



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Actividad antioxidante del té blanco y de los residuos de limón: optimización de la extracción y aplicaciones en carne y en envases activos

Sara Peiró Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

**Actividad antioxidante del té blanco y de los residuos de limón:
optimización de la extracción y aplicaciones en carne y en
envases activos**

Sara Peiró Sánchez 2015



Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

PROGRAMA DE DOCTORAT DE RECERCA, DESENVOLUPAMENT I
CONTROL DE MEDICAMENTS

**Actividad antioxidante del té blanco y de los residuos de limón:
optimización de la extracción y aplicaciones en carne y en envases activos**

Memoria presentada por **Sara Peiró Sánchez** para optar al título de Doctor por la
Universitat de Barcelona.

VºBº de la directora:

Dra. María Pilar Almajano de Pablos

VºBº de la tutora

Dra. Núria Rius Bofill

La doctoranda

Sara Peiró Sánchez 2015

Para realizar el presente trabajo se ha contado con la colaboración de la empresa IRIS *Innovació i Recerca Industrial Sostenible*, S.L. que participó en el programa *Talent Empresa* (TEM) de la AGAUR y se le otorgó la ayuda TEM-DGR (2010).

En memoria de Miquel Regué Queralt

a mis padres

a mi marido

Agradecimientos

Quisiera que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta, han colaborado en la realización de la presente Tesis Doctoral.

En especial quiero agradecer a mi directora de Tesis, María Pilar Almajano por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica en su grupo de investigación, por su tiempo, sus correcciones e interés y por hacer posible que ahora haya acabado la Tesis Doctoral. A Núria Rius Bofill por haber seguido la tutoría. A Francisco Congregado por haberme dado apoyo y haber estado al principio de mi tarea investigadora y haber sido primero, director y luego tutor de Tesis hasta su reciente jubilación. Y sobre todo a Miquel Regué Queralt, un gran científico y un gran hombre que me enseñó todo lo necesario para comenzar la presente investigación y que, por desgracia, no ha podido ver el resultado de ella.

A mis compañeros de laboratorio de microbiología, a Eleonora, a Joana, a Ornella, a Carla, a Guillermo, a Mónica, a Vicen, a Nacho, a César y a Ariadna, a todas “mis” chicas de prácticas, sobre todo a Àngels por querer repetir en el Departamento.

A la Dra María Jesús Montes por estar siempre ahí, enseñarme todo lo que sabe y estar dispuesta a ayudarme en todo momento. A Carme, a Lucía por su buen carácter, a la Dra. Manresa, por preguntar siempre qué tal va, a la Dra M^o Carmen Fusté, a La Dra. Mercadé, al Dr. David Miñana por su interés y especialmente a la Dra. Mercedes Berlanga por compartir poyata y ciencia también fuera de la universidad.

Al parque Científico de Barcelona con un personal maravilloso, en especial el de técnicas separativas y citometría de flujo.

Al departamento de Ingeniería Química de la ETSEIB de la Universidad Politécnica de Catalunya. A mis compañeros de poyata por tantos experimentos compartidos; a Marga, Monika, Aini, Gaby y sobre todo a Francisco, el más manitas de todos los ingenieros. A los que han hecho la estancia de prácticas con el grupo de investigación, Anna, Laia, Xisca, Juanjo, Mari Cruz, Love, José, Eli, Eliana, Júlia y Mireia.

Al Departamento de Tecnología Alimentaria de la universidad de Zaragoza por mi estancia relámpago, en especial al Dr. Javier Raso y a Elisa Luengo por su dedicación, su asesoría y su tiempo.

Al Hospital Clínic de Barcelona, en especial al grupo de investigación de la Dra Silvia Ginés, y a Marta Cherubini por haberme transmitido su saber en el cultivo de las neuronas.

A la empresa *IRIS-Innovació i Recerca Industrial i Sostenible*, por participar en el programa y, especialmente, a Edurne Gastón, la persona con las ideas más claras que he conocido nunca. A Laura y a María, por su apoyo, a Enric, Sergi, Ester, Laura y Fátima por ayudarme con el plasma y con las hamburguesas.

A la AGAUR por conceder el proyecto.

Al Dr. Michael Gordon de la Universidad de Reading por sus meticulosas revisiones, sus comentarios y por compartir sus opiniones y su saber.

A mi *teacher* de Inglés el Dr. Txus Martín, por sus valiosas clases de perfeccionamiento

A mis amigas por prescindir de mi compañía algunos meses mientras escribía esta Tesis.

A mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles y proporcionarme los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona. Mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño y mi perseverancia y coraje para conseguir mis objetivos.

Y por supuesto, mi marido por haberme esperado tantas veces a la salida de laboratorio, y por haberme acompañado dónde he necesitado. Gracias por haber estado siempre ahí.

A todos los que han compartido algún momento conmigo y a todos de los que he aprendido que la ciencia debe de ser algo para. Porque esta Tesis no me corresponde sólo a mí sino a toda la gente que la ha hecho posible.

ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS

ABTS⁺	Radical del Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico
ACN	Acetonitrilo
ADI	Dosis de Ingesta Diaria (<i>Acceptance Dosi Intake</i>)
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
ANOVA	Análisis de la Variancia (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
AOAC	Asociación Oficial de Química Analítica (<i>Association Of Analytical Chemists</i>)
BHT	Butilhidroxitolueno
B.O.E.	Boletín Oficial del Estado
BSA	Albúmina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
c	Concentración
C	Control
CL	Límites de Confianza (<i>Confidence Limits</i>)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CRM	Medio de cultivo Reforzado para Clostridium (<i>Clostridium Reinforced Medium</i>)
DBD	Descarga Dieléctrica en Barrera (<i>Dielectric Barrier Discharge</i>)
DMEM	Medio de Cultivo Dulbecco obtenido por Modificación del Medio de Cultivo Basal de Eagle (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
D.O.	Densidad Óptica
DoE	Diseño de Experimentos (<i>Design Of Experiments</i>)
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EC	Epicatequina (<i>EpiCatechin</i>)
Ec.	Ecuación
ECG	Galato de Epicatequina (<i>EpiCatechin Gallate</i>)
EF	Campo Eléctrico (<i>Electric Field</i>)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (<i>European Food Safety Authority</i>)
EGC	Epigalocatequina (<i>EpiGalloCatechin</i>)
EGCG	Galato de Epigalocatequina (<i>EpiGalloCatechin Gallate</i>)
EtOH	Etanol

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FBS	Suero Fetal Bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FD	Muestra Liofilizada (<i>Freeze Drying</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FI	Fluorescencia
FL	Floresceína
FW	Peso fresco (Fresh Weight)
GA	Ácido Gálico (<i>Gallic Acid</i>)
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico (<i>Gallic Acid Equivalent</i>)
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro (<i>Generally Recognized as Safe</i>)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
IRIS	Innovació i Recerca Industrial i Sostenible, S.L.
KTH	Real Instituto de Tecnología de Estocolmo (<i>KTH Royal Institute of Technology</i>)
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
log	Logaritmo
LW	Residuo de Limón (<i>Lemon Waste</i>)
LW-FD	Extracto de Residuo de Limón Liofilizado (<i>Lemon Waste-Freeze Drying</i>)
LW-FW	Extracto de Residuo de Limón Fresco (<i>Lemon Waste-Fresh Weight</i>)
MAP	Envasado en Atmósfera Modificada (<i>Modified Atmosphere Packaging</i>)
MDA	Malondialdehído
MECK	Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética (<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>)
MeOH	Metanol
MH	Medio de cultivo Mueller-Hinton
MQ	Agua ultrapura MilliQ
MRS	Medio de Cultivo de Man, Rogosa, Sharpe
NOAEL	Efectos Adversos No Observados (<i>Non Observed Adverse Effects Level</i>)
O.M.S.	Organización Mundial de la Salud
o/n	Incubación Durante una Noche (<i>overnight</i>)
ORAC	Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)
O/W	Emulsión Aceite en Agua (<i>Oil-Water emulsion</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)

PCA	Medio de Cultivo Agar para Recuento (<i>Plate Count Agar</i>)
PE	Polietileno
PEF	Campos Eléctricos Pulsados (<i>Pulsed Electric Fields</i>)
PI	Plasma
PLA	Ácido Poliláctico (<i>PoliLactic Acid</i>)
POL	Peroxidación Lipídica
PV	Valor Peróxido (<i>Peroxide Value</i>)
RC	<i>Road Coating</i>
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>RiboNucleic Acid</i>)
RNS	Especies Reactivas del Nitrógeno (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RSM	Metodología de Superficie Respuesta (<i>Response Surface Methodology</i>)
RT	Temperatura Ambiente (<i>Room Temperature</i>)
sd	Desviación Estándar (<i>standard deviation</i>)
Sb	Medio de cultivo Saboraud
Sb-Cl	Medio de cultivo Saboraud-Cloranfenicol
SDS	DioDecilsulfato Sódico
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
t	tiempo
T	Temperatura
TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TE	Trolox Equivalente
TEAC	Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)
Tg	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis Termogravimétrico (<i>Thermogravimetric Analysis</i>)
Tm	Temperatura de fusión
TMC	Contenido en Bacterias Mesófilas Totales (<i>Total Mesophilic Counts</i>)
TP	Polifenoles Totales (<i>Total Polyphenols</i>)
TPC	Contenido en Bacterias Psicrófilas Totales (<i>Total Psychrophilic Count</i>)
TSA	Medio de cultivo Triptona Soja Agar
UB	Universitat de Barcelona
UE	Unión Europea (<i>European Union</i>)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

