

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
NUTRACÉUTICO DE EXTRACTOS DE
MORA (*Morus alba*)**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO: JAVIER CERVERA MARCH

DIRECTORA: EVA GARCÍA MARTÍNEZ

Curso Académico: 2015-2016

VALÈNCIA, JULIO 2016



EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NUTRACÉUTICO DE EXTRACTOS DE MORA (*Morus alba*)

RESUMEN

Mantener una alimentación adecuada y variada resulta más que conveniente dado que son numerosos los estudios y recomendaciones que relacionan una dieta equilibrada con una vida más saludable y la prevención de enfermedades. En este sentido, las frutas juegan un papel fundamental debido a que poseen gran cantidad de compuestos antioxidantes, los cuales están relacionados con la prevención de patologías importantes. Dentro de las frutas destacan las conocidas como “frutas del bosque”, dentro de cuya familia se encuentra la mora. Esta fruta tiene una larga tradición en la cultura china por sus propiedades medicinales debido a su alto contenido en compuestos fitoquímicos. Sin embargo, su producción es estacional y su estabilidad en fresco es muy limitada, solamente un pequeño porcentaje de moras alcanza el mercado para consumo en fresco, la mayoría son congeladas o utilizadas en conservas. Por ello, resultaría interesante diseñar un nutraceutico a partir de extractos mora, para lo cual partir de mora liofilizada podría resultar adecuado. Sin embargo, la viabilidad y estabilidad del nutraceutico depende de muchos factores, dado que los compuestos bioactivos pueden sufrir distintas reacciones de degradación, como la oxidación. El objetivo de este trabajo fue estudiar la aplicación de la liofilización y la adición de un agente encapsulante (goma arábica) en la composición en bioactivos y actividad antioxidante de extractos de mora. Para ello se han realizado extracciones con distintos disolventes para obtener la mayor cantidad de compuestos bioactivos hidrosolubles (compuestos fenólicos y vitamina C) y liposolubles (carotenoides) y se ha evaluado la actividad antioxidante por los métodos DPPH, FRAP y ABTS. Por otra parte, se han secado los diferentes extractos obtenidos y se ha evaluado la influencia del proceso de obtención de los extractos sobre los mismos parámetros analizados en los extractos en disolución. Se ha visto que la liofilización aumentó el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos y carotenoides, pero disminuyó el contenido de vitamina C y la actividad antioxidante de los extractos. La actividad antioxidante evaluada en los extractos hidrofílicos fue mayor que en el extracto lipofílico, siendo la vitamina C la que mejor se correlacionó con esta propiedad. La deshidratación de los extractos disminuyó los compuestos fenólicos un 4% y un 9% la vitamina C. En general, la adición de goma arábica favoreció la estabilidad de los fitoquímicos estudiados.

Palabras clave: mora, liofilización, encapsulación, goma arábica, fenoles, carotenoides, vitamina C, extracción, actividad antioxidante.

Alumno: Javier Cervera March

Tutora Académica: Prof. Dña. Eva García Martínez

Tutor experimental: Alberto Yuste del Carmen

València, Julio de 2016

EVALUATION OF THE NUTRACEUTICAL POTENTIAL OF MULBERRY EXTRACTS (*Morus alba*)

ABSTRACT

An adequate and varied diet is important since numerous studies and recommendations relate a balanced diet with a healthier lifestyle and disease prevention. In this sense, fruits play a role because they have large amounts of antioxidant compounds, which are related to the prevention of significant pathologies. Mulberry belongs to the so called family of "forest fruits". This fruit has a long tradition in Chinese culture for its medicinal properties due to its high content of phytochemicals. However, its production is seasonal and its stability is very limited, only a small percentage of mulberries reaches the fresh market, most are frozen or canned. Therefore, it would be interesting to design a nutraceutical from mulberry extracts, for which freeze dried mulberry may be appropriated. However, the viability and stability of the nutraceutical depends on many factors, since the bioactive compounds may undergo different degradation reactions such as oxidation. The aim of this work was to study the application of freeze drying technology and gum arabic addition as encapsulant in the bioactive composition and antioxidant activity of mulberry extracts. To this purpose different extractions were performed with different solvents, in order to obtain a product rich in water-soluble (phenolics and vitamin C) and liposoluble (carotenoids) compounds. Furthermore antioxidant activity of the extracts was evaluated by DPPH, FRAP and ABTS methods. These extracts were dried and the influence of the process was assessed in the same parameters analyzed in extracts in solution. It has been found that freeze drying increased the extraction yield of phenolic compounds and carotenoids, but decreased the content of vitamin C and the antioxidant activity of the extracts. The antioxidant activity evaluated in the hydrophilic extracts was greater than in the lipophilic one. Vitamin C was the bioactive that better correlated with antioxidant capacity. Extract dehydration step decreased phenolic compounds 4% and vitamin C 9%. In general, the addition of gum arabic favoured the stability of the phytochemicals studied.

Keywords: mulberry, lyophilization, encapsulation, gum arabic, phenols, carotenoids, vitamin C, extraction, antioxidant activity.

Student: Javier Cervera March

Academic tutor: Prof. Dña. Eva García Martínez

Co-Tutor: Alberto Yuste del Carmen

València, July of 2016

AVALUACIÓ DEL POTENCIAL NUTRACÈUTIC D'EXTRACTES DE MORA (*Morus alba*)

RESUM

Mantindre una alimentació adequada i variada resulta més que convenient atès que són nombrosos els estudis i recomanacions que relacionen una dieta equilibrada amb una vida més saludable i la prevenció de importants malalties. En aquest sentit, les fruites juguen un paper fonamental pel fet que posseeixen grans quantitats de compostos antioxidants, els quals estan relacionats amb la prevenció de patologies importants. Dins de les fruites destaquen les conegudes com "fruites del bosc", família en la que es troba la mora. Aquesta fruita té una llarga tradició en la cultura xinesa per les seves propietats medicinals a causa del seu alt contingut en compostos fitoquímics. No obstant això, la seva producció és estacional i la seva estabilitat en fresc és molt limitada, doncs només un petit percentatge de mores arriba al mercat en fresc, la majoria són congelades o utilitzades en conserves. Per això, resultaria interessant dissenyar un nutracèutic a partir d'extractes mora, per la qual cosa, partir de mora liofilitzada podria resultar adequat. No obstant això, la viabilitat i estabilitat del nutracèutic depèn de molts factors, atès que els compostos bioactius poden patir diferents reaccions de degradació, com l'oxidació. L'objectiu d'aquest treball va ser estudiar l'aplicació de la liofilització i l'addició d'un agent encapsulant (goma aràbiga) en la composició en bioactius i activitat antioxidant d'extractes de mora. Per a això s'han realitzat extraccions amb diferents dissolvents per obtenir la major quantitat de compostos bioactius hidrosolubles (compostos fenòlics i vitamina C) i liposolubles (carotenoides) i s'ha avaluat l'activitat antioxidant pels mètodes DPPH, FRAP i ABTS. D'altra banda, s'han assecat els diferents extractes obtinguts i s'ha avaluat l'influència del procés d'obtenció dels extractes sobre els mateixos paràmetres analitzats en els extractes en dissolució. S'ha vist que la liofilització augmenta el rendiment de l'extracció de compostos fenòlics i carotenoides, però va disminuir el contingut de vitamina C i l'activitat antioxidant dels extractes. L'activitat antioxidant avaluada en els extractes hidrofílics va ser més gran que en l'extracte lipofílic, sent la vitamina C la que millor es va correlacionar amb aquesta propietat. La deshidratació dels extractes disminueix els compostos fenòlics un 4% i un 9% la vitamina C. En general, l'addició de goma aràbiga va afavorir l'estabilitat dels fitoquímics estudiats.

Paraules clau: mora, liofilització, encapsulació, goma aràbiga, fenols, carotenoides, vitamina C, extracció, activitat antioxidant.

Alumne: Javier Cervera March

Tutora Acadèmica: Prof. Dña. Eva García Martínez

Tutor experimental: Alberto Yuste del Carmen

València, Juliol de 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería darle las gracias a mi tutora Eva María García Martínez por permitirme realizar este trabajo con ella, por tener paciencia y confianza en mí y por ayudarme a realizar este trabajo con ilusión. También quería darle las gracias a mi compañera durante los experimentos y estudiante de doctorado Margareth da Silva Ribeiro, por ayudarme en los experimentos y cálculos y por hacer más entretenidos los días en el laboratorio. A Alberto Yuste del Carmen quiero darle las gracias por tener paciencia conmigo y enseñarme a hacer las cosas bien en el laboratorio.

A mi compañera en el laboratorio Andrea Rodríguez Company quiero agradecerle su ayuda en los experimentos y en las consultas mutuas sobre las dudas que hemos podido tener a lo largo de todo el trabajo. A mis compañeras de clase, María, Belén y Meritxell, quiero darles las gracias por los momentos vividos y recorrer juntos el viaje que han sido estos cuatro años de carrera.

Pero sobretodo, quiero agradecer a mi familia el hecho de poder haber realizado esta carrera y ayudarme, apoyarme y soportarme en los buenos y los malos momentos en estos cuatro años.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	5
3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	5
3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	6
3.2.1 Extracción de compuestos fenólicos.....	6
3.2.2 Extracción de compuestos liposolubles.....	6
3.2.3 Extracción de vitamina C.....	6
3.2.4 Obtención de extractos secos.....	6
3.3 ANÁLISIS	7
3.3.1 Determinación de la humedad.....	7
3.3.2 Determinación de compuestos bioactivos.....	7
3.3.2.1 Fenoles totales.....	7
3.3.2.2 Carotenoides totales.....	8
3.3.2.3 Vitamina C.....	8
3.3.3 Determinación de la actividad antioxidante.....	8
3.3.3.1 Método DPPH.....	8
3.3.3.2 Método FRAP.....	9
3.3.3.3 Método ABTS.....	9
3.4 EFICACIA ENCAPSULANTE	9
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	10
4. RESULTADOS	10
4.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA LIOFILIZACIÓN Y DE LA ADICIÓN DE GOMA ARÁBIGA	10
4.1.1 Efecto en el contenido de humedad.....	10
4.1.2 Efecto en el contenido de compuestos bioactivos.....	11

4.1.2.1 Evaluación del contenido en compuestos fenólicos.....	11
4.1.2.2 Evaluación del contenido en carotenoides.....	12
4.1.2.3 Evaluación del contenido de vitamina C.....	13
4.1.3 Evaluación de la actividad antioxidante.....	13
4.1.3.1 Actividad antioxidante del extracto fenólico.....	14
4.1.3.2 Actividad antioxidante del extracto lipofílico.....	15
4.1.3.3 Actividad antioxidante del extracto de vitamina C.....	16
4.2 EFECTO DEL DISOLVENTE EMPLEADO EN LA EXTRACCIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	17
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS SECOS. EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	18
4.4 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS.....	20
4.5 ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LA ENCAPSULACIÓN.....	21
5. CONCLUSIONES.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura utilizada en el trabajo para denominar a las diferentes muestras.....	5
Tabla 2. Valores medios de contenido de agua (x_w) y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis), expresados en g de agua por 100 g de muestra.....	10
Tabla 3. Valores medios del contenido de compuestos fenólicos y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis), expresados en mg de ácido gálico por 100 g de sólidos de mora.....	11
Tabla 4. Valores medios del contenido de carotenoides y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis), expresados en mg β -Caroteno por 100 g de sólidos de mora.....	12
Tabla 5. Valores medios del contenido de vitamina C y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis), expresados en mg de ácido ascórbico por 100 g de sólidos de mora.....	13
Tabla 6. Disolventes utilizados en cada extracción y nomenclatura de los extractos.....	17
Tabla 7. Valores medios del contenido de compuestos bioactivos de los extractos secos y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis).....	18
Tabla 8. Valores medios de la actividad antioxidante de los extractos secos y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis).....	19
Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante por el método FRAP, ABTS y DPPH, y los fenoles, carotenoides y vitamina C de la mora.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de extractos liposolubles de ML y MLG.....	6
Figura 2. Actividad antioxidante de cada muestra según el método empleado (DPPH, FRAP, ABTS) en el extracto fenólico de las muestras de mora, en mMol de Trolox por 100 g de sólidos de fruta.....	14
Figura 3. Actividad antioxidante de cada muestra según el método empleado en el extracto lipofílico, en mMol de Trolox por 100 g de sólidos de fruta.....	15
Figura 4. Actividad antioxidante de cada muestra según el método empleado en el extracto con ácido oxálico, en mMol de Trolox por 100 g de sólidos de fruta.....	16
Figura 5. Efecto del disolvente utilizado en la actividad antioxidante (AAO) en %.....	17

1. INTRODUCCIÓN.

Las frutas, y los vegetales en general, siempre han formado parte de la dieta cotidiana, sin embargo, con los cambios de pautas alimentarias producidas en los últimos años, su consumo ha disminuido en favor de alimentos menos saludables, como productos procesados y de alto contenido graso. El aumento de ciertas patologías como la obesidad, la aterosclerosis o el cáncer y su relación con el excesivo consumo de grasas saturadas, ha llevado a las instituciones y organizaciones de todos los niveles a promover hábitos más saludables y especialmente a fomentar el consumo de frutas y verduras. En España, los últimos datos publicados del año 2013, confirman que se incrementó en un 2,7% el consumo de fruta fresca, situándose cerca del 17% del gasto anual en alimentación (MAGRAMA, 2015). Las frutas son un grupo de alimentos muy heterogéneo en colores, texturas, cultivo y consumo. Sin embargo, tienen en común que son ricas en vitaminas, minerales y fibra, lo cual les ha conferido la condición de alimentos saludables, en mayor o menor medida, debido a que muchos de estos componentes ejercen un efecto beneficioso en el organismo, como así lo sugieren y demuestran numerosos estudios científicos. En este sentido, estudios realizados como el EPIC (Estudio Prospectivo sobre la Investigación del Cáncer y la Nutrición), o el SUVIMAX (Suppléments en Vitamines, Minéraux et Antioxydants) constatan que la mejor forma de disminuir el riesgo de padecer algunos tipos de cáncer es mantener una dieta variada y abundante en frutas y hortalizas (Herberg *et al.*, 2006; Agudo y González, 2007). El consumo de frutas y verduras recomendado por instituciones y organizaciones nacionales e internacionales es de 400 g por día o cinco porciones de frutas y / o verduras al día (OMS, 2005).

