

Máster en Nuevos Alimentos

**Empleo de extractos de ciruela
sometidos a diferentes procesos de
secado como ingredientes para la
mejora de la salud gastrointestinal**

Alba Cuño Gallardo

Directores: Dr. José Manuel Silván Jiménez

Dr. Adolfo J. Martínez Rodríguez

Tutor: Dr. Mónica Rodríguez

Lugar de realización: Instituto de Investigación
en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM



FACULTAD DE
CIENCIAS

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Consumo de frutas y su implicación en la salud gastrointestinal.....	1
1.2. La ciruela: origen, tipos y producción.....	2
1.3. Técnicas de procesamiento de la ciruela.....	3
1.4. Composición y propiedades beneficiosas de la ciruela.....	5
1.5. Principales propiedades biológicas de la ciruela: compuestos fenólicos.....	7
1.5.1. Actividad antibacteriana.....	7
1.5.2. Actividad antioxidante.....	8
1.5.3. Actividad anti-inflamatoria.....	9
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo general.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. PLAN DE TRABAJO.....	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1. Materiales y reactivos.....	11
4.2. Preparación y secado de los extractos de ciruela.....	11
4.3. Caracterización de la composición fenólica de los diferentes extractos.....	12
4.4. Estudio <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante.....	13
4.5. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo.....	16
4.6. Estudio del efecto de los diferentes extractos de ciruela frente a microorganismos patógenos y probióticos.....	17
4.7. Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	17
4.8. Estudio del efecto de los extractos de ciruela sobre la viabilidad en células epiteliales humanas y macrófagos.....	18

4.9. Estudio de la actividad anti-inflamatoria empleando un modelo celular.....	19
4.10. Estudio de la actividad antioxidante empleando un modelo celular.....	20
4.11. Análisis estadístico.....	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
5.1. Caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales presentes en los extractos secos de ciruela.....	22
5.2. Actividad antioxidante.....	26
5.3. Ensayos microbiológicos.....	27
5.3.1. Actividad antibacteriana frente a microorganismos patógenos.....	27
5.3.2. Actividad frente a microorganismos beneficiosos para la salud.....	31
5.4. Efecto de los extractos secos de ciruela sobre la viabilidad en células epiteliales intestinales humanas y macrófagos.....	34
5.5. Estudio de la actividad anti-inflamatoria empleando un modelo celular.....	35
5.6. Estudio de la actividad antioxidante empleando un modelo con células intestinales humanas.....	37
6. CONCLUSIONES.....	39
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición nutricional de la ciruela.....	6
Tabla 2: Procesos de secado de las diferentes muestras de ciruela.....	12
Tabla 3. Compuestos fenólicos identificados por LC-MS en los extractos de ciruela obtenidos por diferentes métodos de secado.....	23
Tabla 4. Contenido de ácidos fenólicos presentes las muestras de zumo de ciruela en polvo obtenidas por liofilización (LF), secado al vacío (SV) y atomización (SA) (mg/kg materia seca).....	24
Tabla 5. Contenido de flavonoles presentes las muestras de zumo de ciruela en polvo obtenidas por liofilización (LF), secado al vacío (SV) y atomización (SA) (mg/kg materia seca).....	25
Tabla 6. Contenido de antocianos presentes las muestras de zumo de ciruela en polvo obtenidas por liofilización (LF), secado al vacío (SV) y atomización (SA) (mg/kg materia seca).....	25
Tabla 7. Influencia de los diferentes métodos de secado en la actividad antioxidante de los extractos secos de ciruela determinado mediante los métodos TEAC y FRAP (mmol Trolox/100 g materia seca).....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Variedades de ciruela según su color.....	2
Figura 2. Producción mundial de ciruela en los años 2011-2016.....	3
Figura 3: Diferentes técnicas de secado.....	4
Figura 4: Ensayo de decoloración.....	14
Figura 5: Reducción de iones Fe^{3+} a iones Fe^{2+} mediante el ensayo FRAP.....	15
Figura 6: Cambio de color debido a la reducción de iones Fe^{3+} a iones Fe^{2+}	15
Figura 7: Esquema de reacción de la sonda DCFDA para la detección de las especies reactivas de oxígeno.....	21
Figura 8. Actividad antibacteriana de las diferentes muestras de ciruela sometidas a diferentes procesos de secado frente a <i>E. coli</i>	27
Figura 9: Actividad antibacteriana de las muestras de ciruela sometidas a diferentes procesos de secado frente a <i>S. aureus</i>	29
Figura 10: Actividad antibacteriana de los extractos secos de ciruela frente a <i>C. jejuni</i>	30
Figura 11. Efecto de los extractos de ciruela sometidos a diferentes procesos de secado sobre la viabilidad de <i>L. casei</i>	32
Figura 12. Efecto de las muestras de ciruela sometidas a diferentes procesos de secado sobre la viabilidad de <i>L. paracasei</i>	32
Figura 13. Efecto de las muestras de ciruela sometidas a diferentes procesos de secado sobre la viabilidad de <i>S. boulardii</i>	33
Figura 14. Efecto de los extractos secos de ciruela (1 mg/mL) sobre la viabilidad de células HT-29 de epitelio intestinal humano y células RAW 264.7 de macrófagos.....	34
Figura 15. Efecto de las muestras secas de ciruela (1 mg/mL) sobre la producción de NO en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 estimulada por LPS (10 μ g/mL) durante 24 h.....	36

Figura 16. Efecto protector de los extractos secos de ciruela frente al estrés oxidativo en células intestinales humanas HT-29.....	37
Figura 17. Efecto protector de los extractos secos de ciruela sobre la generación intracelular de ROS tras la exposición a t-BOOH.....	38

ABREVIATURAS

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

ANOVA: Análisis de varianza

ATCC: American Type Culture Collection

BB: Brucella-Broth

C. jejuni: *Campylobacter jejuni*

CIAL: Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

DAD: Detector de diodos

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DE: Desviación estándar

E. coli: *Escherichia coli*

EFSA: Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria

FAO/STAT: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación

FBS: Fetal bovine serum (Suero fetal bovino)

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder Antioxidante Reductor de Hierro)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)

iNOS: NO sintasa inducible

L. casei: *Lactobacillus casei*

L. paracasei: *Lactobacillus paracasei*

LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad

LF: Liofilización

LPS: Lipopolisacárido

MHB: Mueller Hinton sangre

MTT: Bromuro de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil-tetrazolio

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity (capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)

PBS: Phosphate buffer saline (Solución salina tamponada con fosfato)

PDA: Photodiode Array Detection (Detector de fotodiodos)

ROS: Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. boulardii: *Saccharomyces boulardii*

SA: Secado por atomización

SV: Secado a vacío

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox)

TPTZ: 2,4,6-tripyridyl-s-triazine

UE: Unión Europea

UFC: Unidades formadoras de colonia

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento)

VAIN: Incubador de atmosfera variable

RESUMEN

Las ciruelas son frutas que presentan en su composición una gran variedad de compuestos bioactivos, de los cuales se han estudiado diversas actividades biológicas, muchas de ellas relacionadas con los compuestos fenólicos. El presente trabajo evalúa las propiedades bioactivas (antibacteriana, anti-inflamatoria y antioxidante) que presentan diferentes extractos de ciruela obtenidos mediante diversos métodos de secado y su implicación en la mejora de la salud gastrointestinal.

Con este propósito se ha llevado a cabo la preparación y el secado de dichos extractos mediante liofilización, secado a vacío (40, 60 y 80 °C) y secado por atomización. Una vez obtenidos los extractos, se ha llevado a cabo la identificación y caracterización de los fenoles individuales presentes en los mismos. Seguidamente, se llevó a cabo el estudio de las diversas actividades biológicas de interés: evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* (TEAC y FRAP), evaluación de los diferentes extractos de ciruela frente a microorganismos patógenos y beneficiosos para la salud y el estudio de la actividad anti-inflamatoria y antioxidante empleando un modelo celular.

El análisis de las propiedades bioactivas de los extractos obtenidos ha demostrado que los extractos de ciruela son una fuente potencial de compuestos que contribuyen a la mejora de la salud gastrointestinal, ya que son capaces de actuar como agentes antimicrobianos, anti-inflamatorios y antioxidantes. A su vez, cabe destacar que el método de preparación y la temperatura de secado de los extractos influye significativamente en la composición fenólica de los extractos de ciruela, determinando también las propiedades bioactivas de estos extractos.

ABSTRACT

Plums are fruits that present a wide variety of bioactive compounds in their composition, of which various biological activities have been studied, many of them related to phenolic compounds. The present work evaluates the bioactive properties (antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant) presented by different plum extracts obtained by various drying methods and their implication in the improvement of gastrointestinal health.

For this purpose, these extracts were prepared and dried by freeze-drying, vacuum drying (40, 60 and 80 °C) and spray drying. Once the extracts have been obtained, the identification and characterization of the individual phenols present in them has been carried out. Subsequently, the study of the various biological activities of interest was carried out: evaluation of the antioxidant activity *in vitro* (TEAC and FRAP), evaluation of the different plum extracts against pathogenic and beneficial microorganisms for health, and study of the anti-inflammatory and antioxidant activity using a cellular model.

The analysis of the bioactive properties of the extracts obtained has shown that plum extracts are a potential source of compounds that contribute to the improvement of gastrointestinal health, since they are able to act as antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant agents. In turn, it should be noted that the preparation method and the drying temperature of the extracts significantly influences the phenolic composition of the plum extracts, also determining the bioactive properties of these extracts.

1. INTRODUCCIÓN

Las frutas y las verduras son componentes esenciales de una dieta saludable y un consumo diario suficiente podría contribuir a la prevención de enfermedades importantes. Actualmente una de las recomendaciones nutricionales más repetidas por los profesionales de la salud es la de ingerir al menos cinco piezas de fruta al día. Las razones son numerosas, ya que la fruta constituye un auténtico cóctel de beneficios nutricionales, dado que es rica en vitaminas, en fibra, en antioxidantes, en minerales y en otros nutrientes, los cuales ejercen una influencia directa en el buen funcionamiento del organismo y estimulan el funcionamiento del sistema digestivo e inmunológico. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que una ingesta insuficiente de frutas es uno de los diez factores principales de riesgo de mortalidad a escala mundial y que un consumo adecuado de las mismas podría salvar hasta 1,7 millones de vidas al año. Un consumo mínimo diario de 400 g de fruta y verdura ayuda a reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades (OMS, 2013).

1.1. Consumo de frutas y su implicación en la salud gastrointestinal

Las frutas son una parte fundamental de nuestra alimentación y constituyen, junto a otros grupos de alimentos, la esencia de lo que entendemos por dieta mediterránea. Su riqueza en vitaminas, elementos minerales y fibra, hacen que su consumo sea imprescindible para conseguir una alimentación sana y equilibrada, lo que aporta numerosos beneficios para la salud humana. Las frutas son alimentos que se caracterizan por presentar un bajo índice calórico y contienen diferentes principios activos, los cuales pueden ayudar a prevenir y mitigar ciertas enfermedades (Rekhy y McConchie, 2014). Son muchos los estudios que afirman que el consumo de frutas está relacionado con la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, diabetes tipo II, obesidad y algunos tipos de enfermedades gastrointestinales (Figiel y Michalska, 2016). En este último caso, cabe recordar que la mayoría de las patologías gastrointestinales tienen su origen en una inadecuada alimentación y en la falta de rutinas alimenticias sanas. En este punto, la microbiota intestinal es clave para el desarrollo de este tipo de patologías, ya que es ahí donde se producen las alteraciones que finalmente desencadenan diversos tipos de problemas gastrointestinales tales como diarreas, síndrome del intestino irritable u otras patologías como obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico o algunos tipos de cáncer

(Polanco Allué, 2015). Por tanto, el consumo diario de frutas contribuiría a la prevención este tipo de alteraciones gastrointestinales potenciando y favoreciendo el mantenimiento de una microbiota saludable.

Dentro de la gran variedad de frutas disponibles hoy en día en el mercado, las ciruelas y sus derivados son productos muy demandados por los consumidores debido a sus buenas características organolépticas y su valor nutricional, además de permitir la elaboración de numerosos productos a partir de ellas, como pueden ser las frutas secas, zumos, bebidas de frutas o mermeladas (Sójka y col., 2015). Algunos autores han descrito que el consumo de ciruelas podría estar relacionado con la mejora de ciertos tipos de patologías (Igwe y Charlton, 2016), debido a la presencia de importantes compuestos bioactivos presentes en su composición.

1.2. La ciruela: origen, tipos y producción

La ciruela (*Prunus domestica*) es el fruto del ciruelo, árbol de la familia de las rosáceas y característico de regiones templadas. Se cree que los ciruelos y otras especies del género *Prunus* son originarios de Asia central y, alrededor del año 300 a.C., fueron introducidas en Europa, aunque en la Península Ibérica está documentado su cultivo hacia el siglo XIV (Bruce y col., 2011). La ciruela es una drupa de forma redondeada u oval, de hasta 7 cm de diámetro, con un pericarpio de piel fina, carnoso y dulce que rodea a una semilla con cáscara leñosa. Las ciruelas se pueden clasificar en función de su color en ciruelas rojas (muy jugosas y de sabor dulce), ciruelas amarillas (de sabor ácido y abundante jugo), ciruelas verdes (de carne firme y jugosa y gran dulzor) y ciruelas negras (con pulpa de color amarillo muy jugosa y dulce) (**Figura 1**).



Figura 1. Variedades ciruelas según su color.

Independientemente de su color, existen más de 200 variedades de ciruela, pero de entre toda esta gran variedad caben destacar, por su interés comercial, la ciruela europea (*Prunus domestica L.*), y la ciruela japonesa (*Prunus salicina*). Su cultivo ocupa grandes superficies agrícolas a nivel mundial (**Figura 2**) y su volumen de producción ocupa el puesto duodécimo dentro de la producción mundial de frutas, siendo España unos de los diez mayores productores a nivel mundial (FAOSTAT, 2018). En España su consumo mayoritario se produce principalmente durante los meses de verano.