UPC	Universitat Politècnica de Catalunya
VP	Envasado al Vacío (<i>Vacuum Packaging</i>)
WCA	Ángulo de Contacto de Agua (<i>Water Contact Angle</i>)
WT	Té blanco (<i>White Tea</i>)
WT-FD	Té blanco liofilizado (<i>White Tea-Freeze Drying</i>)
WT-G	Té blanco seco picado (<i>White Tea Ground</i>)
Zp	Índice de Desintegración Celular

ÍNDICE

ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS	1
ÍNDICE	5
RESUMEN	11
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	15
1. Los radicales libres	15
1.1 Especies reactivas	16
1.1.1 Especies Reactivas del Oxígeno	16
1.1.2 Especies Reactivas del Nitrógeno	17
1.2 Fuentes de radicales libres	17
1.2.1 Fuentes endógenas	17
1.2.2 Fuentes exógenas	18
2. Efecto de la oxidación	18
2.1 La oxidación lipídica	19
2.2 Oxidación de proteínas	20
2.3 Oxidación de carbohidratos	20
2.4 Oxidación del material genético	21
3. Los compuestos antioxidantes	21
3.1 Definición y características principales	21
3.2 Efectos de los antioxidantes en la salud	22
3.3 Actividad antimicrobiana	24
4. Principales compuestos antioxidantes	25
4.1 Compuestos antioxidantes sintéticos	25
4.1.1 Butilhidroxianisol (BHA)	26
4.1.2 Butilhidroxitolueno (BHT)	27
4.1.3 Terbutilhidroquinona (TBHQ)	27
4.1.4 Galato de Propilo (PG)	28
4.2 Compuestos antioxidantes naturales	28
4.2.1 Los polifenoles	29
4.2.1.1 Ácidos fenólicos simples	29
4.2.1.2 Flavonoides	29

i. Isoflavonas, neoflavonoides y chalconas	30
ii. Flavonas, flavonoles, flavanonas y flavanoles.....	30
iii. Flavanoles y proantocianidinas.....	30
iv. Antocianidinas	31
4.2.1.3 Amidas polifenólicas	31
4.2.1.4 Otros polifenoles	31
4.2.2 Otros compuestos antioxidantes	31
4.2.2.1 Ácido ascórbico.....	32
4.2.2.2 α -Tocoferol.....	32
4.2.2.3 Ácido Cítrico	32
4.2.2.4 Carotenoides.....	33
4.2.2.5 Péptidos proteicos	33
4.2.3 Bacterias con capacidad antioxidante	33
5. Fuentes de antioxidantes naturales	34
5.1 Los productos agroalimentarios	34
5.1.1 Productos agroalimentarios de alto poder antioxidante	35
5.1.2 El té blanco	35
5.1.2.1 Descripción	35
5.1.2.2 Composición	36
5.1.2.3 Aplicaciones descritas	36
5.2 Los residuos agroalimentarios.....	37
5.2.1 La reutilización de residuos agroalimentarios	37
5.2.2 El residuo del limón.....	38
5.2.2.2 Composición	38
5.2.2.3 Aplicaciones descritas	39
6. Tecnologías para la extracción de compuestos antioxidantes.....	40
6.1 Clásica con disolventes	40
6.2 Asistida por presión	41
6.3 Con fluidos supercríticos	41
6.4 Asistida por microondas.....	42
6.5 Asistida por ultrasonidos.....	42
6.6 Asistida por campos eléctricos pulsados.....	44
7. Aplicaciones de antioxidantes en la industria alimentaria.....	46
7.1 Aplicaciones en el producto	46
7.1.1 Descripción.....	46

7.1.2 Antioxidantes naturales testados.....	47
7.2 Aplicación en coberturas comestibles	48
7.2.1 Descripción.....	48
7.2.2 Coberturas desarrolladas.....	48
7.3 Aplicación en envases y coberturas activas no comestibles.....	49
7.3.1 Descripción.....	49
7.3.2 Películas activas desarrolladas.....	51
8. Envase tradicional <i>versus</i> envases activos e inteligentes.....	51
8.1 Producto en envase tradicional.....	52
8.1.1 Envasado al vacío	52
8.1.2 Envasado en atmosfera modificada	52
8.2 El envase inteligente	53
8.3 El envase activo	53
i) Absorbentes o eliminadores	53
ii) Liberadores o emisores.....	54
CAPÍTULO 2: INTERÉS Y OBJETIVOS	55
CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Obtención de residuos y material vegetal.....	57
2. Métodos de optimización de la extracción de los compuestos de interés.....	58
2.1 Extracción acelerada con solventes.....	58
2.2 Extracción por presión asistida por campos eléctricos pulsados (PEF)	59
3. Caracterización de la eficacia y composición de los extractos obtenidos.....	60
3.1 Determinación de la capacidad antioxidante.....	60
3.1.1 Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno (ORAC).....	60
3.1.2 Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC)	61
3.1.3 Actividad antiradicalaria por el método de DPPH.....	62
3.2. Determinación de Polifenoles Totales (TP)	63
3.3 Cuantificación de la composición de los extractos	64
3.3.1 MECK.....	64
3.3.2 HPLC.....	65
3.3.2.1 Cuantificación de los polifenoles mayoritarios	65
3.4 Determinación de proteínas por Bradford test	67
3.5 Capacidad antimicrobiana de los extractos	67
3.5.1 Test de difusión en disco	67

3.5.2 Cuantificación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	70
3.6 Actividad de protección frente al estrés oxidativo inducido	70
3.6.1 Capacidad de protección sobre DNA.....	70
3.6.2 Capacidad de protección celular	71
4. Aplicación de los extractos en carnes.....	73
4.1 Preparación de las muestras de carne.....	73
4.2 Seguimiento de la oxidación de la carne.....	74
4.2.1 TBARS	74
4.2.2 pH.....	74
4.2.3 Color.....	74
4.3 Análisis microbiológico.....	75
5. Aplicación en envases activos	75
5.1 Envase activo antioxidante de PE	75
5.1.1 Elaboración de los films de PE.....	75
5.1.2 Estudio de la capacidad antimicrobiana del plasma.....	76
5.1.2 Caracterización de los films de PE	77
5.1.2.1 Capacidad antioxidante del film.....	77
5.1.2.2 Color y opacidad	77
5.1.2.3 Medida del ángulo de contacto.....	78
5.1.2.4 Liberación de polifenoles	78
5.1.3 Actividad antioxidante de los films	78
5.2 Envase activo de PLA.....	79
5.2.1 Elaboración de los films de PLA.....	79
5.2.2 Caracterización de los films de PLA	79
5.2.2.2 Estudio del análisis térmico.....	79
5.2.2.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	80
5.2.2.1 Actividad antioxidante de los films	80
6. Análisis estadístico de los datos y modelización.....	81
6.1 Análisis estadístico.....	81
6.2 Metodología de optimización por Superficie Respuesta (RSM).....	82
6.3 Ajuste de cinética de extracción.....	82
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
1. Optimización de la extracción de compuestos polifenólicos	83

1.1 Optimización de la extracción de polifenoles del té blanco por disolventes y temperatura.....	83
1.2 Mejora de la extracción de polifenoles procedentes del residuo de limón por presión y campos eléctricos pulsados	95
2. Caracterización de los residuos de limón: capacidad antioxidante, antimicrobiana y de protección frente estrés oxidativo inducido	107
3. Aplicación de los antioxidantes	118
3.1 Aplicación en carnes	118
3.1.1 Aplicación de té blanco en hamburguesa de vacuno envasadas en MAP	118
3.1.2 Aplicación en carne picada ecológica envasada en vacío	128
3.2 Aplicación en envases activos	132
3.2.1 Films activos de polietileno: Efecto antioxidante de un film activo de PE sobre carne de hamburguesa de vacuno.....	132
3.2.2 Aplicación en films de PLA: El té blanco como antioxidante natural en envases bioactivos para alimentos.....	143
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.....	149
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....	157
CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159
CAPÍTULO 8: PUBLICACIONES	183

RESUMEN

Desde los inicios de la humanidad el hombre ha necesitado alimentarse y por ello ha desarrollado técnicas de caza, ha domesticado a los animales, ha utilizado la agricultura y finalmente ha mejorado la conservación de los alimentos (Carocho *et al.*, 2014). En la antigüedad principalmente se empleaban técnicas de secado y salado para preservar de la degradación a los productos alimentarios de consumo. Estos procesos alargaban la vida útil del alimento pero no garantizaban totalmente la seguridad alimentaria de los mismos (Cubero *et al.*, 2002). A mediados del siglo XX, la refrigeración, el desarrollo de envases y el uso de aditivos alimentarios hicieron posible el mantenimiento de los alimentos frescos y en buen estado por un periodo de tiempo aceptable y, dependiendo de la tecnología empleada (como el enlatado), incluso años (Madrid, 2003). En la actualidad, el uso de aditivos en la industria, no sólo alimentaria sino también cosmética y farmacéutica, está ampliamente extendido. Su aplicación tiene como objetivo preservar de la degradación microbiana, del deterioro químico, además de estabilizar el producto, endulzar, gelificar e incluso aportar color (Cubero *et al.*, 2002). Efectivamente, existen más de 2500 compuestos distintos usados como aditivos alimentarios, algunos de ellos permitidos sólo en determinados países y otros ampliamente utilizados en todo del mundo (Carocho *et al.*, 2014).