Los beneficios en la salud por el consumo de frutas son debidos principalmente a los compuestos bioactivos presentes en ellas (Wang *et al.*, 2011; Wootton-Beard y Ryan, 2011). Los compuestos bioactivos son aquellos que ejercen una función beneficiosa para el organismo y los más importantes en las frutas son los que poseen una función antioxidante. Los antioxidantes son un conjunto de sustancias de diferente composición y estructura química, los cuales son capaces de neutralizar los radicales libres, grupos químicos altamente inestables debido normalmente a la presencia de electrones desapareados. Estos radicales libres pueden tener su origen en factores ambientales y biológicos. Entre los factores ambientales se encuentran: radiaciones de media y alta energía (rayos ultravioletas, rayos X y rayos gamma), componentes atmosféricos como el ozono, la polución, tabaco, etc. (Bagchi y Puri, 1998; Machlin y Bendich, 1987). Por otra parte, las reacciones metabólicas también pueden generar radicales libres, especialmente si son reacciones con intercambio de electrones (Ceconi *et al.*, 2003). La formación de radicales libres es un proceso natural que solo representa un problema para la salud cuando el organismo no es capaz de neutralizarlos. El desequilibrio entre la formación de radicales libres y la capacidad del organismo para neutralizarlos se conoce como estrés oxidativo, estando éste relacionado con importantes patologías como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, Alzheimer o Parkinson (NIH y NCCAM, 2013; Hamilton *et al.*, 2004; Auroma, 1998). Los radicales libres más comunes son los relacionados con el oxígeno, como el anión superóxido (O_2^-) o el radical hidroxilo ($OH\cdot$), conocidos como ROS (del inglés *Reactive oxygenspecies*); y los relacionados con el nitrógeno, como el óxido de nitrógeno ($NO\cdot$), conocidos como RNS (*Reactive nitrogenspecies*) (Dusting y Triggler, 2005; Johansen *et al.*, 2005).

Numerosos estudios relacionan la actividad antioxidante de ciertos compuestos con la disminución de estos procesos bioquímicos que pueden degenerar en numerosas enfermedades como aterosclerosis, diabetes o cáncer (Wootton-Beard y Ryan, 2011). La

naturaleza de estos compuestos es muy diversa, pudiendo clasificarse en función de distintos parámetros, como por ejemplo su origen endógeno o exógeno, esto es, en función de la capacidad de ser producidos o no por el ser humano, respectivamente. Otra forma de clasificarlos es en función de su valor nutritivo para el organismo. Dentro de los antioxidantes con valor nutritivo se encuentran vitaminas y minerales, como las vitaminas C, B y E o minerales como el Selenio. Diversos estudios relacionan la capacidad antioxidante de estos compuestos con la prevención de ciertos tipos de cáncer (Lippman *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2011) y otras enfermedades como la diabetes tipo 2 (Song *et al.*, 2009). Por otro lado se encuentran los antioxidantes sin valor nutritivo o fitoquímicos, denominados así debido a que el organismo no los necesita a corto y medio plazo. Los fitoquímicos son un grupo variado de metabolitos secundarios de origen vegetal, los cuales se encuentran con facilidad en frutas, semillas y vegetales en general. Normalmente su función es proteger a la planta frente a situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico. Esta actividad protectora ha inducido al estudio de los beneficios de su consumo para la salud (Jain y Ramawat, 2013). Entre los fitoquímicos se encuentran: los polifenoles, compuestos derivados de la fenilalanina y la tirosina, como los flavonoides, isoflavonoides, estilbenoides y curcuminoides; los alcaloides, como la bencilisoquinolina; y los terpenos, compuestos derivados principalmente del isopreno, siendo los más importantes los carotenoides, aunque también se encuentran monoterpénos, politerpénos o esteroides (Wang *et al.*, 2016). En las frutas los fitoquímicos más abundantes son los polifenoles y los carotenoides (Huang *et al.*, 2005).

En este sentido, la mora (*Morus* sp.) es una fruta muy rica en compuestos fitoquímicos, especialmente en polifenoles, como ácidos fenólicos y flavonoides (Memon *et al.*, 2010; Thabti *et al.*, 2012; Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015a, Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015b). La mora pertenece a la familia de las Moráceas y se encuentra distribuida por amplias áreas de Asia, la cuenca mediterránea y zonas subtropicales de América y África (Watson y Dallwitz, 2007). Dentro del género *Morus* existen 24 especies, una subespecie y más de cien variedades (Ercisli y Orhan, 2007), siendo las más importantes la mora blanca (*Morus alba*), la mora negra (*Morus nigra*) y la mora roja (*Morus rubra*) (Gundogdu *et al.*, 2011). Tradicionalmente, el cultivo de la mora tenía como fin la producción de seda y no ha sido hasta tiempos recientes cuando se han ampliado las posibilidades de empleo de esta planta y sus frutos, siendo consumidos tanto en fresco como procesados (Ercisli y Orhan, 2007; Gundogdu *et al.*, 2011; Sánchez, 2000). Además, las hojas, ramas y corteza de la mora blanca (*Morus alba*) han sido utilizadas desde la antigüedad en la medicina tradicional china para tratar la fiebre, mejorar la vista, fortalecer las articulaciones, como diurético, para proteger el hígado y para disminuir la presión sanguínea (Katsube *et al.*, 2006). Estudios con extractos de hojas de mora han mostrado alta actividad hipoglucémica, hipolipidémica y antiaterogénica (Chung *et al.*, 2013; Enkhmaa *et al.*, 2005; Hunyadi *et al.*, 2013). Otras investigaciones muestran que el consumo del fruto de la mora es beneficioso para la salud, especialmente contra la diabetes tipo 2 (Wang *et al.*, 2013). Estos beneficios han sido relacionados con el alto contenido en polifenoles de la mora (Gundogdu *et al.*, 2011), por lo que la posibilidad de extraer estos componentes para ser empleados como nutraceuticos o como nuevos ingredientes para la fortificación y formulación de otros alimentos, aumentando así su potencial antioxidante y con ello los beneficios para la salud del consumidor, es un aspecto interesante a considerar.

Solamente un pequeño porcentaje de moras alcanza el mercado en fresco, la mayoría son congeladas o utilizadas en conservas. Las moras congeladas pueden ser procesadas para hacer mermeladas, purés, jaleas o zumos (Lohachoompol *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2005). Emplear mora liofilizada podría ser una buena alternativa para darle más versatilidad a esta fruta. Podría ser interesante diseñar un producto nutraceutico a base de extractos de mora. Para ello, partir de la fruta en polvo obtenida por liofilización podría ser una buena estrategia. La liofilización es una técnica de deshidratación que se utiliza para reducir la humedad de los

alimentos sin someterlos a altas temperaturas, con lo que se evita en gran medida el daño a los compuestos termolábiles. Consiste en la extracción de agua de la muestra mediante la congelación y posterior sublimación de la misma, la cual es provocada con una bajada de la presión y la aplicación suficiente de calor para que sublime la mayor cantidad de agua posible (Oetjen y Haseley, 2004). Con la liofilización se obtiene un polvo deshidratado que conserva la mayoría de las propiedades nutricionales, funcionales y organolépticas de la fruta fresca. Existen diferentes estudios sobre el efecto de la congelación y la liofilización en la retención de compuestos antioxidantes en mora (Ancos *et al.*, 2000; Kampuse *et al.*, 2002; Lohachoomol *et al.*, 2004; Scibisz y Mitek, 2007).

Un alimento funcional es, según la Fundación del Consejo Internacional de Información sobre Alimentos (*International Food Information Council - IFIC Foundation* en inglés), un producto que tiene compuestos con efectos beneficiosos para la salud y puede ser consumido como parte de una dieta normal. Ejemplos de alimentos funcionales pueden ser los lácteos, frutas, verduras y pescados. Por otro lado, un alimento fortificado es aquel al que se le ha añadido uno o varios componentes beneficiosos para la salud con el fin de hacerlo más atractivo comercialmente. El principal ejemplo de un producto fortificado son las leches enriquecidas con ácidos omega-3, vitaminas y minerales (Cruzado y Cedrón, 2012). Los alimentos funcionales, fortificados y los nutraceuticos tienen en común que su consumo repercute en un beneficio para la salud. Sin embargo, los nutraceuticos se diferencian en que son productos extraídos, purificados, concentrados y normalmente vendidos en forma de capsulas, pastillas y en polvo (Cruzado y Cedrón, 2012). El término nutraceutico surge en 1989 de la mano de Stephen L. DeFelice y la Fundación para la Innovación en Medicina de Nueva York (Andlauer y Fürst, 2002; Cruzado y Cedrón, 2012). Se definió nutraceutico como “cualquier sustancia que fuera un alimento o parte de un alimento y proporcionara beneficios a la salud, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades” (DeFelice, 1995), pero más tarde se modificó para definirlo como “un producto aislado o purificado procedente de alimentos que son vendidos en formas medicinales y no necesariamente relacionados con la alimentación” (Pandey *et al.*, 2010). Actualmente, los nutraceuticos son un campo de investigación y desarrollo en plena expansión, debido principalmente a que son utilizados para prevenir enfermedades y mejorar la salud, como la depresión, inflamaciones, osteoporosis, cáncer o diabetes. Según algunos indicadores, el mercado global de nutraceuticos asciende a 171,8 miles de millones de dólares en 2014, siendo Estados Unidos el principal mercado (Wang *et al.*, 2016).

Para elaborar un nutraceutico deben extraerse el o los componentes deseados con el o los disolventes adecuados. Para ello, el factor más importante a la hora de elegir el disolvente es la polaridad del compuesto a extraer. Según varios autores, se obtiene un mayor rendimiento en la extracción de los componentes de vegetales mediante mezclas que con los disolventes puros. En este sentido, según el componente a extraer, pueden emplearse mezclas de metanol y agua en diversas proporciones (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2007), mezclas de metanol y agua acidificado con ácido fórmico (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015b), disoluciones de etanol y agua (Katsube *et al.*, 2006), entre otros ejemplos.

Tras la extracción, los compuestos deseados deben estabilizarse y encapsularse para su posterior comercialización y venta. La encapsulación se define como la técnica de envolver sólidos, líquidos o gases en miniaturas, como por ejemplo cápsulas, las cuales pueden liberar su contenido a velocidades controladas en condiciones determinadas (Desai y Park, 2005; Vilstrup, 2001). Los compuestos envueltos pueden encontrarse puros o en mezcla y son conocidos como material revestido, núcleo o activo. El material que envuelve el núcleo es conocido como material de revestimiento, cápsula membrana. Este material puede estar compuesto por azúcares, proteínas, polisacáridos, lípidos o polímeros de origen sintético (Fang y Bhandari, 2010). El objetivo fundamental de la encapsulación es mantener el compuesto que

contiene en la misma condición que se encontraba en el momento de ser encapsulado durante unas condiciones y tiempo determinados. Esta función responde al hecho de que la gran mayoría de compuestos encapsulados son bioactivos (Vos *et al.*, 2010; Nedovic *et al.*, 2011; Peanparkdee *et al.*, 2013), los cuales son muy susceptibles a degradarse o inactivarse. Debido a que cada compuesto bioactivo tiene propiedades fisicoquímicas diferentes, no puede generalizarse un método único de encapsulación (Augustin y Hemar, 2009). El material elegido para encapsular el compuesto debe mantenerlo funcional protegiéndolo de tres factores de riesgo: el primero, la exposición al ambiente (contacto con oxígeno, agua y luz); el segundo, las reacciones químicas dentro de la propia cápsula (oxidación, hidrólisis); y tercero, el paso por el sistema digestivo hasta su absorción (ácidos, enzimas, secuestradores) (Vos *et al.*, 2010).