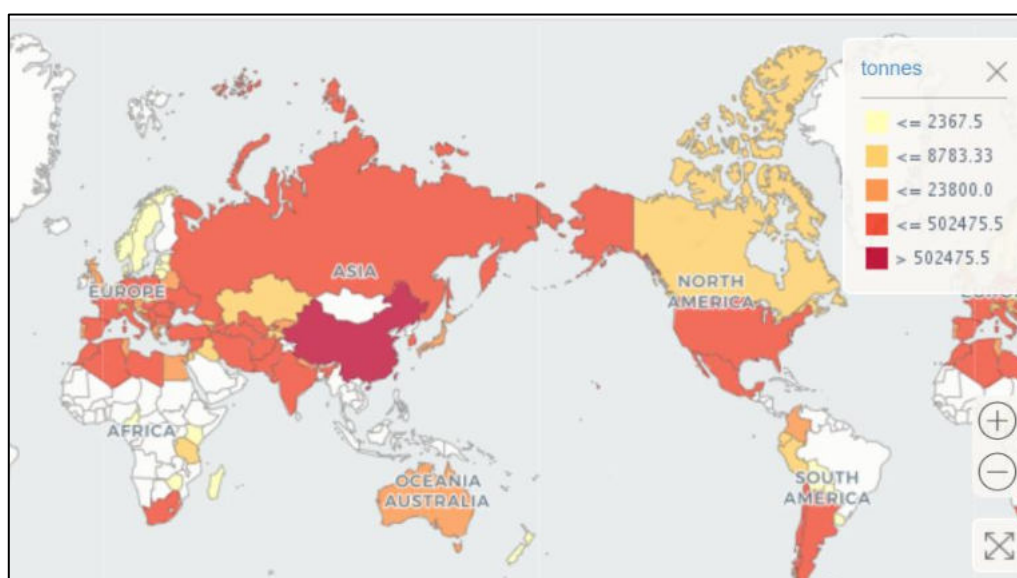


Figura 2. Producción mundial de la ciruela en los años 2011-2016 (FAOSTAT, 2018).

1.3. Técnicas de procesamiento de la ciruela

El principal problema que presenta el cultivo de la ciruela es el hecho de ser una fruta de temporada, lo que significa que no se puede consumir fresca durante todo el año. Además, su periodo de cosecha es muy corto por lo que es muy difícil manejar grandes cantidades de fruta asegurando que lleguen en perfecto estado al consumidor. Por ello, a día de hoy, se han desarrollado nuevas alternativas tecnológicas que permiten aumentar el periodo de conservación de este tipo de frutas a partir del desarrollo de nuevos ingredientes en forma de polvo, favoreciendo su consumo durante largos periodos de tiempo (Michalska y col., 2016a). Algunas de las alternativas que surgen para que este tipo de fruta esté disponible en el mercado fuera de temporada es el procesado de las mismas en forma de mermeladas a partir de su cocción (Shinwari y Rao, 2018), la elaboración de zumos a partir del prensado de la fruta o la deshidratación de la misma eliminando gran parte del agua que presenta en su composición

(Maldonado Salazar y col., 2005). Este elevado contenido en agua de la ciruela es una gran limitación para la conservación de la misma, ya que reduce su vida útil haciéndola más vulnerable a la acción de microorganismos alterantes. Entre los principales métodos de conservación y preservación de los alimentos destaca el proceso de secado. Este proceso consiste en eliminar en parte o en su totalidad el agua de los alimentos e implica una transferencia de calor, dando lugar a cambios físicos irreversibles en el producto resultante (Afolabi y col., 2015). El objetivo principal del secado es aumentar la vida útil del producto y de sus constituyentes (Figiel y Michalska, 2016). Aunque los procesos de secado tradicionales conducen a una pérdida significativa de compuestos bioactivos, las frutas secas pueden seguir siendo una fuente valiosa no solo de energía, fibra dietética y minerales, sino también de antioxidantes (Nicoli y col., 1997). Por tanto, las frutas secas pueden considerarse un producto prometedor, ya que debido a las técnicas de procesamiento actuales no solo se permite una mayor retención del valor biológico de la materia prima, sino que también permiten la fortificación del producto debido a la presencia de los componentes funcionales del mismo (Betoret y col., 2003). Las técnicas de secado de frutas han ido evolucionando a lo largo del tiempo, pasando de un secado exclusivo por exposición al sol, lo que da lugar a la obtención de frutos desecados de gran heterogeneidad, a procesos de secado en los que se emplean secadores de aire caliente que permiten obtener productos finales más homogéneos (**Figura 3**) (Tunde-Akitunde y col., 2005).



Figura 3. Diferentes técnicas de secado.

Hoy en día, se utilizan nuevas técnicas de secado alternativas, que aportan grandes ventajas durante en el proceso de secado (ahorro de tiempo, volumen de secado, rendimiento del proceso) y mejora la calidad de los alimentos. Entre las principales técnicas de secado que se aplican actualmente en la industria caben destacar algunas aplicaciones como:

- **Liofilización (LF):** se somete el alimento a baja temperatura, por lo que permite una mayor retención de los compuestos bioactivos del producto.
- **Secado a vacío (SV):** se basa en la aplicación de aire caliente a cierta temperatura, lo que va a proporcionar la energía necesaria para que el agua del alimento se evapore y salga del secador. Es un método muy efectivo, aunque tiene algunos inconvenientes ya que puede afectar al contenido de los compuestos termolábiles, compuestos fenólicos, entre otros.
- **Secado por atomización (SA):** es una técnica muy efectiva que se basa en la transformación directa de los productos líquidos en polvos. Es una técnica entre 4-5 veces más barata que la LF, por lo que es una de las más empleadas en la industria.

La combinación entre los métodos tradicionales de secado junto con los métodos más novedosos puede ayudar a mejorar significativamente la calidad de los productos finales y así permitir la aparición de nuevos productos potencialmente interesantes en el mercado actual de los alimentos funcionales (Figiel y Michalska, 2016). Por todo ello, el proceso de deshidratación de las ciruelas con las nuevas técnicas de secado puede mejorar significativamente la conservación de esta fruta.

1.4. Composición y propiedades beneficiosas de la ciruela

El principal componente de las ciruelas es el agua, seguido por los hidratos de carbono entre los que destaca el sorbitol (**Tabla 1**). El aporte de vitaminas no es muy relevante, aunque presenta un contenido moderado en provitamina A (más abundante en las variedades de color oscuro) y vitamina E, ambas con acción antioxidante (Moreiras y col., 2013). En lo que se refiere a su contenido en minerales, el componente mayoritario es el potasio, necesario para el correcto funcionamiento del sistema nervioso y la actividad muscular. Su abundancia en fibra (mayoritariamente pectinas) junto con otros componentes con leves propiedades laxantes, como el sorbitol, ayudan a mejorar el tránsito intestinal estimulando los movimientos peristálticos del intestino (Ruiz López y García-Villanova Ruiz, 2017). En el caso de las ciruelas secas su alto

contenido en hierro, fibra y otros fitoquímicos, las hacen altamente recomendadas para mujeres postmenopáusicas por su efecto protector frente a la osteoporosis.

Tabla 1. Composición nutricional de la ciruela (Moreiras y col., 2013).

Composición	100g de porción comestible
Energía (Kcal)	51
Agua (g)	86,3
Proteínas (g)	0,6
Lípidos totales (g)	Trazas
AG saturados (g)	-
AG monoinsaturados (g)	-
AG poliinsaturados (g)	-
Colesterol (mg)	0
Hidratos de carbono (g)	11
Fibra (g)	2,1
Minerales	
Calcio (mg)	14
Hierro (mg)	0,4
Yodo (µg)	2
Magnesio (mg)	8
Zinc (mg)	0,1
Sodio (mg)	2
Potasio (mg)	214
Fósforo (mg)	19
Selenio (µg)	Trazas
Vitaminas	
Tiamina (mg)	0,07
Riboflavina (mg)	0,05
Equivalentes niacina (mg)	0,5
Vitamina B ₆ (mg)	0,05
Folatos (µg)	3
Vitamina B ₁₂ (µg)	0
Vitamina C (mg)	3
Vitamina A (µg)	49,2
Vitamina D (µg)	0
Vitamina E (mg)	0,7

Las ciruelas, aportan, además, una gran variedad de compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoles y antocianos, estos últimos son abundantes en las ciruelas rojas y son los responsables de su color característico. Estos compuestos han demostrado ser efectivos agentes antioxidantes, siendo capaces de secuestrar los

radicales libres (tóxicos para las células) y de proteger frente a la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), ejerciendo, por tanto, un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares y de diferentes tipos de cáncer (Sahamishirazi y col., 2017; Nayeri y col., 2017).

Por tanto, desde un punto de vista nutricional y dietético, las ciruelas se consideran un tipo de fruta muy importante para la dieta por su composición rica en compuestos bioactivos. Además, su consumo frecuente se ha relacionado con la prevención en el desarrollo de diferentes enfermedades debido principalmente a su potencial capacidad antioxidante, antiinflamatoria, gracias a los compuestos bioactivos presentes en su composición (Donovan y col., 1998; Igwe y Charlton, 2016). Sin embargo, apenas existe información sobre el papel de la ciruela y sus compuestos bioactivos en la salud gastrointestinal, por lo que ha sido el objetivo principal que nos hemos propuesto en el presente trabajo.

1.5. Propiedades biológicas de la ciruela: compuestos fenólicos

La ciruela contiene de forma natural una importante cantidad de compuestos fenólicos biológicamente activos (Gil y col., 2002), entre los que destacan por su abundancia y propiedades beneficiosas los ácidos fenólicos, donde predominan los ácidos clorogénico y neoclorogénico, los flavonoles como la quercetina y derivados, y los antocianos, como las cianidinas (Tomás-Barberán y col., 2001). De manera general los compuestos fenólicos presentes en las frutas juegan un papel importante en la prevención de daños oxidativos celulares inducidos por radicales de oxígeno activos actuando como agentes antioxidantes y anticancerígenos (Peixoto y col, 2018), de igual forma sus potenciales efectos antimicrobianos y antiinflamatorios han sido ampliamente estudiados por otros autores (Blando y col., 2004).

1.5.1. Actividad antibacteriana

Existen numerosos estudios que hacen referencia a la posible relación entre la actividad de muchos de los compuestos fenólicos de las frutas con la inhibición en el desarrollo de microorganismos patógenos. Entre los microorganismos más estudiados se encuentran patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*, entre otros (Tian y col., 2017).

Generalmente, se ha visto que la actividad antibacteriana que presentan muchas frutas es debido a los compuestos bioactivos de las mismas, y en numerosos casos se ha relacionado con la presencia de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas a través de diferentes mecanismos, pero se ha observado que uno de los principales es la interacción de estos compuestos con la pared celular bacteriana, provocando la inestabilidad de la misma (Das y col., 2017). Se ha descrito que la magnitud de esta interacción está relacionada con la composición de la pared celular bacteriana, por lo que se han encontrado respuestas diferentes entre bacterias gram negativas y bacterias gram positivas (Tian y col., 2017). Concretamente en el caso de la ciruela, existen muy pocos trabajos que aborden el estudio de sus propiedades antimicrobianas, por lo que ha sido uno de los objetivos principales que se han planteado en el desarrollo de este estudio, evaluando también el efecto de los diferentes procesos de secado en la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

1.5.2. Actividad antioxidante

Existen numerosos estudios que relacionan la presencia de compuestos fenólicos presentes en la ciruela con la capacidad antioxidante de las mismas. La actividad antioxidante de las ciruelas es particularmente alta en comparación con las actividades antioxidantes de otras frutas y verduras secas (Vasanth Rupasinghe y col., 2006). En comparación con otras frutas, las ciruelas tienen el valor más alto de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (Robards y col., 1999). La actividad antioxidante de la ciruela se asocia a la presencia de ácidos fenólicos (ácidos clorogénico y neoclorogénico) y flavonoides (Chun y col., 2003), por lo que esto significa que el contenido fenólico que presente la fruta está relacionado directamente con la capacidad antioxidante (Liu y col., 2018). Estos compuestos fenólicos son capaces de ejercer su actividad antioxidante por varios mecanismos de acción como son el bloqueo de radicales libres, la captación del oxígeno singlete, que da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), o la quelación de iones metálicos, lo que evita la oxidación de células del organismo y, con ello, la aparición de enfermedades como pueden ser enfermedades cardiovasculares o ciertos tipos de cáncer (Cömert y Gökmen, 2018).

1.5.3. Actividad anti-inflamatoria

La inflamación celular es una respuesta que se produce cuando se afecta la homeostasis de células y tejidos, dando lugar a la aparición de diversos trastornos inflamatorios que pueden desencadenar en numerosas patologías. Existen numerosos estudios que describen la actividad anti-inflamatoria producida por los compuestos fenólicos presentes en las frutas. Por ejemplo, se ha observado que algunos compuestos fenólicos producen un aumento de la secreción de citoquinas antiinflamatorias con respecto a las proinflamatorias (Mueller y col., 2010). Esto se traduce en la mejora de síntomas concretos, por ejemplo, este efecto antiinflamatorio es capaz de colaborar en la prevención de la aparición de la aterosclerosis, reduciendo la secreción de las moléculas de adhesión intercelular y disminuyendo la adhesión de leucocitos (Liu y col., 2018).

2. OBJETIVOS

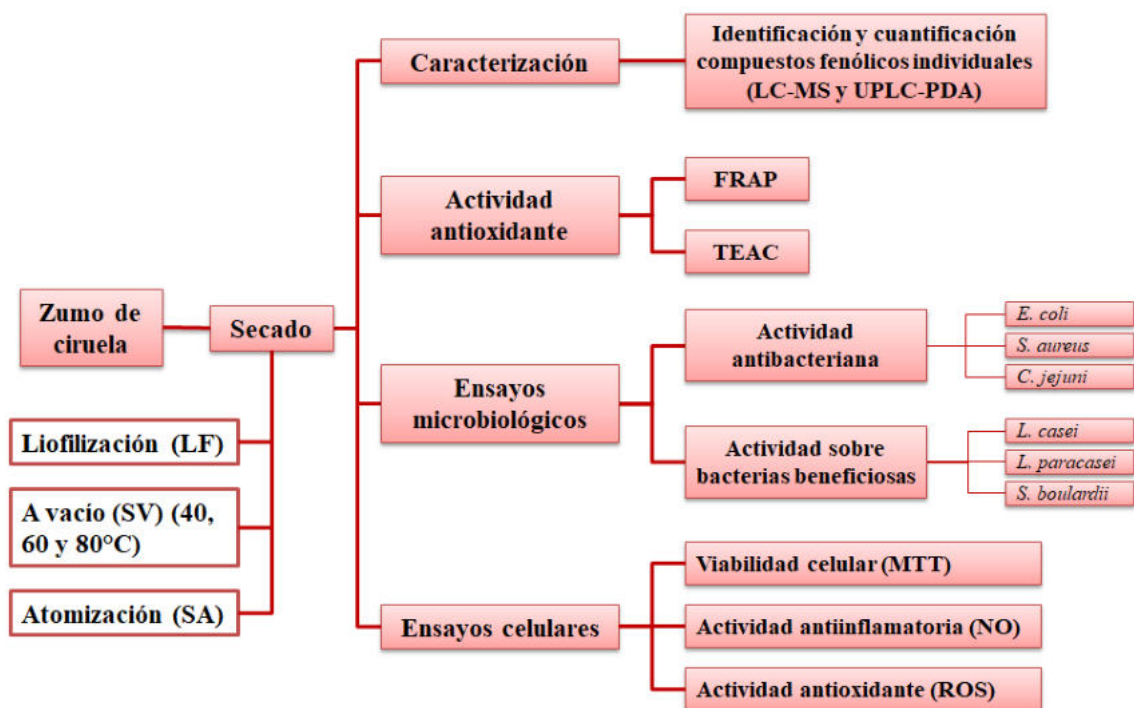
2.1. Objetivo general

Evaluar la potencial bioactividad de extractos de ciruela sometidos a diferentes procesos de secado y su implicación en la mejora de la salud gastrointestinal.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterización de la composición fenólica de los extractos de ciruela.
2. Estudio del efecto de los diferentes extractos de ciruela frente a microorganismos patógenos y probióticos.
3. Estudio de la capacidad anti-inflamatoria de los diferentes extractos de ciruela.
4. Estudio de la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de ciruela.

