



*Área de Nutrición y Bromatología*  
*Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal*  
*Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla*

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
FRUTOS DE ACEROLA (*Malpighia emarginata* DC.) Y  
SUS DERIVADOS.**

Memoria que presenta  
*Tatiana Mezdri*  
Para optar al grado de  
Doctora por la Universidad de Sevilla

*Mezdri*

Sevilla, febrero de 2005

**D. ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD, Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,**

**CERTIFICA:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada: "Evaluación de la Actividad Antioxidante de Frutos de Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) y sus Derivados", propuesta por la Licenciada en Nutrición Tatiana Mezdri para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Área de Nutrición y Bromatología de este Departamento, bajo la dirección de las Dras. Ana M<sup>a</sup> Troncoso González, Catedrática de Universidad, y M<sup>a</sup> del Carmen García Parrilla, profesora titular, ambas del área de conocimiento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Sevilla, durante el tiempo obligado y reuniendo los requisitos exigidos para este tipo de trabajos.

113

376

Sevilla, febrero de 2005

9-02-05

*Alma de Pito*

*Alberto Machado*



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Bioquímica, Bromatología,  
Toxicología y Medicina Legal

Fdo. Alberto Machado de la Quintana

**ANA M<sup>a</sup> TRONCOSO GONZÁLEZ, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD, Y M<sup>a</sup> DEL CARMEN GARCÍA PARRILLA, PROFESORA TITULAR, AMBAS DEL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,**

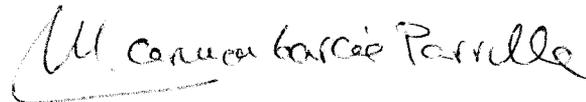
**CERTIFICAN:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada "Evaluación de la Actividad Antioxidante de Frutos de Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) y sus Derivados", propuesta por la licenciada en Nutrición Tatiana Mezdri para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Área de conocimiento de Nutrición y Bromatología bajo su dirección conjunta, reuniendo a su juicio los requisitos exigidos para este tipo de trabajos, por lo que autorizan su presentación.

Sevilla, febrero de 2005



Fdo. Ana M<sup>a</sup> Troncoso González



Fdo. M<sup>a</sup> del Carmen García Parrilla

## **1. Introducción**

El interés por los antioxidantes presentes en la dieta se ha visto incrementado espectacularmente en los últimos años, debido a su posible implicación en la prevención de las principales patologías que afectan a la población.

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas responsables de causar el estrés oxidativo y dañar la estructura celular. Para protegerse del efecto nocivo de los radicales, el organismo cuenta con un sistema de defensa antioxidante propio (origen endógeno) y utiliza un refuerzo externo (origen exógeno) procedente del reino vegetal. Los antioxidantes dietéticos son capaces de neutralizar los radicales libres, combatiendo enfermedades como el cáncer, infarto de miocardio o las enfermedades cerebrovasculares. Las frutas y vegetales son la principal fuente de antioxidantes de tipo exógeno: vitaminas E y C, carotenos y fenoles. Ciertos antioxidantes tienen mecanismos más bien pasivos, ya que se oxidan siempre en primer lugar antes que las moléculas a las que protegen, como es el caso de las vitaminas C, E,  $\beta$ -caroteno, glutatión reducido, ácido úrico y bilirrubina. Otro grupo de antioxidantes exógenos actúa inactivando radicales libres como son los compuestos fenólicos y polifenólicos. Entre ellos se encuentran los flavonoides presentes en muchos alimentos de origen vegetal.

En este sentido, la actividad antioxidante de cualquier alimento refleja la contribución relativa de la suma de los constituyentes antioxidantes del mismo, proporcionando una información valiosa que va más allá de su composición química.

Este trabajo se engloba dentro de una línea de investigación que pretende evaluar la actividad antioxidante de los alimentos de origen vegetal en orden a aumentar el potencial antioxidante de la dieta. Se trata de determinar la actividad antioxidante y proponer métodos de procesado que

respeten estas propiedades para obtener productos más saludables. En concreto, nos hemos dirigido hacia un producto vegetal que ha asumido gran importancia económica en Brasil: la **acerola**.

La acerola (*Malpighia emarginata* DC.) es una planta originaria de las Antillas, América Central y zona septentrional de Sudamérica. Se desarrolla bien en clima tropical y subtropical. Se trata de un fruto en drupa, de pequeño tamaño y rico en minerales y vitaminas. Aparte de ser una excelente fuente de vitamina C también contiene bioflavonoides (*Mesquita y Vigoa, 2000*); de ahí su gran valor nutritivo y su potencial uso como antioxidante. El contenido en ácido ascórbico puede ser de hasta 4000mg/100g de peso fresco. Los frutos verdes poseen mayor contenido en vitamina C que los maduros. Sus usos industriales son: la obtención de zumos para su utilización como fortificador de ácido ascórbico en mezclas con otros zumos de frutas, elaboración de concentrados y en nutracéuticos. Su composición fisicoquímica, aromas, contenido en fibra es bien conocido, pero su actividad antioxidante poco ha sido descrita hasta el momento.

En Brasil actualmente se están implantando industrias alimentarias cuyo objetivo es la comercialización de nutracéuticos ya que el potencial económico de este mercado está aumentando. Así pues, se ha procedido en este estudio a completar la descripción del fruto de acerola intentando evaluar su uso como antioxidante dietético.

## 2. Objetivos

El *objetivo fundamental* de este trabajo es:

⇒ *Evaluar la actividad antioxidante de los frutos de acerola (Malpighia emarginata DC.) y sus productos derivados.*

La evaluación de la actividad antioxidante debe considerar el contenido en sustancias antioxidantes como la vitamina C, los carotenos y los compuestos fenólicos. Resulta interesante comprobar como se modifican en los diversos tratamientos de elaboración de productos derivados. Así pues, en este trabajo se abordan los siguientes *objetivos específicos*:

- Aplicar los métodos de determinación de la actividad antioxidante total de los productos derivados del fruto de acerola, eligiendo las condiciones analíticas que mejor se adaptan a la muestra.
- Describir la composición química de la acerola y sus productos prestando especial atención a los componentes de naturaleza antioxidante: vitamina C, compuestos polifenólicos y carotenoides.
- Establecer relaciones entre la composición química y actividad antioxidante.
- Estudiar las alteraciones que los diferentes métodos de procesado pueden provocar en las propiedades antioxidantes del fruto.
- Evaluar el efecto del tratamiento por altas presiones en la capacidad antioxidantes de los zumos de zumo de acerola.

### 3.1 ACEROLA (*Malpighia emarginata* DC.)

#### 3.1.1 Historia y Clasificación Botánica

La acerola (*Malpighia emarginata* Sessé y Mociño ex DC., Prodr. 1:578; 1824) es una planta originaria de la región bañada por el mar de Las Antillas (sur de México), América Central y de la zona septentrional de Sudamérica.

Su difusión inicial tuvo lugar mucho antes del descubrimiento de América, a través de los nativos de las islas de América Central, los cuales consumían una dieta rica en acerola y la transportaban en sus viajes y migraciones diseminándola de isla en isla (Couceiro, 1985). La atrayente coloración de sus frutos y su gran utilización en la alimentación por los nativos, llamaron la atención de los españoles que, debido a la semejanza morfológica con la cereza europea, la denominaron "Cereza de Las Indias Occidentales" (West Indian Cherry).

Asenjo (1959), relata que el nombre "acerola" proviene del nombre del fruto de *Crataegus azarolus* L., arbusto de la familia de las Rosáceas originario de la parte oriental de la cuenca del Mediterráneo (Creta) y cultivado por sus frutos comestibles en los países del sur de Europa, entre ellos España. El fruto de esta especie es un pomo del mismo color, forma y tamaño que el de la acerola de *Malpighia emarginata* que, sin embargo, es una drupa que dependiendo de los países en los que se cultiva, recibe denominaciones diferentes: cereza de Barbados, cereza de las Antillas, cereza colorada, manche, semeruco, entre otras.

Ledin (1958), indica que Pliny Reasoner introdujo *M. emarginata* en Florida (EEUU) en 1880 como planta ornamental, si bien no se reconocieron sus frutos como comestibles hasta 1903.

Según Ostendorf (1963), la primera referencia sobre *M. emarginata* se debe a Oviedo que, en 1535, describió el "cimiruco" como un pequeño árbol de

frutos delicados y sabrosos parecidos a la cereza europea (*Prunus cerasus* L.), pero que a diferencia de ésta, contenían dos o tres semillas. En 1696, Sloane, desconociendo el trabajo de Oviedo, la denominó "cereza de Suriname" o "pitanga", si bien esta última denominación coincide con la de los frutos de *Eugenia uniflora* L., arbusto de la familia de las Mirtáceas (Ostendorf, l.c.)

En 1703 el botánico francés Charles Plumier agrupó en su *Nova Plantarum Americanarum Genera*, cinco especies de árboles y arbustos en un género al que denominó *Malpighia* (en honor del naturalista italiano Marcello Malpighi), dando "nombres frase" a cinco especies.

En 1753 Linneo, en su *Species Plantarum*, punto de partida de la denominación binomial, basándose en el nombre frase de Plumier "Malpighia mali punici facie" describe *Malpighia glabra*, especie tipo del género frecuentemente confundida con *M. emarginata*. En la segunda edición de esta misma obra, Linneo reconoce como especie del mismo género a *M. puniceifolia*.

El status taxonómico de *M. emarginata* ha sido objeto de no pocas controversias: algunos botánicos han distinguido entre la "Barbados cherry" (*M. glabra*) y la "West Indian Cherry" (*M. puniceifolia*). Se ha sugerido que *M. emarginata* podría tratarse de una especie hibridógena entre *M. glabra* y *M. puniceifolia*; así mismo se ha considerado a *M. glabra* como una variedad de cultivo de *M. puniceifolia*.

Vivaldi (1979) considera denominaciones sinónimas las de *M. glabra* y *M. puniceifolia* (*M. glabra* L.). Para este autor, monógrafo del género *Malpighia*, *M. emarginata* aparece por primera vez en la literatura botánica en el primer volumen (1824) de la obra de A. P. De Candolle (DC.) En su obra, *Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*, este autor reconoce formalmente la especie, basándose en los datos aportados por Martín Sessé y José Mariano Mociño tras su expedición por América Central.

La denominación de esta especie como *Malpighia emarginata* Sessé y Mociño ex DC. fue adoptada definitivamente en el Consejo Internacional de Recursos Genéticos Vegetales en 1986 (Alves y Menezes, 1995).

### 3.1.2 Características, Composición y Utilización de los Frutos

El acerolo es un arbusto con valor ornamental por su denso follaje. Se desarrolla bien en clima tropical y subtropical. Mide una altura de 2 a 5m, con un tallo tortuoso, corteza rugosa, madera blanca y ligera. Presenta un fruto en forma de drupa, subglobuloso de superficie lisa o sensiblemente trilobada, que se dispone apartada o en panículas de dos o tres, en axilas foliares, con pedúnculos cortos y posee tres semillas que representan entre el 19 y el 25% del peso total. El tamaño del fruto varía de 1 a 2,5cm, el diámetro de 1 a 4cm y el peso de 2 a 15g. Presenta una coloración verde cuando está en desarrollo, cambiando a tonos amarillos y rojos cuando está maduro (Figura 1) (Alves y Menezes, 1995).



Figura 1. Acerola en tres estadios de maduración diferentes.

La producción comienza a los 1 – 2,5 años después de plantado y su período de fructificación es de 3 a 4 veces al año. Cada planta produce cerca de 20 a 30kg de frutos anualmente (*Marino Netto, 1986*). En Puerto Rico, *Simão (1971)* constató hasta siete picos de producción por año. En algunas regiones del noreste brasileño, que presentan alta disponibilidad de luz y buena irrigación, las plantas comienzan a dar frutos en menos de un año y producen prácticamente todo el año (*Alves et al., 1995*). Las acerolas maduras mantenidas a temperatura ambiente se deterioran en 4 - 5 días y las verdes y semi-maduras en 6 - 7 días (*Manica y Carvalho, 1995*).

Cada 100g del fruto fresco aporta 17 Kilocalorías, 0,21g de proteína, 0,23g de grasa, 3,57g de carbohidratos, además, es fuente de tiamina (0,02mg), riboflavina (0,07mg), piridoxina (8,7mg) y sales minerales principalmente hierro (0,24mg), calcio (11,7mg) y fósforo (17,10mg) (*Assis et al., 2000; Verdú, 1995*) pero se destaca por el alto contenido en vitamina C, que puede variar de 300 a 4600mg/100g de fruta (*Matsuura y Rolim 2002; Nogueira et al., 2002; Vendramini y Trugo, 2000; Alves, 1996; Ito et al., 1990; Asenjo, 1959*). Además de ser considerada excelente fuente de vitamina C también contiene bioflavonoides; de ahí su gran valor nutritivo y su potencial uso como antioxidante (*Mesquita y Vigoa, 2000*).

Los compuestos del aroma del fruto de acerola han sido aislados e identificados por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Entre los 46 compuestos hallados en la fracción volátil, los alcoholes (3-metil-3-butenol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol) eran los predominantes. Compuestos aromáticos y ésteres, participan también en el aroma de la fruta. Entre las 42 agliconas identificadas por primera vez, los alcoholes y los norisoprenoides alifáticos eran los componentes principales. La hidrólisis de estas agliconas pueden aumentar el aroma de la acerola (*Boulanger y Crouzet, 2001*).

La fruta puede consumirse fresca, aunque por la acidez de la pulpa ésta no es la forma más popular de consumo. Sus usos más frecuentes son como: zumos, mermeladas, helados, compotas, gelatinas, confituras, dulces y licores. Industrialmente se utiliza para la elaboración de concentrados, en

nutracéuticos y como fortificador de ácido ascórbico en mezclas con otros zumos de frutas pobres en esta vitamina. *Matsuura y Rolim (2002)*, aumentaron cinco veces la cantidad de vitamina C de zumo de piña añadiendo de 5 a 10% de zumo de acerola, preservando las características sensoriales del zumo de piña original.

La composición de los frutos y de sus productos depende de algunos factores tales como: condiciones climáticas (lluvias, disponibilidad de nutrientes del suelo, variación de temperatura), tratamiento de cultivo, aplicación de pesticidas, estadio de maduración. El procesado y el almacenamiento, afectan principalmente al contenido de ácido ascórbico (*Carvalho y Guerra, 1995*).

*Nakasone et al. (1966)*, estudiando los factores que influyen sobre el contenido en vitamina C de la acerola, observaron que los frutos después de recolectados y dejados directamente al sol durante 8 horas, presentan una pérdida de agua acompañada de un descenso de hasta 25,2% en su contenido de ácido ascórbico. Sin embargo, la radiación solar durante la fase de crecimiento del acerolo aumenta su actividad fotosintética incrementándose los niveles de azúcares en los tejidos de la planta y como consecuencia el de ácido ascórbico, puesto que ese es sintetizado a partir de las hexosas. Cuanto mayor es la incidencia de la radiación solar durante todo el ciclo de la planta, mayor es el contenido de vitamina C de los frutos.

La actividad metabólica de la acerola es intensa, y su maduración ocurre en corto espacio de tiempo, por lo que no se necesita de ningún agente activador para que la fruta esté en condiciones ideales para el consumo (*Alves, 1996*). Las alteraciones asociadas con la maduración están relacionadas con el estadio en que se encuentren los frutos. El contenido en vitamina C tiende a disminuir durante este proceso, es decir, los frutos verdes presentan valores superiores a los encontrados en los frutos maduros (*Nogueira et al., 2002*). En 1980, *Butt* atribuyó este descenso a la actuación de la enzima denominada ácido ascórbico oxidasa (ascorbato oxidasa), y verificó que la actividad

enzimática de los frutos maduros es mayor que la de los verdes, lo que puede explicar las pérdidas encontradas durante la maduración.

También están implicadas en el proceso de maduración una serie de reacciones bioquímicas complejas tales como: hidrólisis del almidón, conversión de cloroplastos en cromoplastos con transformación de clorofila, descenso de acidez, aumento de los azúcares reductores, producción de carotenoides, antocianinas, fenoles y la formación de compuestos volátiles (Alves *et al.*, 1992; Speirs y Brady, 1991). Todas estas reacciones son importantes para la finalización de la maduración de la fruta y para caracterizar su sabor peculiar.

### **3.1.3 Aspectos Económicos y de Mercado**

En 1955, la acerola fue traída de Puerto Rico por la Universidad Federal Rural de Pernambuco e introducida en Brasil, sin embargo la fruta era conocida en el país hace más de 50 años (Couceiro, 1985). El gran interés económico comenzó cuando se conoció el contenido en vitamina C y consecuentemente, el potencial del mercado interno y externo.

Brasil, por su clima favorable, es un país que presenta condiciones ideales para el cultivo de la acerola, siendo uno de los mayores productores mundiales de esta fruta comercializándola en forma de pulpa y frutos congelados. Sin embargo, esta planta todavía no posee variedades homogéneas, lo que se considera como uno de los principales factores que llevan a gran variabilidad (cuantitativa y cualitativa) de la producción brasileña (Matsuura *et al.*, 2001).

El interés comercial que presenta el cultivo de acerola a escala industrial, se explica por el aumento del consumo interno y la demanda externa. Ello ha favorecido la aparición de pequeños productores que cuentan con una plantación de fácil cultivo, lo que ha contribuido al desarrollo de regiones más desfavorecidas, fomentando el empleo agrario.

La producción brasileña de la acerola se concentra principalmente en el sureste, actualmente el mayor productor del país, seguido de la región noreste y norte, ambas caracterizadas por la formación de grandes áreas cultivadas vinculadas a agro-industrias. La región sur, esta formada por pequeñas propiedades, pero con un gran potencial de mercado (*Nogueira et al., 2002*).

Uno de los principales problemas al que se enfrentan los productores de acerola es la gran sensibilidad de los frutos maduros después de la recolección y durante el proceso de comercialización. La rápida maduración y la facilidad de deterioro por la fragilidad de su piel, hace que con cualquier daño mecánico que provoque su ruptura se desarrolle la fermentación de la pulpa. Para que esto no ocurra, la fruta exige cuidados especiales de recolección y almacenamiento, que encarecen y dificultan la explotación comercial (*Carvalho y Manica, 1993; Moscolo, 1956*).

Entre los compradores externos de acerola de Brasil destaca el mercado japonés, seguido de Estados Unidos y Europa. En Japón, la acerola es procesada y utilizada para la fabricación de varios productos como: suplementos vitamínicos y fortificación de otros zumos. En Estados Unidos y Europa, el mercado es potencialmente prometedor. En Europa, principalmente Alemania, Francia, Bélgica y Hungría, la acerola es usada básicamente para enriquecer zumos; y en Estados Unidos su utilización es mayor en la industria farmacéutica, especialmente para la producción de cápsulas utilizadas como complemento vitamínico. Otro mercado prometedor es el de América Latina, principalmente Argentina, Chile y Uruguay; Argentina por ejemplo ha demostrado gran interés en comprar zumos de acerola de Brasil (*Bliska y Leite, 1995*).

### 3.2 OXIDACIÓN, DAÑO OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

Durante la respiración la mayor parte del oxígeno que inhalamos es completamente reducido y se transforma en agua. Sin embargo, aproximadamente un 5% del oxígeno se reduce sólo parcialmente formando alguna especie reactiva intermedia. Así, la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) está ligada a la utilización de oxígeno. Las ROS se forman en condiciones fisiológicas normales o bajo influencia de determinadas situaciones. Cuando la generación de ROS sobrepasa las barreras de defensa del organismo se produce un gran aumento del daño en las estructuras biológicas de macromoléculas tales como DNA, carbohidratos, proteínas y lípidos. A este proceso se denomina estrés oxidativo, que se define como el desequilibrio entre la producción de radicales y las defensas antioxidantes. (Sies, 1991; Halliwell y Gutteridge, 1989).

Las ROS son tanto radicales, que se caracterizan por disponer de un electrón libre responsable de su efecto agresivo, como compuestos reactivos no radicales, capaces de oxidar biomoléculas. A estos intermedios se conocen como oxidantes o pro-oxidantes (Sies, 1991).

La importancia biológica de los radicales libres fue adelantada por Gerschman en 1954, al reconocer que las ROS son el mecanismo molecular común de la toxicidad del oxígeno y de la radiación. Un aumento de radicales oxidantes o una disminución de los antioxidantes, llevan igualmente al daño celular (estrés oxidativo). La toxicidad del oxígeno es un fenómeno continuo. Estos conceptos fueron asociados a una teoría general del envejecimiento por radicales libres, en la que se considera que su producción conlleva a un daño acumulativo y al azar en moléculas biológicas lo que provoca una disminución de las funciones vitales y el envejecimiento celular (Boveris et al., 2000).

### 3.2.1 Origen y Naturaleza de Radicales Libres y Otros Oxidantes

Las ROS pueden ser de origen endógeno y exógeno. La formación **endógena**, se ocasiona durante el funcionamiento normal metabólico y también como parte de la defensa inmune primaria. En efecto, las células fagocitas tales como neutrófilos, monócitos o macrófagos, producen grandes cantidades de radicales  $O_2^{\bullet-}$  y de la especie no radical  $H_2O_2$ . Según *Diplock et al. (1998)*, este proceso forma parte de la línea de acción microbicida.

Las fuentes endógenas más significativas de ROS derivadas del oxígeno en el organismo están formadas por:

- ❑ Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )
- ❑ Radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )
- ❑ Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
- ❑ Radical hidroperoxilo ( $HO^{\bullet}_2$ )
- ❑ Radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ )
- ❑ Radical peroxilo ( $O_2^{\bullet}$ )
- ❑ Óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ )

#### Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )

Esta forma reactiva de ROS de naturaleza no radical se forma *in vivo* por la exposición del tejido a la luz. Los pigmentos absorben la luz que entra en la célula con un alto estado electrónico y transfiere su energía a la molécula de oxígeno generando así, el oxígeno singlete (*Haslan, 1998*). Su vida media se ha estimado en  $10^{-6}$  segundos. Puede reaccionar bien cediendo su electrón de excitación o bien mediante reacciones químicas. Sus dianas preferentes son los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados y de las bases de ADN (*Stahl y Sies, 1993*).

#### Radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

Generados por reacciones de reducción del oxígeno a través de xantina oxidasa o NADPH oxidasa o por fuga desde la cadena respiratoria. Esta

especie la forman casi todas las células aeróbicas y parece ser la mayor fuente de “escape” de electrones del oxígeno de varios componentes de la cadena de transporte electrónico. Se estima que aproximadamente 1-3% del oxígeno que utilizamos se convierte en  $O_2^{\bullet}$  (Haslam, 1998; Halliwell, 1996).

#### Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Es una especie reactiva no radical que puede fácilmente difundir entre células vivas. Se convierte eficientemente en agua por la enzima catalasa, un proceso que determina su vida media. Los radicales hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) se forman a partir de  $H_2O_2$  endógeno en un proceso catalizado por metales  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$  (Reacción de Fenton). La toxicidad del  $H_2O_2$  está más relacionada con la formación del  $HO^{\bullet}$ , especie de alta reactividad, que con la suya propia.

#### Radical hidroperoxilo ( $HO^{\bullet}_2$ )

Producido por la protonación del radical superóxido, este radical juega un papel importante en la citotoxicidad de la célula, aunque hasta el momento no existe una evidencia clara. Su toxicidad se atribuye a dos factores. Primero, el radical hidroperoxilo es menos polar que el radical superóxido y puede cruzar las membranas biológicas con la misma eficacia que el peróxido de hidrógeno. Segundo, es algo más reactivo que el superóxido, y a diferencia de éste, el radical hidroperoxilo puede atacar directamente ácidos grasos y también iniciar la peroxidación de componentes lipídicos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Haslam, 1998).

#### Radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ )

Es una de las especies más reactivas, con una vida media estimada en  $10^{-9}$  segundos y alta reactividad. Esta implica reacciones en cadena que conducen a un daño inmediato en el lugar donde se genera. Este radical se puede formar *in vivo* por la acción de radiaciones de alta energía como los rayos X, causando una ruptura en el agua corporal ( $H_2O \rightarrow H^{\bullet} + HO^{\bullet}$ ) o por la reacción de Fenton, a través del  $H_2O_2$  y un metal de transición:



La alta reactividad del radical HO<sup>•</sup> puede iniciar sobre los ácidos grasos el proceso de peroxidación lipídica. El ataque de los radicales sobre los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares llevan a una distorsión del espacio hidrofóbico y a una pérdida de la función biológica de la membrana. El radical HO<sup>•</sup> es capaz de iniciar esa secuencia de reacciones (*Diplock et al., 1998*).

#### Radical peroxilo (O<sub>2</sub><sup>•</sup>)

El proceso de peroxidación lipídica puede también generar el radical peróxido (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) que posee una vida relativamente larga (segundos) con una considerable capacidad de difusión entre los sistemas biológicos.

#### Óxido Nítrico (NO<sup>•</sup>)

Se encuentra ubicado en las paredes de los vasos sanguíneos y de la musculatura lisa produciendo una reducción sanguínea. También se produce por la activación de macrófagos contribuyendo a la defensa inmune primaria, pero el exceso de NO<sup>•</sup> es citotóxico y puede reaccionar directamente con las biomoléculas o combinado con oxígeno para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), un radical capaz de inducir la lipoperoxidación e interferir en la señalización celular por nitración de residuos de tirosina en proteínas (*Beckman, 1996*).

La producción de radicales es un hecho totalmente cotidiano y no se puede evitar en su totalidad. Algunos se forman por procesos metabólicos normales, como los descritos anteriormente, pero otros son consecuencia de factores del medio que potencian su efecto nocivo, conocidos como radicales de origen **exógeno**. Estos radicales pueden afectar al organismo a través de dietas inadecuadas, grandes esfuerzos físicos, en atmósferas contaminadas (humos de tabaco, ozono, óxidos de nitrógenos), toma de medicamentos y otros. (*Lario et al., 1998*).

En el organismo existen varios mecanismos de defensas contra esas especies reactivas que permiten eliminarlas o neutralizarlas, pero en ciertas

situaciones esas defensas no son suficientes y se produce así, el daño oxidativo.

### **3.2.2 Daño Oxidativo y su Implicación en Ciertas Enfermedades**

Los radicales libres pueden dañar biomoléculas y componentes celulares produciendo sustancias tóxicas, alterando la expresión genética, la actividad enzimática y deteniendo mecanismos normales de reparación (Jacob, 1999). Está ampliamente reconocido, a través de diversos estudios, que el daño molecular y celular causado por las ROS está íntimamente relacionado con el proceso de desarrollo de enfermedades crónicas como: algunos tipos de cáncer, cardiopatías, artritis-reumatoide, cataratas, problemas neuronales, etc. Algunas de ellas se detallan a continuación:

#### **a) Enfermedades Cardiovasculares**

Una de las consecuencias más importantes de la destructiva reacción en cadena que provocan las ROS son las *enfermedades cardiovasculares*. Actualmente, es la principal incidencia de muerte en la mayoría de los países industrializados. *Berliner y Heinecke (1996)*, citan que la causa primaria en la gran parte de las enfermedades cardiovasculares es la arteriosclerosis, una afección multifactorial de la pared arterial. Este proceso se caracteriza por una disminución del flujo sanguíneo en una o más ramas de las arterias coronarias que se obstruyen por el acúmulo de placas de ateroma que salen del interior a la superficie de las arterias, limitando el lumen. El flujo también puede ser bloqueado totalmente por coágulos sanguíneos (trombos) impidiendo la llegada de oxígeno y nutrientes a la parte del tejido muscular cardíaco afectado.

La arteriosclerosis es una enfermedad progresiva que se desarrolla en diferentes estadios. Las LDL (lipoproteínas de baja densidad) cuando se modifican por el proceso de oxidación, que ocurre debido a la reacción de lipoperoxidación iniciada por los radicales libres, contribuyen efectivamente para la formación de la lesión arterosclerótica (*Tijburg et al., 1997*).

### b) Carcinogénesis

Es un proceso complejo constituido de varias fases y que incluye: iniciación, promoción y progresión de la enfermedad. La generación de radicales está asociada a la tumorigénesis a diferentes niveles. El daño oxidativo del ADN ha sido demostrado *in vivo* e *in vitro* relacionado con el rompimiento de la cadena doble o simple de ADN además de aberraciones cromosomales tales como ruptura o reorganización. Las bases modificadas del ADN (como hidroxitimidina o hidroxiguanina) han sido detectadas después de la exposición de células a situaciones de estrés oxidativo. La modificación de las bases del ADN puede tener como resultado mutaciones, eliminaciones o amplificación genética siendo el primer paso para la carcinogénesis. Además, las ROS son capaces de desactivar enzimas detoxificantes responsables del atrapamiento de carcinógenos potentes (*Flagg et al., 1995*).

### c) Enfermedades Neuronales

El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de la degeneración de las neuronas, proceso relacionado con las enfermedades de Parkinson, Esclerosis Amiotrófica Lateral y Alzheimer (*Kondo, 1996*). Las ROS son capaces de inducir tanto la apoptosis como la necrosis celular. Como una consecuencia de la ruptura de membrana por lipoperoxidación ocurre una distorsión en el gradiente de iones de la célula. Las neuronas pueden sufrir muerte por necrosis, como ha sido demostrado en cultivo celular seguido de depleción intracelular de glutatión reducido (GSH), el principal antioxidante endógeno. En ciertas condiciones patológicas, el óxido nítrico (NO) ha sido considerado como un importante mediador de muerte celular. El mayor responsable por su toxicidad es el peroxinitrito que puede formarse por la reacción entre el radical NO<sup>•</sup> con el radical peróxido (*Diplock et al., 1998*).

### d) Cataratas y Degeneración Macular Relacionada con la Edad (AMD)

*Taylor (1993)*, apunta la relación entre el daño oxidativo y la debilidad de la visión en la vejez. La catarata senil indica la opacidad ocular de las lentes. Las proteínas de las lentes poseen una vida extremadamente larga y a menudo sufren daño oxidativo, ya que están expuestas a la luz y al oxígeno,

Como consecuencia, las proteínas afectadas pueden agregarse y precipitarse perdiendo su función normal.

La AMD es una enfermedad que afecta la región anatómica de la retina con mayor grado de actividad visual. El pigmento macular, mancha amarilla, representa un filtro del color por lo cual la luz debe pasar antes de ser detectada. La función del pigmento macular no ha sido totalmente identificada pero parece que actúa protegiendo contra la foto-oxidación producida por la luz azul, mediada por moléculas en un estado de excitación triplete, O<sub>2</sub> o superóxido (*Landrum et al., 1997*).

Existen otras patologías, además de las citadas, en cuya generación podrían participar efectos de los radicales libres. Entre ellas se han considerado por ejemplo, el daño tóxico agudo del hígado, los trasplantes de órganos, cirugía cardíaca, enfermedades del tracto gastrointestinal, agresiones físicas o químicas (como radiaciones o contaminación ambiental), etc. (*Morrissey y O'brien, 1998*). Todas estas situaciones significan la presencia de un estado de estrés oxidativo, que puede ser tanto causa como consecuencia de la patología en cuestión.

Además de los aspectos clásicos de daño oxidativo para moléculas biológicamente relevantes, las ROS están involucradas en mecanismos patológicos generadores de enfermedades cada vez más comunes. Frente a este fenómeno de agresión al cuerpo, el sistema de defensa del organismo presenta una protección antioxidante que intenta mantener el equilibrio entre: la producción de radicales libres y los antioxidantes.

### 3.3 DEFENSA ANTIOXIDANTE

Halliwell (1995), define a los antioxidantes como sustancias que estando presente a bajas concentraciones frente a un sustrato oxidable, significativamente inhiben o retrasan la oxidación del sustrato.

El antioxidante, al colisionar con una ROS le cede un electrón y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Sin embargo, no todos actúan de esa forma, en el caso de las enzimas, éstas catalizan o aceleran reacciones químicas en las que ciertos sustratos reaccionan con los radicales formados (Jacob, 1995).

Existen dos líneas de defensa antioxidante, una de origen *endógeno* y otra *exógeno*.

#### 3.3.1 Líneas de Defensa Antioxidante Endógeno: sistema enzimático y no enzimático

Para protegerse del daño oxidativo causado por radicales, el organismo opera con un sistema de defensa *endógeno* de tipo enzimático y no enzimático. La primera línea de defensa antioxidante es intracelular y, principalmente de tipo enzimático.

Las enzimas implicadas en la defensa antioxidante son: la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

La superóxido dismutasa es la principal enzima implicada directamente en la detoxificación de las ROS, transformando el radical superóxido en peróxido de hidrógeno. Hay que tener en cuenta que el radical superóxido suele generar la existencia de las demás especies reactivas de oxígeno, de ahí la importancia de esta enzima (Gastell y Alejo, 2000).

Además, la catalasa y la glutatión peroxidasa, reducen el  $H_2O_2$  y los hidroperóxidos orgánicos respectivamente (*Gastell y Alejo, 2000*).

El glutatión (GSH) se encarga de atrapar ROS previniendo que estos actúen sobre los grupos sulfhidrilo de las proteínas lo cual implicaría en daño celular. Esta reacción está modulada por la glutatión peroxidasa. La glutatión reductasa se encarga de reestablecer los niveles de glutatión oxidada (GSSG) a su situación original.

Se ha constatado que varios subtipos de glutatión peroxidadas son selenio-dependientes, presentando un átomo de selenio unido covalentemente a la cisteína. (*Levander y Burk, 1996*).

El sistema de defensa no enzimático es la segunda barrera antioxidante. Incluye varios compuestos que son responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos, como el plasma y de la protección del daño oxidativo de partículas biológicas y macromoléculas circulantes. Esta defensa está formada por distintos compuestos como: glutatión, ubiquinol, urato y proteínas plasmáticas como la albúmina. (*Jacob y Burri, 1996*).

Otra estrategia de prevención de formación de las ROS es el control de los niveles de iones Fe y Cu libres, los cuales son transportados por proteínas ligadoras de metales. Así, previenen la iniciación de la lipoperoxidación o el daño al DNA. Algunas de éstas proteínas son: ferritina, transferrina y ceruloplasmina (*Diplock et al., 1998*).

### **3.3.2 Líneas de Defensa Antioxidante Exógeno: componentes de la dieta**

La dieta tiene una función fundamental en el mantenimiento de la salud y en la prevención de enfermedades, ello es debido a que los alimentos proporcionan al organismo nutrientes protectores, entre los que destacan las sustancias antioxidantes procedentes del reino vegetal, la defensa *exógena*.

Los productos de origen vegetal, además de obtener un valor energético, aportan a la dieta una serie de micronutrientes tales como: minerales, fibras y vitaminas. El grupo de las vitaminas, presenta un papel esencial para el organismo participando de procesos catalíticos y regulación metabólica. Cabe señalar por su relevancia, la *vitamina C* (ácido ascórbico), la *vitamina E* ( $\alpha$ -tocoferol) y  $\beta$ -caroteno (provitamina A) (Lario et al., 1998; Arnao et al. 1998). Recientemente se está prestando especial atención a los *fenoles*.

### **3.3.2.1 Fuentes Naturales de Compuestos Antioxidantes**

La importancia de una dieta rica en alimentos fuentes de antioxidantes está ampliamente descrita en la literatura. Varios estudios epidemiológicos demuestran que el aumento del consumo de frutas y verduras reducen el riesgo de sufrir de enfermedades crónicas, como ciertos tipos de cáncer y arteriosclerosis (Arnao, et al, 1998; Flagg et al., 1995; Cao et al, 1996).

Según Parr y Bolwell (2000), la atención inicial en este campo de la ciencia comenzó con la investigación de las propiedades antioxidantes de las vitaminas C y E y los carotenoides. En los últimos años, la capacidad antioxidante de compuestos como los flavonoides ha atraído la atención de los investigadores, así como se ha visto incrementado el interés por los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados como potentes antioxidantes dietéticos.

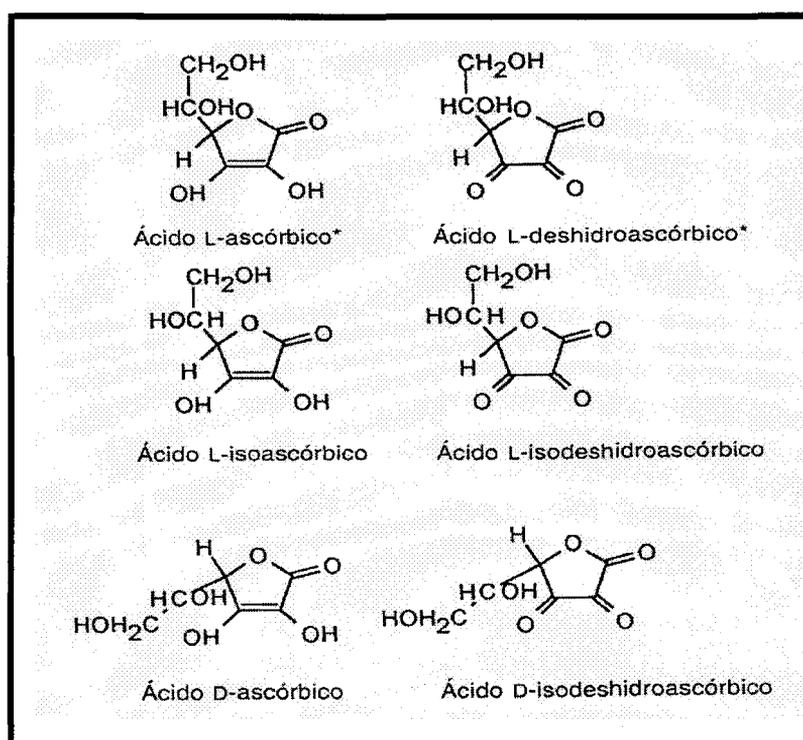
Las sustancias antioxidantes encontradas en los alimentos se clasifican en antioxidantes nutrientes (*vitamina C, vitamina E, carotenoides y selenio*) y antioxidantes no nutrientes como los *compuestos fenólicos* (Diplock et al., 1998).

#### a) Vitamina C

Considerada como uno de los más importantes antioxidantes naturales. Es un compuesto soluble en agua y se encuentra en altas concentraciones en los fluidos corporales en condiciones fisiológicas normales. Se absorbe

fácilmente en el intestino delgado, más precisamente en el duodeno por transporte activo y difusión pasiva. En el plasma, la vitamina C se encuentra en su forma reducida (dehidroascórbico) y es transportada al interior de las células por los transportadores de glucosa y por transportadores específicos (Jacob, Skala, Omaye, 1987).

El ácido L-ascórbico (AA), estructuralmente es una vitamina simple a fin a los carbohidratos, es un anillo de lactona de 6 carbonos con un enlace 2,3-enodiol. Posee propiedades ácidas y reductoras debidas al resto 2,3-enodiol. Es un compuesto muy polar y, por lo tanto, es muy soluble en disoluciones acuosas e insoluble en disolventes apolares. El carácter ácido del AA se debe a la ionización del grupo hidroxilo en el C-3. Una segunda ionización, la disociación del hidroxilo en el carbono C-2, es mucho menos favorable. La pérdida de dos electrones y la disociación del hidrógeno convierten el ácido L-ascórbico en el ácido dehidroascórbico (DHAA) (Davey et al., 2000; Gregory, 2000) (Figura 2).



\* Estructuras que poseen actividad vitamina C.

Figura 2. Estructura de los ácidos L-ascórbico y L-deshidroascórbico y sus formas isoméricas.

El DHAA exhibe aproximadamente la misma actividad que el AA porque se reduce casi totalmente a AA en el organismo. La concentración de DHAA en los alimentos es, casi siempre, sustancialmente más baja que la de AA y depende de las velocidades de oxidación y de la hidrólisis del DHAA a ácido 2,3-dicetoglucónico. En ciertos tejidos animales existe actividad dehidroascorbato reductasa y ascorbato radical libre reductasa. Se cree que estas enzimas protegen a la vitamina mediante reciclado, contribuyendo a que existan bajas concentraciones de DHAA (Davey et al., 2000; Gregory, 2000).