Para mantener y mejorar la estabilidad del compuesto bioactivo, pueden añadirse sustancias con acción conservante y espesante, siendo los más comunes algunos polisacáridos como la goma Arábiga, almidones y sus derivados (Nedovic *et al.*, 2011). La eficacia de estas sustancias puede ser variable según el compuesto a conservar y las condiciones en las que se encuentre. La temperatura es un factor clave para la conservación del compuesto bioactivo, pues puede acelerar o disminuir la velocidad de las reacciones químicas. Las bajas temperaturas pueden conservar en buen estado durante cierto tiempo, pero también se ha visto como largos períodos de tiempo a temperaturas de congelación disminuyen considerablemente el contenido de compuestos bioactivos disponibles, siendo en algunos casos de más de un 30% en diez meses (Poiana *et al.*, 2010). Además de la posible adición de conservantes y el control de la temperatura, el medio de estabilización del extracto es muy importante para la conservación del mismo. El medio de estabilización está íntimamente relacionado con la técnica utilizada para la encapsulación (Vos *et al.*, 2010). La conveniencia de mantener los extractos en medio seco o líquido dependerá de la facilidad de los compuestos bioactivos para interactuar con el medio. Así por ejemplo, la actividad del agua tiende a acelerar las reacciones químicas pero la exposición total al oxígeno puede acelerar las oxidaciones de los compuestos. Otro ejemplo lo muestra un estudio en el que el medio de estabilización es el disolvente empleado en la extracción. Sin embargo, la adición de otros componentes puede provocar que el contenido de disolvente no sea el adecuado, aun siendo el que mayor rendimiento de extracción puede tener (Peanparkdee *et al.*, 2013).

La encapsulación puede realizarse mediante procedimientos químicos o físicos, dentro de estos últimos, junto con el secado por aspersion, el secado por congelación, la coacervación y la extrusión, se encontraría la liofilización (Cruzado y Cedrón, 2012). Actualmente, se están realizando estudios para la elaboración de nutraceuticos de alta capacidad antioxidante por liofilización (Shui y Leong, 2006), técnica ampliamente utilizada para la producción de fármacos (Niwa *et al.*, 1987; Tang y Pikal, 2004).

Cambios en la actividad antioxidante de las frutas pueden tener lugar como resultado de reacciones de oxidación-reducción. Estos cambios pueden estar influenciados por la calidad inicial de la fruta, el procesado, las condiciones (temperatura y humedad relativa) y tiempo de almacenamiento, tipo de container, etc. (Poiana *et al.*, 2010). De cara a optimizar el proceso de obtención del nutraceutico, resultaría interesante evaluar la capacidad antioxidante que queda retenida en el producto final, así como evaluarla en los pasos intermedios del proceso.

2. OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo es conocer la viabilidad de la liofilización y de la adición de goma arábica como agente encapsulante, para la obtención de un producto nutracéutico de mora con alta capacidad antioxidante. Para ello, se han trabajado con mora, mora liofilizada y mora liofilizada con goma arábica, a partir de las cuales se han extraído con diferentes mezclas disolventes los principales compuestos bioactivos lipofílicos e hidrofílicos. Los extractos en disolución obtenidos se han caracterizado en cuanto a su contenido en fenoles totales, vitamina C y carotenoides, además se ha evaluado su potencial antioxidante mediante diferentes métodos. A continuación se deshidrataron los extractos para obtener los correspondientes extractos secos que se caracterizaron en los mismos compuestos y propiedades que los extractos iniciales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Se trabajó con mora congelada (*Morus Alba*) procedente de moreras situadas en el campus de la Universitat Politècnica de València. La mora congelada se descongeló durante 12 h en refrigeración y se trituró con una mezcladora eléctrica (Thermomix, TM 21 Vorwerk, España). Con el objetivo de evaluar si el procesado de la materia prima podía afectar a las propiedades funcionales de los extractos obtenidos, el puré de mora obtenido se dividió en 3 lotes, destinándose cada uno a la elaboración de un tipo de muestra. Un lote del puré de mora se destinó a análisis como muestra control (M). Un segundo lote de puré de mora se liofilizó (ML). Por último, para estudiar su posible efecto protector y encapsulante de los compuestos bioactivos estudiados en la mora, al tercer lote de puré de mora se le añadió goma arábica (Sigma-Aldrich) previamente a su liofilización (MLG). La proporción de goma arábica empleada fue de 6 g /100 g puré fruta, según estudios previos (Agudelo *et al.*, 2016). En la tabla 1 se describe la nomenclatura utilizada para describir las muestras:

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

Tipo de muestra	Nomenclatura
Mora	M
Mora liofilizada	ML
Mora liofilizada con goma arábica	MLG

Los lotes de puré de mora que iban a ser liofilizados se dispusieron en bandejas formando una capa de 0,5 cm de espesor y fueron congelados a -45°C (Liebherr Mediline 7083 207-00) durante 48 horas. Posteriormente, las bandejas se colocaron en el liofilizador (Telstar Lioalfa-6) a 0,021 mPa y a una temperatura de -45°C en el condensador durante 48 horas. Una vez obtenidas las muestras liofilizadas, se trituraron hasta conseguir un polvo homogéneo. El producto en polvo obtenido se introdujo en tubos de plástico de cierre hermético envasados en bolsas a vacío (envasadora Tecnotrip EVO86154, España) y se mantuvieron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su análisis.

3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Para el análisis de los compuestos bioactivos de las muestras se realizaron extracciones con disolventes de diferente polaridad en función del compuesto a extraer. Se realizaron como mínimo 3 extracciones. El proceso de extracción se describe a continuación.

3.2.1 Extracción de compuestos fenólicos.

La extracción de compuestos fenólicos se realizó mezclando 1 g de la muestra con 9 mL de una disolución de metanol: agua (70:30, v/v), basándose en estudios previos (Farinha, 2014; Spaggiari, 2014). La mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 20 minutos y se centrifugó (Selecta Medifriger-BL, España) 10 minutos a 8000 rpm a una temperatura de 20°C. El sobrenadante obtenido se filtró (filtros de nylon 0,45 μm) en viales opacos y se utilizó para determinar el contenido de fenoles y la actividad antioxidante.

3.2.2 Extracción de compuestos liposolubles.

La extracción de compuestos liposolubles se realizó en las mismas proporciones y condiciones descritas en 3.2.1, empleándose como disolvente una disolución de hexano: acetona: etanol (50:25:25, v/v/v), según Olives et al. (2006) y Wang *et al.* (1996). El sobrenadante obtenido tras la centrifugación se filtró (filtros de nylon 0,45 μm) en viales opacos y se utilizó para determinar el contenido de carotenoides y la actividad antioxidante. En la figura 1 se muestran como ejemplo los extractos lipofílicos obtenidos de mora liofilizada (ML) y mora liofilizada con goma (MLG).



Figura 1. Ejemplo de extractos liposolubles de ML y MLG.

3.2.3 Extracción de vitamina C.

La extracción de vitamina C se realizó en las mismas proporciones y condiciones descritas en 3.2.1, empleándose como disolvente una disolución de ácido oxálico al 0,1 % en agua (Xu *et al.*, 2008). La mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó (Selecta Medifriger-BL, España) 10 minutos a 8000 rpm a 20°C. El sobrenadante obtenido se filtró (filtros de nylon 0,45 μm) en viales opacos y se utilizó para determinar el contenido en vitamina C y la actividad antioxidante.

3.2.4 Obtención de extractos secos.

Los extractos de compuestos bioactivos disueltos en su correspondiente disolvente de extracción se secaron para obtener los extractos secos ricos en compuestos fenólicos, ricos en carotenoides y en vitamina C de cada una de las muestras (M, ML y MLG). Para ello, una parte de los extractos líquidos obtenidos según los apartados 3.2.1, 3.2.2 y 3.2.3 fueron destinados a análisis, y a otra parte se les eliminó el disolvente con el objetivo de obtener los extractos

fenólicos, de carotenoides y vitamina C secos de cada una de las muestras. Para ello, en el caso de los extractos fenólicos, el sobrenadante obtenido se secó en rotavapor durante 20 minutos a temperatura de 50°C para eliminar el metanol. Posteriormente, el extracto acuoso obtenido se congeló (48h a -40°C) y se liofilizó (48h en las mismas condiciones descritas que en 3.1). De la misma manera en el extracto lipofílico se eliminó el disolvente empleando el rotavapor (20 minutos a temperatura de 50°C). En el caso del extracto de la vitamina C, éste se congeló (48h a -40°C) y se liofilizó (48h) igual que para el extracto fenólico y en las mismas condiciones descritas que en el apartado 3.1. Para el análisis de los extractos secos, estos fueron reconstituidos previamente con el disolvente empleado en su extracción. Los extractos secos se denominarán como “Extracto seco de...” según el compuesto del que se trate.

3.3 ANÁLISIS.

3.3.1 Determinación de la humedad.

A las muestras M, ML y MLG se les determinó el contenido en humedad, para lo cual se siguió el método 20.013 AOAC (1990) para alimentos ricos en azúcares. Esta determinación se basa en la pérdida de peso de la muestra bajo condiciones específicas de temperatura y presión (60°C ± 5°C, a una presión inferior a 100 mm Hg) hasta alcanzar peso constante. Los resultados se expresaron en g agua por 100 g de muestra.

3.3.2 Determinación de compuestos bioactivos.

Para cada muestra M, ML y MLG, en cada tipo de extracto (metanol/agua, hexano/acetona/etanol y ácido oxálico) y tanto en disolución como secos, se determinó, por triplicado, un tipo de compuesto bioactivo. En el extracto hidrofílico de metanol/agua se determinó el contenido de fenoles, en el extracto hidrofílico de ácido oxálico, el contenido de vitamina C, y en los extractos liposolubles se determinó el contenido de carotenoides. Se calculó la media y la desviación estándar. En vista de estandarizar los resultados y poder compararlos, todos los resultados se expresaron referidos a 100 g de sólidos de fruta.

3.3.2.1 Fenoles totales.

La determinación de los fenoles totales presentes en las muestras se llevó a cabo a través del ensayo Folin-Ciocalteu, siguiendo los estudios de 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, los cuales reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos. A pH básico los complejos formados se reducen dando como resultado un color azul intenso capaz de ser medido por espectrofotometría.

Para su determinación, se añadieron 0,25 mL de extracto hidrofílico junto con 15 mL de agua bidestilada. Después se le añadieron 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, mezclándose y reposando durante ocho minutos en oscuridad. Transcurridos los ocho minutos, se añadieron 3,75 mL de carbonato de sodio al 7,5% (p/v) y se enrasaron con agua bidestilada a 25 mL. Se mantuvieron en oscuridad durante dos horas y se procedió a medir la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Electron Corporation USA). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico (AG) por 100 g de sólidos de mora.

3.3.2.2 Carotenoides totales.

La determinación del contenido de carotenoides se realizó basándose en los estudios de Olives *et al.* (2006), Shim y Kim (2002) y Wang *et al.* (2007). Se le añadió 1,5 mL de agua bidestilada al sobrenadante del extracto liposuble (a razón de 15 mL de agua por 100 mL de disolvente), agitándose manualmente durante 2 minutos. Cuando se separaron las fases, se extrajeron 600 µL de la parte superior, llevándose ésta a sequedad con nitrógeno. El producto resultante fue reconstituido con una disolución de tetrahidrofurano:acetonitrilo:metanol (15:30:55, v/v/v). Se midió la absorbancia a 446 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Electron Corporation, USA). Los resultados se expresaron como mg de β-caroteno por 100 g de sólidos de mora.

3.3.2.3 Vitamina C.

La determinación del contenido de ácido ascórbico o vitamina C se realizó siguiendo la metodología descrita por AOAC (1980) para frutas y vegetales, Pearson (1998) y Mattissek *et al.*, (1998). Consiste en un análisis volumétrico en el que se emplea ácido metafosfórico para inactivar la enzima ascorbato oxidasa. El ácido ascórbico se determina por su acción reductora sobre el colorante azul 2,6 diclorofenol-indofenol. El método básicamente consiste en tomar 0,5 mL de extracto, adicionar 5 mL de disolución acuosa de ácido metafosfórico al 25% y enrasar a 25 mL con agua destilada y hervida. Tras agitar y filtrar, se valoran 10 mL del filtrado con el indicador hasta alcanzar rosa persistente durante 30 segundos. El resultado se expresó en mg de ácido ascórbico por 100 g de sólidos de mora.

3.3.3 Determinación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de los extractos líquidos y secos obtenidos fue determinada por tres métodos: DPPH, FRAP y ABTS. Los experimentos fueron realizados como mínimo por triplicado.

3.3.3.1 Método DPPH.

El método DPPH se basa en la reducción del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a DPPH-H. El radical DPPH es estable y presenta una intensa coloración violeta. Además, presenta absorbancia a 517 nm, por lo que su concentración puede determinarse con métodos espectrofotométricos.

