



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

DATOS PERSONALES

Ochoa Guindulain, Andrea

DNI: 44646784N

DIRECCIÓN: Avenida de Funes, nº 17 Peralta (Navarra)

CORREO ELECTRONICO: andreaocha92@hotmail.com

INDICE

0. Resumen/abstract	1
1. Introducción	3
1.1 Valorización de los residuos de frutas tropicales	
1.2 Compuestos bioactivos presentes en frutas tropicales	
1.3 Compuestos con propiedades antioxidantes presentes en frutas tropicales	
1.4 El rambután: características y propiedades bioactivas	
2. Objetivos	13
3. Materiales y métodos	14
3.1 Preparación de las muestras de rambután	
3.2 Reactivos	
3.3 Cuantificación e identificación de los compuestos de interés	
3.3.1 <i>Optimización de la extracción de los compuestos de interés</i>	
3.3.2 <i>Extracción, cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos</i>	
3.3.3 <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i>	
3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de rambután	
3.4.1 Preparación de los extractos	
3.4.2 Cepas microbianas	
3.4.3 Obtención de las suspensiones	
3.4.4 Técnica de difusión en agar	
4. Resultados y discusión	22
4.1 Optimización de la extracción de compuestos de interés	
4.2 Cuantificación de compuestos fenólicos totales	
4.3 Cuantificación de flavonoides totales	
4.4 Capacidad antioxidante de los extractos	
4.5 Identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios	
4.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de rambután.	
5. Conclusiones/Conclusions	30
6. Aportaciones en materia de aprendizaje	32
7. Bibliografía.....	34

0. RESUMEN/ABSTRACT

Resumen

Actualmente la industria transformadora de frutas tropicales genera elevadas cantidades de pieles, huesos y cáscaras, que suponen un residuo, pero que podrían ser revalorizadas transformándolas en subproductos de los que obtener beneficios. Varios autores han demostrado que el contenido de compuestos bioactivos de interés es mayor en las partes no comestibles de frutas tropicales que en las partes comestibles. Estos compuestos de interés podrían obtenerse de dichos residuos para ser utilizados como conservantes de los alimentos prolongando su vida útil, para la prevención o el tratamiento de enfermedades como la hiperglicemia, o como inhibidores de microorganismos patógenos con aplicación en la industria alimentaria. Por ello, en este estudio se ha cuantificado el contenido en compuestos fenólicos y flavonoides totales, la actividad antioxidante y antimicrobiana de las tres partes fisiológicas del rambután (piel, pulpa y hueso) en diferentes estados de conservación: fresca, deshidratada y liofilizada. La mayor concentración de compuestos fenólicos (21.976,446 mg de ácido gálico/100 g de p.s) y actividad antioxidante (27.229,035 mg de Trolox/100 g p.s) se obtuvo de la piel liofilizada, empleando una proporción de solvente con 80% etanol: 20% agua (v:v). Además, estos extractos concentrados (0,25 g/mL), demostraron tener capacidad antimicrobiana con halos de inhibición más amplios frente a *S. aureus* y frente *B. cereus* que las muestras frescas y deshidratadas de los otros tejidos a mayores concentraciones (0.5 y 1 g/mL). Dos de los compuestos bioactivos identificados en los extractos obtenidos de la piel liofilizada fueron el ácido gálico y el ácido elágico.

Abstract

Nowadays fruit processing companies produce a large amount of waste products (peels, seeds and kernels), which could be revalorized transforming them into by-products to obtain benefits. Several authors have demonstrated that the content of interesting bioactive compounds is bigger in the inedible parts of tropical fruits than in their eatable parts. These compounds might be obtained from the above mentioned residues to be used as preservatives to prolong food shelf life, preventing or treating diseases such as the hypersugar blood content, or inhibiting pathogenic microorganisms with application in the food processing industry. Therefore, the total phenolic and flavonoid content, as well as the antioxidant activity of rambutan peel, flesh and kernel in different conditions of conservation: fresh, dried and freeze-dried was determined. The highest level of phenolic compounds (21,976,446 mg of gallic acid /100 g of d.w) and antioxidant activity (27,229.035 mg of Trolox/100 g d.w) was obtained from the freeze-dried peel, using a solvent proportion of 80% ethanol:20% water (v:v). In addition, these concentrated extracts (0.25 g/mL), demonstrated a higher antimicrobial capacity against *S. aureus* and *B. cereus* than the fresh and dried samples from other parts extracted in higher concentrations (0.5 and 1 g/mL). Two of the bioactive compounds identified in extracts obtained from freeze-dried peel were gallic acid and ellagic acid.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Valorización de los residuos de frutas tropicales

Se define valorización como todo procedimiento que permita aprovechar los recursos presentes en los residuos, sin comprometer la salud humana y sin utilizar métodos perjudiciales para el medio ambiente. Por lo tanto, el objetivo es lograr reducir al máximo el flujo de materia hacia vertedero o incineración, que aun siendo técnicas altamente contaminantes, se emplean mayoritariamente en muchos países europeos. De este modo se lograría transformar los residuos en subproductos con una nueva utilidad.

Son muchos los estudios que evidencian que la presencia de compuestos fitoquímicos es mucho mayor en la piel y la semilla respecto a las partes comestibles del fruto (Ayala-Zavala et al., 2010). Contreras-Calderon et al. (2011) estudiaron la composición de 24 frutas tropicales procedentes de Colombia y su relación con la capacidad antioxidante, diferenciando entre fruto entero, piel y semilla, llegando a la conclusión de que el contenido de estos compuestos en los subproductos era significativamente mayor que en las partes comestibles. Gonzalez-Montelongo et al. (2010) hallaron una mayor concentración de compuestos antioxidantes en la piel que en la pulpa de plátano, resultados que concuerdan con los de Ribeiro da Silva et al. (2014) para distintas especies de frutas tropicales originarias de Brasil.

Principalmente, estos subproductos proceden de las industrias de procesado mínimo de frutas, fabricación de zumos y mermeladas, y los datos aportados sugieren que la valorización de estos residuos orgánicos de origen vegetal parece ser una alternativa sólida a su aprovechamiento. Además, la obtención de los compuestos bioactivos presentes en estos residuos permitiría utilizarlos como conservantes de los propios alimentos de los que proceden, integrándose así en la producción, proporcionando una alternativa natural frente al deterioro de los alimentos, y aumentando la sostenibilidad medioambiental de las empresas alimentarias (Ayala-Zavala et al., 2010).

Las estrategias para la recuperación de estos recursos se dividen en tres grandes grupos (Yepes et al., 2008):

1. Valorización química y biológica

Dentro de este grupo se clasifican procesos biológicos como el compostaje o la

lombricultura, y tecnologías para la extracción de distintos componentes fitoquímicos de interés funcional y tecnológico.

El compost es el resultado de la descomposición biológica de materia orgánica bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (50-70°C), cuya función es servir de abono para los cultivos (Yepes et al., 2008). La lombricultura es otra alternativa biológica para el aprovechamiento de los residuos orgánicos agrícolas, industriales y urbanos, basada en la utilización de la lombriz roja californiana como productora de hummus y proteína animal a partir de estos subproductos (Schuldt, 2006).

Por otro lado, estos subproductos vegetales son fuente de polisacáridos, como fibra, obtenida principalmente de las cortezas y pieles (Ajila et al., 2007; Yapo et al., 2013); enzimas útiles para la industria y con propiedades terapéuticas, como bromelaina (Kelly, 1996) y papaína (Mamboya, 2012); aceites esenciales; compuestos fenólicos, carotenoides y otros fitoelementos con propiedades funcionales (Jahurul et al., 2015).

2. Obtención de combustibles

El biogás se obtiene de la descomposición de la materia orgánica por acción bacteriana o por su combustión en condiciones anaerobias, con el objetivo de producir energía térmica, eléctrica o como combustible (Abraham et al., 2007).

3. Valorización térmica

En Europa actualmente el flujo de materiales residuales al vertedero o incineración es muy elevado. Esta técnica más que aportar un valor añadido, trata de eliminar los subproductos, con el inconveniente de que es altamente contaminante, ya que genera dioxinas y furanos, caracterizados por ser contaminantes orgánicos persistentes (COPs), y dióxido de carbono, contribuyendo al efecto invernadero.

La pirolisis es otro método térmico que emplea temperaturas entre 400 y 800°C para conseguir reducir el volumen de la materia hasta en un 95%, minimizando así la cantidad de residuos.