3. PLAN DE TRABAJO



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales y reactivos

Los reactivos 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido caféico, ácido clorhídrico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido rosmarínico, bromuro de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil-tetrazolio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), epicatequina, ferricianuro de potasio, Folin-Ciocalteu, hesperidina, hesperitina, hexahidrato de cloruro férrico, hidrato de morina, hidrato de rutina, lipopolisacárido de *E. coli* O55:B5 (LPS), miricitina, naringina, óxido nítrico (NO), persulfato potásico, quercetina, trihidrato de acetato de sodio fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). El bicarbonato sódico fue suministrado por Panreac (Barcelona, España) y el terbutilo fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). El medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suero fetal bovino (FBS) (Hyclone), solución salina tamponada con fosfato (PBS) y solución de tripsina/EDTA (170,000 U/l) fueron suministrados por Lonza (Barcelona, España). Todo el material de plástico estéril empleado para los cultivos bacterianos y celulares fueron suministrados por Sarstedt (Barcelona, España).

4.2 Preparación y secado de los extractos de ciruela

Para la realización de este trabajo se utilizó un extracto de zumo de ciruela sometido a cinco condiciones diferentes de secado, dando lugar a cinco tipos de muestras diferentes.

Las ciruelas (*Prunus domestica* L.) utilizadas se obtuvieron de un mercado local. Brevemente, para la obtención del zumo, se utilizaron 20 kg de ciruelas las cuales fueron previamente lavadas, picadas y mezcladas hasta obtener una pasta la cual se prensó y el zumo resultante se centrifugó hasta obtener un zumo libre de partículas en suspensión. Posteriormente, el zumo obtenido se hizo pasar por una columna rellena con resina Amberlita XAD-16 con el fin de retirar los azúcares y obtener un extracto rico en compuesto polifenólicos según describe Michalska y col., (2016)a. Finalmente, el extracto de ciruela rico en polifenoles obtenido se sometió a diferentes procesos de secado. Los métodos de secado utilizados fueron los siguientes:

- a) **Liofilización (LF):** 100 mL de zumo de ciruela se liofilizaron durante 24 horas a una presión de 65 Pa, alcanzándose una temperatura máxima de 30°C.
- b) **Secado a vacío (SV):** 50 mL de zumo de ciruela se secaron a vacío (SPT-200) empleando tres diferentes temperaturas de secado: 40°C, 60°C y 80°C durante 20, 16 y 10 horas, respectivamente, y una presión de 300 Pa.
- c) **Secado por atomización (SA):** 100 mL de zumo de ciruela se sometieron a un proceso de secado por atomización operando el atomizador a una temperatura de entrada y salida de 180°C y 70°C respectivamente con un flujo de 400 mL/min.

Todas las técnicas de secado se realizaron por duplicado para cada una de las variantes de cada muestra de ciruela. Las muestras obtenidas por cada uno de los procesos de secado se molieron, se envasaron al vacío y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las muestras utilizadas y el método de obtención quedan resumidos en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Procesos de secado de las diferentes muestras de ciruela.

Tipo de muestra	Método de secado	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Presión (Pa)	Velocidad de flujo (ml/min)
Muestra A	Liofilización	24	30	65	-
Muestra B	Secado a vacío	20	40	300	-
Muestra C	Secado a vacío	16	60	300	-
Muestra D	Secado a vacío	10	80	300	-
Muestra E	Secado por atomización	-	70	-	400

Para el estudio de la actividad antibacteriana, antioxidante y antiinflamatoria, las muestras se prepararon a una concentración de 20 mg/mL en PBS, esterilizadas por filtración (0,22 µm) y almacenadas a -20°C hasta su uso.

4.3. Caracterización de la composición fenólica de los diferentes extractos

Para la caracterización de la composición fenólica de los diferentes extractos de ciruela se empleó la metodología descrita por Wojdylo, y col., (2013). Dicha caracterización se llevó a cabo empleando un sistema denominado Acquity de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (UPLC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS) (UPLC-MS) (Waters Corp., Milford, EEUU).

Para la identificación de los polifenoles presentes en las muestras de ciruela se emplea una fase estacionaria con una columna C18 (1,7 μm , 2,1 x 50 mm) a 30°C, y una fase móvil que consta de dos solventes: solvente A (4,5% de ácido fórmico) y solvente B (100% de acetonitrilo), inyectándose volúmenes de muestra de 5 μL durante 15 min, con un caudal de 0,45 ml/min. La identificación se llevó a cabo mediante la obtención del tiempo de retención y las masas moleculares de cada uno de los compuestos. Estos datos obtenidos mediante LC-MS fueron evaluados en el software MassLynx 4.0 ChromaLynx Application Manager, en el cual se escanean cada una de las muestras y se identifican las sustancias caracterizadas.

Una vez identificados los polifenoles de las muestras de ciruela se lleva a cabo la cuantificación de los mismos. Para ello se emplea el sistema Acquity de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (UPLC) equipado con un detector de fotodiodos (PDA). Los análisis de UPLC se llevaron a cabo empleando una columna C18 como fase estacionaria a 30°C y una fase móvil compuesta de dos disolventes: disolvente A (ácido fórmico al 4,5%) y disolvente B (acetonitrilo). Los tiempos de retención y los espectros obtenidos se comparan con los de los patrones. Para ello se llevan a cabo diversas curvas de calibrado a concentraciones desde 0,05 a 5 mg/mL de los patrones: clorogénico, neoclorogénico, ácido ferúlico, delfinidina-3-O-glucósido y malvidin-3-O-galactósido. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado y los resultados fueron expresados en miligramos por kilogramo de base seca.

4.4. Estudio *in vitro* de la actividad antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante se emplearon dos métodos químicos: 1) capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) y 2) poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). El método TEAC se basa en la determinación de la actividad antioxidante que presenta un compuesto medido en la cantidad de un compuesto antioxidante que es necesario para eliminar o reducir la actividad del ABTS, que es el agente oxidante. El método FRAP se basa en la capacidad que presenta un determinado compuesto antioxidante para reducir el hierro trivalente a hierro bivalente.

La preparación de las muestras se llevó a cabo diluyendo 300 mg de los extractos secos en 5 mL de una solución acuosa de metanol al 30% (v/v) y sometidos a dos ciclos de sonicación de 15 min. Tras 24 h almacenados a 4 °C en oscuridad, los

extractos obtenidos se centrifugaron (1.500 rpm, 10 min, 4°C) y se determinó su actividad antioxidante según la metodología descrita por Michalska y col., (2016)a.

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos de ciruela mediante radicales ABTS se pueden emplear dos tipos de ensayos: ensayos de decoloración o ensayos de inhibición. En este trabajo, se va a llevar a cabo el ensayo de decoloración mediante la metodología descrita por Re y col. (1999). En primer lugar, hay que formar el radical $ABTS^{\bullet+}$ mediante oxidación. Una vez formado el radical $ABTS^{\bullet+}$, se añaden los antioxidantes y se produce un atrapamiento del radical ABTS por parte de los compuestos antioxidantes, lo que da lugar a una pérdida de color y, por tanto, a una decoloración del mismo (**Figura 4**).

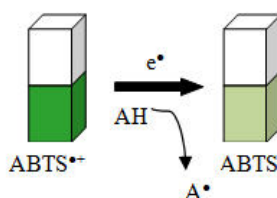


Figura 4. Ensayo de decoloración.

Se lleva a cabo la preparación de una solución madre de $ABTS^{\bullet+}$ disolviendo ABTS en agua hasta obtener una concentración de 7 mM en presencia de persulfato potásico 2,45 mM permaneciendo a oscuridad durante 12-16h a temperatura ambiente. La absorbancia no fue máxima hasta transcurrido más de 6 h, aunque la oxidación comenzó inmediatamente. La solución de trabajo del radical $ABTS^{\bullet+}$ se preparó diluyendo la solución madre en PBS 5mM a pH 7,4 para obtener un valor de absorbancia aproximado de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm.

Las muestras de compuestos fenólicos se diluyeron en tampón fosfato sódico 5 mM pH 7,4. A continuación, se añadieron 10 μ l de cada dilución a la solución de trabajo del radical $ABTS^{\bullet+}$ y se midió la absorbancia a 734 nm en un lector de placas (Sinergy HT, BioTek Instruments, Winooski). Como antioxidante de referencia para la curva de calibrado se empleó Trolox en concentraciones entre 0-150 μ M diluido en PBS 5 mM pH 7,4. La capacidad antioxidante se estimó por el descenso de la absorbancia a 734 nm. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado y se expresaron como promedio de mmol Trolox mg/100g materia seca (\pm DE).

Para determinar la capacidad de reducción férrica de los extractos de ciruela se llevó a cabo el ensayo FRAP mediante la metodología descrita por Benzie y Strain, 1999. El ensayo FRAP se basa en evaluar el potencial reductor que presentan las especies antioxidantes presentes en la muestra determinando la concentración final de iones Fe^{2+} , formados por la reducción de iones Fe^{3+} (**Figura 5**) (Jones y col., 2017).

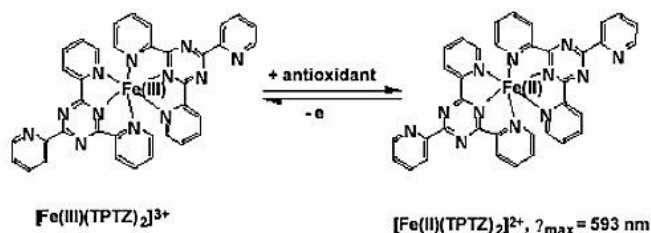


Figura 5. Reducción de iones Fe^{3+} a iones Fe^{2+} mediante el ensayo FRAP.

Esta determinación se llevó a cabo empleando una sustancia cromógena como el ferrocianuro de potasio, observándose un cambio de color al formarse el complejo de hierro bivalente (**Figura 6**).

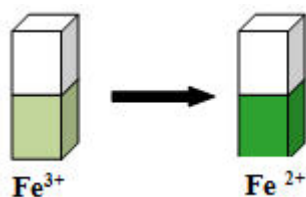


Figura 6. Cambio de color debido a la reducción de iones Fe^{3+} a iones Fe^{2+} .

Por tanto, el reactivo FRAP final se preparó mediante la combinación de dichas soluciones: 500 ml de tampón de ácido acético 300 mM a pH 3,6, 20 ml de TPTZ 10 mM y 20 ml de cloruro férrico 20 mM.

Para la optimización del método se preparó una solución patrón de 100 mg/l que contenía trolox y ácido rosmarínico, disolviendo 10 mg de cada uno en 100 ml de metanol. Además se prepararon tres soluciones estándar que contenían trolox. La primera de 100 mg/l de trolox, ácido rosmarínico, ácido clorogénico, ácido cafeico, hidrato de rutina y quercetina disolviendo 50 mg de cada materia prima en metanol, diluyendo la solución resultante a 50ml con el mismo disolvente. La segunda que contiene 1000 mg/l de trolox, hidrato de morina y epicatequina empleando metanol como disolvente. En este caso, se realizaron diluciones seriadas que contenían 500, 250, 100, 75, 50, 25, 10, 7.5, 5, 2.5, 1 y 0.5 mg/l de cada antioxidante. La tercera que

contiene 10 mg/l de trolox y 1000 mg/l de hesperitina, hesperidina, ácido p-cumárico y naringina, disolviéndose 50 mg de Trolox en 50 ml con metanol, dando una solución de 1000 mg/l.

Los valores de absorbancia se midieron a 595 nm. Para los cálculos del valor FRAP se tomaron las lecturas a los 30 min, dado que, a los 4 min, el tiempo que se toma habitualmente, la reacción para formar el complejo Fe-TPTZ aún no ha terminado (Pulido y col, 2000). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como mmol Trolox/100 g peso seco (media \pm DE).

4.5. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Para el estudio de la actividad antibacteriana de los extractos secos de zumo de ciruela frente a microorganismos patógenos se emplearon las siguientes cepas bacterianas: *Campylobacter jejuni* 11168, adquirida de la National Collection of Type Cultures (NCTC, Londres, Reino Unido), *Escherichia coli* 25992 y *Staphylococcus aureus* 25993, adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). Para el estudio del efecto frente a bacterias de carácter probiótico se emplearon las siguientes cepas probióticas: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Saccharomyces boulardii* disponibles en la colección del propio grupo Microbio del CIAL. Las cepas se encontraban almacenadas hasta su uso a -80 °C en medio de crioconservación consistente en 20 % glicerol en Brucella Broth (BB) (Becton, Dickinson, & Company, New Jersey, USA). Como medio líquido para el crecimiento bacteriano se utilizó BB. Las cepas empleadas en el estudio se regeneraron en placas de agar Müeller-Hinton suplementado con 5 % de sangre de oveja desfibrinada (MHB) (Becton, Dickinson). Las cepas de *C. jejuni* se incubaron bajo condiciones de microaerofilia (85 % de N₂, 10 % de CO₂ y 5 % de O₂) en un Incubador de Atmósfera Variable (VAIN) (MACS-VA500, Don Whitley Scientific, Shipley, Reino Unido) a 37 °C durante 48 h; mientras que, el resto de las cepas patógenas y probióticas se incubaron en aerobiósis a 37 °C durante 24 h. Finalizado el tiempo de incubación, se obtuvieron colonias aisladas de cada cepa que se utilizaron para la preparación de los cultivos experimentales. Para ello, se tomaron 2-3 colonias aisladas de cada cepa, se resuspendieron en 15 mL de medio líquido BB y se incubaron a 37 °C durante 24 h en el incubador VAIN en condiciones de microaerofilia con agitación (120 rpm). Tras 24 h de incubación se prepararon diluciones decimales en serie de cada inóculo experimental en solución salina al 0,9 %, y posteriormente se sembraron 20 μ L de la dilución

apropiada en placas de agar MHB. A continuación, las placas sembradas se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37 °C en el VAIN durante 24 o 48 h, según el crecimiento de la bacteria, y se hizo un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados se expresaron como UFC/mL. Estos inóculos bacterianos ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL) se usaron para los diferentes ensayos experimentales.