Se siguió la metodología descrita por (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2003). En una cubeta se colocaron 3 mL de reactivo DPPH y se le adicionaron 30 µL de extracto. Se midió la absorbancia a tiempo cero y a los 2,5 minutos, cuando la reacción se estabilizó (Espectrofotómetro UV-visible Thermo Electron Corporation, USA). Para calcular el porcentaje de DPPH se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%DPPH = \frac{(Abs\ control - Abs\ muestra)}{Abs\ control} \times 100 \quad (1)$$

Siendo:

Abs control: absorbancia a tiempo cero minutos.

Abs muestra: absorbancia a tiempo 2,5 minutos.

Para determinar cuantitativamente el grado de inhibición del DPPH se realizó una recta de calibrado con Trolox, expresándose el resultado en milimoles equivalentes de Trolox por 100 g de sólidos de mora.

3.3.3.2 Método FRAP.

El método FRAP se basa en la reducción del Fe³⁺ presente en el compuesto TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) a Fe²⁺. La actividad antioxidante presente en la muestra puede relacionarse con la cantidad de Fe³⁺ que ha sido reducido. El complejo reducido posee una coloración azul intensa que presenta su máxima absorción a 593 nm.

Se siguió la metodología descrita por Benzie y Stain (1996), Pulido *et al.* (2000) y Thaipong *et al.* (2006). En una cubeta de 2,5 mL se mezclaron 900 µL de reactivo FRAP con 30 µL de agua bidestilada y 30 µL de extracto o de blanco (disolvente de extracción). La absorbancia se midió a 593 nm (Espectrofotómetro UV-visible Thermo Electron Corporation, USA) tras mantener la mezcla 30 minutos incubada a 37°C. El resultado final estará expresado en milimoles equivalentes de Trolox por 100 g de sólidos de mora.

3.3.3.3 Método ABTS.

Para la realización del método se siguió la metodología descrita por Re *et al.* (1999), Arnao *et al.* (2001) y Thaipong *et al.* (2006). Se preparó una disolución de ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM (1:0,5, v/v), el cual se mantuvo en refrigeración y oscuridad durante 12-16 horas, el tiempo necesario para la formación del radical catiónico ABTS^{•+}. El radical formado es reducido por las sustancias antioxidantes de la muestra y esta reducción puede ser medida por métodos espectrofotométricos. Antes de iniciar la lectura de la absorbancia, se realizó una dilución de la solución en etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0,7 nm. En una cubeta se adicionaron 1 mL de reactivo y 10 µL de extracto, leyéndose la absorbancia a 734 nm (Espectrofotómetro UV-visible Thermo Electron Corporation, USA) a tiempo cero y a tiempo 1 minuto. El resultado final estará expresado en milimoles equivalentes de Trolox por 100 g de sólidos de mora.

3.4 EFICACIA ENCAPSULANTE.

La Eficacia encapsulante indica la capacidad que tiene el agente encapsulante, en este caso goma arábica, para encapsular las moléculas de compuestos bioactivos. Según distintos autores que emplean la técnica de liofilización junto la adición de un soluto encapsulante (goma arábica, maltodextrina) para encapsular los compuestos bioactivos sensibles y los aromas, y mejorar la estabilidad de los productos en polvo obtenidos (Dib Taxi *et al.*, 2003; Righetto y Netto, 2005 y Murali *et al.*, 2014) la Eficacia encapsulante puede calcularse basándose en la cantidad de bioactivo inicial en la fruta antes y después de la encapsulación, según método sugerido por Risch y Reineccius (1988) (ecuación 2):

$$\frac{\text{Compuesto bioactivo en la mora (mg/100g sm)}}{\text{Compuesto bioactivo en el extracto encapsulado (mg/100g sm)}} \times 100 \quad (2)$$

Donde los compuestos se miden en mg del mismo por 100 g de sólidos de mora y el resultado se expresa en %.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para estudiar las posibles diferencias significativas entre las muestras se realizaron análisis de la varianza unifactoriales (ANOVA), a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). También se realizaron correlaciones de Pearson entre la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos. Para llevar a cabo dichos análisis se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV.

4. RESULTADOS.

4.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA LIOFILIZACIÓN Y DE LA ADICIÓN DE GOMA ARÁBIGA.

En el presente apartado se analizará el efecto que produce el proceso de la liofilización y la adición de goma arábica en el contenido de humedad, compuestos bioactivos mayoritarios y actividad antioxidante (AAO) de la mora.

4.1.1 Efecto en el contenido de humedad.

En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestran la media y la desviación estándar, la cual se encuentra entre paréntesis, de los valores de humedad obtenidos (x_w) en las diferentes muestras analizadas.

Tabla 2. Valores medios de contenido de agua (x_w) y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis), expresados en g de agua por 100 g de muestra.

Muestra	x_w
Mora (M)	81,65 (0,45)
Mora liofilizada (ML)	1,53 (0,14) ^b
Mora liofilizada con goma arábica (MLG)	1,12 (0,18) ^a

a-b: Valores con distinta letra en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las muestras liofilizadas.

El contenido medio de agua en la muestra de mora (M) fue de 81,65 g por 100 g de producto, valor muy parecido al descrito en otros estudios de esta fruta (Dimitrova *et al.*, 2015; Imran *et al.*, 2010). Otros estudios de caracterización de distintos genotipos de *Morus Nigra* (Ercisli y Orhan, 2007) y *Morus Alba* (Butt *et al.*, 2008) mostraron valores de humedad menores. Los cambios en la composición fisicoquímica de la fruta pueden deberse a múltiples factores como la diferente variedad, la distinta madurez, la diferente zona geográfica de procedencia ó el clima (Ercisli y Orhan, 2007; Dimitrova *et al.*, 2015).

Tras la liofilización se consiguió un producto en polvo con unos valores de humedad del orden de los sugeridos por otros autores para alimentos liofilizados (Fellows, 2000). Así, los contenidos medios de agua fueron 1,53 g por 100 g de producto y de 1,12 g por 100 g de producto para ML y MLG, respectivamente. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido de humedad en la mora liofilizada con goma arábica (MLG) y la mora liofilizada sin este soluto (ML). Según un estudio de Mosquera (2010), la adición de polisacáridos de alto peso molecular como la goma arábica favorece la eliminación del agua en el posterior proceso de liofilización, lo que podría estar relacionado con un aumento del agua

congelable de la muestra. Además, la adición de solutos provoca una disminución de las propiedades higroscópicas de la muestra, dando mayor estabilidad a los productos en polvo obtenidos y disminuyendo los fenómenos de pegajosidad y apelmazamiento típicos de este tipo de productos de fruta deshidratados (Roos, 1995).

4.1.2 Efecto en el contenido de compuestos bioactivos.

4.1.2.1 Evaluación del contenido en compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos presentan en los vegetales, y particularmente en las frutas, ciertas propiedades químicas que participan en el sabor, color y en sus efectos positivos en la salud humana (Gundogdu *et al.*, 2011), como ya se ha comentado en detalle en el apartado de Introducción. En la siguiente tabla (Tabla 3) se describen la media y la desviación estándar, la cual se encuentra entre paréntesis, del contenido de compuestos fenólicos totales de las diferentes muestras de mora analizadas.

Tabla 3. Valores medios del contenido de compuestos fenólicos y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis), expresados en mg de ácido gálico por 100 g de sólidos de mora.

Muestra	Fenoles (mg ác. gálico/100 g sólidos de mora)
Mora (M)	1792,10 (56,59) ^a
Mora liofilizada (ML)	2258,31 (25,95) ^b
Mora liofilizada con goma arábica (MLG)	2377,46 (23,21) ^c

a-b-c: Valores con distinta letra en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El contenido medio de compuestos fenólicos en la mora fresca (M) fue de 1792,1 mg de ácido gálico por 100 g de sólidos de mora. Dada la importancia de este grupo de fitoquímicos y su abundancia en esta fruta, numerosos estudios han medido el contenido total de compuestos fenólicos en *Morus alba* y en especies semejantes (*Morus nigra* y *Morus rubra*), tanto en las hojas como en los frutos (Ercisli y Orhan, 2007; Gundogdu *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2012). Estos estudios muestran notables diferencias en cuanto a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en esta fruta, siendo inferiores en distintos casos al resultado obtenido en el presente estudio (Ercisli y Orhan, 2007; Dimitrova *et al.*, 2015) o superiores (Imran *et al.*, 2010; Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015a). La variabilidad del contenido de compuestos fenólicos en los frutos depende de muchos factores, como el grado de maduración durante la cosecha, diferencias entre variedades, prácticas culturales o factores medioambientales (temperatura, humedad, luz, etc.) durante el desarrollo del fruto (Zadernowski *et al.*, 2005; Gundogdu *et al.*, 2011). En cuanto a los compuestos fenólicos específicos, también varían según la especie de *Morus* spp. Así en la mora negra (*Morus nigra*) destaca el ácido clorogénico, y en la mora blanca (*Morus alba*) y roja (*Morus rubra*) la rutina (Gundogdu *et al.*, 2011). Otros estudios específicos de frutas del grupo de las bayas reportaron que sobre todo son el genotipo (Scalzo *et al.*, 2005), la localización del cultivo y la técnica de cultivo (Hakkinen y Torronen, 2000) los factores que más afectan al contenido en fenoles totales de la mora. Además, el diferente disolvente empleado y la técnica de extracción de los compuestos fenólicos utilizada también afecta a la variabilidad de los resultados presentados en diferentes estudios (Garau *et al.*, 2007).

El análisis estadístico ANOVA entre los tres tipos de muestra (M, ML y MLG) mostró que existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el contenido de este compuesto entre las muestras (Tabla 3). El contenido medio de compuestos fenólicos en la mora liofilizada (ML: 2258,31 mg de ácido gálico por 100 g de sólidos de mora y MLG: 2377,46 mg de ácido gálico por 100 g de sólidos de mora) fue significativamente ($p < 0,05$) mayor que en la fruta control (M),

concretamente se observó una ganancia en fenoles del 22% y del 28%, en ML y MLG, respectivamente, respecto a M. El aumento en compuestos fenólicos debido al proceso de liofilización ha sido observado en otros estudios. La liofilización, técnica de deshidratación que, como ya se ha comentado, requiere la congelación previa de las muestras y emplea cambios de presión para eliminar el agua libre de las muestras (Oetjen y Haseley, 2004), provoca ruptura en las estructuras celulares que pueden facilitar la entrada del disolvente, lo cual permite una mayor extracción de compuestos fenólicos.

Por otra parte, también se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido de fenoles totales de la mora liofilizada (ML) y de la mora liofilizada con goma arábica (MLG). Esta diferencia puede deberse al efecto protector de la goma arábica añadida a la matriz de la fruta, dado que éste y otros polisacáridos actúan como encapsulantes de los compuestos fenólicos. La protección de los compuestos fenólicos por la adición de goma arábica permitió una mejora del rendimiento de dichos compuestos en estudios con muestras liofilizadas de otras frutas (Yousefi *et al.*, 2011).

4.1.2.2 Evaluación del contenido en carotenoides.

En general, las frutas de la familia de las bayas presentan pequeñas cantidades de carotenoides (Marinova *et al.*, 2007). Aunque la mora no pueda considerarse una fuente dietética rica de estos compuestos, contiene α -caroteno, β -caroteno y el complejo luteína - zeaxantina (Heinonen *et al.*, 1989). En la siguiente tabla (Tabla 4) se describen la media y la desviación estándar, la cual se encuentra entre paréntesis, del contenido de carotenoides totales en las diferentes muestras analizadas.

Tabla 4. Valores medios del contenido de carotenoides y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis), expresados en mg β -Caroteno por 100 g de sólidos de mora.

Muestra	Carotenoides (mg β -Caroteno/100 g sólidos de mora)
Mora (M)	13,39 (0,01) ^a
Mora liofilizada (ML)	16,2 (0,9) ^b
Mora liofilizada con goma arábica (MLG)	17,2 (0,9) ^b

a-b: Valores con distinta letra en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El contenido medio de carotenoides en la mora (M) fue de 13,39 mg de β -Caroteno por 100 g de sólidos de mora. En este caso también se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en estos compuestos causado por la liofilización. Se obtuvieron valores de 16,25 y 17,19 mg de β -Caroteno por 100 g de sólidos de mora en ML y MLG, respectivamente. En algunos vegetales, los carotenoides se encuentran dentro de ciertos orgánulos celulares, y en algunos frutos pueden encontrarse agrupados en formas cristalinas dentro de membranas proteicas (Canene-Adams y Erdman, 2009). Como ya se ha comentado, la liofilización alteraría las estructuras celulares provocando la liberación de los carotenoides, los cuales podrían solubilizarse más fácilmente en el disolvente de extracción y aumentar el contenido de carotenoides disponibles.

Respecto a la adición de goma arábica, el análisis estadístico no ha detectado diferencias significativas ($p > 0,05$) en cuanto a su adición o no a la muestra, pudiendo denotar que la goma arábica no interacciona suficientemente con los carotenoides, no ejerciendo su efecto encapsulante y protector.

4.1.2.3 Evaluación del contenido de vitamina C.

En la siguiente tabla (Tabla 5) se describen la media y la desviación estándar, la cual se encuentra entre paréntesis, del contenido en vitamina C en las diferentes muestras analizadas.