1.2. Compuestos bioactivos presentes en frutas tropicales

Existen numerosos estudios epidemiológicos que evidencian que dietas ricas en frutas y otros vegetales pueden reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes en humanos (Crozier et al., 2009). Entre otros elementos, los

compuestos fenólicos son los responsables de estos efectos terapéuticos. Se trata de metabolitos secundarios ubicuos en las plantas cuyo interés está creciendo debido a sus propiedades bioactivas (Ignat et al., 2011), y que se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo. Aunque, por su estructura, todos ellos son susceptibles de secuestrar radicales libres, su actividad antioxidante puede variar mucho en función de la posición y el grado de hidroxilación, polaridad, solubilidad, estabilidad frente al procesado alimentario, y estabilidad de los propios radicales libres (Fennema, 2000). Se conocen más de 8000 estructuras diferentes, muchas de ellas presentes en los alimentos, que van desde los compuestos más sencillos de bajo peso molecular, hasta los más complejos, como taninos y fenoles derivados conjugados con azúcares o ácidos orgánicos (Crozier et al., 2009). Por norma general se clasifican en dos grandes grupos:

Flavonoides

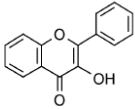
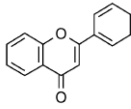
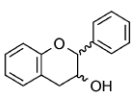
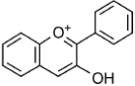
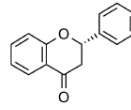
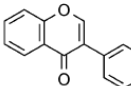
Son los compuestos fenólicos más abundantes en el reino vegetal, y se encuentran principalmente en las hojas y la piel de las frutas. Entre las propiedades funcionales que se les atribuyen, destaca su poder antioxidante y la inhibición del enzima convertidor de angiotensina (ACE) (Actis-Goretta et al., 2006; Crozier et al., 2009; Del Rio et al., 2013). Los compuestos más representativos de este grupo se detallan en la *tabla 1.1*.

Fenoles distintos de los flavonoides

Este subgrupo está formado por una gran variedad de ácidos fenólicos y sus derivados, siendo el ácido gálico y elálgico los más comunes. Mayormente se encuentran esterificados con azúcares en forma de galotaninos y elagitaninos en fuentes diversas como fresas y frambuesas, granada, plátano, o nueces y avellanas, entre otros frutos. En la *tabla 1.2*. se detallan algunos ejemplos de ácidos fenólicos pertenecientes a la serie de los ácidos benzoicos y cinámicos, así como otros compuestos fenólicos distintos de los flavonoides, como los fenoles simples, taninos, y estilbenos.

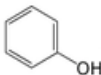
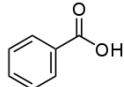
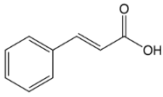
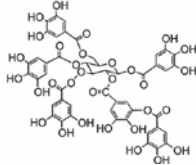
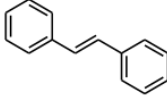
Aunque la cantidad de compuestos bioactivos depende, entre otros factores, de la variedad, grado de madurez, manejo precosecha, condiciones de almacenamiento y localización de los compuestos entre los distintos tejidos del fruto, las frutas tropicales se pueden considerar fuentes significativas de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante (Ajila et al., 2010).

Tabla 1.1. Estructura química de los principales flavonoides presentes en frutas y hortalizas

Clasificación	Estructura química	Principales compuestos	Fuentes
Flavonoles		Quercetina Miricetina Kaempferol	Manzana Cebolla Endibia Granada
Flavonas		Luteolina Apigenina	Espinacas Perejil Apio Cítricos
Flavan-3-ol		Catequinas Proantocianidinas	Uva Manzana Arándano
Antocianidinas		Cianidina Pelagrnidina Delfinina	Mora Grosella Cereza Fresa Uva
Flavanonas		Naringenina Hesperidina Eriocitrina	Cítricos Tomate Menta
Isoflavonas		Genisteina Daidzeina	Soja

Fuentes: (Crozier et al., 2009; Del Rio et al., 2013; Ignat et al., 2011)

Tabla 1.2. Clasificación de los compuestos fenólicos no flavonoides, estructura química y ejemplos de los compuestos más representativos.

Clasificación	Estructura química básica	Principales compuestos	Fuentes
Fenoles simples		<i>p</i> -cresol Hidroquinona Pirotecól	Tomate Coliflor Cítricos
Ácidos benzóicos		Ác. gálico Ác. elágico Vainillina Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	Fresas Uva Cebolla Rábanos
Ácidos cinámicos		Ác. cafeico Ác. ferúlico Ác. clorogénico Ác. cumárico	Café Cereales Zanahoria Albaricoque
Taninos		Galotaninos Elagitaninos	Uva Granada Plátano Nueces
Estilbenos y derivados		Resveratrol Piceatanol	Uva Grosella Arándano

Fuentes: (Crozier et al., 2009; Del Rio et al., 2013; Ignat et al., 2011)

Correia et al. (2012) identificaron quercetina, cianidina, proantocianidinas, y ácido elágico en varios residuos de frutas tropicales, presentándose este último en mayor concentración que en otros alimentos con reconocida cantidad de este compuesto como la fresa y productos derivados. Por otro lado, Ribeiro da Silva et al. (2014) cuantificaron niveles elevados de compuestos fenólicos y flavonoides, e identificaron determinados compuestos, como resveratrol y cumarina, en subproductos de guayaba, mango y papaya, entre otras frutas tropicales. Por último, Dorta et al. (2014) consiguieron separar hasta 30 compuestos fenólicos diferentes en subproductos de tres variedades diferentes de mango, entre los que destacan mangiferina, y derivados del ácido elágico y la quercetina.

Teniendo en cuenta las propiedades de estos compuestos, se postulan como posibles aditivos naturales para alargar la vida útil de algunos alimentos. Por ejemplo, aunque en ocasiones pueda resultar un atributo positivo para su flavor, las reacciones de oxidación de los lípidos forman moléculas volátiles que disminuyen la calidad de los alimentos por descomposición de los ácidos grasos que los forman, siendo una de las principales causas del deterioro de la calidad de alimentos grasos durante su procesado y almacenamiento (González-Montelongo et al., 2010). Además, también influye en las reacciones de oxidación de pigmentos, provocando una pérdida de color y por consiguiente de la calidad organoléptica.

La cinética de oxidación lipídica de los alimentos muestra una fase de inducción seguida de un incremento exponencial de su velocidad. La duración de esta inducción es muy importante para los fabricantes de alimentos, dado que en este periodo la rancidez no se detecta, mientras que una vez que se ha alcanzado la fase exponencial, se desarrollan olores indeseables en muy poco tiempo (Fennema, 2000). Por esta razón, los compuestos antioxidantes naturales se presentan como alternativa para retrasar el periodo de inducción al máximo posible.

1.3. Compuestos con propiedades antioxidantes presentes en frutas tropicales

El oxígeno es un metabolito esencial para la vida. Sin embargo, puede ser altamente dañino para el organismo y para los alimentos que consumimos si su actividad no es controlada. Uno de los efectos negativos del oxígeno es que provoca oxidación de los lípidos o rancidez oxidativa. Este proceso se inicia en los alimentos por

las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS), que también se pueden formar en los organismos vivos como consecuencia de la actividad metabólica de estos, con efectos graves para dichos organismos. Ciertos procesos metabólicos requieren de la participación de los ROS, por lo cual el control de la formación y destrucción de los ROS es de gran importancia (Descalzo et al, 2008).

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio en el balance entre la formación y destrucción de los ROS, y es en este proceso donde los antioxidantes tienen una función protectora importante. Los antioxidantes pueden clasificarse según su origen en sintéticos y naturales. Dentro del primer grupo se encuentran el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), la butilhidroquinona terciaria (TBHQ) y los ésteres del ácido gálico; mientras que los tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos son antioxidantes naturales, que además se asume que son más potentes, eficaces y seguros que los sintéticos (Alfonso Valenzuela et al, 2003), por lo que se está potenciando su uso en detrimento de los sintéticos.

El ser humano obtiene dichas sustancias a través de los alimentos lo que refuerza la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos aportando una protección extra para el estrés oxidativo. Los sistemas *in vivo* que el ser humano posee contra el daño oxidativo pueden clasificarse en tres líneas de defensa:

- La primera consiste en la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres a través del secuestro de iones metálicos, por reducción de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno y por captación de oxígeno singlete.
- Los antioxidantes que absorben radicales actúan como segunda línea de defensa. Los principales representantes de este grupo son la vitamina liposoluble E y la hidrosoluble C. Ambas captan radicales e inhiben la reacción en cadena o rompen la reacción de propagación. Los compuestos polifenólicos también pueden actuar como potentes antioxidantes absorbedores de radicales.

Redondo et al. (2016a) estudiaron la presencia de polifenoles y componentes antioxidantes en frutos del aclareo de distintas frutas de hueso. La nectarina fue el fruto con mayor contenido de polifenoles totales (67,43 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g), flavonoides totales (56,97 mg equivalentes de catequina (CE)/g) y capacidad antioxidante determinadas por los métodos del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) y del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP). Además, estos mismos

autores comprobaron la capacidad de extractos de piel de nectarina del aclareo para prevenir el pardeamiento enzimático provocado por el enzima polifenoloxidasas (PPO) (Redondo et al., 2016b).