En general, y como todo lo que atañe a la salud humana, la legislación sobre ellos es rigurosa y los efectos sobre la salud se revisan periódicamente (Emerton and Choi, 2008). De hecho, en el 2010, la Comisión Europea y la EFSA (*Agencia Europea de Seguridad Alimentaria*) acordaron conjuntamente la re-evaluación de todos los aditivos existentes ya aprobados por dichos organismos. Con previsión de haber revisado en el 2015 todos los colorantes y conservantes (incluyendo los antimicrobianos y antioxidantes) y, en 2020 el resto de aditivos legalmente permitidos (Lodi *et al.*, 2011).

Muchos de estos aditivos son de origen sintético, muy eficaces y sometidos a los mismos criterios de evaluación que los naturales pero con menor nivel de aceptabilidad por parte del consumidor (Bearth *et al.*, 2014; Dickson-Spillmann *et al.*, 2011).

Con el objetivo de conseguir nuevos productos y satisfacer las nuevas demandas de los consumidores, la industria en general y la alimentaria en particular, se investiga para encontrar y testar nuevas fuentes de productos y compuestos naturales bioactivos que se pueden usar como aditivos naturales (Gonzalez-Molina *et al.*, 2010; Perumalla and Hettiarachchy, 2011; Price *et al.*, 2013; Skowyra *et al.*, 2014b) que permitan substituir, o al menos reducir, el uso de aditivos sintéticos.

De entre los posibles compuestos con uso potencial como aditivos naturales, los polifenoles merecen una especial atención. Estas sustancias comprenden aproximadamente unas 8000 estructuras moleculares distintas (Leopoldini *et al.*, 2011; Tsao, 2010) y ofrecen un amplio abanico de funciones. Principalmente presentan actividad antioxidante (Makris *et al.*, 2007; Peschel *et al.*, 2006) pero también se han descrito como antimicrobianos (Oh *et al.*, 2013; Weerakkod *et al.*, 2010), potenciadores de la salud (Cabrera *et al.*, 2006; Moderno *et al.*, 2009; Pacifico *et al.*, 2012) y como colorantes, si consideramos el grupo de las antocianinas (Tsao, 2010).

Actualmente, los polifenoles naturales se están estudiando como antioxidantes por su capacidad de preservar el color, el olor y la textura de los alimentos y productos cosméticos (Fava *et al.*, 2013; Gil-Chávez *et al.*, 2013) centrando su actividad en la protección de la oxidación de las grasas. La oxidación de grasas, o peroxidación lipídica, no sólo deteriora las características fisicoquímicas del alimento, sino que también puede producir compuestos potencialmente tóxicos para la salud humana (Boots *et al.*, 2008; Dotan *et al.*, 2004; Niki, 2009).

Muchos trabajos descritos en la literatura se centran en el estudio de los polifenoles en sistemas cárnicos (Camo *et al.*, 2008; Doolaege *et al.*, 2012; Formanek *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2001), pescados (Zhou *et al.*, 2010) e incluso en recubrimientos y envases que forman los llamados envases activos (Colon and Nerin 2012; Gómez-Estaca *et al.*, 2014; Silva-Weiss *et al.*, 2013).

Siguiendo la estela de estos estudios y otros del propio grupo de investigación (Almajano *et al.*, 2007; 2008; Azman *et al.*, 2014; Santas *et al.*, 2010a, 2010b; Segovia *et al.*, 2014a, 2014b; Skowyra *et al.*, 2014a, 2014b), la presente Tesis Doctoral pretende

profundizar en la optimización de la extracción y el uso de los antioxidantes naturales aplicados a productos alimentarios. Con este fin, se han usado dos casos de estudio concretos como fuente de estos productos, el té blanco y los residuos de limón producidos en la industria de los zumos. Estos últimos son, además, de elevado interés, y su uso supone reutilizar subproductos industriales, *a priori*, sin valor comercial.

La Tesis profundiza en los diferentes aspectos descritos. En el primer Capítulo se expone el concepto de oxidación, sus efectos, así como las fuentes de antioxidantes, tipos de envases y una descripción somera de envases activos. El segundo Capítulo expone el objetivo fundamental de la Tesis y los sub-objetivos en los que se divide. En el tercer Capítulo se detallan los fundamentos de las técnicas así como los materiales y métodos empleados. Los resultados se desarrollan en el cuarto Capítulo, subdivididos en tres grandes Apartados (optimización de la extracción, caracterización de los extractos y aplicación) que a su vez se presentan subdivididos en sub-Apartados, agrupaciones de experimentos coherentes y autocontenidos. El quinto Capítulo expone la discusión global, analizando todos los resultados obtenidos en su conjunto. El sexto desarrolla las conclusiones globales de todo el trabajo realizado; resume el alcance de los objetivos propuestos y, de esta manera, proporciona una visión conjunta de los avances científicos que se aportan en la presente Tesis doctoral. En el séptimo y último Capítulo se recopilan todas las referencias bibliográficas usadas. Al final, se incluye una sección donde se listan los trabajos derivados de esta Tesis Doctoral (ya editados, y/o enviados a revistas internacionales con revisión por pares) además de un artículo ya publicado en su formato editado.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

A nivel químico, la oxidación se define como pérdida de electrones. Así, un agente oxidante es aquel que acepta electrones, se reduce, y causa una reacción de oxidación. Siempre la oxidación va ligada a la reducción (Prior, 1999).

1. Los radicales libres

Los átomos y moléculas que conforman la materia tienen, normalmente, una estructura atómica en la que los electrones se encuentran apareados en un orbital, con diferente número cuántico de spin (+1/2 y -1/2). En este contexto, se define como radical libre aquel átomo, molécula o ion que contiene, al menos, un electrón desapareado en un orbital (Carreras-Cardona, 2012; Wettasinghe and Shahidi, 2000).

Estos átomos o moléculas se caracterizan por ser muy inestables y tener una elevada capacidad de reacción para compensar su desequilibrio. Por ello, a partir de los radicales libres, se pueden dar 3 tipos de reacciones que permiten estabilizarlos: (1) captura de un electrón, (2) captura de un protón, (3) unión a otro radical (**Figura 1**).

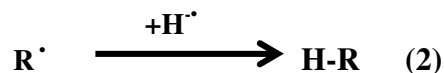
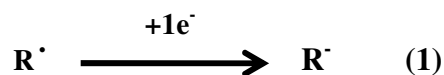


Figura 1: Posibles reacciones de los radicales libres para llegar a la estabilidad.

Los radicales pueden intervenir en numerosas reacciones bioquímicas, alterando el funcionamiento de sistemas biológicos (Prior, 1999). En los organismos vivos atacan a componentes celulares y producen alteraciones en sus membranas, en el material genético y, en general, repercuten negativamente en la salud del individuo. Además, varios estudios han demostrado que las especies reactivas están relacionadas con la pato-fisiología de varias enfermedades, como la diabetes, el cáncer, enfermedades pulmonares crónicas y enfermedades intestinales (Boots *et al.*, 2008; Valko *et al.*, 2007).

Existen fundamentalmente 4 tipos de especies de radicales libres: las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS), las Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS), los radicales libres del carbono y los radicales libres del azufre (Buonocore *et al.*, 2010). Por su importancia en los sistemas biológicos debemos destacar dos de ellos: ROS y las RNS (Boots *et al.*, 2008).

1.1 Especies reactivas

Las ROS y las RNS son las dos especies reactivas con más importancia en los sistemas biológicos. Presentan un rol dual, es decir, son beneficiosas a la vez que dañinas. Los efectos beneficiosos ocurren a concentraciones bajas/moderadas y juegan un papel de defensa del organismo frente a infecciones. Sin embargo, a concentraciones elevadas, pueden causar daño potencial a los sistemas biológicos (Valko *et al.*, 2007).

1.1.1 Especies Reactivas del Oxígeno

El oxígeno es una molécula esencial para la vida aeróbica, primordial para el metabolismo celular, la respiración y la obtención de la energía en las células por acción del metabolismo mitocondrial oxidativo de la glucosa. Este metabolismo es también un arma de doble filo, pues origina las ROS en el interior del organismo (Al-Gubory *et al.*, 2010; Halliwell and Whiteman, 2004).