Tabla 5. Valores medios del contenido de vitamina C y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis), expresados en mg de ácido ascórbico por 100 g de sólidos de mora.

Muestra	Vitamina C (mg ác. ascórbico/100 g sólidos de mora)
Mora (M)	37,18 (0,43) ^b
Mora liofilizada (ML)	32,36 (0,63) ^a
Mora liofilizada con goma (MLG)	33,36 (0,81) ^a

a-b: Valores con distinta letra en superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El contenido medio de ácido ascórbico o vitamina C en la mora (M) fue de 37,18 mg de ácido ascórbico por 100 g de sólidos de mora. En comparación con otros estudios (Imran *et al.*, 2010; Ercisli y Orhan, 2007, Butt *et al.*, 2008 y Gundogdu *et al.*, 2011), el contenido medio de ácido ascórbico de la muestra control (M) fue inferior, lo cual puede deberse al tiempo que ha estado la muestra en congelación (Poiana *et al.*, 2010) o a la diferente especie de mora estudiada. Es remarcable que las especies de mora de color claro tienen mayor contenido en vitamina C que las oscuras (Gundogdu *et al.*, 2011) como es el caso de este estudio. Al igual que ocurre con los compuestos fenólicos, el contenido en vitamina C de la mora va a depender de numerosos factores, además de la especie y variedad, del clima, del estado de maduración, de las condiciones de cultivo, como el suelo o la localización geográfica, de las condiciones de almacenamiento, etc. (Szajdek y Borowska, 2008). Según Poiana *et al.*, (2010), las pérdidas de ácido ascórbico durante la congelación de distintos tipos de bayas fueron cercanas al 20% en seis meses y hasta el 40% en diez meses. Además, se sugiere que estas pérdidas son debidas a la actividad enzimática del agua no congelada de las muestras, la cual puede representar un 11% del agua total a una temperatura de -18°C . La liofilización disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el contenido en vitamina C, obteniéndose valores de 32,36 y 33,36 mg de ácido ascórbico por 100 g sólidos de mora para las muestras liofilizadas ML y MLG, respectivamente. El ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble que se oxida en poco tiempo y es muy termolábil, lo que produce que su contenido disminuya rápidamente (Klimczak *et al.*, 2007). Además también puede contribuir el efecto degradativo del oxígeno, dada su mayor accesibilidad en la estructura porosa que se forma como consecuencia de la liofilización. Algunos estudios muestran que la degradación de la vitamina C en productos vegetales liofilizados durante el almacenamiento es más lenta que en los productos en fresco (Shafiur *et al.*, 2015). Por lo que en este sentido, aunque la liofilización provoca pérdidas iniciales en el contenido de vitamina C, mejoraría posteriormente su estabilidad en los productos en polvo durante mayor tiempo. Por otro lado, no parece que la adición de goma arábiga, en la concentración empleada en este estudio, esté ejerciendo de manera significativa un papel protector sobre la vitamina C.

4.1.3 Evaluación de la actividad antioxidante.

En las Figuras 2 a 4 se presentan los valores medios, con sus desviaciones estándar, de la actividad antioxidante analizada, por los tres métodos empleados, en los extractos en disolución de fenoles totales, carotenoides totales y vitamina C, respectivamente, de las muestras de mora. Cada figura muestra los resultados de actividad antioxidante agrupados para un mismo método (DPPH, FRAP y ABTS) para las muestras analizadas. Puesto que cada método está basado en un fundamento distinto, no pueden compararse resultados entre

diferentes métodos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). El objetivo de las figuras es mostrar las diferencias ocasionadas por la liofilización y la adición de goma arábica, para cada método de análisis y en cada extracto concreto.

4.1.3.1 Actividad antioxidante del extracto fenólico.

En la siguiente figura se muestran los resultados de actividad antioxidante en el extracto fenólico para las muestras: mora (M), mora liofilizada (ML) y mora liofilizada con goma arábica (MLG).

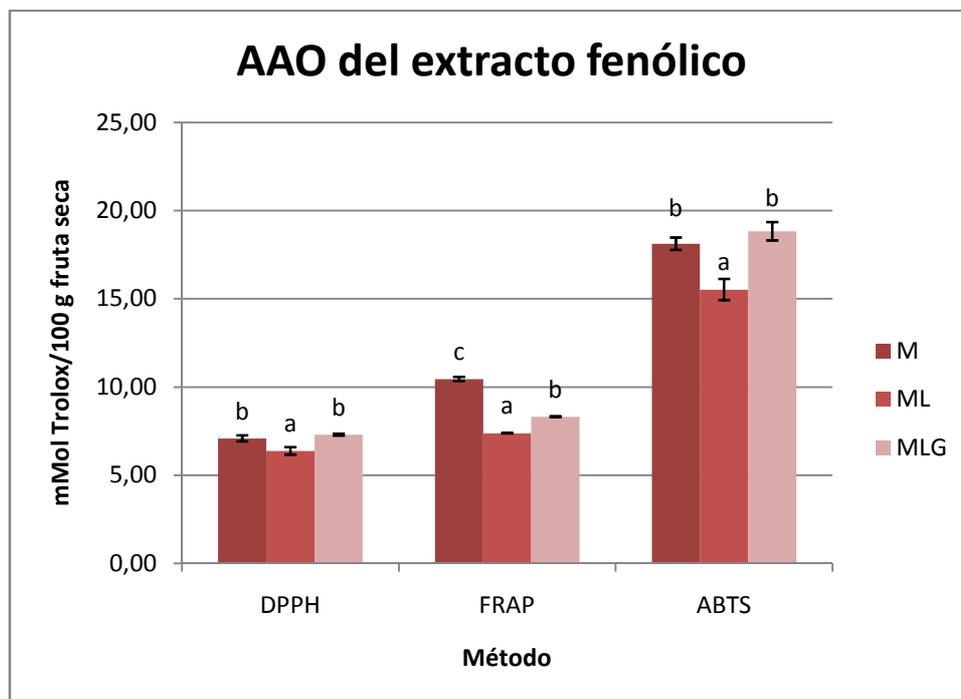


Figura 2. Actividad antioxidante de cada muestra según el método empleado (DPPH, FRAP, ABTS) en el extracto fenólico de las muestras de mora, en mMol de Trolox por 100 g de sólidos de fruta. a-b-c: Columnas con distinta letra dentro de un mismo método presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la figura superior (Figura 2) se aprecian dos aspectos: primero, en todos los métodos de determinación de actividad antioxidante utilizados, la mora liofilizada (ML) siempre presentó valores significativamente ($p < 0,05$) menores que la mora (M) y la muestra liofilizada con goma arábica (MLG). La liofilización ocasionó pérdidas en la AAO de la muestra ML del orden del 10 % para DPPH, 29 % para FRAP y 14 % para ABTS; en segundo lugar, salvo en el método de FRAP, no se produjeron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre muestras de mora y mora liofilizada con goma (M y MLG). De cualquier manera, en este caso se observaron pérdidas en la AAO del 20 % en MLG, inferiores a las observadas para ML, lo cual evidenció el papel protector de este soluto sobre los compuestos bioactivos, proporcionando en general una mayor estabilidad de estos componentes durante la liofilización. Otros trabajos han llegado a conclusiones parecidas utilizando solutos de alto peso molecular similares, como la maltodextrina (Laine *et al.*, 2008).

Por otra parte, estudios de Montenegro *et al.*, (2012) han puesto de manifiesto que la goma arábica es capaz de aportar actividad antioxidante, mejorando la AAO del producto final.

La evolución de la AAO con el tratamiento de liofilización no siguió la misma tendencia que la observada para los compuestos fenólicos. El diferente comportamiento, entre los fenoles

totales y la actividad antioxidante del extracto fenólico, 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, como ya se ha visto, se pierde durante el proceso de liofilización, contribuyendo a la disminución observada de la actividad antioxidante debido a este proceso (Huang *et al.*, 2005; Castañeda *et al.*, 2010).

4.1.3.2 Actividad antioxidante del extracto lipofílico.

En la siguiente figura se muestran los resultados de actividad antioxidante en el extracto lipofílico donde se cuantificaron los carotenoides totales de las muestras: mora (M), mora liofilizada (ML) y mora liofilizada con goma arábica (MLG).

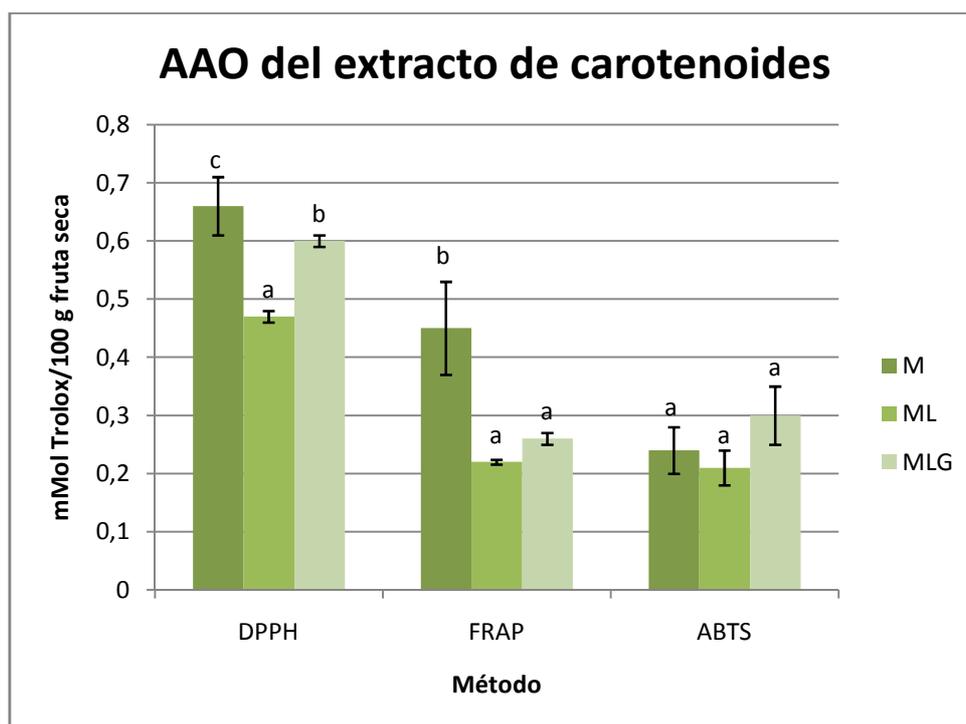


Figura 3. Actividad antioxidante de cada muestra según el método empleado en el extracto lipofílico, en mMol de Trolox por 100 g de sólidos de fruta. a-b-c: Columnas con distinta letra dentro de un mismo método presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En general, los valores de actividad antioxidante del extracto lipofílico fueron inferiores a los obtenidos en el extracto fenólico, tal y como han observado otros autores (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Esto parece lógico, porque también el contenido en fenoles en la mora fue mucho mayor que el contenido en carotenoides. En el extracto lipofílico se reprodujeron a grandes rasgos las mismas tendencias descritas en el extracto fenólico, es decir, la mora liofilizada (ML) presentó menor ($p < 0,05$) actividad antioxidante que la mora (M), con pérdidas del 29 % para DPPH, 51 % para FRAP y 12 % para ABTS, y la adición de goma arábica (MLG) mejoró la capacidad antioxidante respecto a ML.

En este caso, la evolución de la AAO con el tratamiento de liofilización no siguió la misma tendencia que la observada para los carotenoides. Con la extracción realizada de compuestos lipofílicos con hexano:acetona:etanol, han podido extraerse otros fitonutrientes lipofílicos presentes en la mora como la vitamina E, no analizadas en este estudio, sensibles al procesado y que pueden estar siendo contabilizadas al evaluar la capacidad antioxidante de este extracto (Müller *et al.*, 2011). Estudios de Singhal *et al.* (2010) mostraron que la mora fresca tenía un

contenido en vitamina E de 0,87 mg α tocoferol por 100 g de base seca, mientras que tras ser liofilizada se obtuvo un valor de 0,32 mg α tocoferol por 100 g de base seca.

4.1.3.3 Actividad antioxidante del extracto de vitamina C.

En la siguiente figura se muestran los resultados de actividad antioxidante en el extracto donde se cuantificó la vitamina C, empleando ácido oxálico como disolvente en las muestras: mora (M), mora liofilizada (ML) y mora liofilizada con goma arábica (MLG).