Los ácidos L-isoascórbico (isómero óptico en la posición C-5) y D-ascórbico (isómero óptico en la posición C-4) (Figura \_\_), se comportan químicamente de la misma manera que el AA pero estos compuestos carecen de actividad vitamina C. El ácido L-isoascórbico y el AA poseen actividad reductora y antioxidante, pero el ácido isoascórbico (o el D-ascórbico) no tiene valor nutritivo. En la naturaleza se presenta casi exclusivamente la forma reducida de ácido L-ascórbico, es decir, AA (Gregory, 2000).

El ácido ascórbico es muy inestable, es decir, es muy sensible a la oxidación. Su degradación química implica, en primer lugar, la oxidación a DHAA, seguida de la hidrólisis del mismo a ácido 2,3-dicetoglucónico y su posterior oxidación, deshidratación y polimerización para formar una vasta serie de otros productos nutritivamente inactivos. Esto puede ocurrir en dos procesos de transferencia de un electrón o como una reacción única de dos electrones sin detección del intermediario semihidroascorbato, conocido también como monohidroascorbato o radical libre ascorbato. En las oxidaciones de un electrón, el primer paso implica la transferencia de un electrón formándose el radical libre semidehidroascórbico. La pérdida de un electrón adicional rinde ácido dehidroascórbico, el cual es muy inestable debido a la sensibilidad a la hidrólisis del puente de la lactona. Dicha hidrólisis, que irreversiblemente forma ácido 2,3-dicetoglucónico (Figura 3), es responsable de la pérdida de la actividad vitamina C (Davey et al., 2000; Gregory, 2000).

Otra forma de oxidación del AA es cuando la reacción está catalizada por iones metálicos, como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . Asimismo el calor y la luz aceleran el proceso. En tanto que factores como el pH, la concentración de oxígeno y la actividad del agua como disolvente para los reactantes y catalizadores, influyen en la velocidad de la reacción. Como la hidrólisis del DHAA se produce muy fácilmente, la oxidación del DHAA constituye un aspecto esencial y frecuentemente limitante de la velocidad de degradación oxidativa de la vitamina C (*Davey et al., 2000; Gregory, 2000*).

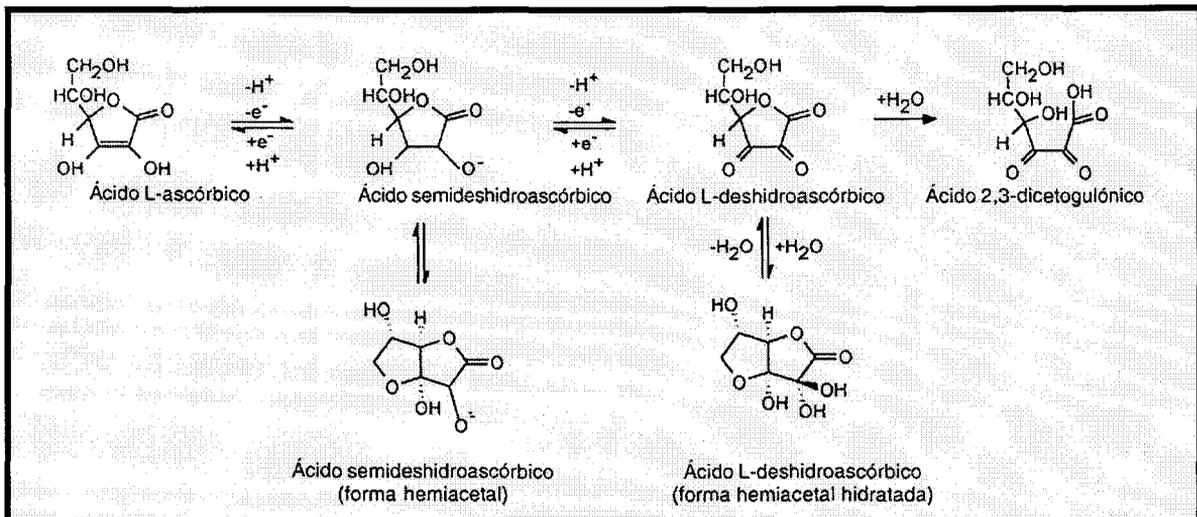


Figura 3. Oxidaciones secuenciales de un electrón del ácido L-ascórbico. Todos los compuestos poseen actividad vitamina C, excepto el ácido 2,3-dicetoglucónico.

El grado de absorción del AA en la mucosa intestinal desciende a la vez que aumenta su ingestión. Dosis de 1 a 1,5 gramos resultan en aproximadamente 50% de absorción, sin embargo en la ingesta de más de 12 gramos apenas 16% de la vitamina es absorbida. Las mejores condiciones para la absorción de esta vitamina es la ingesta de hasta 1 gramo en varias dosis individuales a lo largo del día (*Jacob, 1999*).

El pool de vitamina C que el ser humano posee en condiciones normales es de aproximadamente 1500 a 3000 mg. Cuando este pool se satura, la vitamina C se elimina en un alto porcentaje por orina, bajo la forma de ácido

oxálico (catabolito) o si se ingiere en dosis muy elevadas, como ácido ascórbico. Si hay deficiencias, la absorción es muy alta y no hay eliminación por orina. El ácido ascórbico se encuentra en altas concentraciones en varios tejidos, como por ejemplo, el tejido suprarrenal, hígado, bazo y riñones (*Levine et al, 1999; Jacob et al. 1987*).

Las funciones de la vitamina C están basadas en sus propiedades de oxidación-reducción actuando como cofactor enzimático en al menos 8 reacciones enzimáticas. Tres de ellas están implicadas en las hidroxilaciones de la lisina/prolina, dos en la biosíntesis de la carnitina, dos en las síntesis de hormonas y una en el metabolismo de la tirosina. De todas estas, la mejor estudiada es la hidroxilación de la prolina para formar la hidroxiprolina necesaria para la síntesis de colágeno, la proteína mas importante en los tejidos de sostén (cartílagos, matriz ósea, ligamentos, piel, tendones, etc). Participa también en la síntesis de dos de las hormonas producidas por las glándulas suprarrenales y aumenta la resistencia a la infección mediante una serie de efectos cuyos mecanismos no están del todo dilucidados: aumento de la actividad inmunológica de los linfocitos, aumento la producción de interferon y aumento de la integridad de las membranas mucosas (*Carr y Frei, 1999*).

La suplementación con ácido ascórbico y tocoferol pueden reducir sustancialmente el daño oxidativo. Los efectos son mayores en no fumadores que en fumadores.

*Griffiths y Lunec* (2001) investigan el papel del AA en la regulación de genes responsables en la reparación del daño oxidativo del DNA y sugieren que el AA estimula la síntesis de reparación de enzimas diseñadas para eliminar selectivamente importantes lesiones mutagénicas. Además, el DHAA es un mecanismo importante para la acumulación intracelular del AA reducido; así durante el reciclaje del AA con la consecuente generación intracelular de ROS, puede haber un efecto transitorio pro-oxidante, capaz de cambiar la expresión del gen.

Como antioxidante, el ascorbato presenta una gran eficiencia para secuestrar los radicales de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $ROO^{\bullet}$  y especies reactivas de nitrógeno. De acuerdo con *Frei (1991)*, el ácido ascórbico es un reactivo eficiente para reducir oxidantes en fase acuosa antes de que éstos puedan atacar y causar daño oxidativo a lípidos. Aunque la vitamina C es un valioso captador de los radicales libres, por sí misma es susceptible de ser destruida por la radiación ultravioleta. El mecanismo no antioxidante del ácido ascórbico se basa en su capacidad de donar átomos de hidrógeno a radicales lipídicos, de atrapar oxígeno singulete y de eliminar oxígeno molecular. Así mismo es capaz de atrapar radicales acuosos y de regenerar  $\alpha$ -tocoferol a partir de radicales tocoferoxilo (*Lee et al., 2004*).

El ácido ascórbico es un excelente donador de electrones debido a su bajo potencial de reducción (284 mV) la capacidad de producir un ácido relativamente estable (ácido semidehidroascórbico) y la fácil conversión del DHAA en AA (*Runsey et al., 1999*).

Sin embargo, como agente reductor, el ácido ascórbico tiene la habilidad de reducir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$  y de este modo incrementan la actividad pro-oxidante de estos metales generando  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\bullet}$ . Así, este nutriente puede ejercer ambas funciones: como antioxidante y pro-oxidante. En general, a bajas concentraciones y con altas tensiones de oxígeno esta molécula tendría a ser un pro-oxidante y a altas concentraciones tiende a ser un antioxidante (*Buettner Y Jurkiewicz, 1996*). También se ha demostrado que el ácido ascórbico puede retrasar la peroxidación lipídica, proporcionando una larga protección por inhibición de la modificación oxidativa de las LDL (*Gershoff, 1993*).

#### b) Carotenoides

Forman un grupo de pigmentos de estructura terpenoide. Es la mayor clase de pigmentos naturales de color naranja, amarillo y rojo y están ampliamente distribuidos en frutas, verduras, especias y hierbas.

Químicamente son terpenoides y se consideran biosintéticamente derivados del ácido mevalónico, intermediario metabólico que aporta la unidad básica estructural. Son colorantes naturales formados por las plantas a partir de 8 unidades de isopreno, de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula. Como resultado de ello, los dos grupos metilo centrales de la cadena de polieno están separados por seis átomos de carbono, mientras que el resto lo están por cinco. Parece que a partir del licopeno todos los demás carotenoides se pueden considerar formalmente derivados, ya sea por hidroxilación, ciclación u oxidación, o bien por combinación de estas reacciones (Mínguez Mosquera, 1993).

Se dividen en dos grupos mayoritarios (Mínguez Mosquera, 1993; Thane y Reddy, 1997):

- Carotenos o hidrocarotenoides → que contienen estrictamente hidrocarburos. La estructura del licopeno, que es el caroteno más sencillo, la molécula es sintetizada a partir de dos unidades de diterpenoides unidas “cabeza con cabeza”. Los otros carotenos se forman por ciclación de los extremos de la cabeza.
- Xantofilas o oxicarotenoides → que presentan oxígeno en su composición y se forman inicialmente por hidroxilación de carotenos. La mayoría de los tejidos de las plantas contienen trazas de precursores monohidroxílicos como criptoxanteno, y de xantofilas dihidroxílicas como zeaxanteno o luteína. La formación de los epóxidos son conducidas por posteriores reacciones de oxidación, como violaxanteno, y de acetonas como el capsanteno.

Los carotenoides comprenden una familia de compuestos naturales, de los cuales más de 600 variantes estructurales han sido identificados y caracterizados a partir de bacterias, algas, hongos y plantas superiores. Los mamíferos no están bioquímicamente capacitados para la biosíntesis de carotenoides, pero pueden acumular y convertir precursores que obtengan de la dieta, como ejemplo la conversión del  $\beta$ -caroteno en vitamina A. En el

plasma humano predomina el  $\beta$ -caroteno y el licopeno. Los carotenoides más comunes encontrados en los alimentos vegetales son el  $\beta$ -caroteno (zanahoria; *Daucus carota*), licopeno (tomate; *Lycopersicum esculentum*), varias xantofilas (zeaxantina, luteína y otras estructuras oxigenadas como del maíz, *Zea mays*; del mango, *Mango indica*; del papaya, *Carica papaya* y de la yema del huevo) y la bixina (aditivo culinario y colorante dérmico usado por indígenas amazónicos, obtenido del urucum, *Bixa orellana*). Otras fuentes naturales de uso culinario son la capsaxantina y capsorubina (páprica, *Capsicum annuum*) y la crocina (azafrán, *Crocus sativus*), excepcionalmente soluble en agua y uno de los raros glicósidos diterpenicos ( $C_{20}$ ) encontrados en plantas. La Figura 4 representa la fórmula química de los carotenoides citados (Fraser y Bramley, 2003).

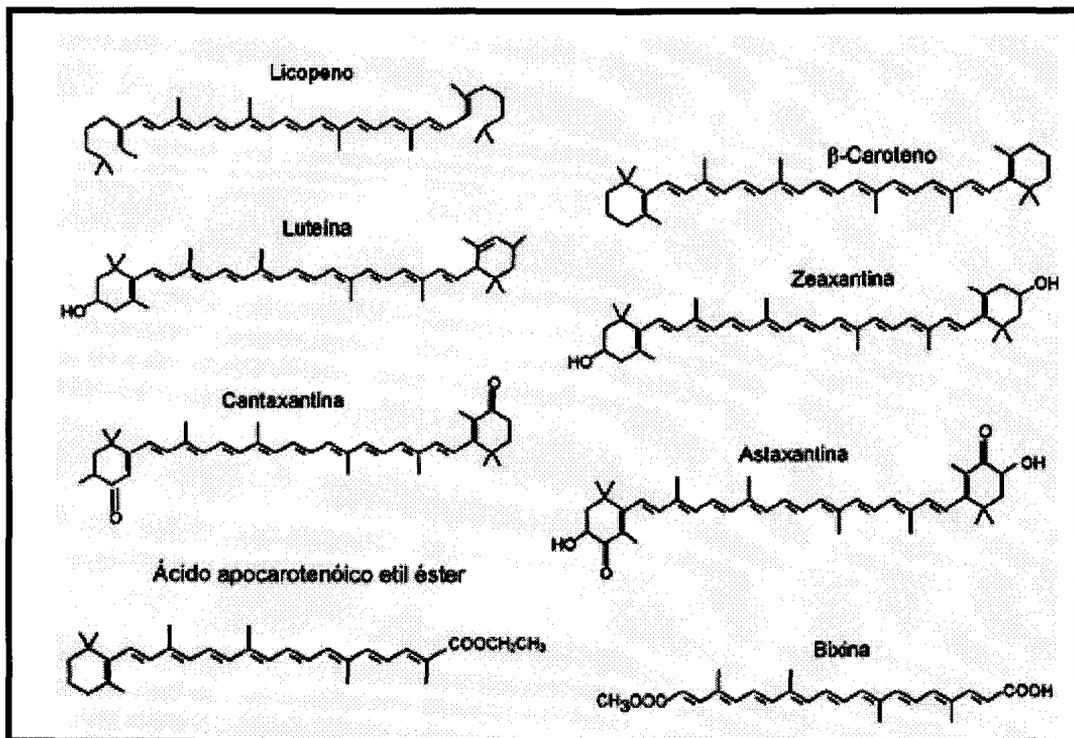


Figura 4. Estructura química de algunos carotenoides.

Los carotenoides ingeridos en la dieta son en parte absorbidos tal cual y depositados en diversos tejidos, como el adiposo y plasma y en células como eritrocitos y leucocitos, así como en la mácula donde se ha encontrado luteína

y zeaxantina El plasma es, entre los tejidos estudiados, el que mayor concentración de carotenoides presenta, estando estos siempre asociados a lipoproteínas de baja densidad. Los que más comúnmente se encuentran en estos tejidos son  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno, zeaxanteno, luteína, cantaxanteno y  $\beta$ -criptoxanteno. La falta de otros pigmentos abundantes y extendidos en la naturaleza, como violaxanteno, neoxanteno y otros epoxicarotenoides, parece ser debida a una pobre absorción de estos en el tracto intestinal o, más probablemente en las transformaciones sufridas en el tracto intestinal o ácido estomacal. De esta manera podemos decir que algunos de los carotenoides encontrados en el plasma son las formas más estables producidas o inalteradas tras metabolismo de una digestión (Mínguez Mosquera, 1993).

La biodisponibilidad de los carotenoides hace referencia a la fracción de un alimento ingerido que llegue a estar disponible para el cuerpo para la utilización en funciones fisiológicas o para el almacenaje. Hay por lo menos 9 factores que influyen en esta biodisponibilidad: la especie del carotenoide, el acoplamiento molecular, la cantidad consumida en una comida, la matriz en la cual se incorpora el carotenoide, los efectos de la absorción y de la bioconversión, el estado nutricional del anfitrión, factores genéticos, factores relacionados con las interacciones. Puesto que los carotenoides son solubles en lípidos se absorben mejor en el intestino por medio de una dieta grasa, aunque la cantidad de grasa requerida es baja, del orden de 3-5 g por comida. El mecanismo de la absorción puede implicar la incorporación de micelas mezcladas. La ingesta de productos vegetales que contienen carotenos es baja (14% para una mezcla de vegetales) comparado con el  $\beta$ -caroteno purificado agregado a una matriz simple. Los isómeros *cis* de carotenoides parecen ser más biodisponibles que las formas *todo-trans*, quizás porque son más solubles en micelas ácidas de la bilis y se incorporan preferentemente en los quilomicrones. Se ha sugerido que los carotenoides individuales antagonizan la absorción de otros, ejemplo: el cantaxanteno inhibe la absorción del licopeno y es probable que el transporte por las células intestinales sea un proceso facilitado (Fraser y Bramley, 2003; Handelman, 2001).

La propiedad antioxidante de los carotenoides ha sido atribuida a su estructura, un extenso sistema de dobles enlaces conjugados (*Stahl y Sies, 1993*), y deriva de su carácter hidrofóbico con tendencia a atrapar radicales de oxígeno rompiendo sus cadenas (*Kitts, 1997*). Medidas realizadas vía foto-emisión indican que la capacidad de atrapar el oxígeno singlete por parte de los carotenos y xantofilas es máxima para el licopeno, alta para la astaxantina o cantaxantina, intermedia para  $\beta$ -caroteno o bixina y aún menor para luteína y crocina (*Fraser y Bramley, 2003*).

El potencial antioxidante de los carotenoides se ha relacionado con la prevención de enfermedades que se inician con la formación de radicales, incluyendo aterosclerosis, cataratas, degeneración macular debido a la edad y esclerosis múltiple (*Lee et al., 2003*).

Los carotenoides son los captadores de oxígeno singlete más eficaces que poseen los sistemas biológicos. Un mol de  $\beta$ -caroteno puede neutralizar entre 250-1000 moléculas de oxígeno singlete (*Foot, 1976*). La velocidad de captación de oxígeno singlete por los carotenoides depende del número de enlaces dobles conjugados y del tipo y número de grupos funcionales en el anillo (*Beutner et al., 2000*). Para que actúen como efectivos neutralizadores de oxígeno singlete, se requieren al menos 7 enlaces conjugados. La capacidad de atrapar radicales libres, en general, no se basa en su capacidad para donar hidrógeno, sino más bien, en la capacidad de donar electrones, convirtiéndose en el caso concreto del  $\beta$ -caroteno, en radical catión  $\beta$ -caroteno (*Liebler, 1993; Mortensen et al., 2001; Lee et al, 2003*).



El  $\beta$ -caroteno en presencia de altas concentraciones de oxígeno puede actuar como prooxidante. La actividad antioxidante del  $\beta$ -caroteno aumenta a concentraciones bajas de oxígeno (*Lee et al., 2004*).

### c) Compuestos Fenólicos

Constituyen un grupo muy amplio de estructuras ubicuas en el reino vegetal, más de 8000 que se caracterizan por presentar el núcleo aromático de benceno sustituido, como mínimo, con una función hidroxilo (Figura 5). Estos compuestos son en su mayoría, potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento normal de las células vegetales. Se hallan preferentemente en las capas más superficiales de frutas, vegetales frescos, cacao, granos de cereales y otras semillas, así como en algunas bebidas tipo té y vino (Robards *et al.*; 1999). El consumo frecuente de estos alimentos se asocia con una menor incidencia de ciertas enfermedades como: algunos tipos de cáncer y cardiopatías. Además, han demostrado ser inhibidores de la agregación plaquetaria, antimicrobianos, inmunoestimuladores y reguladores de la presión arterial (Abram y Donko, 1999; Ito *et al.*, 1998).

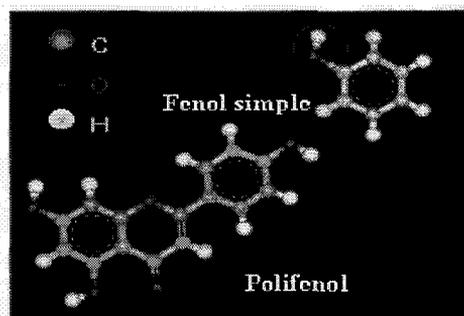


Figura 5: Esquema de la estructura de un fenol simple y un polifenol.

Los fenoles son metabolitos secundarios de las plantas y se sintetizan en su mayoría por la ruta del ácido siquímico, que depende de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, a través de la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido siquímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales. Con la acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se forma el ácido cinámico que luego se transforma en cumárico y sus derivaciones. La PAL, también actúa sobre la tirosina para formar directamente ácido p-cumárico. Todos los mayores grupos de fenoles vegetales son derivados del metabolismo de fenilpropanoides simple C6-C3,

con excepción del ácido gálico que puede ser generado directamente por el ácido siquímico (Figura 6) (Parr y Bolwell, 2000).

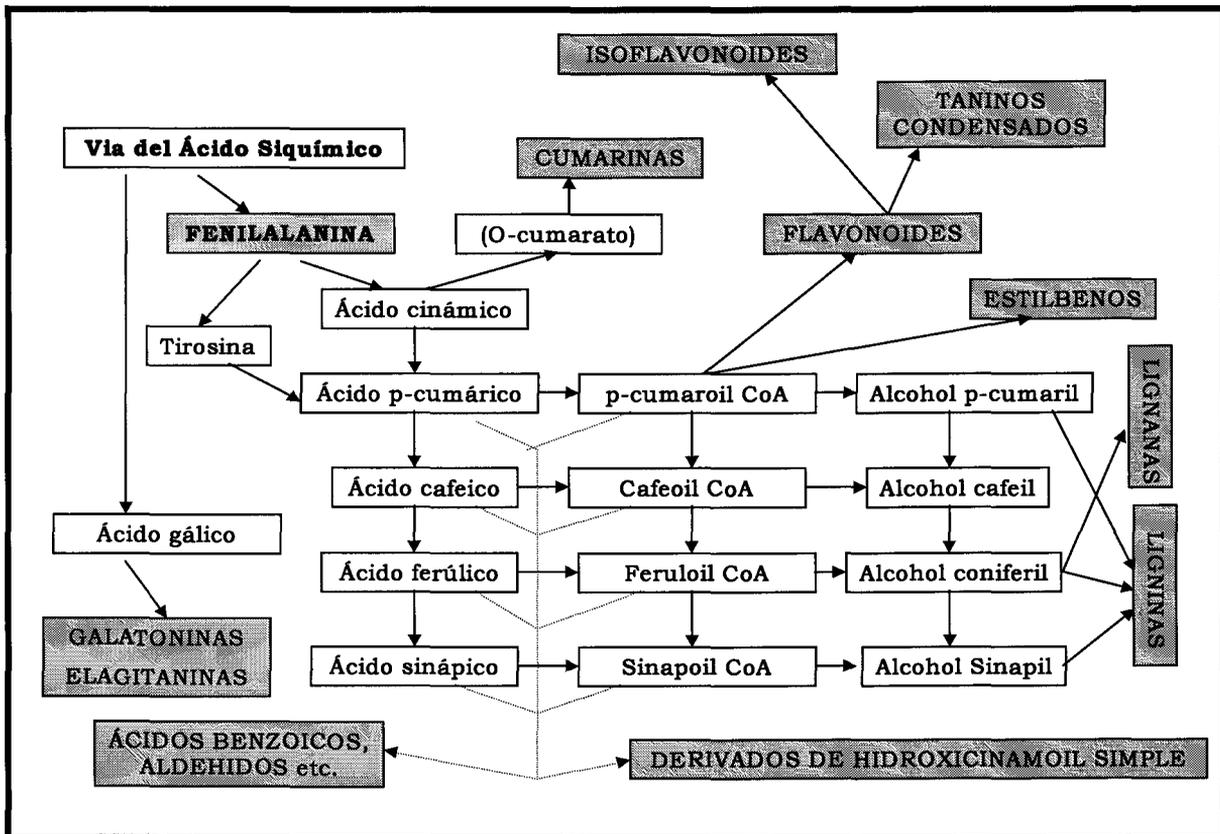


Figura 6: Ilustración esquemática de la origen de varios fenoles a través de fenilpropanoides simple.

Palazón et al. (2003), comentan que la acción del PAL es fundamental para la vida de las plantas y por ello está estrictamente modulada. Entre otros factores, esta enzima es activada por la luz, y depende además de la concentración de diferentes hormonas vegetales. También se refieren a las situaciones de estrés a que son sometidas las plantas como la falta de agua, infecciones fúngicas o bacterianas y radiaciones UV que aumentan la actividad de la enzima PAL. Otro factor que la activa es el frío, y por ello, las plantas sometidas a bajas temperaturas suelen presentar coloraciones rojizas en tallos y hojas. También es conocido que al florecer las plantas en primaveras que siguen a inviernos muy fríos, las flores desarrollan colores muy intensos.

Los polifenoles que encontramos en la naturaleza van desde moléculas simples como los ácidos fenólicos a compuestos de elevado peso molecular como los taninos.

Los ácidos fenólicos (Figura 7) forman un grupo diverso que incluyen los derivados del ácido benzoico (hidroxibenzoicos) y ácido cinámico (hidroxicinámicos). Del ácido benzoico, derivan los ácidos gálico, vainílico y siríngico, compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en la naturaleza en forma libre o combinada. Del ácido cinámico, se forman los ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico, generalmente están presentes en diversas formas conjugadas, siendo más frecuentes como ésteres que como glucósidos. El ácido clorogénico, es el representante más significativo de este grupo en los alimentos vegetales, es un éster del ácido cafeico con el ácido quínico, el cual es un sustrato clave para el pardeamiento enzimático de algunas frutas. (Palazón *et al.*, 2003; Parr y Bolwell, 2000; Aruoma *et al.*, 1993).

Los flavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Figuras 8 y 9) presentan estructura tercíclica (difeníl-propano) y normalmente existen enlazados a moléculas de azúcar, el grupo más numeroso. Están presentes en frutas, verduras y bebidas tales como: té, vino y cerveza. Son eficientes antioxidantes capaces de atrapar especies radicales como O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, peroxilo e hidroxilo (Rice-Evans *et al.*, 1995). Se han descrito más de 5000 flavonoides diferentes, los cuales se clasifican en varias familias, que incluyen: flavanoles (catequina, epicatequina), flavonoles (miricetina, kaempferol, quercetina y su glucósido rutina), flavanonas (naringenina, taxifolina), flavonas (apigenina, hesperidina), isoflavonas (genisteína) y antocianidinas (cianidina, malvidina), siendo la quercetina el flavonoide más ubicuo (3, 5, 7, 3', 4' - pentahidroxi flavona). La propiedad antioxidante de estos compuestos ha sido comprobada en varios estudios *in vivo* e *in vitro* (Diplock *et al.*, 1998).

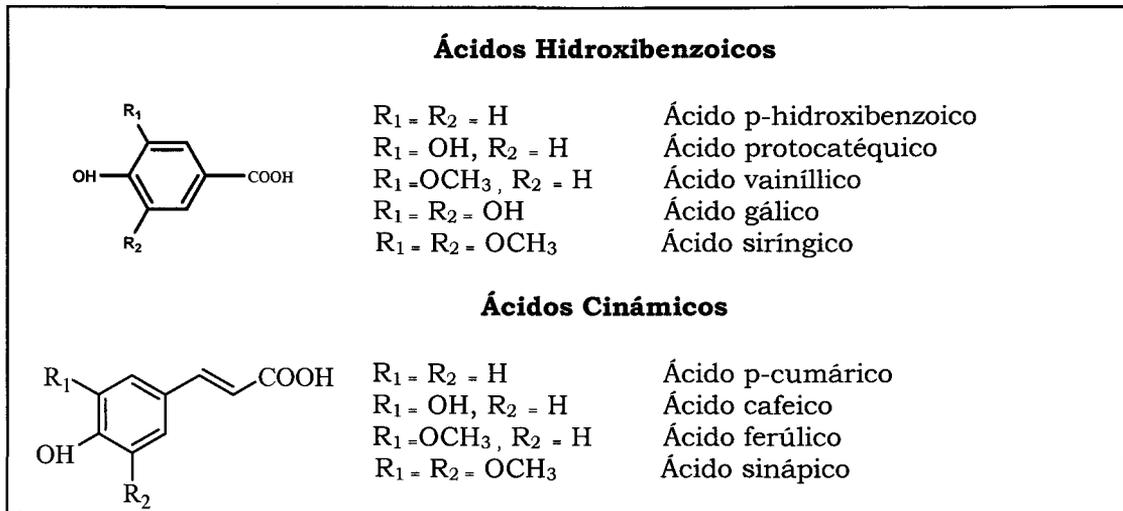


Figura 7. Estructura química de ácidos fenólicos

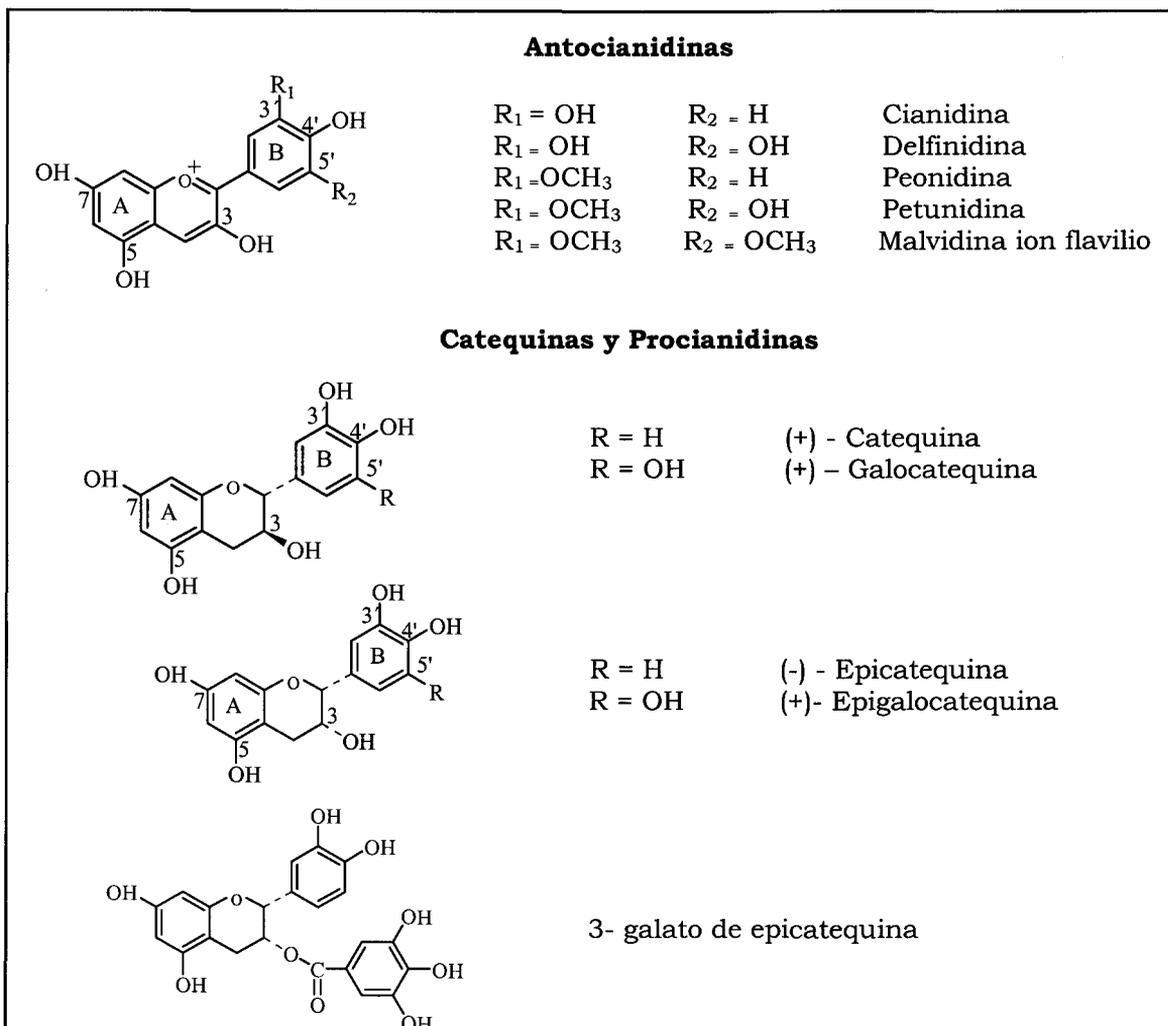


Figura 8. Estructura química de flavonoides (antocianidinas, catequinas y procianidinas)

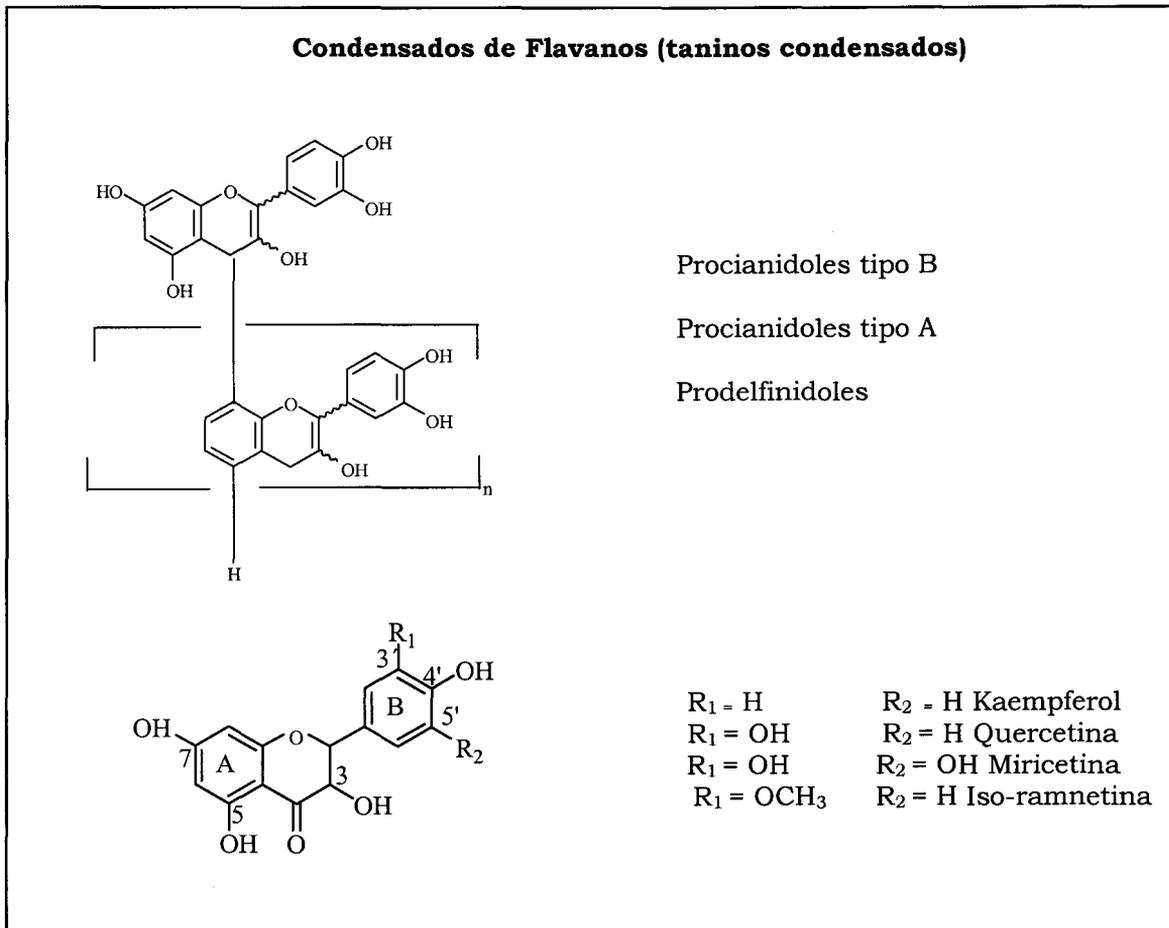


Figura 9. Estructura química de flavonoides (taninos condensados)

Los antocianos, pigmentos de color azul, rojo y violeta presentes en frutos, flores, tallos, hojas y raíces, son colorantes naturales con actividad antioxidante. Son glicosidos de antocianidina (ej. pelargonidina, malvidina, cianidina). Constituyen una alternativa altamente deseable como colorantes en alimentos. (Wrolstad, 2000; Moyer et al., 2002). Su diversidad natural contribuye favorablemente a la existencia de unos 300 tipos de antocianos diferentes conforme describe Hendry y Houghton (1996).

Las frutas aportan a la dieta cantidades apreciables de fenoles. En las cítricas, el ácido cinámico constituye una mayor parte del contenido ácido fenólico pero no se suele encontrar en la forma de ácido libre, siendo el ácido ferúlico el mayoritario, seguido de cumárico, sinápico y cafeico (Rapisarda et

*al.*, 1998). En las frutas en forma de baya, las antocianinas están presentes como el principal constituyente, responsables del color característico de varias de estas frutas; se encuentran en menores proporciones los ácidos cinámicos (p-cumárico, cafeico y ferúlico) (Lopez-Serrano y Barcelo, 1996). En las cerezas, la composición fenólica se diferencia por la característica dulce o argria de la fruta. Ambas variedades contienen ácido clorogénico siendo la (-) epicatequina el flavanol dominante. En las cerezas dulces el 3-p-cumaroilquinico es mayoritario, mientras la procianidina B2 ha sido dominante en las cerezas agrias (Shahzad y Bitsch, 1996).

La presencia de polifenoles en los alimentos de origen vegetal está muy influida por factores genéticos y ambientales. Otros factores como germinación, grado de madurez, variedad, procesado, almacenamiento también influyen en el contenido en compuestos fenólicos.

Los mecanismos antioxidantes de compuestos polifenolicos se basan en la capacidad de donación del hidrógeno y en atrapar iones metálicos (Bravo, 1998). Al donar un átomo de hidrógeno, los compuestos fenólicos se convierten en radicales de resonancia estables, que no participan en otras reacciones radicales. Sin embargo, estos compuestos actúan como prooxidantes bajo ciertas condiciones, como: altas concentraciones de compuestos fenólicos o iones metálicos, y altos pH. las altas estructuras químicas también afectan las actividades antioxidantes.

Los flavonoides son los más potentes antioxidantes. Poseen el grupo o-difenólico, un enlace doble 2-3 conjugado con la función 4-oxo, y los grupos del hidroxilo en las posiciones 3 y 5. Su capacidad antioxidante está influida por la hidroxilación y la presencia del azúcar (Bravo, 1998). Los flavonoides son captadores eficaces del radical del hidroxilo y del radical del peroxilo. Pueden hacer complejos con los metales e inhibir la iniciación de la oxidación lipídica (Hendrich *et al.*, 1999).

La eficacia de los polifenoles como antioxidantes *in vivo* dependerá de su grado de absorción y metabolización.

### 3.4 MÉTODOS DE MEDIDAS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Numerosos métodos tanto *in vitro* como *in vivo*, se han propuesto para evaluar la actividad antioxidante de los alimentos o las muestras biológicas (Tsao y Deng 2004). La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero sí el efecto antioxidante. Los métodos disponibles muestran extrema diversidad y no hay una clara distinción entre las diferentes etapas del proceso (Antolovich *et al.*, 2002).

Otro aspecto que es necesario considerar es el objetivo de la medida. Podemos así, tener en cuenta dos amplias categorías: la actividad en alimentos o la bioactividad en humanos. En los sistemas alimentarios, se trata de valorar la eficiencia de los antioxidantes para proteger los productos frente a la oxidación, en general relacionando con un deterioro del alimento como es el caso de grasas y aceites o la pérdida del valor vitamínico. Así, la medida de la actividad antioxidante en alimentos, particularmente frutas, vegetales y bebidas, nos indica su potencial como protectores frente a la oxidación. En el caso de la bioactividad, se trata de poner de manifiesto cómo los antioxidantes previenen la oxidación de estructuras biológicas (Antolovich *et al.*, 2002).