- La tercera línea de defensa está constituida por los mecanismos de reparación *de novo* y en el aclaramiento de proteínas lípidos y DNA alterados por la oxidación.

Las grasas, aceites y los alimentos con base lipídica se deterioran al sufrir diversas reacciones de degradación, tanto por calentamiento como durante su almacenamiento prolongado. Los principales procesos de deterioro son las reacciones de oxidación y de descomposición de los productos de oxidación que provocan una disminución del valor nutritivo y de la calidad sensorial.

Tsaknis et al. (2002) compararon el comportamiento del aceite de oliva al calentamiento con respecto al del aceite de maíz, el aceite de orujo y una mezcla al 50% de aceite de oliva y aceite de maíz. Se estudió la eficacia del BHA y el BHT en el retraso del deterioro de los aceites durante el calentamiento estático ($175 \pm 5^\circ\text{C}$), encontrándose que el BHA dio una ligera protección al aceite de orujo y que el BHT proporcionó alguna protección al aceite de maíz.

Se conocen relativamente bien los cambios que los antioxidantes sintéticos sufren durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, así como las interacciones que se producen entre los productos de oxidación con otros componentes de los alimentos. Las pérdidas más importantes en la actividad antioxidante se producen como consecuencia de cambios químicos de los antioxidantes presentes en los alimentos.

Sin embargo, los consumidores prefieren consumir productos naturales libres de aditivos sintéticos. Por tanto, en un futuro cercano continuará la aplicación de antioxidantes naturales por lo que será necesario estudiar con más detalle estas moléculas y encontrar fuentes de donde obtenerlos para revalorizar productos de deshecho. Por ello, este hallazgo e identificación de los principales componentes de los extractos y mecanismos responsables de esta actividad antioxidante en la piel de frutas tropicales podrían ser utilizadas como suplementos dietéticos para la prevención de enfermedades y prolongar la vida útil de alimentos con alto contenido en ácidos grasos, entre otros.

En resumen, los antioxidantes son sustancias de origen natural, cuya función radica en preservar al ser que lo contiene. En los alimentos pueden definirse como cualquier sustancia que es capaz de aplazar, retardar o prevenir el desarrollo de rancidez u otro deterioro del flavor que se produzca como consecuencia de la oxidación. Existe un número creciente de datos experimentales, clínicos y epidemiológicos que demuestran sus efectos beneficiosos frente al estrés oxidativo que desemboca en enfermedades relacionadas con la edad como el cáncer y el envejecimiento (Jan Pokorny et al ,2005).

Okonogi et al. (2007) investigaron el potencial de varios residuos de frutas comúnmente consumidas y cultivadas en Tailandia concluyendo que los extractos que poseían mayor capacidad antioxidante eran los procedentes de la piel de granada (*Punica granatum*), rambután (*Nephelium lappaceum L.*), y mangostán (*Garcinia mangostana*). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chunglok et al. (2014) sobre la presencia de componentes con actividad antioxidante y anticancerígena en el pericarpio y las semillas de frutas tropicales como rambután (*Nephelium lappaceum L.*), litchi (*Litchi chinensis Sonn.*) y tamarindo (*Tamarindus indica L.*). Además Khonkarn et al. (2010) evaluaron el potencial antioxidante y citotóxico de distintos extractos procedentes de cáscara de rambután, mangostán y coco frente a líneas celulares humanas, siendo el primero del que se obtuvieron resultados más prometedores. Del mismo modo Palanisamy et al. (2008) cuantificaron por primera vez el alto contenido fenólico, baja capacidad pro-oxidante y fuerte actividad antioxidante del extracto de la corteza del rambután, que aunque normalmente es desechada, podría incorporarse de nuevo al sistema productivo aprovechando así sus propiedades funcionales.

1.4. El rambután: características y propiedades bioactivas

1.4.1. Origen, descripción y cultivo

El rambután (*Nephelium lappaceum L.*) es una fruta originaria del continente asiático, específicamente de Indonesia y Malasia, aunque cultivado también en Tailandia, Vietnam, India, Sri Lanka y en Filipinas donde fue introducida desde Indonesia en 1912. Su color atractivo y apariencia característica, relativa rusticidad y capacidad productiva de los árboles de esta especie, han permitido que este cultivo se transforme en una actividad frutícola promisorio de las zonas tropicales húmedas. Se ha

utilizado tanto para consumo fresco, como para su procesamiento industrial.

Las raíces sintácticas de ese nombre, provienen del vocablo malayo “rambut” que significa pelo, para hacer alusión a los espinaretes largos y suaves que cubren la fruta y que son su principal característica distintiva ante los consumidores (fotografía 1 y 2).

Fotografía 1: Rambutanes de la variedad R162



Fuente: Melvin Arias T. e Iván Calvo V., 2014

Fotografía 2: Rambután abierto



Fuente: <http://frutas.consumer.es/>.

Pertenece a la familia *Sapindaceae*, la cual incluye más de 150 géneros y cerca de 2000 especies de árboles, arbustos, plantas herbáceas y trepadoras de amplia distribución en los trópicos y zonas cálidas del planeta. Existen en el mundo una gran cantidad de variedades de rambután que han sido seleccionadas en países como Indonesia, Malasia y Filipinas, las cuales reúnen parámetros de calidad específicos, ya que han sido mejoradas en cuanto a color, sabor, textura, tamaño del fruto y capacidad de desprendimiento de la pulpa.

Los principales países productores y exportadores de rambután son Tailandia, Indonesia y Malasia (Ramírez, et. al 2003). Le siguen otros países como Las Filipinas, Singapur, Sri Lanka, India y Vietnam, los cuales tienen áreas significativas pero las destinan principalmente para cubrir su consumo interno.

1.4.2. Propiedades bioactivas

Además de la actividad antioxidante que se le atribuye principalmente a los extractos procedentes de la cáscara de este fruto, como se ha reseñado con anterioridad, Palanisamy et al. (2011) concluyen que dichos extractos pueden ser beneficiosos en el tratamiento frente a la hiperglicemia. Otros autores, como Thitilertdech et al. (2008) defienden su posible uso como agentes de control microbiológico frente a

determinadas bacterias, ya que debido al elevado potencial antioxidante de los compuestos fenólicos se derivan funciones antimicrobianas. Por último, Ramesa et al. (2014) también comprobaron el efecto inhibitorio del rambután frente a determinados patógenos, pero en este caso fue a partir de extractos acuosos de las semillas del fruto.

2. OBJETIVOS

A lo largo de la sección anterior se ha constatado que los residuos agroalimentarios procedentes de las operaciones de transformación de fruta pueden ser aprovechados para la extracción de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos cuya capacidad antioxidante ha sido demostrada por varios investigadores. Además de la inhibición de la oxidación, los extractos procedentes de subproductos de frutas tropicales, y en concreto de rambután, han demostrado poseer cierto efecto antimicrobiano frente a algunos microorganismos patógenos o alterantes de interés alimentario, inhibiendo su crecimiento, y por ello, evitando la devaluación del producto o la pérdida de seguridad alimentaria.

Por ello, en este trabajo se cuantificará el contenido en compuestos fenólicos y flavonoides totales, la actividad antioxidante, y la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de piel, pulpa y hueso de rambután fresco, deshidratado y liofilizado.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- 1) Evaluar la influencia del solvente y optimizar la capacidad de extracción de compuestos de interés.
- 2) Determinar la concentración de compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante las distintas partes del fruto (piel, pulpa y hueso) frescas, deshidratadas y liofilizadas para evaluar los efectos que el procesado previo tiene sobre estos contenidos.
- 3) Identificación individual de los compuestos fenólicos presentes en los extractos.
- 4) Determinar la actividad antimicrobiana de los distintos extractos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación de las muestras de rambután

Los frutos de rambután empleados en este estudio fueron adquiridos en MercaZaragoza y eran originarios de Tailandia. Una vez recepcionados, se dividieron en tres grupos de 10 unidades, para su posterior deshidratación, liofilización y conservación en fresco, respectivamente, para realizar su análisis nutricional y comparar el efecto de dichos tratamientos sobre la concentración de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante.

Todos los rambutanes se separaron manualmente con la ayuda de un cuchillo en sus tres tejidos principales (piel, pulpa y hueso) antes de someterse a cada uno de los procesos mencionados. Uno de los grupos se deshidrató por el método convencional en una estufa por corriente de aire a 50°C durante 12 horas hasta que el peso de las muestras fue estable. El segundo grupo se sometió a un secado por congelación en un equipo de liofilización (Heto Holten, DW8; Alemania). En la primera etapa se redujo la temperatura a -20°C para la consiguiente eliminación del agua de la muestra por sublimación al aplicar vacío. En ambos casos, después del tratamiento las muestras se envasaron a vacío hasta su análisis.