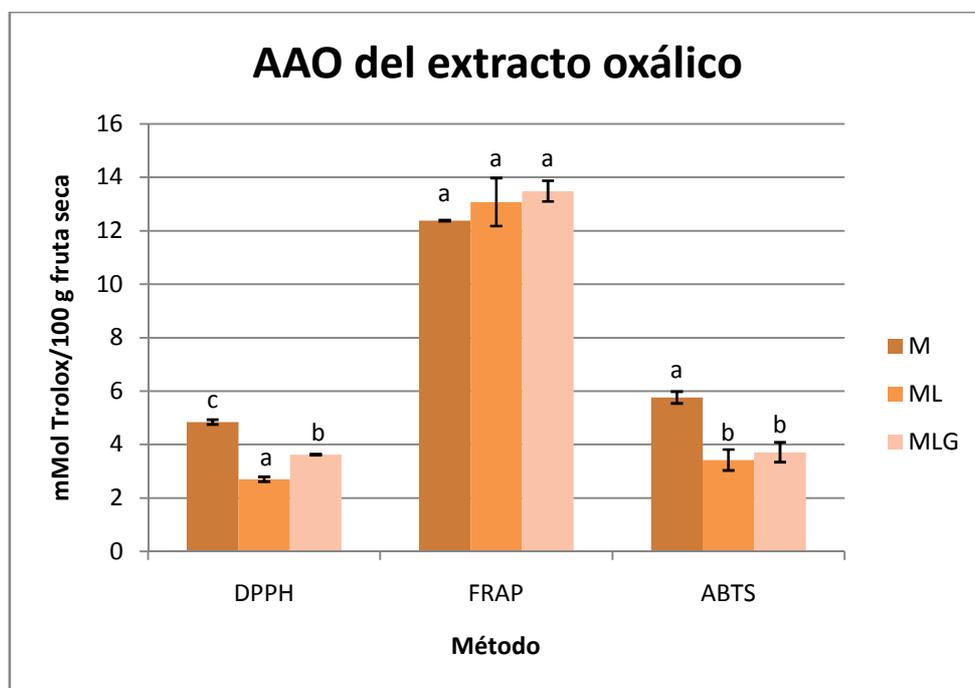


Figura 4. Actividad antioxidante de cada muestra según el método empleado en el extracto con ácido oxálico, en mMol de Trolox por 100 g de sólidos de fruta. a-b-c: Columnas con distinta letra dentro de un mismo método presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Para el extracto de vitamina C se observó la misma tendencia observada en la actividad antioxidante evaluada en los extractos fenólico y lipofílico, respecto al efecto ocasionado por el proceso de liofilización y por la adición de goma arábica. Además es congruente con el comportamiento descrito para la vitamina C (Figura 4). Las pérdidas de AAO de la mora liofilizada (ML) respecto a la mora fresca (M) fueron del 44 % en DPPH y del 40 % en ABTS. En la mora liofilizada con goma arábica (MLG) también se produjeron pérdidas, aunque menores que en la mora liofilizada sin goma (ML), del 25 % en DPPH y del 35 % en ABTS. Sin embargo, el método FRAP parece menos sensible puesto que no encontró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la AAO de las tres muestras (Figura 4). Tampoco el método ABTS encuentra diferencias entre la mora liofilizada (ML) y la mora liofilizada con goma (MLG).

4.2 EFECTO DEL DISOLVENTE EMPLEADO EN LA EXTRACCIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

En este punto se analizarán los efectos del disolvente empleado en la extracción en la AAO de los extractos en disolución obtenidos. En la siguiente tabla (Tabla 6) se resumen los disolventes empleados en cada extracto analizado, tal y como se describió en el apartado de Material y Métodos:

Tabla 6. Disolventes utilizados en cada extracción y nomenclatura de los extractos.

Extracto de:	Disolventes
Compuestos fenólicos (EF)	Metanol: Agua (70:30, v/v)
Carotenoides (EC)	Hexano: Acetona: Etanol (50:25:25, v/v/v)
Vitamina C (EO)	Ácido oxálico (0,1 %)

En la siguiente figura (Figura 5) se muestra una comparación entre los distintos extractos (EF, EC y EO) por muestra (M, ML y MLG) y método empleado para el análisis de la AAO (DPPH, FRAP y ABTS). El objetivo de la figura es visualizar mejor la aportación de cada extracto en la actividad antioxidante total. Cada barra representa el total de la actividad antioxidante (AAO) para cada muestra y análisis. En total, la suma de las actividades antioxidantes de los tres extractos para una misma muestra y análisis representa el 100% de cada barra. La aportación de actividad antioxidante de cada extracto esta coloreada y permite su comparación con el resto de extractos de la misma barra. No se pueden comparar resultados obtenidos por distintos métodos porque su fundamento es distinto (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

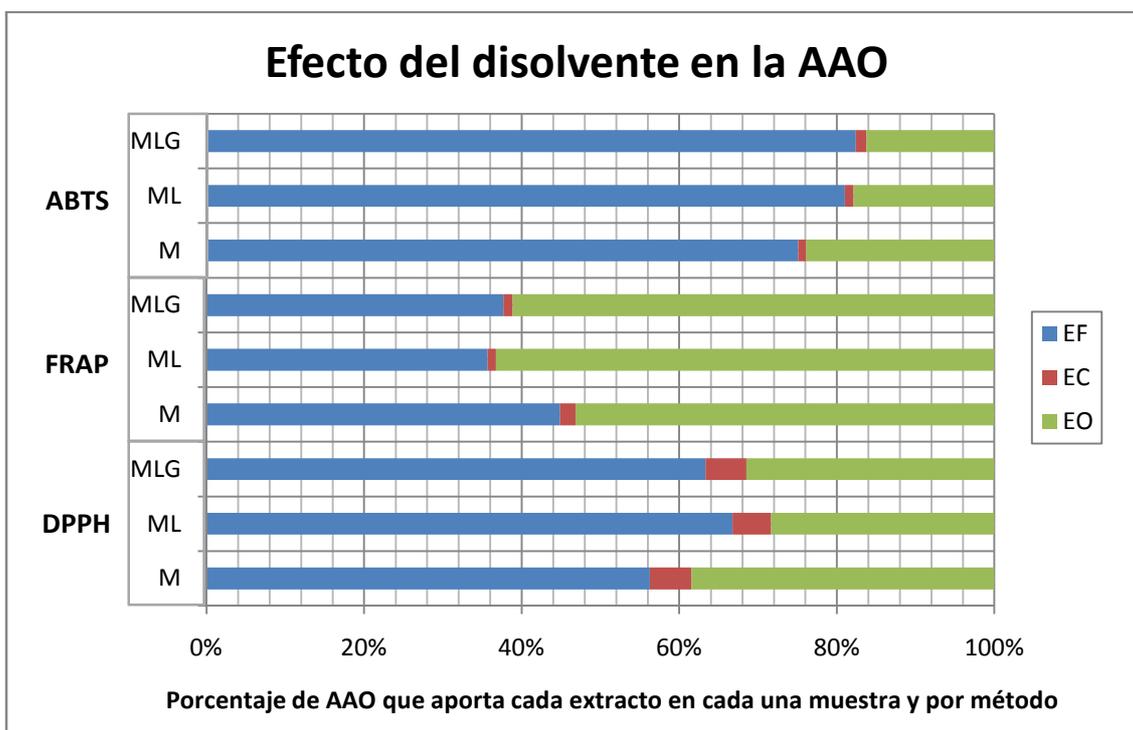


Figura 5. Efecto del disolvente utilizado en la actividad antioxidante (AAO) en %.

Observando la figura se puede decir que, en general, el extracto hidrofílico de compuestos fenólicos (EF) fue el que más aportó a la actividad antioxidante total. El extracto que menos contribuyó a la actividad antioxidante fue el lipofílico (EC). Por análisis, el extracto hidrofílico EF aportó aproximadamente el 80% de AAO en ABTS y en DPPH el 60%, para todas las muestras. Sin embargo, cuando la AAO es evaluada mediante el método FRAP, el extracto de

vitamina C (EO) fue el que más contribuyó a la AAO total, aportando casi un 60% del potencial antioxidante de las muestras. Según un estudio (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007) comparativo entre la utilización de metanol, acetona o agua como disolventes en la extracción de compuestos bioactivos de mora, se obtuvo que el metanol fue el disolvente que mejores resultados de actividad antioxidante dio de los tres disolventes empleados. El metanol es muy utilizado en las extracciones de compuestos polifenólicos de mora (*Morus alba*) y especies semejantes (Imran *et al.*, 2010; Iqbal *et al.*, 2012; Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015a; Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015b).

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS SECOS. EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Como ya se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, la obtención de los extractos secos supuso la deshidratación de los extractos en disolución. Para conocer si la deshidratación de los extractos ha influido en el contenido de compuestos bioactivos y en la actividad antioxidante de los mismos, se analizaron los mismos parámetros que en los extractos en disolución (Apartado 3.3). Los resultados obtenidos se pueden observar en las tablas 7 y 8. Tras obtener los resultados, se realizó un análisis estadístico ANOVA para conocer si existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los resultados de los extractos secos y los correspondientes de los extractos en disolución. Aquellos resultados que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se ha marcado con un asterisco (*) en las Tablas 7 y 8. La tabla 7 muestra los resultados del contenido de compuestos bioactivos (fenoles, carotenoides y vitamina C) de los extractos secos. Por otro lado, la tabla 8 muestra los resultados de actividad antioxidante, medida por los métodos DPPH, FRAP y ABTS, de los extractos secos para cada tipo de extracción realizada.

Tabla 7. Valores medios del contenido de compuestos bioactivos de los extractos secos y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis).

Extracto seco de:	Compuestos bioactivos determinados		
	Fenoles ⁽¹⁾	Carotenoides ⁽²⁾	Vitamina C ⁽³⁾
Mora (M)	1769 (3)	12,53 (0,12)*	33,8 (0,3)*
Mora liofilizada (ML)	2155 (12)*	15,3 (0,2)	30,1 (0,7)*
Mora liof. con goma (MLG)	2330,9 (1,5)	16,72 (0,08)	32,3 (0,3)

(1) Contenido de fenoles, expresados en mg de ácido gálico por 100 g de sólidos de mora.

(2) Contenido de carotenoides, expresados en mg β -Caroteno por 100 g de sólidos de mora.

(3) Contenido de vitamina C, expresada en mg de ácido ascórbico por 100 g de sólidos de mora.

* Cada asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el resultado del extracto seco y el correspondiente resultado obtenido para las muestras iniciales (extracto en disolución).

La deshidratación de los extractos afectó significativamente ($p < 0,05$) disminuyendo el contenido de compuestos fenólicos de ML un 4% y el contenido de vitamina C de las muestras M y ML, con pérdidas del 9 y 6 %, respectivamente. Este descenso podría deberse a la naturaleza lábil esta vitamina (Klimczak *et al.*, 2007), viéndose afectada por la congelación del extracto en disolución y la posterior liofilización para obtener el extracto seco. La presencia de goma arábiga parece mantener mejor el contenido de ácido ascórbico, impidiendo su degradación. El contenido de carotenoides no ha variado significativamente salvo en el extracto seco de M. Se registraron pérdidas del 6, 5 y 3 % para las muestras de mora fresca

(M), mora liofilizada (ML) y mora liofilizada con goma (MLG) respectivamente. En conjunto, la mora liofilizada con goma (MLG) fue la que menos pérdidas sufrió en su composición de compuestos bioactivos, evidenciando su carácter encapsulante. Algunos estudios muestran que la adición de goma arábica en productos secos mantiene en mayor o menor medida sus propiedades fisicoquímicas y funcionales (Omer-Abdelgader & Awad-Ismael, 2011; Idris *et al.*, 2013).

Otros estudios (Ahmad-Qasem, 2015) mostraron que la deshidratación de extractos de hojas de olivo ricos en compuestos fenólicos, a 120°C y a 55°C con vacío, causaron un efecto significativo ($p < 0,05$) en su potencial antioxidante, reduciendo tanto su actividad antioxidante como el contenido en fenoles alrededor de un 10 %, independientemente del método de secado empleado. Esta reducción también ha sido descrita por otros autores cuando distintos extractos naturales se han secado por diferentes métodos. Así, Fang y Bhandari (2011) observaron que el secado por aspersión de zumo de bayas redujo la actividad antioxidante y el contenido de fenoles en un 6 y 4 %, respectivamente, del extracto inicial. Benelli *et al.*, (2013) secaron extractos de plantas aromáticas mediante secado con aire caliente, reduciendo el contenido fenólico del extracto inicial un 8,5 %.

Tabla 8. Valores medios de la actividad antioxidante de los extractos secos y su correspondiente desviación estándar (entre paréntesis).

Extracto:	Método ⁽¹⁾	Extracto seco de:		
		Mora (M)	Mora liofilizada (ML)	Mora liofilizada con goma arábica (MLG)
Hidrofílico-fenólico	DPPH	6,59 (0,01)*	5,91 (0,01)*	7,2 (0,01)
	FRAP	9,7 (0,03)*	6,84 (0,01)*	8,22 (0,02)*
	ABTS	16,81 (0,01)*	14,69 (0,01)*	18,31 (0,03)*
Lipofílico	DPPH	0,64 (0,03)	0,46 (0,01)	0,58 (0,02)
	FRAP	0,43 (0,003)	0,21 (0,003)*	0,25 (0,01)
	ABTS	0,23 (0,001)*	0,2 (0,001)	0,29 (0,004)
Hidrofílico-vitamina C	DPPH	4,36 (0,01)*	2,45 (0,003)*	3,39 (0,01)*
	FRAP	11,01 (0,001)*	11,63 (0,001)*	12,41 (0,002)*
	ABTS	5,11 (0,08)*	3,03 (0,03)*	3,53 (0,02)

(1) Los resultados de AAO se expresaron en mMol de Trolox por 100 g de sólidos de fruta.