En estudios de la actividad antioxidante, la fuente de ROS y del substrato diana deben siempre ser considerados. Un antioxidante puede proteger a lípidos contra el estrés oxidativo mientras que puede acelerar el daño de otras moléculas biológicas. Así, cuando se analiza la capacidad antioxidante de una muestra o un patrón, se debe considerar el objetivo del estudio y plantear una serie de cuestiones que sirven como guía en la evaluación de la eficacia antioxidante. No existe un sistema perfecto capaz de medir la actividad antioxidante real de una muestra dada.

Sin embargo, el conocimiento del potencial antioxidante en alimentos, no indica necesariamente su capacidad antioxidante *in vivo*. Los efectos de cooperación que existen entre diferentes antioxidantes (sinergismo), significan que el efecto del conjunto de antioxidantes es mayor que la suma de la

actividad de un antioxidante individual. Por esta razón, los métodos de cuantificación son también conocidos como Actividad Antioxidante Total, que es un parámetro que cuantifica la capacidad de una muestra (tanto de un producto natural o artificial) para atrapar radicales libres en un medio determinado. Tales métodos consideran la actividad antioxidante como una característica global del producto en cuestión independientemente de su composición particular.

En general, los métodos para determinar la actividad antioxidante total se basan en la inhibición de ciertas reacciones por la presencia de antioxidantes. Los más usados son aquellos que generan radicales en medios específicos y son fácilmente detectados por técnicas fotométricas. Usando estas técnicas es posible definir dos estrategias para estudiar la actividad antioxidante total de un compuesto o muestra biológica (*Arnao et al., 1998*):

- 1) Ensayo de decoloración o pérdida de señal. La reacción se basa en la producción de radicales libres suficientemente estables que, en presencia de un antioxidante o mezcla de antioxidantes, la pérdida de la señal (pérdida del radical) puede ser usada como un indicador de la actividad antioxidante total. La cuantificación se hace por medio de un curva de calibrado que relaciona la pérdida de señal frente la concentración del antioxidante en cuestión.
- 2) Ensayo de inhibición, en que el curso de la reacción es estimado por la ausencia o presencia de diferentes cantidades de antioxidante. El reactivo y la muestra antioxidante se mezclan al principio de la reacción. La presencia del antioxidante afecta a la reacción por dos caminos: a) inhibición de la señal por unidad del tiempo; b) indicación del curso de la reacción.

Así, los métodos clasificase de acuerdo con las estrategias de detección y cuantificación usadas. Los métodos más comúnmente utilizados para determinar la Actividad Antioxidante Total son aquellos que usan radicales coloreados.

El método ABTS, es uno de los más utilizados. Se conoce también como método TEAC (TROLOX Equivalente Antioxidant Capacity). Se basa en la generación del radical catiónico (ABTS<sup>•+</sup>) a partir de su precursor, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) generado por acción de un sistema enzimático formado por una peroxidasa y su sustrato de oxidación, preróxido de hidrógeno y permite la evaluación de la actividad antioxidante de compuestos puros y muestras derivadas de material vegetal. El radical también se puede regenerar utilizando metamioglobina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o persulfato. Los resultados se expresan como equivalentes de TROLOX (*Rice-Evans, 1994*).

Otro método que utiliza radical coloreado es el DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) disuelto en solución metanólica. Se evalúa la actividad antioxidante total de una muestra o un patrón por la disminución de la absorbancia del radical a 515nm, que es proporcional a los compuestos antioxidantes que contiene la muestra o patrón en cuestión (*Larrauri et al., 1999*).

En el método DMPD (N,N-dimethyl-p-fenilediamina dihidroclorida) se prepara un radical catiónico coloreado (DMPD) en presencia de una solución oxidante, como por ejemplo, el cloruro férrico. Todos los métodos descritos utilizan la estrategia 1 y tiene como resultado la valoración del comportamiento antioxidante.

Otro método ampliamente utilizado es el ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno), que actúa de acuerdo con la estrategia 2 y se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de una muestra o patrón para atrapar radicales de oxígeno (peroxilo). La fluorescencia de la proteína β-ficoeritrina sufre un descenso a causa del daño provocado por especies reactivas, su conformación e integridad química es medida fluorimétricamente en función del tiempo. Este método fue desarrollado por *Prior y Cao (2000)*.

El análisis de ORAC utiliza la proteína  $\beta$ -ficoeritrina como un sustrato y el AAPH como generador de radicales peroxilo. Es un método que cuantifica mediante la medida del área bajo la curva (AUC), y así, combina el porcentaje de inhibición y la longitud del tiempo de acción del radical libre por los antioxidantes de una muestra. El análisis de ORAC ha proporcionado información valiosa con respecto a la capacidad antioxidante de varias muestras biológicas de compuestos puros tales como melatonina, dopamina y flavonoides, a las matrices complejas tales como té, frutas, verduras y los tejidos animales.

Otros métodos muy utilizados en la evaluación de la actividad antioxidante de alimentos y bebidas, así como de medidas biológicas han sido los siguientes:

- Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), basado en la medida del poder reductor de la muestra (Benzie y Shain, 1996).
- Método del  $\beta$ -caroteno – ácido linoleico ( $\beta$ -CLAMS), basado en la decoloración del  $\beta$ -caroteno por los peróxidos generados durante la oxidación del ácido linoleico (Muller, 1971; Tapc, 1984).
- Método ácido tiobarbitúrico (TBARS), basado en que durante la peroxidación lipídica se forman compuestos de descomposición de aldehído (hexano, melondialdehído y 4-hidroxinone). El ensayo consiste en la detección espectrofotométrica de un producto estable entre aldehídos y el ácido tiobarbitúrico en la fase acuosa (Buege, 1978).

## 4.1 MATERIAL

### 4.1.1 Muestras

Se adquirieron 6 saquitos de 100g de **Pulpa de Acerola** comercial congelada (1 lote de 3 saquitos en 2002 y otro lote en 2004), 1L de **Zumo Comercial** (envasado “tetra pak”) y 500 mL de **Zumo Concentrado** (envasado en vidrio) en el comercio local de Itajaí (Estado de Santa Catarina - Brasil) durante los años 2002-2004. Las muestras se transportaron a la Universidad de Sevilla (España) en cajas adecuadas y se mantuvieron en temperatura apropiada hasta su análisis.

Los **Frutos de Acerola**, también procedentes de la región sur de Brasil (Estado de Santa Catarina), se recolectaron en diferentes puntos de la misma planta y en dos distintos meses de cosecha (marzo y abril de 2002, enero de 2004). Para garantizar la homogeneidad de las muestras, los frutos de cada mes se mezclaron y separaron en dos lotes: uno para el procesado en licuadora y otro para el estrujado en prensa. Los diferentes lotes se congelaron y transportaron adecuadamente hasta su análisis. Los códigos asignados a las diferentes muestras aparecen en la Tabla 1.

*Tabla 1: Codificación de las muestras de acerola.*

Muestra	Código
Saquitos de Pulpa (Lote 1 - 2002)	P1, P2, P3
Saquitos de Pulpa (Lote 2 - 2004)	P4, P5, P6
Fruto del mes de Marzo Licuado (año 2002)	ML
Fruto del mes de Marzo Estrujado (año 2002)	ME
Fruto del mes de Abril Licuado (año 2002)	AL
Fruto del mes de Abril Estrujado (año 2002)	AE
Fruto del mes de Enero Licuado (año 2004)	EL
Fruto del mes de Enero Estrujado (año 2004)	EE
Zumo Comercial (año 2004)	ZL
Zumo Concentrado (año 2004)	ZC

Para someter el zumo de acerola al tratamiento por altas presiones se seleccionaron frutos maduros del mes de enero de 2004 y se conservaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta el procesamiento de la fruta licuada para posterior análisis.

#### 4.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados para la realización de los métodos aparecen en la Tabla 2:

*Tabla 2: Relación de los reactivos utilizados en los métodos*

Método	Reactivo	Proveedor	Referencia
Folin-Ciocalteu	Ácido gálico	Fluka	48630
	Carbonato sódico anhidro p.a.	Merck	1.06392.0500
	Reactivo Folin-Ciocalteu	Merck	1.09001.0500
Vitamina C	Ácido dehidroascórbico	Sigma	D-8132
	Ácido L(+)-Ascórbico	Merck	1.00127.0100
	Ácido metafosfórico	Merck	1.00546.0100
	Ácido sulfúrico 98%	Merck	1.00748.0500
	Ácido ortofosfórico 85%	Panreac	131032
	Sal disódica del ácido etilendiaminotetracético, EDTA	Sigma	E-4884
	$\alpha$ -ditiotreitól (DTT)	Sigma	D-0632
	Di-potasio hidrógeno fosfato	Probus	145110
ABTS	Sal diamónica del Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) - ABTS	Sigma	A-1888
	Peroxidasa tipo IV-A	Sigma	P-6782
	Peróxido de hidrógeno 30% p/p	Sigma	H-1009
	Glicina p.a.	Merck	1.04201.0100
	Ácido clorhídrico 32%	Merck	1.00319.1000
DPPH	1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	Sigma	D-9132
	Metanol p.a.	Merck	1.06009.2500
DMPD	N,N-dimetil-p-fenilenediamina dihidroclorida (DMPD)	Sigma	D-0401
	Acetato sodio anhidro	Merck	1.06268.0250
	Sodio hidróxido 0,1N	Panreac	181694
	Cloruro férrico	Sigma	F-7134

	$\beta$ -ficoeritrina	Sigma	P-1286
ORAC	2,2'-Azobis(2-amidino-propane) dihidrochlorido (AAPH)	Wako Chemicals	017-11062
	Sódio di-hidrogeno fosfato	Panreac	131965
	Di-potasio hidrogeno fosfato	Probus	145110
	Etanol	Panreac	141085
	Metanol p.a.	Merck	1.06009.2500
Extracción en Fase Sólida (SPE)	Acetonitrilo grado HPLC	Merck	1.14291.2500
	Acetato de etilo p.a.	Panreac	131318
	Hidróxido sódico en lentejas p.a.	Merck	1.06498
	Ácido clorhídrico 32%	Merck	1.00319.1000
Patrones de Antioxidantes de Referencia	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX)	Aldrich	23881-3
	Ácido L(+)-Ascórbico	Merck	1.00127.0100
Determinación de Antocianos	Cloruro potasio		
	Acetato sodio anhidro	Merck	1.06268.0250
Determinación de Carotenoides	Acetona	Merck	1.00014.1000
	Éter etílico	Merck	1.00921.1000
	Sodio Cloruro	Panreac	131659
	Sulfato sodio anhidro	Merck	1.59337.0050
	Potasio hidróxido en lentejas	Panreac	121515
	Metanol p.a.	Merck	1.06009.2500
	Bicarbonato sodio	Merck	1.06395.0050
	Éter de petróleo ligero 40-60°C	Merck	1.59542.0500
	Dietilamina	Merck	1.59623.0050
	Silicigel	Merck	1.59530.0170
Benceno	Merck	1.01783.1000	

#### 4.1.3 Instrumentación

Las medidas espectrofotométricas, para los métodos Folin-Ciocalteu, ABTS, DPPH, DMPD y determinación de antocianos, se realizaron en un Espectrofotómetro Hitachi.

Para realización de las medidas de fluorescencia, se utilizó un Espectrofotómetro de Fluorescencia F-2500 Hitachi con cubetas de cuarzo de 10mm de paso de luz obtenidas de Hellma.

En la extracción en fase sólida (SPE) se utilizó una bomba de vacío tipo B-169 de BÜCHI® conectada a un dispositivo de fraccionamiento Supelco Visiprep™. En el fraccionamiento de las muestras se utilizaron cartuchos C<sub>18</sub> Sep-Pack® plus (Waters™) para extracción en fase sólida. Las distintas fracciones recogidas se evaporaron hasta el volumen deseado en un rotavapor BÜCHI R200®, controlando la temperatura mediante un baño de agua termostatzado BÜCHI B490®.

La Vitamina C y el Perfil Fenólico de las muestras se analizaron y cuantificaron en un equipo cromatográfico Waters™ formado por inyector manual Rheodyne 7725, una bomba cuaternaria Waters™ 600E System Controller, un detector de haz de fotodiodos; horno Waters™ Steel Column Heater Module, ordenador Compaq Deskpro con software Millennium 2.0. El bucle de inyección es de 50µL y la columna es Merck LichroCart® 100RP-18 de fase reversa, tamaño de partícula 5µ, 250x4mm (Ref. 1.16056.0001), precolumna LichroCart® 4-4 (Ref. 1.50957.0001).

Para la extracción de pigmentos carotenoides de las muestras, se utilizó un homogeneizador Ultra-Turrax modelo T-25. La concentración de los pigmentos purificados de los patrones carotenoides se ha determinado en un espectrofotómetro Hewlett-Packard UV modelo 8452A. Los extractos de las muestras y de los patrones, se evaporaron hasta sequedad en un rotavapor Büchi modelo R110.

En la separación e identificación de los carotenoides se utilizó un equipo cromatográfico Hewlett-Packard 1100 formado por inyector automático, bomba cuaternaria, detector haz de fotodiodos, ordenador HP Vectra XA con software HP ChemStation Rev. A.0603. La columna utilizada es Waters Spherisorb ODS2 de fase reversa, tamaño de partícula 5µ, 250x4,6mm, precolumna de 100x4mm empaquetada con el mismo material.

El tratamiento a alta presión de zumo de acerola se realizó en un equipo isostático discontinuo S-Food-Lab 850-9-W (Stansted Fluid Power Ltd., Stansted UK) con capacidad de alcanzar 900 Mpa y un cilindro de presión de 36.5 mm de diámetro y 240 mm de altura.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Medida de la Actividad Antioxidante

#### 4.2.1.1 ABTS

##### a) *Fundamento*

El método se fundamenta en la capacidad que presentan los antioxidantes para atrapar radicales libres presentes en el medio. El radical coloreado formado se genera a partir de su precursor, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS). Este es un compuesto estable, muy soluble en agua y con un máximo de absorción a 340 nm. Por acción de un sistema enzimático formado por una peroxidasa y su sustrato de oxidación (el peróxido de hidrógeno), se forma el radical catiónico, ABTS<sup>•+</sup>, que resulta ser estable 12 horas a temperatura ambiente. Se trata de un compuesto de color verde-azulado y tiene un espectro característico de absorción con 3 picos máximos de absorbancia a 414, 752 y 842nm en medio acuoso y 414, 730 y 873nm en medio etanólico (Arnao, 2000).

A este radical formado se añade el antioxidante patrón o de la muestra y posteriormente se mide el descenso de absorbancia producido. Se está evaluando la actividad antioxidante en función de la capacidad para disminuir la concentración del radical.

##### b) *Reactivos*

Para obtener 60mL de radical ABTS<sup>•+</sup> a una concentración de 30 $\mu$ M, se utilizan:

Disolución de ABTS: se pesan 0,0504g de sal amónica cristalizada del ABTS y se disuelven en 20mL de agua desionizada. De esta disolución, se toma 0,500mL y se lleva hasta 100mL en un matraz aforado, se mide la

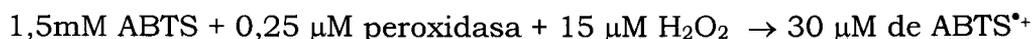
absorbancia a 340nm frente a un blanco de agua desionizada a temperatura ambiente. La concentración se verifica a partir del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{340} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El volumen calculado se refiere a  $9 \cdot 10^{-5}$  moles y se lleva al medio de reacción.

Enzima Peroxidasa: se toma una cantidad cualquiera y se disuelve en 4mL de agua desionizada. La absorbancia se mide a una longitud de 403 nm y la concentración requerida se calcula utilizando:  $\epsilon_{403} = 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . El volumen necesario calculado (para  $1,5 \cdot 10^{-8}\text{M}$ ) se añade al medio de reacción para la formación del radical.

Peróxido de Hidrógeno: para la obtención de una concentración final de  $1,5277 \cdot 10^{-3}\text{g/mL}$ , se toma 1mL de peróxido de hidrógeno comercial (30% p/p,  $\delta = 1,10\text{Kg/L}$ ) y se diluye sucesivamente con agua desionizada. De esta dilución, se toman  $20\mu\text{L}$  y se llevan al medio de reacción.

Tampón Glicina: se prepara pesando 1,875g de glicina que se disuelven en aproximadamente 450mL de agua desionizada. El pH se ajusta a 4,5 con una disolución de HCl 0,1N (a partir de HCl comercial al 32%). Posteriormente, la glicina tamponada se enrasa hasta 500mL en un matraz aforado con agua desionizada. El pH final se ajusta con HCl. De este tampón se toma el volumen necesario para completar los 60 mL del medio de reacción.

La generación del radical se puede resumir como:



### *c) Procedimiento para la Medida de la Actividad Antioxidante*

Preparación del Radical: para la generación del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  es necesario mezclar los reactivos en la siguiente orden: Tampón  $\rightarrow$  ABTS  $\rightarrow$  Enzima  $\rightarrow$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La comprobación del radical se hace tomando 2mL y midiendo la absorbancia a los 2 minutos de comenzada la reacción, el valor debe estar entre 0,8 y 1,2nm. El blanco utilizado es el tampón glicina-HCl.

Curva de Calibrado Absorbancia – Concentración del Radical: con el objetivo de verificar la linealidad entre la concentración del radical y la absorbancia medida a 414nm, se ha determinado diariamente y por duplicado las concentraciones de 30 $\mu$ M, 24 $\mu$ M, 18 $\mu$ M, 12 $\mu$ M y 3 $\mu$ M del radical. En la Figura 10 se representa la absorbancia del radical ABTS<sup>•+</sup> frente a su concentración expresada en mg/mL.

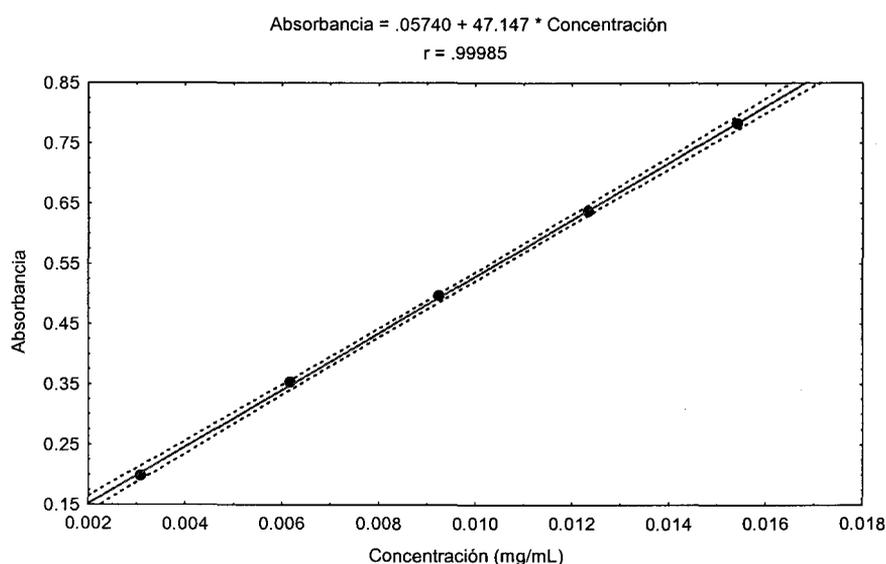


Figura 10: Curva de calibrado Absorbancia – Concentración de ABTS<sup>•+</sup>

Determinación de la Actividad Antioxidante de la Muestra: las muestras de pulpa y zumo de acerola se han diluido convenientemente para que la medida de absorbancia quedara dentro del intervalo de linealidad. Las medidas se realizaron en medio acuoso y metanólico. Se toman 2mL de disolución del radical, se mide su absorbancia inicial a 414nm y se añaden 100 $\mu$ l de la muestra diluida. Las medidas por triplicado, se realizan a los 2, 3, 4, 5, 6, 10 y 15 minutos después de comenzada la reacción. El porcentaje de

inhibición del radical se ha calculado a los 2 y a los 15 minutos para cada concentración estudiada, de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = (1 - A_{2\text{minutos}} / A_{\text{inicial}}) * 100$$

$$\% \text{ inhibición} = (1 - A_{15\text{minutos}} / A_{\text{inicial}}) * 100$$

Las medidas de absorbancia se realizaron a diferentes tiempos porque, de esta manera, es posible que existan compuestos en la muestra de reacción rápida y otros que requieran un periodo de tiempo mayor para completar la reacción de modo que no serían evaluados si la medida se realiza a los 2 minutos, como propone el método original (Cano *et al.*, 1998; van den Berg *et al.*, 1999).

#### **4.2.1.2 DPPH**

##### *a) Fundamento*

El método se basa en la medida de la capacidad de captura de radicales libres por los antioxidantes de las muestras ensayadas. El radical catiónico que se utiliza es el 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) en solución metanólica, que presenta un espectro de absorción característico, con un pico máximo a 515nm. Cuando la muestra se añade a la solución que contiene el radical se produce una disminución de la absorbancia que es proporcional a la concentración de compuestos antioxidantes que contiene la muestra. Así, se realiza una medida continua de la absorbancia hasta que ésta alcanza valores prácticamente constantes, lo que indica que la reacción ha llegado a su punto de equilibrio (Larrauri *et al.*, 1999; Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

El método presenta la ventaja de que el DPPH<sup>+</sup> se comercializa como radical en su forma estable, solo es necesario disolverlo en metanol.

b) *Reactivos*

Disolución del Radical: Para obtener una concentración de 0,1mM de radical, se pesan 0,0125g de DPPH<sup>•+</sup> y se disuelven en 500mL de metanol. El radical preparado es estable durante 12h a temperatura ambiente y protegido de la luz.

c) *Procedimiento para la medida de la actividad antioxidante*

Curva de Calibrado Absorbancia – Concentración de radical: Para comprobar la relación lineal que existe entre la absorbancia medida a 515nm y la concentración de radical, se realizaron curvas de calibrado. Se toman volúmenes del radical recién preparado para obtener concentraciones de 63, 51, 38, 25 y 13μM y se lee su absorbancia a la longitud de onda de 515nm. En la Figura 11 se representa la absorbancia del radical DPPH<sup>•+</sup> frente a su concentración expresado en mg/mL. La curva se realiza diariamente y por triplicado.

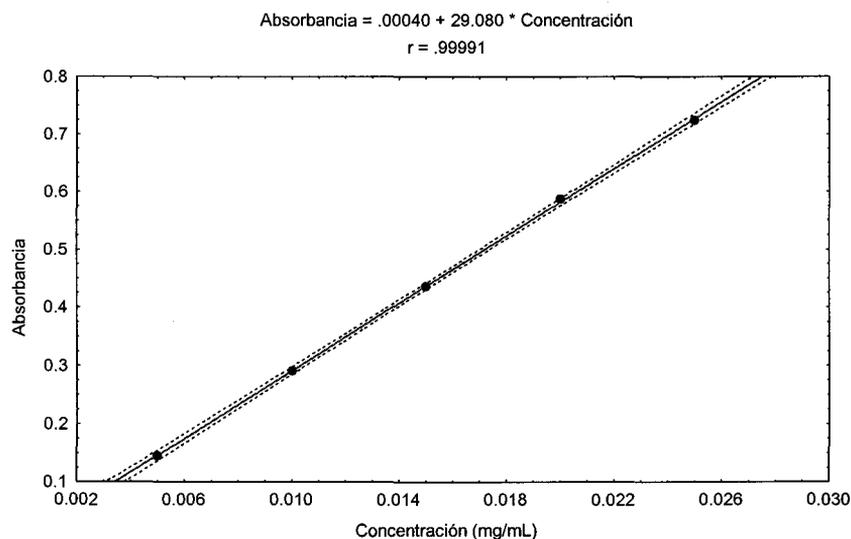


Figura 11: Curva de calibrado Absorbancia – Concentración de DPPH<sup>•+</sup>

Determinación de la Actividad Antioxidante de la Muestra: Para las muestras estudiadas (pulpa y zumo de Acerola) se han preparado distintas

diluciones para que la medida de absorbancia se sitúe en los valores de respuesta lineal. Se toman 3,9mL de disolución de radical y se lee la absorbancia ( $A_{inicial}$ ) a 515nm, se añaden 100 $\mu$ L de la muestra, se agita bien y se sigue la caída de la absorbancia hasta que esta alcance un valor constante. En este momento se considera que se ha alcanzado el equilibrio.

A partir de las medidas efectuadas por triplicado, se calcula el porcentaje de inhibición del radical en el punto de equilibrio para cada concentración, según la formula:

$$\% \text{ inhibición} = (1 - A_{\text{equilibrio}} / A_{\text{inicial}}) \times 100$$

La representación se lleva a cabo comparando este valor con las distintas concentraciones de muestra ensayada expresada en mg de muestra/mL de disolución.

#### 4.2.1.3 DMPD

##### a) Fundamento

Este método se fundamenta en la capacidad de donación de átomos de hidrógeno de compuestos antioxidantes para neutralizar radicales libres de una disolución. Para ello, se prepara una disolución de N,N-dimethyl-p-fenilenediamina dihidroclorida (DMPD). En presencia de una solución oxidante, en este caso cloruro férrico, se forma el radical catiónico coloreado DMPD<sup>•+</sup>. El espectro ultravioleta-visible del DMPD<sup>•+</sup> presenta un máximo de absorción a 505nm. Al añadir el antioxidante que se pretende evaluar el radical disminuye, la reacción se produce con rapidez (menos de 10 minutos) y el punto final, que es estable, se toma como una medida de la eficiencia antioxidante (Fogliano *et al.*, 1999). La formación del radical se puede resumir como sigue:



## *b) Reactivos*

Disolución del DMPD: Para preparar 100mM de DMPD, se pesan 209mg y se disuelven en 10mL de agua desionizada, se mezcla y se protege de la luz.

Preparación de Tampón Acetato: Para obtener 500mL del tampón a una concentración de 0,1M y pH 5,25, se pesan 3,1354g de acetato sodio anhidro y se disuelven en agua desionizada, se añade 697 $\mu$ L de ácido acético y se enrasa a 500mL en un matraz aforado. El pH 5,25 se ajusta con NaOH.

Preparación de Cloruro Férrico: Se pesan 811mg de cloruro férrico anhidro y se disuelven en 100mL de agua desionizada, se obtiene una concentración de 0,05M.

## *c) Procedimiento para la Medida de la Actividad Antioxidante*

Preparación del Radical: se toma 1mL de disolución DMPD 100mM y se añade a 100mL de tampón acetato, pH 5,25. El radical catiónico coloreado DMPD<sup>•+</sup> se obtiene añadiendo 0,2mL de la solución de 0,05M de cloruro férrico (concentración final 0.1mM). Su preparación debe de ser diaria y es estable, protegido de la luz, hasta 12 horas.

Para comprobar el radical, se toman 2mL de la disolución formada y se mide su absorbancia a 505nm, la densidad óptica debe estar entre  $0.900 \pm 0.100$  unidades de absorbancia.

Curva de Calibrado Absorbancia – Concentración del Radical: se preparan diariamente diluciones de 1, 0,8, 0,6, 0,4 y 0,2mM del radical y se mide por triplicado a una longitud de onda de 505nm, así se comprueba la linealidad del radical entre su concentración y absorbancia (Figura 12). La referencia es la disolución tampón.

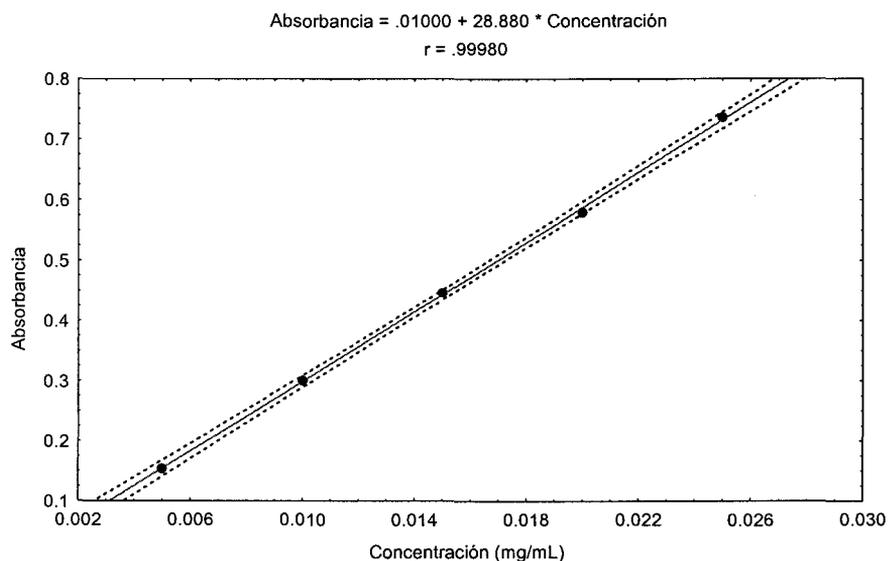


Figura 12: Curva de calibrado Absorbancia – Concentración de DMPD\*

Determinación de la Actividad Antioxidante de la Muestra: se preparan distintas diluciones para las muestras de pulpa y zumo de acerola. Se toman 2mL de disolución del radical y se lee la absorbancia ( $A_{inicial}$ ), se añaden 100  $\mu$ L de la muestra diluida y se mezclan durante 10 minutos, tras los cuales se lee la absorbancia a 505nm.

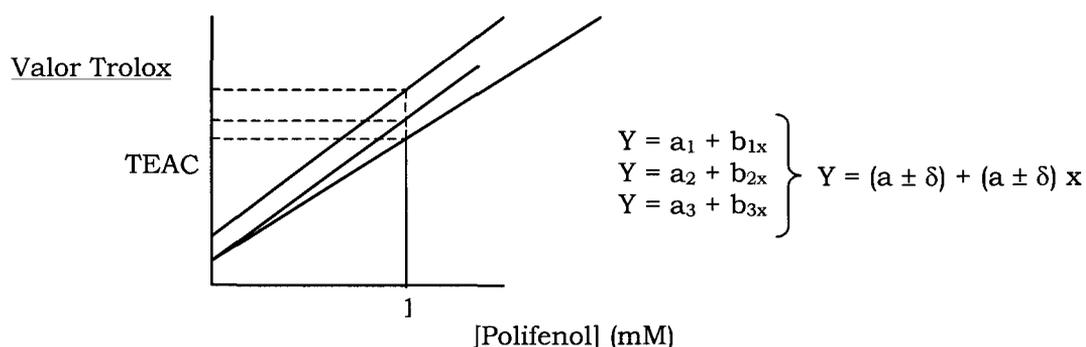
Todas las medidas se efectuarán por triplicado. Se ha calculado el porcentaje de inhibición del radical con la medida de absorbancia a los 10 minutos de comenzada la reacción para cada concentración, según la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = (1 - A_{10 \text{ minutos}} / A_{inicial}) \times 100$$

Se calcula el valor medio de los porcentajes de inhibición y se representan en una gráfica frente las distintas concentraciones de muestra ensayada expresada en mg de muestra/mL de disolución.

#### 4.2.1.4 Expresión de los Resultados: Valor TEAC

La actividad antioxidante se expresa en referencia al Trolox, un compuesto análogo a la Vitamina E y soluble en agua. El valor TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox) es la concentración de Trolox que presenta la misma actividad antioxidante que una concentración 1mM de la sustancia a ensayar (*van den Berg et al., 1999*).



El valor TEAC de una mezcla de compuestos, como ocurre en los alimentos, bebidas, extractos, representa la concentración de una disolución de Trolox que tiene la misma actividad que la mezcla de ensayo. Se calcula representando distintas concentraciones de Trolox frente a las correspondientes variaciones de absorbancia del radical del método ensayado (*van den Berg et al., 1999*).

El valor TEAC se ha utilizado para expresar los resultados de los métodos ABTS, DMPD y DPPH. Se analiza un triplicado de cada concentración de Trolox (expresadas en mM) y se representa el valor medio de variación de absorbancia. Las medidas deben seguir los tiempos establecidos para cada método en cuestión.

##### a) Cálculo del Valor TEAC

Curva de Calibrado Absorbancia – Concentración del Trolox: para cada método (ABTS, DMPD y DPPH), se preparan diferentes concentraciones de Trolox, en agua o metanol y los ensayos se realizaran por triplicado de acuerdo

con la longitud de onda de cada método. El resultado comprueba la linealidad de la respuesta del Trolox (en mM) frente a su absorbancia. Se obtuvieron las rectas siguientes:

### **Método ABTS:**

#### Utilizando *agua* como diluyente:

$$A_{414} \text{ a los 2 minutos} = 0,02260 + 2,2745 [\text{Trolox mM}] \quad r = 0,9990$$

$$A_{414} \text{ a los 15 minutos} = 0,03295 + 2,1987 [\text{Trolox mM}] \quad r = 0,9984$$

#### Utilizando *metanol* como diluyente:

$$A_{414} \text{ a los 2 minutos} = 0,00122 + 2,4777 [\text{Trolox mM}] \quad r = 0,9908$$

$$A_{414} \text{ a los 15 minutos} = 0,00227 + 2,4700 [\text{Trolox mM}] \quad r = 0,9914$$

### **Método DMPD:**

#### Utilizando *agua* como diluyente:

$$A_{505} \text{ a los 10 minutos} = 0,03105 + 0,62263 [\text{Trolox mM}] \quad r = 0,9993$$

#### Utilizando *metanol* como diluyente:

$$A_{505} \text{ a los 10 minutos} = 0,04289 + 0,55492 [\text{Trolox mM}] \quad r = 0,9890$$

### **Método DPPH:**

#### Utilizando *agua* como diluyente:

$$A_{515} \text{ en equilibrio} = -0,0113 + 0,41270 [\text{Trolox mM}] \quad r = 0,9779$$

#### Utilizando *metanol* como diluyente:

$$A_{515} \text{ en equilibrio} = 0,02194 + 0,49587 [\text{Trolox mM}] \quad r = 0,9992$$

Para obtener la concentración de Trolox que presenta la misma actividad de una determinada concentración del compuesto patrón, se toma una dilución de la sustancia que presente valores de absorbancia dentro del intervalo de la recta de Trolox y este dato se interpola en ella.

Aplicación a las muestras: para calcular el valor TEAC de las muestras de pulpa y zumo de acerola, se mide por triplicado la variación de absorbancia que experimenta una dilución determinada de esta, en los tiempos de 2 y 15 minutos para el ABTS, a los 10 minutos para el DMPD y en el punto de equilibrio para el DPPH.

Estos datos se interpolan en la curva de calibrado del Trolox (variación de absorbancia frente la concentración de Trolox). Las muestras deben estar debidamente diluidas para que sus valores estén dentro del intervalo de respuesta de la curva de Trolox.

Para hallar el valor TEAC de cada disolución ensayada se multiplica la concentración de Trolox, calculada anteriormente, por el factor de dilución.

$$\text{TEAC}_{\text{solución}} = \text{Concentración de Trolox}_{\text{dilución}} \times \text{factor de dilución}$$

Se han ensayado diferentes diluciones de cada muestra, de modo que para cada una de ellas se ha obtenido el valor TEAC (mmol Trolox/kg de pulpa o mmol Trolox/L de zumo) y los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de las muestras ensayadas.

#### **4.2.1.5 ORAC**

##### *a) Fundamento*

El ensayo ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno) se fundamenta en la capacidad de compuestos antioxidantes en atrapar radicales de oxígeno. La fluorescencia de la proteína  $\beta$ -Ficoeritrina de *Porphiridium cruentum* sufre un descenso que afecta a su conformación e integridad química a causa del daño provocado por especies reactivas. Bajo condiciones apropiadas, el descenso de la emisión de fluorescencia de  $\beta$ -Ficoeritrina en presencia de una especie reactiva es un índice del daño oxidativo que sufre la proteína. En este método se emplea el AAPH (2,2'-Azobis-(2-amidino-propano)dihidrocloruro), especie reactiva que sufre descomposición térmica espontánea y genera radicales peroxilos con un rango determinado por la temperatura. La inhibición de especies reactivas por acción de un antioxidante se refleja en la protección del descenso de la fluorescencia

de  $\beta$ -ficoeritrina. Así, se mide la actividad antioxidante de estos compuestos frente a los radicales libres (Prior y Cao, 2000; Wang et al., 1996).

Según Prior y Cao (2000), para medir la inhibición de especies reactivas por adición de compuestos antioxidantes, se deben considerar dos parámetros: el tiempo que dura la inhibición del radical y el porcentaje de inhibición exhibido a diferentes tiempos.

#### *b) Reactivos*

Tampón fosfato (7,5mM - pH 7): se prepara una disolución de  $K_2HPO_4$  0,75M y otra de  $NaH_2PO_4$  0,75M, se mezclan en la proporción 61,6:38,9 (v/v) respectivamente y se diluye con agua desionizada (1:9 v/v). El pH de la solución final debe ser alrededor de 7.

Ficoeritrina: La solución madre se prepara disolviendo 1mg de ficoeritrina en 5,9mL de tampón fosfato. La disolución de trabajo se obtiene por dilución de la madre con tampón fosfato.

AAPH (160mM): se pesa 434mg de AAPH y se disuelve en 10mL de solución tampón.

TROLOX (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico): la solución madre se prepara disolviendo 5,0mg de TROLOX en 200mL de tampón fosfato, la solución de trabajo se obtiene mediante dilución con tampón fosfato (1:4 v/v).

#### *c) Procedimiento para la Medida del Valor ORAC*

El ensayo ORAC: se lleva a cabo en microcubetas fluorimétricas a una temperatura constante de 37°C. Para la realización del método, se toman los siguientes volúmenes de los reactivos: 150 $\mu$ L de muestra + 150 $\mu$ L de ficoeritrina (68mg/L) + 75 $\mu$ L de AAPH (160mM).

- ✓ El blanco está constituido por: 150µL de tampón fosfato.
- ✓ La solución estándar utilizada es: 150µL de TROLOX (20µM).

Inmediatamente se mide la fluorescencia con una  $\lambda$  de excitación de 540nm y de emisión de 565nm, cada 5 minutos durante 60 minutos o hasta que la medida descienda aproximadamente a 0 o a 5% del valor inicial.

Medida con la muestra: para las muestras de Pulpa (P1, P2, P3) se prepara una disolución de 0,3g/L, y para el Zumo de 0,5mL/L (ML, AL) y 0,25mL/L (ME, AE). Todas estas muestras se preparan en tampón fosfato (75mM pH 7) antes de la medida.

El área bajo la curva de emisión de fluorescencia se cuantifica mediante la información de intensidad de fluorescencia y tiempo. La medida de la capacidad antioxidante del compuesto estudiado se obtiene calculando la diferencia de área bajo la curva de descenso de fluorescencia a lo largo del tiempo entre el blanco y la muestra en cuestión. El valor ORAC se expresa usando equivalentes de TROLOX ( $\mu\text{M}$ ):

$$\text{Valor ORAC } (\mu\text{M}) = 20K (S_{\text{muestra}} - S_{\text{blanco}}) / (S_{\text{trolox}} - S_{\text{blanco}})$$

20 = concentración del TROLOX

K = factor de dilución de la muestra estudiada

S = área bajo la curva de descenso de fluorescencia para cada muestra (compuesto antioxidante, blanco o TROLOX).

El área se calcula de la siguiente forma:

$$S = (0,5 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + f_{15}/f_0 + \dots + f_{60}/f_0) \times 5$$

$f_0$  = fluorescencia inicial medida a tiempo 0.

