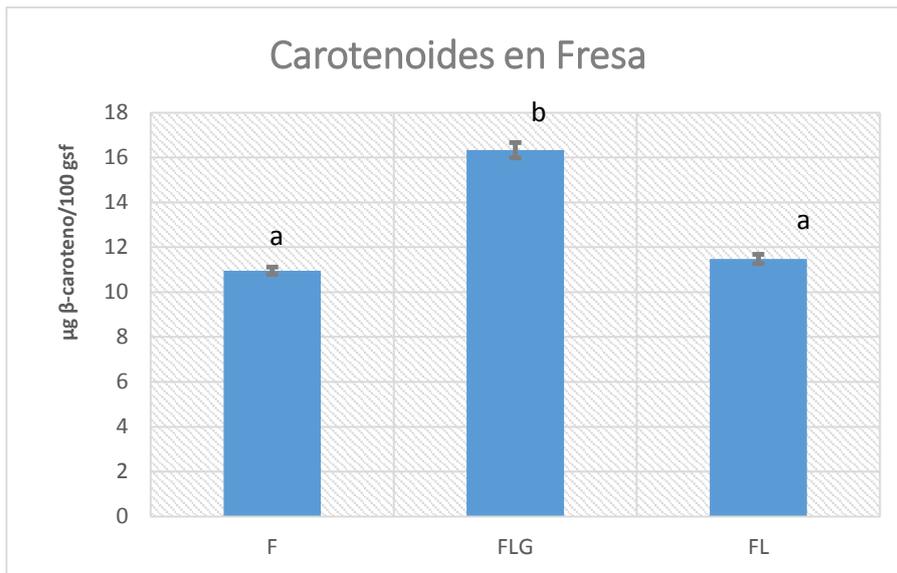


a-c: Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

FIGURA 7. Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico/100 g sp) de las diferentes muestras de mora.

Los valores obtenidos del contenido de fenoles totales de la mora fresca fueron 370,04 mg de AG/ 100 g de fruta. Valores mayores a los encontrados en la fresa y un poco más elevados que los obtenidos por otros estudios (Donno *et al.*, 2015). En este caso la liofilización disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el contenido en fenoles de la mora, se observó una pérdida mayor en la muestra sin goma arábiga. Las pérdidas fueron de 51,44 y 13,36% para ML y MLG, respectivamente. Esta observación coincide con estudios realizados por otros investigadores. Asami *et al.* (2003), observó que los mayores contenidos de compuestos fenólicos totales de muestras de bayas, fresa y maíz se encontraban en las muestras sin tratar, seguidas de los productos liofilizados y de los secados por aire caliente. Por su parte, Vashisth *et al.* (2011) encontraron una disminución en el contenido de compuestos fenólicos en pulpa de uva liofilizada. Otro ejemplo lo encontramos en el estudio realizado por Wojdylo *et al.* (2009), que observó un ligero descenso en la concentración de fenoles totales en fresas liofilizadas. El contradictorio efecto ocasionado por el secado por liofilización sobre estas sustancias entre las muestras de fresa y mora, puede ser debido a que la ruptura de la estructura celular ocasionada durante la congelación de las muestras debido a la formación de cristales de hielo, además de poder facilitar la extracción de los mismos, también puede facilitar la liberación de enzimas oxidativas que al no ser inactivadas posteriormente, al no alcanzarse elevadas temperaturas durante la liofilización, pueden degradar los compuestos fenólicos. Además, algunos estudios han descrito la diferente sensibilidad a factores de degradación como la temperatura, la luz o la acción de enzimas de los compuestos fenólicos dependiendo de su composición (Garau *et al.*, 2007). Por otro lado, la adición de goma arábiga parece ejercer un papel protector (Yousefi *et al.*, 2015) en los compuestos fenólicos de la mora durante el proceso de liofilización, del mismo modo que en el caso de la fresa.

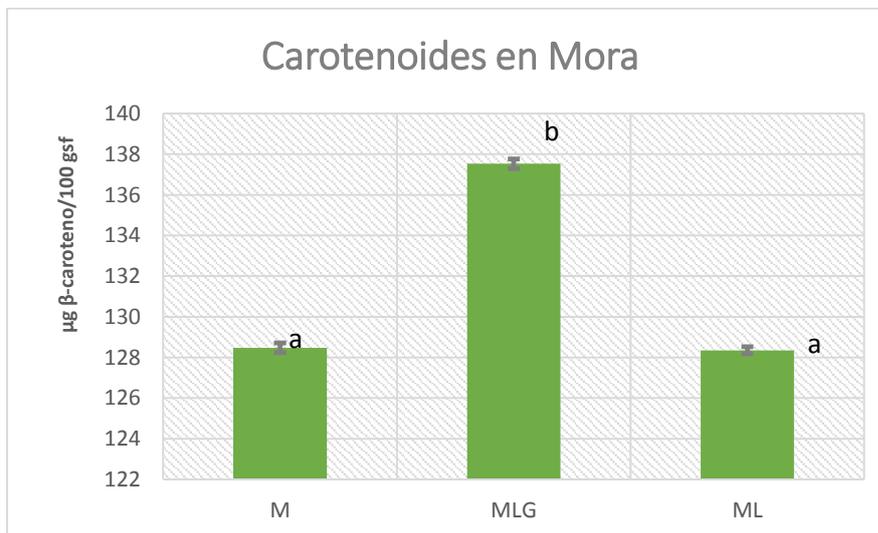
En las figuras 8 y 9 se muestran los valores obtenidos en la cuantificación de carotenoides totales en la fresa y mora. Los resultados se encuentran expresados como μg de β -caroteno/ 100 g solutos de fruta.



a-c: Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

FIGURA 8. Contenido en carotenoides totales (µg β-caroteno/100 gsf) de las diferentes muestras de fresa.

