

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL



EFECTO DE LA ADICIÓN DE GOMA ARÁBIGA EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS DE ACEROLA Y KIWI LIOFILIZADOS

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: SUSANA DE LA FUENTE LORENTE

TUTOR/A: EVA GARCÍA MARTÍNEZ

COTUTOR/A: ISABEL ANDÚJAR PÉREZ

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, 1 de Septiembre de 2015



EFFECTO DE LA ADICIÓN DE GOMA ARÁBIGA EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS DE ACEROLA Y KIWI LIOFILIZADOS

RESUMEN

Las frutas, especialmente las tropicales, presentan un gran interés en la nutrición humana por su elevado valor nutritivo y funcional, derivado de la presencia de vitaminas, minerales, fibra y otras sustancias bioactivas. El consumo regular de estas frutas está relacionado con la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, se trata de productos estacionales y perecederos, estando además su calidad comprometida el deterioro debido al transporte y al almacenamiento. La eliminación de agua mediante la técnica de liofilización es un medio para estabilizar el alimento sin provocar grandes pérdidas funcionales y de nutrientes.

Para este trabajo se ha seleccionado como frutas de estudio la acerola y el kiwi y se ha estudiado la influencia del secado por liofilización y la incorporación de goma arábica como agente encapsulante, con el fin de conocer la viabilidad de la esta tecnología para la obtención de productos nutracéuticos con alta capacidad antioxidante. Se han realizado extracciones con distintos disolventes para obtener la mayor cantidad de compuestos bioactivos liposolubles (carotenoides) e hidrosolubles (compuestos fenólicos) y se ha evaluado la actividad antioxidante por los métodos DPPH, FRAP y ABTS. Además, se ha realizado un screening *in vitro* de la actividad antiinflamatoria mediante el estudio de la inhibición de la producción de ácido nítrico en macrófagos de ratón.

Los resultados mostraron que la acerola obtuvo mayor contenido en compuestos fitoquímicos, así como mayor actividad antioxidante que el kiwi. En ambas frutas la actividad antioxidante evaluada en el extracto hidrofílico fue mayor que en el lipofílico. La liofilización afectó de distinta manera a la calidad funcional de las frutas, mejorando la actividad antioxidante de la acerola, pero disminuyendo la del kiwi. En general, la incorporación de goma arábica favoreció la estabilidad de los fitoquímicos estudiados y mejoró la actividad antioxidantes de los productos en polvo. En los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro*, solo se encontró inhibición celular en el extracto de kiwi liofilizado con un 75% de inhibición en la producción de NO.

PALABRAS CLAVE: Acerola, kiwi, liofilización, goma arábica, fenoles, carotenoides, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria.

Alumna: Susana de la Fuente Lorente

Tutora: Eva García Martínez

Cotutora: Isabel Andújar Pérez

Valencia, Septiembre 2015

ABSTRACT:

Fruits, especially the tropical ones, are of great interest in human nutrition due to their high nutritional and functional benefits, which are provided by the presence of vitamins, minerals, fiber and other bioactive components. Moreover, it has been demonstrated that regular consumption of these fruits is related to the prevention and treatment of various diseases. However, fruits are seasonal and perishable products and its quality is influenced by the deterioration suffered by transport and storage. Previous studies have shown that the removing of the water in fruits by freeze drying technique stabilizes the product without causing major alterations of their functional or nutritional benefits.

In the present work, kiwi and acerola were selected to find out how important the influence of freeze drying could be in these products and also, if arabic gum could be used as an appropriated encapsulating agent. Therefore, our aim is to know the viability of the use of this technique to obtain nutraceutical products with high antioxidant properties. To reach this aim, extractions were performed with different solvents to obtain the larger amount of lipophilic bioactive compounds (carotenoids) and hydrophilic (phenolic compounds) and the antioxidant activity was evaluated by the use of three different methods: DPPH, FRAP and ABTS. Furthermore, a screening *in vitro* of the anti-inflammatory activity was performed by examining the inhibition of nitric acid in mouse macrophages.

The results showed that acerola had higher amount of phytochemicals and greater antioxidant activity than kiwi. When comparing hydrophilic and lipophilic extracts, we found that both fruits showed higher antioxidant activity in the hydrophilic extract. Besides, the freeze drying affected differently the functional quality of both fruits, since the process improved the antioxidant activity of acerola, but decreased in kiwi. In relation with the encapsulation, in general, the incorporation of arabic gum improved both the stability of the phytochemicals studied and the antioxidant activity of the powders. Finally, the *in vitro* assays results show a single cell inhibition in the freeze dried kiwi extract which reaches 75%.

KEY WORDS: Acerola, kiwifruit, freeze drying, arabic gum, phenols, carotenoids, antioxidant activity, antiinflammatory activity.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la directora de este proyecto, Eva García Martínez, el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Decidí pedirle la dirección de este proyecto por su gran conocimiento y amabilidad con sus alumnos, ya ha sido un orgullo realizarlo con ella.

Agradecer también a Isabel Andújar Pérez, ha sido un periodo corto pero le agradezco su continuo apoyo y los conocimientos que me ha aportado de Biotecnología.

Sin olvidarme de Alberto Yuste del Carmen, por su paciencia conmigo y por haberme proporcionado parte de su gran conocimiento, así como transmitirme esas ganas y optimismo necesario en el trabajo de investigación.

También quiero agradecer a todos los compañeros de laboratorio su ayuda y consejo en todo momento, en especial a Miriam Tarim ya que ha sido mucho más fácil realizar este proyecto a su lado, teniendo un apoyo e implicación tan grande y como constante como el suyo.

A todos mis amigos, y en especial a Aina, María y Vito, se que sin ellas nada de esto hubiese sido lo mismo. Ellas han hecho que estos cinco años en Valencia sean maravillosos.

Y por último, a mi familia por su confianza, por haberme dado la oportunidad y el apoyo para poder realizar mis estudios. En especial a Alberto, el cual siempre ha estado a mi lado incondicionalmente superando grandes distancias y dificultades, sin él no hubiese podido llegar donde hoy estoy.

A todos, muchas gracias.

Índice general

I. Introducción	1
1. Nutracéuticos	1
2. Kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i>).....	2
3. Acerola (<i>Malpighia emarginata DC.</i>)	3
4. Liofilización.....	4
5. Goma arábica.....	5
II. Objetivos	7
III. Materiales y métodos	8
1. Materia prima.....	8
1.1. Preparación de las muestras	8
2. Obtención de los productos liofilizados en polvo.....	8
3. Obtención de los extractos.....	9
4. Determinaciones analíticas	10
4.1. Humedad	10
4.2. Compuestos bioactivos.....	10
4.2.1. Fenoles totales.....	10
4.2.2. Carotenoides	10
4.3. Capacidad antioxidante	11
4.3.1. Método DPPH.....	11
4.3.2. Método ABTS.....	11
4.3.3. Método FRAP	12
4.4. Ensayos <i>in vitro</i>	12
4.4.1. Cultivo de la línea celular RAW 264.7.....	12
4.5. Ensayos de citotoxicidad celular	13
4.5.1. Preparación de las muestras	13
4.5.2. Evaluación de la citotoxicidad y proliferación celular por MTT.....	13
4.5.3. Determinación de la producción de NO.....	15
5. Análisis estadísticos	15
IV. Resultados	16
1. Efecto del tratamiento en el contenido en humedad	16
2. Efecto del tratamiento en el contenido de compuestos bioactivos	17
4. Efecto del tratamiento en los ensayos <i>in vitro</i>	25
4.1. Ensayos de citotoxicidad	25
4.1.1. Viabilidad celular.....	25
4.1.2. Determinación de la producción de NO.....	26
V. Conclusiones	28
VI. Referencias	29

Índice de figuras

Figura 1: Etapas de la liofilización	5
Figura 2: Fotografías representativas del tipo celular descrito procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC).....	13
Figura 3: Reducción de MTT a formazán	14
Figura 4: Esquema del procedimiento para el ensayo de citotoxicidad	14
Figura 5: Reacción de la sulfanilamina con nitrito y N-(1-naftil)-etilendiamina para formar un cromóforo diazo.....	15
Figura 6: Actividad antioxidante (AAO, milimoles Trolox Equivalente / 100 g s.f.) del extracto 1 de las diferentes muestras de acerola.....	20
Figura 7: Actividad antioxidante (AAO, milimol de Trolox Equivalente/100 g s.f.) del extracto 1 de las diferentes muestras de kiwi	21
Figura 8: Actividad antioxidante (milimolTrolox Equivalente / 100 g sf) del extracto 2 de las diferentes muestras de acerola	22
Figura 9: Actividad antioxidante (milimolTroloxEquivalente/100 g sf) del extracto 2 de las diferentes muestras de kiwi	23
Figura 12: Evaluación de la citotoxicidad celular por medio de la reducción de MTT a formazán	26
Figura 13: Evaluación de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7	27

Índice de tablas

Tabla 1: Valores medios y desviación estándar de la humedad (x_w) de las diferentes muestras expresadas como g agua/g muestra	17
Tabla 2: Valores medios y desviación estándar del contenido fenoles totales (mg ácido gálico/100 g sólidos de fruta) y carotenoides (mg β caroteno/100 g sólidos de fruta) de las diferentes muestras de acerola y kiwi.....	18
Tabla 3: Actividad antioxidante total (milimolTroloxEquivalente/100 g s.f.) de las diferentes muestras de acerola y kiwi.....	24
Tabla 4: Correlación de Pearson entre los componentes fenólicos y carotenoides con la capacidad antioxidante medida por DPPH, FRAP y ABTS para acerola	24
Tabla 5: Correlación de Pearson entre los componentes fenólicos y carotenoides con la capacidad antioxidante medida por DPPH, FRAP y ABTS para el kiwi.....	25

I. Introducción

1. Nutraceuticos

En los últimos años, la comida ha asumido la condición de "alimento funcional", satisfaciendo los requerimientos nutricionales y, al mismo tiempo, aportando multitud de beneficios para nuestra salud. En concreto, la fruta es un alimento excelente, caracterizado por un bajo contenido de calorías, una alta cantidad de sustancias antioxidantes y niveles significativos de componentes activos con funciones fisiológicas y bioquímicas (Tavarini *et al.*, 2008). Un nutraceutico puede definirse como todo alimento o parte del mismo que proporciona beneficios para la salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades. Estos nutraceuticos se extraen de su matriz natural y se estudian mediante procesos similares a los que se emplean para identificar las propiedades biológicas de los fármacos. Gracias a este concepto, los alimentos ya no solo son evaluados en términos de macronutrientes y micronutrientes, sino que se analiza además su contenido en otros componentes activos. Su papel más importante es la prevención o posible tratamiento de enfermedades, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades degenerativas. Generalmente se crean productos elaborados a partir de alimentos para ser comercializados en forma de píldoras o polvos (Birute *et al.*, 2009).

El contenido en compuestos bioactivos o fitoquímicos de una fruta depende de factores como las condiciones climáticas, el genotipo, la técnica de cultivo, la ubicación geográfica, la aplicación de pesticidas, la etapa de maduración, el procesado y el almacenamiento (Lee y Kader, 2000; Tavarini *et al.*, 2008).