$f_i$  = fluorescencia medida a tiempo i (minutos)

Las medidas se realizan por triplicado. Para el cálculo del valor medio de los resultados obtenidos, se aplicó un test de rechazo de datos, por el cual

un dato es rechazado si el cociente entre su diferencia con el valor central y la diferencia del central con el tercero es superior a 1,5, siendo  $x_1 > x_2 > x_3$ . Se rechaza  $x_1$  si  $x_1 - x_2 / x_2 - x_3 > 1,5$ . Se rechaza  $x_3$  si  $x_2 - x_3 / x_1 - x_2 > 1,5$ .

## 4.2.2 Determinación de la Composición Química

### 4.2.2.1 Determinación de Vitamina C por HPLC

#### a) Fundamento

El método consiste en la identificación y cuantificación de las dos formas biológicamente activas de vitamina C: ácido ascórbico (AA) y dehidroascórbico (DHAA). El AA se puede determinar gracias a su absorbancia a 245nm, sin embargo, el DHAA presenta una baja absorptividad molar en UV. Así, se ha propuesto la reducción hasta AA con  $\alpha$ -ditiotreitól (DTT) determinando pues, el AA total. Los resultados se expresan en mg/mL de ácido ascórbico (Sánchez-Mata et al, 2000; Kim, 1989).

#### b) Reactivos

Solución Extractora: Solución de ácido metafosfórico al 3% (p/v) conteniendo 1mM de EDTA.

Solución Reductora: Se prepara una solución de DTT al 0,2% (p/v) en tampón fosfato 0,2M a pH 7.

Otras Soluciones: Di-potasio hidrógeno fosfato al 45% en agua desionizada

Ácido ortofosfórico 2M

Tampón fosfato 0,2M – pH 7

c) *Tratamiento de las Muestras*

Se toman 1,25mL de pulpa o zumo previamente filtrados con Buchner y papel Watman número 1 y se llevan a 1L con la disolución extractora. Esta dilución se filtra con Millipore 0,22 $\mu$ m y se inyecta en el cromatógrafo con el fin de cuantificar el AA inicial.

Para determinación de AA total, se toma 1mL de la dilución anterior y se añade 0,2mL de solución reductora de DTT al 0,2%. A continuación, se añade 0,1mL de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 45%. Se deja 10 minutos en la oscuridad para que la reducción del DHAA sea completa y, seguidamente, se añade 0,2mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2M. Después de unos minutos se filtra y se inyecta en el cromatógrafo. El procedimiento descrito está esquematizado en la Figura 13.

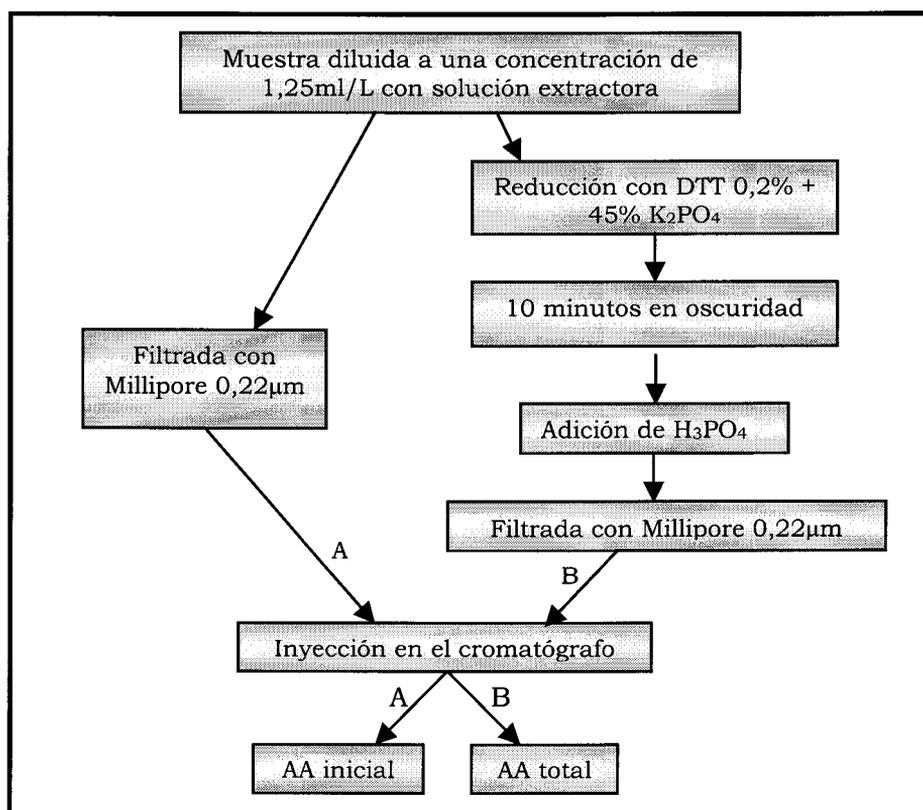


Figura 13: Esquema de la preparación de muestra para el análisis del AA inicial y AA total en pulpa y zumo de acerola.

Para la realización de la curva de calibrado se prepara una disolución madre del patrón disolviendo 25mg de AA en 100mL de la solución extractora. A partir de ésta, se preparan 6 disoluciones cuyas concentraciones son 1, 2, 5, 10, 20 y 40mg/L con la misma solución extractora. Se estudia la linealidad en este intervalo determinando la correlación entre las concentraciones de AA y las correspondientes áreas de pico. Una de las rectas de calibrado realizada fue:

$$\text{Área} = 41630.0 + 1858.10^5 \times \text{Concentración de AA} \quad (r = 0.99963)$$

Recuperación: La recuperación del AA y DHAA se llevan a cabo en una muestra de pulpa (P1) y dos de zumo (ME y AL). Para cada una de ellas, se evalúa la recuperación después de la adición de 0,05mL de una disolución de 5mg/100mL del patrón (AA o DHAA según el caso) a la muestra antes de la extracción. La determinación se realiza por triplicado.

De cada muestra en estudio se toman 9 alícuotas iguales, a 3 de ellas se añade una cantidad conocida de AA, a otras 3 una cantidad conocida de DHAA y a las 3 restantes no se añade nada. Estas últimas sirven para determinar la cantidad de AA inicial y total, en las adicionadas de AA se determina el AA inicial + AA añadido y en las muestras con adición de DHAA se determina el AA total (AA inicial + DHAA reducido) (Figura 14).

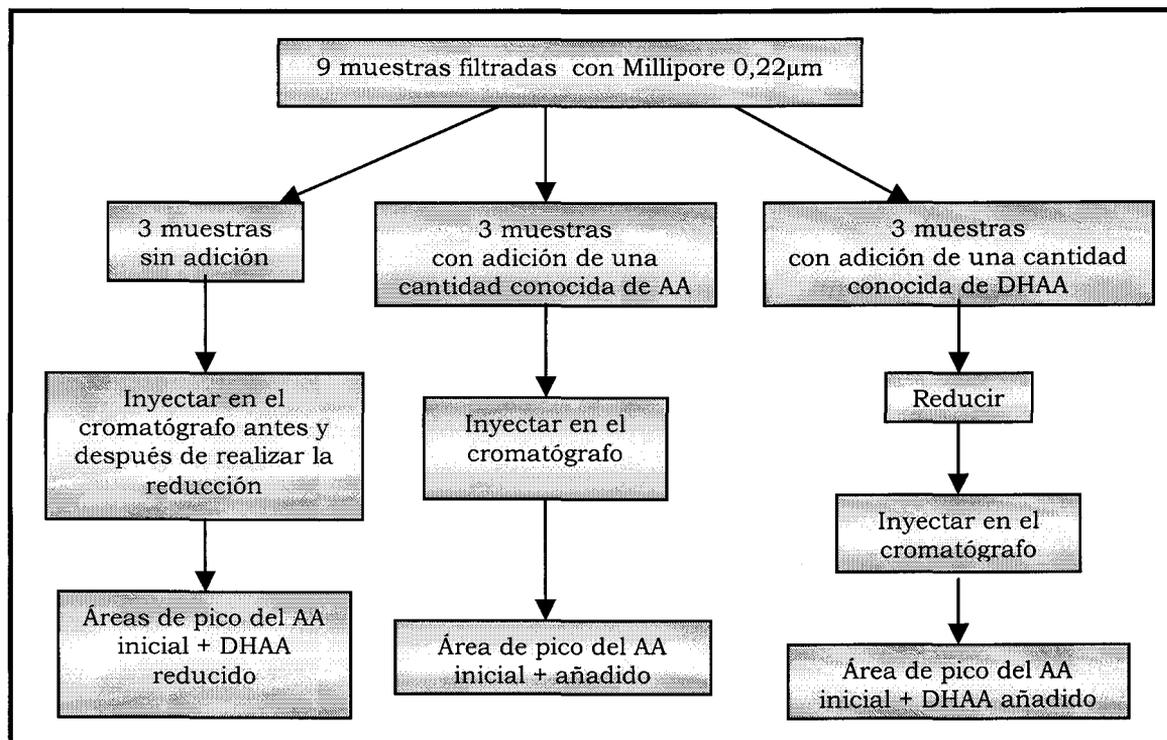


Figura 14: Esquema de reducción de muestras.

d) *Condiciones Cromatográficas:*

Fase móvil: se utilizó una fase móvil de 18mM de ácido sulfúrico en agua desionizada (pH 2.6) a una velocidad de flujo de 0,9mL/min.

Fase estacionaria: columna Merck LichroCart® 100RP-18 de fase reversa, tamaño de partícula 5 $\mu$ , 250x4 mm protegida con precolumna LichroCart® 4-4 a temperatura ambiente.

Detección: UV de 200 a 400nm. Se cuantifica en el máximo de absorción del AA (245nm). La inyección se realiza a bucle completo 50 $\mu$ L. Los análisis se obtienen por triplicado. La identificación se lleva a cabo comparando los espectros del patrón con el del pico a identificar. La cuantificación se realiza por calibrado externo mediante las áreas de los picos.

#### 4.2.2.2 Índice de Polifenoles Totales (IPT)

##### a) Fundamento

El método se fundamenta en el carácter reductor de los polifenoles. Emplea como reactivo una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico en medio básico que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdenio ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia del color azul desarrollado es máxima a 765nm. Tratando la muestra con el reactivo Folin-Ciocalteau en presencia de  $Na_2CO_3$ , la lectura de absorbancia a 765nm es proporcional a la concentración total de polifenoles y se expresa como índice de Folin-Ciocalteau (*Singleton y Rossi, 1965*).

##### b) Reactivos

Disolución Patrón: Se disuelven 0,500g de ácido gálico, desecado previamente en estufa a 100°C durante 2 horas y enfriado en desecador, en 100mL de agua.

Disolución de Carbonato Sódico a 20% (p/v): se disuelven 200g de carbonato sódico en un litro de agua en ebullición, se enfría a temperatura ambiente y se filtra a las 24 horas.

##### c) Procedimiento para la Medida del Índice de Polifenoles Totales

Curva de Calibrado: se toman volúmenes de 0, 1, 2, 3, 5 y 10mL de la disolución patrón de fenol que se vierten en otros tantos matraces aforados de 100mL y se diluyen con agua hasta enrase. La concentración de fenol de estas disoluciones es de 0, 50, 100, 150, 250 y 500mg/L, respectivamente. De cada una de estas disoluciones se toma 1mL y se vierte en el correspondiente matraz aforado de 100mL. Se añade a cada matraz 100mL de agua, aproximadamente. Se agita, se añaden 5mL de reactivo de Folin-Ciocalteau y se mezcla bien. Después de 30 segundos y antes de 8 minutos, se añaden 15mL de disolución de carbonato sódico al 20%. Se agita bien y se diluye con

agua hasta enrase. Se deja reposar la disolución durante 2 horas a 24°C y se determina la absorbancia a 765nm. Se representa la absorbancia frente a la concentración (Figura 15).

Muestras de acerola: Se toman 50g de pulpa de acerola y se llevan a 1L de agua o metanol. Se agita con ultrasonido durante 5 minutos. Posteriormente se filtra con Buchner y papel Whatman número 1. En el caso del zumo, se prepara una dilución de 40mL/L en agua o metanol, que se agita con ultrasonido y se filtra. Se toma 1mL cada una de estas diluciones para realizar la determinación de Folin Ciocalteu. Los resultados se expresan como ácido gálico en mg/L o mg/kg de fruta fresca.

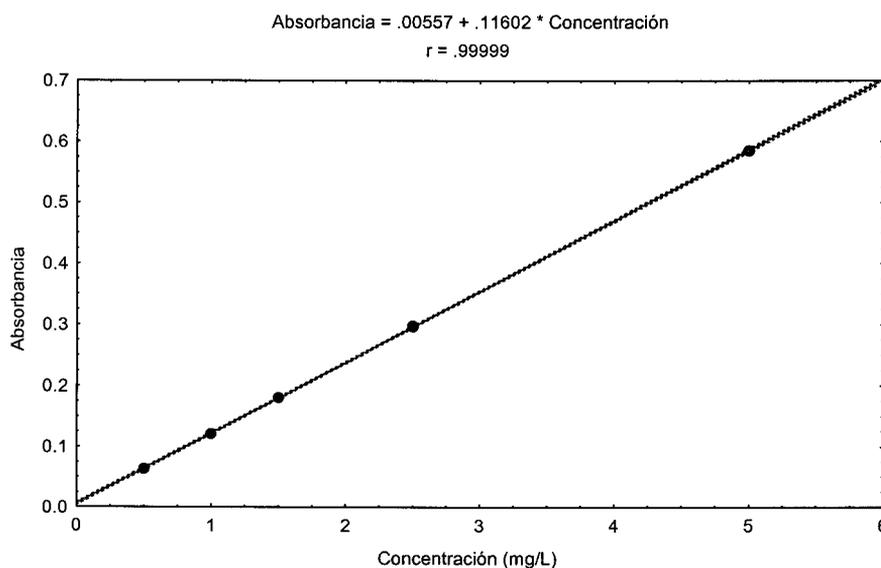


Figura 15: Curva de calibrado de polifenoles totales

### 4.2.2.3 Determinación de Antocianos Totales

#### a) Fundamento

El fundamento del método consiste en la determinación espectrofotométrica del contenido de antocianos totales por diferencia de pH, en que se aplica dos sistemas de disoluciones tampón (pH 1 y 4,5) a las muestras midiéndose la absorbancia a 510 y 700nm en ambos medios (*Giusti y Wrolstad, 2001*).

#### b) Tratamiento de las Muestras

Las muestras de pulpa se centrifugaron (10 minutos, 4000rpm) y se filtraron en papel Watmann nº1, las restantes (zumo preparado en el laboratorio) solamente se filtraron en dicho filtro.

Se ha utilizado acetonitrilo con 4% de ácido acético para la extracción de los antocianos totales en todas las muestras.

#### c) Reactivos

- Cloruro potasio pH 0,1 (0,025M)
- Acetato sodio pH 4,5 (0,4M)

#### d) Procedimiento de Medida de los Antocianos Totales

Se diluye cada muestra diez veces en tampones de cloruro de potasio (pH 0,1 – 0,025M) y en acetato sódico (pH 4,5 – 0,4M), posteriormente se efectúa la medida de la absorbancia a 510 y 700nm y se calcula a partir de:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}0,1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$$

La concentración de pigmentos monoméricos en las muestras de acerola se ha expresado en cianidina-3-glucósido por la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianos monoméricos (mg/100g)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{(\epsilon \times l)}$$

Donde:

A = Absorbancia

PM = Peso Molecular (449,2)

FD = Factor de Dilución

$\epsilon$  = Absortividade Molar (26900)

La concentración final de antocianos se expresa en mg/100g o mg/100mL de cianidina 3-glucósido para la pulpa y el zumo, respectivamente.

#### **4.2.2.4 Separación Cromatográfica de las Fracciones Polifenólicas de la Acerola Usando Cartuchos de Extracción en Fase Sólida (SPE)**

##### *a) Fundamento*

El método se fundamenta en la separación cromatográfica de polifenoles usando cartucho de extracción en fase sólida (solid phase extraction – SPE). La columna está constituida por un relleno sólido que forma la parte estacionaria del sistema, está compuesta por sílice (fase normal) y octadecil C<sub>18</sub> (fase reversa). Los compuestos de la muestra estudiada se separan de acuerdo a su afinidad por la fase estacionaria o móvil, que cambia de polaridad según el propósito de la extracción (*Brenneman y Ebeler, 1999*).

La técnica tiene una amplia utilidad y se aplica en el campo medioambiental, alimentario y biomédico para reconstituir y aislar compuestos del agua, el aire, los alimentos o los fluidos biológicos.

##### *b) Reactivos*

Acetonitrilo acuoso 16% pH 2: el pH se ajusta con HCL 0,1N.

Ácido clorhídrico 1N y 0,01N

Hidróxido de sodio 5N

*c) Procedimiento para la Separación de las Fracciones Polifenólicas*

Obtención de las fracciones: la separación se lleva a cabo en una columna de extracción en fase sólida reversa C<sub>18</sub> y se ajusta el pH y la fuerza iónica de los disolventes. El flujo se mantiene aproximadamente a 1mL/minuto, tiempo suficiente para permitir la adsorción/deadsorción del analito de la muestra entre la fase estacionaria y líquida.

Los polifenoles se separan en 3 familias dependiendo de su polaridad: 1) ácidos fenólicos, 2) flavanoles y antocianos y 3) flavonoles.

Para comenzar la separación de las distintas familias, se ajustan a pH 7 las muestras de pulpa y zumo de acerola. En este momento se observa un cambio del color debido a algunos antocianos que pueden existir en forma de quinonas, cuya coloración es azul en lugar de roja, su forma ionizada.

El fraccionamiento se procede como sigue:

- 1) Se activa la columna con 2mL de metanol seguido por 2mL de agua a pH neutro para su acondicionamiento.
- 2) Se carga la columna con 1,5mL de muestra a pH 7.
- 3) Se hacen pasar 6mL de agua neutra por la columna y se recoge el eluyente, que es la **Fracción 1**, constituida por los ácidos fenólicos que no son absorbidos por la fase estacionaria hidrofóbica.
- 4) Posteriormente se reacondiciona la columna con 2mL de 0,01N HCL. Este eluyente es despreciado.
- 5) La **Fracción 2** es recogida tras eluir 6mL de acetonitrilo acuoso al 16% (pH 2) a través de la columna. Esta fracción está compuesta por flavanoles y antocianos, que han sido ionizados en el paso anterior.
- 6) Se pasan 6mL de acetato de etilo, el eluyente recogido es la **Fracción 3**, que corresponde a los flavonoles.

Las 3 fracciones se llevan al rotavapor controlando la temperatura con un baño termostatzado a 38°C. Teniendo en consideración que el disolvente utilizado para medir la actividad antioxidante de las fracciones es agua, es necesario eliminar los demás. La Fracción 1 se evapora hasta el volumen deseado. La Fracción 2 se evapora hasta la completa desaparición del acetonitrilo (que está al 16%) y la fracción 3, constituida por acetato de etilo, se evapora hasta sequedad y se reconstituye con agua. Al final, todas las fracciones se llevan al mismo volumen de la disolución madre de la pulpa y el zumo, es decir, 5mL.

#### **4.2.2.5 Determinación de la Composición Fenólica**

##### *a) Fundamento*

El método consiste en la separación y identificación de los compuestos fenólicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector de fotodiodos en fase reversa y un gradiente de elución binario con un rango de detección en UV visible de 240 a 450nm, registrando simultáneamente las longitudes de 240, 313, 320 y 355nm. La separación de los compuestos se completa a los 80 minutos.

##### *b) Tratamiento de las Muestras*

Las muestras de zumo de acerola licuado y estrujado y el zumo comercial se inyectan directamente sin manipulación salvo la filtración (Millex 0,22µm). La pulpa y el zumo concentrado se centrifugan (10 minutos 4000rpm), se filtran y se inyectan en el cromatógrafo.

##### *c) Condiciones Cromatográficas*

El control de la temperatura del módulo que contiene la columna evita oscilaciones en la medida de la línea base, y permite obtener tiempos de

retención constantes. El eluyente adquiere la temperatura deseable antes de entrar en la columna.

Fase móvil: se ensayaron diferentes gradientes al objeto de conseguir una adecuada separación de los picos. Los ensayos se realizaron con los eluyentes constituidos por una mezcla de disolventes:

Fase A: ácido acético en agua (pH 2,65)

Fase B: acetonitrilo: ácido acético en agua (pH 2,65) en las proporciones 80/20.

Los gradientes ensayados han sido:

Gradiente 1 – Flujo: 1,5

Tiempo (minutos)	Fase A	Fase B
--	100	0
5	98	2
10	96	4
15	90	10
30	80	20
35	70	30
40	0	100
45	100	0
60	100	0

Gradiente 2 – Flujo: 1,0

Tiempo (minutos)	Fase A	Fase B
--	100	0
5	98	2
10	96	4
15	90	10
20	86	14
30	80	20
35	75	25
40	70	30
50	0	100
55	100	0
70	100	0

## Gradiente 3 – Flujo: 0,9

Tiempo (minutos)	Fase A	Fase B
--	100	0
5	98	2
10	96	4
20	90	10
25	86	14
35	80	20
45	75	25
55	70	30
60	0	100
70	100	0
80	100	0

El gradiente 3, con un flujo de 0.9 mL/min y la temperatura de 40°C, ha sido elegido como el método de separación adecuada de los compuestos polifenólicos de las muestras de acerola. En la Figura 16 se muestra el cromatograma a 280nm de un zumo de acerola obtenido con las condiciones del gradiente 3. Se ha incluido también la representación bidimensional del cromatograma en la que se puede observar una adecuada separación. La duración de cada análisis completo es de 80 minutos.

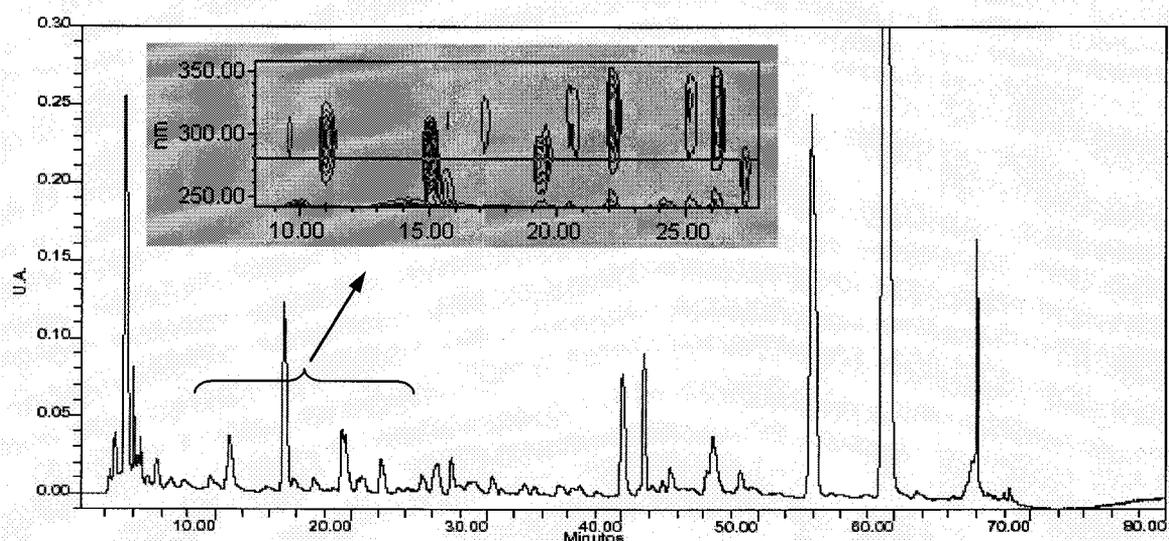


Figura 16. Cromatograma a 280nm de un zumo de acerola obtenido con las condiciones del gradiente 3.

Fase estacionaria: columna Merck LichroCart® 100RP-18 de fase reversa, tamaño de partícula 5 $\mu$ , 250x4 mm protegida con precolumna LichroCart® 4-4 a una temperatura constante de 40°C.

Detección: UV de 200 a 600nm. Se identifica y cuantifica los polifenoles en el máximo de absorción correspondiente a cada familia de fenoles (280, 313 y 355). En todos los casos se realizó la inyección a bucle completo (50 $\mu$ L). Los análisis se llevan a cabo por triplicado.

#### *d) Resolución de los Picos*

La resolución de los picos se comprobó aplicando la siguiente fórmula (Schoenmakers, 1988):

$$Y = t_{r2} - t_{r1} / (W2 + W1) / 2$$

Donde Y es la resolución entre dos picos,  $t_r$  es el tiempo de retención de cada uno de los picos y W la medida de la anchura de la base del pico. Matemáticamente, W se calcula como la diferencia entre los puntos de intersección entre las tangentes a ambos lados del pico cromatográfico y la línea de base del cromatograma.

Se ha constatado que los picos identificados tienen una resolución con el anterior y el posterior mayor que 1,5.

#### **4.2.2.5 Determinación de Pigmentos Carotenoides**

##### *a) Fundamento*

El método se fundamenta en la separación e identificación de los pigmentos carotenoides por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa de extractos saponificados de productos naturales. Se utiliza un gradiente de elución binario con acetona y agua. La detección se hace en

UV visible a 450nm. Con el detector de fotodiodos se obtienen los espectros de los pigmentos, lo cual ayuda a su correcta identificación. Esta técnica presenta un alto poder de resolución en un corto espacio de tiempo. La separación se completa a los 15 minutos (*Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993*).

#### *b) Reactivos*

- Disolución de Cloruro de sodio al 10% (p/v)
- Hidróxido de potasio al 20% (p/v) en metanol
- Disolución saturada de bicarbonato sódico
- Disolución Sulfato de sodio al 2% (p/v)

#### *c) Tratamiento de las Muestras*

Extracción: Las muestras de fruto maduro (15g), fruto inmaduro (15g), pulpa (8g), zumo concentrado (5g) y zumo listo (5mL) se homogeneizaron con 50mL de acetona para extraer los pigmentos carotenoides. El homogeneizado se filtra a vacío, se recoge el filtrado y se extrae con 50mL de acetona. Este proceso se repite sucesivas veces hasta completa extracción del color. Antes de la homogeneización de las muestras de fruto, estas se mezclan con 50mL de una disolución saturada de bicarbonato sodio (p/v). El filtrado que contiene los carotenoides se pasa a un embudo de decantación de 1L y se añaden 150mL de éter etílico y 200mL de disolución de NaCl al 10% (p/v), transfiriendo así, los pigmentos de la fase acuosa a la orgánica.

La fase acuosa se transfiere a otro embudo con el fin de recuperar toda la pigmentación que pueda haber en la misma, repitiendo el proceso anterior. Las fases orgánicas se reúnen en un mismo embudo y se lavan varias veces con 200mL de agua destilada.

Saponificación: Al extracto de pigmentos disueltos en 50mL éter etílico se adicionan 25mL de hidróxido de potasio en metanol al 20% (p/v), agitando suavemente cada 15 minutos hasta completar una hora de reacción. Tras la

cual, la fase orgánica se lava con agua destilada hasta conseguir su neutralidad. Se filtra a través de un lecho de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro sólido y se evapora el éter en rotavapor a temperatura inferior a  $30^\circ\text{C}$ . El extracto seco se reconstituye con 1mL de acetona que se conserva en el congelador ( $-30^\circ\text{C}$ ) hasta análisis.

Las muestras se centrifugan a 12000 rpm en tubos Eppendorff antes de analizarlas por Cromatografía Líquida.

#### *d) Separación y Cuantificación de Pigmentos Carotenoides por HPLC*

*Condiciones cromatográficas:*

Fase móvil: se emplean como eluyentes acetona y agua desionizada a una velocidad de flujo de 1,5mL/min. El programa de gradiente se recoge en la Tabla 3:

*Tabla 3: Programa de gradiente utilizado para determinación de carotenoides en el HPLC.*

Tiempo (min)	% Acetona	% Agua
0	75	25
5	75	25
10	95	5
17	95	5
20	100	0
25	75	25

Fase estacionaria: columna Waters C18 fase reversa (Spherisorb ODS2), 250mm de longitud y 4,6mm de diámetro interno, tamaño de partícula  $5\mu$ , protegida con precolumna de 100x4mm empaquetada con el mismo material.

Detección: UV-visible de 350 a 600nm. Se cuantifica en el máximo de absorción de los pigmentos carotenoides (450nm). El volumen de inyección es de  $10\mu\text{L}$ . La cuantificación se lleva a cabo mediante patrón interno.

### *Cuantificación de los pigmentos:*

El método empleado para determinar la concentración carotenoide de las muestras ha sido el del patrón interno. Se utiliza un pigmento que está ausente del perfil carotenoide de la acerola, en este caso,  $\beta$ -apo-8'-carotenal, que en las condiciones propuesta se separa bien del resto de los carotenoides. El patrón se adiciona antes de proceder la saponificación de las muestras. Se prepara una solución patrón con concentración de 124 $\mu$ g/mL en éter de petróleo ligero 40-60°C. La cantidad exacta a añadir depende de la concentración carotenoide de la muestra. En los frutos maduros, inmaduros, pulpa y zumo concentrado se añadió 0,2mL y para el zumo listo 0,1mL.

### *e) Obtención de los Patrones*

#### Preparación de extractos:

Las disoluciones patrón de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxanteno, luteína, anteraxanteno, violaxanteno y neoxanteno se obtuvieron mediante extracción de los pigmentos saponificados de productos naturales conocidos como la menta o el pimiento. Se obtuvieron extractos saponificados concentrados de pigmentos de estas fuentes y se sometieron a separación y purificación mediante cromatografía en capa fina (TLC).

#### Cromatografía en capa fina (TLC):

Para la separación de los carotenoides por TLC se preparan placas de vidrio (20x20cm) revestidas de una capa de silicagel 60GF<sub>245</sub> de 0,7cm de espesor. Una vez secas al aire, se activan durante una hora en estufa a 120°C antes del uso. De la disolución madre del extracto del producto natural se toma una alícuota de 200 $\mu$ L y se cromatografía utilizando como diluyente la mezcla éter de petróleo 65-95°C – acetona – dietilamina (10:4:1) para el extracto saponificado. Completado el desarrollo de la placa, lo que suele durar entre 15 y 30 minutos, se seleccionan las bandas de interés, se rascan y se disuelven en acetona filtrando para eliminar la sílice. La elución de los

pigmentos ocurre en orden inversa a su polaridad, avanzando con el disolvente los hidrocarburos ( $\beta$ -caroteno), quedando retenidas las xantofilas que son más polares.

Para obtener cantidades suficientes de los pigmentos requeridos, se repite las operaciones de cromatografiar, eluir, rascar y filtrar. La solución de cada pigmento encontrado se vuelve a cromatografiar en las mismas condiciones para comprobar su pureza. Al final, todos los pigmentos son disueltos en acetona y almacenados en oscuridad en el congelador hasta cuantificación y uso.

#### Cuantificación de la disolución patrón del pigmento:

La cuantificación de cada disolución de pigmento se realiza mediante espectrofotometría UV-visible. Se registra la longitud de onda máxima del pigmento ( $\lambda_{\text{max}}$ ) que debe situarse en un intervalo de 0,2 y 0,8 unidades de absorbancia, para obtener una buena correlación de la ley de Lambert-Beer. Una vez medida la absorbancia (A) y utilizando el coeficiente de extinción específico adecuado ( $\epsilon$ ) para cada pigmento, se obtiene la concentración de pigmento de la disolución (C).

$$C \text{ (g/mL)} = \frac{A (\lambda_{\text{max}})}{\epsilon \times 100}$$

#### *e) Expresión de los Resultados: cuantificación de los pigmentos carotenoides en las muestras de acerola*

Tras conocer la concentración de los pigmentos patrones, se preparan distintas mezclas a partir de la disolución madre y se añade siempre la misma cantidad de la solución del patrón interno. Las disoluciones resultantes se evaporan en rotavapor a 30°C, se disuelven en 2mL de acetona y se conservan a una temperatura de -20°C.

Las soluciones standard se cromatografian y se representan para cada pigmento, los valores de relación de área de pico y de cantidad inyectada con respecto al patrón interno, a fin de calcular el factor respuesta:

$$\frac{\text{Peso}_i}{\text{Peso PI}} = \text{FR}_i \times \frac{\text{Area}_i}{\text{Area PI}}$$

Donde:

$i$  = pigmento objeto de calibrado

PI = Patrón Interno

$\text{FR}_i$  = Factor respuesta

La ecuación nos permite la cuantificación de cada componente en las condiciones de separación propuesta. La concentración se expresa en  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco para el fruto, la pulpa y el concentrado y  $\mu\text{g/mL}$  para el zumo comercial.

#### *f) Valores de Vitamina A*

Los valores de la vitamina A, se expresan como equivalentes del retinol (RE). Se ha calculado según el NAS-NRC [Academia Nacional de Ciencias y Consejo Nacional de Investigación, 1989], siendo que cada 6  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno corresponde a 1  $\mu\text{g}$  de RE. Considerando la actividad relativa de diversos carotenoides con actividad de provitamina A presentes en fruta de acerola, se ha considerado 100% para todo-*trans*- $\beta$ -caroteno y el 50% al resto de carotenoides con actividad de provitamina A, según la siguiente expresión (Bauerfeind, 1972):

$\text{RE} = \mu\text{g de } \beta\text{-caroteno}/6 + \mu\text{g otro carotenoide con actividad provitamina A}/12$
---

## 5.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ACEROLA

La acerola, además de ser una excelente fuente de vitamina C también se considera buen aporte de bioflavonoides; de ahí su gran valor nutritivo y su potencial uso antioxidante para prevenir enfermedades degenerativas como el cáncer (Mesquita y Vigoa, 2000).

Son escasos los estudios de la capacidad antioxidante de esta fruta. Los investigadores se dedican principalmente al desarrollo de técnicas de mejoramiento genético (Lopes et al., 2001; Salla et al., 2002), efectos del tratamiento térmico (Assis et al., 2000), enriquecimiento de otros zumos con acerola (Matsuura y Rolim, 2002; Hwang et al., 2001), cambios físico-químicos durante la maduración (Carrington y King, 2002; Nogueira et al., 2002), influencia de las variables meteorológicas (Gomes et al., 2002), identificación de componentes aromáticos (Boulangier y Crouzet, 2001; Pino y Marbot, 2001; Vendramini y Trugo, 2000) y sobretodo, análisis de la vitamina C (Andrade et al., 2002; Mezquita y Vigoa, 2000; Assis et al., 2001).

En la bibliografía encontramos numerosos métodos de medir la capacidad antioxidante de frutas y vegetales. Hemos seleccionado los métodos DMPD, ABTS, DPPH y ORAC por ser los más comúnmente utilizados.

Se han aplicado 3 métodos de medida de actividad antioxidante cuyo fundamento se basa en la desaparición de un radical del medio de reacción en presencia del antioxidante. Estos métodos tienen pues en común, la medida de la actividad antiradicalaria del alimento.

Los métodos seleccionados se diferencian en el radical empleado (ABTS, DPPH y DMPD).

Además el método ORAC se fundamenta en la pérdida de fluorescencia de una proteína, la ficoeritrina, cuando es dañada por los radicales peroxilo,

es decir, se mide el daño en una molécula diana y se considera en el apartado 5.1.3.

### 5.1.1 Medida de la Actividad Antioxidante: ABTS, DPPH, DMPD

Antes de realizar el análisis de la actividad antioxidante de la acerola es preciso seleccionar las condiciones adecuadas. Es un fruto desconocido y la falta de bibliografía acerca de su actividad antioxidante implica realizar ensayos previos que garanticen una adecuada selección de la dilución de la muestra y del extractante a emplear.

Para comprobar la linealidad de la respuesta, elegir la dilución y el extractante apropiado para cada método ensayado, se han utilizado las siguientes muestras: P1, P2, P3 de pulpa y ML, ME, AL, AE de zumo.

#### *a) Linealidad de la Respuesta y Elección de la Dilución Apropiada*

Las muestras deben ser diluidas para que sus valores de absorbancia se encuentren dentro de un intervalo lineal y presenten una respuesta adecuada.

El intervalo de medida debe ser tal que, el **límite superior** sea la máxima concentración que presente una respuesta lineal y el **límite inferior** sea la mínima concentración que produce una respuesta.

Para cada método se han ensayado 5-6 diluciones de cada muestra de pulpa y zumo de acerola comprendidas entre 0 y 0,1:100. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del radical frente a la dilución ensayada. Se ha comprobado, en todos los métodos, que el intervalo de diluciones que presenta linealidad es muy estrecho de 0,1 a 3,0:100 y las muestras deben estar diluidas hasta 300 veces (Figura 13).

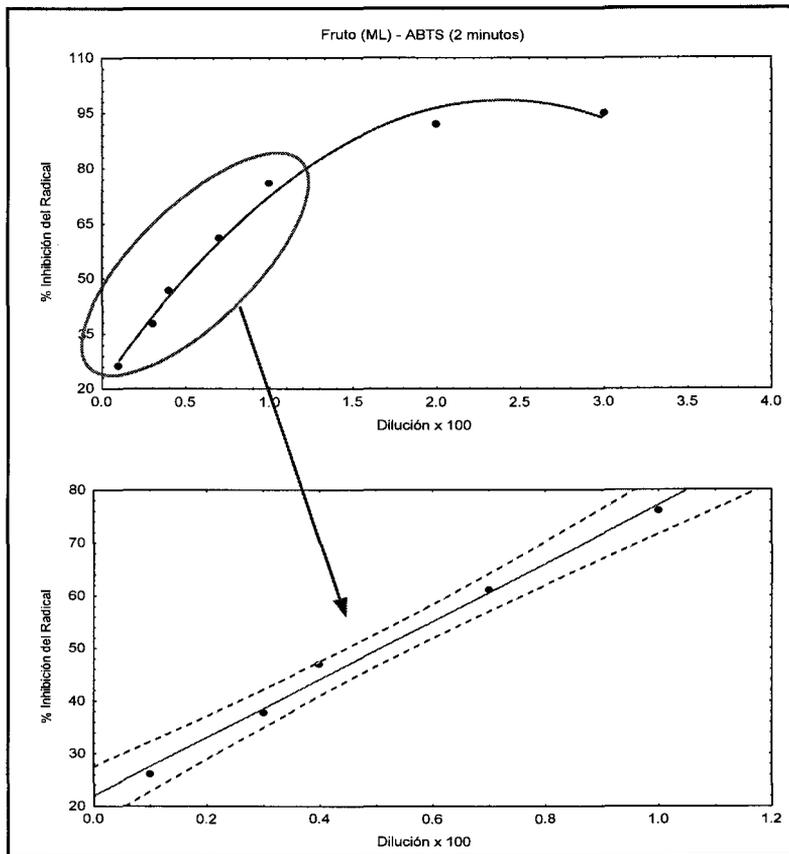


Figura 13: Relación entre la muestra ensayada y el % de inhibición del radical (Método ABTS).

En las Tablas 5, 6 y 7 se muestra el intervalo apropiado de las diluciones para la pulpa y el zumo ensayadas con diferentes extractantes.

Tabla 5: Intervalo de linealidad para el método **DMPD**.

Muestra	Diluyente	Dilución x 100
P1	Agua	0.1 - 2.0
	Metanol	0.5 - 1.5
P2	Agua	0.5 - 3.0
	Metanol	0.5 - 2.0
P3	Agua	0.1 - 2.0
	Metanol	0.5 - 2.0
ML	Agua	0.1 - 1.0
	Metanol	0.5 - 1.5
ME	Agua	0.1 - 1.0
	Metanol	0.1 - 1.0
AL	Agua	0.1 - 1.0
	Metanol	0.1 - 0.9
AE	Agua	0.3 - 1.0
	Metanol	0.1 - 0.7

Tabla 6: Intervalo de linealidad para el método **ABTS**.