* Cada asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el resultado del extracto seco y el correspondiente resultado obtenido para las muestras iniciales (extracto en disolución).

En las muestras M y ML se observó una ligera disminución ($p < 0,05$) en la AAO de ambos extractos hidrofílicos (fenólico y de vitamina C) secos del orden del 7 % en el extracto fenólico y del 10% para el extracto de vitamina C respecto a la AAO de los respectivos extractos en disolución. En el extracto de vitamina C también se produjeron pérdidas significativas ($p < 0,05$) en el extracto con goma arábica del orden del 6 % para DPPH y 8 % para FRAP. En este caso, no se observó un efecto protector de la goma arábica sobre la AAO de los extractos. En general, la AAO del extracto lipofílico seco se mantuvo más estable, no mostrando diferencias con el extracto en disolución. La presencia de goma arábica en este caso sí ejerció un efecto encapsulante, tal y como atestiguan otros estudios (Laine *et al.*, 2008).

Para evaluar la cantidad de bioactivos que contiene el extracto y poder comparar con el aporte ingerido al tomar la misma cantidad de fruta fresca, los resultados se expresaron también por g de extracto. Se obtuvo que por g de extracto de mora (M) se estarían tomando 47,37 mg de

ácido gálico (AG), 39,17 mg de AG en mora liofilizada (ML) y 44,45 mg de AG en mora liofilizada con goma (MLG), lo cual supondría tomar 14, 12 y 13 veces más, respectivamente, que tomar 1 g de fruta. Respecto a los carotenoides: en M se estarían tomando 0,33 mg de β -carotenos, en ML 0,28 mg y en MLG 0,32 mg, lo cual supondría 13,6, 11,4 y 13 veces más que tomar 1 g de fruta, respectivamente. Por último, para la vitamina C, se estarían tomando 0,82 mg ácido ascórbico para M, 0,55 mg en ML y 0,61 mg en MLG, lo cual supone 12, 8 y 9 veces más que tomar 1 g de fruta fresca, respectivamente.

4.4 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS.

Para identificar si existe alguna correlación entre los métodos de determinación de la actividad antioxidante utilizados y cada uno de los compuestos bioactivos extraídos, se realizaron análisis estadísticos de correlación de Pearson (Tabla 9). El coeficiente de correlación de Pearson es un índice que mide el grado de variación entre distintas variables relacionadas linealmente. El intervalo de variación de este coeficiente es de -1 a +1 y mide la fuerza de relación lineal entre las variables.

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.

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

	DPPH	ABTS	FRAP
Fenoles Totales	0,74*	0,78*	0,75*
Carotenoides	-0,64*	-0,91*	-0,58*
Vitamina C	0,90*	0,83	0,89

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

Se observó una correlación positiva entre la actividad antioxidante determinada por cualquiera de los tres métodos y el contenido en fenoles totales y en vitamina C de las diferentes muestras de mora. Esta correlación fue significativa ($p < 0,05$) para los fenoles en todos los casos y para la vitamina C solo con el método DPPH.

Los extractos de vitamina C fueron los que mejor se correlacionaron con la actividad antioxidante, concretamente con el método DPPH (0,90). Los compuestos fenólicos de la mora también estuvieron bien correlacionados con la actividad antioxidante, tal y como describen trabajos de distintos autores (Koka y Kardeniz, 2009; Wu *et al.*, 2010 & Rios de Souza *et al.*, 2014).

Por su parte, las correlaciones de Pearson de los carotenoides fueron negativas y no significativas con la actividad antioxidante por ninguno de los tres métodos. La correlación negativa entre carotenoides totales y la actividad antioxidante, ha sido observada también por otros autores (Thaipong *et al.*, 2006; Rios de Souza *et al.*, 2014). Esto indica que los carotenoides no son los principales agentes antioxidantes de la fracción lipofílica de la mora, pudiendo existir otras sustancias interferentes, como ya se ha comentado en apartados anteriores. Así, en la AAO del extracto lipofílico puede existir influencia de la acción de otros componentes no evaluados en este trabajo, como la vitamina E (Singhal *et al.* 2010; Müller *et*

al., 2011). Pulido *et al.* (2000) tampoco observaron relación de los carotenoides con el método FRAP, concluyendo que estas sustancias no parecen contribuir a la reducción del hierro. Pérez Jiménez *et al.* (2008), sugieren la aplicabilidad de este método de determinación de la capacidad antioxidante para compuestos hidrofílicos, y el método DPPH para ambos extractos, lipofílico e hidrofílico.

4.5 ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LA ENCAPSULACIÓN.

La Eficacia encapsulante indica la capacidad que tiene el agente encapsulante, en este caso la goma arábica para encapsular las moléculas de compuestos bioactivos. Según distintos autores que emplean la técnica de liofilización junto la adición de un soluto encapsulante (goma arábica, maltodextrina) para encapsular compuestos bioactivos sensibles y aromas, y con el objetivo de mejorar la estabilidad de los productos en polvo obtenidos (Dib Taxi *et al.*, 2003; Righetto y Netto, 2005 y Murali *et al.*, 2014) la Eficacia encapsulante puede calcularse basándose en la cantidad de bioactivo inicial en la fruta antes y después de la encapsulación, según método sugerido por Risch y Reineccius (1988), tal y como se ha descrito en Material y Métodos (3.4). Siguiendo este procedimiento y comparando respecto al contenido en la fruta de partida, se obtuvo que la Eficacia encapsulante de los compuestos fenólicos y de los carotenoides fue de 84%, mientras que la de la vitamina C fue del 81%.

Además, para no tener en cuenta en el cálculo de este parámetro el efecto del aumento de compuestos bioactivos que en algunos casos se produce con el proceso de liofilización, y enmascarar así el efecto causado únicamente por la adición de goma arábica, también se calculó la Eficacia encapsulante tomando como control el extracto seco de la mora liofilizada sin goma arábica. Es decir se compararon los valores de compuestos bioactivos en el extracto seco de ML respecto al extracto seco de MLG. De esta manera, la eficacia encapsulante de los compuestos fenólicos fue del 91,5%, de los carotenoides fue del 91% y de la vitamina C del 92%.

Estos valores fueron del orden de los encontrados por Murali *et al.*, (2014), que encapsuló antocianinas con goma arábica empleando la técnica de liofilización.

5. CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos, pueden presentarse las siguientes conclusiones.

- La liofilización permitió obtener productos de mora en polvo ricos en compuestos bioactivos y de alta capacidad antioxidante. Este proceso aumentó el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos y carotenoides. Por el contrario, la liofilización disminuyó el contenido de vitamina C, dado su carácter termolábil. Sería necesario realizar un estudio de almacenamiento para comprobar cuanto tiempo permanece viable esta vitamina en cada muestra en polvo, dado que algunos estudios sugieren una mayor estabilidad para la vitamina C en productos liofilizados. Por otra parte, la liofilización parece afectar negativamente a la actividad antioxidante de las muestras, con pérdidas respecto a la muestra fresca del entorno del 20 % en el extracto hidrofílico y hasta 50 % en el extracto lipofílico. Dado que la liofilización no afectó a los carotenoides, esto parece indicar que pudieron extraerse también otros fitonutrientes lipofílicos presentes en la mora como la vitamina E, no analizados en este estudio,

sensibles al procesado y que pueden estar siendo contabilizados al evaluar la capacidad antioxidante de este extracto.

- En general, los extractos hidrofílicos, es decir el extracto fenólico (obtenido con una disolución de metanol y agua) y el extracto de vitamina C (obtenido con ácido oxálico) fueron los que mayor actividad antioxidante mostraron, en comparación con el extracto lipofílico.
- La vitamina C fue el compuesto que mejor se correlacionó con la actividad antioxidante de la mora.
- La deshidratación de los extractos disminuyó los compuestos fenólicos un 4% y un 9% en vitamina C. La presencia de goma arábica mantuvo mejor el contenido de estos compuestos, impidiendo su degradación. El extracto lipofílico seco no mostró diferencias significativas respecto al extracto inicial en disolución.
- En general, la adición de goma arábica favoreció la estabilidad de los fitoquímicos estudiados, demostrando su acción encapsulante y protectora de los mismos. Además, mejoró la actividad antioxidante de los extractos. Se obtuvo una eficacia encapsulante de alrededor de 90 %.

6. BIBLIOGRAFÍA.

AGUDELO, C.; IGUAL, M.; CAMACHO, M. M. & MARTÍNEZ-NAVARRETE, N., 2016. Effect of process technology on the nutritional, functional and physical quality of grapefruit powder. *Food Science and Technology International* (En prensa).

AGUDO, A. & GONZÁLEZ, C. A., 2007. Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *American Journal of Clinical Nutrition*, 85: 1634-42.

AHMAD QASEM MATEO, M., 2015. *Assessment of the influence of processing conditions on the antioxidant potential of extracts obtained from olive oil industry by products*. Tesis Doctoral en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria. Universitat Politècnica de València. 366 pp.

ANCOS, B.; GONZALEZ, E.M. & CANO, M.P., 2000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4565-4570.

ANDLAUER, W. & FÜRST, P., 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35: 171-176.

AOAC, 1980. Official Methods of Analysis. *Association of Official Analytical Chemists*. 13th Edition. Washington D.C.

AOAC, 1990. Official methods of analysis. *Association of Official Analytical Chemists*. 15th Edition.

- ARABSHAHI-DELOUEE, S. & UROOJ, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102: 1233-1240.
- ARNAO, M.B.; CANO, A; ACOSTA, M., 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food chemistry*, 73: 239-244.
- ARUOMA, O. I., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (2): 199–212.
- AUGUSTIN, M. A. & HEMAR, Y., 2009. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38: 902-912.
- BAGCHI, K. & PURI, S., 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern mediterranean health journal*, 4 (2): 350–360.
- BENELLI, L.; SOUZA, C. R. F. & OLIVEIRA, W. P., 2013. Spouted bed performance on drying of an aromatic plant extract. *Powder Technology*, 239: 59-71.
- BENZIE, F.F.I. & STRAIN, J.J., 1996. The ferric reduction ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239: 70-76.
- 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.
- 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. *Chemistry Central Journal*, 8: 48.
- BUTT, M. S.; NAZIR, A.; SULTAN M. T.; SCHROËN, K., 2008. *Morus alba* L. nature's functional tonic. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 505-512.
- CANENE-ADAMS, K. & ERDMAN JR, J. W., 2009. Chapter 7: Absorption, Transport, Distribution in Tissues and Bioavailability, in: *Carotenoids, Volume 5: Nutrition and Health*. Edited by Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H.. Basel, Boston & Berlin, 115-144.
- CASTAÑEDA, J.; MIÑANO, H. A.; JARA, R. S. y RODRIGUEZ, G., 2010. Estudio comparativo de la pérdida de vitamina C en chalarina (*Casmiroa edulis*) por cuatro métodos de deshidratación. *Scientia Agropecuaria*, 1: 75-80.
- CECONI, C.; BORASO, A.; CARGNONI, A. & FERRARI, R., 2003. Oxidative stress in cardiovascular disease: Myth or fact? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 420 (2): 217–221.
- CHUNG, H. I.; KIM, J.; KIM, J. Y. & KWON, O., 2013. Acute intake of mulberry leaf aqueous extract affects postprandial glucose response after maltose loading: Randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Journal of Functional Foods*, 5: 1502-1506.
- CRUZADO, M. Y CEDRÓN, J. C., 2012. Nutraceuticos, alimentos funcionales y su producción. *Revista de Química PUCP*, vol. 26, nº 1-2: 33-36.
- DEFELICE, SL., 1995. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends Food Science Technology*, 6: 59-61.

- DESAI, K. G. H. & PARK, H. J., 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23: 1361-1394.
- DIB TAXI, C.M.A., MENEZES, H.C., SANTOS, A.B. & GROSSO, C.R.F., 2003. Study of the microencapsulation of camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice. *Journal of Microencapsulation*, 20: 443-448.
- DIMITROVA, M. P.; PETKOVA, N. TR.; DENEV, P. P. & ALEKSIEVA, I. N., 2015. Carbohydrate Composition and Antioxidant Activity of Certain *Morus* Species. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*; 7(3): 621-627.
- DUSTING, G. J. & TRIGGLE, C., 2005. Are we over oxidized? Oxidative stress, cardiovascular disease, and the future of intervention studies with antioxidants. *Vascular Health and Risk Management*, 1 (2): 93-97.
- ENKHMAA, B.; SHIWAKU, K.; KATSUBE, T.; KITAJIMA, T.; ANUURAD, E.; YAMASAKI, M. & YOSUKE, Y., 2005. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Journal of Nutrition*, 135: 729-734.
- ERCISLI, S. & ORHAN, E., 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103: 1380-1384.
- FANG, Z. & BHANDARI, B., 2010. Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 510-523.
- FANG, Z. & BHANDARI, B., 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129 (3): 1139-1147.
- 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*. Ed. Acribia. Zaragoza. 706 pp.
- GARAU, M. C.; SIMAL, S.; ROSSELLO, C. & FEMENIA, A., 2007. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food Chemistry*, 104: 1014-1024.
- GUNDOGDU, M.; MURADOGLU, F.; GAZIOGLU, R. I. & YILMAZ, H., 2011. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132: 37-41.
- GUNDOGDU, M.; MURADOGLU, F.; GAZIOGLU-SENSOY, R. I. & YILMAZ, H., 2011. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132: 37-41.
- GUNDOGDU, M.; MURADOGLU, F.; SENSOY, R. I. G. & YILMAZ, H., 2011. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132: 37-41.
- HAKKINEN, S. H. & TORRONEN, A. R., 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33: 517-524.