Diariamente el ser humano está expuesto a agentes oxidantes producidos por la contaminación ambiental, el estrés, diversos productos químicos adicionados a los alimentos, (Avello y Suwalsky, 2006) etc. Todo ello provoca la generación de radicales libres en el organismo que deben ser neutralizados por los antioxidantes biológicos para evitar que provoquen daño oxidativo, ya sea en las membranas celulares o en el ADN. Este daño oxidativo es el causante de diversas enfermedades. Entre los antioxidantes no sintéticos encontramos los endógenos, sintetizados por el organismo humano, y los exógenos, presentes en componentes de la dieta. A pesar del amplio y efectivo sistema antioxidante endógeno, (Carocho y Ferreira 2013) éste no resulta suficiente en algunas situaciones por lo que los humanos dependen de antioxidantes presentes en la dieta para mantener las concentraciones de radicales libres a niveles suficientemente bajos (Pietta, 2000). Así, la actividad antioxidante de los alimentos es fundamental, ya que estos contienen compuestos que frenan la formación de radicales libres y previenen o permiten tratar las enfermedades causadas por el estrés oxidativo (Biurete *et al.*, 2009). Entre los antioxidantes más importantes presentes en las frutas se encuentran:

- Vitamina C o ácido ascórbico, es un compuesto hidrosoluble presente en el plasma, el cual es un potente inhibidor de la oxidación de los lípidos. A nivel biológico es importante en la formación de colágeno, absorción de hierro inorgánico, reducción de niveles de colesterol en el plasma, mejora el sistema inmune. Como antioxidante, tiene la función de frenar problemas como la inflamación, reducir el riesgo de arteriosclerosis, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y regenera la vitamina E (Mateljan, 2001; Lee y Kader, 2000).
- Vitamina E, también llamado tocoferol. Es un poderoso antioxidante liposoluble, el cual facilita la absorción de vitamina A. Aunque su papel más importante es proteger la integridad de las membranas celulares, por lo que es necesaria una concentración suficiente en el organismo para que los radicales libres no oxiden a los lípidos de la membrana celular. Por esta razón es de gran importancia para prevenir el envejecimiento (Biurete *et al.*, 2009).
- Compuestos fenólicos: Estrechamente relacionados con la calidad sensorial y nutricional de los alimentos, contribuyendo al aroma y sabor deseable o indeseable. Las coloraciones azules y violetas se deben al contenido de estos compuestos en las frutas. Los fenoles protegen al organismo humano de daños oxidativos, atrapando los radicales libres y previniendo que estos se unan y dañen las moléculas de DNA, este es un paso muy importante en la prevención de los procesos de cáncer. También previenen la peroxidación de lípidos, los cuales pueden causar daño estructural a las células, interfiriendo así con el transporte de moléculas a través de estas. Esto afecta al crecimiento y proliferación celular (Chasquibol *et al.*, 2003). Así mismo tienen gran relevancia en los procesos inflamatorio y ataques cardiacos (Imeh y Khokhar, 2002). El grupo de los fenoles incluye a los flavonoides y sus subgrupos las antocianidinas, las catequinas, los ácidos gálicos y las isoflavonas.
- Terpenos: Son antioxidantes liposolubles que protegen a los lípidos, a la sangre y a otros fluidos corporales del ataque de radicales libres. Responsables del color rojo, naranja y amarillo de las frutas y verduras. Dentro de este grupo se encuentran los carotenoides, que incluyen dos moléculas importantes, los carotenos y las xantofilas. Entre los carotenos se encuentra el α -caroteno, β -caroteno, licopeno, β -cryptoxantina, luteína y zeaxantina, siendo el β -caroteno el más activo. Ofrecen protección contra diferentes tipos de cáncer (Bendich y Olson, 1989), reduce el riesgo de ataques cardiacos, tiene efectos beneficiosos para el sistema inmunológico y protegen la piel contra la radiación ultravioleta. (Bendich y Olson, 1989; Biurete *et al.*, 2009).

2. **Kiwi (*Actinidia deliciosa*)**

Kiwi (*Actinidia deliciosa*) perteneciente a la variedad Hayward, es la más comercializada en el mercado internacional, esto se refleja por la combinación de sabor, valor nutricional y aspecto único. El cultivo del kiwi se ha generalizado en todo el mundo (Testolin y Ferguson, 2009; D'Evoli *et al.*, 2015). Se trata de una planta trepadora originaria del valle del río Yantze de China (Luh y Wang, 1984), la cual fue conocida como Yang Tao. En 1845 tuvo su entrada en Europa, concretamente en Londres, pero no fue hasta principios del siglo XX cuando llegó a Inglaterra, Francia, California, Nueva Zelanda y por último Italia y Grecia (Soufleros *et al.*, 2001). La explotación comercial de esta planta se inició en la década de 1950 (Luh y Wang,

1984; Soufleros *et al.*, 2001), pero la primera aparición en los restaurantes fue en Estados Unidos (1961), con el nombre de “*Chinese Gooseberry to kiwifruit*”, donde posteriormente fue distribuida con una gran aceptación en los mercados alcanzando una notable producción. En 1962, esta fruta exótica única, fue importada por su creciente demanda abandonando su nombre originario de Grosella china y adoptando el nombre de Kiwi (Mateljan, 2001).

El fruto es cilíndrico y envuelto por una la piel marrón con vellosidades. Su interior es de color verde brillante con diminutas semillas negras dispersas radialmente en su núcleo central. Según indica D’Evoli *et al.* (2015) los beneficios que aporta son muy importantes por su alto contenido en fitonutrientes, vitaminas, minerales (P, K, Ca, Mg) y compuestos aromáticos (principalmente ésteres, alcoholes, aldehídos y cetonas) (Soufleros *et al.*, 2001; Beirao *et al.*, 2007).

Como apuntan Du *et al.* (2009), D’Evoli *et al.* (2015) y Bursal y Gülçin (2011), en relación a las sustancias bioactivas o fitonutrientes presentes en el kiwi, se encuentran una gran variedad de flavonoides y carotenoides, siendo de este último grupo, la luteína el más abundante, seguido de β -caroteno. Su color verde característico se debe principalmente a las clorofilas a y b (Tavarini *et al.*, 2008). Respecto a los tocoferoles (vitamina E), el α -tocoferol es uno de los más abundantes seguido de γ -tocotrienol y por último el δ -tocoferol. También tiene una alta concentración de ácido quínico (tanino), característica muy importante en los kiwis, seguido de ácido cítrico, galacturónico, láctico, málico, glucónico, oxálico y fumárico (Soufleros, 2001). Los kiwis también son muy ricos en ácido ascórbico, así D’Evoli *et al.* (2015) demostraron que es el principal contribuyente a la actividad antioxidante total y que contiene de 3 a 5 veces más ácido ascórbico que los cítricos. Por último, cabe destacar la gran importancia dentro de los compuestos fenólicos en el kiwi, en concreto del ácido pirogálico, donde algunos estudios han demostrado que junto con el ácido ascórbico son los compuestos con mayor índice de actividad antioxidante y reductora (Bursal y Gülçin., 2011).

En la actualidad se acepta que el consumo de kiwi tiene un efecto preventivo contra ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Así, especialmente los cánceres del sistema digestivo (principalmente cáncer estomacal), pulmón e hígado, han sido tratados con bioactivos provenientes del kiwi debido a sus actividades citotóxicas y antioxidantes (Du *et al.*, 2009).

3. Acerola (*Malpighia emarginata* DC.)

Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) comprende 30 especies de arbustos nativos procedentes de las Indias Occidentales, aunque también la podemos encontrar en América Central, del Sur y sobretodo en Brasil, debido a su buena adaptación al suelo y al clima. En la actualidad Brasil es el principal productor mundial, consumidor y exportador (Vera de Rosso *et al.*, 2008; Mezadri *et al.*, 2008). En España es poco conocida como fruto fresco y no es muy comercializada ya que aun no ha sido ampliamente distribuida. Sí la podemos encontrar en mezclas de zumos, refrescos en polvo, pulpa congelada y otros derivados.

El fruto tiene una gran semejanza con la cereza. Este es redondo con un diámetro entre 1 a 2 cm y 20 g de peso. Su piel es lisa de color rojo y amarillo. La pulpa es muy jugosa y

refrescante con un sabor afrutado y dulce pero un poco ácido.

El mayor impulso de esta fruta fue cuando se publicó el primer informe de su alto contenido de vitamina C (Asenjo, 1980; Sean Carrington y King, 2002), siendo mayor que el de las naranjas, convirtiéndose así en una de las fuentes naturales más importantes de ácido ascórbico. El consumo de tres unidades de frutas por día satisface la cantidad diaria recomendada de vitamina C para un adulto. Además, presenta alto contenido en otras vitaminas como tiamina, riboflavina y niacina. Los principales minerales esenciales son hierro, calcio y fósforo (Mezadri *et al.*, 2008).

Los principales contribuyentes de la actividad antioxidante son los compuestos polifenólicos. Así mismo, contiene cantidades importante de carotenoides. Mezadri *et al.* (2005) identificaron 17 pigmentos diferentes mediante HPLC, además de flavonoides como las antocianinas y los flavonoles, ambos muy importantes por sus propiedades antioxidantes (Biurete *et al.*, 2009). En 2008, Mezadri *et al.* (2008) identificaron cinco compuestos diferentes por HPLC, los cuales fueron el ácido clorogénico, galato de epigallocatequina, epicatequina procianidina B1 y rutina, siendo estos dos últimos predominantes.

4. Liofilización

Los alimentos liofilizados han tenido un gran auge en proyectos multinacionales con el fin de preparar productos para astronautas, montañistas y militares, pero en la actualidad el mercado se está ampliando al comensal común, gracias a las firmas alimentarias que descubrieron los liofilizados por su sabor intenso, su consistencia crocante y su carácter novedoso (Ramírez, 2010).

La liofilización es el proceso más importante de conservación de productos biológicos conocido, el cual aúna los dos métodos más fiables de conservación, la congelación y la deshidratación, donde las temperaturas bajas reducen al mínimo las reacciones de degradación. De esta manera se consiguen productos de más alta calidad que con cualquier otro método de secado (Berk, 2009).

Cuando va a liofilizarse un material húmedo se efectúan tres operaciones básicas que se observan en la figura 1: a) la congelación del producto a baja temperatura, b) la deshidratación primaria, donde el vapor de agua se mueve progresivamente por sublimación de la masa congelada mientras que la temperatura baja se mantiene constante. La fuerza termodinámica impulsora para la eliminación de agua es provista por la diferencia de presión de vapor entre el frente seco y el espacio dentro de la cámara. Esta etapa es importante porque le confiere al producto la porosidad adecuada para la rehidratación posterior además de que es la etapa en que el contenido de agua desciende hasta un 15% (Zhai, 2003), y c) la desorción o deshidratación secundaria, a temperaturas más elevadas, donde el agua no congelada es eliminada (Wolff, 1988).

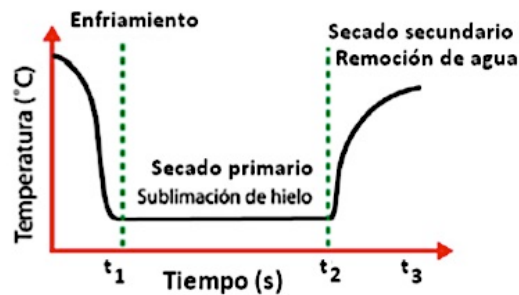


Figura 1: Etapas de la liofilización (Ramírez, 2010)

El factor principal es la rigidez estructural que presenta la sustancia congelada al término de la etapa de sublimación, esto evita el colapso de la estructura porosa después del secado (Orrego, 2008; Ramírez, 2010). Un aspecto a tener en cuenta a la hora de obtener frutas en polvo por liofilización es que al añadir agua posteriormente, el producto rehidratado retiene la mayor parte de su estructura original, además de que las propiedades más interesantes de esta técnica es que conserva su sabor y aroma (Ramírez 2010). Sin embargo, el secado por congelación es una forma de deshidratación de alimentos bastante costosa, debido a la velocidad lenta de secado y a la necesidad de usar vacío (Menlik *et al.*, 2010).

Por otro lado, en el caso de las frutas, su alto contenido en azúcares y ácidos confieren al producto liofilizado una estructura pegajosa y una elevada higroscopicidad. Para paliar este problema y mejorar el rendimiento del proceso y la calidad del producto obtenido, es frecuente adicionar solutos de alto peso molecular con un efecto encapsulante, antihumectante y antiapelmazante, como por ejemplo la goma arábiga (Krishnan *et al.*, 2005). Actualmente, se están realizando estudios para la elaboración de nutraceuticos de alta capacidad antioxidante por liofilización (Shui y Leong, 2006), técnica también ampliamente utilizada para la producción de fármacos (comprimidos, tejidos, plasma, sueros y otros productos biológicos) (Niwa *et al.*, 1987; Tang y Pikal, 2004).

5. Goma arábiga

La goma arábiga (E-414) también conocida como goma de acacia, goma de Turquía o goma de Senegal. Se trata de la goma más antigua y mejor conocida de las gomas naturales. En la actualidad existen alrededor de 500 especies de Acacia distribuidas por las áreas subtropicales y tropicales de África, India, Australia, América Central y el Suroeste de Norteamérica (Oswaldo, 2006).