Muestra	Diluyente	Dilución x 100
P1	Agua	0.1 – 0.5
	Metanol	0.1 – 0.5
P2	Agua	0.1 – 0.5
	Metanol	0.1 – 0.5
P3	Agua	0.1 – 0.5
	Metanol	0.1 – 0.5
ML	Agua	0.1 – 0.3
	Metanol	0.1 – 0.3
ME	Agua	0.1 – 0.3
	Metanol	0.1 – 0.4
AL	Agua	0.1 – 0.4
	Metanol	0.1 – 0.4
AE	Agua	0.1 – 0.3
	Metanol	0.1 – 0.4

Tabla 7: Intervalo de linealidad para el método **DPPH**.

Muestra	Diluyente	Dilución x 100
P1	Agua	0.1 – 1.0
	Metanol	0.5 – 1.7
P2	Agua	0.4 – 1.5
	Metanol	0.4 – 2.0
P3	Agua	0.4 – 1.4
	Metanol	0.5 – 1.6
ML	Agua	0.5 – 1.4
	Metanol	0.5 – 1.3
ME	Agua	0.4 – 1.2
	Metanol	0.4 – 1.2
AL	Agua	0.3 – 1.2
	Metanol	0.5 – 1.4
AE	Agua	0.3 – 1.1
	Metanol	0.4 – 1.1

A la luz de los resultados obtenidos, se puede recomendar realizar las medidas de actividad antioxidante dentro de los siguientes intervalos de dilución. Así, en el caso del método ABTS, parece razonable usar un intervalo de 0.1 a 0.5 para la pulpa y 0.1 a 0.3 para el zumo. La dilución recomendada cuando se emplea el método DPPH es 0.4 a 1.5 y 0.3 a 1.2 para la pulpa y el zumo respectivamente. Se pudo observar que en el método DMPD las diluciones son 0.1 a 2.0 en el caso de la pulpa y de 0.1 a 1.0 en el caso del zumo.

### b) Elección del Extractante

Para llevar a cabo la elección del extractante se ensayaron *agua* y *metanol*. Ambos extractantes fueron aplicados tanto a la pulpa como al zumo. Tras el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) de los valores de la actividad antioxidante (expresados como TEAC) obtenidos, se comprobó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con el agua y el metanol para los métodos ABTS y DMPD y si la hubo para el método DPPH (Tabla 8), probablemente relacionada con la afinidad del radical en medios acuosos. Así pues, se ha utilizado agua como extractante para todos los métodos analizados.

Tabla 8: Análisis estadístico de varianza (ANOVA) entre los extractantes, agua y metanol, para los métodos ABTS, DPPH y DMPD.

Método	Muestra	Diferencia Estadística (p)
ABTS 2 min.	Pulpa	0.645
	Zumo	0.682
ABTS 15 min.	Pulpa	0.736
	Zumo	0.731
DPPH	Pulpa	0.008*
	Zumo	0.016*
DMPD	Pulpa	0.058
	Zumo	0.821

\* valores estadísticamente diferentes

### 5.1.2 Aplicación de los Método ABTS, DPPH y DMPD a las Muestras de Acerola

En la Tabla 9 se muestran los valores de actividad antioxidante (TEAC - Actividad Antioxidante Equivalente al TROLOX) para la pulpa y el zumo de acerola extraídos en agua, utilizando los métodos ABTS y DPPH. Se representa la media  $\pm$  la desviación estándar del TEAC, de 5-6 diluciones diferentes y que están dentro del intervalo de linealidad.

Tabla 9: TEAC de la pulpa y zumo de acerola para los métodos ABTS y DPPH.

Muestra	ABTS		DPPH
	TEAC 2 min <sup>a</sup>	TEAC 15 min <sup>a</sup>	TEAC equil <sup>a</sup>
P1 (lote 1)	64.76 ± 5.05	65.81 ± 6.06	85.11 ± 3.30
P2 (lote 1)	51.11 ± 2.10	51.47 ± 3.77	77.99 ± 3.28
P3 (lote 1)	46.16 ± 1.78	46.62 ± 2.87	74.36 ± 6.21
P4 (lote 2)	36.95 ± 1.18	38.83 ± 2.17	39.89 ± 0.10
P5 (lote 2)	38.80 ± 1.00	41.84 ± 1.84	38.31 ± 0.70
P6 (lote 2)	37.84 ± 0.71	40.90 ± 1.75	39.81 ± 1.00
ME (cosecha marzo)	90.28 ± 6.24	94.86 ± 9.27	122.69 ± 8.15
ML (cosecha marzo)	76.13 ± 2.42	76.39 ± 3.86	95.70 ± 4.91
AE (cosecha abril)	91.76 ± 6.24	91.60 ± 8.75	125.66 ± 8.37
AL (cosecha abril)	85.21 ± 8.27	85.80 ± 9.18	112.98 ± 1.77
EE (cosecha enero)	81.50 ± 2.26	83.50 ± 2.92	82.33 ± 1.82
EL (cosecha enero)	74.30 ± 3.14	76.71 ± 3.58	91.80 ± 1.35
ZL (zumo comercial)	2.03 ± 0.28	2.34 ± 0.26	2.74 ± 0.36
ZC (zumo concentrado)	32.16 ± 0.71	33.88 ± 1.06	36.56 ± 3.08

<sup>a</sup> Valor expresado en mM (mmol/kg de pulpa y mmol/L de zumo) ± desviación estándar.

Tras la aplicación del análisis de la varianza (ANOVA), se ha constatado que existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) cuando se comparan los valores TEAC de la pulpa (P1, P2, P3, P4, P5, P6) y del zumo procesado (ME, ML, AE, AL, EE, EL). En general, la pulpa presenta una menor actividad antioxidante que el zumo en ambos métodos ensayados. Para el caso de los zumos envasados (ZC y ZL) su actividad antioxidante resulta menor que la de los zumos preparados en el laboratorio.

Se han encontrado resultados similares para las cosechas de marzo, abril (2002) y enero (2004). No se han observado diferencias significativas entre las muestras de zumo obtenidas estrujando o licuando la acerola. Respecto a las muestras de pulpa congeladas en diferentes lotes analizados (P1, P2, P3 y P4, P5, P6) son estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Quizás este comportamiento se debe al hecho de que fueron adquiridas en distintas épocas del año, pero del mismo proveedor.

En el método ABTS, algunos autores proponen realizar las medidas a los 15 minutos para que los compuestos de reacción lenta tengan suficiente

tiempo (Cano *et al.*, 1998; van den Berg *et al.*, 1999). Sin embargo, tal y como se puede comprobar, no existen diferencias entre los valores TEAC analizados a los 2 y a los 15 minutos. Ello implica que los compuestos antioxidantes de la acerola reaccionan mayoritariamente en la primera fase. Así pues, se puede recomendar realizar las medidas de la actividad antioxidante con el método ABTS a los 2 minutos.

La acerola presenta valores TEAC muy elevados medidos con el método ABTS cuando se compara con otras frutas o vegetales, como naranjas (5,8mM) (Proteggente *et al.*, 2003), gazpacho (1,2mM), sopa de verduras (0,8mM) (Arnao *et al.*, 2001), arándanos (38,3mM) y moras (26,5mM) (Sellappan *et al.*, 2002). Los resultados para el método DPPH evidencian una elevada actividad antioxidante de la pulpa y del zumo y ambos son superiores a los valores TEAC del vino (6-8mM) (Fogliano *et al.*, 1999; Ghiselli *et al.*, 1998), de las infusiones de té verde (5,7mM) (Atoui, 2005) y de frutas como la granada (28mM) (Gil *et al.*, 2000).

Los valores TEAC obtenidos mediante el método DMPD para las muestras: P1, P2, P3, ME, ML, AE, AL presentan gran variabilidad (Tabla 10). El coeficiente de variación, tanto de la pulpa como del zumo (18-32 y 8-20, respectivamente) es elevado comparado con los resultados encontrados en los métodos ABTS y DPPH (Tabla 8). Teniendo en consideración los elevados coeficientes de variación, el método DMPD presenta una pobre reproducibilidad, así que no resulta ser el método de elección para el análisis de la actividad antioxidante del fruto en cuestión.

Tabla 10: TEAC de la pulpa y zumo de acerola para el método DPPH con diferentes extractantes.

Muestra	Extractante	DMPD
		TEAC 10 min <sup>a</sup>
P1	Agua	47.74± 8.83
	Metanol	48.66 ± 15.42
P2	Agua	28.85 ± 18.78
	Metanol	57.38 ± 14.52
P3	Agua	33.83 ± 16.95
	Metanol	69.26 ± 19.11
ME	Agua	101.55 ± 6.59
	Metanol	118.69 ± 17.41
ML	Agua	102.88 ± 11.93
	Metanol	82.30± 15.84
AE	Agua	124.07 ± 18.01
	Metanol	115.24 ± 13.64
AL	Agua	108.5 ± 11.96
	Metanol	111.52 ± 20.51

### 5.1.3 Valor ORAC

El ensayo ORAC se ha utilizado ampliamente para medir la capacidad antioxidante de frutas y verduras y para evaluar respuestas *in vivo* frente a dietas ricas en estos compuestos mediante el análisis de la actividad antioxidante del plasma (Cao *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996).

Las Figuras 14 y 15 representan las curvas de descenso de la fluorescencia de la proteína  $\beta$ -ficoeritrina a lo largo del tiempo en presencia del radical peroxilo y de las muestras de acerola. Se observa (Figura 12), que las muestras AL y ML presentan curvas de mayor área, sin embargo la dilución ha sido 1:2000, una vez que para las muestras AE, ME, EE y EL la dilución ha sido 1:4000, o sea, casi 2 veces mayor.

Para las muestras comerciales (ZL, ZC) se han utilizados factores de dilución de 1:130 y 1:1500, respectivamente.

El comportamiento de las muestras de pulpa (Figura 13) es similar para una misma dilución; 1:3000 para la pulpa P1, P2, P3 y 1:2500 para P4, P5, P6.

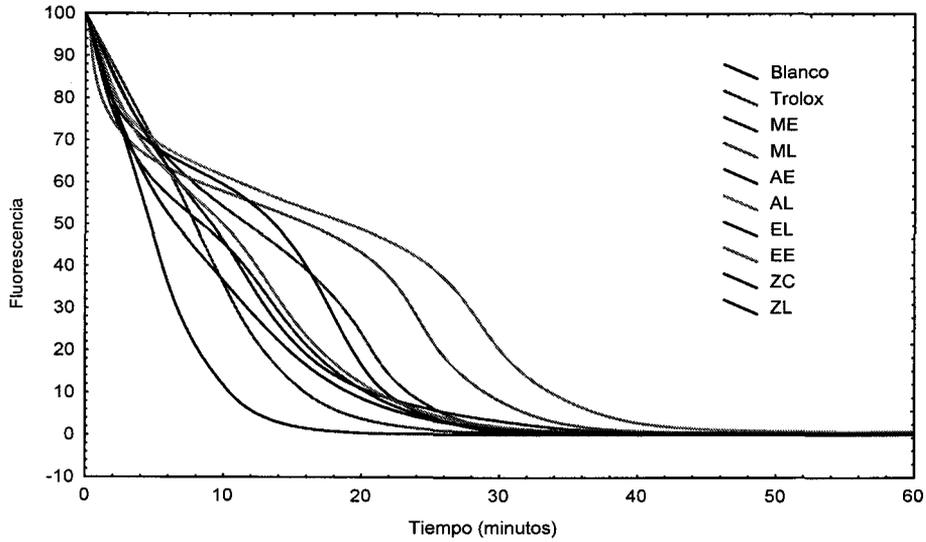


Figura 14: Representación de la fluorescencia del Blanco, del TROLOX y de las muestras de **zumo de acerola** frente al tiempo (Dilución 1:2000 – AL, ML y 1:4000 – AE, ME, EE, EL).

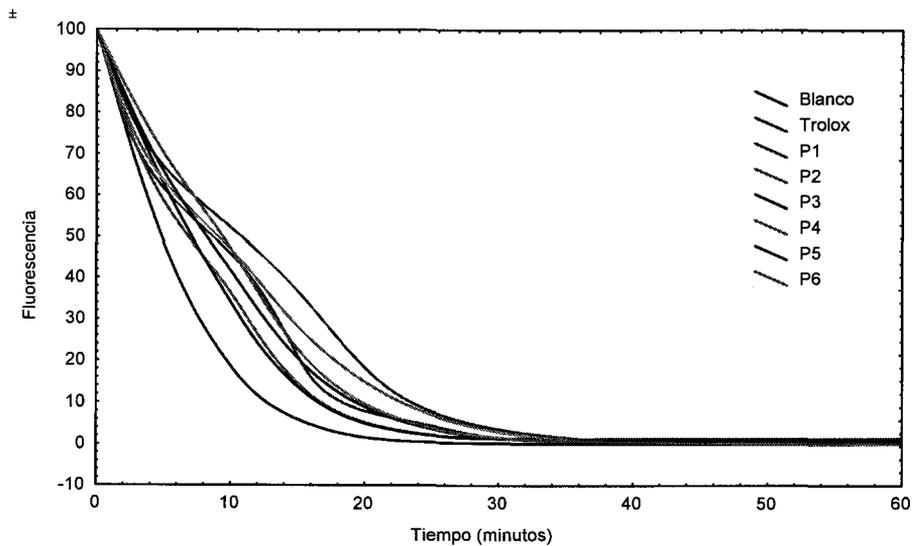


Figura 15: Representación de la fluorescencia del Blanco, del TROLOX y de las muestras de **pulpa de acerola** frente al tiempo (Dilución 1:3000 – P1, P2, P3 y 1:2500 – P4, P5, P6).

En la Tabla 11, se representa la media  $\pm$  desviación estándar del valor ORAC (expresado en mmol/L o mmol/Kg) por triplicado de la pulpa y del zumo de acerola. Se ha observado que las muestras de pulpas congeladas y zumos elaborados en el laboratorio (ME, ML, AE, AL, EE, EL) son estadísticamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, al comparar los valores del zumo en diferentes procesados (ME, AE, EE - ML, AL, EL), no encontramos diferencia estadística.

Tabla 11: Valor ORAC  $\pm$  la desviación estándar de las muestras de pulpa y zumo de acerola.

Muestra	ORAC <sup>a</sup>
P1	58.83 $\pm$ 0.18
P2	47.42 $\pm$ 0.27
P3	46.75 $\pm$ 0.23
P4	34.58 $\pm$ 0.05
P5	34.87 $\pm$ 1.97
P6	40.40 $\pm$ 1.17
ME	85.39 $\pm$ 0.36
ML	50.57 $\pm$ 2.28
AE	76.71 $\pm$ 1.34
AL	57.52 $\pm$ 2.89
EE	77.14 $\pm$ 5.59
EL	83.03 $\pm$ 2.25
ZL	1.26 $\pm$ 0.20
ZC	22.37 $\pm$ 0.73

<sup>a</sup> Valor ORAC expresado en mmol/kg de pulpa y mmol/L de zumo

Cao *et al.* (1996) y Wang *et al.* (1996), encontraron valores de la capacidad antioxidante que consideraron relativamente altos para la col (17.7mmol/Kg), fresa (15.4mmol/Kg) y espinaca (12.6mmol/Kg). Según Prior *et al.* (1998), la cereza ha sido específicamente estudiada por presentar, en algunos casos, valores de hasta 40-50mmol/Kg de fruta fresca.

En un estudio realizado por Howard *et al.* (2003), en diversos genotipos de arándanos, los valores ORAC encontrados alcanzaron resultados de hasta 73.1 mmol/kg de fruta, datos muy parecidos a los hallados en los frutos de acerola.

## 5.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

En este capítulo se analiza la composición química del fruto de acerola. Se han seleccionado los compuestos que presentan actividad antioxidante: la vitamina C, los compuestos polifenólicos y los carotenoides. A cada uno de ellos se les dedica un apartado en la presente memoria.

### 5.2.1 Análisis de la Vitamina C

La vitamina C se presenta bajo dos formas activas: el ácido ascórbico (AA) y su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (DHAA). Durante el procesado, el AA puede reversiblemente convertirse en DHAA, y ser hidrolizado irreversiblemente a ácido 2,3 dicetoglucónico (2,3 DCG), sin actividad vitamínica (Figura 11). Cuando hablamos de vitamina C nos referimos pues a la suma de las dos formas activas (AA + DHAA).

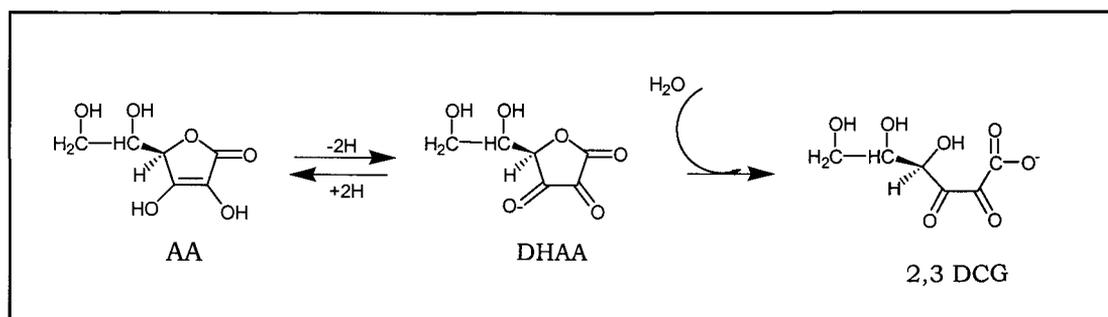


Figura 11: Estructura química del AA, DHAA y 2,3 DCG.

Los métodos cromatográficos para el análisis de vitamina C han sido ampliamente utilizados. La cromatografía en capa fina y en papel fueron las primeras; la cromatografía de gases ha demostrado buena linealidad y exactitud. Pero sin duda, es la cromatografía líquida la que ha proporcionado resultados más satisfactorios en muestras de alimentos, biológicas y farmacéuticas, con alta sensibilidad, especificidad y simplicidad (Furusawa, 2001; Gardner et al., 2000; Zapata y Dufour, 1992).

Hemos elegido, para el análisis de la vitamina C de las muestras de acerola la cromatografía líquida en fase reversa con detector de fotodiodos.

El método adaptado de *Sánchez-Mata et al. (2000)* ha sido utilizado para identificar y cuantificar la vitamina C de las muestras de pulpa y zumo de acerola en diferentes procesados. El tratamiento de las muestras debe ser efectivo para preservar el contenido en ácido ascórbico total, una vez que esta vitamina se oxida con gran facilidad.

#### **5.2.1.1 Preparación de las Muestras**

Las muestras se prepararon en una solución extractora de  $\text{HPO}_3$ , quizás, la más utilizada en análisis de AA en alimentos. La concentración ( $\text{HPO}_3$  al 3% - p/v) ha sido elegida para alcanzar valores de pH inferiores a 3, consiguiéndose así, según *Watada (1982)*, la estabilidad del AA y su completa extracción.

La presencia de 1mM de EDTA en la solución extractora es importante para aumentar la sensibilidad del método, considerando que el EDTA es capaz de formar complejos con los iones metálicos del sistema y prevenir la oxidación del ácido ascórbico.

#### **5.2.1.2 Reacción de Reducción del DHAA a AA**

Para cuantificar el contenido total de vitamina C (AA + DHAA) presente en las muestras, en principio se ensaya el método descrito por *Sánchez-Mata et al. (2000)*. Se añade 0,2mL de 20mg/mL de DTT ( $\alpha$ -ditiotreitól) a 1mL de la muestra diluida con solución extractora y se mantiene durante 2 horas en oscuridad. Es decir, se añade directamente el extracto final sin ajustar el pH. Comprobamos que la reacción resultaba bastante lenta. Así, una solución estándar de 0,05mg/mL de DHAA disuelta en la solución extractora se trató con 0,2mL de 2% DTT y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla \_\_).

Tabla \_\_. %de reducción del DHAA a lo largo del tiempo.

Tiempo (horas)	DHAA (concentración)	% de reducción
0	0.05 mg/mL	0
2	0.006 mg/mL	12
4	0.01 mg/ mL	20
24	0.025 mg/mL	50

La cinética lenta de la reacción de reducción hace que este método no se considere viable.

Por otro lado, diversos autores obtuvieron una velocidad de reducción máxima del DHAA utilizando reductores como DTT u homocisteína a un pH neutro entre 6,5 - 6,8 (*Park, 2001; Okamura, 1980*). Por ello, se lleva a cabo el análisis de la vitamina C de las muestras de acerola modificando las condiciones del pH y basándonos en el procedimiento descrito por *Kim (1989)*. Así pues, 1mL de la muestra diluida (con HPO<sub>3</sub> al 3% + 1mM EDTA) se trató con 0,2mL de DTT (0,2% en tampón fosfato 0,2M a pH 7) y con 0,1mL K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 45%; la reacción se mantuvo por 10 minutos en oscuridad y se acidificó con 0,2mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2M antes de la inyección en el cromatógrafo, hasta el pH 2,6 (Tabla \_\_).

Tabla \_\_. %de reducción del DHAA a lo largo del tiempo.

Tiempo (minutos)	DHAA (concentración)	% de reducción
0	0.05 mg/mL	0
10 (ensayo 1)	0.0475 mg/mL	95
10 (ensayo 2)	0.045 mg/ mL	90
10 (ensayo 3)	0.0465 mg/mL	93

*Graham y Annette (1992)* cuantificaron la vitamina C de patatas y fresas, empleando una solución de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 45% para la neutralización de los extractos y encontraron un porcentaje de reducción satisfactorios.

Las modificaciones propuestas en este trabajo para asegurar un pH neutro y no diluir excesivamente el extracto final de la muestra, han conseguido resultados del 90-95% de reducción al añadir 0,05mg del patrón de DHAA a 1mL de muestra diluida en solución extractora después de un tiempo de 10 minutos de reacción. Ello indica que el método es eficiente para determinar vitamina C en muestras de acerola a las que previamente se les había determinado el contenido en DHAA.

### 5.2.1.3 Identificación y Cuantificación del AAT en las Muestras

El pico de AA eluye a un tiempo de retención de 4 minutos. La detección y la pureza de los picos se verificó mediante la comparación de los espectros de absorción UV con los patrones de AA (Figura 12).

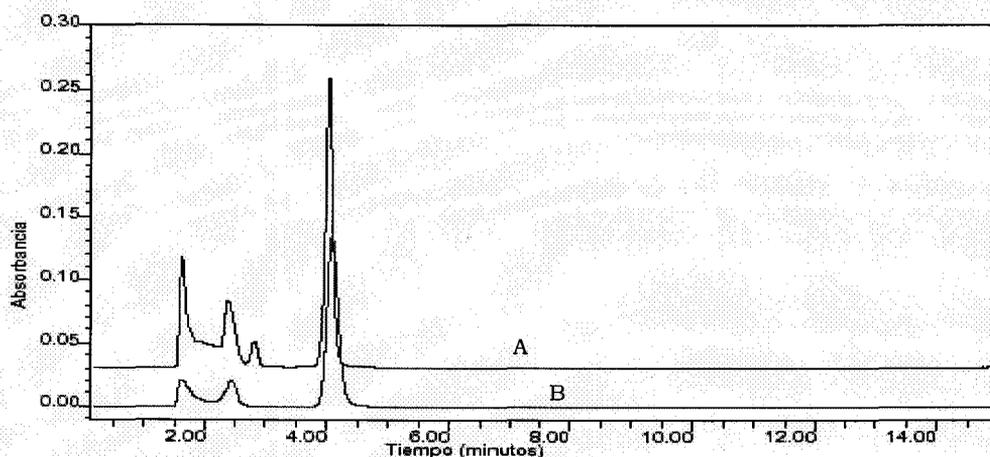


Figura 12: Cromatogramas obtenidos de una muestra de zumo de acerola AL (A) y del patrón de AA (B).

Para la cuantificación del ácido ascórbico total (AAT) de las muestras, se utilizaron las rectas de calibrado detalladas en Material y Métodos. Los resultados se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores de AA inicial, DHAA y AAT en mg/100g y mg/100mL  $\pm$  desviación estándar para las muestras de pulpa y zumo de acerola respectivamente.

Muestra	AA inicial	DHAA	AAT
P1	904 $\pm$ 0.21	16 $\pm$ 0.10	920
P2	816 $\pm$ 0.12	40 $\pm$ 0.21	856
P3	768 $\pm$ 0.22	08 $\pm$ 0.02	776
P4	565 $\pm$ 0.14	102 $\pm$ 0.47	667
P5	478 $\pm$ 0.27	164 $\pm$ 1.04	632
P6	531 $\pm$ 0.14	110 $\pm$ 0.85	641
ME	824 $\pm$ 1.23	120 $\pm$ 1.25	944
ML	1000 $\pm$ 1.52	48 $\pm$ 0.42	1048
AE	1000 $\pm$ 1.85	40 $\pm$ 0.33	1040
AL	856 $\pm$ 0.47	96 $\pm$ 0.52	952
EE	1341 $\pm$ 1.44	430 $\pm$ 2.23	1771
EL	1449 $\pm$ 2.01	348 $\pm$ 1.41	1797
ZL	042 $\pm$ 0.04	001 $\pm$ 0.00	43
ZC	444 $\pm$ 0.24	019 $\pm$ 0.00	425

Los valores encontrados de AAT para la pulpa y el zumo de acerola se encuentran entre los valores: 632 – 920mg/100g y 43 – 1797mg/100mL respectivamente.

Según datos de la literatura, el estado de madurez de la fruta en el período de cosecha influye en el contenido de vitamina C. Diferentes estudios constataron que el valor del AA puede variar de 695 a 4827mg/100g (Gomes et al., 2000; Santos et al., 1999). Nogueira et al. (2002), explican que esa variación está relacionada con el grado de madurez de los frutos, presentado los frutos verdes valores superiores a los maduros.

Oliveira et al. (1999), evaluaron los parámetros de calidad fisico-química de pulpa congelada de acerola y encontraron valores para la vitamina C que oscilan entre 470,24 y 1655,53mg/100g. Los autores atribuyen a las técnicas de procesado la causa de la variabilidad de los datos, lo que puede justificar los bajos valores de AAT encontrados para las muestras ZL (42mg/100mL) y ZC (444mg/100mL)

La cantidad encontrada de DHAA con relación al AAT es pequeña; 8  $\pm$  0,02 – 164  $\pm$  1,04mg/100g para la pulpa y 1  $\pm$  0,00 – 430  $\pm$  2,23mg/100g para el

zumo. En la acerola, el ácido ascórbico es el principal compuesto de la vitamina C, suponiendo más del 85% de su contenido total (*Carvalho y Manica, 1993*). Por lo tanto, el DHAA a pesar de su papel importante en las células como posible regenerador del AA (*Wilson, 2002*), no está bien representado en este fruto.

Cuando se comparan los resultados encontrados de AAT de la pulpa (632 – 920mg/100g) y del zumo elaborado manualmente (944 – 1797mg/mL) de acerola con otros zumos de frutas, como naranja ( $51,6 \pm 2,2\text{mg}/100\text{mL}$ ), pomelo ( $27,4 \pm 1,5\text{mg}/100\text{mL}$ ) y limón ( $32,7 \pm 1,5\text{mg}/100\text{mL}$ ) (*Ashoor et al., 1984*) comprobamos que gran parte de las muestras estudiadas poseen un contenido en vitamina C significativamente superior a ellos. El camu-camu, una fruta cultivada en la región Amazónica de Perú y Brasil, presenta también un alto contenido de esta vitamina (hasta 4000mg/100g) (*FAO, 1992*).

## 5.2.2 Compuestos Polifenólicos

La composición fenólica de la acerola es prácticamente desconocida. Cuando se inició este estudio no existía ninguna referencia, así pues, el trabajo se planteó de la siguiente manera: en primer lugar se determinó el Índice de Polifenoles Totales (IPT) como primera aproximación. Al ser la acerola un fruto de color rojo se procedió al análisis de los antocianos totales. Posteriormente, acometimos la separación en fase sólida para poder discernir qué grupo de fenoles es más representativo y con mayor influencia en la actividad antioxidante. Se separan los ácidos fenólicos, los flavanoles y flavonoles. Tras estos resultados se procedió a la identificación de ciertos compuestos polifenoles mediante HPLC-DAD.

### 5.2.2.1 Índice de Polifenoles Totales

El Índice de Polifenoles Totales (IPT) expresa el contenido total de polifenoles que presentan las muestras estudiadas. La Tabla \_\_, representa el IPT de las muestras de acerola.

Tabla \_\_. IPT de las muestras de acerola.

Muestra	IPT <sup>a</sup>
P1	751 ± 14
P2	526 ± 12
P3	643 ± 10
P4	452 ± 10
P5	487 ± 8
P6	501 ± 14
ME	805 ± 17
ML	973 ± 20
AE	1045 ± 41
AL	1059 ± 52
EE	1150 ± 92
EL	1042 ± 47
ZL	140 ± 2
ZC	377 ± 5

<sup>a</sup> mg/100g o mg/100mL de ácido gálico de pulpa y zumo respectivamente ± desviación estándar.

Se comprueba que los valores del IPT de la pulpa congelada están entre  $452 \pm 10$  y  $751 \pm 14$  mg/100g, datos estos, inferiores al zumo elaborado manualmente ( $805 \pm 17$  a  $1150 \pm 92$  mg/100mL). El zumo comercial y el zumo concentrado presentaron valores de  $140 \pm 2$  y  $377 \pm 5$ , respectivamente.

Al comparar los resultados del IPT de la pulpa y el zumo producido manualmente con otras frutas como caqui ( $1,45$  mg/100g), piña ( $1,34 \pm 0,04$  mg/100g), mango ( $1,64$  el  $\pm 0,04$  mg/100g) y la guayaba ( $4,95 \pm 0,05$  mg/100g) (Gorinstein *et al.*, 1999), observamos que las muestras de acerola presentan valores muy superiores. Tsau e Yang (2003) hallaron contenido alto de IPT cuando analizaron la cáscara de la manzana ( $20,12$  mg/100mL), sin embargo para el zumo de esta fruta estos valores son muy inferiores ( $0,62$  mg/100mL).

### 5.2.2.2 Determinación de Antocianos Totales

En la Tabla 18, se indican los valores de antocianos totales, índice de polifenoles totales (IPT) y de la Fracción 2 de las muestras de acerola (P1,P2,P3, ME, ML, AE, AL).

Tabla 18. Valores de antocianos totales de las muestras de pulpa y zumo de acerola.

Muestras	Antocianos Totales <sup>a</sup>
P1	$2.82 \pm 0.11$
P2	$2.72 \pm 0.21$
P3	$2.70 \pm 0.17$
ME	$5.23 \pm 0.02$
ML	$4.69 \pm 0.00$
AE	$4.97 \pm 0.01$
AL	$5.03 \pm 0.02$

<sup>a</sup> mg/100g o mg/100mL de cianidina 3-glucósido de pulpa y zumo respectivamente  $\pm$  desviación estándar.

Se observa que los valores de antocianos totales de la pulpa que es de color amarillo ( $2.75 \pm 0.06$ ) y del zumo ( $4.90 \pm 0.18$ ) son menores que los de otros zumos de frutas como de fresa (55,7 mg/100mL – *Torreggiani et al, 1999*) y naranjas sanguinas (12,8 – 21,7 mg/100mL, *Mondelo et al., 2000*). *Prince y Wrolstad (1995)* encontraron cantidades de antocianos excepcionales de zumo de una variedad de bayas denominada “Royal Okanogan Huckleberry” (530 mg/100mL). *Lima et al. (2003)* obtuvieron valores que varían de 3,79 a 59,74mg/100g de pulpa de acerola.

Los antocianos, como muchos otros pigmentos naturales, son inestables frente a diversos factores, como: temperatura, oxígeno, pH, enzimas o interacción con otros componentes de los alimentos. Generalmente, en condiciones ácidas, son más estables, pero cuando degradados sufren una pérdida del color, seguida de la formación del color marrón y productos insolubles (*Hendry y Houghton, 1996; Bridle y Timberlake, 1997*).

La forma del procesado de la fruta influye en su contenido en antocianos totales, una vez que al licuar, estrujar o extraer la pulpa, se elimina la piel que es de color rojo y supone la parte del fruto que concentra los antocianos. *Vendramini y Trugo (2004)*, hallaron valores de 37,5mg/100g de antocianinas en la piel de la acerola y sugieren que este subproducto de la elaboración de pulpa y zumos comerciales puede ser utilizados como fuente de pigmento natural. Los antocianos caracterizados por estos autores en la piel de la acerola fueron: malvidina 3,5-diglicosilada, cianidina 3-glicosilada y pelargonidina.

El zumo presenta el doble de los valores de antocianos totales que la pulpa. Es importante destacar que al preparar el zumo manualmente, este quizás, estuvo más tiempo en contacto con la piel del fruto y así, se puede extraer más los antocianos presentes en esta (Tabla 18).

### 5.2.2.3 Separación de las Fracciones Polifenólicas

Las familias fenólicas se separaron con extracción en fase sólida. Se obtuvieron tres fracciones que corresponden a: ácidos fenólicos (F1), flavanoles y antocianos (F2) y flavonoles (F3).

En la Tabla \_\_ se muestra el IPT de cada una de las fracciones polifenólicas de las muestras estudiadas.

Tabla \_\_. IPT de las fracciones F1, F2, F3 y de las muestras y % de contribución.

Muestra	F1 <sup>a</sup>	F2 <sup>a</sup>	F3 <sup>a</sup>	Σ Fa	IPT de la muestra <sup>a</sup>	% Contribución
P1	364 ± 21	52 ± 4	3 ± 0.00	319	751 ± 14	55.79
P2	266 ± 45	51 ± 2	0 ± 0.00	317	5.26 ± 12	60.27
P3	317 ± 28	54 ± 2	1 ± 0.00	372	6.43 ± 19	58.86
P4	235 ± 22	105 ± 1	3 ± 0.00	343	452 ± 21	75.88
P5	254 ± 24	102 ± 1	7 ± 0.10	363	487 ± 41	74.54
P6	300 ± 31	85 ± 2	2 ± 0.12	387	501 ± 14	79.24
ME	413 ± 47	49 ± 1	4 ± 0.00	466	805 ± 17	57.89
ML	462 ± 56	53 ± 1	1 ± 0.00	516	973 ± 27	53.03
AE	486 ± 58	169 ± 2	8 ± 0.01	6.63	1045 ± 41	63.45
AL	571 ± 31	26 ± 0.4	4 ± 0.1	6.01	1059 ± 52	56.75
EE	521 ± 44	90 ± 2	8 ± 0.2	6.19	1150 ± 92	53.83
EL	447 ± 26	203 ± 4	6 ± 0.1	6.56	1042 ± 47	62.96
ZL	23 ± 0.3	3 ± 0.1	--	0.26	140 ± 2	18.57
ZC	105 ± 21	42 ± 0.8	6 ± 0.2	1.93	377 ± 5	51.20

<sup>a</sup> mg/100g o mg/100mL de ácido gálico de pulpa y zumo respectivamente ± desviación estándar.

Se observa que la suma de las tres fracciones contribuyen con 55-89% y 53-63% del IPT de las muestras para la pulpa y el zumo, respectivamente. En el caso del zumo comercial (ZL) esta contribución es de 18% y para el zumo concentrado de 51%. Se ha constatado que la F1 es la fracción mayoritaria para todas las muestras ensayadas, por lo tanto es la que más contribuyen al IPT.

#### 5.2.2.4 Determinación de los Compuestos Fenólicos por CLAE

##### Condiciones de Identificación

Las muestras se inyectaron directamente en las condiciones descritas anteriormente (p. \_\_) sin más tratamiento previo de centrifugación y filtración (pulpa y zumo concentrado) o solamente filtración (resto de las muestras).

Se ensayaron los ácidos fenólicos y cinámicos disponibles en el mercado como patrones puros y los compuestos flavonoides más habituales descritos, en total 37 compuestos.

Los compuestos se identificaron por la comparación del tiempo de retención y del espectro UV del pico con el del estándar correspondiente (Tabla 19). Para verificar una correcta identificación, se procedió a sembrar las muestras con el patrón comprobando que el área del pico aumentaba. Si se obtenía un pico único se comprobó la pureza del mismo verificando la homogeneidad espectral a lo largo de todo el pico.

Tabla 19: Compuestos identificados, número de pico, tiempo de retención (tr) y  $\lambda_{\text{máximo}}$ :

Nº de Pico	Compuestos	tr	$\lambda_{\text{máximo}}$
1	Furfural	20.5	278.8
2	Procianidina B1	25.7	281.2
3	Ácido 5-O cafeoilquinico (Ácido clorogénico)	34.0	326.3
4	Galato de epigallocatequina	37.8	276.5
5	(+)- epicatequina	40.2	278.8
6	Rutina	52.1	257.5/355

Se ha incluido en esta Tabla el furfural, a pesar de que no es un compuesto fenólico, porque presenta características espectrales similares a los compuestos fenólicos.

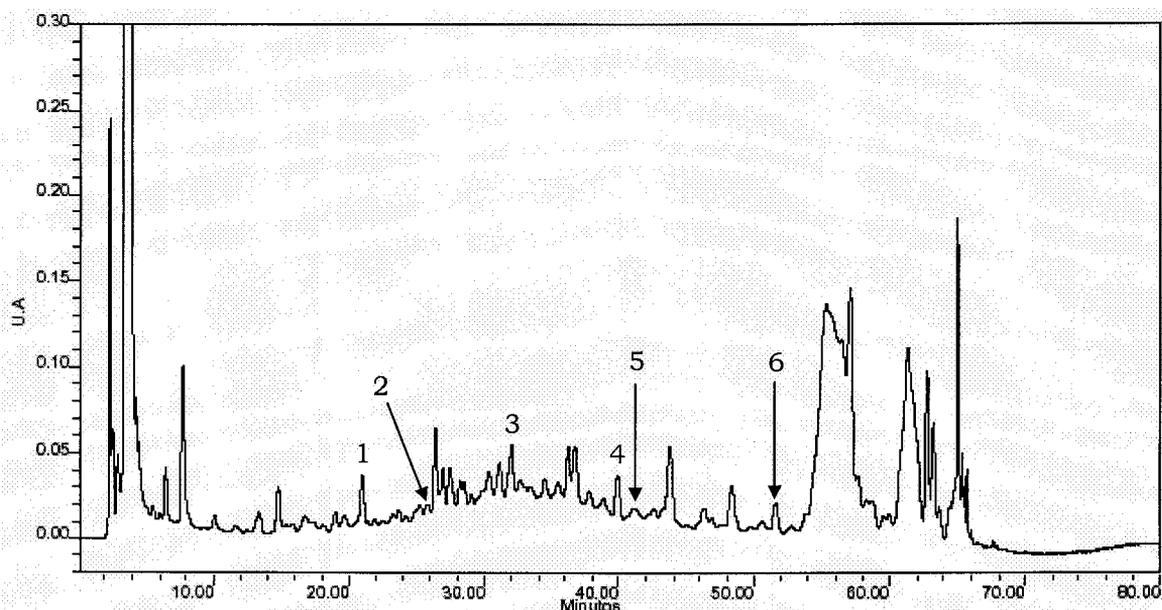


Figura 24. Identificación de los polifenoles de una muestra de zumo de acerola. 1. Furfural, 2. Procianidina B1, 3. Ácido Clorogénico, 4. Galato de Epigallocatequina, 5. (+)-Epicatequina, 6. Rutina.

Como se observa (Figura 24), el cromatograma muestra un mayor número de compuestos, algunos de ellos tienen espectros UV parecidos a estándares conocidos de compuestos fenólicos o productos de la reacción de Maillard (Tabla 20). Sin embargo, cuando se sembró la muestra se constató que no corresponden a ninguno de estos compuestos.