4.6. Estudio del efecto de los diferentes extractos de ciruela frente a microorganismos patógenos y probióticos

Tanto para la determinación del efecto antimicrobiano de los extractos frente a microorganismos patógenos como para la determinación de su efecto frente a microorganismos beneficiosos se emplearon los cinco extractos secos de zumo de ciruela preparados según se describe en el apartado 4.2. Para ello se utilizó una concentración final de 1 mg/mL. Se ha descrito que, para extractos naturales, la presencia de actividad en un rango de concentración entre 1 mg/mL y 2 mg/mL puede resultar de interés práctico (Ríos y Recio, 2005). Para el desarrollo del ensayo se siguió la metodología descrita por Silván y col., (2018).

Brevemente, en una placa estéril de 96 pocillos de fondo plano se añadieron en cada pocillo: 240 μ L medio líquido BB, 60 μ L del extracto seco de zumo de ciruela correspondiente (10 mg/mL) y 3 μ L del inóculo bacteriano correspondiente ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL). En la misma placa, se añadieron controles de crecimiento de cada cepa conteniendo medio BB y el inóculo bacteriano correspondiente. A continuación, las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37 °C durante 24 h en el VAIN con agitación constante (120 rpm). Finalizada la incubación, se prepararon diluciones decimales en solución salina 0,9 % de cada mezcla contenida en los pocillos, se sembraron 20 μ L de cada dilución en placas de agar fresco MHB, y se incubaron en microaerofilia a 37 °C en el incubador VAIN durante 24 o 48 h según la cepa bacteriana. Finalmente se llevó a cabo el recuento de las UFC. Los resultados se expresaron como UFC/mL comparando los datos con el control de crecimiento de cada bacteria. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en al menos tres ensayos independientes.

4.7. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos líneas celulares en el presente trabajo: células epiteliales intestinales humanas HT-29 y macrófagos de origen murino RAW 264.7 obtenidas de la

ATCC. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Las células se sembraron a densidades de 1×10^5 células en frascos de cultivo celular T₇₅ y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ (BINDER GbmH, Tuttlingen, Alemania), cambiándose el medio de cultivo cada dos días hasta alcanzar una confluencia cercana al 90 %.

4.8. Estudio del efecto de los extractos de ciruela sobre la viabilidad en células epiteliales humanas y macrófagos

La viabilidad de ambas líneas celulares (HT-29 y RAW 264.7) frente a diferentes concentraciones de los extractos secos de ciruela se determinó mediante el ensayo de reducción de MTT según se describe en Silván y col. (2018).

Tras varios días de incubación de las células en medio DMEM suplementado y alcanzada una confluencia celular de aproximadamente el 90 % se retiró el medio por aspiración y se lavaron las células con PBS para eliminar posibles restos en suspensión y células no adheridas que hubiera presentes en el medio. Tras el lavado, se aspiró el PBS y las células se trataron con Tripsina/EDTA durante 5 min para reducir su adherencia al soporte plástico y recuperar el mayor número células, ayudándose de un raspador celular para obtener el mayor número de células posibles. La suspensión celular obtenida se centrifugó (5 min, 1100 rpm, 25°C) para recuperar un pellet celular libre de tripsina. A continuación, el pellet celular se resuspendió en medio DMEM suplementado y se hizo un recuento celular de la suspensión obtenida.

Para el recuento celular se utilizó la cámara de Neubauer, dispositivo adaptado al microscopio que permite el recuento de células gracias a la división en cuadrículas que presenta. Finalizado el recuento, se preparó una suspensión celular que permitió sembrar 5×10^4 células por pocillo en placas adherentes estériles de 96 pocillos con fondo plano. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 h.

Posteriormente, el medio celular de cada pocillo se retiró por aspiración y las células se lavaron con PBS (200 uL/pocillo) con el fin de eliminar posibles restos en suspensión y células no adheridas. A continuación, se aspiró el PBS y se añadieron los diferentes extractos secos de ciruela diluidos en DMEM libre de suero a concentraciones de 1, 0,5, 0,25, 0,125 y 0,0625 mg/mL. Cada placa experimental contenía controles de crecimiento celular consistentes únicamente en células y medio de

cultivo libre de suero a fin de ver la viabilidad máxima de nuestras células. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h. Pasado el periodo de incubación, se retiró el medio por aspiración y las células se lavaron con PBS (200 µL). Una vez aspirado el PBS se les añadieron 200 µL/pocillo de DMEM libre suero. A continuación, se añadieron 20 µL/pocillo de una solución de MTT (5 mg/mL) en PBS previamente esterilizada por filtración en filtro de 0,2 µm, y se incubaron las placas 60 min en el caso de las HT-29 y 45 min en el caso de las células RAW 264.7 a 37 °C y 5 % de CO₂. Durante la incubación las células metabólicamente activas (células vivas) son capaces de reducir el MTT a formazán dando lugar a la mayor o menor aparición de cristales de color púrpura en función del número de células vivas que haya presentes en cada pocillo. Finalizada la incubación, el medio de cultivo se eliminó por aspiración y los cristales de formazán formados en los pocillos se solubilizaron en 200 µL de DMSO. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 570 nm empleando un lector de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Winooski).

La viabilidad celular se calculó considerando que las células control incubadas únicamente con medio libre de suero aportaban el 100% de viabilidad celular. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado en al menos tres experimentos independientes ($n=3$). Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes en días diferentes ($n=3$). Todos los experimentos se llevaron a cabo entre los pases celulares 10 y 30 para garantizar la uniformidad y la reproducibilidad de las células.

4.9. Estudio de la actividad anti-inflamatoria empleando un modelo celular

La evaluación de la actividad anti-inflamatoria se estimó mediante la cuantificación de la acumulación de óxido nítrico (NO) siguiendo la metodología descrita por Benayad y col. (2014). Este método se basa en la determinación del óxido nítrico acumulado en las células el cual actúa como marcador de la inflamación. Para ello, las células se deben de poner en contacto con lipopolisacáridos de membrana de origen bacteriano (LPS) para estimular la producción de citoquinas y, con ello, desencadenar el proceso inflamatorio. Una vez estimuladas las células, deben reaccionar con el reactivo de Griess, lo cual va a permitir calcular la cantidad de óxido nítrico acumulado en las células empleando una curva estándar de nitrito de sodio permitiendo

de esta forma conocer la actividad anti-inflamatoria que presentan los diferentes extractos de ciruela.

Para ello se utilizó la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Las células se cultivaron según se detalla en el apartado 4.7. Una vez alcanzada la confluencia celular deseada del 90 % se procede al recuento celular tal y como se resume en el apartado 4.8. A continuación, las células se cultivaron a una densidad de 5×10^4 células por pocillo en placas adherentes estériles de 96 pocillos con fondo plano y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ en un incubador durante 24 h. Tras 24 h de incubación, se lavaron las células con PBS (200 uL) y se añadieron los diferentes extractos de ciruela en concentraciones de 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 mg/mL (180 µL/pocillo) diluidos en DMEM libre de suero. A continuación, el proceso de inflamación se estimuló añadiendo 20 µL de LPS (100 µg/ml) diluido en DMEM libre de suero y se incubaron las células 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en al menos tres ensayos independientes. Los experimentos incorporaron controles negativos (sin LPS) y positivos de inflamación (con LPS) sin adición de los extractos en estudio. Finalizada la incubación, se tomaron 100 µl del sobrenadante de cada pocillo y en placas de 96 pocillos no estériles se mezclaron con la misma cantidad del reactivo de Griess constituido por 1% (p/v) de sulfanilamida y 0,1% (p/v) de N-(1-naftil) etilendiamina. A continuación, la placa se incubó durante 15 min en oscuridad y se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas Synergy HT. Finalmente, la cantidad de NO acumulado se calculó usando una curva estándar de nitrito de sodio a concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de inflamación respecto al control celular positivo.

4.10. Estudio de la actividad antioxidante empleando un modelo celular

La evaluación de la actividad antioxidante a nivel celular de los extractos secos de zumo de ciruela se estimó por cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS) según describe Martín y col. (2014). La detección y cuantificación de estas especies reactivas de oxígeno se basa en la utilización de compuestos no fluorescentes fácilmente oxidables por acción de los ROS dando lugar a derivados oxidados que presentan fluorescencia. El empleo de componentes fluorescentes para la cuantificación de los ROS aporta gran sensibilidad al método, sin

embargo, no permite establecer cuál es la especie oxidante responsable de la oxidación de la sonda utilizada (**Figura 7**).



Figura 7. Esquema de reacción de la sonda DCFDA para la detección de las especies reactivas de oxígeno.

Para la determinación de la actividad antioxidante se emplearon células intestinales HT-29 cultivadas como se describe en el apartado 4.7. Una vez alcanzada la confluencia celular deseada del 90% se procedió al recuento celular tal y como se resume en el apartado 4.8. y las células se cultivaron a una densidad de 5×10^4 células por pocillo en placas adherentes estériles de 96 pocillos con fondo plano, y se incubaron a 37°C y 5 % de CO_2 durante 24h. A continuación, se lavaron las células con PBS (200 μL /pocillo) y se añadieron los diferentes extractos secos de ciruela a la concentración final de 1 mg/mL (200 μL /pocillo) diluidos en DMEM libre de suero. Los experimentos incorporaron controles sin adición de los extractos en estudio. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en al menos tres ensayos independientes. Tras 24 h de incubación con los extractos, las células se lavaron tres veces con PBS (200 μL /pocillo) y se incubaron con 200 μL /pocillo de la sonda fluorogénica DCFDA diluida en DMEM libre de suero a una concentración de 10 mM durante 30 minutos para permitir que la sonda difunda al interior celular. Posteriormente, se aspiró medio celular conteniendo la sonda y se lavaron las células tres veces con PBS a fin de retirar el exceso de sonda fluorescente. Finalmente, las células fueron incubadas con 200 μL del agente prooxidante terbutilo (t-BOOH) a una concentración final de 2,5 mM. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado e incluyeron controles positivos de incubación (células + t-BOOH) y controles negativos de oxidación (células). Finalmente, se midió la fluorescencia a 485 nm longitud de onda de excitación y 530 nm longitud de onda de emisión cada 30 minutos hasta un tiempo máximo de 3 h en un lector de microplacas Synergy HT.

4.11. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medias \pm desviaciones estándar (DE) realizadas por triplicado. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$. Cuando fue necesario, se aplicaron test post ANOVA para conocer las diferencias entre tratamientos. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales presentes en los extractos secos de ciruela

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales presentes en los extractos de zumo de ciruela obtenidos por diferentes técnicas de secado se realizaron por Cromatografía Líquida acoplado a un espectrómetro de masas (LC-MS) (**Tabla 3**) y Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento equipado con un detector de fotodiodos (UPLC-PDA) (**Tabla 3**), respectivamente. Se lograron identificar 12 compuestos fenólicos correspondientes a cinco ácidos fenólicos, cuatro flavonoles y tres antocianos (**Tabla 3**). El contenido total en compuestos fenólicos en los extractos secos de zumo de ciruela se situó en el rango de 3,4 a 4,8 g/kg de materia seca, siendo el extracto sometido al proceso de atomización el que mayor contenido en compuestos fenólicos presentó. Estos contenidos son menores a los obtenidos por otros autores en extractos de ciruela secados por diferentes técnicas utilizando el fruto completo (7,8-14,9 g/kg materia seca) (Michalska y col., 2016b). Esto podría deberse al hecho de que ninguno de los compuestos que se identificaron en los extractos de zumo de ciruela pertenecen a la familia de los flavan-3-ols, los cuales si se encuentran en elevada concentración en los extractos obtenidos empleando la ciruela entera.

Tabla 3. Compuestos fenólicos identificados por LC-MS en los extractos de ciruela obtenidos por diferentes métodos de secado.

Compuesto	t (min)	λ_{\max} (nm)	MS [M – H] ⁻ (m/z)	MS/MS [M – H] ⁻ (m/z)
<i>Ácidos fenólicos</i>				
Ácido neoclorogénico	3,09	326	353,08	191,05
Ácido 3- <i>O</i> - <i>p</i> -cumroilquinico	3,86	312	337,09	163,05
Ácido clorogénico	4,16	326	353,08	191,05
Ácido 3-feruloilquinico	4,30	324	367,10	193,05
Metil-3-cafeoilquinato	4,74	326	367,10	135,00/193,01
<i>Flavonoles</i>				
Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosido	6,50	264/350	609,14	301,03
Quercetina-3- <i>O</i> -galactosido	6,66	346	463,08	301,02
Quercetina-3- <i>O</i> -glucosido	6,75	346	463,18	301,02
Quercetina-3- <i>O</i> -(6''acetilgalactosido)	8,18	363	505,09	301,02
<i>Antocianos</i>				
Cianidina-3- <i>O</i> -glucosido	3,72	278/515	449,10	287,05
Cianidina-3- <i>O</i> -rutinosido	3,93	279/515	595,16	287,05
Peonidina-3- <i>O</i> -rutinosido	4,62	286/517	609,17	301,07

Los ácidos fenólicos fueron los compuestos predominantes en todos los extractos estudiados constituyendo entre 75-77% del total (**Tabla 4**). El rango del contenido en estos ácidos fenólicos se situó entre 2,6 y 3,6 g/kg materia seca, siendo el extracto obtenido por el método de atomización el más rico en ácidos fenólicos. Además, se observó que la composición en cada uno de los ácidos variaba en función del tratamiento de secado aplicado, siendo los ácidos 3-feruloilquinico y neoclorogénico los predominantes en todos los extractos, excepto en el extracto obtenido por secado a vacío a 80°C, donde el metil-3-cefeoilquinato fue el ácido mayoritario. Cabe destacar el incremento en el contenido de este compuesto que se observó a medida que aumentaba la temperatura de secado, siendo su concentración hasta cerca de 30 veces mayor en el extracto obtenido por secado a vacío a 80°C respecto al extracto obtenido por liofilización. Esto sugiere que la liberación de este compuesto a la matriz de la muestra estaría asociada al incremento de la temperatura durante el proceso de secado.