Concretamente es una exudación gomosa seca, proveniente de varias especies de árboles de Acacia, de la familia de las leguminosas. Esta exudación aparece entre las grietas de los troncos de los árboles en forma de esferas que semejan lágrimas. Se recogen de forma manual y se exportan a los proveedores de todo el mundo. Existe en la naturaleza como una sal neutra o ligeramente ácida de un polisacárido complejo, el cual contiene calcio, magnesio y potasio. Químicamente es un heteropolisacárido de estructura ramificada con cantidades variables de D-galactopiranososa, L-arabinosa, L-ramnosa y algunos ácidos derivados como es ácido D-glucurónico ligado a la cadena principal (3-(1-6)) (Beniller y Whistler, 1996).

La adición de este tipo de solutos a la fruta liofilizada viene dada por ser un hidrocoloide complejo con excelente solubilidad en agua, además de sus propiedades tensoactivas, su buena actividad superficial con capacidad para formar una película protectora alrededor de las gotitas de la emulsión, antiapelmazante y productor de bajas viscosidades en la solución. Estas propiedades han facilitado su amplio uso como agente encapsulación para la retención y protección de compuestos saborizantes o volátiles (McNamee *et al.*, 2001; Chanamaiand y McClements, 2001). Este material tiene múltiples aplicaciones en el sector de la industria alimentaria como en la confitería, productos de panificación, productos lácteos, bebidas y fijadores del sabor, entre otras (Oswaldo, 2006).

II. Objetivos

Con la intención de conocer la viabilidad de la liofilización para la obtención de productos nutracéuticos con alta capacidad antioxidante, este estudio tiene como objetivo evaluar el posible efecto sobre los principales compuestos fitoquímicos y sobre la actividad antioxidante del secado por liofilización y de la incorporación de goma arábiga como agente encapsulante y antihumectante en kiwi y acerola. Con esta finalidad, se han extraído y cuantificado algunos compuestos bioactivos liposolubles (carotenoides) e hidrosolubles (compuestos fenólicos) de las muestras obtenidas, empleando para ello distintos disolventes. Además, se ha evaluado la actividad antioxidante de los distintos extractos obtenidos de acerola y kiwi por distintos métodos de análisis, y se ha realizado un screening *in vitro* de la posible actividad antiinflamatoria mediante el estudio de la inhibición de la producción de ácido nítrico en una línea celular de macrófagos de ratón.

III. Materiales y métodos

1. Materia prima

El estudio se llevó a cabo a partir de dos frutas diferentes. Se trabajó con pulpa de acerola congelada (*Malpighia emarginata* DC., suministrada por DeMarchi, Brasil), y kiwi (*Actinidia deliciosa*) de la variedad Hayward, adquiridos siempre en el mismo supermercado, en la ciudad de Valencia. Se seleccionaron kiwis sin daños físicos, con un tamaño, color y firmeza lo más uniforme posible, según apreciación visual. Algunas muestras se formularon incorporando goma arábica (GA), de Alfa Aesar GmbH & Co KG (Alemania).

1.1. Preparación de las muestras

Para la obtención de las muestras, los kiwis se lavaron y se les raspó la piel con ayuda de un cuchillo para desprender las vellosidades, y se extrajeron las partes correspondientes al ombligo y al pedúnculo. A continuación se cortaron en rodajas y se trituraron mediante un robot de cocina (Thermomix TM 21, Vorwerk, Spain). La pulpa de acerola congelada se mantuvo en refrigeración hasta su completa descongelación y se trituró en las mismas condiciones que el kiwi. Los purés de fruta obtenidos se dividieron en tres partes cada uno para preparar las diferentes muestras. Por un lado se separó parte del puré obtenido constituyendo las primeras muestras K y A (kiwi y acerola, respectivamente), otra parte de puré se separó para liofilizar, como se describirá a continuación, y por último a la tercera parte de puré se le añadieron solutos de alto peso molecular con capacidad antiapelmazante como aditivo, en concreto, goma arábica. La proporción adicionada para ambas muestras fue de 1,2 g GA/100g de puré (Mosquera et al, 2009 y 2010). La adición de la GA se realizó en el mismo robot de cocina utilizado para la trituración de la fruta (Thermomix TM 21, Vorwerk, Spain). Estas muestras de fruta con GA también se liofilizaron, como se describe en el siguiente apartado.

2. Obtención de los productos liofilizados en polvo

Los purés de kiwi y acerola con y sin GA se liofilizaron. Para ello los purés se dispusieron en bandejas de aluminio de 15 cm de diámetro y 5 cm de alto, y se depositaron formando una capa homogénea por toda la bandeja de 5 mm de espesor. Posteriormente las muestras se congelaron durante 24 horas antes de la liofilización en un criocongelador (CVF 545/86, Ing. Climas, España) a -86°C. Finalmente, se llevó a cabo la liofilización empleando para ello un liofilizador LioAlfa-6 (Telstar, España) a 0,026 mBar y -56,6 °C durante 48 horas. Tras la liofilización y con el fin de obtener el producto en polvo, las muestras fueron trituradas en una picadora eléctrica (Moulinex, Moulinette:320). Los productos así obtenidos se envasaron a vacío con una envasadora Tecnotrip EVO86154 (España) y se almacenaron en un desecador

con gel de sílice y cierre de silicona al resguardo de la luz hasta el momento de su análisis. Las muestras en polvo obtenidas de esta manera se designaron como KL y KL+S para el kiwi (sin y con GA, respectivamente), y AL y AL+S, para la acerola (sin y con GA, respectivamente).

3. Obtención de los extractos

Escoger el solvente adecuado es uno de los factores más importantes en la obtención de extractos con alto contenido de compuestos bioactivos. Los compuestos antioxidantes de los alimentos se extraen con disolventes de diferentes polaridades de acuerdo con el carácter hidrofílico o lipofílico de los compuestos que se desean evaluar. Además, se ha observado en algunos estudios que el tipo de disolvente y la polaridad puede afectar a la transferencia del electrón singulete y a la del átomo de hidrogeno, los cuales son esenciales en la medida de la capacidad antioxidante (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006).

- Extracción de compuestos fitoquímicos hidrosolubles: Para esta extracción se utilizó la mezcla de metanol/agua en una proporción de 70:30 (v/v). Este disolvente mostró los mejores resultados en estudios previos para la extracción de compuestos fenólicos (Farinha, 2014; Spaggiari, 2014). Se pesó 1 g de muestra y se añadieron 9 ml del disolvente de extracción. La mezcla se homogeneizó durante 20 minutos en agitación magnética y después se centrifugó a 20°C y 8000 rpm durante 10 minutos (Selecta Medifriger-BL, España). Para cada muestra, el sobrenadante obtenido se denominó extracto 1. Este extracto se empleó para la cuantificación de compuestos fenólicos y también se determinó su actividad antioxidante.
- Extracción de compuestos fitoquímicos liposolubles: El disolvente más comúnmente utilizado en la obtención de extractos lipofílicos es el hexano puro o mezclado con otros disolventes orgánicos. En este estudio se ha utilizado la mezcla de hexano, acetona y etanol en una proporción 50:25:25 (Olives *et al.*, 2006). Para llevar a cabo esta extracción se partió del precipitado obtenido en la extracción con metanol y agua, el cual se pesó y se mezcló con una disolución de hexano:acetona:etanol (50:25:25) en la misma proporción y condiciones descritas para la extracción de compuestos hidrofílicos. El sobrenadante obtenido para cada muestra se denominó extracto 2. Este extracto se empleó para la cuantificación de compuestos carotenoides y también se determinó su actividad antioxidante.
- Extractos análisis de actividad biológica: En este caso se ha utilizado la mezcla de metanol/agua en una proporción de 70:30. Por 2 gramos de muestra procesada se añadieron 30 mL del disolvente y se mantuvo durante 20 minutos en un homogeneizador. Posteriormente se centrifugó a 20°C y 9000 rpm durante 10 minutos (Selecta Medifriger-BL, España). Para los análisis de actividad biológica es necesario eliminar el disolvente que acompaña a los solutos de interés. Para ello repartimos el sobrenadante producido, tras centrifugar la muestra, en tres matraces corazón en la misma cantidad. Estos matraces se introdujeron en un rotavapor durante 10 minutos, produciéndose la separación por evaporación a presión reducida y suave. Una vez extraído todo el soluto, se guardó en viales y se volvió a liofilizar.

4. Determinaciones analíticas

4.1. Humedad

La humedad (x_w) se determinó por el método oficial para alimentos ricos en azúcares (AOAC 934.06, 2000). Este método consiste en la determinación de la pérdida de peso de la muestra mediante desecación de la misma en una estufa de vacío (Vacioterm, J.P. Selecta) a una temperatura de 60°C y P<100mm Hg, dejando secar hasta peso constante. La variación de peso se midió en una balanza Mettler AE 100 de precisión 0,1 mg. Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como g de agua/ g de muestra.

4.2. Compuestos bioactivos

A las muestras K, KL, KL+S, A, AL y AL+S se les analizó, por triplicado, el contenido en fenoles totales y carotenoides. Se calculó la media y la desviación estándar. Con fines comparativos, todos los resultados se expresaron referidos a 100 g de solutos de fruta (sf), aplicando la ec. 1.

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

Donde:

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

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

m_m : masa de muestra analizada (g)

v : volumen de disolvente de extracción (mL)

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

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

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

4.2.1. Fenoles totales

La determinación de los fenoles totales presentes en las muestras de fruta se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu, según Benzie y Strain, (1999). Este método permite el análisis de compuestos orgánicos que presenten anillos hidroxilados y es característico por su rapidez y sencillez (Tomas-Barberán *et al.*, 2001). Los compuestos fenólicos presentes en las muestras reaccionan a pH básico con el reactivo Folin-Ciocalteu, dando lugar a una coloración azul, susceptible de ser medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 765 nm.

Para llevar a cabo el ensayo, a 250 μ L de extracto 1 se le añadieron 15 mL de agua bidestilada y 1,25 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Alemania) y se dejó reaccionar la mezcla en oscuridad durante 8 minutos. Seguidamente, se añadieron 3,75 mL de carbonato sódico al 7,5% (p/v) y agua bidestilada hasta completar 25 mL. Tras 120 minutos en oscuridad se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Thermo Electron Corporation, USA). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico (AG)/ s.f.

4.2.2. Carotenoides

La determinación de los carotenoides totales se realizó mediante espectrofotometría

según el método AOAC (1996). Para llevar a cabo el ensayo, se usó el extracto 2, por cada 100 mL de extracto 2 se añadieron 15 ml de agua bidestilada,. Después se mezcló en agitación magnética durante 1 minuto, provocando así una separación entre fases. Del sobrenadante (fase hexano) se tomaron 600 μ L, que se llevaron a sequedad con nitrógeno y el extracto seco se disolvió en 1 mL de una disolución de THF:ACN:MeOH (15:30:55 v/v/v). La medida de la absorbancia a 446 nm se realizó a través de un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Electron Corporation, USA). Los resultados se expresaron como mg de β - caroteno/100 g de s.f.

4.3. Capacidad antioxidante

Las propiedades antioxidantes (AAO) de los extractos 1 y 2 se evaluaron por los métodos DPPH, FRAP y ABTS. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.3.1. Método DPPH

El método DPPH se emplea para determinar los radicales libres y los grupos oxidables presentes en los extractos de frutas (Brand-Williams *et al.*, 1995; Sanchez-Moreno *et al.*, 2003). El radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) tiene la capacidad de secuestrar componentes antioxidantes presentes en la muestra, dando lugar a un cambio en la coloración de la disolución (Molyneux, 2004; Brand-Williams *et al.*, 1995). Inicialmente, la disolución de DPPH es de un tono morado y, a medida que el radical DPPH se va reduciendo (gana electrones) por reacción con los antioxidantes presentes en la muestra (los cuales ceden electrones), se decolora (Prakash, 2001). Por lo tanto, una menor absorbancia en la mezcla de la reacción indica un mayor poder antioxidante de la muestra (Duarte-Almeida *et al.*, 2007).