Tabla 20: Patrones fenólicos ensayados, tiempo de retención y  $\lambda_{\text{máximo}}$ :

Patrones ensayados	Tr	$\lambda_{\text{máximo}}$
(+)- catequina	28.9	278.8
Ácido cafeico	34.8	323.9
Ácido siríngico	35.7	276.5
5 metilfurfural	36.4	293
Aldehído vainillico	38.0	281.2/309.7
Ácido p-cumárico	44.2	309.7
Ácido ferúlico	46.3	323.9
Kaempferol	65.9	267/365.4

Para comprobar si los compuestos de espectro parecidos eran ésteres de los fenoles se sometió la muestra de zumo de acerola a hidrólisis ácida (1:1 HCl pH 2, 30 minutos y 1 hora en ultrasonido **CITA**). No obstante, los

cromatogramas obtenidos tras la hidrólisis no tienen ninguno de estos ácidos fenólicos (Figura 25).

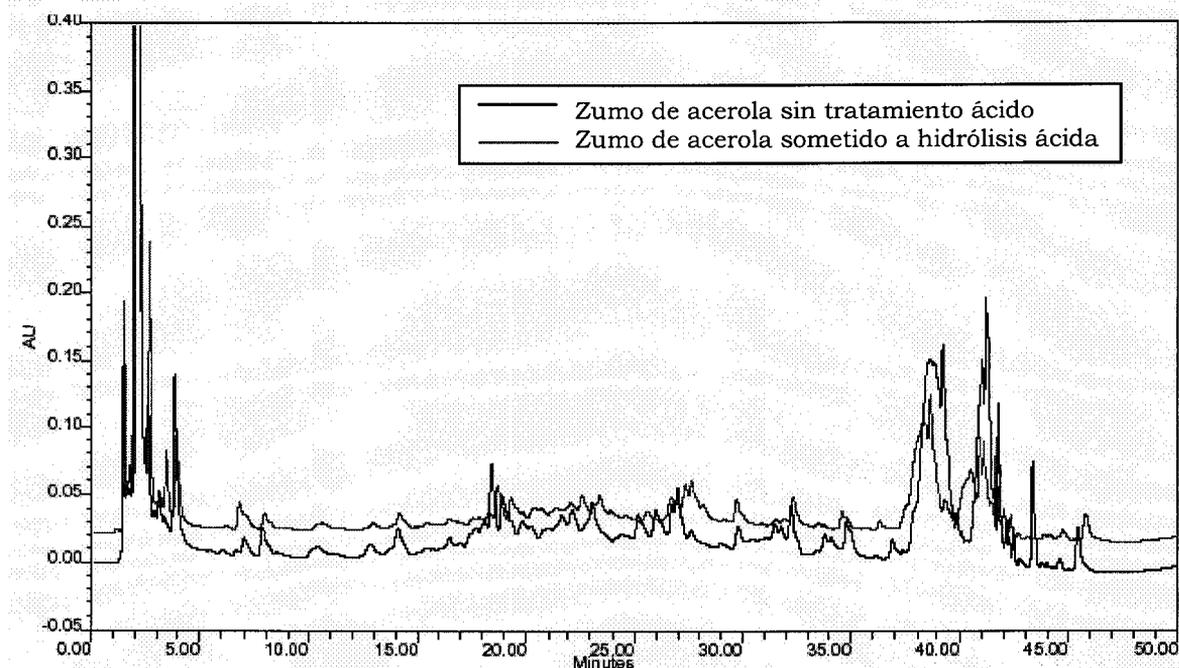


Figura 25: Cromatograma de una muestra de zumo de acerola antes y después de la hidrólisis ácida.

De los picos no identificados hay cuatro que tienen un espectro similar a dímeros de catequina y epicatequina. Estos se cuantifican como procianidina B1 (Tabla 21). Otros cinco se cuantifican como rutina, ya que presentan espectro de absorción UV similar. Se debe tratar de diferentes mono o diglicósidos de la quercetina por unión del azúcar en la posición OH libre del anillo C (Tabla 21).

Además del ácido 5-O cafeilquinico (tr = 34 minutos), encontramos otro pico a 33,4 minutos con características espectrales casi idénticas. Ambos se cuantifican como ácido clorogénico, siguiendo el criterio (Clifford, 2003) de que los ácidos clorogénicos son una familia de esteres que se forman entre ciertos ácidos trans-cinámicos y el ácido quinico.

Tabla 21: Compuestos análogos a patrones.

Compuesto análogo	Tr	$\lambda_{\text{máximo}}$
	17.8	281.2
Procianidina B1	19.1	281.2
	31.0	281.2
	36.1	281.2
	33.4	326.4
Ácido clorogénico	47.7	257.5/352.6
	56.6	257.5/355
	58.0	255.5/355
	60.0	257.5/357
	63.7	257.5/355.2
	56.6	257.5/355

*Cuantificación:*

Los compuestos identificados (6 en total) se cuantificaron mediante calibrado externo con el estándar correspondiente. Las rectas de calibrado obtenidas se muestran en la siguiente Tabla 22.

Tabla 22: Ecuaciones de las rectas de calibrado.

Compuesto	Ecuación	Coefficiente de Variación (r)
Furfural	$y = -388.10^3 + 7556.10^2 x$	0.998
Procianidina B1	$y = -6211 + 22564 x$	0.999
Ácido 5-O cafeoilquinico (ácido clorogénico)	$y = -107.10^3 + 2194.10^2 x$	0.988
Galato de epigallocatequina	$y = -481.10^3 + 1179.10^2 x$	0.999
(+)- epicatequina	$y = -150.10^3 + 46028 x$	0.997
Rutina	$y = -246.10^3 + 68543 x$	0.994

Los compuestos de espectro similar se han cuantificado suponiendo que son análogos y que presentan el mismo coeficiente de extinción molar, así, se han usado para cuantificar las rectas del clorogénico, procianidina B1 y rutina.

En las Tablas \_\_ y \_\_ se muestran los resultados obtenidos para las muestras de zumo y pulpa de la presente memoria. Se incluyen en estas Tablas todos los compuestos que han sido identificados:

Tabla 23: Composición fenólica de zumos de acerola

Compuestos	Muestras de Zumos (mg/ 100mL)							
	ME	ML	AE	AL	EE	EL	ZL	ZC
Furfural	--	--	--	--	--	--	0.15 ± 0.02	--
Procianidina B1	1.86 ± 0.24	1.44 ± 0.33	1.03 ± 0.19	1.23 ± 0.08	8.53 ± 0.15	5.59 ± 0.32	--	--
Ácido Clorogénico	--	0.07 ± 0.00	--	0.48 ± 0.00	--	0.16 ± 0.00	0.18 ± 0.04	--
Galato Epigallocateq	0.79 ± 0.06	0.74 ± 0.01	--	0.78 ± 0.04	1.40 ± 0.03	0.53 ± 0.00	--	3.19 ± 0.10
Epicatequina	--	--	--	--	--	--	--	1.38 ± 0.06
Rutina	0.58 ± 0.06	1.43 ± 0.37	0.70 ± 0.05	0.60 ± 0.01	1.02 ± 0.07	1.09 ± 0.23	0.47 ± 0.04	0.59 ± 0.10

Tabla 24: Composición fenólica de pulpas de acerola

Compuestos	Muestras de Pulpa (mg/ 100g)					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Furfural	--	--	--	--	--	--
Procianidina B1	2.20 ± 0.08	3.19 ± 0.30	1.38 ± 0.03	1.58 ± 0.10	2.17 ± 0.21	1.77 ± 0.30
Ácido Clorogénico	--	--	--	--	--	--
Galato Epigallocateq	--	0.89 ± 0.05	--	--	--	--
(+)- Epicatequina	--	--	--	--	--	--
Rutina	1.05 ± 0.10	0.90 ± 0.15	0.96 ± 0.02	1.75 ± 0.06	1.71 ± 0.02	3.01 ± 0.13

El furfural es un compuesto que se forma por la reacción de Maillard. Cuando analizamos las Tablas 23 y 24, se ha detectado que el furfural solo aparece en una muestra comercializada y que su presencia se debe probablemente a la caramelización de los azúcares del zumo cuando este ha sido pasteurizado. Tampoco se ha detectado 5-hidroximetilfurfural, compuesto que suele aparecer en el proceso de pasterización de los productos (Ciolino, 1998).

En las muestras de pulpa (Tabla 24), los polifenoles presentes son mayoritariamente la procianidina B1 y la rutina. En el zumo, además de estos compuestos, se presentan el ácido clorogénico, el galato de epigallocatequina y la epicatequina. Según Antolovich et al. (2000), el perfil polifenólico es característico de cada especie de fruta mientras que las diferencias entre la variedad y el clima son de importancia secundaria. Estos autores también discuten la distribución de los compuestos fenólicos entre las diferentes partes de la fruta que difieren cualitativamente y cuantitativamente. Cuando analizamos las distintas cosechas, en general, se hallaron concentraciones más altas en las muestras del mes de enero (EL, EE).

Hay que destacar que los valores obtenidos para el zumo presentan una mayor variabilidad, probablemente debido a que se procesaron manualmente en el laboratorio en tanto que los valores de pulpa son más homogéneos una vez que esta era comercial.

En la bibliografía son escasas las informaciones sobre la caracterización de los fenoles de la acerola, de hecho, hasta el momento, hemos encontrado apenas un estudio con este objetivo. *Vendramini y Trugo (2004)*, determinaron los compuestos fenólicos del fruto de acerola e identificaron el ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido clorogenico, Kaempferol y quercitina. No obstante, los autores utilizaron para los análisis un cromatógrafo con detector UV con longitud de onda fija sin diodo siendo posible la confusión que en este trabajo se ha evitado sembrado las muestras para comprobar si los picos eran los compuestos identificados.

#### **5.2.2.5 Identificación y Cuantificación de Carotenoides: Influencia del Procesado**

Se han separado 17 carotenoides por TLC y HPLC. Para identificarlos se han usado diferentes criterios:

- a) Por comparación de los espectros UV-visibles y tiempos de retención con los patrones puros. En el caso de que estos no sean comerciales los datos espectrales empleados en la identificación son los descritos en la bibliografía.
- b) Para completar los criterios de identificación se ha realizado tests de derivación en micro escala, tras el aislamiento por TLC, para separar los grupos 5,6-epoxido, hidroxil y carbonil. Se identificaron trazas de criptoxantina-5,6-epoxido y criptoxantina-5,8-epoxido.
- c) También se han realizados ensayos de epóxido con los extractos de pigmentos, analizando los resultados antes y después de la adición

del HCl. En las Tablas 25 y 26 se muestran las propiedades cromatográficas y espectrofotométricas de los carotenoides hallados en la acerola y sus productos derivados, respectivamente. La Figura 26 representa el cromatograma obtenido de la esterificación del extracto carotenoide de la fruta madura. Todas las muestras analizadas, fruta y productos industrializados, presentan un perfil cromatográfico similar para la mayoría de los carotenoides.

Tabla 25: Características cromatográficas usadas para la identificación de carotenoides en frutas de acerola. Adsorbente cromatográfico para TLC: Silicagel 60GF<sub>254</sub>. Sistema de solventes: a) éter de petróleo ligero (40-60°C)-acetona-dietilamina (10:4:1), b) hexano-etil acetato-etanol-acetona (95:3:2:2), c) benceno-acetona (4:1)

Carotenoides	TLC		Datos espectrofotométricos,		Test Epóxido		
	Sistema de solventes	Valor R <sub>f</sub>	$\lambda_{max}(nm)$		Banda Hipsocrómica (nm) después del tratamiento con HCl	Acetilación	Reducción
			Éter de Petróleo Ligero 40-60°C	Etanol			
Neoxantina	A	0.23	412, 436, 466	410, 436, 466	14	+	-
Violaxantina	A	0.34	416, 468, 502	414, 436, 466	40	+	-
Luteina	A	0.41	418, 442, 470	418, 442, 472	0	+	-
$\beta$ -Criptoxantina	B	0.85	(424), 448, 474	(428), 446, 470	0	+	-
$\beta$ -Caroteno	A	1.00	(426), 444, 470	(426), 448, 476	0	-	-
Anteraxantina	A	0.42	424, 442, 470	(426), 444, 472	18	+	-
Mutatoxantina	C	0.25	(404), 424, 454	(406), 426, 456	0	+	-
Neocromo	A	0.19	399, 418, 446	400, 418, 446	0	+	-
Luteoxantina	A	0.28	402, 426, 448	400, 420, 446	20	+	-
Auroxantina	A	0.41	378, 400, 424	380, 400, 422	0	+	-

Tabla 26: Propiedades espectroscópicas principales de los carotenoides obtenidos de la acerola por HPLC.

Nº Pico <sup>a</sup>	Carotenoides	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>b,c</sup>	%III/II <sup>d</sup>
1	Neoxantina	3.51	416, 440, 470	85
2	Neoxantina isomero	4.73	416, 440, 470	86
3	Neocromo	5.04	402, 426, 452	76
4	Neocromo isomero	5.37	402, 424, 452	74
5	Violaxantina	7.02	420, 444, 472	96
6	Violaxantina isomero	7.75	418, 440, 468	96
7	Luteoxantina	8.26	400, 420, 448	112
8	Auroxantina	9.05	382, 404, 448	97
9	Anteraxantina	9.15	428, 448, 476	52
10	Mutatoantina	9.42	408, 430, 456	48
11	Luteina	10.19	(426), 450, 476	55
12	cis-Luteina	10.39	(422), 444, 470	52
13	Crptoxantina-5,8- epóxido	11.39	(402), 424, 450	55
14	Criptoxantina-5,6- epóxido	11.75	(424), 448, 476	40
15	β-Criptoxantina	12.62	(428), 452, 478	26
16	β-Caroteno	14.07	(428), 452, 478	22
17	cis-β-Caroteno	15.27	(424), 450, 474	15

<sup>a</sup> Numerado de acuerdo con el cromatograma descrito en la Figura 1

<sup>b</sup> Obtenido con detector de fotiodos

<sup>c</sup> El paréntesis indica un hombro

<sup>d</sup> %III/II. Calculado según Britton (1995)

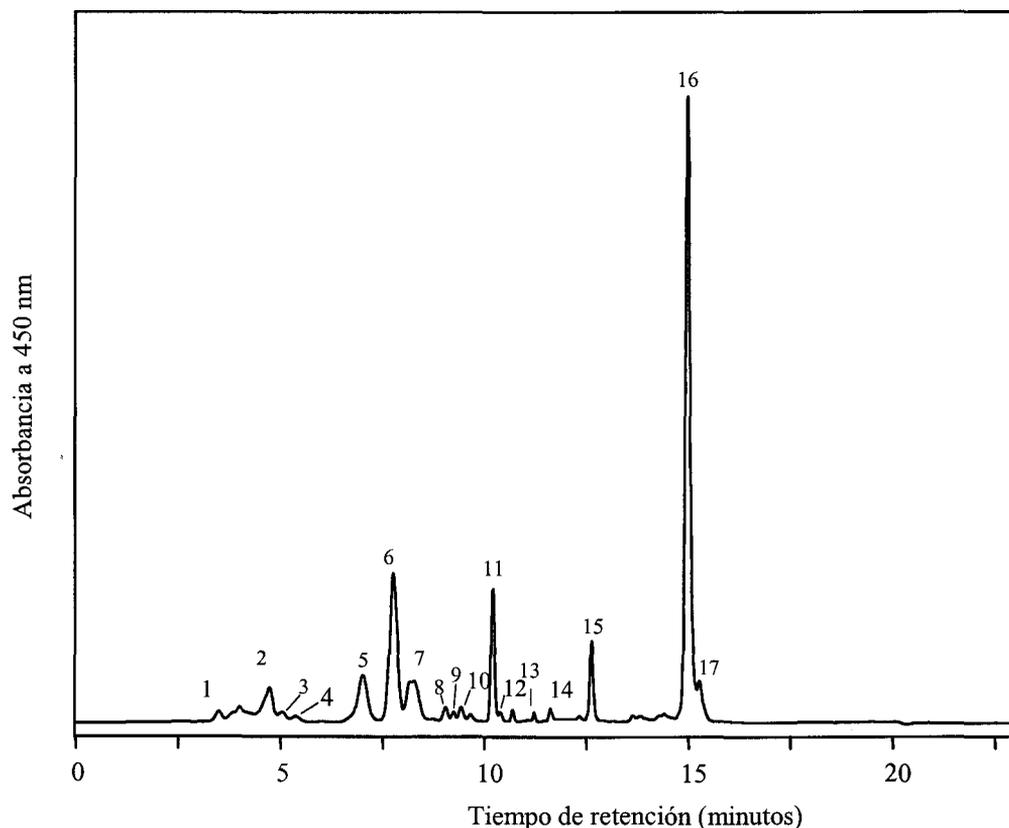


Figura 26: Cromatograma obtenido a 450nm por desesterificación del extracto carotenoide de la fruta madura. Picos identificados: 1. neoxantina; 2. isómero de neoxantina; 3. neocromo; 4. isomero de neocromo; 5. violaxantina; 6. isómero de violaxantina; 7. luteoxantina; 8. auroxantina; 9. anteraxantina; 10. mutatoxantina; 11. luteína; 12. cis-luteína; 13. criptoxantina-5,8-epóxido; 14. criptoxantina-5,6-epóxido; 15.  $\beta$ -criptoxantina; 16.  $\beta$ -caroteno; 17. cis- $\beta$ -caroteno.

#### *Cambios en el perfil carotenoide durante la maduración de la fruta:*

La composición carotenoide de la fruta ha sido analizada en tres estadios consecutivos de maduración: envero (E), fruto maduro (M) y sobremaduro (SM). En la Tabla 27 se resumen los cambios de la composición carotenoide durante la maduración y en la Figura 27 se describe el camino de la biosíntesis carotenoide de la acerola, que se propone tomando como referencia la secuencia de los cambios en la estructura de los pigmentos durante la maduración. Se describe también la transformación de los pigmentos con grupo final 5,6 - epóxido en 5,8-epóxido como resultado de la

liberación de ácidos orgánicos (mayoritariamente vitamina C) durante la sobremaduración y procesado de la fruta. No obstante, la vía propuesta es común a la mayor parte de los frutos en que predominan los carotenos, hidroxí y epoxi xantofilas (Gross, 1987).

Tabla 27: Composición carotenoides y valores de Vitamina A en frutas de acerola en diferentes estadios de maduración.

Carotenoides	Concentración ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ fruto fresco) <sup>a</sup>		
	Envero (E)	Madura (M)	Sobremadura (SM)
Neoxantina	10.96 $\pm$ 0.94	21.59 $\pm$ 1.21	39.73 $\pm$ 1.89
Neocromo	6.25 $\pm$ 0.17	13.42 $\pm$ 0.47	9.15 $\pm$ 0.32
Violaxantina	17.60 $\pm$ 0.70	151.34 $\pm$ 8.03	395.33 $\pm$ 16.73
Luteoxantina	1.12 $\pm$ 0.01	48.30 $\pm$ 2.05	54.90 $\pm$ 2.34
Auroxantina	1.06 $\pm$ 0.02	21.82 $\pm$ 0.78	5.36 $\pm$ 0.08
Anteraxantina	3.53 $\pm$ 0.75	21.79 $\pm$ 0.61	31.81 $\pm$ 1.78
Mutatoxantina	1.27 $\pm$ 0.25	8.32 $\pm$ 0.29	11.04 $\pm$ 0.31
Luteína	78.22 $\pm$ 14.53	144.69 $\pm$ 6.21	99.21 $\pm$ 10.21
cis-Luteína	2.96 $\pm$ 1.38	11.84 $\pm$ 0.60	8.72 $\pm$ 0.11
Criptoxantina-5,8-epóxido	-	-	tr <sup>a</sup>
Criptoxantina-5,6-epóxido	-	-	tr
$\beta$ -Criptoxantina	16.36 $\pm$ 2.28	108.33 $\pm$ 5.39	417.46 $\pm$ 17.11
$\beta$ -Caroteno	109.19 $\pm$ 18.00	783.88 $\pm$ 47.21	536.55 $\pm$ 27.31
cis- $\beta$ -Caroteno	6.29 $\pm$ 2.32	61.31 $\pm$ 11.20	36.62 $\pm$ 5.90
Total	254.22 $\pm$ 39.03	1396.63 $\pm$ 84.05	1645.88 $\pm$ 84.09
Vit A (RE/100 g f)	20.09 $\pm$ 3.38	144.78 $\pm$ 8.41	127.26 $\pm$ 6.47
Valor ORAC ( $\mu\text{M TE}$ )	93.42 $\pm$ 5.96		173.77 $\pm$ 17.76 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación Estándar (n=3)

<sup>b</sup> tr: trazos.

<sup>c</sup> Datos correspondientes a los extractos combinados (proporción 1:1) del fruto maduro (M) y sobremaduro (SM).

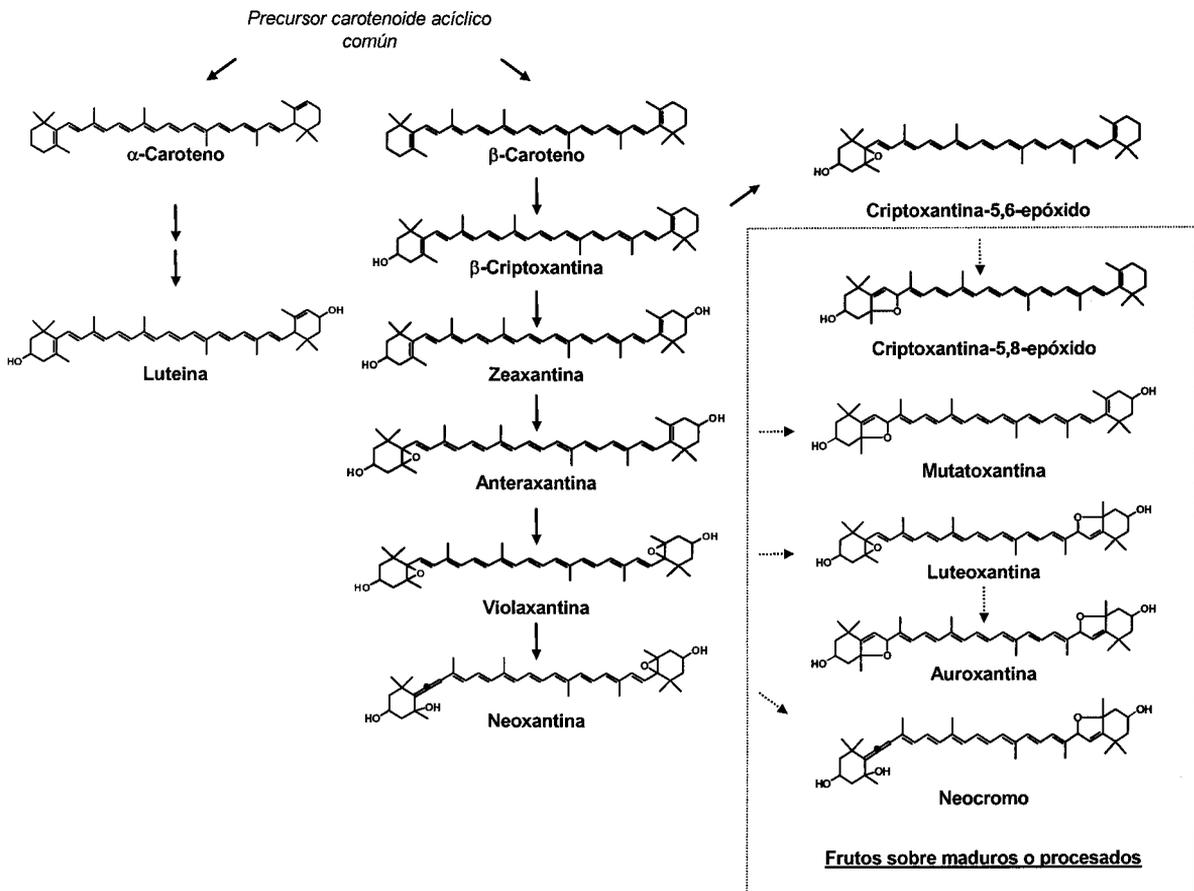


Figura 27: Esquema de la vía biosintética carotenoides de frutos de acerola y modificación de los carotenoides que contienen grupos 5,6-epóxido durante el procesamiento y almacenamiento.

El  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína y violaxantina están presentes en todas las frutas y sus productos derivados ensayados, resultados que corresponden a otros estudios de carotenoides en frutos de acerola (Azevedo-Meleiro y Rodríguez-Amaya, 2004; Agostini-Costa et al., 2003; Godoy y Rodríguez-Amaya, 1994; Cavalcante y Rodríguez-Amaya, 1992). Entre ellos, el  $\beta$ -caroteno se ha destacado en todas las muestras analizadas (40 a 60% del contenido total de carotenoides), presentando valores de hasta el 75% en el caso del zumo. Neoxantina, neocromo, luteoxantina, auroxantina, anteraxantina, mutatoxantina, cis-luteína, cis- $\beta$ -caroteno, criptoxantina-5,6-epóxido y criptoxantina-5,8-epóxido fueron encontrados en menor cantidad, no excediendo del 5% del total de carotenoides en ciertos casos. Durante el

envero, el  $\beta$ -caroteno y la luteína fueron los pigmentos mayoritarios, con un 46 y 33% respectivamente, seguidos por violaxantina y neoxantina (17,60 y 10,96 en cada caso). El perfil de estos pigmentos guarda relación con la presencia de cloroplastos, que se transforman en cromoplastos durante la maduración.

Como resultado de la maduración, en el fruto sobremaduro, hubo un aumento acusado del contenido total de carotenoides (6,88 veces). En este estadio, no desapareció ninguno de los pigmentos y tampoco hubo biosíntesis de nuevos, a excepción de la formación de 5,8-epóxidos y sus derivados. Se constató un aumento general en la ruta biosintética que da lugar a los carotenoides de la serie  $\beta$ - $\beta$  (con  $\beta$ -caroteno como precursor común) sobre la ruta principal de la serie de los  $\beta$ - $\epsilon$ . Durante la maduración, el  $\beta$ -caroteno y la criptoxantina aumentan desde 109,19 y 16,36  $\mu\text{g}/100\text{g f}$  (peso fresco) hasta 536,55 y 417,46  $\mu\text{g}/100\text{g f}$  respectivamente. La luteína, el único componente de la serie  $\beta$ - $\epsilon$ , aumenta de 78,22 a 99,21  $\mu\text{g}/100\text{g f}$ . En el caso de las frutas maduras, ésta se diferencia por aumentar (3-4 veces) los contenidos de  $\beta$ -criptoxantina y violaxantina. En el fruto sobremaduro, ocurre ya una disminución en  $\beta$ -caroteno, que actúa como precursor común de ellos.

Los pigmentos que presentan grupos 5,6-epóxido (violaxantina, neoxantina, anteraxantina, criptoxantina 5,6-epóxido) se encuentran parcialmente transformados en el correspondiente derivado 5,8-epóxido debido a la reorganización interna de los grupos 5,6-epóxidos en grupos 5,8-furanoides, catalizados por ácidos liberados durante el ablandamiento de las frutas sobre maduras.

La proporción de isómeros *cis* de carotenoides con respecto al total de las formas *trans* fue casi constante durante todo el proceso de maduración. Así, las formas *cis*- $\beta$ -caroteno suponen 6,4-7,3% con relación a todas las formas *trans*- $\beta$ -caroteno, y las formas *cis*-luteína en 7,6-8,1% la para la fruta madura y sobremadura. Estos valores son ligeramente bajos en el estadio de envero, 5,4 y 3,6% para *cis*- $\beta$ -caroteno y *cis*-luteína respectivamente.

El  $\beta$ -caroteno, cis- $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina son los principales pigmentos que contribuyen a la actividad de provitamina A en la acerola. El contenido correspondiente de pro-vitamina A, expresado como valores de vitamina A (retinol/100g f) para cada fase de maduración se ofrece en la Tabla \_\_. El  $\beta$ -caroteno es el carotenoide que más contribuye a la actividad de la vitamina A (90% en las muestras de frutas de envero y maduras y aproximadamente 70% en las frutas sobremaduras). La  $\beta$ -criptoxantina ha contribuido con un 6% en los dos primeros estadios y hasta 27% en el último. Se ha observado un aumento de 7,2 veces en el contenido de vitamina A en el cambio de los estadios de envero a fruto maduro. Sin embargo, en el fruto sobremaduro se ha constatado una disminución del 12%. La reducción final de la vitamina A en el fruto del último estadio está relacionada directamente con el descenso del contenido en  $\beta$ -caroteno, y la correspondiente disminución de la  $\beta$ -criptoxantina, que contribuye con el 50% de la pro-vitamina A con respecto al  $\beta$ -caroteno. No obstante, los valores de Vitamina A son bajos si los comparamos con otras frutas como: mango, albaricoque, pimienta y perejil, sin embargo es similar a la guayaba, papaya y algunas variedades de tomates.

#### *Influencia del procesado en el perfil carotenoide y su actividad antioxidante*

Se observaron cambios en el perfil carotenoide como resultado del procesado de la acerola (Tabla 28). En el caso de la pulpa congelada los pigmentos fueron casi idénticos, en términos de cantidad y calidad, a la fruta madura. Sin embargo, en el caso del zumo concentrado y en el comercial envasado los cambios observados han sido más significativos. En el primer caso, el zumo concentrado pasteurizado, el contenido en carotenoides ha descendido a un 17% con respecto a la pulpa congelada, pero el cambio más evidente ha sido en los carotenoides que poseían los grupos 5,6-epóxido (violaxantina, neoxantina y anteraxantina), presente en la fruta. Estos se han transformados en sus tres derivados correspondientes (auroxantina, neocromo y mutacromo). Esta transformación en la estructura de los pigmentos era previsible como resultado del contacto con ácidos orgánicos durante la producción y almacenamiento del zumo concentrado.

Tabla 28: Composición carotenoides y valores de Vitamina A en productos derivados de la acerola.

Carotenoides	Concentración ( $\mu\text{g}/100 \text{ g fw}$ ) <sup>a</sup>		
	Pulpa congelada	Zumo concentrado	Zumo comercial <sup>b</sup>
Neoxantina	45.84 $\pm$ 0.95	-	-
Neocromo	23.32 $\pm$ 1.61	14.83 $\pm$ 2.98	-
Violaxantina	122.02 $\pm$ 9.74	-	-
Luteoxantina	21.53 $\pm$ 3.67	-	-
Auroxantina	12.10 $\pm$ 2.18	42.89 $\pm$ 11.06	-
Anteraxantina	6.14 $\pm$ 0.21	-	-
Mutatoxantina	12.24 $\pm$ 0.85	70.62 $\pm$ 13.03	6.79 $\pm$ 0.17
Luteína	127.50 $\pm$ 2.15	206.27 $\pm$ 7.73	14.49 $\pm$ 0.04
cis-Luteína	7.86 $\pm$ 0.83	35.04 $\pm$ 13.50	2.48 $\pm$ 0.12
Criptoxantina-5,8-epóxido	tr <sup>b</sup>	tr	-
Criptoxantina-5,6-epóxido	tr	tr	-
$\beta$ -Criptoxantina	126.95 $\pm$ 1.31	87.36 $\pm$ 5.72	49.07 $\pm$ 2.31
$\beta$ -Caroteno	816.77 $\pm$ 0.13	630.00 $\pm$ 34.87	225.28 $\pm$ 11.16
cis- $\beta$ -Caroteno	61.98 $\pm$ 6.78	65.53 $\pm$ 3.32	18.86 $\pm$ 3.22
Total	1384.22 $\pm$ 2.59	1152.53 $\pm$ 4.40	316.95 $\pm$ 16.95
Vit A (retinol/100 g)	151.88 $\pm$ 0.43	117.75 $\pm$ 6.56	43.21 $\pm$ 2.32
Valores ORAC ( $\mu\text{M TE}$ )	134.82 $\pm$ 7.23	107.95 $\pm$ 13.56	98.79 $\pm$ 0.37

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación Estándar (n=3)

<sup>b</sup> Concentración y valores de vitamina A expresados en  $\mu\text{g}/100\text{mL}$  y (RE/100 mL) respectivamente, en este caso.

<sup>c</sup> tr: trazas.

En el zumo comercial, estos pigmentos no están presentes o apenas existen a niveles traza. Esto es debido a la acción de ácidos intrínsecos y añadidos sobre los pigmentos, y como consecuencia de la dilución durante el procesado del zumo. Esta puede ser la razón por la que el contenido en carotenoides, en estas muestras, sea bajo. Hay que resaltar que el contenido en vitamina C y en polifenoles era muy inferior al resto de las muestras analizadas, por lo que sospechamos que existe una dilución considerable durante el procesado.

La pasteurización de ambos zumos, concentrado y comercial, ha llevado a la duplicación de los isómeros de cis/trans del  $\beta$ -caroteno y luteína como consecuencia del proceso térmico, y así pues, a la reducción de su contribución a los valores de vitamina A. Tal situación ha sido descrita para el zumo pasteurizado de zanahoria, cuando el control de los parámetros del procesado es crítico. Se conoce que el efecto del procesado a un tiempo reducido (25 segundos a 110°) produce una bajada en los efectos de

isomerización de los pigmentos. Si el tiempo es excesivo (85 segundos a 110°) puede causar considerables pérdidas en los valores del  $\beta$ -caroteno así como las reacciones de isomerización (Desobry et al., 1998). En la fruta de acerola procesada, se encontraron valores altos de vitamina A para la pulpa congelada (151,88 RE/100g f) y para el zumo concentrado (117,75 RE/100g f), y mucho más bajos en el caso del zumo comercial (43,21 RE/100g f).

Como hemos visto anteriormente, el procesado puede afectar también a otros antioxidantes. Así, que la contribución a la capacidad antioxidante de los carotenoides con actividad de pro vitamina A o no, se ha visto afectada como consecuencia del procesado en la fruta fresca de acerola. Los valores ORAC expresados en Equivalentes de Trolox de diferentes fracciones carotenoides de las muestras estudiadas aparecen en las Tablas \_\_ y \_\_. Se observa una correlación directa entre los valores ORAC y el contenido en carotenoides. Una alta actividad antioxidante (173,77  $\mu$ M TE) corresponde a los extractos combinados del fruto maduro y sobre maduro (1:1), como una mezcla más representativa de la heterogeneidad del total de los frutos utilizados para el procesado industrial. En el caso del fruto inmaduro (envero) encontramos valores bajos (93,42  $\mu$ M TE). Teniendo como referencia los resultados de los valores de ORAC del fruto maduro, se observa que el alto nivel del procesado disminuye la capacidad antioxidante. Los factores externos, como las condiciones aplicadas en el procesado de la pulpa y del zumo afectan directamente el contenido en carotenoides y consecuentemente su capacidad antioxidante. La mejora de estos factores podrían ser aplicados en el orden de evitar la pérdida de la calidad del producto comercial.

### 5.2.3 Relación de la Actividad Antioxidante y Composición Química

La actividad antioxidante de la acerola debe estar relacionada con su contenido en vitamina C (de la que esta fruta es una excelente fuente), de su aporte en polifenoles y del contenido en carotenos. En los capítulos anteriores se muestran los resultados del análisis de la actividad antioxidante y de la composición química. En este apartado se pretende comparar la contribución de cada constituyente a la actividad antioxidante.

Así pues, se determinó la actividad antioxidante de una disolución del patrón de ácido ascórbico con las mismas concentraciones de las muestras ensayadas a la que se determinó la actividad antioxidante con los métodos ABTS, DPPH y ORAC. El valor de actividad encontrado se ha comparado con el valor TEAC de la muestra calculando el porcentaje de contribución. En las Figuras \_\_-\_\_ se representan gráficamente los resultados encontrados.

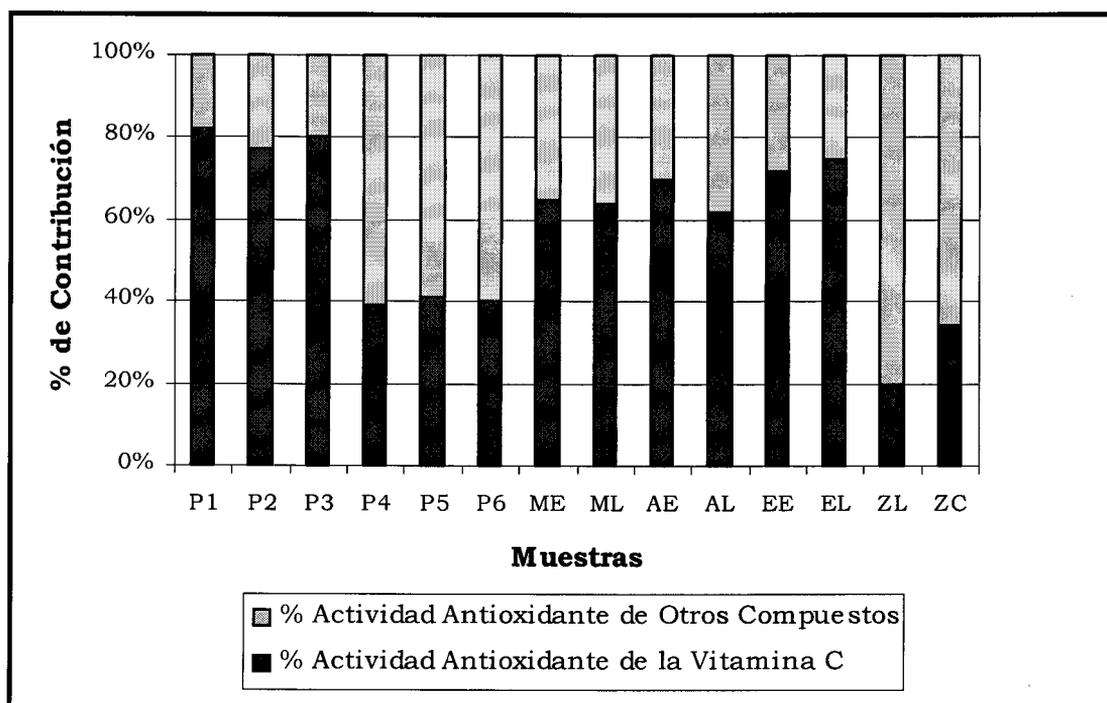


Figura 16: % de contribución de la actividad antioxidante de la vitamina C en las muestras de pulpa y zumo de acerola por el método ABTS (2 minutos).

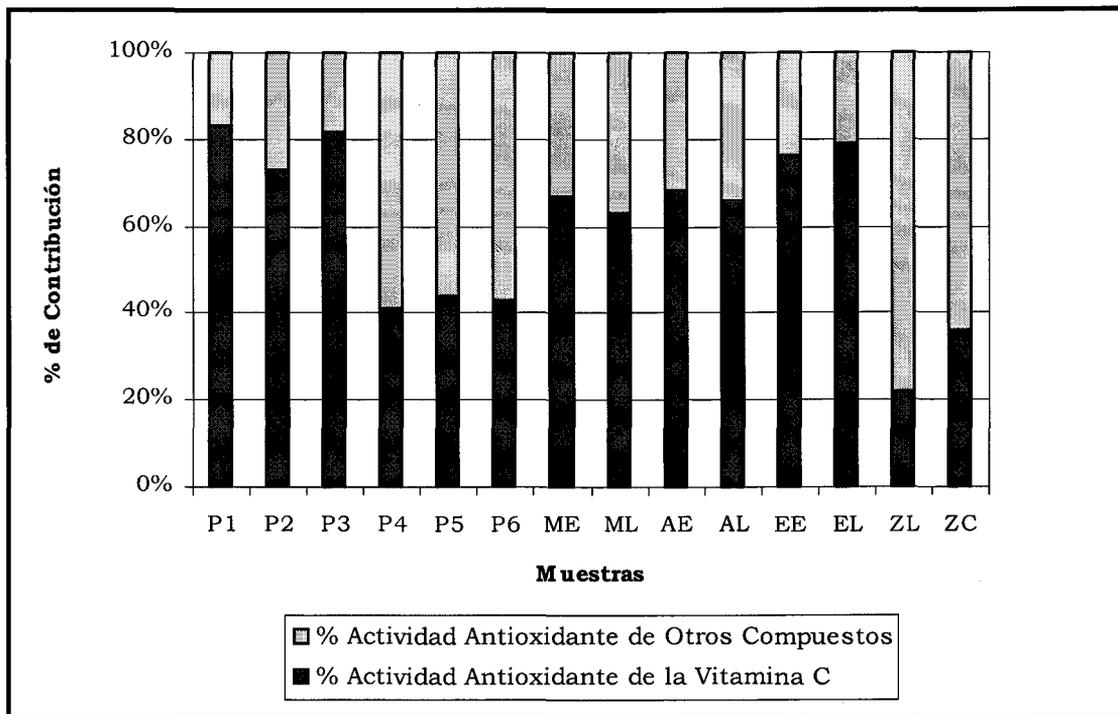


Figura 17: % de contribución de la actividad antioxidante de la vitamina C en las muestras de pulpa y zumo de acerola por el método **ABTS (15 minutos)**.