Por último, se destinó una fracción del pool de muestras de cada parte fisiológica de los frutos frescos para su deshidratación y obtención de los diferentes extractos secos y poder expresar los resultados de los análisis en base seca para facilitar su comparación.

3.2. Reactivos

Los principales reactivos empleados en este trabajo han sido:

Carbonato de sodio (NaCO_3), nitrito de sodio (NaNO_2), cloruro de aluminio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), metanol y etanol, todos ellos procedentes de Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España). El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ), y el ácido 2-carboxílico-6-hidroxi 2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), y el reactivo Folin-Ciocalteu por Merck KGaA (Darmstadt,

Alemania).

Todos los patrones de calibración (ácido gálico, ácido elágico, catequina, epicatequina, galocatequina, quercetina, vainillina, ácido ferúlico, ácido cumárico, y ácido clorogénico) también fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

3.3. Cuantificación e identificación de los compuestos de interés

3.3.1 Optimización de la extracción de compuestos de interés

Para determinar la cantidad de etanol óptima que maximizara la extracción de los compuestos de interés, se utilizó dicho solvente en diferentes relaciones etanol:agua (0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 y 100:0).

Se pesó 1 gramo de muestra en tubos de centrifuga de 50 mL (Sarstedt Ag & Co.; Nümbrecht, Alemania) y se añadieron 10 mL de las correspondientes concentraciones de solvente mencionadas anteriormente. Con la ayuda de un ultraturrax (IKA-W) se homogeneizó la mezcla durante 2 minutos, y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se trasvasaron los sobrenadantes a tubos Falcon de 15 mL (Sarstedt Ag & Co.) correctamente etiquetados y se filtraron con filtros de 45 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co.; Düren, Alemania) antes de cuantificar la cantidad total de fenoles y flavonoides.

3.3.2. Extracción, cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos

3.3.2.1. Preparación de los extractos

En esta primera etapa de caracterización de piel, pulpa y hueso de rambután, la extracción se llevó a cabo, por triplicado, a partir de 1 g de cada muestra en 10 mL de solución etanol:agua (80:20; v/v) que se homogeneizaron en tubos de centrifuga de 50 mL (Sarstedt Ag & Co.; Nümbrecht, Alemania) con la ayuda de un ultraturrax (IKA-W) durante 2 minutos, y se centrifugaron posteriormente a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Por último, se trasvasaron los sobrenadantes a tubos Falcon de 15 mL (Sarstedt Ag & Co.), y una fracción de cada extracto, de 2 mL aproximadamente, se filtró en viales de cromatografía (Labbox; Barcelona, España) a través de un filtro de 45 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co.; Düren, Alemania) para ser analizados por HPLC. Las muestras se guardaron en congelación (-32°C) hasta su análisis.

3.3.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales

Para determinar la concentración de compuestos fenólicos se modificó el método descrito por Singleton y Rossi (1965). En tubos de ensayo (Labbox) se colocaron 0,5 mL de cada extracto a los que se añadieron 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. A continuación, se añadieron otros 0,5 mL de carbonato de sodio al 7,5%, y seguidamente 7 mL de agua destilada. Tras 60 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se determinó la absorbancia de la muestra a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (Unicam; Waltham, USA). Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por 100 g de peso seco.

La curva patrón se obtuvo a partir de soluciones estándar de ácido gálico (0-250 mg/l) preparadas en matraces de 10 mL (Labbox) que fueron sometidas al mismo proceso que las muestras para determinar su absorbancia.

3.3.2.3. Cuantificación de flavonoides

El contenido en flavonoides del extracto se determinó modificando un ensayo colorimétrico descrito por Iacopini et al. (2010) en el que a 0,5 mL de extracto o solución estándar con concentraciones crecientes de catequina (0-150 mg/l) se añadieron 0,1 mL de nitrito de sodio al 5%. Transcurridos 5 minutos se adicionaron 0,1 mL de AlCl₃ al 10%, y tras otro minuto se mezcló con 0,6 mL de NaOH 1 M. Por último, se midió la absorbancia de la mezcla a 510 nm y tras realizar los cálculos se expresó el contenido en flavonoides como mg de catequina en 100 g de peso seco.

3.3.2.4. Identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC

Los fenoles se identificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un equipo serie 1100 (Hewlett-Packard Agilent; Santa Clara, USA) equipado con un degasificador, una bomba cuaternaria, un selector de muestras automático, un detector de matriz de fotodiodos (DAD) y una columna Zorbax SB-C18 de fase reversa (150 mm x 4,6 mm d.i.; tamaño de partícula 3,5 µm). Los resultados se analizaron con el software HP ChemStation 3365. Se empleó un método basado en el descrito por Tomás-Barberán et al. (2001) con pequeñas modificaciones. Como solvente A y B se utilizó metanol y agua, respectivamente, ambos con 5% de ácido fórmico para

mejorar la resolución de los picos (Tomás-Barberán et al., 2001). El flujo fue de 1 mL/min, aplicado según el siguiente gradiente: 95% de B desde 0 hasta 5 minutos, 95-88% de B desde 5 hasta 10 minutos, 88-75% de B desde 10 hasta 35 minutos, 75-50% de B desde 35 hasta 50 minutos, 50-20% de B de 50 a 52, y de 20-0% de B hasta 60 minutos. El volumen inyectado fue de 20 µL. El detector se fijó a longitudes de onda de 280 nm para analizar compuestos fenólicos pertenecientes a los ácidos benzoicos (ácido gálico y elágico, y vainillina), ácidos cinámicos (ácido ferúlico, cumárico y clorogénico), y flavonoides (catequina, quercetina, galocatequina y epicatequina). Todos los estándares de las curvas patrón se disolvieron en metanol:agua (80:20, v/v).

3.3.3. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó mediante dos métodos: DPPH y FRAP.

3.3.3.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

El procedimiento operativo para la determinación colorimétrica de la capacidad antioxidante total se modificó del propuesto por Llorach et al. (2004). Se mezclaron 900 µl de los extractos fenólicos, en la correspondiente dilución (Tabla 3.1.), en cubetas de espectrofotometría (Sarstedt Ag & Co.) junto con 900 µl de solución de radical libre DPPH preparada con anterioridad pesando 0,0131 g (Mettler Toledo; Greifensee, Suiza) en un volumen total de 250 mL de metanol. Se agitó la mezcla y se incubó durante dos horas y media en oscuridad para que se desarrollase totalmente el color y medir la absorbancia a 515 nm.

Tabla 3.1. Diluciones realizadas para la curva de calibrado empleada en el método DPPH de determinación de la capacidad antioxidante.

Diluciones	1	2 (1/2)	3 (1/4)	4 (11/90)	5 (1/15)	6 (1/30)	7 (1/60)
Muestra (µL)	900	450	225	110	60	30	15
MeOH:H ₂ O (µL)	-	450	675	790	840	870	885
DPPH (µL)	900	900	900	900	900	900	900

La curva patrón (*Figura 3.1*) se preparó a partir de una solución madre de Trolox en metanol, que se diluyó 1/100 en metanol:agua al 80%. A partir de esta solución de trabajo se realizaron diluciones seriadas desde 0 hasta 60 µM, a las que se añadieron 900 µl de DPPH para obtener la curva de calibrado tras el periodo de incubación.



Figura 3.1 Imagen de la curva patrón de Trolox para el método DPPH.

3.3.3.2. FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica)

Se desarrolló un procedimiento de trabajo a partir de los protocolos de Thaipong et al. (2006) y, Griffin y Bhagooli (2004), que consistía en añadir 900 µl de reactivo FRAP junto con 120 µl de muestra en cubetas de espectrofotometría, y medir la absorbancia de la mezcla a 595 nm, tras ser incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente.

El reactivo FRAP estaba formado por tampón acetato, TPTZ y $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en proporción 10:1:1 (v:v:v). Se prepararon disolviendo: 0,1562 g de TPTZ en 2 mL de ácido clorhídrico y enrasando con agua hasta 50 mL, 0,2703 g de cloruro férrico en agua con ayuda de 1 mL de HCl en 50 mL, y 3,1 g de acetato de sodio trihidratado en 16 mL de ácido acético glacial y enrasando con agua hasta 1000 mL.

Para determinar las concentraciones finales de antioxidantes de las muestras se preparó una curva patrón de Trolox (*Tabla 3.2.*). Para ello, se partió de 50 mL de una solución madre (1000 µM en metanol:agua (80:20, v:v)). En la tabla 2.2. aparecen las distintas concentraciones usadas para realizar la curva de calibrado a partir de esta solución madre.