Tabla 4. Contenido de ácidos fenólicos presentes las muestras de zumo de ciruela en polvo obtenidas por liofilización (LF), secado al vacío (SV) y atomización (SA) (mg/kg materia seca).

	Ácido neoclorogénico	3- <i>O</i> - <i>p</i> -ácido cumaroilquinico	Ácido clorogénico	3-ácido feruloilquinico	3-metil-cafeoilquinato	Total
LF	1051,4 ± 6,3	1025,2 ± 12,2	439,9 ± 8,7	414,3 ± 1,1	24,6 ± 0,9	2955,4
SV 40°C	996,3 ± 10,7	1017,9 ± 2,1	472,7 ± 9,9	395,8 ± 0,1	36,7 ± 1,4	2919,4
SV 60°C	851,3 ± 35,5	885,2 ± 10,8	458,7 ± 14,9	358,4 ± 2,5	54,7 ± 2,4	2608,3
SV 80°C	541,8 ± 15,2	645,2 ± 2,5	405,2 ± 20,6	335,7 ± 12,1	708,5 ± 10,2	2636,4
SA	1169,1 ± 27,8	1104,0 ± 33,0	529,9 ± 13,6	469,9 ± 4,5	392,1 ± 5,6	3665,2

El segundo grupo importante de compuestos fenólicos identificados en los extractos secos fueron los flavonoles, constituyendo entre el 20-22% del total de compuestos fenólicos en los diferentes extractos estudiados (**Tabla 5**). Cabe destacar que los flavonoles identificados, así como su contenido fue diferente al reportado por otros autores utilizando el fruto de la ciruela completo (Michalska y col. 2016b). En el presente trabajo el contenido total de flavonoles se situó en el rango entre los 760 y 990 mg/kg de materia seca, siendo la quercetina-3-*O*-glucósido y la quercetina-3-*O*-galactósido las predominantes en todos los extractos estudiados. El contenido en quercetina-3-*O*-glucósido fue similar en todos los extractos secos excepto en el extracto obtenido por liofilización donde se observó una pérdida muy significativa de este compuesto respecto al resto de métodos de secado. La degradación de este compuesto en muestras de ciruela completa utilizando la liofilización como método de secado ha sido descrito previamente (Michalska y col. 2016b). En el caso de la quercetina-3-*O*-galactósido, el resultado obtenido fue el opuesto al observado con la quercetina-3-*O*-glucósido, de modo que la muestra secada por el método de liofilización fue la que presentó mayor contenido, mientras que en la muestra secada por atomización se redujo hasta casi siete veces su contenido (**Tabla 5**), sugiriendo que el contenido en este compuesto se ve afectado drásticamente por la temperatura del proceso de secado. Cabe destacar que la quercetina-3-*O*-(6''acetilgalactósido) fue identificada por primera vez en productos derivados de la ciruela.

Tabla 5. Contenido de flavonoles presentes las muestras de zumo de ciruela en polvo obtenidas por liofilización (LF), secado al vacío (SV) y atomización (SA) (mg/kg materia seca).

	Quercetina-3-O-rutinósido	Quercetina-3-O-galactósido	Quercetina-3-O-glucósido	Quercetina-3-O-(6''acetilgalactósido)	Total
LF	73,1 ± 1,1	500,5 ± 4,9	125,2 ± 0,3	102,9 ± 0,1	801,7
SV 40°C	524,5 ± 1,9	129,3 ± 0,5	9,2 ± 0,5	104,2 ± 0,4	767,2
SV 60°C	514,1 ± 6,8	141,3 ± 0,6	24,3 ± 3,9	88,9 ± 9,9	768,6
SV 80°C	458,4 ± 9,5	147,1 ± 5,6	108,5 ± 16,5	60,6 ± 1,4	774,6
SA	610,7 ± 13,8	72,6 ± 0,7	188,2 ± 16,6	119,8 ± 9,5	991,3

Finalmente, el tercer grupo de compuestos fenólicos identificados en las muestras fueron los antocianos los cuales fueron los compuestos minoritarios en todos los extractos analizados, aproximadamente el 2% del total de los compuestos fenólicos cuantificados (**Tabla 6**). En trabajos previos utilizando el fruto de la ciruela completo se han llegado a identificar hasta seis tipos de antocianos diferentes (Michalska y col. 2016b), sin embargo, en el presente estudio solo se identificaron dos tipos de cianidinas y una peonidina. Entre los antocianos identificados, la cianidina-3-O-rutinósido fue el antociano predominante en todos los extractos secos de zumo de ciruela, constituyendo aproximadamente el 70% del total de los antocianos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en trabajos previos empleando ciruela fresca (Chun y col., 2003) y extractos de ciruela entera (Michalska y col. 2016b). Entre las técnicas de secado empleadas, la atomización resultó ser el proceso que menos afectó la composición en antocianos de las muestras estudiadas, incluso por encima del método de liofilización considerado como la mejor alternativa para la obtención de productos alimenticios deshidratados de calidad.

Tabla 6. Contenido de antocianos presentes las muestras de zumo de ciruela en polvo obtenidas por liofilización (LF), secado al vacío (SV) y atomización (SA) (mg/kg materia seca).

	Cianidina-3-O-glucósido	Cianidina-3-O-rutinósido	Peonidina-3-O-rutinósido	Total
LF	26,8 ± 0,4	70,3 ± 0,9	0,6 ± 0,0	97,7
SV 40°C	25,8 ± 0,2	69,6 ± 0,4	0,6 ± 0,0	96,0
SV 60°C	24,4 ± 3,7	66,4 ± 10,6	0,5 ± 0,0	91,3
SV 80°C	17,2 ± 2,7	52,5 ± 3,1	0,4 ± 0,0	70,1
SA	28,1 ± 0,9	78,3 ± 3,6	0,6 ± 0,0	107,0

5.2. Actividad antioxidante

Los principales resultados obtenidos del estudio de la actividad antioxidante en los diferentes extractos de ciruela se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Influencia de los diferentes métodos de secado en la actividad antioxidante de los extractos secos de ciruela determinado mediante los métodos TEAC y FRAP (mmol Trolox/100 g materia seca).

Método de secado	TEAC ABTS	FRAP
LF	98,9 ± 3,2 ^{C*}	85,4 ± 4,1 ^C
SV 40°C	95,1 ± 1,3 ^B	80,9 ± 2,5 ^C
SV 60°C	98,0 ± 0,2 ^C	87,1 ± 2,5 ^D
SV 80°C	80,9 ± 0,8 ^A	75,9 ± 0,8 ^A
SA	81,2 ± 3,8 ^A	78,3 ± 1,8 ^B

*Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los extractos ($p \leq 0,05$ Tukey test)

Como se puede observar, en todos los extractos se obtuvieron altos valores de actividad antioxidante, independientemente del procedimiento utilizado para la preparación de las muestras. Los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante fueron el extracto liofilizado y el extracto secado al vacío a 60°C. En estudios previos se ha demostrado que la temperatura utilizada en el proceso de secado puede influir en los resultados de actividad antioxidante determinada por diferentes metodologías (Piga y col., 2003; Michalska y col., 2017). De forma general, mientras más elevada es la temperatura utilizada en el proceso de preparación de los extractos más se afecta su composición, y entre los compuestos más afectados se encuentran los fenólicos, que están muy involucrados en la magnitud de la respuesta antioxidante. Precisamente, en este trabajo el extracto secado al vacío a una temperatura de 80°C fue el que presentó una menor actividad antioxidante, y los mismos resultados se obtuvieron utilizando los dos métodos analíticos. Sin embargo, resultados completamente diferentes se han obtenido cuando se evalúa la capacidad antioxidante de extractos de ciruela secados por diferentes métodos y a los que se les han añadido azúcares, que es un procedimiento habitual en las industrias elaboradoras de zumos. En estos casos, y en dependencia de la temperatura utilizada, se puede producir un aumento o una disminución de la capacidad antioxidante de los extractos, asociándose el incremento de la capacidad antioxidante a la formación de productos de la reacción de Maillard

(Michlaska y col., 2016b). Por tanto, es de gran importancia conocer la formulación del extracto antes de elegir un tratamiento de secado con el objetivo de obtener extractos con una mejor capacidad antioxidante.

5.3. Ensayos microbiológicos

5.3.1. Actividad antibacteriana frente a microorganismos patógenos

Como se comentó en el apartado de Materiales y Métodos (4.5.), para el estudio de la actividad antibacteriana de los extractos de ciruela se seleccionaron tres bacterias diferentes: *E. coli* como ejemplo de bacteria gram negativa; *S. aureus* como ejemplo de bacteria gram positiva y *C. jejuni* por ser el principal patógeno bacteriano asociado a toxiinfecciones alimentarias. En la **Figura 8** se presentan los principales resultados obtenidos con *E. coli*.

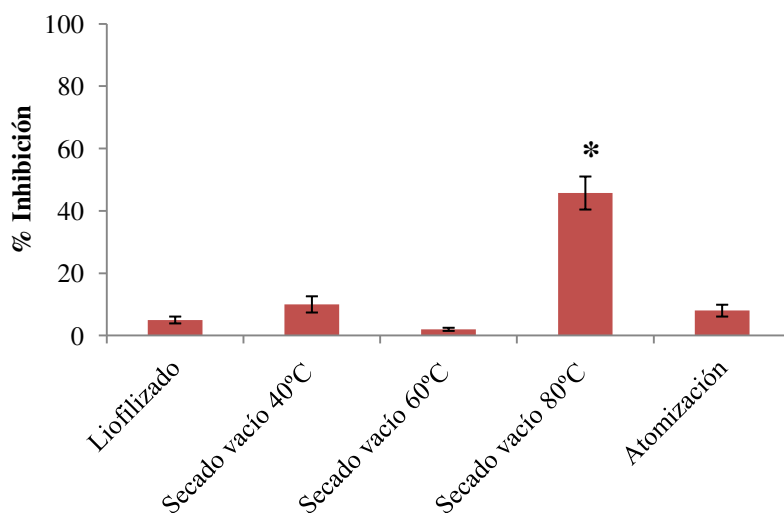


Figura 8. Actividad antibacteriana de las diferentes muestras de ciruela sometidas a diferentes procesos de secado frente a *E. coli*. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento respecto del control. Las barras con asterisco indican diferencias significativas respecto al control de crecimiento ($p < 0.05$) tras análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de Dunnett.

Como se puede observar, la actividad antimicrobiana solo fue significativa con respecto al control de crecimiento para el extracto obtenido por el método de secado al vacío a una temperatura de 80 °C, mientras que en el resto de los extractos no se observó una actividad antimicrobiana significativa. El extracto obtenido por el método del secado al vacío a 80 °C fue capaz de inhibir el 46 % del crecimiento de *E. coli*. En estudios previos, otros autores han descrito la efectividad como antimicrobianos

naturales de extractos de frutas enriquecidos en compuestos fenólicos, como es el caso de los extractos de ciruela utilizados en este trabajo (Michalska y col., 2016a). Se ha observado que extractos ricos en compuestos fenólicos pertenecientes a las familias de los flavonoles, ácidos fenólicos y antocianos, son capaces de inhibir el crecimiento de diferentes bacterias gram negativas relacionadas con las infecciones bacterianas asociadas a los alimentos (Chan y col., 2018). Estas bacterias, entre las que se encuentra *E. coli* y otros coliformes como *Salmonella* y *Shigella*, son las responsables de numerosos casos de toxiinfección alimentaria (EFSA, 2017), y en los últimos años se han convertido en un problema de salud pública relevante, ya que se han incrementado de forma significativa los niveles de resistencia a los principales antibióticos que suelen utilizarse para su tratamiento (EFSA, 2018). Por tanto, poder disponer de antimicrobianos naturales que puedan ayudar en el control de estos patógenos es de gran importancia práctica e interés para las autoridades europeas de Salud Pública. El hecho de que el extracto obtenido por la metodología de secado al vacío a una temperatura de 80 °C haya resultado el más efectivo frente a *E. coli*, parece indicar que los compuestos más antimicrobianos frente a este patógeno no son especialmente termolábiles, y/o son extraídos preferentemente a temperaturas más elevadas. Como parte de este trabajo hemos podido observar que ácidos fenólicos como el metil-3-cafeoilquinato son mayoritarios en este extracto, debido probablemente a que para su producción se emplea una temperatura más elevada. En próximos estudios debe investigarse la efectividad de este compuesto sobre *E. coli* para poder conocer de forma directa su implicación en los resultados obtenidos en el presente trabajo.

En la **Figura 9** se presentan los principales resultados obtenidos en el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos frente a *S. aureus*, bacteria que se eligió como representante de los microorganismos gram positivos.

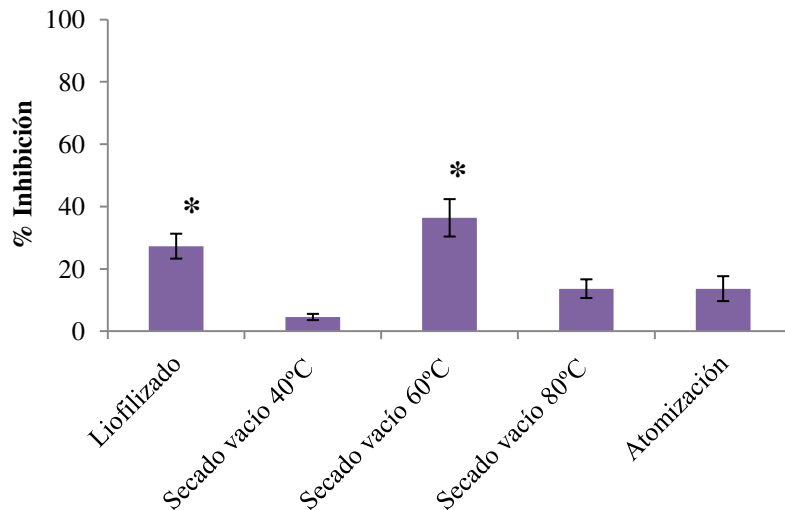


Figura 9. Actividad antibacteriana de las muestras de ciruela sometidas a diferentes procesos de secado frente a *S. aureus*. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento respecto del control. Las barras con asterisco indican diferencias significativas respecto al control de crecimiento ($p < 0.05$) tras análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de Dunnett.