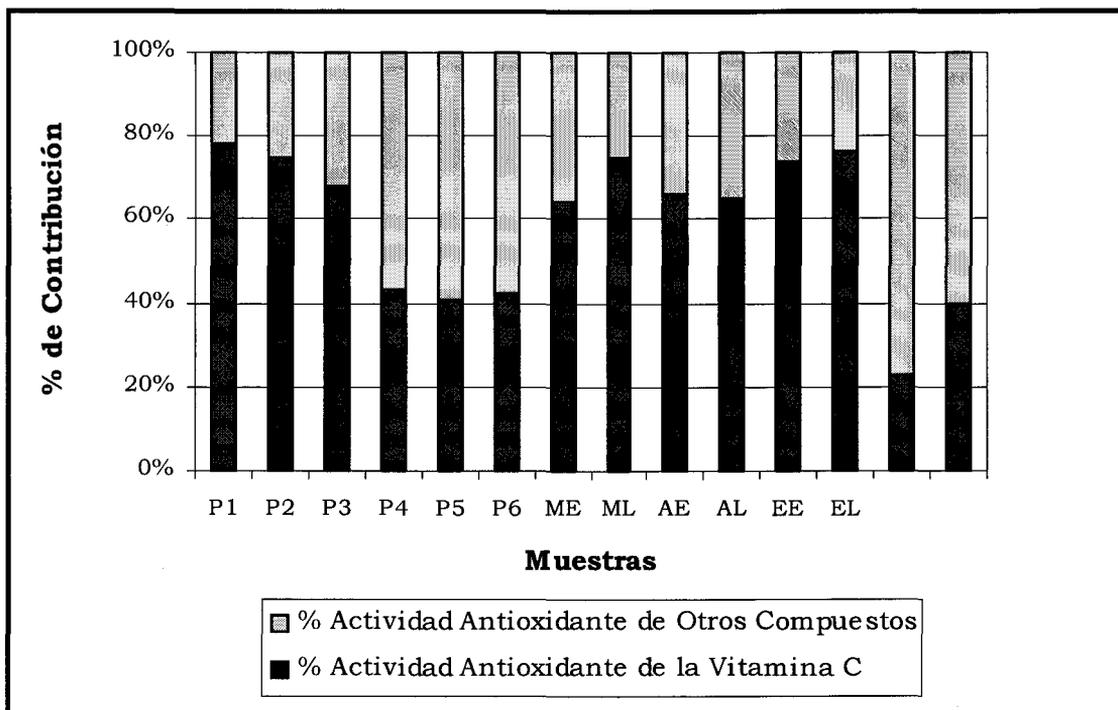


Figura 18: % de contribución de la actividad antioxidante de la vitamina C en las muestras de pulpa y zumo de acerola por el método **DPPH**.

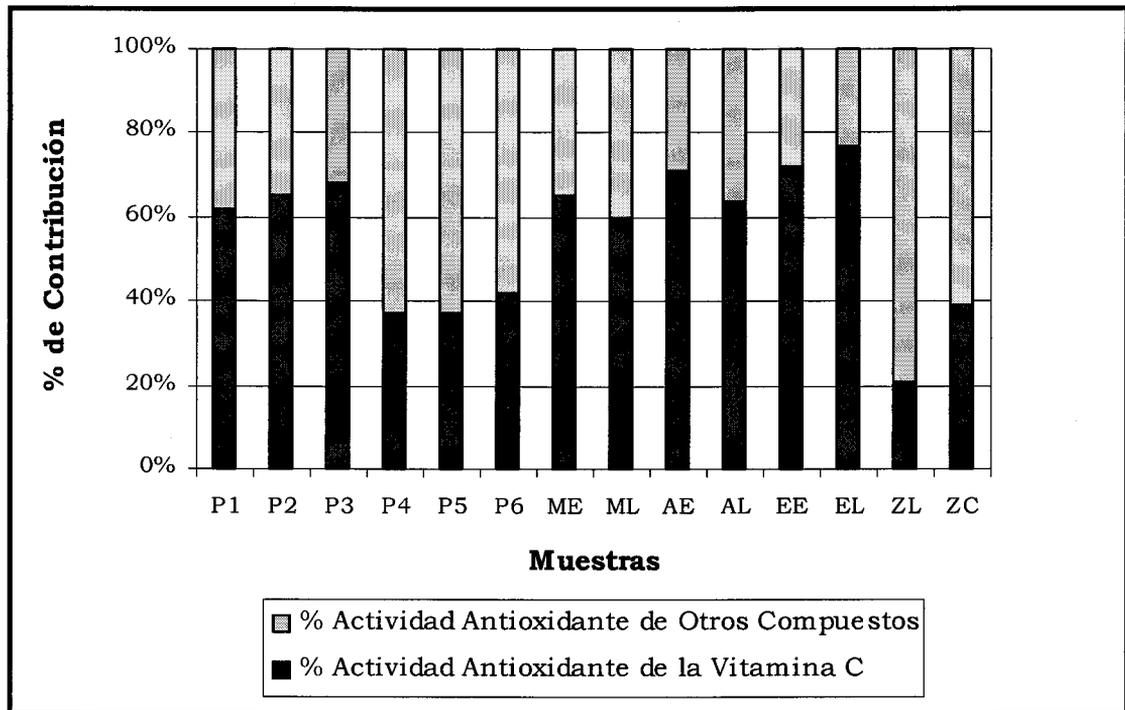


Figura 19: % de contribución de la actividad antioxidante de la vitamina C en las muestras de pulpa y zumo de acerola por el método **ORAC**.

Se ha observado que para los métodos ABTS (2 y 15 minutos), DPPH y ORAC el porcentaje de contribución de la vitamina C es elevado, contribuyendo con 39 - 83% de la actividad antioxidante total de las muestras de pulpa y del zumo procesado manualmente. En general, el ácido ascórbico representa un mayor porcentaje de la actividad en la pulpa (P1, P2, P3, P4, P5, P6) y resulta ser menor en el zumo procesado manualmente (ME, ML, AE, AL, EE, EL). Ello se puede explicar por la forma del procesado de la fruta, ya que el zumo lleva todas las partes de la acerola (piel, semilla y pulpa) y de ahí proceden otros compuestos que también se caracterizan por contener actividad antioxidante, como los fenoles, mayoritariamente encontrados en la piel.

*Gardner et al. (2000)*, han estudiado la contribución del potencial antioxidante de la vitamina C, carotenóides y fenoles en zumos de diferentes frutas encontrando que el ácido ascórbico contribuye con un 65 - 100% de la actividad antioxidante en 5 frutas cítricas (3 tipos de naranja y 2 de pomelo)

siendo esta contribución menor para la manzana (0,8%), piña (0,8%) y verduras (4,8%).

Posteriormente, se analizó la actividad antioxidante de las diferentes fracciones fenólicas después de la separación. Los datos obtenidos tras la aplicación de los métodos para las 3 fracciones, la suma de las mismas y el porcentaje de contribución frente al valor TEAC y ORAC de la pulpa y zumo de acerola, se recogen en las Tablas 14-17.

Tabla 14: Índice TEAC\* de las fracciones y de las muestras. Suma de las fracciones y % de contribución. **Método ABTS (2 minutos).**

Muestra	F1	F2	F3	$\Sigma$ F	TEAC de la muestra	% Contribución
P1	5.95 ± 0.91	1.11 ± 0.10	0.06 ± 0.01	7.12	64.76 ± 5.05	11.00
P2	6.58 ± 0.32	1.00 ± 0.29	0.03 ± 0.01	7.61	51.11 ± 2.10	14.89
P3	4.24 ± 0.58	0.93 ± 0.12	0.01 ± 0.00	5.18	46.16 ± 1.78	11.22
P4	13.03 ± 1.52	1.35 ± 1.96	0.04 ± 0.00	14.42	36.95 ± 1.18	39.03
P5	10.85 ± 1.65	1.51 ± 0.29	0.05 ± 0.02	12.41	38.80 ± 1.00	31.98
P6	15.61 ± 1.64	1.42 ± 0.33	0.05 ± 0.00	17.08	37.84 ± 0.71	45.13
ME	12.29 ± 0.57	1.64 ± 0.78	0.11 ± 0.02	14.04	90.28 ± 6.24	15.55
ML	13.93 ± 0.23	1.69 ± 0.83	0.02 ± 0.00	15.64	76.13 ± 2.42	20.54
AE	9.74 ± 0.20	2.46 ± 0.32	0.04 ± 0.01	12.24	91.76 ± 6.24	13.34
AL	13.53 ± 0.87	2.44 ± 0.16	0.02 ± 0.01	15.99	85.21 ± 8.27	18.78
EE	14.04 ± 1.59	1.20 ± 0.41	0.03 ± 0.00	15.27	81.50 ± 2.26	18.73
EL	12.56 ± 1.86	1.37 ± 0.00	0.02 ± 0.00	13.95	74.30 ± 2.14	18.77
ZL	--	--	--	--	2.03 ± 0.28	0
ZC	2.08 ± 0.13	0.40 ± 0.00	0.20 ± 0.00	2.68	32.16 ± 0.71	8.33

\* TEAC expresado en mmol/kg de pulpa y mmol/L de zumo

Tabla 15: Índice TEAC\* de las fracciones y de las muestras. Suma de las fracciones y % de contribución. **Método ABTS (15 minutos).**

Muestra	F1	F2	F3	Σ F	TEAC de la muestra	% Contribución
P1	5.17 ± 0.59	1.47 ± 0.37	0.03 ± 0.01	6.67	65.81 ± 6.06	10.13
P2	6.10 ± 0.56	1.38 ± 0.46	0.02 ± 0.00	7.50	51.47 ± 3.77	14.57
P3	4.05 ± 0.28	1.27 ± 0.26	0.01 ± 0.00	5.33	46.62 ± 2.87	11.73
P4	13.93 ± 2.96	2.05 ± 0.31	0.08 ± 0.00	16.06	38.83 ± 2.17	41.36
P5	12.40 ± 2.00	2.23 ± 0.36	0.09 ± 0.01	14.72	41.84 ± 1.84	35.18
P6	17.00 ± 2.93	2.11 ± 0.37	0.10 ± 0.03	19.21	40.90 ± 1.75	46.97
ME	13.63 ± 0.54	2.06 ± 0.16	0.16 ± 0.03	15.85	94.86 ± 9.27	16.71
ML	13.93 ± 0.80	2.50 ± 0.74	0.02 ± 0.00	16.45	76.39 ± 3.86	21.53
AE	13.05 ± 0.48	2.26 ± 2.01	0.05 ± 0.01	14.36	91.60 ± 8.75	16.77
AL	12.37 ± 0.13	1.67 ± 0.16	0.02 ± 0.00	14.06	85.80 ± 9.18	19.14
EE	15.32 ± 2.51	1.90 ± 0.52	0.08 ± 0.02	17.30	83.50 ± 2.92	20.70
EL	13.13 ± 2.62	2.03 ± 0.00	0.06 ± 0.00	15.22	76.71 ± 3.58	19.84
ZL	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.00	--	0.09	2.34 ± 0.26	3.85
ZC	2.33 ± 0.13	0.76 ± 0.01	0.36 ± 0.00	3.45	33.88 ± 1.06	10.19

<sup>a</sup> TEAC expresado en mmol/kg de pulpa y mmol/L de zumo

Tabla 16: Índice TEAC\* de las fracciones y de las muestras. Suma de las fracciones y % de contribución. **Método DPPH (equilibrio).**

Muestra	F1	F2	F3	Σ F	TEAC de la muestra	% Contribución
P1	6.24 ± 0.32	1.65 ± 0.36	0.22 ± 0.00	8.11	85.11 ± 3.30	9.55
P2	3.52 ± 0.21	2.65 ± 0.39	0.29 ± 0.01	7.50	77.99 ± 3.28	9.62
P3	8.81 ± 0.24	1.10 ± 0.18	0.31 ± 0.01	10.22	74.36 ± 6.21	13.74
P4	16.97 ± 0.13	1.63 ± 0.35	0.07 ± 0.00	18.67	39.89 ± 0.10	46.81
P5	16.36 ± 0.16	2.58 ± 0.39	0.11 ± 0.00	19.05	38.31 ± 0.70	49.53
P6	13.71 ± 0.13	2.50 ± 0.31	0.14 ± 0.00	16.35	39.81 ± 1.00	41.07
ME	17.18 ± 0.63	3.06 ± 0.16	0.19 ± 0.02	20.43	122.69 ± 8.15	16.65
ML	11.14 ± 0.58	2.71 ± 0.47	0.32 ± 0.00	14.17	95.70 ± 4.91	14.81
AE	20.15 ± 0.59	3.34 ± 0.48	0.28 ± 0.02	23.78	125.66 ± 8.37	18.92
AL	18.63 ± 0.24	1.47 ± 0.23	0.20 ± 0.01	20.30	112.98 ± 11.77	17.98
EE	14.74 ± 1.17	3.12 ± 0.53	0.06 ± 0.00	17.92	82.33 ± 1.82	21.76
EL	12.35 ± 1.09	2.86 ± 0.72	0.01 ± 0.00	18.07	91.80 ± 1.35	19.68
ZL	--	--	0.25 ± 0.09	0.25	2.74 ± 0.36	9.12
ZC	6.66 ± 1.15	3.01 ± 0.21	0.05 ± 0.00	9.72	36.56 ± 3.08	26.58

<sup>a</sup> TEAC expresado en mmol/kg de pulpa y mmol/L de zumo

Tabla 17: Valor ORAC\* de las fracciones y de las muestras. Suma de las fracciones y % de contribución. **Método ORAC.**

Muestra	F1	F2	F3	Σ F	Valor ORAC de la muestra	% Contribución
P1	14.25 ± 0.23	2.83 ± 0.07	0.16 ± 0.01	17.24	58.83 ± 1.76	29.30
P2	11.58 ± 1.90	2.02 ± 0.41	0.29 ± 0.02	13.89	47.42 ± 2.71	29.29
P3	10.64 ± 1.24	1.63 ± 0.22	0.21 ± 0.05	12.48	46.75 ± 2.28	26.70
P4	7.71 ± 0.24	0.95 ± 0.14	0.22 ± 0.02	8.88	34.58 ± 0.05	25.68
P5	9.20 ± 0.54	1.03 ± 0.02	0.19 ± 0.02	10.42	34.87 ± 1.97	29.88
P6	10.64 ± 0.85	0.72 ± 0.05	0.17 ± 0.01	11.53	40.40 ± 1.17	28.54
ME	21.81 ± 0.53	2.38 ± 0.35	0.34 ± 0.05	24.53	85.40 ± 3.64	28.72
ML	13.58 ± 2.35	2.48 ± 0.67	0.32 ± 0.03	16.38	50.57 ± 2.83	32.39
AE	12.39 ± 0.53	2.95 ± 0.13	0.35 ± 0.02	15.69	76.71 ± 1.34	20.45
AL	14.89 ± 0.28	1.58 ± 0.54	0.15 ± 0.01	16.62	57.52 ± 2.89	28.89
EE	18.92 ± 0.54	2.68 ± 0.14	0.21 ± 0.00	21.81	77.14 ± 5.59	28.27
EL	19.28 ± 0.52	1.50 ± 0.28	0.17 ± 0.01	20.95	83.03 ± 2.25	25.23
ZL	0.21 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.03 ± 0.00	0.38	1.26 ± 0.30	30.16
ZC	3.23 ± 0.59	2.58 ± 0.11	0.08 ± 0.02	5.89	22.37 ± 0.73	26.33

\* Valor ORAC expresado en mmol/kg de pulpa y mmol/L de zumo

Se constata que la Fracción 1 (ácidos fenólicos simples) es la que posee mayor actividad antioxidante, seguida de la Fracción 2 y Fracción 3, que es la de menor actividad. Ello ocurre en todos los métodos ensayados y para todas las muestras.

En las Figuras 20-23 se representa gráficamente el porcentaje de contribución de la actividad antioxidante de la vitamina C, la suma de las fracciones y los otros compuestos (carotenos) que participan de la actividad antioxidante total de las muestras de acerola ensayadas por los métodos ABTS (2 y 15 minutos), DPPH y ORAC.

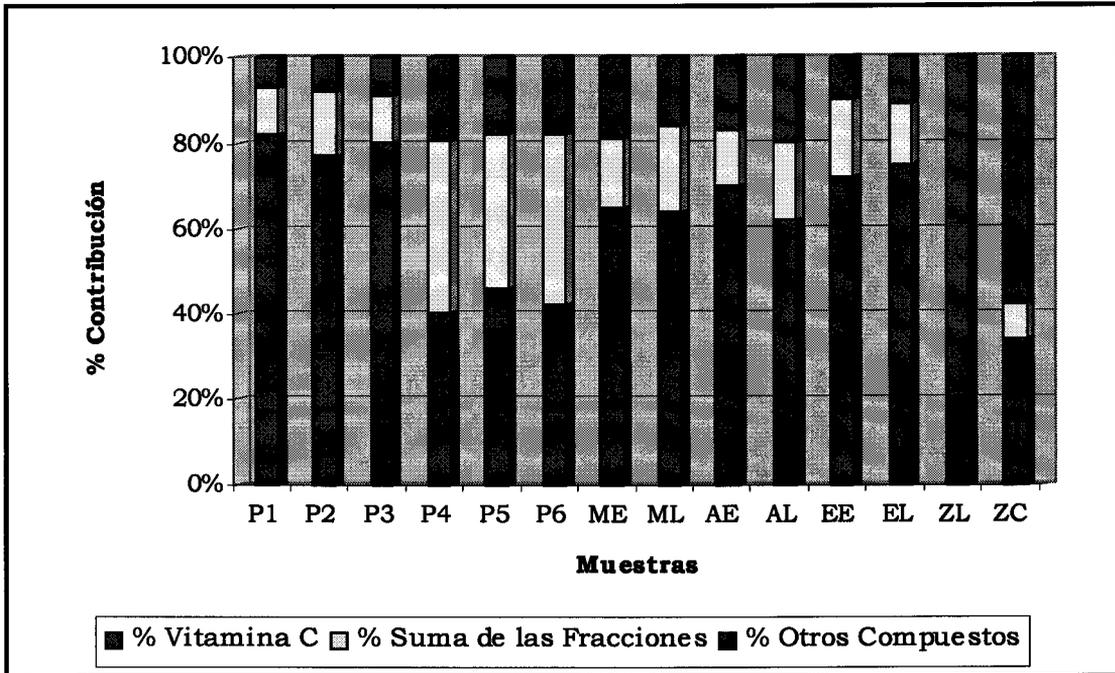


Figura 20: % de contribución de la actividad antioxidante total de vitamina C, suma de las fracciones y de otros compuestos en las muestras de acerola. Método ABTS (2 minutos).

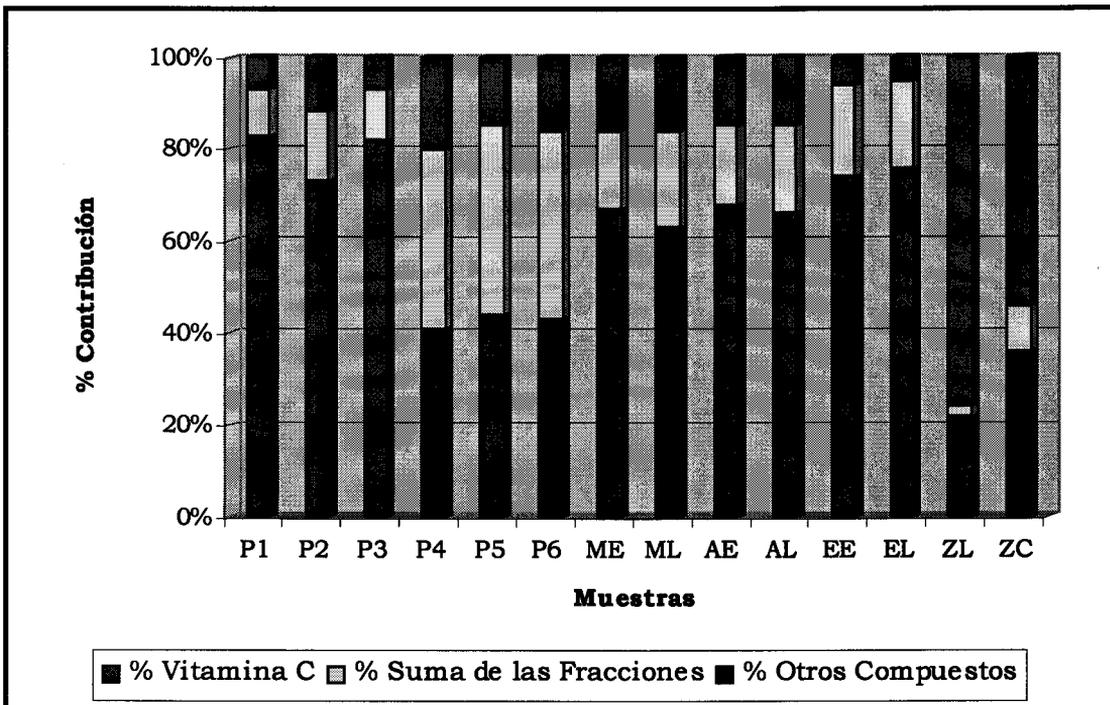


Figura 21: % de contribución de la actividad antioxidante total de vitamina C, suma de las fracciones y de otros compuestos en las muestras de acerola. Método ABTS (15 minutos).

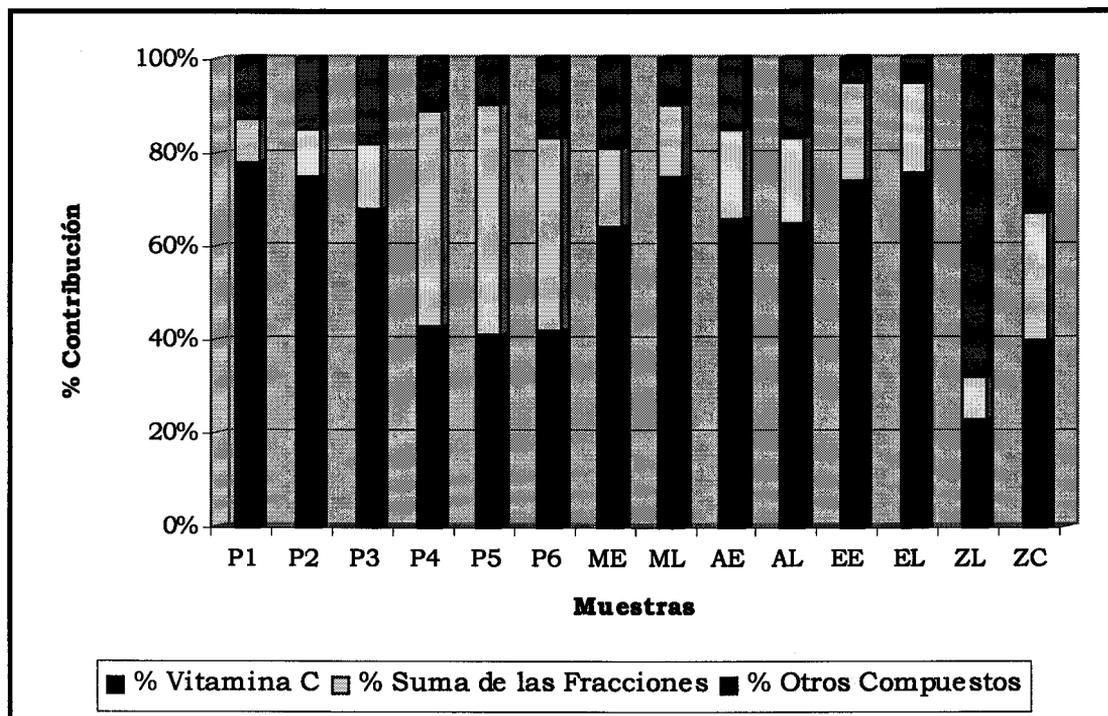


Figura 22: % de contribución de la actividad antioxidante total de vitamina C, suma de las fracciones y de otros compuestos de las muestras de acerola. **Método DPPH.**

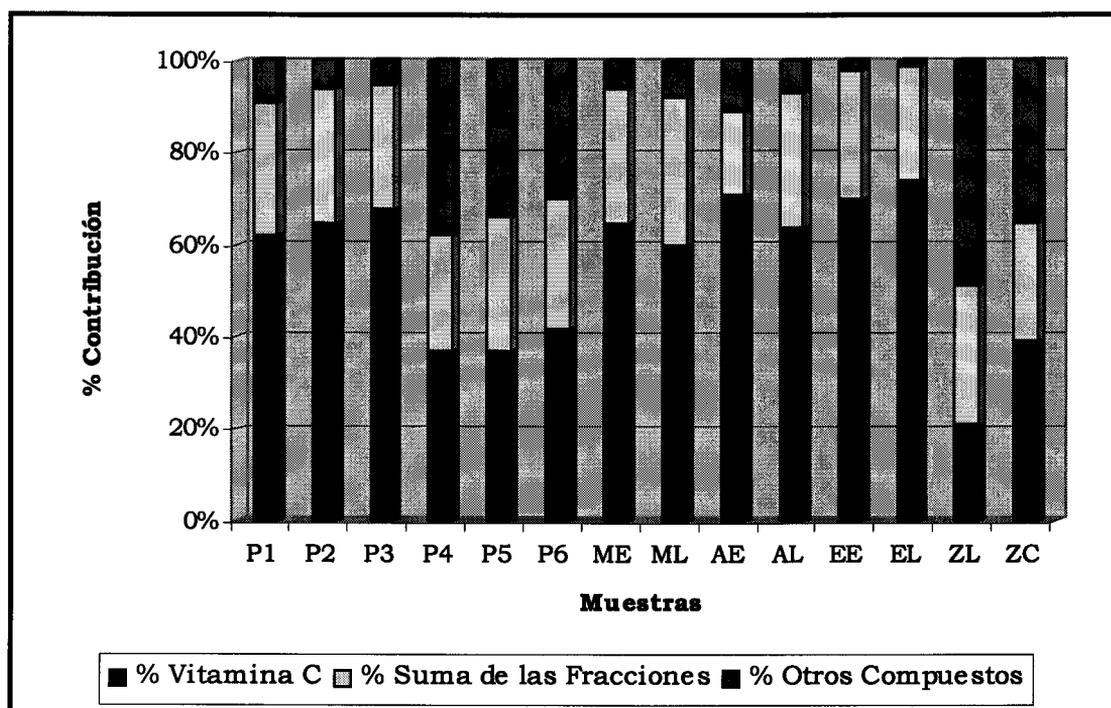


Figura 23: % de contribución de la actividad antioxidante total de vitamina C, suma de las fracciones y de otros compuestos de las muestras de acerola. **Método ORAC.**

Se identificaron por HPLC diferentes compuestos polifenólicos: el ácido clorogénico, la procianidina B1 y la rutina que están presentes en casi todas las muestras. Se determinó la actividad antioxidante de los estándares puros. El clorogénico tiene un valor TEAC 0,5 mM, la procianidina B1 2,16 mM y la rutina no presenta actividad. La escasa concentración y el reducido número de muestras en que se presenta el ácido clorogénico hace que no se considere en este estudio estadístico. La actividad de la procianidina B1 se correlacionó con los valores TEAC de las muestras. Sin embargo, los coeficientes obtenidos fueron muy pequeños (Tabla \_\_). En esta Tabla se puede comprobar que el IPT y la vitamina C están mejor correlacionados con la actividad antioxidante.

Si consideramos la actividad antioxidante de la procianidina y su concentración, no se puede justificar los valores de actividad de la Fracción 2. Como en esta fracción además de los flavan-3-ol eluyen los antocianos, es razonable pensar que estos, cuantificados en la Tabla \_\_ sean responsables de la actividad de la F2.

Se realizó un análisis de correlación para comprobar si las concentraciones de vitamina C, procianidina B1 e IPT estaban relacionadas o no con la actividad antioxidante de la acerola. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla (\_\_).

*Tabla 12: Correlación entre vitamina C y valores TEAC y ORAC; correlación entre Procianidina B1 y valores TEAC y ORAC, correlación entre IPT y valores TEAC y ORAC, correlación entre actividad antioxidante del ácido ascórbico (AA) y valores TEAC y ORAC del conjunto de muestras analizadas (pulpa y zumo).*

Método	Condiciones	Vit C (r)	Procian. B1	IPT (r)
ABTS	TEAC 2 min	0.591	0.196	0.898
	TEAC 15 min	0.594	0.210	0.884
DPPH	TEAC en equilibrio	0.415	0.160	0.784
ORAC	Valor ORAC	0.752	0.450	0.780

Se constata que las muestras de acerola están mejor correlacionadas con el IPT que las concentraciones de vitamina C y

prociánidina B1. Cuando se analiza la Tabla \_\_, se observa que tampoco existe una buena correlación entre las concentraciones de los componentes químicos mayoritarios y la actividad antioxidante. Sin embargo, si se considera la actividad antioxidante de las concentraciones de ácido ascórbico en las muestras, se obtiene una nueva correlación mejor que las anteriores (Tabla \_\_).

*Tabla 13: Coeficiente de correlación (r) entre los valores TEAC y ORAC de las muestras de acerola con la vitamina C, prociánidina B1 y el IPT.*

Método	Condiciones	r
ABTS	TEAC 2 min (agua)	0.362
	TEAC 15 min (agua)	0.447
DPPH	TEAC en equilibrio (agua)	0.564
ORAC	Valor ORAC	0.497

*Tabla 13: Coeficiente de correlación entre los valores TEAC y ORAC de las muestras de acerola con el IPT y actividad antioxidante del ácido ascórbico.*

Método	Condiciones	Activ. Antiox. del AA (r)
ABTS	TEAC 2 min (agua)	0.962
	TEAC 15 min (agua)	0.965
DPPH	TEAC en equilibrio (agua)	0.959
ORAC	Valor ORAC	0.980

La actividad antioxidante de la fracción carotenoide presentó algunas dificultades. Las muestras de zumos licuados y estrujados preparadas en el laboratorio carecían de estos compuestos. Como se observa en la Gráfica \_\_, la actividad antioxidante de estas muestras está explicada casi totalmente por la vitamina C y los compuestos fenólicos. Por ejemplo, entre el 94-99% en el método ORAC está explicado por estos compuestos.

El análisis de la fracción carotenoide se llevó a cabo en la pulpa congelada y zumo comercial (Tabla \_\_). En esta fracción sólo se pudo determinar la actividad antioxidante total por el método ORAC y ya que el método ABTS y DPPH aunque se determinan en metanol no permitieron una buena reacción con compuestos tan lipófilos.

Los valores ORAC de la fracción carotenoide de la pulpa fueron 0,14mM y del zumo comercial 0,10mM representando una contribución entre 0,4-0,2% y 5% respectivamente. Así pues, la determinación de la actividad antioxidante de la vitamina C, de las fracciones fenólicas y de la fracción carotenoide extraída, explica casi totalmente la actividad antioxidante de la mayoría de las muestras de acerola analizadas.

### **5.2.3 Efecto del Tratamiento por Altas Presiones**

Las altas presiones hidrostáticas pueden utilizarse para realizar la descontaminación microbiológica de alimentos acondicionados en embalajes flexibles, evitando los efectos, a menudo indeseados, de los tratamientos térmicos (*Basak, Ramaswamy y Simpson, 2001; Teo, Ravishankar y Sizer, 2001*).

Actualmente, se llevan a cabo aplicaciones industriales en mermeladas y otras preparaciones de frutas azucaradas o no, zumos de frutas, jamón cocido y precortado, champiñones silvestres, mariscos, etc.

Para llevar a cabo el tratamiento, el producto se acondiciona en un envase flexible y se introduce en una cámara de acero de gran espesor, capaz de resistir altas presiones. La presión se transmite mediante un fluido poco compresible, generalmente agua. La gama de presiones utilizada varía en general de 1.000 a 10.000 bares. La presión ejercida provoca daños irreversibles en muchos microorganismos, lo que permite llevar a cabo la descontaminación sin afectar, en el caso de las aplicaciones actuales, ni el

sabor, ni la textura, ni el contenido de vitaminas y sales minerales. En algunos casos, con el fin de eliminar las esporas bacterianas, puede ser necesario combinar la acción de las altas presiones con un tratamiento térmico (Polydera, Stoforos y Taoukis, 2005).

El zumo de acerola obtenido de frutas maduras fue licuado y diluido 5,5 veces con agua hasta un volumen total de 600mL. El producto fue dividido en tres lotes de dos botellas, uno de los cuales se ha conservado en refrigeración a 5°C, otro se ha tratado a 600Mpa durante 10 minutos y el tercer lote a 700Mpa durante 5 minutos. La temperatura del tratamiento se ha mantenido a 25°C. El tratamiento a altas presiones se ha realizado por duplicado.

Las muestras, una vez abierto los envases, se han conservado a 5°C durante un período de 3 semanas, evaluando el efecto del tratamiento sobre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico en comparación con el zumo sin tratar por altas presiones.

La capacidad antioxidante del zumo de acerola tratado a altas presiones y no tratado determinado por los métodos ORAC y ABTS se presenta en la Tabla 29.

Tabla 29. Efecto del tratamiento a altas presiones sobre la capacidad antioxidante

Tratamiento	Método	
	ORAC mmol Trolox /L	ABTS mmol Trolox /L
No tratado	60.7±3.4	138.2±6.0
600 MPa	67.8±3.5	130.0±10.1
700 MPa	63.2±3.2	136.6±8.3

El tratamiento a altas presiones no ha afectado la capacidad antioxidante del zumo de acerola ( $p < 0.05$ ). Estos resultados muestran que la calidad del zumo de acerola desde un punto de vista de su capacidad antioxidante no se ve afectada por el tratamiento a altas presiones. Fernandez-

García et al. (2001a,b) para zumos de naranja y naranja/limón/zanahoria, y para puré de tomate observaron igualmente que la capacidad antioxidante no variaba con el tratamiento a altas presiones (rango 500-800MPa). Sánchez-Moreno et al. (2003a) trabajando a altas presiones con zumos de naranja en el rango 100-400 MPa y diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento observaron que la capacidad antioxidante no se veía afectado en los tratamientos en los que la temperatura no era elevada. No obstante, De Ancos et al. (2002) en zumo de naranja observaron una disminución de la capacidad antioxidante en los zumos tratados a altas presiones (rango 100-500MPa).

En la Figura 28 se muestra la evolución de la capacidad antioxidante de los zumos de acerola tratados a 600 y 700 MPa en comparación con el zumo sin tratar durante su conservación a 5°C durante 3 semanas, una vez abierto el recipiente después del tratamiento.

El comportamiento de la capacidad antioxidante del zumo sin tratar respecto los tratados a altas presiones durante las tres semanas de conservación es completamente diferente. Mientras que la capacidad antioxidante del zumo de acerola tratado a altas presiones permanece prácticamente estable durante las 3 semanas de conservación a 5°C tanto evaluada por el método ORAC como ABTS, el zumo sin tratamiento disminuye un 50 y 35% de su capacidad antioxidante al cabo de las tres semanas según se determine por el método ABTS y ORAC respectivamente. Aunque los valores absolutos son diferentes en función del método de análisis empleado, en la Figura 1ab se puede observar que el comportamiento de la evolución tanto para el zumo tratado a altas presiones como el no tratado es similar.

La capacidad antioxidante de zumos disminuye aún conservándose a temperaturas bajas. Por ejemplo, Fernández-García et al. (2001a) en una mezcla de zumos de naranja/limón/zanahoria en tres semanas perdió del orden del 50%, en cambio en este mismo trabajo diferentes zumos de naranja disminuyeron su capacidad antioxidante menos del 10%. Las mezclas de zumos tratados a altas presiones(600MPa) perdieron en tres semanas entre un 15-25% de su capacidad antioxidante, mientras que los zumos de naranja

perdieron entre un 8-15%. Fernández-García et al. (2001b) con purés de tomate determinaron que la capacidad antioxidante de la fracción soluble en agua no tratada disminuyó un 50% en la primera semana, permaneciendo prácticamente estable hasta los 21 días conservada a 4°C, mientras que el puré tratado a 500 y 800 MPa durante 5 minutos, la capacidad antioxidante disminuyó un 35 y 20% respectivamente la primera semana, permaneciendo igualmente prácticamente constante el resto del periodo de conservación.

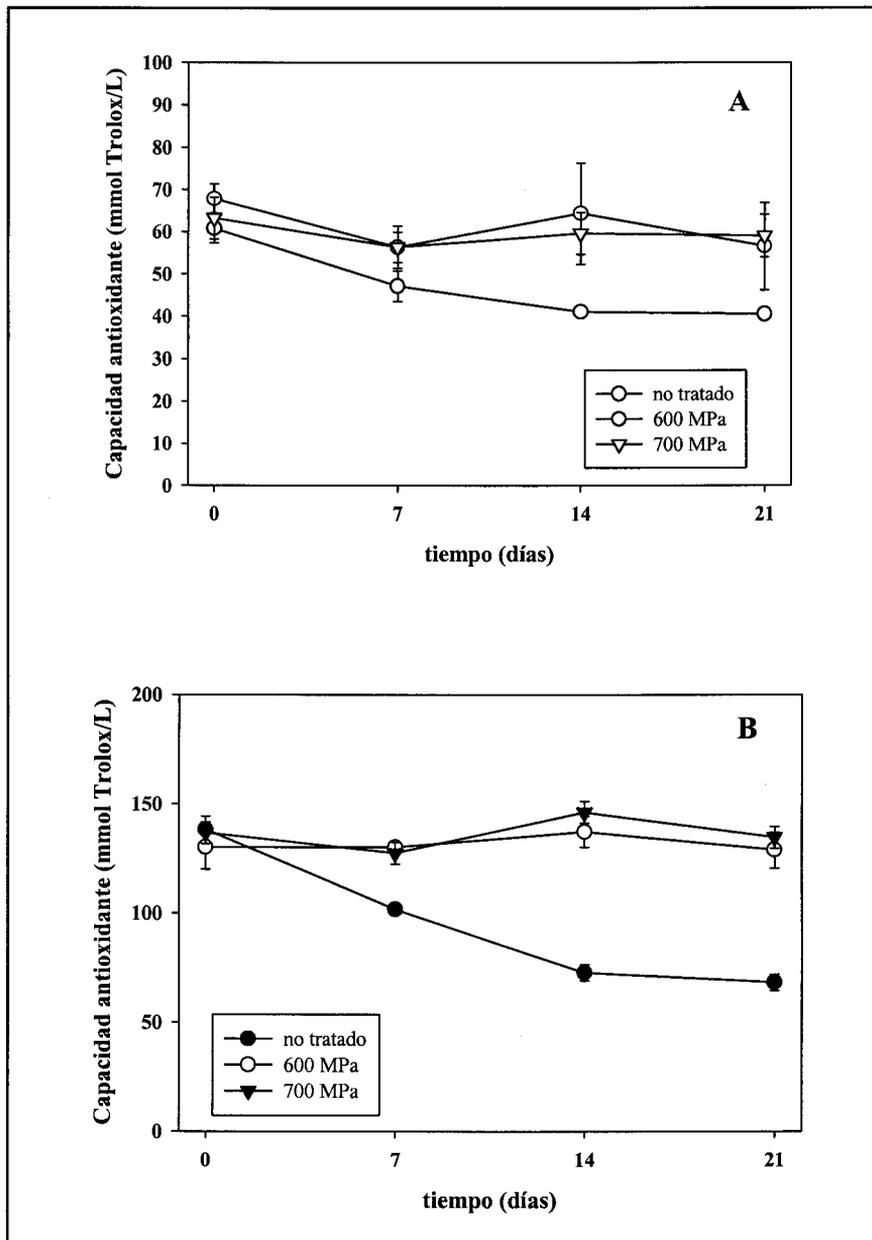


Figura 28. Evolución de la capacidad antioxidante de zumo de acerola con el tiempo. A: método ORAC, B: método ABTS.