La fresa mostró menor contenido en compuestos carotenoides que la mora. Los valores obtenidos en el contenido de carotenoides fue de 10,947 µg de β-caroteno/ 100 g sf y de 128,479 µg de β-caroteno/ 100 g sf para la fresa y mora frescas, respectivamente. El comportamiento de ambas frutas fue similar al someterlas al proceso de liofilización. Así, la liofilización no causó cambios ($p > 0,05$) en el contenido en carotenoides de FL y ML, y sin embargo, aumentó significativamente ($p < 0,05$) en las muestras liofilizadas con goma arábica (aumento del 49% en FLG y 7% en MLG, respecto a F y M respectivamente).



a-c: Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

FIGURA 9. Contenido en carotenoides totales (µg β-caroteno/100 gsf) de las diferentes muestras de mora.

Estos resultados pueden ser debidos, tal y como se ha comentado para los compuestos fenólicos, porque la ruptura celular ocasionada durante la congelación de las muestras puede facilitar la extracción de los compuestos bioactivos (Hossain *et al.*, 2010). Además, la liofilización debido a que utiliza bajas temperaturas y bajas presiones, protege a los carotenoides de la oxidación y la degradación que se vería amenazados si se aplicaran otros tratamientos en los que se aplicaran temperaturas elevadas (Wu *et al.*, 2010). La adición de goma arábica proporciona una mayor estabilidad de estos componentes, tal como han descrito otros estudios, protegiendo los compuestos bioactivos frente a la humedad, el oxígeno, la temperatura u otras reacciones químicas que puedan degradarlo (Zuidam y Nedoviæ, 2009, Parra, 2010). En el estudio realizado por Rascon *et al.* (2011) se utilizó este efecto protector de la goma arábica para retener el contenido de carotenoides de praprika.

4.1.3 Actividad antioxidante de los extractos.

En la tabla 3 se muestran los valores medios de la actividad antioxidante analizada por tres métodos diferentes en el extracto 1, utilizado para la extracción y cuantificación de los fenoles totales de la fresa.

Tabla 3. Valores medios de actividad antioxidante, en mmol Trolox Equivalente/100 g solutos de fruta, y desviación estándar en el extracto 1 de las muestras de fresa.

Muestra	DPPH	ABTS	FRAP
F	8,3(0,8) ^b	9 (2) ^b	7,9 (0,2) ^c
FL	4,64 (0,02) ^a	5,7(0,4) ^a	4,15 (0,01) ^a
FLG	4,74 (0,07) ^a	6,1 (0,6) ^a	6,83 (0,52) ^b

a-c: Para cada método de análisis, superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

En general, en todos los métodos de análisis utilizados, la fresa fresca fue la muestra que presentó mayor ($p < 0,05$) actividad antioxidante. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la actividad antioxidante de las muestras liofilizadas con y sin goma arábica en los métodos de análisis DPPH y ABTS. En general se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) con una pérdida del 44% de la actividad antioxidante al aplicar la liofilización. Al observar el efecto del tratamiento de liofilización con adición de goma arábica se vió una disminución ($p < 0,05$) de un 42,87%, 33,15% y 13,13% en la actividad antioxidante en los métodos DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Únicamente con el método FRAP se detectaron diferencias entre la actividad antioxidante de FL y FLG. Además, algunos estudios han puesto de manifiesto las propiedades antioxidantes que tiene la goma arábica (Montenegro *et al.*, 2012).

El diferente comportamiento entre los fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto 1, puede ser debido a que en la extracción con la disolución metanol:agua se podrían haber extraído otros compuestos hidrosolubles, como por ejemplo la vitamina C, que puede perderse durante el proceso de liofilización, contribuyendo a la disminución observada de la actividad antioxidante debido a este proceso (Asami *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Castañeda, 2010).

En la tabla 4 se muestran los valores medios y sus desviaciones entre paréntesis de la actividad antioxidante analizada por tres métodos diferentes en el extracto 1 de las muestras de mora.

Tabla 4. Valores medios de actividad antioxidante, en mmol Trolox Equivalente/100 g solutos de fruta, y desviación estándar en el extracto 1 de las muestras de mora.

Muestra	DPPH	ABTS	FRAP
M	9 (2) ^b	8,271 (0,01) ^c	5,9 (1,3) ^a
ML	4,64 (0,01) ^a	5,34 (0,05) ^a	5,58 (0,02) ^a
MLG	4,95 (0,07) ^a	7,27 (0,01) ^b	5,86 (0,11) ^a

a-c: Superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

En el caso de la mora, también es la muestra fresca la que presentó mayor ($p < 0,05$) actividad antioxidante. El comportamiento observado en los compuestos fenólicos de la mora parece reflejarse con los cambios observados en su actividad antioxidante debido al procesado. De esta forma, comparando la actividad antioxidante de la M con ML se observó una reducción significativa ($p < 0,05$) de la misma del 48,42% y 35,43% en los métodos DPPH y ABTS, respectivamente. La muestra MLG presentó unas pérdidas significativas ($p < 0,05$) de la actividad antioxidante del 45% y 12.10%, en el método DPPH y ABTS, respectivamente; pérdidas menores que sin la adición de este soluto. Únicamente con el método FRAP no se apreciaron cambios significativos en esta propiedad ocasionados por la liofilización, con y sin la adición de goma arábica.

A continuación, en la tabla 5 se presenta las medidas de actividad antioxidante que se analizaron por los tres métodos empleados al extracto 2, empleado para la extracción y cuantificación de los carotenoides de la fresa. En general los valores de actividad antioxidante de los extractos lipofílicos fueron inferiores a los obtenidos en el extracto 1, tal y como han observado otros autores (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Esto parece lógico, porque también el contenido en fenoles del extracto 1 fue mucho mayor que el contenido en carotenoides del extracto 2.

Tabla 5. Valores medios de actividad antioxidante, en mmol Trolox Equivalente/100 g solidos de fruta, y desviación estándar en el extracto 2 de las muestras de fresa.