Las ROS incluyen radicales de oxígeno (como por ejemplo el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo ($\bullet OH$), alcoxilo (RO^{\bullet}) y peróxilo (ROO^{\bullet}) y otros derivados del O_2 que no contienen electrones desapareados, como por ejemplo el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (O_2^1), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el ozono (O_3). Las ROS tienen la capacidad de atacar a varios componentes celulares produciendo daños que afectan directamente a la salud (Al-Gubory et al., 2010; Buonocore *et al.*, 2010; Halliwell, 2006).

1.1.2 Especies Reactivas del Nitrógeno

Las RNS incluyen derivados del radical óxido nítrico (NO^{\bullet}), como por ejemplo el dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}) y los no radicales del nitrógeno, como son el peroxinitrito ($ONOO^-$), el anión nitroxilo (NO^-), el catión nitrosilo (NO^+) y el ácido nitroso (HNO_2) (Halliwell and Whiteman, 2004).

1.2 Fuentes de radicales libres

En los sistemas biológicos los radicales libres se pueden clasificar según su procedencia en exógenos o endógenos. Los radicales libres exógenos son los que provienen de fuentes externas al organismo, causados por la luz ultravioleta, la contaminación del aire, el ozono y ciertos medicamentos. Los endógenos son los que se producen por el propio metabolismo celular (Halliwell and Whiteman, 2004).

1.2.1 Fuentes endógenas

Las principales fuentes endógenas de especies oxidantes y radicales libres en el organismo son:

- La respiración aeróbica mitocondrial: las mitocondrias consumen O_2 reduciéndolo en varias etapas a H_2O y produciendo como subproducto de esta respiración $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$ (Bereiter-Hahn, 2014; Valko *et al.*, 2007).

- Las células fagocíticas: los leucocitos neutrófilos, macrófagos y eosinófilos actúan mediante respuesta oxidativa al activarse por medio de proinflamatorios o de agentes bacterianos, víricos o parasitarios. Así, son productores directos de grandes cantidades de $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, NO^{\cdot} y OCl^{\cdot} . (Buonocore *et al.*, 2010; Forman and Torres, 2001).
- Los peroxisomas: producen H_2O_2 de forma natural como subproducto de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas (Khatua *et al.*, 2013).
- El metabolismo oxidativo de los xenobióticos: el complejo citocromo p451 es el responsable de eliminar productos tóxicos para el organismo. En este proceso se generan subproductos oxidantes (Buonocore *et al.*, 2010).

1.2.2 Fuentes exógenas

Las principales fuentes exógenas de especies oxidantes son:

- Los óxidos de nitrógeno producidos por la contaminación atmosférica y por el humo del tabaco (Poljšak and Fink, 2014).
- Las radiaciones ultravioleta, rayos X y gamma.
- El ozono, habitual y naturalmente presente en las capas más externas de la atmósfera terrestre. En ocasiones puede encontrarse en capas más bajas de forma natural o puede ser producido por fuentes antrópicas (Gutteridge and Halliwell, 2010; Poljšak and Fink, 2014).
- Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos (reacción de Fenton) (Al-Gubory *et al.*, 2010).
- Los alimentos que ingerimos que potencialmente pueden contener peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición.

2. Efecto de la oxidación

Las ROS y las RNS pueden reaccionar directamente con prácticamente todas las biomoléculas, como por ejemplo el DNA, RNA, proteínas, carbohidratos y lípidos, produciendo en todas alteraciones dañinas que las afectan en mayor o menor grado

ocasionando, incluso, reacciones de oxidación en cadena (Boots *et al.*, 2008; Goetz and Luch, 2008; Valko *et al.*, 2007).

2.1 La oxidación lipídica

Una de las principales dianas de las ROS y RNS son los ácidos grasos poliinsaturados presentes, por ejemplo, en todas las membranas celulares (Boots *et al.*, 2008). Ambas especies reactivas actúan sobre los ácidos grasos produciendo la oxidación lipídica o Peroxidación Lipídica (LPO). La LPO es una reacción en cadena (**Figura 2**) que se inicia normalmente con la sustracción de un átomo de hidrogeno del ácido graso diana convirtiéndose en un radical lipídico. Este nuevo radical se reorganiza molecularmente para incrementar su estabilidad y, al hacerlo, reacciona rápidamente con el oxígeno, creando un radical peroxilo (ROO[•]). Este radical peroxilo propagará la reacción y dará lugar a un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico por sustracción de un átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso y así, sucesivamente. La reacción en cadena finalizará cuando se cumpla alguna de las siguientes condiciones: (i) se consuma una de las moléculas reactivas (los ácidos grasos o el oxígeno), (ii) se forme un radical poco reactivo, (iii) reaccionen dos radicales y se forme un “no radical” (Boots *et al.*, 2008; Niki, 2009).

Además, esta reacción produce moléculas potencialmente tóxicas como el malondialdehído (MDA) y el oxisterol (Bañón *et al.*, 2007).

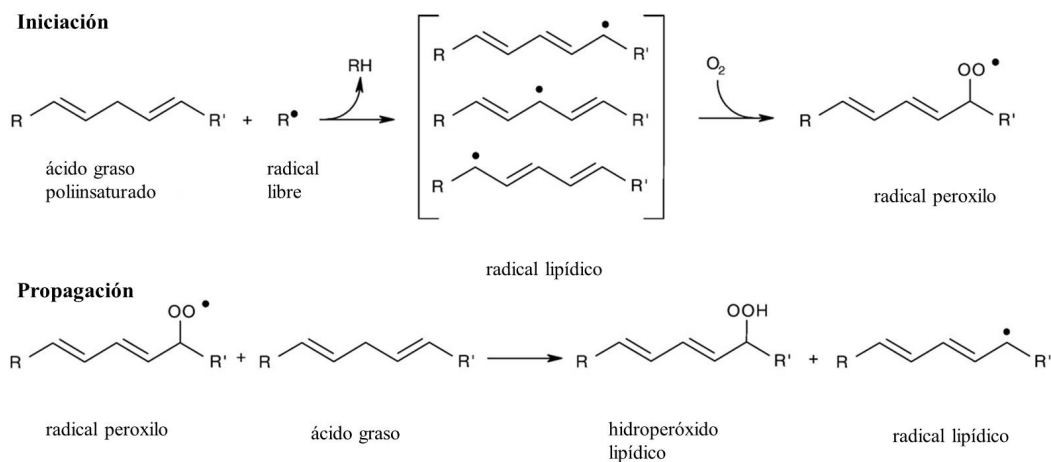


Figura 2: Proceso de oxidación lipídica iniciada por un radical R[•]. Modificada de Boots *et al.*, 2008.

2.2 Oxidación de proteínas

La capacidad de oxidación de las ROS abarca, también, la oxidación de aminoácidos proteicos, como la cisteína, la metionina, la histidina o el triptófano, produciendo la inhibición de enzimas. Como consecuencia de estas reacciones se forman ácidos sulfénicos, sulfínicos y sulfónicos así como, endoperóxidos que producen la degradación de las proteínas. También tienen efectos de desnaturalización, agregación y precipitación de proteínas; todo ello contribuye a la inflamación de tejidos y a la muerte celular (Goetz and Luch, 2008; Stadtman and Levine, 2003).

2.3 Oxidación de carbohidratos

Azúcares como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical OH[•] para producir sustancias reactivas. De igual forma, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, fragmentándose en unidades más pequeñas. Por ejemplo, se ha demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radical hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones (Devasagayam *et al.*, 2004; Morelli *et al.*, 2003).

2.4 Oxidación del material genético

Las especies reactivas, en especial las ROS, también pueden atacar a los ácidos nucleicos afectando a las bases nitrogenadas y azúcares que conforman el DNA. Sus efectos producen aberraciones genéticas que causan la malformación de proteínas y otros componentes celulares. Incluso pueden provocar la muerte celular o lo que es peor, mutaciones que son transmitidas a la siguiente generación de células (Boots *et al.*, 2008).

La mutación en el DNA se considera un factor crucial en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. En muchos tumores se han descrito numerosas mutaciones genéticas ligadas a la oxidación (Loft *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2014).

A su vez, el estrés oxidativo está ligado a la expresión genética y a respuestas celulares diversas detectadas en todos los organismos vivos, desde bacterias a animales complejos (Crawford *et al.*, 2002; Leopoldini *et al.*, 2011).

3. Los compuestos antioxidantes

3.1 Definición y características principales

Un antioxidante es una sustancia que, a concentración baja, en comparación con el sustrato oxidable, previene o retrasa significativamente una reacción de oxidación ya iniciada, promovida por un agente oxidante (Prior, 1999; Wiseman and Halliwell, 1996).

Pro-oxidante es un sinónimo de especie reactiva. Así, químicamente, un pro-oxidante es un oxidante que produce un efecto patológico importante. Un antioxidante puede reducir eficazmente la acción de un pro-oxidante formando productos sin (o de baja) toxicidad (Prior, 1999). Un antioxidante siempre tiene carácter reductor pero un reductor no es necesariamente un antioxidante.

Por tanto, es posible definir a los antioxidantes como un grupo de moléculas reconocidas por su capacidad para neutralizar los efectos negativos de los radicales libres y el estrés oxidativo (Pinchuk *et al.*, 2012). Pueden ser productos muy diferentes entre sí, en cuanto a origen, estructura química y modo de acción, pero tienen en común su capacidad de inhibir o frenar los mecanismos implicados en la oxidación (Niki, 2010).