De Ancos et al. (2002) observaron que el tratamiento a altas presiones (rango 100-500 MPa) en zumo de naranja presentaba evoluciones diferentes de la capacidad antioxidante durante 4 semanas conservado a 4°C en función de las condiciones de tratamiento, sin encontrar una relación entre la presión aplicada y el tiempo de tratamiento con esta evolución. De Ancos et al. (2000) en purés de kaki habían obtenido conclusiones similares a las del estudio con zumo de naranja.

La capacidad antioxidante del zumo de acerola es debida básicamente a la vitamina C (70-80%), los polifenoles (10-20%) y otros compuestos como los carotenos (10%) (Mezadri, 2004, de Assis et al. 2001). La disminución de la capacidad antioxidante del zumo de acerola se puede justificar principalmente por la degradación de la vitamina C. Martí et al. (2002) observaron una importante degradación de la vitamina C en zumos de granada a los que se había añadido vitamina C en dosis de 330 mg/L conservados a 5°C. Esta disminución era más rápida en el zumo natural que en soluciones modelo de vitamina C, ya que la vitamina C reacciona con los antocianos del zumo. En zumo de naranja Sánchez-Moreno et al, 2003b, observaron que en 10 días de conservación en frío la vitamina C no variaba incluso para el zumo no tratado a altas presiones, excepto para los tratamientos realizados a temperaturas más elevadas (60 y 40°C). Sancho et al. (1999) para fresas de la variedad *Coulis* con un tratamiento a 400 MPa durante 30 minutos y 20°C y conservación a 4°C durante 4 semanas observaron que la vitamina C decrecía de forma similar al producto no tratado, concluyendo que las altas presiones ni aceleraba ni disminuía la cinética de degradación de la vitamina C. El tratamiento por altas presiones no presenta unos efectos generalizados sobre la capacidad antioxidante de los productos tratados, no obstante esta falta de generalización hace necesario que se deban evaluar el efecto de la misma en los diferentes productos.

En este trabajo el zumo de acerola siempre se ha conservado a temperaturas bajas, por lo que aspectos térmicos no pueden justificar esta disminución de la capacidad antioxidante por degradación de la vitamina C. Otras posibles vías de degradación de la vitamina C pueden ser la vía

enzimática y/o el efecto del oxígeno. La pectinmetilesterasa (PME) para la acerola presenta una actividad notablemente superior a la de otros cítricos y es más difícil de inactivar térmicamente (de Assis et al. 2000). Existen estudios sobre el efecto del oxígeno en la degradación de vitamina C para zumos de naranja (Soares et al., 1999, Haugaard et al. 2002). No obstante ésta no parece ser la causa de las diferencias encontradas entre los zumos procesados a altas presiones respecto del no tratado, pues las condiciones de estudio han sido las mismas para todas las muestras. La variación puede ser debida a la degradación de la vitamina C vía enzimática en el zumo no tratado, mientras que en los zumos tratados a altas presiones se ha producido su inactivación enzimática que ha impedido la degradación de la vitamina C, y por tanto la disminución de su capacidad antioxidante.

Se ha evaluado el efecto del tratamiento a altas presiones sobre el contenido polifenólico de la acerola. Los dos polifenoles mayoritarios, rutina y procianidina B1, tal como se puede ver en la Figura 29, no se afectan de forma significativa ( $p < 0.05$ ) justo después del tratamiento.

Para el zumo no tratado a altas presiones a las tres semanas, la procianidina B1 presenta una disminución del 60%. Para los otros polifenoles identificados catequina, epicatequina, ácido clorogénico y p-cumárico no se ha encontrado ninguna relación entre el tratamiento a altas presiones y su evolución durante la conservación.

La rutina durante la conservación del zumo de acerola a 5°C durante tres semanas presenta un ligero aumento, aunque las diferencias no son significativas ( $p < 0.05$ ), mientras que la procianidina B1 presenta un aumento a la semana con el tratamiento a 600 Mpa manteniéndose estable hasta las tres semanas. En el tratamiento a 700 MPa se mantiene estable la primera semana, produciéndose un aumento la segunda semana y volver a recuperar los niveles iniciales al final de las tres semanas. Estos aumentos pueden ser debidos a la inactivación parcial de las enzimas (peroxidasa y polifenol oxidasa) por el efecto del tratamiento a altas presiones aplicados.

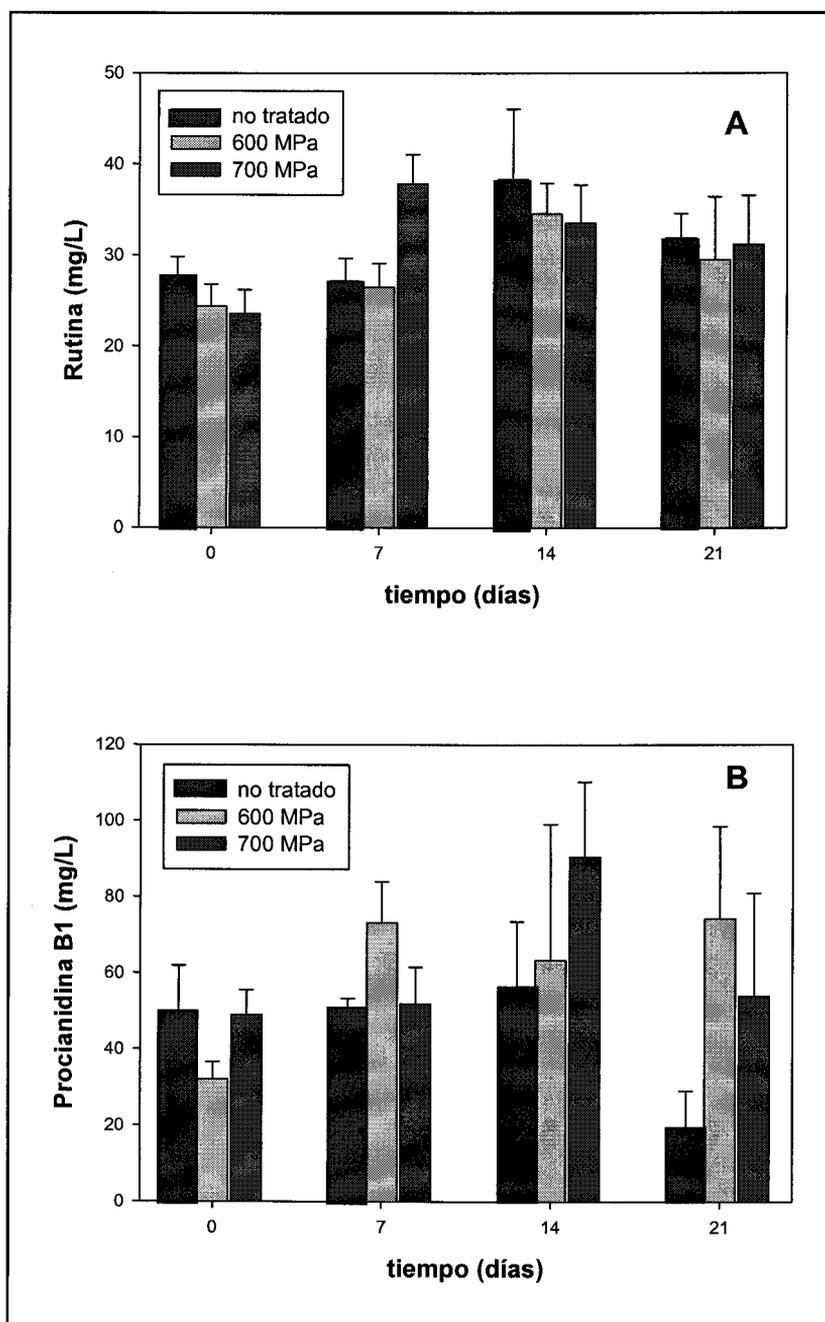


Figura 29. Evolución de la concentración de rutina y procianidina B1 durante el tiempo de conservación a 5°C.

## 6. CONCLUSIONES

1. Los extractantes utilizados para el tratamiento de las muestras de zumo y pulpa de acerola fueron agua y metanol. No se encontraron diferencias significativas entre ambos extractantes cuando se determinó la actividad antioxidante utilizando ABTS y DMPD. En el caso de emplear el DPPH, la elección más adecuada es la extracción de la muestra con agua. Tampoco hubo diferencias significativas en el IPT determinado en los dos extractos.
2. Los resultados obtenidos para los métodos ensayados ABTS, DPPH, ORAC e IPT muestran criterios de linealidad y reproducibilidad, mientras que el DMPD ha presentado un coeficiente de variación muy alto y por lo tanto, no es recomendado para el análisis de la actividad antioxidante de la acerola (pulpa y zumo).
3. Respecto al método ABTS, se recomienda realizar las medidas absorbancia a los 2 minutos, una vez que se ha comprobado que no existen diferencias entre los valores TEAC analizados a los 2 y 15 minutos de comenzada la reacción. Ello indica que los compuestos antioxidantes de la acerola reaccionan mayoritariamente en la primera fase, en especial el ácido ascórbico.
4. De los productos de acerola analizados son los preparados en el laboratorio los que presentan mayor actividad antioxidante. No existen diferencias estadísticas entre los zumos obtenidos licuando o estrujando el fruto. La pulpa comercial presenta un 45% menos de actividad que el zumo y por último el zumo comercial o el concentrado presentan valores un 60% y 95%, respectivamente inferior al zumo natural.
5. Se ha adaptado y puesto a punto un método por CLAE (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia) para determinación de ácido ascórbico total en

pulpa y zumo de acerola. El contenido en vitamina C encontrado ha oscilado entre 944-1797mg/100mL para el zumo (licuado y estrujado), 43mg/100mL para el zumo comercial envasado y 425mg/100mL para el zumo concentrado. La pulpa comercial congelada presenta valores entre 632-920mg/100g.

6. Se ha comprobado que el alto contenido en vitamina C de la acerola explica 40-80% de la actividad antioxidante total para las muestras de pulpa comercial congelada y un 65-75% para zumo procesado manualmente. Los compuestos fenólicos representan, por lo general, el segundo componente que más contribuye a esta actividad. En los zumos comerciales (ZL, ZC) los carotenoides contribuyen un 5% a la actividad antioxidante.
7. Los valores de antocianos totales encontrados para las muestras de pulpa ( $2.75 \pm 0.06\text{mg}/100\text{mL}$  de cianidina 3-glucósido) son menores que los del zumo ( $4.90 \pm 0.18\text{mg}/100\text{mL}$  de cianidina 3-glucósido).
8. Se han identificados los siguientes compuestos polifenólicos en el zumo: Procianidina B1, 5-O cafeoilquinico (ácido clorogénico), Galato de Epigalocatequina, Epicatequina y Rutina. En la pulpa congelada comercial se ha encontrado: Procianidina B1, Galato de Epigalocatequina y Rutina. La Procianidina B1 y la rutina son los compuestos polifenólicos mayoritarios.
9. Se identificaron 17 carotenoides en los frutos de acerola analizados: neoxantina, isómero de neoxantina, neocromo, isómero de neocromo, violaxantina, isómero de violaxantina, luteoxantina, auroxantina, anteraxantina, mutatoxantina, luteína, cis-luteína,  $\beta$ -criptoxantina 5-8-epóxido y 5-6-epóxido,  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno y cis- $\beta$ -caroteno. Entre ellos, el  $\beta$ -caroteno esta presente en todas las muestras analizadas (40 a 60% del contenido total de carotenoides). El contenido en carotenoides en el zumo comercial es muy inferior al del fruto o pulpa, posiblemente porque se pierden durante el procesado o

experimentan un considerable efecto de dilución. Los valores de vitamina A son altos para la pulpa (151,88 retinol/100g de fruto) y para el zumo concentrado (117,75 retinol/100g de fruto) y mucho más bajos en el caso del zumo comercial (43,21 retinol/100g de fruto).

10. Los zumos tratados a altas presiones conservan mejor la capacidad antioxidante que los no tratados. Se obtuvieron resultados similares con las dos presiones aplicadas (600 y 700 Mpa). Los polifenoles mayoritarios (procianidina B1 y rutina) tampoco se alteran.

## 7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABRAM, V.; DONKO, M. (1999). Tentative identification of polyphenols in *Sempervivum tectorum* and assessment of the antimicrobial activity of *Sempervivum L.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47, 485-489.
- AGOSTINI-COSTA et al. (2003). Effect of freezing and storing time of pulp of acerola on the carotenoid contents. *Rev. Bras. Frutic.* 25, 56-58.
- ALVES, R.E. Características das frutas para exportação. (1996). In: *Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita*. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria do Desenvolvimento Rural. Programa de apoio à produção e exportação de frutas, hortaliças, flores e plantas ornamentais. Brasília: EMBRAPA. 30p.
- ALVES, R.E.; MENEZES, J.B. (1995). Botânica da aceloreira. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista - BA, UESB. 160p.
- ALVES, R.E.; MENEZES, J.B.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. (1992). Atividade respiratória e características físico-químicas e químicas de acerolas (*Malpighia emarginata* DC.) em diferentes estádios de maturação. *Agropecuária Técnica*. 13 (1/2), 77-89.
- ALVES, R.E.; MENEZES, J.B.; SILVA, S.M. (1995). *Colheita e pós-colheita da acerola*. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista - BA, UESB. 160p.
- ANCOS, B., EVA GONZALEZ, E., CANO, M.P. (2000). Effect of High-Pressure Treatment on the Carotenoid Composition and the Radical Scavenging Activity of Persimmon Fruit Purees, *J. Agric. Food Chem.* 48, 3542-3548.
- ANCOS, B., SGROPPO, S., PLAZA, L., CANO, M.P. (2002). Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82, 790-796.
- ANDRADE, R.S.G.; DINIZ, M.C.T.; NEVES, E.A.; NÓBREGA, J.A. (2002). Determinação e distribuição de ácido ascórbico em três frutos tropicais. *Eclética Química*. 27, 393-401.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127, 183-198.
- ARNAO, M.B. (2000). Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*. 11, 419-421.
- ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. (1998). Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry*. 2, 893-905.

- ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 73, 239-244.
- ARUOMA, O.I.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. (1993). Evaluations of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41, 1880-1885.
- ASENJO, C.F. (1959). Aspectos químicos y nutritivos de la acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). *Ciencias - Revista Hispano Americana de Ciencias Puras y Aplicadas*. México. 19 (6-7), 109-118.
- ASHOOR, S.M.; MONTE, W.C.; WELTY, J. (1984). Liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*. 67, 78-80.
- ASSIS, S.A., LIMA, D.C., DE FARIA OLIVEIRA, O.M. M. (2000). Acerola's pectin methylesterase: studies of heat inactivation, *Food Chemistry*. 71, 465-467
- ASSIS, S.A., LIMA, D.C., DE FARIA OLIVEIRA, O.M. M. (2001). Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development, *Food Chemistry*. 74, 133-137
- ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. (2000). Acerola's pectin methylesterase: studies of heat inactivation. *Food Chemistry*. 71, 465-467.
- ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. 89 (1) Jan, 27-36.
- AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2004). Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17 (3-4), Jun/Aug, 385-396.
- BASAK, S., RAMASWAMY, H.S., SIMPSON, B.K. (2001). High pressure inactivation of pectin methyl esterase in orange juice using combination treatment. *Journal of Food Biochemistry*. 25 (6), 509-526.
- BAUERFEIND, J.C. (1972). *J. Agric. Food Chem.* 20, 456-473.
- BECKMAN, J.S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology*. 9, 836-844.
- BEDWALL, R.S.; NAIR, N.; SHARMA, M.P.; MATHUR, R.S. (1993). Selenium - its biological perspectives. *Medical Hypothesis*. 41, 150-9.
- BENDER DA. Vitamin E: tocopherols and tocotrienols. En: *Nutritional Biochemistry of the vitamins*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992, Cap 4:87-105
- BERLINER, J.A.; HEINECKE, J.W. (1996). The role of oxidised lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 20, 707-727.
- BJORNEBUE A, GUNN EA, DEVRON CA. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr* 1990;120(3):233-42.

- BLISKA, F.M.M.; LEITE, R.S.S.F. (1995). Aspectos econômicos e de mercado. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista - BA, UESB. 160p.
- BOULANGER, R.; CROUZET, J. (2001). Identification of the aroma components of acerola (*Malpighia glabra L.*): free and bound flavour compounds. *Food Chemistry*. 74, 209-216.
- BOVERIS, A.; COSTA, L.E.; JUNQUEIRA, V.B.C. (2000). La teoría del envejecimiento mitocondrial por la acción continua de los radicals libres del oxígeno y del nitrógeno. *Ciencia e Investigación*. 3(1), 5-13.
- BRENNEMAN, C.A.; EBELER, S.E. (1999). Chromatographic separation using solid-phase extraction cartridges: separation of wine phenolics. *Journal of Chemical Education*. 76 (12), 1710-1711.
- BRIDLE, P.L.; TIMBERLAKE, C.F. (1997). Anthocyanins a natural food colours selected aspects. *Food. Chem.* 58, 1-2.
- BUETTNER, G.R.; JURKIEWICZ, B.A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*. 145, 532-541.
- BUTT, V.S. (1980). Direct oxidases and related enzymes. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. New York: Academic. 2, 81-123.
- BUTZ, P., KOLLER, W.D., TAUSCHER, B., WOLF, S. (1994). Ultra-High pressure processing of onions; chemical and sensory changes, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 27, 463-467.
- CANO, A.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; ACOSTA, M.; ARNAO, M.B. (1998). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical Analysis*. 9, 196-202.
- CANO, M. P., HERNÁNDEZ, A., DE ANCOS, B. (1997). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*. 62, 85-88.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 3426-3431.
- CARR, A.; FREI, B. does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditional? (1999). *The FASEB Journal*. 13, 1007-1024.
- CARRINGTON, C.M.S.; KING, R.A.G. (2002). Fruit development and ripening in Barbados cherry, *Malpighia emarginata* DC. *Scientia Horticulturae*. 92, 1-7.
- CARVALHO, I.T.; GUERRA, N.B. (1995). Suco de acerola - estabilidade durante o armazenamento. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista - BA, UESB. 160p.
- CARVALHO, R.I.N.; MANICA, I. (1993). *Acerola, composição, armazenamento de frutas*. Cardernos de Horticulturas (UFRGS). Rio Grande do Sul. 1, 143p.

- CAVALCANTE, M. L. AND D. B. RODRIGUEZ-AMAYA (1992). Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In *Food Science and Human Nutrition*. Ed. by G. Charalambous. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 643-650.
- CLIFFORD, M.N. The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates. En: SANTOS-BUELGA, C.; WILLIAMSON, G. (ed.) *Methods in polyphenol análisis*. (2003). Royal Society of Chemistry: UK. 14, 314-358.
- CONNOR, A.M.; LUBY, J.J.; HANCOCK, J.F.; BERKHEIMER, S.; HANSON, E.J. (2002). Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *J. Agric. Food Chem.* 73 (4), 306-309.
- COUCEIRO, E.M. (1985). *Curso de extensão sobre a cultura da acerola*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 45p.
- DAVEY, M.W.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I.J.J.; STRAIN, J.J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 80, 825-860.
- DESOBRY, S. A.; NETTO, F. M. AND LABUZA, T. P. (1998). Preservation of  $\beta$ -carotene from carrots. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38, 381-387.
- DIPLOCK, A.T.; CHARLEUX, J.L.; GROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*. 80 (1), S77-S112.
- FACHIN, D., VAN LOEY, A.M., NGUYEN, B.L., VERLENT, I., INDRAWATI, HENDRICKX, M.E. (2003). Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 4, 135-142.
- FAO. (1992). Cultivos marginados. Otra perspectiva de 1492. In: HERNÁNDEZ, L.E.; LEÓN, J.). *Colección FAO: Producción y protección vegetal*. 46, 16-30.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA A., BUTZ P., TAUSCHER B. (2001b). Effects of High-pressure Processing on Carotenoid Extractability, Antioxidant Activity, Glucose Diffusion, and Water Binding of Tomato Puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *J Food Sci.* 66, 1033-1038.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, A., BUTZ, P., BOGNÀR, A., TAUSCHER, B. (2001a). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different. *Eur. Food Res. Technol.* 213, 290-296.
- FLAGG, E.W.; COATES, R.J.; GREENBERG, R.S. (1995). Epidemiological studies of antioxidants and cancer in humans. *Journal of the American College of Nutritional.* 14, 419-426.
- FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 1035-1040.
- FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. 43, 228-265.

- FREI, B. (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*. 54, 1113S-1118S.
- FURUSAWA, N. (2001). Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control*. 12, 27-29.
- GARCÍA-PARRILLA, M. C.; HEREDIA, F. J.; TRONCOSO, A. M. (1996). Phenols HPLC analysis by direct injection of Sherry wine vinegar. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 19, 274-258.
- GARDNER, P.T.; WHITE, T.A.C; McPHAIL, D.B.; DUTHIE, G.G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*. 68, 471-474.
- GASTELL, P.L.P.; ALEJO, J.L.P. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 29(3), 192-198.
- GERSHOFF, S.N. (1993). Vitamin C (ascorbic acid): new roles, new requirements? *Nutrition Review*. 51, 313-326.
- GHISELLI, A.; NARDINI, M.; BALDI, A.; SCACCINI, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 361-367.
- GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 48, 4581-4589.
- GODOY, H.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1994). Occurrence of cis isomers of provitamin A in Brazilian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 1306-1313.
- GOMES, E.; DILERMANDO, P.; MARTINS, A.B.G.; FERRAUDO, A.S. (2000). Análise de grupamentos e de componentes principais no processo seletivo em genótipos de aceroleira (*Malpighia Emarginata* DC.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 22 (1), 36-39.
- GOMES, J.E; PEREDIN, D.; MARTINS, A.B.G. (2002). Correlações entre os caracteres físico-químicos de frutos de aceroleira com variáveis meteorológicas. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24 (1), 111-114.
- GOODNER, J. K., BRADDOCK, R. J., PARISH, M. E. (1998). Inactivation of Pectinesterase in Orange and Grapefruit Juices by High Pressure, *J. Agric. Food Chem.* 46, 1997-2000.
- GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; HARUENKIT, R.; CHUTHAKORN, R.; GRAUER, F.; MARTIN-BELLOSO, O.; TRAKHTENBERG, S. (1999). Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 10 (6), Jun., 367-371.
- GRAHAM, W.D.; ANNETTE, D. (1992). Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in potatoes (*Solanum tuberosum*) and strawberries using ion-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography*. 594, 187-194.

- GRIFFITHS, H.R.; LUNEC, J. (2001). Ascorbic acid in the 21<sup>st</sup> century – more than a simple antioxidant. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 10, 173-182.
- GROSS, J. (1987). *Carotenoids. In Pigments in Fruits*. Academic Press Inc. London, UK. p 87-186.
- GUISTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Antocyanins. (2001). Characterization and measurement with UV-visible Spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Wrolstad, R.E., Ed. John Wiley and Sons: New York.
- HALLIWELL, B. (1995). Antioxidant characterisation; methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. 49, 1341-1348.
- HALLIWELL, B. (1996). Oxidative stress, nutrition and health. *Free radical research*. 25, 57-74.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1989). *Free radical in biology and medicine*. 2<sup>o</sup> ed. Oxford: Clarendon Press. 540p.
- HANDELMAN, G.J. (2001). The Evolving Role of Carotenoids in Human Biochemistry. *Nutrition*. 17, 818–822.
- HASLAM, E. (1998). *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action..* UK: Cambridge University Press. 422p.
- HAUGAARD, V.K., WEBER, C.J., DANIELSEN, B., BERTELSEN, G. (2002). Quality changes in orange juice packed in materials based on polylactate, *Eur Food Res Technol*. 214:423–428.
- HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. (1996). *Natural Food Colorants*. Blackie Academic: London, 1-103.
- HERNÁNDEZ, A., CANO, M.P. (1998). High-Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Tomato Puree, *J. Agric. Food Chem*. 46, 266-270.
- HOWARD, L.R.; CLARK, J.R.; BROWNMILLER, C. (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83, 1238-1247.
- HWANG, J.; HODIS, H.N.; SEVANIAN, A. (2001). Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 308-314.
- ITO, A.; SHAMON, L.A.; YU, B.; MATA-GREENWOOD, E.; LEE, S.K.; van BREEMEN, R.B.; MEHTA, R.G.; FARNSWORTH, N.R.; FONG, H.H.S.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. (1998). Antimutagenic constituents of *Casimiroa edulis* with potential cancer chemopreventive activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 3509-3516.
- ITOO, S.; AIBA, M.; ISHIHATA, K. (1990). Comparison of ascorbic acid content in acerola fruit from different region depend on degree of mature, and its stability by processing. *Journal Japanese Society of Food Science and Technology*. 37 (9), 726-729.
- JACOB, R.A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*. 15, 755-766.

- JACOB, R.A. (1999). Evidence that diet modification reduces in vivo oxidant damage. *Nutrition Review*. 57 (8), 255-258.
- JACOB, R.A., Vitamin C. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*. (1999) Ninth Edition. Edited by Maurice Shils, James Olson, Moshe Shike, A. Catharine Ross. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 467-482.
- JACOB, R.A.; BURRI, B.J. (1996). Oxidative damage and defence. *American Journal of Clinical Nutrition*. 63, 985S-990S.
- JACOB, R.A.; SKALA, J.H.; OMAJE, S.T. (1987). Biochemical indices of human vitamin C status. *Am. J. Clin. Nutr.* 46, 818-826.
- KIM, H.J. Determination of total vitamin C by ion exclusion chromatography with electrochemical detection. (1989). *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*. 72, 681-686.
- KITTS, D.D. (1997). An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends in Food Science & Technology*. 8, 198-203.
- KONDO, T. (1996). Parkinson disease and free radical. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 786, 206-216.
- LANDRUM, J.T.; BONE, R.A.; KILBURN, M.D. (1997). The macular pigment: a possible role in protection from age-related macular degeneration. *Advances in Pharmacology*. 38, 537-556.
- LARIO, A.C.; ECHEVERRÍA, M.A.; ARNAO, M.B. (1998). Estimación de la actividad antioxidante de distintas bebidas comerciales. *Alimentaria* (Septiembre) 73-76.
- LARRAURI, J.A.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; RUPÉRE, P.; SAURA-CALIXTO, F. (1999). Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 47, 1603-1606.
- LEDIN, R.B. (1958). *The barbados or West Indian cherry*. Gainesville: University of Florida. (Bulletin, 594), 28p.
- LEE, J.; KOO, N.; MIN, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging and antioxidant nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3, 21-33.
- LEVANDER, O.A.; BURK, R.F. (1996). *Selenium*. In: ZIEGLER, E.E.; FILER, L.J. Washington, DC.: ILSI Press. 320-328.
- LEVINE, M. ET AL RUMSEY, SC. DARUWALA, R. PARK, JB. WANG, Y. (1999) Criteria and Recommendations for Vitamin C Intake. *JAMA*. 281, 1415-1423.
- LIMA, V.L.A.G; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, D.E.S. (2003). Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de 12 frutos de diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC.) *Cienc. Tecnol. Aliment.* 23(1), 101-103.
- LOPES, R.; BRUCKNER, C.H.; CRUZ, C.D.; LOPES, M.T.G.; FREITAS, G.B. (2001). Repetibilidade de características do fruto de aceroleira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 36 (3), 507-513.

- MANICA, I., CARVALHO, R.I.N. (1995). Acerola pesquisa e extensão no Rio Grande do Sul. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista - BA, UESB. 160p.
- MARINO NETTO, L. (1986). *Acerola, a cereja tropical*. São Paulo: Nobel. 94p.
- MARTÍ, N., PÉREZ-VICENTE, A, GARCÍA-VIGUERA, C. (2002). Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(2), 217-221.
- MATAIX-VERDÚ, J. (ed.). 1995. Tabla de composición de alimentos españoles. Granada: Universidad Autónoma. 2ed. p. 143.
- MATSUURA, F.C.A.; ROLIM, R.B. (2002). Avaliação da adição de suco de acerola em suco de abacaxi visando à produção de um "blend" com alto teor de vitamina C. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24 (1), 138-141.
- MATSUURA, F.C.A.U.; CARDOSO, R.L.; FOLEGATTI, M.I.S.; OLIVEIRA, J.R.P.; SANTOS, D.B. (2001). Avaliações físico-químicas em frutos de diferentes genótipos de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23 (3), 602-606.
- MEZADRI, T. (2004). Evaluación de la actividad antioxidante de frutas de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) y sus derivados. Trabajo de Investigación para Obtención de Suficiencia Investigadora. Universidad de Sevilla.
- MEZQUITA, P.C.; VIGOA, Y.G. (2000). La acerola. Fruta marginada de america con alto contenido en ácido ascórbico. *Alimentaria*. 113-125.
- MONDELLO, L.; COTRONEO, A.; ERRANTE, G.; DUGO, G.; DUGO, P. (2000). Determination of anthocyanins in blood orange juices by HPLC analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 23 (1), 191-195.
- MORRISSEY, P.A.; O'BRIEN, N.M. (1998). Dietary antioxidants in health and disease. *International Dairy Journal*. 8, 463-472.
- MOSCOLO, C.C. (1956). West Indian cherry richest know source of natural vitamin C. *Economic Botany*. 10(3), 280-294.
- MOYER, R.A.; HUMMER, K.E.; FINN, C.E.; FREI, C.E.; WROLSTAD, R.E. (2002). Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium, Rubus* and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem*. 50,519-525.
- NAKASONE, H.I.; MIYASHITA, R.K.; YAMANE, G.M. (1966). Factors affecting ascorbic acid content of acerola. *American Society for Horticultural Scienci*. 89, 161-164.
- NIKI, E. (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*. 44, 227-253.
- NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A.; SILVA JUNIOR, J.F. (2002). Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas da acerola. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37 (4), 463-470.
- OKAMURA, M. (1980). An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clinica Chimica Acta*. 103, 259-268.

- OLIVEIRA, M.E.B.; BASTOS, M.S.R.; FEITOSA, T.; BRANCO, M.A.A.C.; SILVA, M.G.G. (1999). Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 19 (3), 326-332.
- OSTENDORF, F.W. (1963). The West Indian cherry. *Tropical abstracts*, Amsterdam. 18 (3), 145-150.
- PALAZÓN, J.; CUSIDÓ, R.M.; MORALES, Y.C. (2003). Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. [http://www.acenologia.com/ciencia55\\_2.htm](http://www.acenologia.com/ciencia55_2.htm) (Consulta: 25/11/03).
- PARK, J.B. (2001). Reduction of dehydroascorbic acid by homocysteine. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1525, 173-179.
- PARKER, R.S. (1989). Dietary and biochemical aspects of vitamin E. *Advances in Food Nutritional and Research*. 33, 157-232.
- PARR, A.J.; BOLWELL. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 80, 985-1012.
- PINO, J.A.; MARBOT, R. (2001). Volatile flavor constituents of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 5880-5882.
- PLAZA, L., MUÑOZ, M., DE ANCOS, B., CANO, M. P. (2003). Effect of combined treatments of high-pressure, citric acid and sodium chloride on quality parameters of tomato puree, *Eur Food Res Technol.* 216, 514-519.
- POLYDERA, A.C., STOFOROS, N.G., TAOUKIS, P.S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice, *Journal of Food Engineering*. 60, 21-29.
- POLYDERA, A.C.; STOFOROS, N.G.; TAOUKIS, P.S. (2005). Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chemistry*. 91, 495-503.
- PRIOR, R.L., CAO, G.H. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review, *Journal of AOAC International*. 83 (4):950-956.
- PRIOR, R.L.; CAO, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*. 27 (11/12), 1173-1181.
- PRIOR, R.L.; CAO, G. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *Journal of AOAC International*. 83 (4), 950-956.
- PRIOR, R.L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, A.; McEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C.M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 2686-2693.
- PROTEGGENTE, A.R.; SALJA, A.; PASQUALE, A.; RICE-EVANS, C.A. (2003). The compositional characterisation and antioxidant activity of fresh juices from Sicilian sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties. *Free Radical Research*. 37 (6), 681-687.

- PUIG, A., VILAVELLA, M., DAOUDI, L., GUAMIS, B., MINGUEZ, S. (2003). Estabilización microbiológica y bioquímica de vinos por aplicación de la técnica de altas presiones, *Bulletin O.I.V.* 76(869-870), 597-617.
- RIahi, E., RAMASWAMY, H.S. (2004). High pressure inactivation kinetics of amylase in apple juice. *Journal of Food Engineering.* 64, 151-160.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research.* 22, 375-383.
- ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry.* 66, 401-436.
- RUMSEY, S.C.; WANG, Y.; LEVINE, M. (1999). Vitamin C en Papas, A.M. (ed.) *Antioxidant status, diet, nutrition and health.* CRC press, 479-496.
- SALLA, M.F.E.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. (2002). Uso de marcadores moleculares na análise de variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* DC.). *Revista Brasileira de Fruticultura.* 24 (1), 015-022.
- SANCHÉS-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. (1998). A produce to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 76, 270-276.
- SÁNCHEZ-MATA, M.C.; CÁMARA-HURTADO, M.; DÍEZ-MARQUÉS, C.; TORIJA-ISASA, M.E. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). 210, 220-225.
- SÁNCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., DE ANCOS, B., CANO, M.P. (2003a). Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis* L.) during chilled storage. *Eur Food Res. Technol.* 216, 18-22.
- SÁNCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., DE ANCOS, B., CANO, M.P. (2003b). Vitamin C, Provitamin A Carotenoids, and Other Carotenoids in High-Pressurized Orange Juice during Refrigerated Storage. *J. Agric. Food Chem.* 51, 647-653.
- SANCHO, F., LAMBERT, Y., DEMAZEAU, G., LARGETEAU, A., BOUVIER, J.M., NARBONNE, J. F. (1999). Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. *Journal of Food Engineering.* 39(3), 247-253.
- SANTOS, A.R.L.; REINHARDT, D.H.; SILVEIRA, W.R.; OLIVEIRA, J.R.P.; CALDAS, R.C. (1999). Qualidade pós-colheita de acerola para processamento, em função de estádios de maturação e condições de armazenamento. *Revista Brasileira de Fruticultura.* 21 (3), 365-371.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50, 2432-2438.
- SIES, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine.* 91, 31S-39S

- SIMÃO, S. Cereja das Antilhas. (1971). In: SIMÃO, S. *Manual de Fruticultura*. São Paulo: Agronômica Ceres. 15, 477-485.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.
- SOYSAL, C., SOYLEMEZ, Z., BOZOGLU, F. (2004). Effect of high hydrostatic pressure and temperature on carrot peroxidase inactivation, *Eur Food Res Technol*. 218, 152-156.
- SPEIRS, J.; BRADY, C.J. (1991). Modification of gene expression in ripening fruit. *Australian Journal of Plant Physiology*. 18, 519-532.
- STAHL, W.; SIES, H. (1993). Physical quenching of singlet-oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 691, 10-19.
- TAYLOR, A. (1993). Cataract: relationship between nutrition and oxidation. *Journal of the American College of Nutrition*. 12, 138-146.
- TEO, A.Y.L.; RAVISHANKAR, S.; SIZER, C.E. (2001). Effect of low-temperature, high pressure treatment on the survival of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in unpasteurised fruit juice. *Journal of Food Protection*. 64 (8), 1122-1127.
- THANE, C.; REDDY, S. Processing of fruits and vegetables: effect on carotenoids. (1997). *Nutrition and Food Science*. 2, March/April, 58-65.
- TIJBURG, L.B.M.; MATTERN, T.; FOLTS, J.D.; WEISGERBER, U.M. KATAN, M.B. (1997). Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 37 (8), 771-785.
- TORREGGIANI, D.; FORNI, E.; GUERCILENA, I.; MAESTRELLI, A.; BERTOLO, G.; ARCHER, G.P.; KENNEDY, C.J.; BONE, S.; BLOND, G.; CONTRERAS-LOPEZ, E.; CHAMPION, E. (1999). Modification of glass transition temperature through carbohydrates additions: effect upon colour and anthocyanin pigment stability in frozen strawberry juices. *Food Research International*. 32 (6), 441-446.
- TRABER, M.G., 1999. Vitamin E. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*. Ninth Edition. Edited by Maurice Shils, James Olson, Moshe Shike, and A. Catharine Ross. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999 p. 347-362.
- TRABER, M.G.; SIES, H. (1996). Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Reviews of Nutrition*. 16, 321-347.
- TSAO, R.; YANG, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography A*. 1018 (1, 7) Nov., 29-40.
- US National Academy of Science – National Research Council. (1989). *Recommended dietary allowances*, 10<sup>th</sup> ed. National Academy Press: Washington DC.
- VAN DEN BERG, R. HAENEN, G.R.M.M.; VAN DER BERG, H.; BAST, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*. 66, 511-517.

- VENDRAMINI, A.L.; TRUGO, L.C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry*. 71, 195-198.
- VIVALDI, J. (1979). *The systematic Malpighia L.* Thesis of Degree of Doctor or Philosophy. Fac. of Graduate School of Cornell University. 259p.
- WANG, H., CAO, G.H., PRIOR, R.L., Total antioxidant capacity of fruits. (1996). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (3) : 701-705.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 701-705.
- WANG, S.Y.; ZHENG, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 4977-4982.
- WATADA, A.E. (1982). A high-performance liquid chromatography method for determining ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables. *Hort Science*. 17, 334-335.
- WILSON, J.X. (2002). The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Letters*. 527, 5-9.
- WROLSTAD, R.E (2000). Anthocyanins. Natural food colorants - Science and Technology. 237-252.
- YEN, G. C., LI, H. (1996). Comparison of high pressure treatment and thermal pasteurization effects on the quality and shelf life of guava puree. *International Journal of Food Science and Technology*. 31, 205-213.
- ZABETAKIS, I., KOULENTIANOS, A., ORRUÑO, E., BOYES, I. (2000). The effect of high hydrostatic pressure on strawberry flavour compounds, *Food Chemistry*. 71, 51-55.
- ZAPATA, S.; DUFOUR, J.P. (1992). Ascorbic acid, dehydroascorbic and isoascorbic acid simultaneous determinations by reverse phase ion interaction HPLC. *Journal of Food Science*. 57, 506-511.

D. TATIANA MEZADRI  
EVALUACIÓN de la ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE de FRUTOS de  
ACEROLA (*Malpighia emarginata* DC.) y SUS DERIVADOS

27 junio

2005

  
El Presidente

El Presidente





~~Reyes Barberá~~

algun

  
M. I. Mezardri