Muestra	DPPH	ABTS	FRAP
F	0,37 (0,11) ^a	1,0 (0,3) ^a	0,25 (0,02) ^a
FL	0,69 (0,03) ^b	2,0 (0,2) ^b	0,51 (0,14) ^b
FLG	0,83 (0,02) ^c	2,3 (0,3) ^b	0,7 (0,2) ^b

a-c: Superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

En todos los casos, FLG fue la muestra que presentó mayor actividad antioxidante, aumentando entorno a un 125% respecto a la fruta fresca. Con los métodos ABTS y FRAP no se vio efecto protector de la goma arábica, no observándose diferencias significativas ($p > 0,05$) en la actividad antioxidante de FL y FLG. La mayor actividad antioxidante de las muestras liofilizadas puede estar relacionada con la mayor extracción de compuestos antioxidantes producidos debido a la ruptura celular producida durante la congelación de las muestras previa a la liofilización, tal y como ya se ha comentado.

La tabla 6 presenta las medidas de actividad antioxidante que se analizaron por los tres métodos empleados en el extracto 2 de las muestras de mora.

Tabla 6. Valores medios de actividad antioxidante, en mmol Trolox Equivalente/100 g solutos de fruta, y desviación estándar en el extracto 2 de las muestras de mora.

Muestra	DPPH	ABTS	FRAP
M	0,65 (0,10) ^a	0,6 (0,2) ^a	0,37 (0,09) ^a
ML	1,03 (0,12) ^b	2,5 (0,8) ^b	0,52 (0,11) ^a
MLG	1,12 (0,15) ^b	3,5 (0,2) ^b	1,1 (0,2) ^b

a-c: Para cada método de análisis, superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Al observar la tabla 6, vemos que en todos los casos, excepto con el método FRAP, la actividad antioxidante de la mora liofilizada fue mayor ($p < 0,05$) que la fruta fresca. Con el método de análisis DPPH y ABTS no se vieron diferencias entre las muestras liofilizadas con y sin la adición de goma arábica. Mediante el método FRAP, la muestra liofilizada con goma arábica presentó una actividad antioxidante significativamente ($p < 0,05$) mayor.

Con el objetivo de estimar la capacidad antioxidante total de las muestras, se sumaron las actividades antioxidantes de los dos extractos para cada muestra (Van der Berg *et al.*, 1999; Pérez-Jiménez *et al.*, 2008), obteniéndose los valores mostrados en la tabla 7.

Tabla 7. Actividad antioxidante total, en mmol Trolox Equivalente/100 g solutos de fruta, y desviación estándar de las muestras de fresa y mora.

Muestra	DPPH	ABTS	FRAP
F	8,7 (0,9) ^b	10 (2) ^a	8,1 (0,2) ^b
FL	5,33 (0,02) ^a	7,7 (0,5) ^a	4,65 (0,12) ^a
FLG	5,6 (0,06) ^a	8,4 (0,7) ^a	7,5 (0,4) ^b
M	10 (2) ^b	8,8 (0,2) ^b	6,3 (1,3) ^a
ML	5,67 (0,13) ^a	7,8 (0,8) ^a	6,10 (0,12) ^a
MLG	6,1 (0,2) ^a	10,8 (0,2) ^c	6,89 (0,13) ^a

a-c: Para cada fruta y para cada método, superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

En general, tanto en fresa como en la mora, las muestras que presentaron mayor actividad antioxidante fueron las frutas frescas sin tratar. En la fresa se observaron pérdidas significativas ($p < 0,05$) de AAO al aplicar la liofilización de un 38,7% y 42,52% en los métodos DPPH y FRAP,

respectivamente. El tratamiento de liofilización con goma arábica provocó pérdidas significativas ($p < 0,05$) del 35% en esta propiedad cuando se analizó con el método DPPH. No se observaron cambios significativos en la AAO de las muestras de fresa con el método ABTS. En cuanto a la mora, se produjeron pérdidas significativas ($p < 0,05$) en la actividad antioxidante de los productos liofilizados de un 43,3% y 12% en DPPH y ABTS, respectivamente. Al añadir la goma arábica también se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) de la actividad antioxidante aunque en menor medida, con pérdidas del 39% en método DPPH. Únicamente en el método ABTS la muestra MLG mostró mayor ($p < 0,05$) actividad antioxidante que la mora fresca (ganancias del 21,75%). El método FRAP empleado en el análisis de la mora y el método ABTS empleado en fresa no presentaron diferencias significativas en la actividad antioxidante debidas al tratamiento (con o sin adición de goma arábica) comparando la fruta fresca, lo que indica estos métodos de análisis no son tan sensibles a los cambios producidos en los compuestos antioxidantes debidos al procesado.

4.2 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS FITOQUÍMICOS Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante parece dependiente de la cantidad de compuestos bioactivos que presentaron las muestras, como los compuestos fenólicos y carotenoides analizados. Numerosos estudios han evidenciado dicha relación, un ejemplo de ello es un estudio realizado en fresas, donde se observó que la reducción ocasionada en el contenido de vitamina C, compuestos fenólicos y carotenoides totales en la fabricación de puré, zumo y néctar dio lugar a una reducción en su actividad antioxidante (Klopotek *et al.*, 2005; Boeing *et al.*, 2014)

Según lo descrito por Boeing *et al.* (2014), no existe un método de extracción de compuestos bioactivos única, ya que su eficacia depende de varios factores como el tamaño de partícula, el método de extracción que se utilice, la presencia de sustancias que puedan interferir, así como la naturaleza del compuesto bioactivo, etc.

Para identificar si existe alguna correlación entre de los métodos de cuantificación de la actividad antioxidante utilizados y cada uno de los compuestos extraídos analizados, se realizaron análisis estadísticos de correlación de Pearson (Tablas 8 y 9). El rango de este coeficiente de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables.