En el código alimentario los antioxidantes están descritos como aquellas sustancias que, por separado o mezcladas entre sí, pueden utilizarse para impedir o retardar la oxidación catalítica y los procesos que elevan o causan enranciamiento natural provocados por la acción del aire o la luz, en los alimentos y bebidas (Cubero *et al.*, 2002).

3.2 Efectos de los antioxidantes en la salud

El estudio de los efectos de los antioxidantes en la salud humana ha sido, y es aún, uno de los temas de estudio más recurrentes en la literatura. Muchos autores han descrito los efectos beneficiosos de los antioxidantes, contenidos en gran diversidad de plantas y productos naturales, en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson (Albarracin *et al.*, 2012; Almajano *et al.*, 2011; Dimitrios, 2006; Pacifico *et al.*, 2012) e incluso se ha estudiado su uso como paliativo del cáncer (Du *et al.*, 2012; Loft *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). En la **Tabla 1** se muestra con detalle la relación entre algunas fuentes vegetales con actividad antioxidante y su efecto sobre la salud. Estos efectos se basan en la capacidad de los antioxidantes de paliar y reducir el efecto de las especies reactivas (Cheng *et al.*, 2013).

Tabla 1: Ejemplos de algunos estudios de evaluación de la actividad de los antioxidantes sobre la salud.

Actividad	Planta/Compuesto testado	Referencia
Protección al DNA	Té blanco	Sharangi, (2009)
	Miel	Habib, (2014)
	Eugenol y borneol procedentes de varias de plantas	Slameňová, <i>et al.</i> , (2009)
	Espino chino(<i>Crataegus pinnatifida</i>)	Cheng <i>et al.</i> , (2013)
Protección a la degeneración neuronal	Té blanco	Almajano, <i>et al.</i> , (2011)
	Pimentero chino (<i>Zanthoxylum piperitum</i>)	Jeong <i>et al.</i> , (2011)
	Varias plantas australianas	Steele <i>et al.</i> , (2013)
	Té verde	Andrade and Assunção, (2012)
	Varias plantas	Essa <i>et al.</i> , (2012)
Efecto antiinflamatorio	Té blanco, Rosa	Thring, <i>et al.</i> , (2011)
	Piel de cacahuete	Yu <i>et al.</i> , (2005)
Protección frente infecciones urinarias (cistitis)	Membrillo	Pacifico <i>et al.</i> , (2012)
	Vitamina C e histidina	Farshid, <i>et al.</i> , (2013)
	Galato de epigallocatequina	Liu <i>et al.</i> ,(2013)
	Flavonoides	Ozcan <i>et al.</i> , (2005)
Diabetes	Quercitina, curcumina, teaflavina, Vitaminas C, E, β -caroteno	Marrazzo <i>et al.</i> , (2014)
	Ácido Gálico	Jayamani and Shanmugam, (2014)
Hipertensión	Zanahoria, té y otras plantas	Baradaran, <i>et al.</i> , (2014)
Afecciones pulmonares	Zanahoria, té, soja y otros vegetales alimentarios	Baradaran <i>et al.</i> , (2014)
	Antioxidantes para inhibir los efectos de polución ambiental	Poljšak and Fink, (2014)
Cáncer	Membrillo	Pacifico <i>et al.</i> , (2012)
	Fresones	Zhang <i>et al.</i> , (2008)
	Té blanco	Yen <i>et al.</i> , (2013)
	Semillas de limón (<i>citrus limon</i>)	Kim <i>et al.</i> , (2012b)
	Ácido ascórbico	Du <i>et al.</i> , (2012)
	<i>Melissa officinalis</i>	Encalada <i>et al.</i> ,(2011)

3.3 Actividad antimicrobiana

Numerosos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de los compuestos con capacidad antioxidante. Su actividad se ha demostrado *versus* un gran número de microorganismos como son bacterias, hongos y levaduras (Almajano *et al.*, 2008; Calatayud *et al.*, 2013; Fernández-López *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2013; Viuda-Martos *et al.*, 2008a, 2008b; Weerakkody *et al.*, 2010). Además también se ha relacionado la actividad de ciertos compuestos antioxidantes (como la quercitina y la hesperidina) con la inhibición de la capacidad infectiva y de replicación de virus como el virus del herpes simple, poliovirus o virus parinfluenza (Tripoli *et al.*, 2007). Otros estudios similares realizados con aceites esenciales demostraron ser eficaces en la inhibición de la replicación del virus del herpes (Minami *et al.*, 2003). En la **Tabla 2** se recopilan sin ánimo de ser exhaustivos sino a título de ejemplo algunos efectos antimicrobianos que producen extractos y aceites esenciales con poder antioxidante.

Tabla 2: Ejemplos de efecto antimicrobiano de algunas plantas/productos sobre varios grupos de bacterias y hongos.

Microorganismo	Planta/ Producto antimicrobiano	Referencia
Bacterias		
Gram positivas		
<i>Micrococcus luteus</i>	Varias variedades de té	Almajano <i>et al.</i> , (2007)
<i>Bacillus cereus</i>	Té, romero, mate	Oh <i>et al.</i> , (2013)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cacao	Calatayud <i>et al.</i> , (2013)
	Semillas de zanahoria, limón, cebolla, ajo, orégano	Teixeira <i>et al.</i> , (2013)
	Eucalipto, menta, pimienta negra, orégano	Weerakkody <i>et al.</i> , (2010)
Gram negativas		
<i>Escherichia coli</i>	Varias especies de cardo	Kenny <i>et al.</i> , (2014)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cebolla	Santas <i>et al.</i> , (2010a)
<i>Listeria monocytogenes</i>		

Tabla 2: Continuación.

Microorganismo	Planta/ Producto antimicrobiano	Referencia
Hongos		
<i>Candida albicans</i>	Varias variedades de té	Almajano <i>et al.</i> , (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aceites esenciales de cítricos	Belleti <i>et al.</i> , (2004)
<i>Aspergillus flavus</i>	Limón, naranja, pomelo, mandarina	Viuda-Martos <i>et al.</i> , (2008b)
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Penicillium chrysogenum</i>		
<i>Penicillium verrucosum</i>		

4. Principales compuestos antioxidantes

Los compuestos antioxidantes tienen diversos criterios de clasificación. Por ejemplo, según su obtención se clasifican en: 1) sintéticos, obtenidos mediante síntesis química, o 2) naturales, de extracción de fuentes naturales. Entre las sustancias antioxidantes sintéticas se distinguen los análogos a compuestos que se encuentran en la naturaleza como son el ácido cítrico, el ácido ascórbico, los tocoferoles o los carotenoides, que, a pesar de ser sintetizados químicamente, reciben el apelativo de “antioxidante natural” (Carocho *et al.*, 2014).

4.1 Compuestos antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son aplicados con asiduidad a productos farmacéuticos, cosméticos y alimentarios. Los más ampliamente usados son el Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Terbutilhidroquinona (TBHQ) y Galato de Propilo (PG). Todos ellos deben seguir las llamadas buenas prácticas de fabricación “*good manufacturing practices*” que certifican que su fabricación se hace bajo condiciones controladas y sigue normas de calidad que permiten obtener un producto uniforme (Dolatabadi and Kashanian, 2010). Además, todos los antioxidantes sintéticos usados en la industria alimentaria tienen que ser reconocidos por la Unión Europea (UE) cómo

aditivos seguros. La UE les asigna un número para reconocerlos: el *E-number* (Carocho *et al.*, 2014). En el Apartado siete de éste Capítulo se profundiza más en los aspectos legales y aplicaciones de los antioxidantes de ámbito alimentario.

4.1.1 Butilhidroxianisol (BHA)

El BHA está reconocido por la UE como E-320. Se comercializa como mezcla de dos isómeros (**Figura 3A y 3B**) *2-terc*-butil-4-hidroxianisol (2-BHA) y *3-terc*-butil-4-hidroxianisol (3-BHA) (EFSA, 2011). Es soluble en grasas, aceites, alcoholes y en éter pero insoluble en agua (Emerton and Choi, 2008).

Es muy estable en condiciones alcalinas y es resistente al calor, características que lo hace apropiado para su uso en bollería, en productos fritos y en cualquier producto cocinado. También es apropiado como aditivo en cereales secos, productos derivados de las patatas, postres y bebidas (Dolatabadi and Kashanian, 2010).

El BHA se usa desde los años 70, aunque ha despertado (y despierta) cierta inseguridad y controversia en lo que se refiere a sus efectos sobre la salud (Carocho *et al.*, 2014). Algunos autores (Booterweck *et al.*, 2000; Dolatabadi and Kashanian, 2010; Moure *et al.*, 2001) han descrito al BHA como promotor e iniciador de tumores en algunos tejidos animales (tejidos estomacales) mientras que otros autores han demostrado sus efectos anticancerígenos (Carocho *et al.*, 2014).