Para llevar a cabo el ensayo la medida de la actividad antioxidante por este método se siguió la metodología propuesta por Brand-Williams *et al.*, (1995) y Sanchez-Moreno *et al.*, (2003). Se añadió a las cubetas de espectrofotometría 3 mL de una disolución de DPPH al 30% (w/v) en metanol y 30 μ L de extracto. Se midió la absorbancia a 517 nm, en un espectrofotómetro UV/Visible (Thermo Electron Corporation, USA) a tiempo cero y a los 2,5 minutos, cuando la reacción se había estabilizado.

Se calculó el porcentaje (%) de inhibición de DPPH, a partir de la ecuación 2:

$$\% DPPH = \frac{(AB-AA)}{AB} \cdot 100 \quad (2)$$

donde A_B y A_A representan las absorbancias medidas a 517 nm a tiempo 0 y a tiempo 2,5 minutos cuando la reacción se estabilizó, respectivamente. Los resultados se expresaron como milimoles de Trolox equivalente (TE)/100 g sf.

4.3.2. Método ABTS

El catión ABTS que se genera a partir de su precursor, el ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico), por oxidación en presencia de persulfato, es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. La capacidad antioxidante de los compuestos se mide como inhibición de la absorbancia (disminución del color), al reaccionar directamente con el radical ABTS.

Este método se llevó a cabo según metodología descrita por Re et al.(1999), Arnao et al.(2001) y Thaipong et al.(2006). El reactivo ABTS fue disuelto en agua bidestilada hasta alcanzar una concentración de 7 mM. El catión radical ABTS•+ se produjo por reacción del ABTS con persulfato potásico a una concentración de 2,45 mM en oscuridad y en refrigeración durante 12-16 horas. Una vez conseguido el radical, se diluyó con etanol hasta conseguir una absorbancia de $0,7 \pm 0,01$ a 734 nm. Para llevar a cabo las medidas se mezclaron en la cubeta del espectrofotómetro 10 μ L de extracto y 1 mL de la disolución de ABTS. La absorbancia se midió a 734 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Thermo Electron Corporation, USA). Los resultados se expresaron en milimoles de Trolox equivalente (TE)/100 g s.f.

4.3.3. Método FRAP

Se determinó la actividad antioxidante por el método FRAP según Benzie y Strain (1996), Pulido *et al.*, (2000) y Thaipong et al (2006). Este método se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . El complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Se trata de un método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del Fe^{2+} . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta es la señal de absorbancia.

Para llevar a cabo las medidas, se mezclaron en cada cubeta del espectrofotómetro 900 μ L de la solución FRAP mantenido en un baño a 37°C, 30 μ L de agua bidestilada y 30 μ L de extracto o disolvente de extracción, este último para la lectura del blanco. La absorbancia se midió a 593 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Thermo Electron Corporation, USA). Los resultados se expresaron en milimoles de Trolox equivalente (TE)/100 g s.f.

4.4. Ensayos *in vitro*

Para la realización de este trabajo se emplearon los siguientes reactivos y disolventes: el medio de cultivo celular (DMEM GlutaMAX 1 g/L de glucosa), el suero fetal bovino (SFB), el antibiótico y el tampón fosfato salino (PBS) fueron comprados a Life Technologies (Alcobendas, Madrid). Además, el colorante Trypan blue, lipopolisacárido bacteriano (LPS), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolo (MTT) y el reactivo de Griess se adquirieron en Sigma-Aldrich.

4.4.1. Cultivo de la línea celular RAW 264.7

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

ATCC Number: **TIB-71**™
Designation: **RAW 264.7**

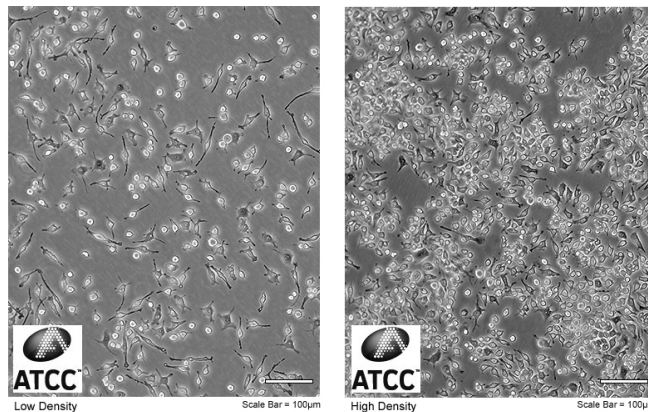


Figura 2: Fotografías representativas del tipo celular descrito procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC)

Estas células son parcialmente adherentes, algunas crecen en suspensión mientras que otras se adhieren débilmente o crecen fijadas a la superficie del frasco de cultivo. El cultivo se realizó en frascos de 75 cm² con medio DMEM GlutaMAX 1 g/L glucosa suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomycin) y se incubaron a 37 °C en un incubador celular (Thermo Scientific Forma Steri-Cycle, Ohio, Estados Unidos) con atmósfera controlada al 5% de CO₂ y 95% de humedad hasta alcanzar la subconfluencia (70-80%).

Cada 2 o 3 días se realiza un pase de células eliminándose el medio de cultivo y añadiendo 10 mL de medio completo. Las células se recuperan mecánicamente con un raspador y esta suspensión celular se diluye a razón 1:6 para el mantenimiento en un frasco nuevo o bien se cuentan y se siembran. El recuento celular se realizó tiñendo las células con el colorante vital Trypan blue (Sigma-Aldrich) y empleando una cámara de Neubauer-Improved (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania).

4.5. Ensayos de citotoxicidad celular

4.5.1. Preparación de las muestras

Las muestras fueron anteriormente extraídas y liofilizadas, extracto A3 y K3 en sus diferentes formas. Se disolvieron en PBS para una concentración final de 100 mg/mL, tras mezclar y homogeneizar se preparan diferentes diluciones. Inicialmente, se ensayó la toxicidad de las muestras a una concentración de 100, 10 y 1 mg/mL y, en función de los resultados obtenidos, se fueron modificando esas concentraciones de trabajo.

4.5.2. Evaluación de la citotoxicidad y proliferación celular por MTT

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

directamente del grado de activación de las células. Este método detecta solamente células vivas y se puede emplear para determinar la citotoxicidad, proliferación y activación celular.

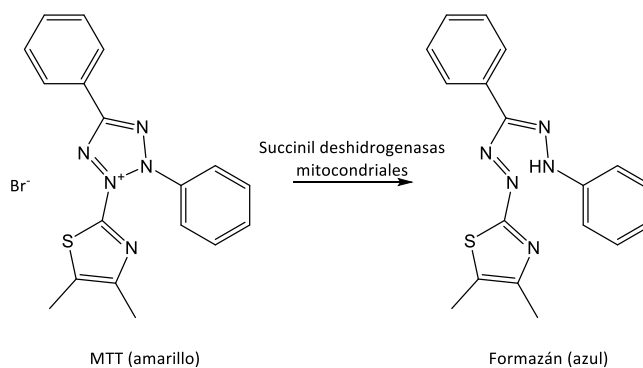


Figura 3: Reducción de MTT a formazán

Las células se siembran en placas de 96 pocillos a una concentración de 60.000 células por pocillo. A las 24 h se cambia el medio de cultivo a medio con un 0,5% de SFB y se dejan las células en reposo en el incubador durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se añaden 5 μ L del extracto del liofilizado a distintas concentraciones (100, 10 y 1 mg/mL) obteniendo una concentración final en el pocillo de 2,5, 0,25 y 0,0025 mg/mL, respectivamente. Tras su incubación 24 h a 37 $^{\circ}$ C, se toman 100 μ L de sobrenadante y se pasan a otra placa de 96 pocillos y se añaden 20 μ L MTT a una concentración de 5 mg/mL (para obtener una concentración final en el pocillo de 0,5 mg/mL). A los 60 min y tras comprobar que han aparecido los depósitos de formazán, se elimina todo el volumen del pocillo y se añaden 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO), donde disuelve los depósitos de formazán, dando lugar a una solución de un color azulado homogéneo. La absorbancia se mide a 570 nm como longitud de onda de referencia en el lector de placas Bio-Rad iMarkTM Microplate reader. La viabilidad celular se determina según la siguiente ecuación:

$$\% Viabilidad = \frac{Am}{Ac} \times 100 \quad (3)$$

Donde *Am* es la medida aritmética de la absorbancia de la muestra y *Ac* es la media aritmética de la absorbancia del control.

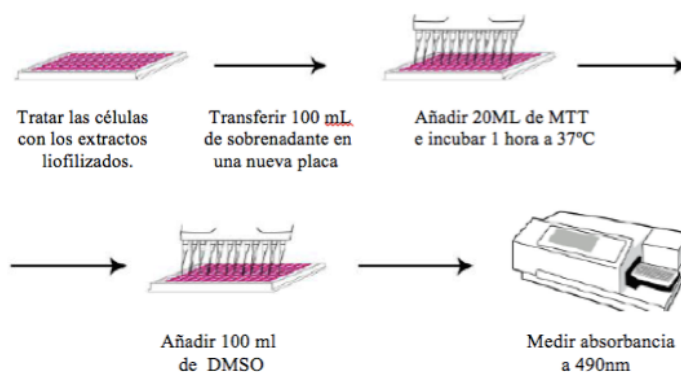


Figura 4: Esquema del procedimiento para el ensayo de citotoxicidad

4.5.3. Determinación de la producción de NO

El gas sencillo óxido nítrico (NO) es una molécula señalizadora paracrina, capaz de difundir directamente a través de la membrana plasmática de sus células diana y alterar la actividad de enzimas intracelulares. Es fundamental tanto en el sistema inmune como en el nervioso y en el circulatorio, de ahí la importancia de su determinación.

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

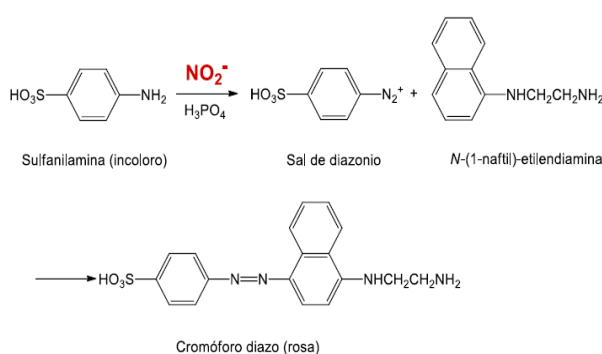


Figura 5: Reacción de la sulfanilamina con nitrito y N-(1-naftil)-etilendiamina para formar un cromóforo diazo

Los macrófagos RAW 264.7 fueron sembrados en placas de 96 pocillos en una concentración 60.000 células por pocillo. Al día siguiente, se sustituye el medio de cultivo completo por medio de cultivo al 0,5% de SFB y 2 h después se tratan las células con los productos a ensayar a distintas concentraciones durante 1 h. Las concentraciones se seleccionaron en función de los datos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad. Transcurrido ese tiempo se estimulan con LPS 1 µg/mL. A las 24 h se toman 100 µL de sobrenadante y se pasan a otra placa de 96 pocillos. A esos 100 µL de sobrenadante se añaden otros 100 µL de reactivo de Griess. Se incubó la placa durante 10 min y se lee en el espectrofotómetro a 540 nm.

5. Análisis estadísticos

Para estudiar si hay diferencias significativas entre las muestras se realizaron análisis de la varianza, también conocido como ANOVA. El nivel de confianza elegido será del 95% ($p < 0,05$). También se realizaron correlaciones de Pearson entre los diferentes métodos de actividad antioxidante y los compuestos bioactivos en cada extracto. Para llevar a cabo los análisis se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV y GraphPad Prism 6.

IV. Resultados

La liofilización es una técnica de procesado de alimentos que al no emplear calor, causa un efecto menos agresivo en los componentes del sistema y, además, garantiza la obtención de productos deshidratados con menor contenido de humedad que en otras tecnologías empleadas para la obtención de nutraceuticos, como es el caso del secado por atomización (Mosquera, 2010). Por otra parte, dadas las características de la materia prima, el desarrollo de un producto en polvo de calidad y fisicoquímicamente estable a base de pulpa de fruta que pueda emplearse como nutraceutico, requiere evaluar el efecto de la adición de solutos (a una concentración definida), empleados con el fin de contribuir a optimizar el proceso tecnológico utilizado para su obtención y además mejorar las características de calidad funcional en el producto final. En este sentido, se ha estudiado el efecto de la liofilización con y sin la adición de goma arábica, en los principales compuestos fitoquímicos hidro y liposolubles del kiwi y la acerola y en su actividad antioxidante.