4.2.1 Análisis de correlación en los extractos de fresa

En la siguiente tabla (Tabla 8) se muestran el grado de asociación entre los fenoles, los carotenoides y los distintos métodos de cuantificación de la actividad antioxidante en la fresa.

Tabla 8. Coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante por el método FRAP, ABTS y DPPH, y los fenoles y carotenoides de la fresa.

	DPPH	ABTS	FRAP
Fenoles Totales	-0,4486	-0,7037*	-0,0616
Carotenoides	0,7525*	0,6435	0,6895*

* Correlaciones estadísticamente significativas (nivel de confianza 95%).

Los resultados obtenidos en las correlaciones de fenoles de fresa nos indicaron que estos compuestos mostraron correlaciones negativas con todos los métodos de análisis de la actividad antioxidante. Además, el método significativamente ($p < 0,05$) más correlacionado con los fenoles fue el ABTS. La presencia de correlaciones significativas o no significativas entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante puede depender de la fuerte presencia otras sustancias presentes en las frutas que interfieren que en el resultado, tales como ácido ascórbico, minerales, etc. (Deepa *et al.*, 2006 Moo-Huchin *et al.*, 2014).

En la tabla 8 se puede ver que se produjeron correlaciones positivas entre todos los métodos de análisis de la AAO y los carotenoides. De entre todos ellos, el método significativamente ($p < 0,05$) más correlacionado fue el DPPH, con una correlación positiva de 0,7525. El método FRAP también mostró correlaciones significativas con los carotenoides (0,6895).

4.2.2 Análisis de correlación en los extractos de mora

La tabla 9 muestra el grado de asociación entre los fenoles, los carotenoides y los distintos métodos de cuantificación de la actividad antioxidante en la mora.

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante total por el método FRAP, ABTS y DPPH, con los fenoles y carotenoides de la mora.

	DPPH	ABTS	FRAP
Fenoles Totales	0,6214	0,9892*	0,1327
Carotenoides	0,5796	0,7261*	0,9115*

* Correlaciones estadísticamente significativas (nivel de confianza 95%).

Los resultados obtenidos en las correlaciones de Pearson nos indican que los fenoles estuvieron positivamente correlacionados con los tres métodos de análisis de la actividad antioxidante. El método ABTS fue el que presentó mejor correlación significativa (0,9892), este hecho también coincide con el reportado por otros autores (Gil y Rojano, 2009). Estudiando la relación entre los métodos, se observó que los métodos FRAP y DPPH mostraron muy buena correlación, con correlaciones significativas entre ellos, la razón de esto podría ser que ambos métodos se basan en reacciones redox (Huang *et al.*, 2005).

En la tabla 9 se puede ver que se produjeron correlaciones positivas entre todos los métodos de análisis de la AAO y los carotenoides. El método significativamente de medida de la actividad antioxidante más correlacionado ($p < 0,05$) con los carotenoides fue el FRAP, con una correlación de 0,9115. El ABTS también mostró correlaciones significativas con los carotenoides aunque en menor medida (0,7261).

5. RESULTADOS ESTUDIOS *IN VITRO*.

A continuación se presentan los resultados obtenidos *In vitro* de la actividad antiinflamatoria y la citotoxicidad de los compuestos bioactivos analizados en el presente estudio a distintos tratamientos

5.1. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y CITOTOXICIDAD.

En primer lugar, se determinó la dilución de trabajo no tóxica. Para ello se empleó el ensayo de reducción de MTT, que determina la viabilidad celular basándose en la capacidad de las células vivas de producir formazán a partir del MTT. Por tanto, este ensayo sirve para evaluar tanto la viabilidad como la proliferación celular.

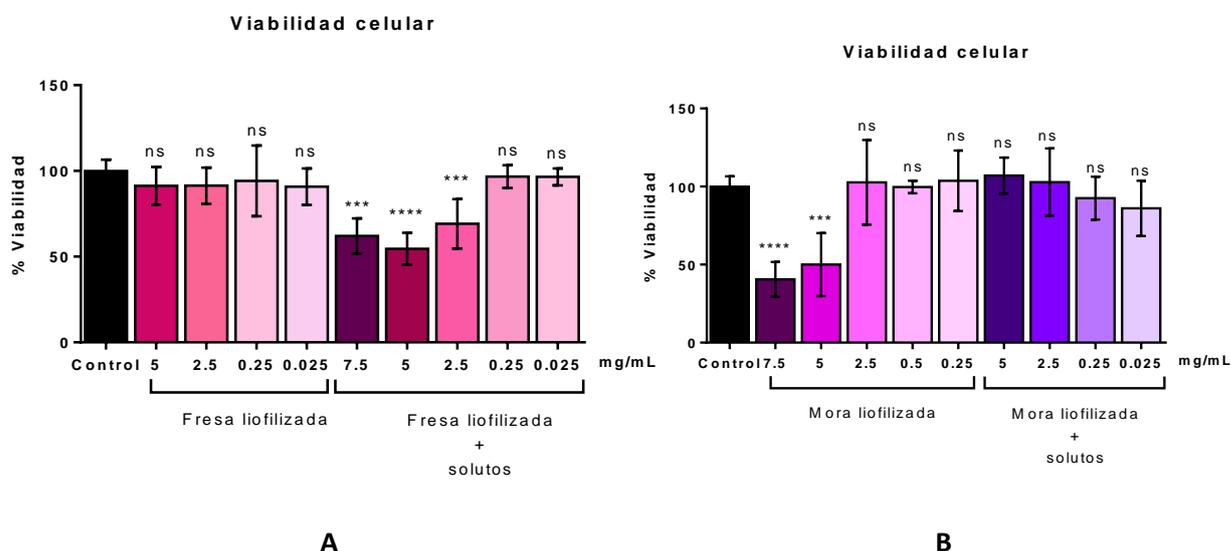


FIGURA 10. Evaluación de la citotoxicidad celular por medio de la reducción de MTT a formazán. (A) Evaluación de la viabilidad celular de fresa liofilizada sin solutos y con solutos. (B) Evaluación de la viabilidad celular de mora liofilizada sin solutos y con solutos. Los datos se expresan como la media \pm error estándar. Las diferencias de cada dosis de cada muestra respecto al control se determinaron por medio del análisis de varianza ANOVA seguido del test de la *t* de Dunnett, siendo **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$; ns = diferencias no significativas.