Su uso como aditivo está siendo revisado por la EFSA (2011-2016), Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, (EFSA, 2011). Hasta el momento se concluye que los efectos en tejidos estomacales no deben de ser considerados como riesgo para la salud humana. Se ha establecido una Dosis de Ingesta Diaria Aceptada (ADI) menor de 1 mg/kg de peso corporal, y se considera adecuada una ingesta diaria inferior a 0,5 mg/kg de peso corporal.

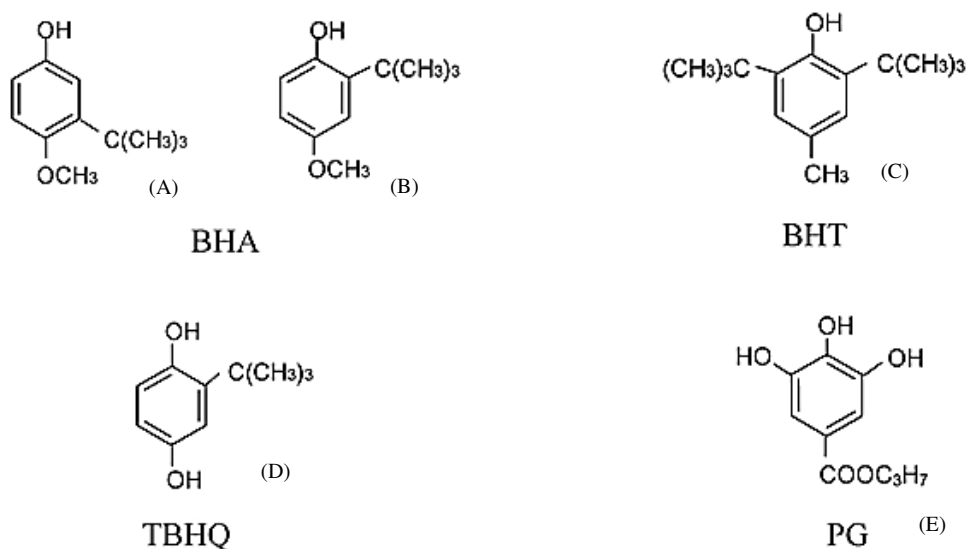


Figura 3: Estructura molecular de los principales antioxidantes sintéticos usados en la industria alimentaria. (A) BHA en su isómeros 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol (B) BHA en su isómero 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol, (C); BHT; (D): TBHQ y (E): PG. Extraído de EFSA, 2004; EFSA, 2011, EFSA 2012b y EFSA 2014.

4.1.2 Butilhidroxitolueno (BHT)

El BHT (**Figura 3C**) reconocido como E-321, es un antioxidante muy similar al BHA en la mayoría de sus propiedades, aunque su efectividad es inferior. Es altamente soluble en grasas y aceites e insoluble en agua. Presenta una volatilidad superior al BHA, con lo que su uso no es tan recomendado en productos alimentarios procesados con calor. Se le reconoce función sinérgica con el BHA, TBHQ y ácido cítrico (EFSA, 2012b). Su ADI es de 0,05 mg/kg de peso corporal en adultos (EFSA, 2012b). Sus efectos sobre la salud, al igual que sucede con el BHA, están aún en discusión; mientras algunos autores afirman sus efectos tóxicos, otros respaldan su uso seguro para la salud (Carocho *et al.*, 2014; Carocho and Ferreira 2013).

4.1.3 Terbutilhidroxiquinona (TBHQ)

El TBHQ, reconocido en la UE como E-319, es un fenol aromático orgánico derivado de la hidroquinona (**Figura 3D**). Es soluble en etanol pero insoluble en agua. Es muy efectivo en la estabilización de aceites altamente insaturados y en la mayoría de grasas

procedentes de animales comestibles. Su adición no causa efectos en el olor ni en el sabor de los productos en los que se aplica, incluso en presencia de hierro (Dolatabadi and Kashanian, 2010). Es estable a altas temperaturas y su volatilidad es menor que la del BHT y BHA. Se le reconoce actividad sinérgica con otros antioxidantes como el BHT, BHA, tocoferoles y ácido cítrico. Su ADI se sitúa en 0,7 mg/kg de peso corporal (Carocho *et al.*, 2014; EFSA 2012b).

4.1.4 Galato de Propilo (PG)

E-310 en la lista de aditivos de la UE (**Figura 3E**). Es uno de los tres galatos que se producen comercialmente (Dolatabadi and Kashanian, 2010). Muy usado en productos cárnicos, a menudo aplicado junto al ácido cítrico ya que el PG suele tener tendencia a crear complejos con sales de hierro que producen el oscurecimiento del alimento. También presenta sinergias con el BHT y el BHA (Dolatabadi and Kashanian, 2010). Desde su descubrimiento en 1948 su uso ha sido controvertido. Por un lado algunos autores han descrito efectos beneficiosos del PG, como por ejemplo, capacidad neuroprotectora y citotóxica contra células cancerígenas. Sin embargo, por otro lado, se ha descrito que es precursor de dermatitis o inductor de mutagénesis entre otros efectos negativos (Carocho *et al.*, 2014; EFSA, 2014).

4.2 Compuestos antioxidantes naturales

Los antioxidantes naturales gozan de una elevada aceptación por parte de los consumidores, contrariamente a la percepción negativa (como tóxicos o perjudiciales) a la que se enfrentan los antioxidantes químicos o sintéticos (Bearth *et al.*, 2014; Dickson-Spillmann *et al.*, 2011). Esta percepción (junto con la confusión por parte de los consumidores sobre las diferencias entre aditivo y condimento y la desinformación sobre los riesgos reales del consumo de estos antioxidantes sintéticos, entre otros factores), lleva a los consumidores a buscar alimentos biológicos y a elegir productos llamados “naturales” (Bearth *et al.*, 2014; Shim *et al.*, 2011; Siró *et al.*, 2008). Esta demanda ha empujado al uso y a la búsqueda de nuevos compuestos naturales, con

capacidad antioxidante demostrada, que sustituyan (o al menos reduzcan) el uso de los antioxidantes sintéticos (Ayala-Zavala *et al.*, 2011; Gil-Chávez *et al.*, 2013; Segovia *et al.*, 2014b; Skowrya *et al.*, 2014b).

Los nuevos compuestos antioxidantes hallados deben también ser testados toxicológicamente antes de ser considerados aptos para el consumo, ya que el hecho de ser naturales no lleva implícita su seguridad (Carocho *et al.*, 2014; EFSA, 2012a).

Los antioxidantes naturales más estudiados son los procedentes de las plantas superiores. La mayoría de ellos son compuestos fenólicos, productos del metabolismo secundario. Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo, y éstos desempeñan diversas funciones fisiológicas (Rusak *et al.*, 2008) y contribuyen a las características organolépticas de los alimentos de origen vegetal, intervienen en el color natural y en el sabor (Balasundram *et al.*, 2006; McClements *et al.*, 2009; Silva-Weiss *et al.*, 2013).

4.2.1 Los polifenoles

El término polifenoles engloba aproximadamente 8000 estructuras moleculares distintas (Tsao, 2010). Estos compuestos mueven una gran cantidad de dinero; el mercado mundial de polifenoles se estima en cientos o incluso miles de millones de dólares y la mayoría de ellos son extraídos para su uso como nutracéuticos o como alimento funcional (Wijngaard and Brunton, 2010). Según su estructura química es posible clasificarlos en varios subgrupos:

4.2.1.1 Ácidos fenólicos simples

Los ácidos fenólicos más abundantes en la naturaleza son derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico. Se encuentran sobretodo en frutos y semillas (Tsao, 2010) y su actividad antioxidante se basa en su capacidad reductora.

4.2.1.2 Flavonoides

Los flavonoides son la subclase de polifenoles más abundante. Presentan gran número de propiedades biológicas y son, sin duda, el grupo de polifenoles más estudiado

(Heim, *et al.*, 2002). En muchas ocasiones son responsables del crecimiento de las plantas y pueden exhibir determinadas interacciones con otros organismos vivos. Entre otras funciones son responsables de la pigmentación de los pétalos en las flores de tonos amarillos, rojos y naranjas, atrayendo así a los agentes polinizadores. También tienen la capacidad de proteger a las plantas del daño provocado por los rayos UV y del ataque de ciertos insectos y patógenos (Yan *et al.*, 2005). Los flavonoides se subdividen en cuatro subgrupos:

i. Isoflavonas, neoflavonoides y chalconas

Las isoflavonas se encuentran sobre todo en las plantas de la familia de las leguminosas como las judías o la soja. Los neoflavonoides no se suelen encontrar en las plantas comestibles pero están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Las chalconas de anillo abierto se encuentran en muchas frutas como las manzanas y también en el lúpulo y en la cerveza (Tsao, 2010).

ii. Flavonas, flavonoles, flavanonas y flavanoles

Este subgrupo es el más abundante y uno de los más ubicuos en el reino vegetal (Tsao, 2010). Estos compuestos tienen un alto poder antioxidante y algunos de los alimentos que los contienen, se comercializan como productos nutracéuticos. A este grupo pertenecen polifenoles como la hesperidina y eriocitrina, presentes en los cítricos (Coll *et al.*, 1998).