1. Efecto del tratamiento en el contenido en humedad

La acerola presentó una humedad de 92,85 g agua/100g de muestra (Tabla 1), valores similares a los obtenidos en otros estudios con esta fruta (Vendramini y Trugo (2000) y Arrazola *et al.*, (2014)). Al aplicar el tratamiento por liofilización a la muestra de pulpa de acerola, se alcanzó una humedad de 4,42 g agua/100g de muestra. Del mismo modo pero en la muestra a la que se le añadió goma arábica, con la liofilización se consiguió una humedad ligeramente inferior ($p < 0,05$) de 3,79 g de agua/100g de muestra. Así, parece que la adición de goma arábica favorece la extracción del agua congelada de la matriz del alimento durante el proceso de liofilización, tal y como apunta Mosquera (2010) en estudios con fresa y borjón. Además, con la adición de este soluto, se mejoraría la calidad fisicoquímica de las muestras en polvo, ya que se reduciría la higroscopicidad característica de las mismas, tal y como han observado otros autores en pomelo (Telis y Martínez-Navarrete, 2010), fresa (Mosquera *et al.*, 2010) y mango (Jaya *et al.*, 2006). La goma arábica actúa como vehículo encapsulante durante la liofilización, formando una barrera frente a la absorción de agua, creando de esta manera productos más estables (Mosquera, 2010).

Tabla 1: Valores medios y desviación estándar de la humedad (x_w) de las diferentes muestras expresadas como g agua/g muestra

Muestras	x_w
A	0,9285 (0,0003) ^a
AL	0,0442 (0,0023) ^{by}
AL+S	0,0379 (0,0006) ^{cy}
K	0,853 (0,004) ^a
KL	0,0269 (0,001) ^{bz}
KL+S	0,0237 (0,002) ^{bz}

a-c: Para cada fruta, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)
 y-z: Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras liofilizadas ($p < 0,05$).

En el caso del kiwi, como podemos observar también en la tabla 1, su humedad inicial fue de 85,3 g de agua/100 g de muestra, valores similares a los descritos para esta fruta por Monteagudo *et al.*, (2013). En este caso, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras liofilizadas, KL y KL+S, obteniéndose valores de humedad de 2,69 g de agua/100 g de producto y 2,37 g de agua/100 g de producto, respectivamente.

Comparando los productos liofilizados de ambas frutas, los valores de humedad de la acerola fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que los del kiwi, confirmando un mayor carácter higroscópico del producto obtenido con esa fruta, siendo las pérdidas de agua producidas en la acerola durante el secado por liofilización menores que las producidas en el kiwi. En cualquier caso los valores de humedad de las muestras liofilizadas fueron del orden de los recomendados para frutas procesadas mediante esta tecnología (Fellows, 2000).

2. Efecto del tratamiento en el contenido de compuestos bioactivos

La tabla 2 presenta los datos del contenido en compuestos bioactivos analizados en las muestras empleadas para este estudio. El contenido en fenoles totales de la pulpa de acerola congelada empleada como materia prima para este estudio fue de 357,6 mg de AG/100g de muestra, valores inferiores a los encontrados en otros trabajos para pulpa de acerola congelada (Mezadri *et al.*, 2008); siendo estos valores mucho mayores que en otras frutas como el caqui, piña, mango o guayaba, como expone el mismo autor. En estos frutos rojos intensamente coloreados las antocianinas constituyen un importante grupo dentro de los compuestos fenólicos (Heinonen y Meyer, 2002). En general, el contenido en fenoles de las muestras de kiwi fue muy inferior a los de la acerola. La muestra de kiwi fresco presentó 37,94 mg de AG/100 g de muestra, aproximadamente 10 veces menor que la acerola. Comparando este resultado con otros estudios realizados en kiwi, comprobamos que fue similar al reportado por Du *et al.*, (2009) e inferiores a los descritos en estudios realizados por D'Evoli *et al.*, (2015). El contenido en compuestos bioactivos de las frutas depende de factores como las condiciones climáticas, el genotipo, la técnica de cultivo, la ubicación geográfica, la aplicación de pesticidas, la etapa de

maduración o de procesamiento, las operaciones realizadas durante el almacenamiento post-cosecha y el propio almacenamiento (Lee y Kader, 2000; Tavarini *et al.*, 2008).

Tabla 2: Valores medios y desviación estándar del contenido fenoles totales (mg ácido gálico/100 g sólidos de fruta) y carotenoides (mg β caroteno/100 g sólidos de fruta) de las diferentes muestras de acerola y kiwi

Muestras	Fenoles totales (mg ácido gálico/100 g s.f.)	Carotenoides (mg β caroteno/100 g s.f.)
A	5002 (165) ^a	190 (10) ^a
AL	3284 (25) ^b	100 (4) ^b
AL+S	3467 (47) ^b	170,5 (1,2) ^a
K	228 (60) ^a	4,8 (0,1) ^a
KL	250 (21) ^a	4,86 (0,17) ^a
KL+S	348 (46) ^b	4,98 (0,09) ^a

a-c: En columnas, para cada fruta, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

El impacto de distintas técnicas de secado sobre el contenido fenólico de los alimentos ha sido ampliamente estudiada, existiendo cierta controversia entre los resultados obtenidos. En la tabla 2, se puede observar que se produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el contenido de fenoles de la acerola debido al tratamiento de liofilización. Aunque no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos muestras liofilizadas AL y AL+S, se observó cierto efecto protector de la goma arábiga sobre los fenoles totales, así se produjeron unas pérdidas en estos compuestos del 34% para la muestra sin goma arábiga, AL, y de 30% para la muestra con este soluto, AL+S. Otros autores explican el efecto protector de los solutos de alto peso molecular, como la goma arábiga, sobre la matriz del alimento debido a que la rápida congelación de las sustancias hidrosolubles crea una tendencia a la formación de mezclas eutécticas. De esta manera, se forma una estructura cristalina inestable, que en el proceso de sublimación posterior ocurrido durante la liofilización, se rompe. Esta ruptura de la estructura celular del alimento, puede conllevar a la posterior degradación de compuestos fenólicos por acción enzimática y oxidativa, pudiendo ser evitada mediante la incorporación de ciertas sustancias encapsulantes y de alto grado de cristalinidad, como la goma arábiga (Fernandes *et al.*, 2009).

Por otro lado, se produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) en los fenoles de aproximadamente 10% en KL y un 50% en KL+S, respecto a la muestra de kiwi fresco. El aumento en compuestos fenólicos debido al proceso de liofilización ha sido observado en otros estudios. Delva y Goodrich-Schneider (2013) demostraron que los extractos obtenidos a partir de polvo liofilizado de acerola contenían un total de polifenoles y de sustancias antioxidantes más altos que la muestra fresca (Delva y Goodrich-Schneider, 2013). Por su parte, Pinela *et al.*,

(2012) explican el aumento de fenoles con la liofilización de muestras *Tuberaria lignosa* debido a los efectos de la congelación a la que se somete la fruta previamente al secado por liofilización, sobre la matriz de la fruta. Durante la congelación se forman cristales de hielo que pueden romper la estructura celular y liberar los fitoquímicos de la matriz, facilitando la posterior entrada del disolvente y mejorando así su extracción (Kim y Lee, 2002; Vashisth *et al.*, 2012; Dorta *et al.*, 2010).

El contenido en carotenoides de la acerola también fue mayor que en el kiwi. Las muestras de A presentaron unos valores de β -caroteno/100 g de muestra, valores similares a los reportados en otros estudios sobre esta fruta (Lima *et al.*, 2005; Mezadri *et al.*, 2009). En esta fruta, el contenido total de β -caroteno supone el 40-60% del total de los carotenoides (Mezadri *et al.*, 2008). El kiwi presentó 0,701 mg de β -caroteno/100 g de muestra, valores mayores a los descritos por otros autores (D'Evoli *et al.*, 2015). El carotenoide más abundante en el kiwi es la luteína con 0,46 mg/100g de muestra fresca (D'Evoli *et al.*, 2015).

Las muestras de acerola liofilizadas presentaron unos valores de 100 y 170 mg β -caroteno/100 g de sf en AL y AL+S, respectivamente, lo que corresponde a una disminución significativa ($p < 0,05$) de los carotenoides respecto a la acerola fresca, con unas pérdidas del 47% para la muestra sin goma arábica y del 10 % en la muestra liofilizada con este soluto.

La inestabilidad de los carotenoides se debe al hecho de que son compuestos altamente insaturados, degradándose fundamentalmente debido a procesos oxidativos. Otros factores como la temperatura, la luz o el pH también pueden producir importantes cambios cualitativos en estos compuestos debido a reacciones de isomerización (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004). En el kiwi, no se observaron cambios significativos en el contenido en carotenoides ocasionados por el procesado, obteniéndose alrededor de 5 mg β -caroteno/100g s.f.

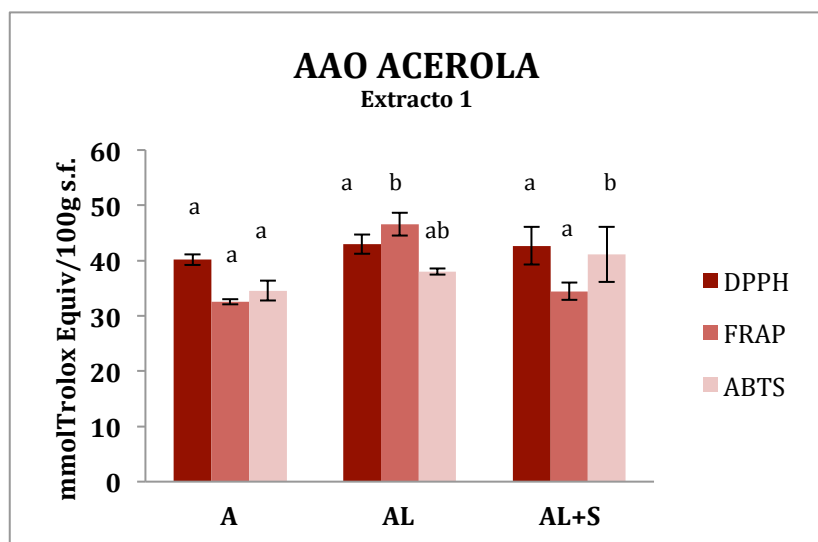
3. Efecto del tratamiento en la actividad antioxidante

Se han desarrollado diferentes métodos para medir la actividad antioxidante de un alimento. Como la capacidad antioxidante total de una muestra viene determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos antioxidantes, así como por el modo de acción concreto de cada uno de ellos, es necesario utilizar procedimientos adecuados en la extracción de antioxidantes y en la medida de la capacidad antioxidante (Thaipong *et al.* 2006; Pérez Jiménez *et al.* 2008). Existen en la literatura diferencias sustanciales en cuanto a la preparación de las muestras, extracción de los compuestos antioxidantes (disolvente, temperatura, etc.), selección de los puntos finales de la reacción y expresión de los resultados. Incluso se encuentran diferencias en el protocolo para el mismo método de análisis, por lo que la comparación entre los valores reportados en la actividad antioxidante de una muestra por diferentes laboratorios pueden ser bastante difícil. Los métodos elegidos en este estudio (empleando el reactivo ABTS, como oxidante; el método FRAP basado en la capacidad de reducción férrica y el método DPPH basados en el potencial captador de radicales libres de este reactivo) son los recomendados por distintos autores (Ozgen *et al.*, 2007), pudiendo emplearse para determinar la actividad antioxidante de matrices biológicas, como plasma, así como compuestos simples, componentes de alimentos o extractos de los mismos (Van der Berg *et al.*, 1999). Las comparaciones entre resultados de capacidad antioxidante solo se pueden realizar

para un mismo método y para muestras obtenidas con los mismos disolventes (Pérez-Jiménez et al., 2008).