Tal como se muestra en la figura 10A, la fresa liofilizada no presentó toxicidad a las concentraciones ensayadas. En cambio, la fresa liofilizada con solutos presentó toxicidad a partir de una concentración de 2,5 mg/mL. En el caso de la mora (figura 10B), se observa que la muestra liofilizada con solutos no presentó toxicidad a ninguna concentración ensayada, pero en el caso de la mora liofilizada sin solutos, la concentración de 5 mg/mL ya resultó tóxica (se observa una pérdida de la viabilidad de aproximadamente el 50%). Por ello, las concentraciones de trabajo establecidas para los análisis posteriores fueron menores a 5 mg/mL.

5.2. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO

Los polifenoles, aislados o como constituyentes de una fracción, presentan capacidad para actuar como potenciales antioxidantes protegiendo los tejidos corporales frente al estrés oxidativo así como frente a enfermedades asociadas a estas condiciones (Sies *et al.*, 2005).

Los resultados del presente trabajo mostraron que aquellas concentraciones con mayor contenido en polifenoles ejercen una inhibición mayor de la producción de NO en macrófagos murinos estimulados con LPS que aquellas concentraciones con menor contenido (figura 11), numerosos estudios han evidenciado que los extractos de polifenoles derivados de las frutas muestran efectos inhibitorios sobre la producción de NO, así como efecto antiinflamatorio (Wang y Mazza,2002; Lin y Tang,2008)

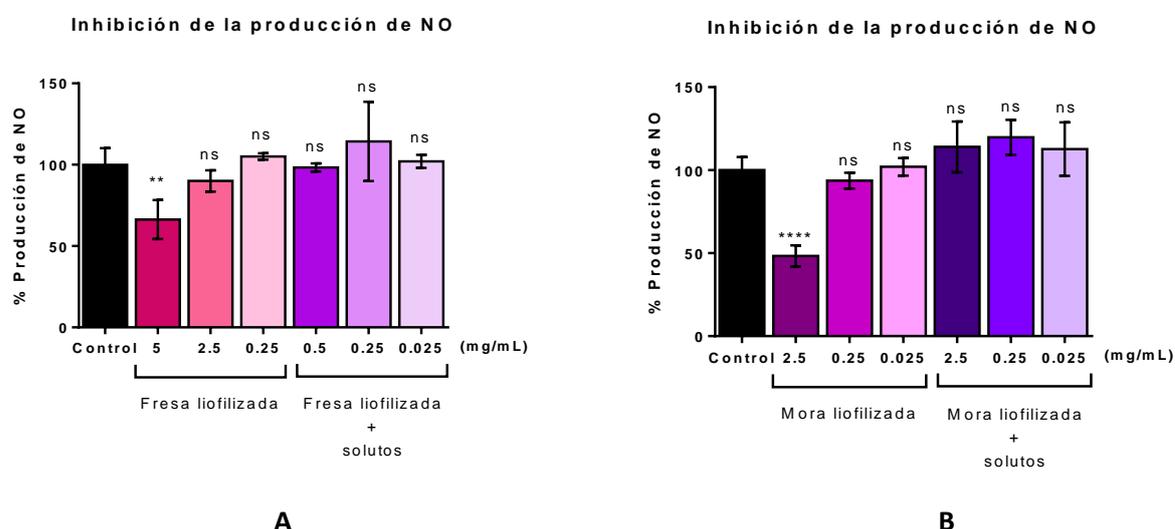


FIGURA 11. Evaluación de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7. (A) Evaluación de la inhibición de la producción de NO de fresa liofilizada sin solutos y con solutos. (B) Evaluación de la inhibición de la producción de NO de mora liofilizada sin solutos y con solutos. Los datos fueron obtenidos a partir de cuatro experimentos independientes y se expresan como la media \pm desviación estándar. La significación estadística de las diferencias de cada dosis respecto al control se determinaron por medio del análisis de varianza ANOVA seguido del test de la *t* de Dunnett (siendo * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$); ns = diferencias no significativas.

De esta forma, en las muestras de fresa liofilizada se observó una inhibición significativa en la producción de NO de alrededor del 40% a una concentración de 5 mg/mL, siendo ésta la mayor concentración medida en el estudio. En la fresa liofilizada con solutos no se observó inhibición a ninguna concentración. Por otra parte, la mora liofilizada presentó una inhibición significativa de la producción de NO del 50% a la mayor concentración estudiada (2.5 mg/mL). La mora liofilizada con solutos tampoco presentó inhibiciones significativas, por lo que se podría deducir que tal y como se ha explicado anteriormente a mayor contenido de compuestos fenólicos totales mayor actividad antiinflamatoria.

Resulta significativo el hecho de que los extractos liofilizados con solutos no mostraron efecto inhibitor del NO, a diferencia de los extractos sin solutos. En el caso de la fresa, debido a su toxicidad, no pudimos ensayar concentraciones superiores a 0,5 mg/mL de fresa liofilizada con solutos, lo que supone 10 veces menos concentración que la concentración efectiva de fresa liofilizada sin solutos. En el caso de la mora, a pesar de ensayar las mismas concentraciones con solutos y sin solutos, las muestras con solutos no mostraron actividad inhibitora. Aunque serían necesarios más experimentos para comprobarlo, nos planteamos como hipótesis que el encapsulado con goma arábica esté dificultando la acción de los polifenoles en las células. Nishi y Jayakrishnan (2004) estudiaron el tiempo de liberación de un fármaco (la primaquina) en tampón fosfato sódico tras ser encapsulado con goma arábica. Según sus resultados, manteniendo el fármaco encapsulado en dicho tampón en un baño oscilante (a 100 oscilaciones/min) a una temperatura de 37 °C, tras 24h sólo se había liberado un 15% del fármaco. Por tanto, cabe la posibilidad de que el encapsulado con goma arábica en nuestras muestras esté impidiendo la liberación rápida de los principios activos.