Tabla 3.2 Diluciones realizadas para la curva de calibrado empleada en el método FRAP de determinación de la capacidad antioxidante.

Concentración (µM)	Solución madre Trolox (mL)	Metanol:agua 80:20 (mL)
1000	10	-
500	5,0	5,0
250	2,5	7,5
200	2,0	8,0
150	1,5	8,5
100	1,0	9,0
50	0,5	9,5
0	-	10

3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de rambután

3.4.1. Preparación de los extractos

A algunos compuestos fenólicos, además de desempeñar un papel principal en la inhibición de la oxidación debido a su elevado potencial redox, se les atribuye un amplio rango de funciones biológicas, por ejemplo como antimicrobianos, derivadas de su capacidad antioxidante. Por ello se testaron los extractos de piel de rambután, ya que presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos, frente a una serie de microorganismos que se detallan más adelante. Para ello, se prepararon extractos de piel fresca, deshidratada y liofilizada, disolviendo 2,5 g de cada tejido en 10 mL de etanol, obteniendo extractos de una concentración de 0,25g/mL. Posteriormente se eliminó el disolvente, eliminando así su posible toxicidad frente a las cepas seleccionadas, en un rotavapor a 35°C y 60 rpm durante 3 minutos, y cada uno de los extractos se recuperó del matraz de evaporación disolviendo el precipitado en concentraciones decrecientes (1 mL, 0,5 mL y 0,25 mL) de una solución de etanol al 3% y 0,05% de Tween 80 para mejorar la dispersión de los compuestos bioactivos en el disolvente. De este modo, se obtuvieron las concentraciones finales deseadas en los extractos de cada una de las muestras: 0,25g/mL, 0,5g/mL, y 1g/mL.

3.4.2. Cepas microbianas

La actividad antimicrobiana *in vitro* se testó frente a 11 microorganismos (tabla 3.3), 6 bacterias comúnmente transmitidas por los alimentos y 5 mohos fitopatógenos, suministrados por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España) o procedentes de la colección de cepas del Grupo de Investigación Alimentos de Origen Vegetal (VG). Las cepas fueron inoculadas en caldo triptona y soja (TSB; Merck; Darmstadt, Alemania) suplementado con un 0,6 % extracto de levadura (Merck) e incubadas a 37 °C durante 24 horas para las bacterias. Los mohos se sembraron en placas con agar patata-dextrosa (PDA; Merck) y se incubaron durante 7 días a 25 °C.

Tabla 3.3. Microorganismos utilizados en la determinación in vitro de la actividad antimicrobiana de los extractos de rambután

Grupo	Especie	Colección
Bacterias Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
Bacterias Gram +	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 13932
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124
Mohos	<i>Botrytis cinerea</i>	VG1*
	<i>Monilinia fructicola</i>	ATCC 62879
	<i>Monilinia laxa</i>	VG105*
	<i>Penicillium digitatum</i>	VG20*
	<i>Penicillium expansum</i>	CECT20140
	<i>Penicillium italicum</i>	VG101*

3.4.3. Obtención de las suspensiones

El número de bacterias por mL se determinó por recuento microscópico directo (depositando 10 µL de la suspensión en una superficie de 1 cm² delimitado en un porta y contando el número de esporas presentes en 20 campos) y posterior dilución en caldo TSB.

Para los mohos, en cada placa de PDA que contenía las cepas fúngicas crecidas se añadieron 5 mL de agua destilada estéril, con un 0,05% de Tween 80; posteriormente se raspó la superficie con asa de siembra estéril para separar el micelio y las esporas de su superficie y se homogenizó el tubo en un vortex. A continuación, el líquido fue filtrado a través de 4 capas de gasa estéril. El número de esporas por mL se ajustó al igual que en el caso de las bacterias.

3.6.4. Técnica de difusión en agar

La actividad antimicrobiana de dichos extractos se determinó mediante la técnica de difusión en agar.

Para ello, se inoculó en placas de agar Mueller-Hinton (Oxoid; Hampshire, England) 0,1 mL de la suspensión microbiana adecuada: bacterias (10⁸ unidades formadoras de colonia (ufc) /mL) y mohos (10⁴ ufc/mL). Dicho inóculo se extendió de

forma homogénea por toda la superficie de la placa con ayuda de un hisopo estéril. A continuación, 100 µL de cada extracto se añadieron a un disco de papel de filtro de 6 mm (Filter-Lab; Madrid, España) que se depositó en la superficie de las placas inoculadas. Se depositaron 3 réplicas de cada extracto por disco y un disco impregnado con el disolvente (3% etanol-0,05% Tween 80) como control. Las placas se incubaron durante 24-72 h en las condiciones óptimas de cada microorganismo y la zona de inhibición se midió, en milímetros, mediante un calibre automático Flash and Go (IUL Instruments; Barcelona, España). Los resultados obtenidos por el método de difusión en agar son cuantitativos y la capacidad inhibitoria de los extractos frente a los microorganismos se clasificó en: no sensible (-) cuando el diámetro del halo de inhibición, incluyendo el disco, es inferior a 8 mm; sensible (+) para un diámetro entre 8 y 14 mm; muy sensible (++) para un diámetro entre 14 y 20 mm; y extremadamente sensible (+++) para un diámetro igual o superior a 20 (Elaissi et al., 2011). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de la extracción de compuestos de interés

A pesar de que muchos autores coinciden en el hecho de que la mayor eficacia en la extracción de compuestos bioactivos a partir de materias vegetales se adquiere utilizando metanol como solvente, en este estudio se decidió emplear etanol con el objetivo de reducir el impacto sobre el medio ambiente por el uso de solventes orgánicos de alta toxicidad. Sin embargo, con el objetivo de recuperar la mayor concentración de compuestos de interés posible, se realizó un ensayo previo para evaluar con qué proporción de solventes en la mezcla etanol-agua se extraía más de la muestra. Los resultados obtenidos en la determinación de fenoles y flavonoides totales con cada uno de los solventes empleados (0-100, 20-80, 40-60, 60-40, 80-20, y 100-0 etanol-agua (v:v)) se muestran en la figura 4.1.

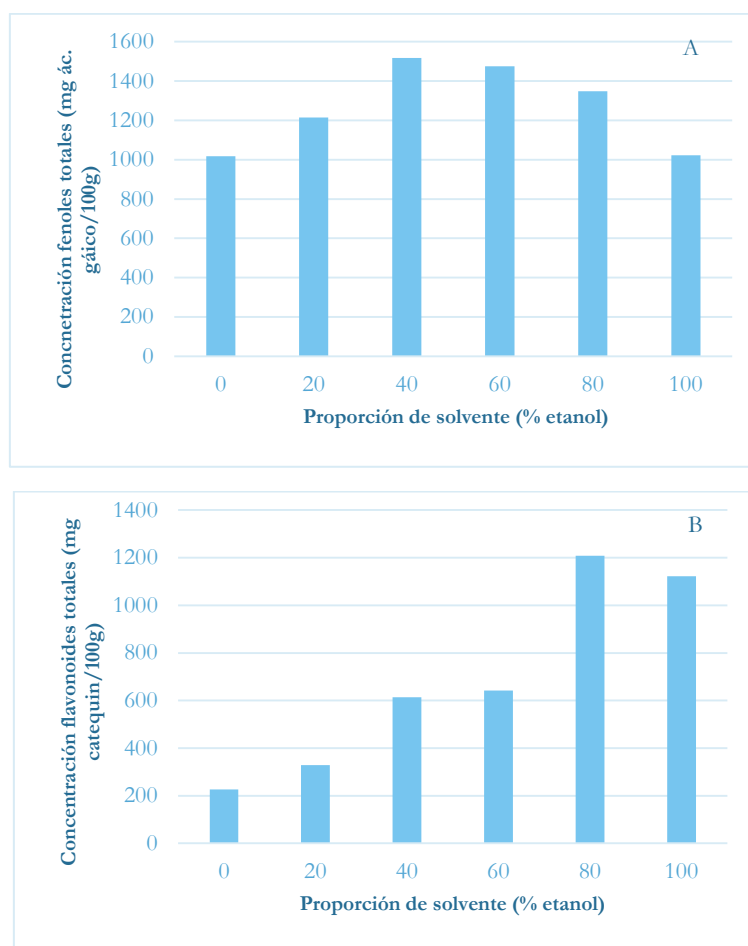


Figura 4.1. Concentración de fenoles (A) y flavonoides (B) totales obtenidas con diferentes proporciones de etanol.

Se observa que la mayor concentración de compuestos fenólicos totales se obtuvo empleando un 40% de etanol. Sin embargo, las diferencias con las concentraciones obtenidas con un 60% o un 80% de etanol son mínimas. Por otro lado, sí que se observan diferencias significativas en la extracción de flavonoides totales entre los extractos al 40 o 60% de etanol con el obtenido al 80%, siendo este el más efectivo para la extracción de compuestos de interés de la piel de rambután. Por este motivo, se utilizó etanol al 80% para todas las extracciones posteriores.