Como se puede observar, los extractos de ciruela obtenidos por liofilización y por secado al vacío a 60 °C fueron los que presentaron una actividad antimicrobiana significativa frente a *S. aureus*, provocando una disminución del crecimiento con respecto al control del 27 % y el 36 %, respectivamente. Al igual que para *E. coli*, se ha descrito la efectividad de diversos extractos naturales enriquecidos en compuestos fenólicos como antimicrobianos frente a bacterias gram positivas (Chan y col., 2018), aunque apenas existen referencias acerca de la actividad antimicrobiana de extractos de ciruela, como se ha estudiado en este trabajo. Además de *S. aureus*, hay otras bacterias gram positivas que son las causantes de un gran número de toxiinfecciones alimentarias, como es el caso de *Clostridium spp* y *Listeria spp* (Chan y col., 2018). Al igual que en el caso de las bacterias gram negativas, los índices de resistencia a los principales antimicrobianos se han incrementado de forma significativa en los últimos años, por lo que disponer de antimicrobianos alternativos naturales es de gran interés. El hecho de que los extractos que presentan actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (extracto liofilizado y extracto secado al vacío a 60 °C) sean diferentes al extracto activo frente a *E. coli* (extracto secado al vacío a 80 °C) sugiere que los compuestos involucrados en el efecto antibacteriano observado deben de ser distintos en cada caso. Este hecho es coherente, entre otros aspectos, con las diferencias en la composición de la pared celular

entre las bacterias gram positivas y gram negativas, ya que se ha descrito previamente que la pared celular es una de las dianas principales de muchos de los compuestos fenólicos que presentan actividad antimicrobiana (Das y col., 2017).

En la **Figura 10** se presentan los resultados principales obtenidos en el estudio del efecto antimicrobiano de los extractos de ciruela frente a *C. jejuni*. Los extractos obtenidos por liofilización y secado al vacío a 40 °C fueron los que presentaron una actividad antimicrobiana significativa frente a *C. jejuni*, provocando una disminución del crecimiento de un 52,2 % y 58,2 %, respectivamente, con respecto al control de crecimiento.

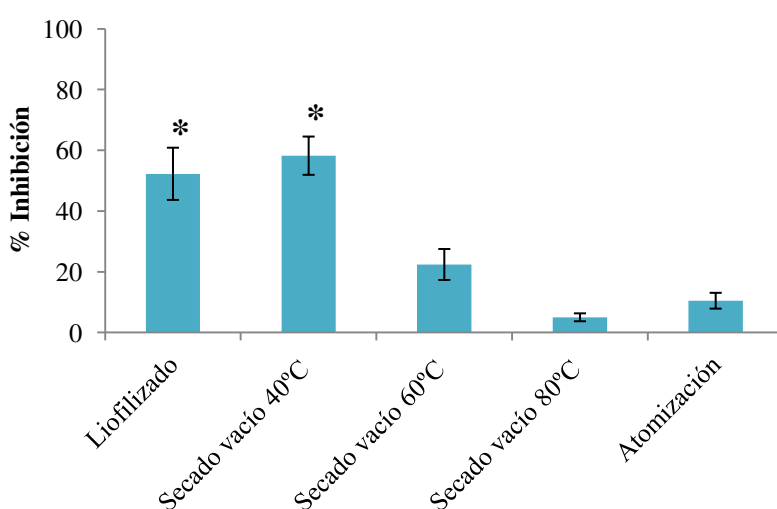


Figura 10. Actividad antibacteriana de los extractos secos de ciruela frente a *C. jejuni*. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento respecto del control. Las barras con asterisco indican diferencias significativas respecto al control sin inhibición de crecimiento ($p < 0.05$) tras análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de Dunnett.

Esta bacteria, a pesar de ser gram negativa como *E. coli*, presentó un comportamiento diferente, lo que sugiere la importancia del efecto especie y cepa en la respuesta antimicrobiana, hecho que ya ha sido descrito por otros autores que han estudiado el efecto antimicrobiano de extractos naturales ricos en compuestos fenólicos (Tian y col., 2017). A diferencia de *E. coli*, en el caso de *Campylobacter* la actividad antimicrobiana desaparece en la medida que aumenta la temperatura utilizada en la preparación de los extractos, lo que indica que los compuestos con mayor actividad son menos sensibles a las temperaturas elevadas.

Por lo tanto, con respecto a la actividad antibacteriana de los diferentes extractos de ciruela frente a bacterias patógenas de origen alimentario, se puede concluir que el efecto antimicrobiano depende tanto de la composición de los extractos analizados como de la bacteria estudiada (genero, especie, cepa). Cada método de secado favorece la liberación y/o conservación de diferentes compuestos fenólicos, los cuales pueden ser activos frente a unas cepas de microorganismos y no frente a otras. Por tanto, se requiere el estudio futuro de un mayor número de cepas bacterianas con el propósito de evaluar de forma más efectiva la factibilidad del empleo como antimicrobianos de estos extractos.

5.3.2. Actividad frente a microorganismos beneficiosos para la salud

En trabajos previos realizados por otros autores y en nuestro propio grupo, se ha observado que algunos extractos naturales enriquecidos en compuestos fenólicos que presentan actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos pueden presentar un carácter selectivo frente a microorganismos probióticos, ya sea contribuyendo a su crecimiento o mejorando su resistencia a diversas condiciones de estrés que pueden encontrarse en la industria alimentaria (Lee y col., 2006; Mingo y col., 2016).

Por tanto, en el presente trabajo, se determinó el efecto de los diferentes extractos de ciruela sobre 3 microorganismos probióticos diferentes: dos cepas distintas de *Lactobacillus* (*L. casei* y *L. paracasei*) y una cepa de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*. En la **Figura 11** se presentan los principales resultados obtenidos frente a la cepa de *L. casei*. Como se puede observar, los extractos de ciruela preparados por la metodología de secado al vacío a 80 °C y por atomización provocaron un aumento significativo en el porcentaje de crecimiento de la bacteria respecto al control. Se deben de realizar más estudios con el fin de evaluar la potencialidad de estos extractos como coadyuvantes industriales encaminados a lograr una mejora en la recuperación de esta bacteria probiótica. Aunque los cambios no fueron significativos desde el punto de vista estadístico, para todos los extractos utilizados se obtuvieron valores de crecimiento algo superiores al control experimental, y en ningún caso se observó inhibición en el crecimiento de esta cepa.

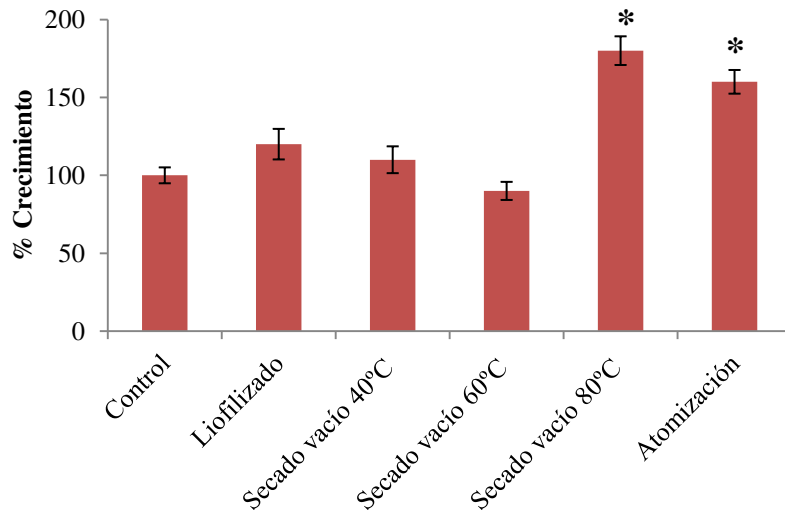


Figura 11. Efecto de los extractos de ciruela sometidos a diferentes procesos de secado sobre la viabilidad de *L. casei*. Los resultados se expresan como % de crecimiento en función del control y están representados por la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Las barras con asterisco indican diferencias significativas respecto al control de crecimiento ($p < 0.05$) tras análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de Dunnett.

En la **Figura 12** se presentan los principales resultados obtenidos frente a la cepa de *L. paracasei*.

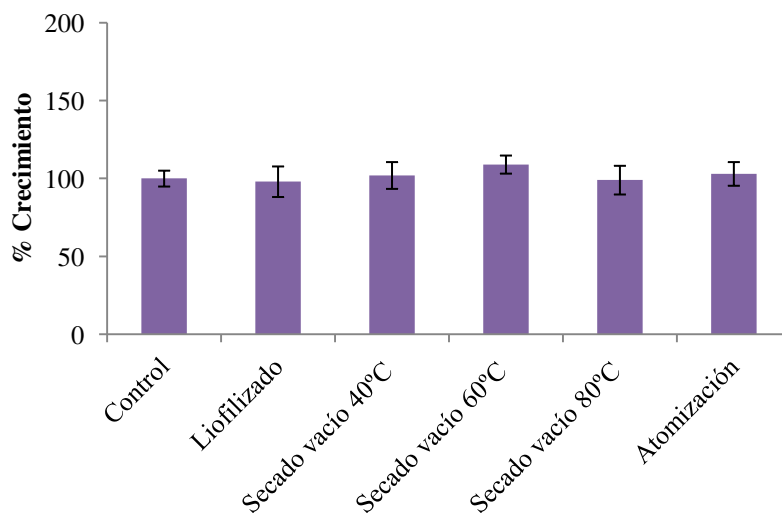


Figura 12. Efecto de las muestras de ciruela sometidas a diferentes procesos de secado sobre la viabilidad de *L. paracasei*. Los resultados se expresan como % de crecimiento en función del control y están representados por la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Las barras con asterisco indican diferencias significativas respecto al control de crecimiento ($p < 0.05$) tras análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de Dunnett.

Se puede observar que ninguno de los extractos estudiados provocó cambios significativos en el crecimiento de *L. paracasei*. Aunque en este caso ningún extracto provocó una mejora en el crecimiento de esta cepa, tampoco ningún extracto provocó su inhibición, lo que confirma el efecto selectivo de estos extractos de ciruela sobre estas bacterias probióticas que, aunque pueden afectar el crecimiento de bacterias patógenas asociadas a los alimentos, respetan el desarrollo de algunos microorganismos probióticos.

Resultados similares se obtuvieron al estudiar el efecto de los extractos frente a la levadura probiótica *S. boulardii* (**Figura 13**). Aunque ninguno de los extractos fue capaz de aumentar su crecimiento, tampoco se observó que ninguno de ellos provocase una inhibición del crecimiento respecto al control.

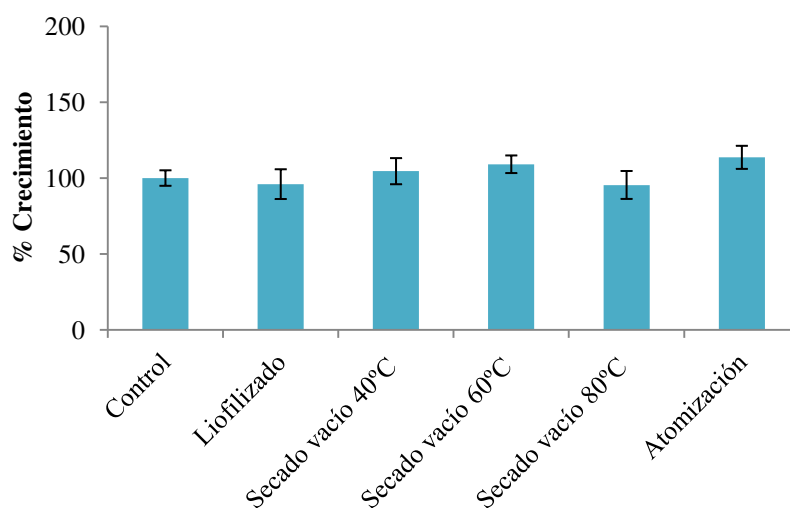


Figura 13. Efecto de las muestras de ciruela sometidas a diferentes procesos de secado sobre la viabilidad de *S. boulardii*. Los resultados se expresan como UFC/mL en función del control y están representados por la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Las barras con asterisco indican diferencias significativas respecto al control de crecimiento ($p < 0.05$) tras análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de Dunnett.

Por tanto, como resumen de esta parte del trabajo podemos concluir que ninguno de los extractos afectó el crecimiento de los microorganismos probióticos estudiados lo que sugiere que los mismos presentan cierto carácter selectivo frente a los mismos al compararlo con los patógenos estudiados. Sin embargo, se requiere ampliar el estudio a un número mayor de muestras, tomando en cuenta el efecto cepa que ha sido descrito

previamente (Mingo y col., 2016) y que se ha observado en este estudio en el comportamiento de la cepa utilizada de *L. casei*.

5.4. Efecto de los extractos secos de ciruela sobre la viabilidad en células epiteliales intestinales humanas y macrófagos

Previamente a los estudios empleando modelos celulares es necesario evaluar la potencial citotoxicidad de los extractos a utilizar (Oke y Aslim, 2010). El efecto de los extractos secos de ciruela sobre la viabilidad de las líneas celulares HT-29 de intestino humano y RAW 264.7 de macrófagos se determinó a través del ensayo colorimétrico MTT. Las **Figura 14** muestra el porcentaje de viabilidad de las líneas celulares empleadas.

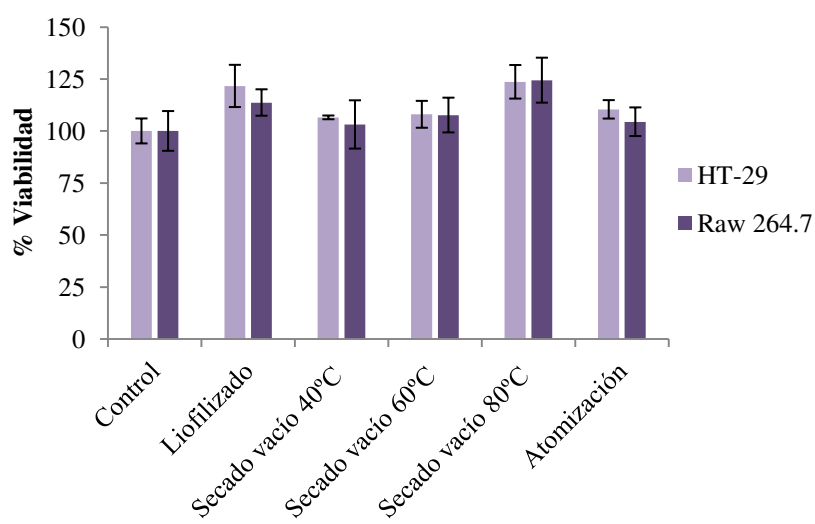


Figura 14. Efecto de los extractos secos de ciruela (1 mg/mL) sobre la viabilidad de células HT-29 de epitelio intestinal humano y células RAW 264.7 de macrófagos. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad respecto del control celular sin tratar y se representan por la media \pm desviación estándar ($n = 3$).