6. CONCLUSIONES

La liofilización parece una buena alternativa para obtener un producto en polvo con un alto contenido en compuestos bioactivos y actividad antioxidante, pudiendo ser empleado como parte de un alimento funcional o en elaboración de nutraceuticos. La mora presentó mayor contenido en compuestos fenólicos y carotenoides. En la fresa el procesado no ocasionó cambios significativos en el contenido en fitoquímicos, mientras que en la mora se produjeron pérdidas en fenoles. Las muestras liofilizadas con goma arábica mostraron el mayor contenido en carotenoides. En general, la incorporación de este soluto como aditivo tecnológico favoreció la estabilidad de los fitoquímicos estudiados, demostrando su acción encapsulante y protectora, y mejorando la actividad antioxidante de los productos en polvo. Para ambas frutas los extractos hidrofílicos mostraron mayor actividad antioxidante que los lipofílicos. En cuanto a la relación entre los compuestos fitoquímicos estudiados y los métodos de análisis de la actividad antioxidante, en la fresa se obtuvieron relaciones negativas entre los fenoles y la actividad antioxidante. Esto parece indicar que otros compuestos fitoquímicos no evaluados en este trabajo, como la vitamina C, pueden estar afectando a los resultados. En la mora tanto los fenoles como los carotenoides se relacionaron de manera positiva con la actividad antioxidante. Fue el FRAP el método que mejor se correlacionó con los carotenoides en ambas frutas.

Además, en los estudios *in vitro* se ve una clara inhibición en la producción de NO y por tanto un efecto antiinflamatorio en los extractos liofilizados sin solutos. Sin embargo, la presencia de solutos da lugar a una baja actividad antiinflamatoria, por lo que se plantea que la goma arábica dificulta la acción de los compuestos bioactivos en las células. Como hipótesis planteamos que esto sería debido a la lenta liberación de dichos compuestos en el medio celular. Sería por tanto necesario realizar un estudio de liberación de compuestos fenólicos en condiciones análogas al proceso digestivo para poder ensayar después la actividad antiinflamatoria.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aqil, F., Gupta, A., Munagala, R., Jeyabalan, J., Kausar, H., Sharma, R. J., & Gupta, R. C., 2012.** Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L.(Jamun, the Indian Blackberry). *Nutrition and cancer*, 64(3), 428-438.
- Avello, M., & Suwalsky, M., 2006.** Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494, 161-172.
- Aaby, K., Mazur, S., Nes, A., & Skrede, G., 2012.** Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*, 132(1), 86-97.
- Ayala-Zavala, J.F., Wang, S.Y., Wang, C.Y., Gonzalez-Aguilar, G.A., 2004.** Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Food Science and Technology* 37, 687–695
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M., 2001.** The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244.
- Adhikari, B.; Howes, T.; Bhandari, B. R.; Troung, V., 2004.** Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modeling. *Journal of Food Engineering*, 62 (1): 53-68.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K., 2002.** Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- AOAC (1997).** Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, Virginia, EEUU.
- AOAC, 1996.** Official methods of analysis. Arligton, Supplement March.
- Asami, D. K.; Hong, Y. J.; Barrett, D. M.; Mitchell, A. E., 2003.** Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5): 1237-1241.
- Bagchi, D., Sen, C.K., Bagchi, M., Atalay, M., 2004.** Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry* 69, 75–80.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J., 1999.** Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*, (299), 15-27.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J., 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Barba, A. O., Hurtado, M. C., Mata, M. S., Ruiz, V. F., & De Tejada, M. L. S., 2006.** Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95(2), 328-336.

- Boeing**, J. S., Barizão, É. O., Costa e Silva, B., Montanher, P. F., Almeida, V. D. C., & Visentainer, J. V., 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem Centr J*, 8, 48.
- Costa**, G., García-Díaz, D., Jimenez, P., Silva, P., 2013. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *Journal of Functional Foods*, 5, 539–549
- Cordenunsi**, B.R., Nascimento, J.R.O., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2002. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2581–2586.
- Crecente-Campo**, J., Nunes-Damaceno, M., Romero-Rodriguez, M. A., Vazquez-Oderiz, M. L., 2012. Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Selva). *Journal of Food Composition and Analysis*, 28, 23–30
- Calvo Bruzos**, S. C., Gómez Candela, C., Royo Bordonada, M. Á., & López Nomdedeu, C., 2011. Nutrición, salud y alimentos funcionales. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Cruzado**, M.; Cedrón, C., 2012. Nutracéuticos, alimentos funcionales y su producción. *Revista de Química*. Vol. XXVI. N°1-2.
- Castañeda**, J.; Miñano, H.A.; Jara, R.S.; Rodriguez G., 2010. Estudio comparativo de la pérdida de vitamina C en chalarina (*Casimiroa edulis*) por cuatro métodos de deshidratación. *Scientia Agropecuaria*, 1: 75-80.
- Donno**, D., Cerutti, A. K., Prgomet, I., Mellano, M. G., & Beccaro, G. L., 2015. Foodomics for mulberry fruit (*Morus* spp.): Analytical fingerprint as antioxidants' and health properties' determination tool. *Food Research International*, 69, 179-188.
- da Silva Pinto**, M., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I., 2008. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107(4), 1629-1635.
- Deepa**, N., Kaur, C., Singh, B., & Kapoor, H. C., 2006. Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 572-578.
- Elejalde** Guerra, J. I., 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. In *Anales de Medicina Interna* (Vol. 18, No. 6, pp. 50-59). Arán Ediciones, SL.
- Ercisli**, S., & Orhan, E., 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103(4), 1380-1384.
- FEPEX**, 2015. Campaña de frutos rojos 2014-2015: plantación de fresa y frambuesa y mora en producción. Dirección URL: <<http://www.fepex.es/noticias/detalle/campa%C3%B1a-frutos-rojos-2014-2015-plantaci%C3%B3n-fresa-frambuesa-mora-producci%C3%B3n>> (Consulta: 14 Agosto 2015)
- Fang**, Z., & Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
- Farinha**, P., 2014. Efeito da liofilização e da adição de goma arábica no potencial bioativo de extratos de morango e kiwi. Tesina Final de Master. Instituto Politécnico de Castelo Branco (Portugal).