4.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales

En la *figura 4.2* se muestran los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fenólicos totales para los extractos de rambután fresco, deshidratado y liofilizado de las tres partes del fruto: piel, pulpa y hueso.

Se observa que la piel de rambután es un subproducto con alto contenido en estos compuestos, muy por encima del resto de tejidos analizados, además de que la liofilización es el tratamiento que mejor preserva la cantidad de dichos compuestos en comparación con la deshidratación, incluso permite una mejor extracción de fenoles, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Chan et al. (2009). Este fenómeno se debe a que los cristales formados durante la congelación del agua del alimento favorecen la ruptura de las células y por consiguiente facilita la salida de los compuestos retenidos hacia el solvente, lo que permite conseguir mayores eficacias en extracciones a partir de materias liofilizadas que a partir de materias frescas (Asami et al., 2009).

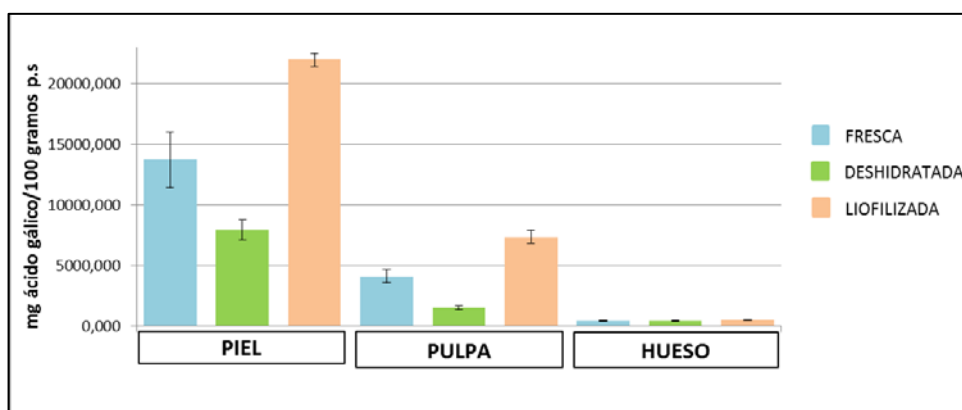


Figura 4.2. *Compuestos fenólicos totales en las distintas fracciones del fruto de rambután (piel, pulpa y hueso) procedentes de muestras frescas, deshidratadas y liofilizadas*

Así pues, la piel de rambután es la zona fisiológica del fruto con mayor cantidad

de compuestos fenólicos, frente al hueso que es la de menor contenido.

Dentro de la piel, la liofilizada es la que contiene mayor cantidad de estos compuestos (21976,446 mg de ácido gálico/100 g de p.s), seguida de la fresca (13721,441 mg de ácido gálico/100 g de p.s) y de la deshidratada (7967,651 mg de ácido gálico/100 g de p.s).

Dichos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores. Palanisamy et al., 2008 determinó 762 ± 10 mg GAE/ g extracto (GAE: del inglés, equivalentes de ácido gálico) en piel de rambután desecada, y Chunglok et al., (2014) hallaron valores de 104,6 mg GAE/ g peso seco.

El elevado contenido de compuestos fenólicos del rambután podría compararse con otros frutos característicos por sus tonalidades rojizas y violetas, y ricos en estos compuestos antioxidantes. Así, en la tabla 4.1 donde se muestra el contenido de fenoles totales en algunos de estos frutos expresados en mg/100 gramos de peso fresco, se observa que la piel de rambután podría considerarse un subproducto rico en compuestos antioxidantes.

Tabla 4.1 Fenoles totales en distintas frutas

Producto	Fenoles (mg/100 g de peso fresco)	Referencia
Frambuesa	114,0	(Aaby et al., 2012)
Cereza	105,0	(Fu et al., 2011)
Ciruela roja	143,5	
Granada	146,9	
Arándano	171,0	
Uva	200,1	
Mora	417,0	

4.3. Cuantificación de flavonoides totales

La concentración de flavonoides de la piel, pulpa y hueso de rambután aparece reflejada en la figura 4.3., donde se observa que la mayor concentración de flavonoides se encuentra en la piel fresca (2771,671 mg de catequina/100g p.s), seguida de la piel liofilizada (1911,974 mg catequina/100g p.s) y en último lugar la piel deshidratada (1018,405 mg catequina/100g p.s).

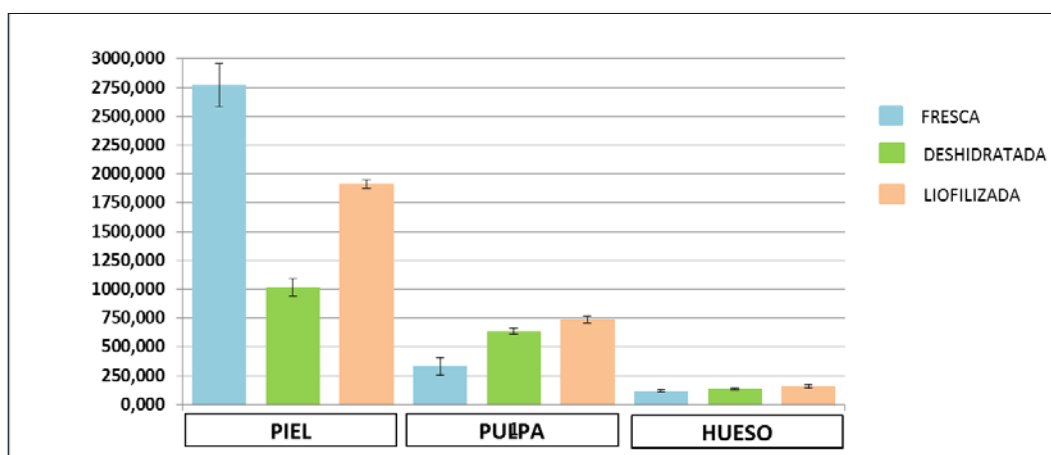


Figura 4.3. Flavonoides totales (mg catequina/100 g p.s) en las distintas fracciones del fruto de rambután (piel, pulpa y hueso) procedentes de muestras frescas, deshidratadas y liofilizadas

Los resultados obtenidos por otros autores como Thitilertdech et al., 2008 de contenido de flavonoides en piel de rambután desecada son de 542,2 mg catequina/g de extracto seco, valores superiores a los obtenidos en el presente estudio.

Esta discrepancia tiene un enfoque multivariable, ya que son muchos los factores de los que depende concentración de estos compuestos: intrínsecos o propios del fruto (variedad o grado de madurez en el momento del ensayo), factores ambientales, zona geográfica del cultivo, climatología, procedimiento de extracción (pretratamiento de la muestra, tipo de solvente, tecnología de extracción, temperatura, tiempo, número de extracciones, etc.).

4.4. Capacidad antioxidante de los extractos

Los compuestos fenólicos están relacionados con la actividad antioxidante porque actúan como secuestrantes de radicales libres y quelantes de iones metálicos (Du et al., 2009; Jacob et al., 2008). Además tienen la capacidad de neutralizar especies reactivas al oxígeno a altas concentraciones (Moongkarndi et al., 2004; Russo et al., 2005). Para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos, se utilizaron dos métodos: el del radical libre DPPH y el FRAP, cuyos resultados se detallan en las tablas 4.2 y 4.3.

Tabla 4.2 Capacidad antioxidante determinada por el método DPPH (mg Trolox/100 g p.s) en las distintas fracciones del fruto de rambután (piel, pulpa y hueso) procedentes de muestras frescas, deshidratadas y liofilizadas

	Piel	Pulpa	Hueso
FRESCA	12454,0 ± 1596	926,553 ± 98,0	419,4 ± 68,0
DESHIDRATADA	5875,4 ± 700,1	424,9 ± 25,1	380,7 ± 109,4
LIOFILIZADA	27229,0 ± 499,4	2901,7 ± 112,4	463,9 ± 313,8

Tabla 4.3 Capacidad antioxidante determinada por el método FRAP (mg Trolox/100 g p.s) en las distintas fracciones del fruto de rambután (piel, pulpa y hueso) procedentes de muestras frescas, deshidratadas y liofilizadas.