En las figuras 6 y 7 se observan los valores medios de la actividad antioxidante del extracto 1 de las muestras de acerola y kiwi, respectivamente, mediante los tres métodos de cuantificación de la misma seleccionados en este trabajo. En este extracto principalmente se han extraído los compuestos fitoquímicos hidrosolubles. Si comparamos los resultados obtenidos en cada muestra de acerola, se observaron valores de actividad antioxidante del mismo orden en los tres métodos de análisis. Así, en las muestras de pulpa de acerola se observaron valores de 2,95, 2,51 y 2,36 mmol Trolox equivalentes/100 g muestra con los métodos DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Estos valores son comparables con los resultados obtenidos por Mezadri *et al.*, (2008), en muestras de pulpa de acerola congelada. En cuanto al efecto del secado por liofilización, no se observó la misma tendencia que en los compuestos fenólicos cuantificados en este extracto. En este caso, con el método DPPH no se detectaron cambios significativos ($p > 0,05$) ocasionados por la liofilización. Por otro lado, con el método ABTS la muestra liofilizada con goma arábica mostró valores de AAO superiores ($p < 0,05$), con unas ganancias del 16% a la muestra fresca. Este método no diferencia entre la AAO de las dos muestras liofilizadas AL y AL+S. Con el método FRAP se detectó un aumento significativo del 30% en la AAO de la muestra AL, sin cambios significativos ($p < 0,05$) entre la AAO de A y AL+S.

Figura 6: Actividad antioxidante (AAO, milimoles Trolox Equivalente / 100 g s.f.) del extracto 1 de las diferentes muestras de acerola



a-c: Para el mismo método de determinación de la actividad antioxidante, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

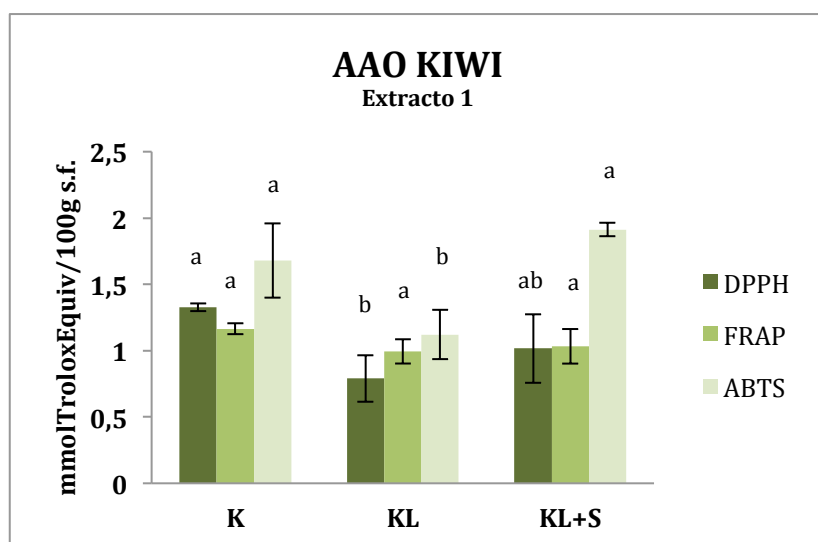
Cabe destacar que con esta extracción realizada con la mezcla metanol:agua, también se pueden estar extrayendo otros compuestos hidrosolubles como la vitamina C, con acción antioxidante. Esta vitamina es muy importante en la acerola. Estudios realizados por Delva y Goodrich-Schneider (2013) han descrito que la vitamina C oscilaba desde 1744 a 405 mg/100 g acerola, dependiendo del estado de madurez de esta fruta. Estos valores son ligeramente

inferiores a los reportados en la Vendramini y Trugo, (2000), pero mayores que los reportados en la Mezadri *et al.*, (2008). El contenido en vitamina C de la acerola es mucho más alto que el reportado para otras frutas, tales como naranja (51,6 mg/100 g), pomelo (27,4 mg/100 g) o limón (32,7 mg/100 g) (Ashoor *et al.*, 1984).

La actividad antioxidante de la fracción hidrófila del kiwi se describe en la figura 7. En general, para este extracto, el método ABTS fue el que dio los valores más altos de AAO. La capacidad antioxidante del kiwi fresco recogida en este estudio fue de 0,164 mmolTrolox/100g de muestra con el método FRAP, 0,273 mmolTrolox/100g con el método ABTS y 0,195 mmolTrolox/100g con el método DPPH, valores inferiores a la AAO de la acerola. Comparando estos resultados de kiwi fresco con otros autores (D'Evoli *et al.*, 2015), se aprecia que tienen una capacidad antioxidante menor que la referida por dichos autores, estas diferencias puede estar relacionadas con el distinto estado de madurez, zona de cultivo, etc.

En la muestra KL se produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) de la AAO respecto a la muestra de kiwi fresco en los análisis DPPH y ABTS, con una pérdidas del 40% y del 33%, respectivamente. En ningún método la muestra con goma arábica mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en su AAO respecto a la muestra fresca. Por lo tanto, al igual que en acerola, se observó el efecto protector de la goma arábica sobre los compuestos bioactivos hidrofílicos con carácter antioxidante. En este caso también en este extracto se puede estar contabilizando la acción antioxidante de la vitamina C, siendo el kiwi también una fruta rica en esta vitamina (Nishiyama *et al.*, 2004). En general, los datos obtenidos son similares para la extracción hidrofílica en los 3 métodos de determinación con otros estudios realizados por Park (2014), el cual realiza un estudio de la capacidad antioxidante para diferentes extractos de muestras de kiwi liofilizadas mediante los mismos métodos.

Figura 7: Actividad antioxidante (AAO, milimol de Trolox Equivalente/100 g s.f.) del extracto 1 de las diferentes muestras de kiwi

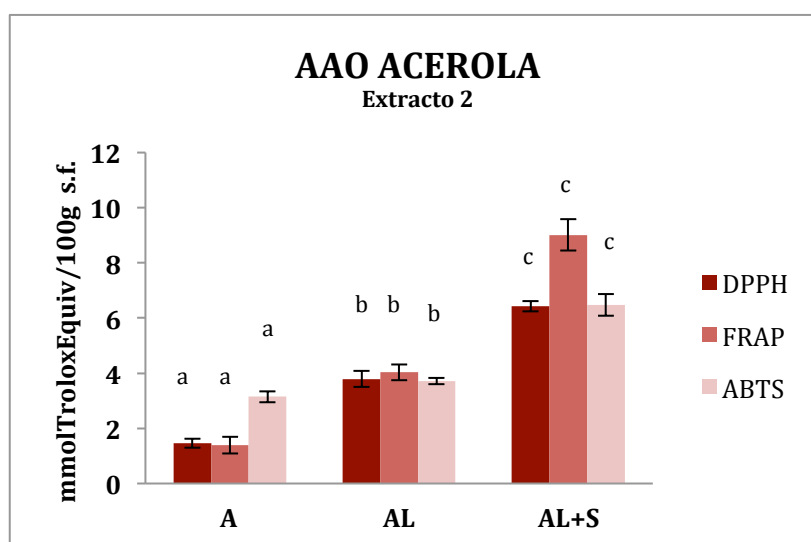


a-c: Para el mismo método de determinación de la actividad antioxidante, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

En las figuras 8 y 9 se observan los valores medios de la actividad antioxidante del extracto 2 de las muestras de acerola y kiwi, respectivamente, analizadas mediante tres métodos de análisis diferentes. En general los valores de actividad antioxidante de los extractos lipofílicos fueron inferiores a los obtenidos en el extracto hidrofílico 1, tal y como han observado otros autores (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Esto parece lógico, en este caso, porque el contenido en fenoles del extracto 1 fue mucho mayor que el contenido en carotenoides del extracto 2 para ambas frutas.

En todos los casos se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la actividad antioxidante de las muestras A, AL y AL+S, por los 3 métodos de análisis. La actividad antioxidante de las muestras liofilizadas aumentó significativamente ($p < 0,05$) un 61 y 65% en FRAP y DPPH y un 15% en ABTS respecto a la fruta fresca. Respecto las muestras liofilizadas con goma arábiga se estima un incremento del 77, 85 y 51% para DPPH, FRAP y ABTS, respecto a la fruta fresca.

Figura 8: Actividad antioxidante (milimolTrolox Equivalente / 100 g sf) del extracto 2 de las diferentes muestras de acerola



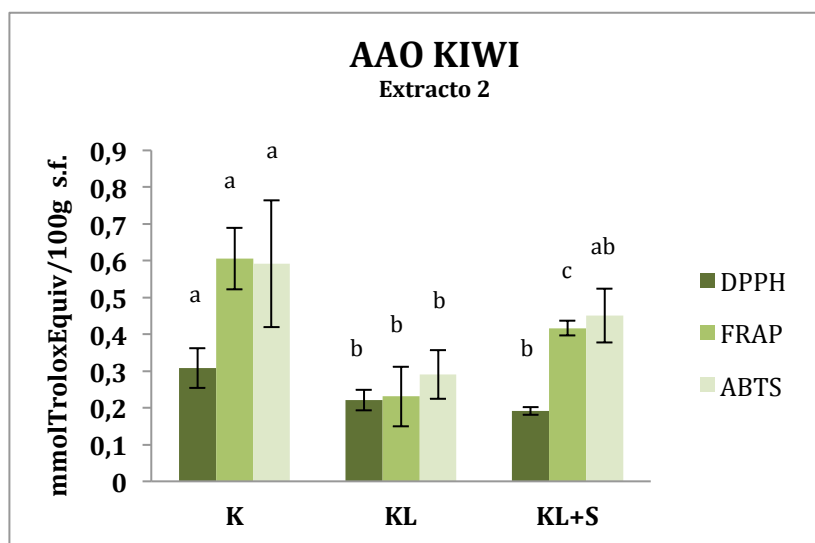
a-c: Para el mismo método de determinación de la actividad antioxidante, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Este aumento en la AAO de las muestras ocasionada por el proceso de liofilización ha sido observado por otros autores. Durante la congelación previa a la liofilización de las muestras, se forman cristales de hielo que pueden romper la estructura celular y liberar los fitoquímicos consolidados de la matriz facilitando la posterior entrada del disolvente y mejorando así su extracción (Dorta *et al.*, 2010). Por otro lado, algunos autores como Paulino *et al.*, (2013), revelan que los mejores disolventes para la extracción y cuantificación de bioactivos son la acetona y el metanol. Finalmente, podemos apoyar también los resultados obtenidos en este extracto con otros autores (López, 2010; Montenegro *et al.*, 2012), los cuales explican que la goma arábiga añadida en la muestra ejerce un efecto encapsulante y protector de los compuestos bioactivos.

En la figura 9 se presentan los valores medios de la actividad antioxidante del extracto 2 de las muestras de kiwi extraídas mediante hexano:acetona:etanol (50:25:25) mediante tres métodos de análisis diferentes. Se obtuvieron valores de AAO inferiores a las muestras de acerola. Los resultados obtenidos de AAO de K por el método FRAP y ABTS fueron de 0,088 mmolTrolox/100g de muestra. Estos resultados fueron muy similares a los descritos por D'Evoli *et al.*, (2015), reportando valores de 0,083 mmolTrolox/100g de muestra para FRAP y de 0,05 mmolTrolox/100g de muestra para ABTS en extracto lipofílico de kiwi. Para todas las muestras, con el método DPPH se obtuvieron los menores valores de AAO.

La actividad antioxidante de las muestras KL disminuyó significativamente ($p < 0,05$) respecto a la de la fruta fresca, con unas pérdidas del 28% en DPPH, 60% en FRAP y del 51% en ABTS. Para las muestras liofilizadas con goma arábica, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) medio del 40% según los métodos FRAP y ABTS respecto las muestras liofilizadas sin este soluto. Esto demuestra de nuevo el efecto protector de la goma arábica sobre los compuestos bioactivos con actividad antioxidante.

Figura 9: Actividad antioxidante (milimolTroloxEquivalente/100 g sf) del extracto 2 de las diferentes muestras de kiwi



a-c: Para el mismo método de determinación de la actividad antioxidante, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Para estimar la capacidad antioxidante total de las muestras, se sumaron las actividades antioxidantes de los extractos 1 y 2 para cada muestra (Van der Berg et al., 1999; Pérez-Jiménez et al., 2008). La siguiente tabla describe la actividad antioxidante total de cada una de las muestras estudiadas, para cada método de análisis. Como se puede ver, todas las muestras de acerola tienen una actividad antioxidante mayor que las muestras de kiwi, aproximadamente 40 veces mayores.