- Fellows, P.**, 2000. Tecnología del procesado de los alimentos: principios y práctica. Acribia, Ed., Zaragoza. 706pp.
- Giampieri, F.**, Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M., 2012. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9-19.
- Gawlik-Dziki, U.**, 2012. Changes in the antioxidant activities of vegetables as a consequence of interactions between active compounds. *Journal of Functional Foods*, 4, 872–882.
- Garti, N.**, McClements, D.J., 2012 Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals .*Woodhead Publishing Limited*.
- Ghio, S.**, Barresi, A. A., & Rovero, G., 2000. A comparison of evaporative and conventional freezing prior to freeze-drying of fruits and vegetables. *Food and bioproducts processing*, 78(4), 187-192.
- Gabas, A. L.**, Telis, V. R. N., Sobral, P. J. A., & Telis-Romero, J., 2007. Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. *Journal of Food Engineering*, 82(2), 246-252.
- Gouin, S.**, 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330-347.
- Gracia, O.**, y de Gomas Naturales, S. D. C., 1991. La goma Arábica: una maravilla Natural que nos Beneficia a todos. *Industria Alimentaria. México*.
- Gündüz, K.**, & Özdemir, E., 2014. The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. *Food chemistry*, 155, 298-303.
- Garau, M.C.**, Simal, S., Roselló, C., Femenia, A., 2007. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fiber and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chemistry*, 104, 1014-1024.
- Gil, J. H.**; Rojano, B. A., 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3): 388-395.
- Hernanz, D.**, Recamales, A.F., Melendez-Martínez, A.J., Gonzales-Miret, M.L., Heredia, F.J., 2007. Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1846–1852.
- Huang, D.**; Ou, B.; Prior, R.L., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 1841-1856.
- Iniesta Ortiz, J. A.**, & Ramírez Carrera, E., 2005. The Arabic gum in the wine. *Viticultura Enología Profesional (España)*.
- Kaur, C**; Kapoor, H.C., 2001. “Antioxidants in fruits and vegetables – at millenium’s health”. *International Journal of Food Science and technology*, 36, 703-7025.
- Kuppusamy, P.**, Yusoff, M. M., Maniam, G. P., Ichwan, S. J. A., Soundharrajan, I., & Govindan, N. (2014). Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharmaceutica Sinica B*,4(3), 173-181.

- Krishnan**, S.; Kshirsagar, A.C.; Singhal, S.R., 2005. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*, 62: 309-315.
- Klimczak**, I., I., Malecka, M., Szlachta, M. and Gliszczynska-Swiglo, A., 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 313-322
- Klopotek**, Y., Otto, K., & Böhm, V., 2005. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5640-5646.
- Liang**, L.H., Wu, X.Y., Zhu, M.M., Zhao, W.G., Li, F., Zou, Y., et al., 2012. Chemical composition, nutritional value, and antioxidant activities of eight mulberry cultivars from China. *Article Pharmacognosy Magazine*, 8(31), 215–224.
- Lin**, J. Y., & Tang, C. Y., 2008. Strawberry, loquat, mulberry, and bitter melon juices exhibit prophylactic effects on LPS-induced inflammation using murine peritoneal macrophages. *Food Chemistry*, 107(4), 1587-1596.
- Leong**, S. Y., & Oey, I., 2012. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food chemistry*, 133(4), 1577-1587.
- MAGRAMA**, 2013. Datos del consumo alimentario en España 2013. Dirección URL :<[http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/PRESENTACION DATOS CONSUMO 2013_tcm7-321988.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/PRESENTACION_DATOS_CONSUMO_2013_tcm7-321988.pdf) > (Consulta: 14 Agosto 2015)
- MAGRAMA**, 2014. Campaña frutas y verduras de aquí y ahora. Dirección URL: <<http://www.alimentacion.es/es/campanas/frutas/fruta-y-verdura-de-aqui-y-ahora/default.aspx>> (Consulta: 14 Agosto 2015)
- Meiers**, S., Kemeny, M., Weyand, U., Gastpar, R., von Angerer, E., Marko, D., 2001. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2), 958–962.
- Madene**, A., Jacquot, M., Sher, J. y Desobry, S., 2006. Flavour encapsulation and controlled release- a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1-21
- Michiels**, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J., 2012. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4), 986-993.
- Munin**, A., & Edwards-Lévy, F., 2011. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829.
- Mosquera**, L.H., Moraga, G. and Martínez-Navarrete. N., 2009. Effect of arabic gum on the stability of freeze-dried fruit powders. Proceedings of the 2009 EFFoST Annual Conference New Challenges in Food Preservation Processing - Safety – Sustainability, Budapest, Hungary
- Mosquera**, L. H., Moraga, G., & Martínez-Navarrete, N., 2010. Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojó (Borojoa patinoi Cuatrec.) powder. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 72-78.
- Moon**, J. K., & Shibamoto, T., 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.