Como se puede observar, la viabilidad en ambas líneas celulares no se vio afectada significativamente ($p > 0.05$) tras 24 horas de exposición a los extractos secos de ciruela a una concentración de 1 mg/mL. En todos los casos el porcentaje de viabilidad celular fue superior al 95 % (**Figura 14**). En términos generales, se considera que no se afecta la viabilidad celular cuando la tasa de supervivencia es superior al 90 %, de modo que la concentración de 1 mg/mL utilizada positivamente en los ensayos microbiológicos (sección 5.3.) se consideró como válida para la evaluación de las

actividades antiinflamatorias y antioxidantes de los extractos secos de ciruela empleando modelos celulares.

5.5. Estudio de la actividad anti-inflamatoria empleando un modelo celular

Estudios recientes asocian las enfermedades gastrointestinales con procesos inflamatorios crónicos y agudos (Hartman y col., 2014). Durante estos procesos inflamatorios la NO sintasa inducible (iNOS) es responsable de una elevada producción de NO lo que puede conducir a lesiones tisulares, disfunción de órganos y tumorigénesis relacionada con la inflamación (Conforti y Menichini, 2011). Por tanto, el NO es un adecuado biomarcador de los procesos inflamatorios utilizando modelos celulares.

Como se confirmó en el aparato anterior (sección 5.4), los tratamientos celulares con los extractos secos de ciruela (1 mg/mL) no afectaron la viabilidad de las células RAW 264.7. La **Figura 15** muestra el efecto de los extractos secos de ciruela en la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS durante 24 horas. La presencia de LPS en el medio estimuló significativamente ($p < 0.05$) la producción de NO en las células, incrementando su contenido desde 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (control) a 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (LPS) (**Figura 15**). Los tratamientos de las células con todos los extractos secos de ciruela redujeron significativamente ($p < 0.05$) la producción de NO en comparación con el control celular estimulado con LPS. En todos los casos se alcanzó una inhibición en la producción de NO de al menos el 25 %, siendo el extracto de ciruela secado a vacío a 80 °C el que presentó una mayor actividad anti-inflamatoria, permitiendo una inhibición en la producción de NO superior incluso al 40 %. Este extracto se caracterizó por presentar un contenido en el ácido fenólico metil-3-cafeoilquinato mayor al presente en el resto de extractos (**Tabla 4**). Este ácido fenólico es un derivado del ácido clorogénico, al cual, junto a otros derivados del mismo ácido, se le atribuyen importantes propiedades anti-inflamatorias (Hu y col. 2014), relacionada esta propiedad principalmente a su estructura, en la cual presenta numerosos grupos hidroxilo.

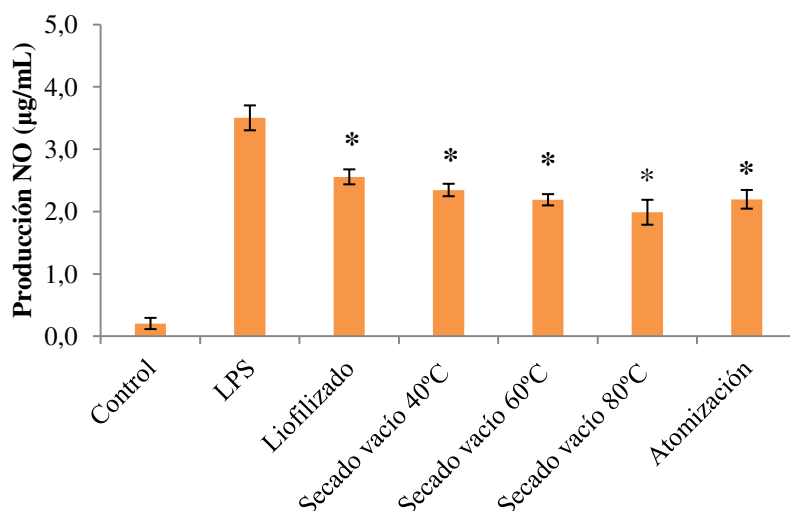


Figura 15. Efecto de las muestras secas de ciruela (1 mg/mL) sobre la producción de NO en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 estimulada por LPS (10 µg/mL) durante 24 h. Los resultados expresan los valores medios \pm desviación estándar de tres ensayos independientes (n=3). Los asteriscos en las barras representan diferencias significativas en la producción de NO ($p < 0.05$) respecto al control celular estimulado con LPS.

Las diferentes actividades anti-inflamatorias observadas entre los extractos podrían deberse a los distintos perfiles fenólicos de cada uno de ellos generados como consecuencia de los procesos de secado a los que fueron sometidos. Esta capacidad de inhibir la producción de NO en macrófagos estimulados previamente con LPS ha sido ampliamente estudiada en diferentes frutas empleando extractos enriquecidos en compuestos fenólicos (Wang y Mazza, 2002; Ho y col., 2017), no así en el caso de extractos de zumo de ciruela, cuyos resultados novedosos se muestran en el presente trabajo. Hay estudios que muestran que los flavonoles, como las quercetina y sus derivados, son los principales compuestos anti-inflamatorios en los extractos solubles de frutas, inhibiendo la expresión de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias (Zhang y col., 2017) y dificultando la producción de NO, reduciendo, por tanto, la respuesta inflamatoria (Devi y col., 2015). Por tanto, debido a que el NO está considerado como un mediador importante involucrado en múltiples vías inflamatorias, la inhibición de su producción por todos los extractos secos de ciruela es indicativo de la potencial actividad anti-inflamatoria de estos extractos a nivel celular.

5.6. Estudio de la actividad antioxidante empleando un modelo con células intestinales humanas

El uso de los cultivos celulares para la cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por un agente pro-oxidante es una adecuada herramienta para evaluar la potencial capacidad antioxidante de extractos naturales (Martín y col., 2014). La **Figura 16** muestra el incremento en la generación de ROS en células HT-29 de intestino humano cuando fueron expuestas al agente pro-oxidante terbutilo (t-BOOH) durante un tiempo máximo de 210 min. Esta generación de ROS se vio reducida cuando las células fueron pre-incubadas 24 horas con los extractos secos de ciruela. Cabe destacar que las células pre-tratadas con los extractos obtenidos por secado a vacío a 80 °C y por atomización presentaron una cinética de generación de ROS cuando fueron expuestas al agente pro-oxidante similar o inferior a los valores obtenidos en el control celular sin oxidar, lo que indica que estos extractos presentarían una elevada capacidad antioxidante.

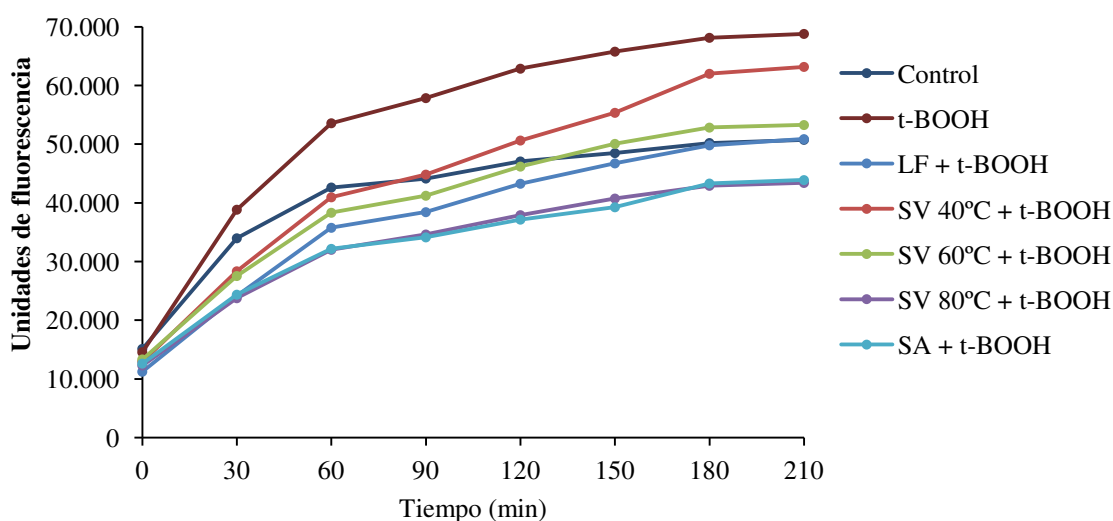


Figura 16. Efecto protector de los extractos secos de ciruela frente al estrés oxidativo en células intestinales humanas HT-29. Las células fueron tratadas con 1 mg/mL de los extractos durante 24 h, y expuestas al agente pro-oxidante t-BOOH para inducir la generación de ROS cuya formación fue evaluada durante 210 min.

Como se muestra en la **Figura 16**, el nivel intracelular de ROS en las células HT-29 expuestas únicamente al agente pro-oxidante terbutilo fue de un 135 % comparado con el control celular sin oxidar (considerado como 100 %), indicando que el t-BOOH estimula eficientemente la generación de ROS intracelular. El

pretratamiento de las células durante 24 horas con los diferentes extractos secos de ciruela redujo significativamente ($p < 0,05$), excepto en el extracto obtenido por secado al vacío a 40 °C, el incremento en la formación de ROS intracelular tras 210 minutos de exposición al agente pro-oxidante terbutilo.

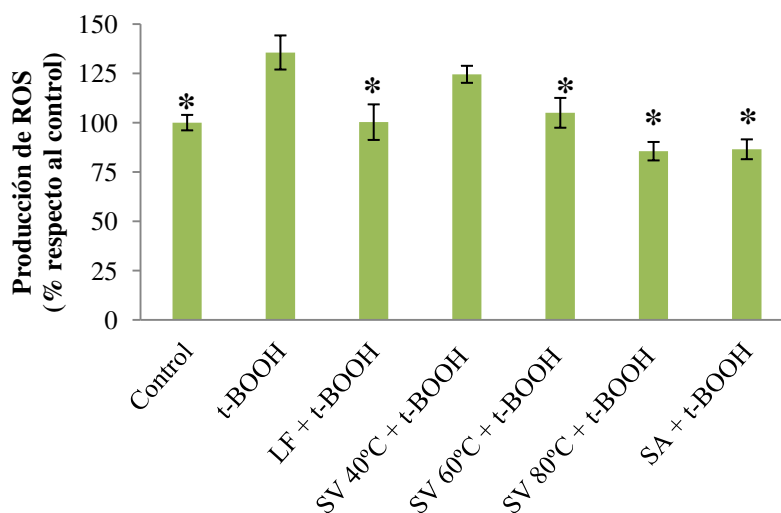


Figura 17. Efecto protector de los extractos secos de ciruela sobre la generación intracelular de ROS tras la exposición a t-BOOH. Las células HT-29 fueron pre-tratadas con 1 mg/mL de los extractos secos de ciruela durante 24 horas antes de ser expuestas al agente pro-oxidante t-BOOH (2,5 mM) durante 210 min para inducir la producción de ROS. Los valores se expresan como el porcentaje relativo de emisión de fluorescencia respecto al control celular sin oxidar. Las barras con asterisco indican una reducción significativa de la producción de ROS en comparación con las células expuestas al t-BOOH sin ningún pretratamiento con los extractos de ciruela ($p < 0,05$).

Las principales inhibiciones en la formación de ROS intracelular se obtuvieron cuando las células se pre-trataron con las muestras obtenidas por secado a vacío a 80 °C y por atomización, cuya principal diferencia respecto al resto de las muestras radica en el contenido en el ácido fenólico 3-metil-cafeilquinato (**Tabla 4**). Estos resultados sugieren que los ROS generados durante el periodo de estrés oxidativo fueron eficientemente atrapados cuando las células fueron pre-tratadas durante 24 horas con los extractos secos de ciruela, lo cual también podría explicar la inhibición observada en la inflamación inducida por LPS (**Figura 15**), ya que los procesos de inflamación pueden ser una manifestación de un incremento en estrés oxidativo celular (Hajjar y Gotto 2013; Reuter y col., 2010). Estudios previos utilizando diferentes modelos celulares han

demostrado que los compuestos fenólicos presentes en extractos de frutas pueden actuar como potentes antioxidantes (Martín y col. 2015; Tan y col., 2012).

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en el presente trabajo son las siguientes:

1. El método y la temperatura de secado utilizada influye significativamente en la composición fenólica de los extractos de ciruela, contribuyendo por tanto a las propiedades bioactivas de estos extractos.
2. Algunos de los extractos de ciruela presentan actividad antimicrobiana frente a patógenos relacionados con los alimentos, la cual depende tanto de la composición del extracto como de la bacteria estudiada.
3. En cuanto a la actividad frente a microorganismos beneficiosos para la salud ninguno de los extractos de ciruela afectó a la viabilidad de los microorganismos probióticos estudiados, salvo en el caso de *L. casei* donde se observó un aumento del crecimiento provocado por los extractos obtenidos mediante SV a 80 °C y mediante SA, lo que sugiere que estos extractos podrían tener un efecto selectivo frente a microorganismos beneficiosos.
4. Todos los extractos de ciruela tuvieron actividad anti-inflamatoria y fueron capaces de reducir la producción de NO, destacando el SV a 80 °C, que tiene una concentración mayor de metil-3-cafeoilquinato del cual se han descrito propiedades anti-inflamatorias.
5. Los extractos con una mayor actividad antioxidante a nivel celular fueron SV a 80 °C y SA, posiblemente debido a la presencia de 3-metil-cafeilquinato en estos extractos.

De forma general, se puede concluir que los compuestos fenólicos presentes en los extractos de ciruela pueden ser una fuente potencial de compuestos bioactivos que contribuyan a la mejora de la salud gastrointestinal, ya que pueden actuar como agentes antibacterianos, anti-inflamatorios y antioxidantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Afolabi T.J., Tunde-Akintunde T.Y., Adeyanju J.A. (2015). Mathematical modeling of drying kinetics of untreated and pretreated cocoyam slices. *Journal of Food Science and Technology*, 52: 2731-2740.