Tabla 3: Actividad antioxidante total (milimolTroloxEquivalente/100 g s.f.) de las diferentes muestras de acerola y kiwi

Muestra	DPPH	FRAP	ABTS
A	41,59 ^a	33,95 ^a	37,70 ^a
AL	46,73 ^b	50,63 ^c	41,76 ^b
AL+S	49,10 ^c	43,44 ^b	47,57 ^c
K	1,63 ^a	1,77 ^c	2,27 ^b
KL	1,01 ^c	1,22 ^a	1,41 ^a
KL+S	1,20 ^b	1,45 ^b	2,36 ^c

a-c: Para cada fruta y para el mismo método de determinación de la actividad antioxidante, letras diferentes en columnas indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Tanto en la acerola como en el kiwi, para todos los métodos de análisis de la actividad antioxidante se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras frescas, liofilizadas y liofilizadas con goma arábica. En primer lugar en el caso de la acerola, vemos que los valores de las muestras liofilizadas son mayores ($p < 0,05$) que los de la fruta fresca para todos los métodos. Los métodos DPPH y ABTS mostraron la mayor ($p < 0,05$) AAO en la muestra AL+S.

En el caso del kiwi el proceso de liofilización produjo una disminución media del 35% de la AAO total. La adición de goma arábica mejoró la AAO de las muestras un 19% con el método DPPH y FRAP y un 67% con el ABTS, respecto las muestras liofilizadas. Con el método ABTS además se ha obtenido una AAO mayor ($p < 0,05$) en KL+S que en K, con un aumento del 4%.

En el presente estudio se utilizó como análisis de correlación de Pearson entre los métodos de cuantificación de la actividad antioxidante utilizados y cada uno de los compuestos mayoritarios extraídos (tablas 4 y 5). El coeficiente de correlación de Pearson es un índice que mide la correlación lineal entre distintas variables. El intervalo de variación de este coeficiente es de -1 a +1. Principalmente se determinaron si existen relaciones entre los componentes bioactivos y la capacidad antioxidante, como una primera aproximación para evaluar los efectos biológicos de las muestras.

Tabla 4: Correlación de Pearson entre los componentes fenólicos y carotenoides con la capacidad antioxidante medida por DPPH, FRAP y ABTS para acerola

ACEROLA	AAO DPPH	AAO FRAP	AAO ABTS
Fenoles	-0,5635	-0,6636	-0,6090
Carotenoides	-0,1714	-0,0319	-0,1524

Tanto para el caso de los fenoles como los carotenoides, se produjeron correlaciones negativas con todos los métodos de análisis de la actividad antioxidante, y en ningún caso significativas ($p > 0,05$). Esto indica que los fitoquímicos analizados en este trabajo, no son los principales agentes antioxidantes de las frutas de estudio (Toh *et al.*, 2013), pudiendo existir otras sustancias interferentes. Así, la AAO puede existir influencia por la acción de otros componentes no evaluados, como la vitamina C en el extracto hidrofílico (Delva & Goodrich-Schneider, 2013) o los terpenos que pueden intervenir en la actividad antioxidante de la fracción lipofílica de la acerola (Toh *et al.*, 2013). En la acerola la contribución de la vitamina C oscila entre el 40-83% de la actividad antioxidante del extracto hidrofílico, el resto es debido a los polifenoles (Mezadri *et al.*, 2008). Por otra parte, se produjeron correlaciones positivas y significativas ($p < 0,05$) entre los 3 métodos de análisis (valores no representados), por lo que los 3 métodos están bien relacionados entre si.

Tabla 5: Correlación de Pearson entre los componentes fenólicos y carotenoides con la capacidad antioxidante medida por DPPH, FRAP y ABTS para el kiwi

KIWI	AAO DPPH	AAO FRAP	AAO ABTS
Fenoles	-0,2159	-0,3179	0,5394
Carotenoides	-0,7688*	-0,3115	-0,2336

* Indica correlaciones estadísticamente significativas (nivel de confianza 95%)

En el caso del kiwi no se produjo ninguna correlación significativa ($p > 0,05$) entre los fenoles y los métodos de análisis de la actividad antioxidante. En los carotenoides del kiwi se observó una correlación negativa significativa ($p < 0,05$) con el método DPPH. Según otros autores la AAO de la fracción lipofílica del kiwi está producida por la luteína (0,2 mg/100 g) y por otros fitoquímicos liposolubles como la vitamina E (D'Evoli *et al.*, 2015).

4. Efecto del tratamiento en los ensayos *in vitro*

4.1. Ensayos de citotoxicidad

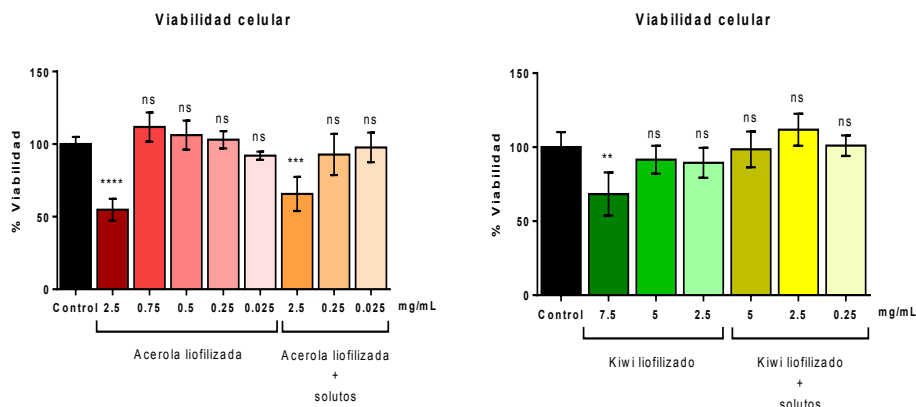
En primer lugar, se determinó la dilución de trabajo no tóxica. Para ello se empleó el ensayo de reducción de MTT, que determina la viabilidad celular basándose en la capacidad de las células vivas de producir formazán a partir del MTT.

4.1.1. Viabilidad celular

A continuación podemos observar los resultados del análisis de citotoxicidad correspondientes a la acerola (figura 12). En ambos análisis, la acerola resultada tóxica cuando se emplea concentrada a 2,5 mg/mL. A partir de concentraciones menores no se evidencian diferencias significativas. A la vista de estos resultados, se decidió emplear la acerola a concentraciones iguales o menores a 0,75 mg/mL. En el caso de la acerola liofilizada con

solutos, podemos concluir que para posteriores ensayos *in vitro* se establecen como concentraciones límite 0,25 a 0,025 mg/mL.

Figura 12: Evaluación de la citotoxicidad celular por medio de la reducción de MTT a formazán



**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$; ns = diferencia no significativa

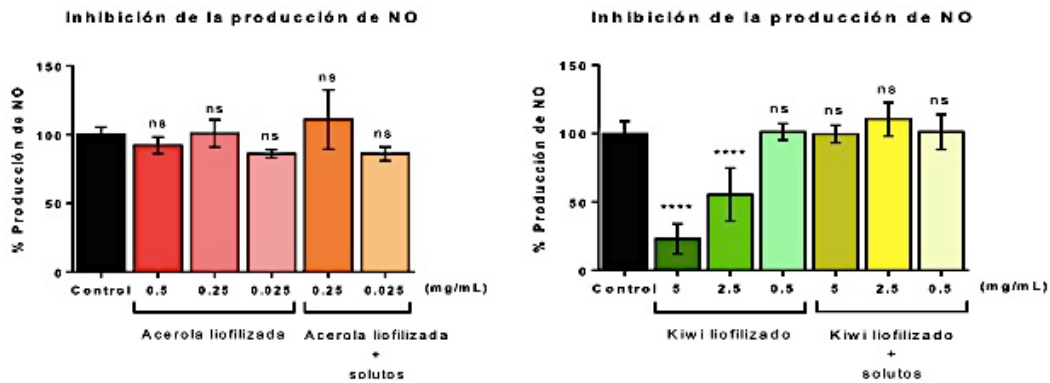
Los resultados del análisis de citotoxicidad del kiwi se pueden observar en la figura 12. En primer lugar, se observa que la única diferencia significativa en muestras de kiwi se encuentra en el liofilizado con una concentración de 7,5 mg/mL. En la misma muestra podemos ver como no existe proliferación celular y se puede concluir que concentraciones iguales o inferiores a 5 mg/mL son aptas para realizar análisis *in vitro*. Finalmente, en muestras de kiwi liofilizado con solutos podemos observar que no se evidencian diferencias significativas en ninguna de las concentraciones analizadas.

4.1.2. Determinación de la producción de NO

Los polifenoles presentan capacidad para actuar como potenciales antioxidantes protegiendo los tejidos frente al estrés oxidativo así como frente a enfermedades asociadas a estas condiciones. Sus actividades pueden derivar de la inhibición mediada por éste en la síntesis periférica o liberación de los mediadores inflamatorios involucrados en estas respuestas como TNF- α y NO (dos Santos *et al.*, 2006).

En la figura 13 se puede observar como, en el caso de la acerola, ninguna de las concentraciones estudiadas inhibe de manera significativa la producción de NO, al contrario de lo que demuestran los estudios de Wakabayashi *et al.*, (2003). Según estos autores, la adición de un extracto de acerola a los macrófagos activados por LPS reduce de manera significativa la concentración extracelular de NO a un nivel indetectable a través de un mecanismo que implica la disminución de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la actividad de captación de radicales de estos extractos. En este trabajo, a partir de 4,3 kg de acerola liofilizada, se preparan diferentes extractos (extrayendo con acetona, hexano o metanol) y posteriormente fraccionando estos extractos. En cada una de estas fracciones se ensaya su actividad inhibitoria de NO. Sin embargo, en nuestro trabajo partimos de un extracto metanólico (metanol:agua 70:30) sin fraccionar. Esto podría explicar porque en nuestros estudios no se observa el mismo efecto que en los estudios de Wakabayashi *et al.*, (2003).

Figura 13: Evaluación de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7



* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns = diferencia no significativa.

Con respecto a las muestras de kiwi (Figura 13), podemos observar como en el caso de las muestras liofilizadas sin solutos sí hay una inhibición significativa y dosis-dependiente en la producción de NO. A una concentración de 2.5 mg/mL, esta inhibición es del 50% y llega a ser del 75% a concentraciones de 5 mg/mL.

Con respecto a las muestras de liofilizadas con solutos en ambas frutas no se observa inhibición de la producción de NO. Se han encontrado estudios (Nishi y Jayakrishnan, 2004) donde explica que la liberación *in vitro* de un principio activo, encapsulado mediante goma arábica, en una solución salina tamponada (PBS) es lenta, aumentando gradualmente con el tiempo. La máxima liberación fue inferior al 50% de la carga después de 10 días. Sin embargo, en contacto con una solución de fluidos gástricos e intestinales simulada fue más rápida que en PBS debido a la rápida hidrólisis de enlaces de Schiff.

V. Conclusiones

La liofilización permitió obtener productos de acerola y kiwi en polvo de alta calidad funcional. Comparando ambas frutas, la acerola mostró mayor contenido en fenoles y carotenoides, así como mayor actividad antioxidante que el kiwi. En ambas frutas la actividad antioxidante evaluada en el extracto hidrofílico fue mayor que en el lipofílico. En la acerola el secado por liofilización afectó negativamente al contenido en fenoles y carotenoides y mejoró la capacidad antioxidante cuantificada por los tres métodos estudiados. En el kiwi la liofilización aumentó el contenido en compuestos fenólicos, posiblemente debido a facilitar su extracción, y no provocó cambios significativos en el contenido en carotenoides. Sin embargo, la actividad antioxidante de los productos de kiwi en polvo fue inferior a los de la fruta fresca. Desde este punto de vista, se recomendaría el empleo de la liofilización en el caso de la acerola pero no en el caso del kiwi.