	Piel	Pulpa	Hueso
FRESCA	876,8 ± 177,0	802,2 ± 79	344,0 ± 53,6
DESHIDRATADA	200,0 ± 40,0	204,0 ± 10,5	350,8 ± 5
LIOFILIZADA	2147,0 ± 136,0	296,2 ± 46	326,9 ± 5,3

Los resultados demuestran que la piel de rambután, contiene la mayor capacidad antioxidante, obteniéndose el mayor valor del extracto liofilizado (27229,035 ± 499,375 mg de Trolox/100 g p.s) cuantificado por el método DPPH .Ocurre lo mismo con el método FRAP (2147,006 ± 136,001 mg Trolox/100g p.s), siendo ambos resultados significativamente superiores al resto.

Esta propiedad aumenta cuanto mayor es la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la cuantificación de estos componentes.

4.5. Identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios

Tras la separación cromatográfica de los extractos se consiguieron identificar mediante HPLC algunos de los compuestos fenólicos individuales, en base a la información espectral de los patrones disponibles.

Desafortunadamente, no en todos los casos se pudo cuantificar la presencia de dichos compuestos. Además, no todos los picos cromatográficos pudieron ser identificados, y en caso afirmativo sería necesaria una técnica más robusta de confirmación como la espectrometría de masas acoplada a HPLC.

La tabla 4.4 muestra el perfil fenólico de los extractos de rambután. Se observa que en el hueso los compuestos identificados fueron la quercetina y el ácido gálico, siendo el extracto fresco el de mayor contenido de dichos componentes. En los extractos obtenidos de la piel, el ácido gálico y el ácido elágico son los únicos compuestos identificados. Además en el extracto liofilizado se encuentran en mayor concentración que el mismo tejido deshidratado y fresco. Por último, en la pulpa no se detectó ninguno de los compuestos analizados.

Tabla 4.4 Compuestos fenólicos identificados en los extractos en las distintas fracciones del fruto de rambután (piel, pulpa y hueso) procedentes de muestras frescas, deshidratadas y liofilizadas

EXTRACTO	COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/g)
HUESO FRESCO	Ácido elágico	n.d
	Ácido cumárico	n.d
	Quercetina	0,1806 ± 0,07
	Ácido gálico	0,137 ± 0,03
	Vainillina	n.d
	Ácido ferúlico	n.d
	Catequina	n.d
HUESO DESHIDRATADO	Ácido elágico	n.d
	Ácido cumárico	n.d
	Quercetina	0,1971
	Ácido gálico	0,07 ± 0,01
	Vainillina	n.d
	Ácido ferúlico	n.d
	Catequina	n.d
HUESO LIOFILIZADO	Ácido elágico	n.d
	Ácido cumárico	n.d
	Quercetina	0,116 ± 0,007
	Ácido gálico	0,104 ± 0,06
	Vainillina	n.d
	Ácido ferúlico	n.d

Tabla 4.4 (cont.) Compuestos fenólicos identificados en los extractos en las distintas fracciones del fruto de rambután (piel, pulpa y hueso) procedentes de muestras frescas, deshidratadas y liofilizadas

PIEL FRESCA	Ácido elágico	3,56 \pm 0,55
	Ácido cumárico	n.d
	Quercetina	n.D
	Ácido gálico	0,163 \pm 0,08
	Vainillina	n.D
	Ácido ferúlico	n.d
PIEL DESHIDRATADA	Ácido elágico	1,773 \pm 0,55
	Ácido cumárico	n.d
	Quercetina	n.d
	Ácido gálico	0,117 \pm 0,002
	Vainillina	n.d
	Ácido ferúlico	n.d
PIEL LIOFILIZADA	Ácido elágico	4,194 \pm 0,204
	Ácido cumárico	n.d
	Quercetina	n.d
	Ácido gálico	0,205 \pm 0,014
	Vainillina	n.d
	Ácido ferúlico	n.d

n.d.: no detectado

La tabla 4.4. muestra que fueron pocos los compuestos fenólicos identificados y que su suma está muy lejos del contenido fenólico total determinado en el epígrafe 4.2. Este hecho sugiere que en el rambután, además del ácido elágico, los compuestos fenólicos mayoritarios son otros tales como la coligarina o la geranina llegando a representar el 70 % del contenido total (Thitilertdecha et al., 2010).

4.6. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de rambután

En la tabla 4.5 se muestran los resultados de los ensayos antimicrobianos obtenidos por la técnica de difusión en agar.

Del mismo modo que en los resultados obtenidos por Thitilertdecha et al. (2008), se observa que los extractos de piel de rambután demostraron tener capacidad antimicrobiana frente a *S. aureus*, y en nuestro caso también frente *B. cereus* en concentraciones de 0,5 y 1 g/mL en las muestras frescas y deshidratadas. Por otro lado,

los extractos liofilizados además de inhibir significativamente el crecimiento de ambos microorganismos a una concentración menor (0,25 g/mL), también presentaron halos de inhibición más amplios.

Tabla 4.5. Halos de inhibición en los extractos de piel de rambután procedentes de muestras frescas, deshidratadas y liofilizadas

Extracto	Concentración del extracto (g/mL)	Halo de inhibición frente a bacterias (mm)					
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
FRESCA	0.25	-	(-)	(-)	(-)	-	(-)
	0.5	10,5±2,04	(-)	(-)	(-)	5,7±0,7	(-)
	1	13,3±1,8	(-)	(-)	(-)	7,7±2,1	(-)
DESHIDRATADA	0.25	-	(-)	(-)	(-)	-	(-)
	0.5	12,3± 2,1	(-)	(-)	(-)	6,5±0,51	(-)
	1	16,6± 1,7	(-)	(-)	(-)	5,01±0,04	(-)
LIOFILIZADA	0.25	13,7± 2,5	(-)	(-)	(-)	7,88±1,98	(-)
	0.5	17,5± 2,3	(-)	(-)	(-)	6,23±1,50	(-)
	1	17,74±1	(-)	(-)	(-)	8,45±1,56	(-)

Por el contrario, a pesar del creciente interés para el control de podredumbres producidas por ciertos mohos alterantes de alimentos de origen vegetales, y el mantenimiento de la calidad postcosecha de los productos, ninguno de los extractos presentó actividad antifúngica significativa frente a los mohos fitopatógenos ensayados.

5. CONCLUSIONES

- La combinación de solvente que permite extraer la mayor cantidad de fenoles y flavonoides totales del fruto de rambután es 80:20 etanol-agua (v:v) debido al gradiente de polaridad que se consigue mezclando estos dos solventes.
- Independientemente del tratamiento previo de la muestra (fresca (ninguno), deshidratación o liofilización), la piel de rambután es el tejido que presenta el mayor contenido en compuestos fenólicos y flavonoides totales.
- Posiblemente, la elevada capacidad antioxidante hallada en la piel de rambután viene determinada por el alto contenido en compuestos fenólicos postulando este residuo vegetal como un subproducto del que obtener compuestos de interés que pueden suponer un beneficio a nivel económico, nutricional o tecnológico.
- El ácido elágico y el ácido gálico han sido los dos únicos compuestos fenólicos, de los analizados (ácido gálico, ácido elágico, vainillina, ácido ferúlico, cumárico y clorogénico, catequina, quercetina, galocatequina y epicatequina), identificados en la piel del rambután suponiendo su suma un pequeño porcentaje del contenido fenólico total. Este hecho puede deberse a que en este producto los fenoles mayoritarios son la coligarina y la geranina.
- Mientras que el proceso de deshidratación reduce el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en cada uno de los tejidos de rambután analizados, la liofilización ha demostrado preservarlos mejor, e incluso extraer más cantidad de dichos compuestos que los obtenidos a partir de las materias vegetales frescas, por lo que se elige como la mejor estrategia para conservar las propiedades funcionales del rambután.
- Probablemente, el elevado contenido en compuestos fenólicos de los extractos de piel de rambután liofilizada es el responsable de su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *S. aureus* y *B. cereus*.

CONCLUSIONS

- The solvent's proportion that allows to extract the highest quantity of total phenols and flavonoids from rambutan fruit is 80% ethanol:20% water (v:v) due to the gradient of polarity that is obtained mixing these two solvents.
- Independently of the previous treatment (fresh (none), dehydration or liophilisation), the rambutan peel presents the highest content in total phenolic and flavonoids compounds.
- Probably, the high antioxidant capacity detected in rambutan peel is derived from its high content in phenolic compounds, placing this vegetable residue as an interesting by-product to obtain interesting compounds with economic, nutritional or technological benefits.
- Elagic and galic acid have been the only phenolic compounds detected in the rambutan peel among those analyzed (galic, elagic, ferulic, cumaric and chlorogenic acids, vanillin, catequin, quercetin, galocatequin and epicatequín) and represent a small percentage of the total phenolic content. This could be due to the fact that in this product the major phenols are corilagin and geraniin.
- Whereas the drying process reduces the total phenolic content present in each one of the rambutan parts analyzed, freeze-drying has demonstrated to preserve them better, and to extract more quantity of the above mentioned bioactive compounds than the one obtained from the fresh samples. Thus, lyophilisation raised as the best strategy to preserve the rambutan functional properties.
- Probably, the high content of phenolic compounds found in freeze-dried rambutan peel extracts is the responsible of their *in vitro* antimicrobial activity against *S. aureus* and *B. cereus*.

6. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

Las aportaciones de aprendizaje de esta asignatura han sido:

- Comprensión y funcionamiento de equipos de laboratorio, cuyo fundamento ya conocía, pero el tener que utilizarlos de forma independiente hizo que tuviese que comprender más profundamente su funcionamiento , medidas de precaución y manejo.
- Preparación y administración de muestras de manera minuciosa para que interviniesen las mínimas variables posibles y por lo tanto las muestras fuesen similares entre ellas. Además también fue necesario una codificación de las muestras para identificarlas y distinguirlas, puesto que el número de muestras era elevado.
- Métodos analíticos y sus fundamentos, lo que me permitió comprender los resultados obtenidos y poder deducir posibles errores durante el estudio experimental y tratamiento de resultados.
- Organización, planificación y autonomía de trabajo, administrando lo más eficientemente posible el tiempo de trabajo y recursos.
- Gestión y síntesis de información.
- Utilización de bases de datos para búsqueda de artículos utilizados en la revisión bibliográfica y saber cómo y donde buscar información.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aaby, K., Mazur, S., Nes, A. y Skrede, G.** (2012). Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*, 132, 86-97
- Abraham, E., Ramachandran, S., y Ramalingam, V.** (2007). Biogas: can it be an important source of energy? *Environmental Science and Pollution Research - International*, 14(1), 67-71.
- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., y Fraga, C. G.** (2006). Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 229-234.
- Ajila, C. M., Aalami, M., Leelavathi, K., y Rao, U. J. S. P.** (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 219-224.
- Ajila, C. M., Bhat, S. G., y Prasada Rao, U. J. S.** (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102(4), 1006-1011.
- Arias T., M.** (2014). El cultivo de rambután(*Nephelium lappaceum* L). Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria en Costa Rica, 21.
- Asami, D.K., Hong, Y.J., Barrett, D.M. y Mitchell, A.E.,** (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 1237-1241.
- Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., y González-Aguilar, G. A.** (2010). Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: looking for integral exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8), R175-R181.
- Cerdeño , J.M.** (2015) Consumo de frutas y hortalizas. Evolución, situación actual y perfiles dela demanda. Universidad complutense de Madrid.
- Chan E.W.C, Lim Y.Y, Wong S.K. , Lim K.K, Tan S.P, Lianto F.S., and Yong M.Y.** (2009) Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*, 113, 166-172.
- Chunglok, W., Utaipan, T., Somchit, N., Lertcanawanichakul, M., y Sudjaroen, Y.** (2014). Antioxidant and Antiproliferative Activities of non-Edible parts of selected tropical fruits. *Sains Malaysiana*, 43(5), 689-696.
- Contreras-Calderon, J., Calderon-Jaimes, L., Guerra-Hernandez, E., y Garcia-Villanova, B.** (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047-2053.
- Correia, R. T. P., Borges, K. C., Medeiros, M. F., y Genovese, M. I.** (2012). Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical

- fruit residues. *Food Science and Technology International*, 18(6), 539-547.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., y Clifford, M. N.** (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., y Crozier, A.** (2013). Dietary (Poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818-1892.
- Descalzo, A., Sancho, A.** (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79 (3): 423 – 436.
- Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., Sánchez-Moreno, C., y de Ancos, B.** (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, 57(0), 51-60.
- Du, G., Li, M., Ma, F., y Liang, D.** (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chemistry*, 113(2), 557-562.
- Elaissi, A., Salah, K.H., Mabrouk, S., Larbi, K.M., Chemli, R. y Harzallah-Skhiri, F.** (2011). Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species' essential oils. *Food Chemistry*, 129, 1427-1434.
- Fennema, O. R.** (2000). *Química de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Frutas.consumer.es**[sede Web].[acceso 28 de abril de 2016].Disponible en: <http://frutas.consumer.es/>
- Fu, L., Xu, B., Xu, X., Gan, R., Zhang, Y., Xia, E. y Li, H.** (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345-350.
- Gonzalez-Montelongo, R., Gloria Lobo, M., y Gonzalez, M.** (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119(3), 1030-1039
- Griffin, S. P., y Bhagooli, R.** (2004). Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2), 201-211.
- Iacopini, P., Camangi, F., Stefani, A., y Sebastiani, L.** (2010). Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of Malus x domestica Borkh. in a peroxynitrite-induced oxidative process. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 518-524.
- Ignat, I., Volf, I., y Popa, V. I.** (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Jacob, J. K., Hakimuddin, F., Paliyath, G., y Fisher, H.** (2008). Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines. *Food Research International*, 41(4), 419-428.
- Jahurul, M. H. A., Zaidul, I. S. M., Ghaffoor, K., Al-Juhaimi, F. Y., Nyam, K.-L., Norulaini, N. A. N. y Mohd Omar, A. K.** (2015). Mango (*Mangifera indica* L.)

- by-products and their valuable components: A review. *Food Chemistry*, 183(0), 173-180.
- Kelly, G. S.** (1996). Bromelain: A literature review and discussion of its therapeutic applications. *Alternative Medicine Review*, 1(4), 243-257.
- Khonkarn R., Okonogi S., Ampasavate C. y Anuchapreeda S.** (2010) Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2122–2129.
- Llorach, R., Tomas-Barberan, F. A., y Ferreres, F.** (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5109-5116.
- Mamboya, E.** (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8, 99-104.
- Moongkarndi, P., Kosem, N., Kaslungka, S., Luanratana, O., Pongpan, N., y Neungton, N.** (2004). Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(1), 161-166.
- Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., y Chowwanapoonpohn, S.** (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103(3), 839-846.
- Palanisamy, U., Ming, C. H., Masilamani, T., Subramaniam, T., Teng, L. L., y Radhakrishnan, A. K.** (2008). Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants. *Food Chemistry*, 109(1), 54-63.
- Pokorny,J., Yanishlieva, N. y Gordon, M.** (2005). Antioxidantes de los alimentos: aplicaciones prácticas. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Ramesa S.B. y Sooad A.** (2014)Antimicrobial activity of Litchi chinensis and Nephelium lappaceum aqueous seed extracts against some pathogenic bacterial strains.*Journal of King Saud University Science*,26,79-82.
- Ramirez ,T. Albc, C. Ahmad, R.** (2003). Manual para el cultivo y propagación de rambután en Honduras. Proyecto de Gestión Sostenible de los Recursos Naturales y Cuencas del Corredor Biológico Mesoamericano en el Atlántico Hondureño, 47.
- Redondo, D., Venturini M.E., Oria R. y Arias E.** (2016a) Inhibitory effect of micro-waved thinned nectarine extracts on polyphenol oxidase activity. *Food Chemistry*, 197, 603-610
- Redondo, D., Arias, E.,Oria R. y Venturini M.E.**(2016b).Thinned stone fruits are a source of polyphenols and antioxidant compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI 10.1002/jsfa.7813
- Redondo,D.** (2014). El aclareo en frutos de hueso: una nueva fuente de compuestos de interés funcional y tecnológico. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Ribeiro da Silva, L. M., Teixeira de Figueiredo, E. A., Pontes Silva Ricardo, N. M., Pinto Vieira, I. G., de Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., y Gomes, C. L.** (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398-404.

- Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Vanella, A., y Garbarino, J. A.** (2005). Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of *Geum quellyon* sweet roots in human tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 323-332.
- Schuldt, M.** (2006). *Lombricultura: teoría y práctica*. Ed. Mundi-Prensa Libros. Madrid.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., y Byrne, D. H.** (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675.
- Thitilertdecha N., Teerawutgulrag A., Kilburn J.D., Rakariyatham N.** (2010) Identification of major phenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. and Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 15, 1453-1465.
- Thitilertdecha, N., Teerawutgulrag, A., y Rakariyatham, N.** (2008). Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2029-2035.
- Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., y Kader, A. A.** (2001). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4748-4760.
- Tsaknis, J., Lalas, S., Protopapa E.** (2002). Effectiveness of the antioxidants BHA and BHT in selected vegetable oils during intermittent heating. *Grasas y Aceites* 53 (2), 199-205
- Valenzuela, A., Sanhueza ,J., Nieto, S.** (2003) Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Grasas y aceites*, 54 (3), 295
- Yapo, B. M., Besson, V., Koubala, B. B., y Koffi, K. L.** (2013). Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *American Journal of Food and Nutrition*, 1(3), 38-46.
- Yepes, S. M., Montoya Naranjo, L. J., y Orozco Sánchez, F.** (2008). Valorización de residuos agroindustriales- frutas - en Medellín y el sur del valle del Aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 61, 4422-4431.