- Benayad Z., Martinez-Villaluenga C., Frias J., Gomez-Cordoves C., EddineEs-Safi N. (2014). Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 62: 412-420.
- Benzie I. F. y Strain J.J (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299: 15-27.
- Betoret N., Puente L., Díaz M.J., Pagán M.J., García M.J., Gras M.L. Martínez-Monzó J., Fito P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 56: 273-277.
- Blando F., Gerardi C., Nicoletti I. (2004). Sour Cherry (*Prunus cerasus* L) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5: 253-258.
- Bruce L. T., Dougal M. R., Michael N., Marco A. D., Weisheng L. (2011). Capítulo 15: Plum. Badenes, M.A. y Byrne, D. H. (Editores). *Fruit Breeding*. New York, USA. Editorial: Springer.
- Chan C.L., Gan R.Y., Shah N. P., Corke H. (2018). Polyphenols from selected dietary spices and medicinal herbs differentially affect common food-borne pathogenic bacteria and lactic acid bacteria. *Food Control*, 92: 437-443.
- Chun O.K., Kim, D.O., Moon, H.Y., Kang, H.G., Lee, C.Y. (2003). Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51: 7240-7245.
- Cömert E. D. y Gökmen V. (2018). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 105: 76-93.
- Conforti F. y Menichini, F. (2011). Foods of plant origin as source of nitric oxide production inhibitors. S. Haugen y S. Meijer (Editores.). *Handbook of nutritional biochemistry: Genomics, metabolomics, and food supply*. UK. Editorial: Nova Science Publishers.
- Das Q., Islam M. R., Marcone M. F., Warriner K. Diarra M. S.Das, (2017). Potential of berry extracts to control foodborne pathogens. *Food Control*, 73: 650-662.

- Devi K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. M., Daglia, M. (2015). Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*, 99:1-10
- Donovan J. L., Meyer, A. S., Waterhouse, A. L. (1998). Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1247-1252.
- EFSA, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2017.5077>
- EFSA, 2018. Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria still high in humans, animals and food, say ECDC and EFSA. <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180227>
- FAOSTAT, 2018. Production quantities of plums and sloes by country. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Figiel A. y Michalska A. (2016). Overall Quality of Fruits and Vegetables Products Affected by the Drying Processes with the Assistance of Vacuum-Microwaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 1-18.
- Gil M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Kader, A. A. (2002) Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin c contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4976-4982.
- Hajjar D.P. y Gotto A.M. Jr. (2013). Biological Relevance of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Arterial Diseases. *The American Journal of Pathology*, 182: 1474-1481.
- Hartman K.G., Bortner J.D. Jr., Falk G.W., Ginsberg G.G., Jhala N., Yu J., Martín M.G., Rustgi A.K., Lynch J.P. (2014). Modeling human gastrointestinal inflammatory diseases using microphysiological culture systems. *Experimental Biology and Medicine*, 239: 1108-1123.
- Ho G.T., Wangensteen H., Barsett H., (2017). Elderberry and Elderflower Extracts, Phenolic Compounds, and Metabolites and Their Effect on Complement, RAW 264.7 Macrophages and Dendritic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18:584.
- Hu T., He X.W., Jiang J.G. (2014). Functional Analyses on Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Effects of Extracts and Compounds from Ilex

latifolia Thunb., a Chinese Bitter Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 8608-8615

- Igwe E. y Charlton K.E. (2016). A Systematic Review on the Health Effects of Plums (*Prunus domestica* and *Prunus salicina*). *Phytotherapy research*, 30, 701-731.
- Jones A., Pravadali-Cekic S., Dennis G.R. Bashir R., Mahon P.J., Shalliker R.A. (2017). Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 967: 93-101.
- Lee H. C., Jenner, A. M., Lova, C. S., Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*: 157, 876-884.
- Liu H., Ma S., Xia H., Lou H., Sun L. (2018). Anti-inflammatory activities and potential mechanisms of phenolic acids isolated from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* roots in THP-1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 222: 201-207.
- Liu Y., Qi Y., Chen X., He H., Liu Z., Zhang Z., Ren Y., Ren X. (2018). Phenolic compounds and antioxidant activity in red-and in green- fleshed kiwifruits. *Food Research International*, 1: 1-11.
- Maldonado Salazar E., Quiñones Quiñones K.I., Vásquez H. D., Miranda J.C. (2005). Estudio fisicoquímico, bromatológico, fitoquímico y potencial de transformación artesanal de la ciruela del Pacífico. *Acta agronómica*, 54: 25-28.
- Martín M.A., Cordero-Herrera I., Bravo L., Ramos S., Goya L. (2014). Cocoa flavanols show beneficial effects in cultured pancreatic beta cells and liver cells to prevent the onset of type 2 diabetes. *Food Research International*, 63: 400-408.
- Martín M.A., Ramos S., Mateos R., Marais P.J.J., Bravo-Clemente L., Khoo C., Goya L. (2015). Chemical characterization and chemo-protective activity of cranberry phenolic powders in a model cell culture. Response of the antioxidant defenses and regulation of signaling pathways. *Food Research International*, 71: 68-82.
- Michalska A., Honke J., Łysiak G., Andlauer W. (2016)a. Effect of drying parameters on the formation of early and intermediate stage products of the Maillard reaction in different plum (*Prunus domestica* L.) cultivars. *Food Science and Technology*, 65: 932-938.

- Michalska A., Wojdyło A., Lech K., Łysiak G. P., Figiel A. (2016)b. Physicochemical properties of whole fruit plum powders obtained using different drying technologies. *Food Chemistry*, 207: 223-232.
- Michalska A., Wojdyło A., Łysiak G.P., Figiel A. (2017). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Powders Obtained from Different Plum Juice Formulations. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 1-14.
- Mingo, E., Silván, J. M., Martínez-Rodríguez, A. J. (2016). Selective antibacterial effect on *Campylobacter* of a winemaking waste extract (WWE) as a source of active phenolic compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 418-424.
- Moreiras O., Carbajal A., Cabrera L., Cuadrado C. (2013). *Tablas de composición de alimentos*. Madrid, España. Editorial: Pirámide.
- Mueller M., Hobiger S., Jungbauer A. (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry*, 122: 987-996.
- Nayeri H., Ali Naderi G., Asgari S., Sadeghi M., Boshtam M., Mohamadzadeh S., Babaknejad N. (2017). LDL fatty acids composition as a risk biomarker of cardiovascular disease. *Artery Research*, 20: 1-7.
- Nicoli M.C., Anese M., Parpinel M.T., Franceschi S., Lericci C. R. (1997). Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters*, 114: 71-74.
- OMS, 2013. Promoting fruit and vegetable consumption around the world. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>
- Oke F. y Aslim B. (2010). Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1728-1733.
- Peixoto C. M., Dias M. I., Alves M. J., Calhelha R. C., Barros L., Pinho S. P., Ferreira I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253: 132-138.
- Piga A., Del Caro, A., Corda, G. (2003) From plums to prunes: Influence of drying parameters on polyphenols and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3675-3681.
- Polando Allué, I. (2015). Microbiota and gastrointestinal diseases. *Anales de Pediatría (English Edition)*, 83: 43.

- Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3396-3402.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1231-1237.
- Rekhy R. y McConchie R. (2014). Promoting consumption of fruit and vegetables for better health. Have campaigns delivered on the goals? *Appetite*, 79: 113-123.
- Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free radical biology & medicine*, 49: 1603-1616.
- Ríos J. L., y Recio M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84.
- 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.
- Ruiz López M. y García-Villanova Ruiz B., (2017). Capítulo 9: Frutas y productos derivados. Gil Á. (Editor). Tratado de Nutrición (Tomo III): Composición y calidad nutritiva de los alimentos, Madrid, España. Editorial Médica Panamericana.
- Sahamishirazi S., Moehring J., Claupein W., Graeff-Hoenninger S., (2017). Quality assessment of 178 cultivars of plum regarding phenolic, anthocyanin and sugar content. *Food Chemistry*, 214: 694-701.
- Shinwari K. J. y Rao P. S. (2018). Stability of bioactive compounds in fruit jam and jelly during processing and storage: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 75: 181-193.
- Silván J.M., Reguero M., de Pascual-Teresa S. (2016). A protective effect of anthocyanins and xanthophylls on UVB-induced damage in retinal pigment epithelial cells. *Food & Function*, 7: 1067-1076.
- Silván J.M., Zorraquin-Peña I., Gonzalez de Llano D., Moreno-Arribas M.V., Martínez-Rodríguez A.J. (2018). Antibacterial Activity of Glutathione-Stabilized Silver Nanoparticles Against *Campylobacter* Multidrug-Resistant Strains. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-10.

- Sójka M., Kołodziejczyk K., Milala J., Abadias M., Viñas I., Guyot S., Baron A. (2015). Composition and properties of the polyphenolic extracts obtained from industrial plum pomaces. *Journal of Functional Foods*, 12:168-178.
- Tan S., Ramos S., Martin M.A., Mateos R., Harvey M., Ramanathan S., Najimudin N., Alam M., Bravo L., Goya L. (2012). Protective effects of papaya extracts on tert-butyl hydroperoxide mediated oxidative injury to human liver cells (An in-vitro study). *Free Radicals and Antioxidants*, 2, 10-19.
- Tian Y., Puganen A., Alakomi H.L., Uusitupa A., Saarela M., Yang B. (2017). Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. *Food Research International*, 106: 291-303.
- Tomás Barberán, F.A., Gil M. I., Cremin P., Waterhouse A. L., Hess-Pierce B., Kader B.B. (2001). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4748-4760
- Tunde-Akitunde T. Y., Afolabi T. J., Akintunde B. O. (2005). Influence of drying methods on drying of bell-pepper (*Capsicum annum*). *Journal of Food Engineering*, 68: 439-442.
- Vasantha Rupasinghe H.P., Jayasankar S., Lay W. (2006). Variation in total phenolics and antioxidant capacity among European plum genotypes. *Scientia Horticulturae*, 108: 243-246.
- Wang J. y Mazza G. (2002). Inhibitory Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on Nitric Oxide Production in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 850-857.
- Wojdylo A, Oszmiański J. y Bielicki P. (2013). Polyphenolic Composition, Antioxidant Activity, and Polyphenol Oxidase (PPO) Activity of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 2762-2772.
- Zhang B., Deng, Z., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Ramdath, D.D., Tsao, R. (2017). Bioaccessibility, in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolics in cooked green lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Functional Foods*, 32:283-291.

8. ANEXOS

ANEXO AL CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID PARA EL DESARROLLO DE PROGRAMAS DE MÁSTER UNIVERSITARIO

SOLICITUD DE PRÁCTICAS / TRABAJOS FIN DE MÁSTER

Curso: 2017-18

La Universidad Autónoma de Madrid conforme a lo establecido en la cláusula segunda. 2) del citado convenio, solicita al CSIC la realización de prácticas y/o trabajos de fin de Máster por parte del alumnado abajo consignado, según los contenidos del convenio de colaboración citado, firmado el 11 de noviembre de 2014, del que el presente documento es anexo inseparable, y en los siguientes términos:

1. Denominación del programa de Máster:	Máster en Nuevos Alimentos
2. Instituto del CSIC donde se desarrollarán las actividades:	CSIC - CIAL Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Dpto de Biotecnología y Microbiología de Alimentos
3. Coordinador/a del Máster de la Universidad:	ZABURA JAIME DE PAZ LO
4. Tutor/académico de la Universidad:	Monica Rodríguez Garcia-Risco Departamento de Química Física Aplicada 910017924 monica.rodriguez@uam.es
5. Organizador/a del Máster del CSIC:	
6. Responsable de prácticas/trabajo fin de Máster del CSIC:	Adolfo Martínez Dpto de Biotecnología y Microbiología 910017964 adolfo.martinez@csic.es
7. Finalidad de las actividades:	Desarrollo Trabajo Fin de Máster. Empleo de subproductos derivados de la ciruela como ingredientes para la mejora de la salud gastrointestinal
8. Objetivos programáticos y actividades previstas:	Desarrollo Trabajo Fin de Máster. Evaluación de actividad antioxidante, anti-inflamatoria y antibacteriana de extractos de ciruela
9. Sistemas de evaluación y control:	Regulado en la guía docente de la asignatura
10. Duración de las actividades:	Del 2 de febrero de 2018 al 30 de junio de 2018
11. Horario de las actividades:	De 09:00 a 17:00 Horas diarias: 5
12. Nº total de horas	500
13. Cuantificación de la previsión del gasto en el que incurrirá eventualmente el	0

instituto del CSIC

Nombre y apellidos del estudiante: Alba Cuño Gallardo	DNI/NIE: 53802276D	Curso: 1	Teléfono: 670604443	Fecha de nacimiento: 21/01/1994	Máster: Máster en Nuevos Alimentos
--	-----------------------	-------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------------------

Lo que se firma, por duplicado ejemplar, en Madrid a 29 de enero de 2018

Por la Universidad Autónoma de Madrid

Marín Martín, Francisco
Vicedecano de Prácticas Externas




Francisco Marín Martín
Autorizado por el/la director/a del Instituto del CSIC

ANEXO II AL CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID PARA EL DESARROLLO DE PROGRAMAS DE MÁSTER UNIVERSITARIO.

El presente anexo se incorpora al convenio suscrito entre las citadas entidades con fecha 19 de diciembre de 2014. El alumnado abajo firmante y que se recoge en el anexo I firmado el 29 de enero de 2018, del citado convenio, ha leído y acepta las condiciones y compromisos establecidos en dicho convenio y declara su conformidad para realizar las prácticas y/o trabajos de fin de Máster en el CSIC, según los términos recogidos en el anexo I del mismo

Firma del/de la alumno/a



Fdo.: Alba Cuño Gallardo
DNI: 53802276D



INFORME DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN: NUEVOS ALIMENTOS

CURSO ACADÉMICO: 2017-2018

CONVOCATORIA: Ordinaria Extraordinaria

ESTUDIANTE:

Apellidos: Cuño Gallardo Nombre: Alba

TÍTULO DEL TFM:

Empleo de extractos de ciruela sometidos a diferentes procesos de secado como ingredientes para la mejora de la salud gastrointestinal.

TÍTULO EN INGLÉS:

Use of plum extracts subjected to different drying processes as ingredients for the improvement of gastrointestinal health.

DIRECTOR

Apellidos: Martínez Rodríguez Nombre: Adolfo

Codirector: Silván Jiménez Nombre: Jose Manuel

TUTOR (si aplica)

Apellidos: Rodríguez Nombre: Mónica

INFORME PARA EL TRIBUNAL

La firma del presente documento avala que la dedicación del estudiante ha sido adecuada a los ECTS del TFM, y que los resultados presentados en la memoria del TFM han sido generados por el autor de la misma.

Cantoblanco a 03 de Septiembre de 2018

EL DIRECTOR

EL CODIRECTOR

EL TUTOR

EL ESTUDIANTE