iii. Flavanoles y proantocianidinas

Los flavanoles o flavan 3-ols son comúnmente denominados catequinas. La catequina es el isómero *trans* de la molécula; el isómero *cis* se denomina epicatequina. Cada una de las dos configuraciones tiene dos esteroisómeros, esto es, (+)-catequina, (-)-catequina, (+)-epicatequina y (-)-epicatequina. En los vegetales comestibles se encuentran más comúnmente la (+)-catequina y la (-)-epicatequina (Tsao, 2010). Los flavanoles monoméricos y sus derivados (como por ejemplo galocatequinas) son los principales compuestos activos de plantas como el té (Azman, *et al.*, 2014) o el cacao (Pina-Pérez *et al.*, 2013).

iv. Antocianidinas

Conforman los principales componentes de los pigmentos rojos, lilas y azules de la mayoría de pétalos de flores, frutas y vegetales así como de ciertas especies de grano (como es el arroz negro) (Anderson and Jordheim, 2006). Existen más de 500 antocianidinas distintas. Como característica, cabe destacar que la pigmentación de éstas es pH-dependiente; así, en condiciones ácidas son rojas, mientras que en condiciones básicas son azules. Además, hay otros factores que influyen en el color de la molécula, como la metilación o la hidroxilación de los anillos aromáticos. Las antocianinas son químicamente estables en soluciones ácidas. Algunos ejemplos de este subgrupo son la cianidina o la malvidina (Tsao, 2010).

4.2.1.3 Amidas polifenólicas

Se encuentran fácilmente en muchos alimentos y proporcionan características organolépticas como, por ejemplo, el sabor picante (Davis *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, la capsaicina es la responsable del efecto picante de los “pimientos picantes” y está descrita como antiinflamatoria y moduladora del sistema inmune. También encontramos amidas polifenólicas en la avena con elevado poder de inhibir la oxidación de grasas (Tsao, 2010; Bratt *et al.*, 2003).

4.2.1.4 Otros polifenoles

Además de los citados, existen otros polifenoles no flavonoides. Entre éstos cabe destacar el resveratrol, presente en uva y vino tinto, (Chen *et al.*, 2012); el ácido elágico y sus derivados, presentes en frutos del bosque como las fresas y frambuesas (Zhang *et al.*, 2008); y el ácido rosmarínico (Segovia *et al.*, 2014a) presente en la borraja.

4.2.2 Otros compuestos antioxidantes

Existen otros compuestos con capacidad antioxidante que no tienen naturaleza polifenólica. A continuación se detallan las características de los considerados más relevantes.

4.2.2.1 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico, (conocido como vitamina C) es reconocido por la EFSA con el E-number 300 (E-300) (Carocho *et al.*, 2014; EFSA, 2013a). Es una molécula hidrosoluble con dos grupos hidroxilos ionizables, lo que propicia que sea un agente reductor excelente y, por tanto, también un excelente antioxidante. El ácido ascórbico puro es un polvo blanco, incoloro en solución, sus productos de oxidación, dan un color amarillo. La vitamina C es muy estable en polvo e inestable en solución. Muchos autores han puesto de manifiesto su poder antioxidante y han probado su efectividad sobre la salud y como aditivo en alimentos frescos, como por ejemplo, en carnes (Du *et al.*, 2012; Martí *et al.*, 2009; Mitsumoto *et al.*, 2005; Odriozola-Serrano *et al.*, 2008). Además también se le ha reconocido como potencial regenerador de otras moléculas antioxidantes como la vitamina E, el glutatión y el β -caroteno (Traber and Stevens, 2011). Se encuentra, sobre todo, en frutas, especialmente cítricos y también el kiwi. A pesar de su gran abundancia en la naturaleza, comercialmente se obtiene por síntesis química (EFSA 2013a).

4.2.2.2 α -Tocoferol

Al α -Tocoferol (vitamina E) la UE le ha asignado el E-307 (Descalzo and Sancho, 2008). Es un compuesto liposoluble y con gran actividad de protección frente a la oxidación de ácidos grasos (Kasapidou *et al.*, 2012).

Se han elaborado diversos estudios sobre su actividad antioxidante en carnes, emulsiones, envases activos y otros productos (Kim *et al.*, 2012a; Tang, *et al.*, 2001; Yang and McClements, 2013). Una de las relaciones sinérgicas descritas con más poder antioxidante es la de la vitamina E con la vitamina C (Niki, 2010).

4.2.2.3 Ácido Cítrico

El ácido cítrico, E-330 (EFSA, 2013b), está presente en muchas frutas como las naranjas, limones y otros cítricos (Ortuño *et al.*, 2004; Zulueta *et al.*, 2007). Es una molécula hidrosoluble, con elevada capacidad antiradicalaria y con capacidad de reducción enzimática debido a la donación directa de electrones de sus grupos hidroxilo.

4.2.2.4 Carotenoides

Son compuestos liposolubles que basan su capacidad antioxidante en ser buenos donadores de electrones (Ayala-Zavala *et al.*, 2011). Los carotenoides con más actividad antioxidante son: β -caroteno, luteína, α -caroteno, zeaxantina, criptoxantina y licopeno. Los carotenoides se encuentran en frutas como el aguacate y el mango (Ayala-Zavala *et al.*, 2011; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2012) e incluso en algas (Del Campo *et al.*, 2000).

4.2.2.5 Péptidos proteicos

Las proteínas, los hidrolizados de proteínas y las fracciones proteicas solubles son compuestos alternativos a los polifenoles con actividad antioxidante (Sarmadi and Ismail, 2010).

También se han identificado algunos péptidos con actividad antimicrobiana (Maragkoudakis *et al.*, 2009). Por ejemplo, las bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico tienen múltiples usos en la industria alimentaria (Cleveland *et al.*, 2001; Khan, et al., 2010; Ohmomo *et al.*, 2000). Una de las bacteriocinas más usadas es la nisina, E-234, cuya aplicación ha sido estudiada en carnes y también en envases activos y coberturas (Lee, 2010; Nattress *et al.*, 2001; Theivendran *et al.*, 2006).

4.2.3 Bacterias con capacidad antioxidante

Estudios recientes *in vitro* (Kuda *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2011; Pieniz *et al.*, 2014) demuestran que ciertas bacterias probióticas (algunas especies de *Lactobacillus* y *Enterococcus*) son capaces de actuar como antioxidantes naturales después de ser ingeridas. Es decir, ellas mismas son los agentes antioxidantes. Los estudios revelan que este efecto antioxidante se debe a los exopolisacáridos que producen en su pared. Por ello, estas bacterias se puede aplicar clínicamente para luchar contra enfermedades como la colitis ulcerosa o el síndrome del intestino inflamable (Martín *et al.*, 2013; Spyropoulos *et al.*, 2011).

5. Fuentes de antioxidantes naturales

Los compuestos antioxidantes naturales pueden ser obtenidos a partir de plantas superiores (Balasundram *et al.*, 2006), mohos (Khatua *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014; Woldegiorgis *et al.*, 2014), musgos (Pejin *et al.*, 2013), algas (García-Casal *et al.*, 2009; Jard *et al.*, 2013; Plaza *et al.*, 2010b), microalgas (Pouvreau *et al.*, 2008; Shanab *et al.*, 2012) e incluso bacterias (Kuda *et al.*, 2014).

Todos ellos deben superar una serie de pruebas, antes de ser legalmente aceptados, que corroboren su seguridad para la salud humana, tanto si son de nuevo descubrimiento como de nueva aplicación (Carocho *et al.*, 2014; EFSA, 2012a).

Una de las formas de garantizar la seguridad en los productos usados como fuente de antioxidantes es utilizar productos agroalimentarios (ya aptos para el consumo) o, incluso subproductos o residuos derivados de estos productos alimentarios, económicamente más rentables (Dimitrios, 2006; Fernández-López *et al.*, 2005; Lafka *et al.*, 2007; McCarthy 2001a). De igual forma, estos productos no están exentos de pasar las pruebas de seguridad antes mencionadas.

5.1 Los productos agroalimentarios

Los productos agroalimentarios, además de ser fuente de nutrientes y de aporte energético, también pueden ser usados como fuente segura de compuestos bioactivos (Ayala-Zavala *et al.*, 2011; Perumalla and Hettiarachchy, 2011).

Muchos de ellos se consideran favorables para la salud humana por sus beneficios ampliamente testados (Moderno *et al.*, 2009); otros se comercializan concentrados como productos nutracéuticos (Gil-Chávez *et al.*, 2013; Hayes *et al.*, 2011) o pueden ser la materia prima usada para la extracción de compuestos de interés, como son los polifenoles (Gil-Chávez *et al.*, 2013; Wijngaard *et al.*, 2012).

Los productos agroalimentarios con alto poder antioxidante engloban, por un lado, los productos obtenidos directamente y sus subproductos, obtenidos después de un

procesado (como son los zumos); y por otro, los residuos que se generan en la etapa de producción (pieles, semillas, etc.) que, en ciertos casos pueden potencialmente ser reutilizados como fuente de antioxidantes (Coll *et al.*, 1998; Hellín *et al.*, 2003; Malacrida *et al.*, 2012; Moure *et al.*, 2001; Ranalli *et al.*, 2003; Segovia *et al.*, 2014a).