- HAMILTON, C. A.; MILLER, W. H.; AL-BENNA, S.; BROSNAN, M. J.; DRUMMOND, R. D.; MCBRIDE, M.W. & DOMINICZAK, A. F., 2004. Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clinical Science*, 106 (3): 219–234.
- HEINONEN, M. I.; OLLILAINEN, V.; LINKOLA, E. K.; VARO, P. T. & KOIVISTOINEN, P. E., 1989. Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37: 655-659.
- HERCBERG, S.; CZERNICHOW, S. & GALAN, P., 2006. Antioxidant vitamins and minerals in prevention of cancers: lessons from the SUVIMAX study. *British Journal of Nutrition*, 96 (Supl.1): S28-30.
- HUANG, D.; OU, B. & PRIOR, R. L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.
- HUANG, D.; OU, B. & PRIOR, R.L., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 1841-1856.
- HUNYADI, A.; LIKTOR-BUSA, E.; MÁRKI, A.; MARTINS, A.; JEDLINSZKI, N.; HSIEH, T. J.; BÁTHORI, M.; HOHMANN, J. & ZUPKÓ, I., 2013. Metabolic effects of mulberry leaves: Exploring potential benefits in type 2 diabetes and hyperuricemia. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, Art. No.: 948627.
- IDRIS, Y. M. A.; IBRAHIM, Y. A. & MARIOD, A. A., 2013. Color of dehydrated tomato: effects of Gum Arabic. *International Journal of Food Properties*, 16: 838-851.
- IMRAN, M.; KHAN, H.; SHAH, M.; KHAN, R. & KHAN, F., 2010. Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 1(12): 973-980.
- IQBAL, S.; YOUNAS, U.; SIRAJUDDIN; WEI CHAN, K.; SARFRAZ, R. A. & UDDIN, MD. K., 2012. Proximate Composition and Antioxidant Potential of Leaves from Three Varieties of Mulberry (*Morus* sp.): A Comparative Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 6651-6664.
- JAIN, N. & RAMAWAT, K. G., 2013. Nutraceuticals and antioxidants in prevention of diseases, in: *Natural Products*, Ed. Springer. Berlin, Heidelberg, 2559-2580.
- JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J. & ERGUL, A., 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, 4 (1): 5.
- KAMPUSE, S.; KAMPUSS, K. & PIZIKA, L., 2002. Stability of anthocyanins and ascorbic acid in raspberry and blackcurrant cultivars during frozen storage. *Acta Horticulturae*, 585: 507-600.
- KATSUBE, T.; IMAWAKA, N.; KAWANO, Y.; YAMAZAKI, Y.; SHIWAKU, K. & YAMANE, Y., 2006. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97: 25-31.
- KLEIN, E. A.; THOMPSON, IM. JR.; TANGEN, C. M.; *et al.*, 2011. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Journal of the American Medical Association*, 306 (14): 1549-1556.
- KLIMCZAK, I.; MALECKA, M.; SZLACHTA, M. & 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.

- KLIMCZAK, I.; MALECKA, M.; SZLACHTA, M. & GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A., 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of oranges juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 313-322.
- KOCA, I. & KARADENIZ, B., 2009. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 121: 447-450.
- LAINE, P.; KYLLI, P.; HEINONEN, M. & JOUPPILA, K., 2008. Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11251-11261.
- LIPPMAN, S. M.; KLEIN, E. A.; GOODMAN, P. J.; et al., 2009. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers. *Journal of the American Medical Association*, 301 (1): 39-51.
- LOHACHOOMPOL, V.; SRZEDNICKI, G. & CRASKE, J., 2004. The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5: 248-252.
- MACHLIN, L. J. & BENDICH, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1 (6): 441-445.
- MAGRAMA, 2015. Panel de consumo alimentario en España. Visto el 1 de Junio de 2015.
- MARINOVA, D. & RIBAROVA, F., 2007. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 370-374.
- MATTISSEK, R.; SCHENEPEL, F. y STEINER, G., 1998. Análisis de alimentos: fundamentos prácticos, métodos y aplicaciones. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.
- MEMON, A. A.; MEMON, N.; LUTHRIA, D. L.; BHANGER, M. I. & PITAFI, A. A., 2010. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) Leaves and fruits grown in Pakistan. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60 (1): 25-32.
- MONTENEGRO, M. A.; BORSARELLI, C. D.; VALLE, L. & BOIERO, M. L., 2012. Gum Arabic: more than an edible emulsifier. *Products and Applications of Biopolymers*, Dr. Johan Verbeek (Ed.), InTech. Visto el 1 de Julio de 2016. Available from: <http://www.intechopen.com/books/products-and-applications-of-biopolymers/gum-arabic-more-than-an-edible-emulsifier>
- MOSQUERA MOSQUERA, L. H., 2010. Influencia de la humedad y de la adición de solutos (maltodextrina o goma arábica) en las propiedades fisicoquímicas de borjón y fresa en polvo. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València. 247 pp.
- MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K. & BÖHM, V., 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129: 139-148.
- MURALI, S.; ABHIJIT KAR, A.; MOHAPATRA, D.; KALIA, P., 2014. Encapsulation of black carrot juice using spray and freeze drying. *Food Science and Technology International*, 0(0): 1-9.
- NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S. & BUGARSKI, B., 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. 11th *International Congress on Engineering and Food (ICEF11)*. *Procedia Food Science* 1: 1806-1815.

- NIH & NCCAM, 2013. Antioxidants and health: an Introduction. *Get the facts*
- NIWA, Y.; KANO, T.; KASAMA, T. & NEGISHI, M., 1987. Activation of antioxidant activity in natural medicinal products by heating, brewing and lipophilization. A new drug delivery system. *Drugs under experimental and clinical research*, 14(5): 361-372.
- OETJEN, G.-W. & HASELEY, P., 2004. *Freeze-drying*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- OLIVES BARBA, A. I.; CÁMARA HURTADO, M.; SÁNCHEZ MATA, M.C.; FERNÁNDEZ RUIZ, V. & LÓPEZ SÁENZ DE TEJADA, M. 2006. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95: 328-336.
- OMER-ABDELGADER, M. & AWAD-ISMAIL, I., 2011. Application of Gum Arabic for Coating of Dried Mango Slices. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10 (5): 457-462.
- OMS, 2005. The global burden of disease attributable to low consumption of fruits and vegetables; implications for the global strategy on diet. *Bull. Health Organization*, 83 (2): 100-108.
- PANDEY, M.; VERMA R.K. & SARAF, S.A., 2010. Nutraceuticals: new era of medicine and health. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3: 11-15.
- PEANPARKDEE, M.; BOROMPICHAICHARTKUL, C. & DUANGMAL, K., 2013. Encapsulation of Extraction from Mulberry *Morus alba* L. Leaves by Polymer-Polymer Interactions in: *Proceedings of the international symposium on agri-foods for health and wealt*. Produced by Division Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi. Bangkok, 273-279.
- PEARSON, D., 1998. *Técnicas de laboratorio para análisis de alimentos*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J. y SAURA-CALIXTO, F., 2007. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. V Congreso Iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones, S8-O131.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, 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.
- POIANA, M. A.; MOIGRADEAN, D.; RABA, D.; ALDA, L. M. & POPA, M., 2010. The effect of long term frozen storage on the nutraceutical compounds, antioxidant properties and color indices of different kinds of berries. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, Vol.8 (1): 54-58.
- 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.
- PUUPPONEN-PIMIÄ R.; HÄKKINEN S.T.; AARNI M.; SUORTTI T.; LAMPI A.M.; EUROLA M.; PIIRONEN V.; NUUTILA A.M. & OKSMAN-CALDENTY K.M., 2003. Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1389-1402.

- RE, N.; 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*, 26: 1231-1237.
- RIGHETTO, A. M. & NETTO, F. M., 2005. Effect of encapsulating material on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola. *International Journal of Food Properties*, 8(2): 337-346.
- RIOS DE SOUZA, V.; PEREIRA, P.; THAIS LOMÔNACO TEODORO DA SILVA, T.; DE OLIVEIRA LIMA, L.; PIO, R. & QUEIROZ, F., 2014. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156: 362-368.
- RISCH, S. J. & REINECCIUS, G. A., 1988. Spray-dried orange oil—Effect of emulsion size on flavor retention and shelf life, in: *Flavor encapsulation*. Risch, S.J., Reineccius, G.A., editors. Washington DC: American Chemical Society. p 67-77.
- ROOS, Y., 1995. Characterization of food polymers using state diagrams. *Journal of Food Engineering*, 24(3): 339-360.
- SÁNCHEZ, M. D., 2000. World Distribution and Utilization of Mulberry, Potential for Animal Feeding. *FAO Electronic Conference on Mulberry for Animal Production (Morus L.)*. <<http://www.fao.org/DOCREP/005/X9895E/x9895e02.htm>>.
- SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M.; MENA, P.; GARCÍA-VIGUERA, C.; HERNÁNDEZ, F. & MARTÍNEZ, J. J., 2015b. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. *Journal of Functional Foods*, 18: 1039-1046.
- SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M.; MENA, P.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MARTÍNEZ, J. J. & HERNÁNDEZ, F., 2015a. Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. *Journal of functional foods*, 12: 399-408.
- SCALZO, J.; POLITI, A.; PELLEGRINI, N.; MEZZETTI, B. & BATTINO, M., 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21: 207-213.
- SCHMIDT, B.M.; ERDMAN, J. R. J. W. & LILA, M.A., 2005. Effects of food processing on blueberry antiproliferation and antioxidant activity. *Journal of Food Science*. 70(6):19-26.
- SCIBISZ, I. & MITEK, M., 2007. The changes of antioxidant properties in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during freezing and long-term frozen storage. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(4): 75-82.
- SELVENDRAN, R.R.; RYDEN, P., 1990. Methods in plant biochemistry. *Academy Express London*, 2: 549.
- SHAFIUR RAHMAN, M.; HAMED AL-RIZEIQI, M.; GUIZANI, N.; SALOM AL-RUZAIQI, M.; HAMED AL-AAMRI, A. & ZAINAB, S., 2015. Stability of vitamin C in fresh and freeze-dried capsicum stored at different temperatures. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3): 1691-1697.
- SHUI, G. & LEONG, L. P., 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97: 277-284.

- SINGHAL, B. K.; KHAN, M. A.; DHAR, A.; BAQUAL, F. M. & BINDROO, B. B., 2010. Approaches to industrial exploitation of mulberry (*Mulberry sp.*) fruits. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 1: 83-99.
- SONG, Y.; COOK, N. R.; ALBERT C. M.; VAN DENBURGH, M. & MANSON, J. E., 2009. Effects of vitamins C and E and beta-carotene on the risk of type 2 diabetes in women at high risk of cardiovascular disease: a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90 (2): 429-437.
- 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).
- SZAJDEK, A. & BOROWSKA, E. J., 2008. Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63: 147-156.
- TANG, X. & PIKAL, M. J., 2004. Design of Freeze-Drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical Research*, 21: 191-200.
- THABTI, I.; ELFALLEH, W.; HANNACHI, H.; FERCHICHI, A. & CAMPOS, M. G., 2012. Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC DAD and HPLC-MS. *Journal of Functional Foods*, 4: 367-374.
- 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.
- VILSTRUP, P., 2001. *Microencapsulation of food ingredients*. Surrey: Leatherhead Pub.
- VOS, P. de; FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M. & SIKKEMA, J., 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20: 292-302.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3): 701-705.
- WANG, J.; GULERIA, S.; KOFFAS, M. & YAN, Y., 2016. Microbial production of value-added nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 37: 97-104.
- WANG, S.; MELNYK, J. P.; TSAO, R. & MARCONE, M. F., 2011. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, 44: 14-22.
- 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), Art. No.: e71144.
- WATSON, L. & DALLWITZ, M. J., 2007. Moraceae. In: *The families of flowering plants: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval, 1992 onward*. <<http://delta-intkey.com>>.
- WOOTTON-BEARD, P. C. & RYAN, L., 2011. Improving public health?: The role of antioxidant rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44: 3135-3148.

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. *Food Science and Technology*, 43: 1253-1264.

XU, G.; LIU, D.; CHEN, J.; YE, X.; MA, Y. & SHI, J., 2008. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106(2): 545-551.

YOUSEFI, S.; EMAM-DJOMEH, Z. & MOUSAVI, S. M., 2011. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum L.*). *Journal of Food Science and Technology*, 48(6): 677-684.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M. & NESTEROWICZ, J., 2005. Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2118-2124.