- Mosmann**, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1), 55-63.
- Moraga**, G., Martinez-Navarret, N., and Chiralt, A., 2006. Compositional changes of strawberry due to dehydration, cold storage and freezing–Thawing processes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(4),458–474.
- Mosquera** Mosquera, L. H., 2010. Influencia de la humedad y de la adición de solutos (maltodextrina o goma arábica) en las propiedades fisicoquímicas de borojó y fresa en polvo (doctoral dissertation).
- Mudnic**, D., Modun, I., Brizic, J., Vukovica, I., Generalic, V., Katalinic, T., Bilusicb, I. and Ljubenkov, M. B., 2009. Cardiovascular effects in vitro of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca*, L.) leaves. *Phytomedicine*, 16, 462–469
- Montenegro**, M. A.; Borsarelli, C. D.; Valle, L.; Boiero, M. L., 2012. *Gum Arabic: more than an edible emulsifier*. INTECH Open Access Publisher.
- Moo-Huchin**, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., y Vargas, M. D. L. V., ... & Sauri-Duch, E., 2014. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 152, 508-515.
- Nile**, S. H., & Park, S. W., 2014. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144.
- Naczk**, M., & Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Nishi**, K. K., & Jayakrishnan, A., 2004. Preparation and in vitro evaluation of primaquine-conjugated gum arabic microspheres. *Biomacromolecules*, 5(4), 1489-1495.
- O'Mahony**, R., 2010. The antibacterial properties of dietary fruit. *Bioactive Foods in Promoting Health. Chapter 10, p. 141-160. Elsevier Inc.*
- Özgen**, M., Serçe, S., & Kaya, C., 2009. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia Horticulturae*, 119(3), 275-279.
- Pineli**, L. D. L. D. O., Moretti, C. L., dos Santos, M. S., Campos, A. B., Brasileiro, A. V., Córdova, A. C., & Chiarello, M. D., 2011. Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 11-16.
- Pinto**, M.S, Lajolo, F.M., Genovese, M.I., 2008. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch). *Food Chemistry* 107, 1629–1635.
- Prior**, R. L., Wu, X., & Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Pulido**, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Pozo**, D., Osuna, C., Calvo, J. R., y Guerrero, J. M., 1998. Producción de óxido nítrico y su modulación en el sistema inmune y el sistema nervioso. *Arch Neuro science (Méx.)*, 2, 84-94.

- Parra Huertas, R. A.**, 2010. FOOD MICROENCAPSULATION: A REVIEW. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2), 5669-5684.
- Pérez-Jiménez, J.**; Arranz, S.; Taberner, M.; Díaz-Rubio, M.E.; Serrano, J.; Goñi, I.; Saura-Calixto, F., 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3):274–285.
- Roos, Y.**, 1995. Characterization of Food Polymers Using State Diagrams. *Journal of Food Engineering*, 24(3): 339-360(22)
- Re, R.**, Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rascón, M. P.**, Beristain, C. I., García, H. S., & Salgado, M. A., 2011. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and soy protein isolate as wall materials. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 549-557.
- Stoner, G. D.**, Wang, L. S., & Casto, B. C., 2008. Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis*, 29(9), 1665-1674.
- Singthong, J.**, Ningsanond, S., & Cui, S. W., 2009. Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. *Food Chemistry*, 114(4), 1301-1307.
- Selvendran, R.R.**; Ryden, P., 1990. Methods in plant biochemistry. *academy express – London*, 2: 549.
- Sánchez-Moreno, C.**, Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P., 2003. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 430-439.
- Sanchez, V.**, Baeza, R., Galmarini, M. V., Zamora, M. C., & Chirife, J., 2013. Freeze-drying encapsulation of red wine polyphenols in an amorphous matrix of maltodextrin. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1350-1354.
- Spaggiari, M.**, 2014. Ottimizzazione del proceso di estrazione di composti bioattivi di *Actinidia* spp., *Fragaria ananassa*, *Morus nigra* e *Humulus lupulus*, per la formulazione di prodotti nutraceutici ad alta capacità antiossidante. Trabajo Final de Carrera. Università degli Studi di Parma (Italia).
- Sies, H.**, Schewe, T., Heiss, C., & Kelm, M., 2005. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 304S-312S.
- Tomás-Barberán, F. A.**, Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A., 2001. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4748-4760.
- Thaipong, K.**, Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6), 669-675.
- Tulipani S.**, Romandini, S., Busco, F., Bompadre, S., Mezzetti, B., and Battino, M., 2009. Ascorbate, not urate, modulates the plasma antioxidant capacity after strawberry intake. *Food Chemistry*, 117, 181–188

- Vijayan, K.**, 2010. The emerging role of genomics tools in mulberry (*Morus*) genetic improvement. *Tree Genetics and Genomes*, 6, 613–625.
- Vashisth, T.**, Singh, R. K., & Pegg, R. B., 2011. Effects of drying on the phenolics content and antioxidant activity of muscadine pomace. *LWT-Food Science and Technology*, 44(7), 1649-1657.
- Van den Berg, R.**; Haenen, G. R.; van den Berg, H.; Bast, A. A. L. T., 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4): 511-517.
- Wang, Y.**, Xiang, L., Wang, C., Tang, C., & He, X., 2013. Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PloS one*, 8(7), e71144.
- Wang, J.**, & Mazza, G., 2002. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 850-857.
- Wu, R.**, Frei, B., Kennedy, J. A., & Zhao, Y., 2010. Effects of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of 'Marion' and 'Evergreen' blackberries. *LWT-Food Science and Technology*, 43(8), 1253-1264.
- Wojdyło, A.**, Figiel, A., & Oszmiański, J., 2009. Effect of drying methods with the application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1337-1343.
- Yousefi, S.**, Emam-Djomeh, Z., Mousavi, M., Kobarfard, F., & Zbicinski, I., 2015. Developing spray-dried powders containing anthocyanins of black raspberry juice encapsulated based on fenugreek gum. *Advanced Powder Technology*, 26(2), 462-469.
- Zuidam, N. J.**, & Nedoviæ, V., 2009. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, 2nd edn Springer. *New York*, 3-100.