En general, la incorporación de goma arábiga como aditivo tecnológico favoreció la estabilidad de los fitoquímicos estudiados, demostrando su acción encapsulante y protectora de los mismos, y mejoró la actividad antioxidantes de las muestras. En cuanto a los métodos de cuantificación de actividad antioxidante, ninguno parece correlacionarse con el contenido en compuestos fenólicos ni carotenoides de ambas frutas. Esto parece indicar que otros compuestos fitoquímicos no evaluados en este trabajo, como la vitamina C, pueden estar afectando a los resultados.

En cuanto a los ensayos realizados *in vitro*, no se obtuvo inhibición de la producción de NO en la acerola, pero sí en las muestras de kiwi liofilizado. En este caso los solutos liberan lentamente los bioactivos por ello no se ha encontrado inhibición de NO en ninguna muestra liofilizada.

VI. Referencias

A

- Arrázola**, G.; Alvis A.; Páez M. 2014. Composición, Análisis Termofísico y Sensorial de Frutos Colombianos. Parte 2: Acerola (*Malpighia emarginata* L.). Información Tecnológica Composición. 25: 23-30.
- Arnao**, M.B.; Cano, A.; Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73: 239-24.
- Asenjo**, C.F. 1980. *Acerola. In Tropical and Subtropical Fruits: Composition, Properties and Uses*. Ed. S. Nagy and P.E. Westport. 341-374.
- Ashoor**, S.H., W.C. Monte, and J. Welty. 1984. Liquid Chromatographic Determination of Ascorbic Acid in Foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 67(1): 78-80.

B

- Beirao-da-Costa**, S.; Cardoso, A.; Louro Martins, L.; Empis, J.; Moldao-Martins, M. 2008. The effect of calcium dips combined with mild heating of whole kiwifruit for fruit slices quality maintenance. *Food Chemistry*, 108: 191-197.
- Benzie**, I.F.F. y 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.
- Berk**, Z. 2009. *Food Process Engineering and Technology*. Elsevier Inc, 511.
- Biruete Guzmán**, A.; Juárez Hernández, E.; Sieiro Ortega, E.; Romero Viruegas, R.; Silencio Barrita, J.L. 2009. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría*. 76: 136-145.
- Brand-Williams**, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Bursal**, E. y Gülçin, I. 2011. Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44: 1482-1489.

C

- Chanamai**, R. y McClements. D.J. 2001. Depletion Flocculation of Beverage Emulsions by Gum Arabic and Modified Starch. *Journal of Food Science*, 66: 457-463.
- Carocho**, M.; Ferreira, IC. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 51: 15-25.

D

- Delva**. L y Goodrich-Schneider R. 2013. Antioxidant activity and antimicrobial properties of phenolic extracts from acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruit. *International Journal of Food Science and Technology*, 48: 1048-1056.
- D'Evoli**, L; Moscatello, S; Lucarini, M.; Aguzzi, A.; Gabrielli, P.; Proietti, S.; Battistelli, A.;

Famiani, F.; Böhm, V.; Lombardi-Boccia, G. 2015. Nutritional traits and antioxidant capacity of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* Planch., cv. Hayward) grown in Italy. *Journal of Food Composition and Analysis* 37: 25–29.

Dorta, E.; Lobo, M. G.; González, M. 2012. Using drying treatments to stabilize mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 45:261-268.

Dos Santos, M.D.; Almeida, M.C.; Lopes, N. P.; Petto de Souza, G. E. 2006. Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biol. Pharm. Bull.* 29(11): 2236-2240 .

Du, G.; Li, M.; Ma, F.; Liang, D. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry* 113: 557-562.

Duarte-Almeida, J.M.; Dos Santos, R.J.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema α -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26: 446-452.

F

Farinha, P. 2014. Efeito da liofilização e da adição de goma arábica no potencial bioativo de extratos de morango e kiwi. Tesina Final de Master. Instituto Politécnico de Castelo Branco (Portugal).

Fellows, P. 2000. *Tecnología del procesado de los alimentos: principios y práctica*. Acribia, Ed., Zaragoza. 706 pp.

Fernandes, M., R. Fornari, M. Mazutti, D. Oliveira, F. Ferreira, A. Cichoski, R. Cansian, M. Luccio and H. Treichel. 2009. Production and characterization of xantham gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering* 90(1): 119-123.

H

Heinonen. I.M. y Meyer A.S. 2002. Antioxidants in fruits, berries and vegetables. *Fruit and vegetable processing*. Ed. Woodhead Publishing Limited, England. 381 pp.

I

Imeh, U. y Khokhar, S. 2002. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6301-6306.

K

Krishnan, S.; Kshirsagar, A.C.; Singhal, S.R., 2005. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*, 62: 309-315.

J

Jaya, S., Das, H. and Mani, S., 2006. Optimization of maltodextrin and tricalcium phosphate for producing vacuum dried mango powder. *International Journal of Food Properties*, 9(1): 13-24.

L

Lee, S.K. y Kader, A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*. 20: 207-220.

Luh, B. S. y Wang, Z. 1984. Kiwifruit. *Advanced Food Research*, 29: 279-307.

Lima, V.L.A.G., Me'lo, E.A., Maciel, M.I.S., Prazeres, F.G., Musser, R.S., Lima, D.E.S., 2005. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry* 90, 565–568.

López Hernández, O.D. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*. 44(3).

M

Mateljan. G. THE WORLD'S HEALTHIEST FOODS. *Kiwifruit*. Visto el 27 de Mayo de 2015 <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=41>

McNamee, B.F.; O’Riordan, E.D.; O’Sullivan, M. 2001. Effect of Partial Replacement of Gum Arabic with Carbohydrates on Its Microencapsulation Properties. *J. Agric. Food Chem*, 49: 3385–3388.

Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. 2004. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54 (2): 1-12.

Menlik, T.; Özdemir, M.B.; Kirmaci, V. 2010. Determination of freeze-drying behaviors of apples by artificial neural network. *Expert Systems with Applications*, 37: 7669-7677.

Mezadri, T.; Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. 2008. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21:282– 290.

Mezadri, T.; Perez-Galvez, A.; Hornero-Mendez, D. 2005. Carotenoid pigments in acerola fruits (*Malpighia emarginata* DC.) and derived products. *European Food Research Technology*, 220: 63-69.

Montenegro, M.A., Boiero, M.L., Valle, L.; Borsarelli, C.D. (2012). *Gum Arabic: More than an Edible Emulsifier, Products and Applications of Biopolymers*. ED. InTech. Croatia. 220pp.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65: 55-63.

Mosquera, L.H.; Moraga, G.; Martínez-Navarrete, N. 2009a. Effect of arabic gum on the stability of freeze-dried fruit powders. *Proceedings of The 2009 EFFoST Annual Conference New Challenges in Food Preservation*.

Mosquera, L.H.; Moraga, G; Martínez-Navarrete, N. 2010a. Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojó (*Borojoa patinoi* Cuatrec.) powder. *Journal of Food Engineering*, 97: 72-78.

Mosquera Mosquera, L.H. 2010. *Influencia de la humedad y de la adición de solutos (maltodextrina o goma arábica) en las propiedades fisicoquímicas de borojó y fresa en polvo*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 219pp.

Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26: 211-219.

Monteagudo Fraile, G.; Benlloch Tinoco, M.; Camacho Vidal, M.; Moraga Ballesteros, G. 2013. Aplicación de métodos combinados para la obtención de kiwi en polvo de alta calidad.

N

Nishi, K.K. and Jayakrishnan, A. 2004. Preparation and *in Vitro* Evaluation of Primaquine-Conjugated Gum Arabic Microspheres *Biomacromolecules* 5: 1489-1495.

Nishiyama, I.; Yamashita, Y.; Yamanaka, M.; Shimohashi, A.; Fukuda, T. y Oota, T. (2004). Varietal difference in vitamin C contents in the fruit of kiwifruit and other species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5472-5475.

Niwa, Y.; Kanoh, 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.

O

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 b-carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95: 328-336.

Orrego, A. C. E. 2008. *Congelación y liofilización de Alimentos*. Ed. Artes Gráficas Tizan Ltda. Colombia. 172 pp.

Ozgen, M.; Serce, S.; Gunduz, K.; Yen, F.; Kafkas, E.; Paydas, S., 2007. Determining total phenolics and antioxidant capacities of selected *Fragaria* genotype. *Asian Journal of Chemistry*,

19: 5573-5581.

P

Park, Y-S; Namiesnik, J; Vearasilp, K; Leontowicz, H; Leontowicz, M; Barasch, D; Nemirovski, A; Trakhtenberg, S; Gorinstein, S. 2014. Bioactive compounds and the antioxidant capacity in new kiwi fruit cultivars. *Food Chemistry* 165: 354–361.

Pérez-Jimenez, J y Saura-Calixto, F. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research internacional*, 39: 791-800.

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.

Pietta, PG. 2000 Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63(7): 1035-42.

Pinela, J., Barros, L.; Dueñas, M.; Carvalho, A. M.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. 2012. Antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds and sugars of wild and commercial *Tuberaria lignosa* samples: Effects of drying and oral preparation methods. *Food Chemistry*, 135(3), 1028-1035.

Prakash, A. 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19(2).

Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3396-3402.

R

Ramirez, J.S. 2010. Liofilización. *Ed. ReCiTeIA*. 6: 1-21

Re, R; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.

S

Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, P. 2003. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 430-439.

Sean Carrington, R.A. Gerard King. 2002. Fruit development and ripening in Barbados cherry, *Malpighia emarginata* DC. *Scientia Horticulturae* 92: 1-7.

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.

Soufberos, E.H.; Pissa, I.; Petridis, D.; Lygerakis, M.; Mermelas, K.; Boukouvalas, G.; Tsimitakis, E. 2001. Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine; sensory evaluation and optimisation of its composit. *Food Chemistry*, 75: 487–500.

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).

T

Tang, X.; Pikal, M.J., 2004. Design of Freeze-Drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical Research*, 21: 191-200.

Tavarini, S.; Degl’Innocenti, E.; Remorini, D.; Massai, R.; Guidi, L. 2008. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chemistry*, 107: 282-288.

Telis, V.R.N. and Martínez-Navarrete N. 2010. Application of compression test in analysis of mechanical and color changes in grapefruit juice powder as related to glass transition and water activity. *LWT – Food Science and Technology*, 43: 744-751.

Testolin, R. y Ferguson, A.R. 2009. Kiwifruit (*Actinidia spp.*) production and marketing in Italy. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37: 1-32.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675.

Toh, J.J.; Khoo, H.E.; Azrina, A. 2013. Comparison of antioxidant properties of pomelo (*Citrus Grandis* (L) Osbeck) varieties. *International Food Research Journal* 20(4): 1661-1668.

Tomás-Barberán, F.A.; Gil, M.I.; Cremin, P.; Waterhouse, A.L.; Hess-Pierce, B.; Kader, A.A. 2001. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4748-4760.

V

Van den Berg, R.; Haenen, G. R.; van den Berg, H.; Bast, A. A. L. T. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4): 511-517.

Vendramini, A.L. y Trugo, L.C. 2000. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry* 71: 195-198.

Vera de Rosso, V.; Hillebrand, S.; Cuevas Montilla, E.; Bobbio, F.O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A.Z. 2008. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and ac-ai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 291-299.

W

Wakabayashi, H.; Fukushima, H.; Yamada, T.; Kawase, M; Shirataki, Y.; Satoh, Z.; Tobe, T; hashimoto, K.; Kurihara, T.;1 Motohash, N.; Sakagami, H. Inhibition Of LPS-Stimulated NO Production in Mouse Macrophage-like Cells by Barbados Cherry, a Fruit Of *Malpighia emarginata* DC. *Anticancer research* 23: 3237-3242.

Wolff, E. y Gilbert, H. (1988). Développements technologiques nouveaux en lyophilisation. *Journal of Food Engineering*, 8: 91-108.

V

Vashist, A., Gupta, Y.K. y Ahmad, S., (2012). 'Interpenetrating biopolymer network based hydrogels for an effective drug delivery system'. *Carbohydrate Polymers*, 87(2): 1433-1439.

Z

Zhai, S.; Taylor, R.; Sanches, R.; Slater, H. (2003). Measurement of lyophilisation primary drying rates by freeze-drying microscopy. *Chemical Engineering Science*, 58: 2313-2323.