5.1.1 Productos agroalimentarios de alto poder antioxidante

Algunos de los productos alimentarios con más potencial antioxidante son productos hortícolas como uva, manzana, cítricos, cebolla o borraja (Álvarez *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2011; Hellín *et al.*, 2003; Misharina *et al.*, 2011; Santas *et al.*, 2010b; Segovia *et al.*, 2014a). También se pueden obtener de otras plantas aromáticas (Djenane *et al.*, 2012; Gallego *et al.*, 2013) o, incluso, del té (Row and Jin, 2006; Rusaczonk *et al.*, 2010).

5.1.2 El té blanco

La infusión con té (*Camellia sinensis* (L.)) es, después del agua, la bebida más consumida del mundo (Komes *et al.*, 2011; Venditti *et al.*, 2010). Según su origen, variedad botánica, condiciones ambientales y proceso de elaboración, podemos distinguir varios tipos de té con diferentes propiedades antioxidantes.

Algunos estudios (Moderno *et al.*, 2009; Unachukwu *et al.*, 2010) apoyan que el procesado del té es la característica más influyente en estas propiedades antioxidantes. Así, según su procesado, podemos clasificar las variedades de té en: no fermentados (té verde y blanco); parcialmente fermentados (té oolong); y completamente fermentados (té negro) (Moderno *et al.*, 2009; Rusak *et al.*, 2008; Sharangi, 2009).

Por ello, el té blanco y el té verde son las dos clases de té con más propiedades antioxidantes, siendo el blanco el de más interés por ser el que tiene un sabor más suave y apreciado en occidente y por ser a su vez el menos estudiado.

5.1.2.1 Descripción

El té blanco, principalmente *Camellia sinensis* var. *sinensis*, es considerado por algunos autores, el té más antioxidante del mundo (Cabrera *et al.*, 2006; Karori *et al.*, 2007;

Venditti *et al.*, 2010) y a su vez es el menos estudiado, hasta el momento, de todas las variedades de té existentes (O'Grady *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2002). Su capacidad antioxidante ha sido demostrada por todo tipo de técnicas, incluso con Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) (Azman *et al.*, 2014).

Se obtiene de las hojas y brotes jóvenes aún no completamente abiertos de la planta del té (Almajano *et al.*, 2011; Hilal and Engelhardt, 2007; Müller *et al.*, 2010). Se recolecta solamente una vez al año, al inicio de la primavera y se somete a un proceso de secado al aire inmediatamente después de su recolección (Rusak *et al.*, 2008); esto le hace ser uno de los tés más caros y más exclusivos de los existentes, cultivado mayoritariamente- en China y muy apreciado por su suave aroma y delicado sabor (Friedman *et al.*, 2005; Moderno *et al.*, 2009).

5.1.2.2 Composición

Se ha demostrado que su composición en flavonoides puede superar el 30% de su peso seco, siendo los compuestos antioxidantes mayoritarios, la familia de los favan-3-oles (catequinas y derivados). El polifenol más abundante y el más activo es la (-)-galato de epigalocatequina. Además también están presentes otros derivados de la catequina como la (-)-epicatequina-3-galato, la (-)-epigalocatequina, la (-)-epicatequina, la (+)-catequina, (+)-galocatequina y 3-galato-galocatequina (Moderno *et al.*, 2009; Unachukwu *et al.*, 2010).

5.1.2.3 Aplicaciones descritas

Muchos de los trabajos existentes (Jo *et al.*, 2003; López de Dicastillo, *et al.*, 2013; Perumalla and Hettiarachchy, 2011), se centran en las aplicaciones del té verde. A pesar de esto, recientemente se han publicado varios trabajos sobre las características y aplicaciones de uso del té blanco. Se recogen algunos ejemplos en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Resumen de algunas de las aplicaciones descritas del té blanco.

Actividad	Aplicación	Referencia
Antioxidante y antimicrobiana	Múltiples aplicaciones	Almajano <i>et al.</i> , (2008)
Protección celular al daño oxidativo	Prevención de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson	Almajano <i>et al.</i> , (2011) López and Calvo, (2011)
Protección frente a daños causados por la radiación ultravioleta en piel humana	Aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos	Camouse <i>et al.</i> , (2009)
Antiinflamatoria	Industria farmacéutica	Thring <i>et al.</i> , (2011)
Paliativo de diabetes	Industria farmacéutica	Islam, (2011)
Mejora la movilidad del esperma	Servicios de reproducción asistida y salud huma	Dias <i>et al.</i> , (2014)

5.2 Los residuos agroalimentarios

Según el Real Decreto 10/1998 (BOE, 1998), se entiende como residuo: “cualquier producto en estado sólido, líquido o gaseoso procedente de un proceso de extracción, transformación o utilización, que, carente de valor para su propietario, éste decide abandonar”.

Sin embargo, muchos de los considerados residuos agroalimentarios, podrían ser aprovechados para la extracción de compuestos bioactivos de interés. Esto implica re-usar un producto de desecho, dándole un valor económico.

5.2.1 La reutilización de residuos agroalimentarios

Desde un punto de vista económico, de sostenibilidad y respetuoso con el medio ambiente, es mucho más interesante usar residuos agroalimentarios como fuente de compuestos antioxidantes que extraerlos de productos agroalimentarios, otras plantas o algas, que tienen que ser cultivados o recolectados especialmente para este fin. Es más,

actualmente, existe gran preocupación por dar un valor añadido a los residuos agroalimentarios, pues la gestión de éstos supone un gasto importante para las empresas productoras (Ćetković *et al.*, 2012; Fava *et al.*, 2013).

Algunos estudios proponen también usar estos residuos para la producción de bioetanol (Boluda-Aguilar and López-Gómez, 2013); como sustrato para crecimiento microbiano (Di Donato *et al.*, 2011); o simplemente alimento para ganado (Fava *et al.*, 2013; Mahro and Timm, 2007).

5.2.2 El residuo del limón

El limón (*Citrus limon* (L.)) es uno de los cultivos de árboles frutales más importantes del mundo. Existen diversas variedades que producen su fruto en distintas estaciones del año. Las más comunes son “Primofiori”, “Verna”, “Lisbon”, “Eureka” y “Fino” (Gonzalez-Molina *et al.*, 2010; González-Molina *et al.*, 2009; Ortuño *et al.*, 2004).

La producción mundial anual de limones está estimada en unos 4,2 millones de toneladas en 2010; aproximadamente la mitad de esta producción es destinada a la industria de los zumos, aceites esenciales y otros subproductos (González-Molina *et al.*, 2010). Esto genera gran cantidad de residuos o biomaterial no aprovechado (Ćetković *et al.*, 2012). Debido a la alta concentración de compuestos antioxidantes del limón (Ortuño *et al.*, 2004), una buena alternativa de reutilización, es la de extraer del residuo polifenoles, siendo posible, *a posteriori*, la reutilización como fuente de biomasa o cualquier otra reutilización de las descritas, siempre que ésta esté realizada mediante una tecnología limpia y sin solventes contaminantes.

5.2.2.2 Composición

El residuo de limón está formado por semillas, pulpa y piel. La piel consta de varias capas diferenciadas, el albedo y flavelo (Ortuño *et al.*, 2004). Este residuo contiene todavía muchos nutrientes y compuestos activos. Efectivamente, varios autores (Bocco *et al.*, 1998; Tripoli *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008) han descrito la capacidad antioxidante de semillas, piel y pulpa de limón y de otros cítricos.

El limón contiene varios compuestos naturales de interés, entre los que destacan los compuestos polifenólicos (mayormente flavonoides) y otros nutrientes minoritarios (vitaminas, minerales, fibra alimentaria, aceites esenciales, carotenoides y ácidos orgánicos) (González-Molina *et al.*, 2010). Las flavononas suponen el 90% de los polifenoles contenidos en el limón. Su composición varía en función de la parte del fruto estudiada y se consideran mayoritarias, en el conjunto del fruto, la eriocitrina y la hesperidina (Coll *et al.*, 1998; Fernández-López *et al.*, 2004, Gironés-Vilaplana *et al.*, 2012). Además, cabe destacar su alto contenido en vitaminas (especialmente en vitamina C), ácido cítrico y pectina; esta última contenida principalmente en el albedo, la parte más fibrosa de la piel (González-Molina *et al.*, 2010).

5.2.2.3 Aplicaciones descritas

Se han descrito múltiples aplicaciones para el limón (y/o para su residuo, que incluye la piel y la pulpa y las semillas) y los compuestos contenidos en él. De entre todas la aplicaciones, la más usada es la de antioxidante alimentario (EFSA, 2013a, 2013b; González-Molina *et al.*, 2009) debido a que el ácido cítrico y el ácido ascórbico se reconocen como seguros. En la **Tabla 4** se recogen varios estudios que demuestran la actividad antibacteriana, antiinflamatoria y anticancerígena del residuo del limón.

Tabla 4: Resumen de algunas de las aplicaciones descritas del limón y su residuo.

Actividad	Aplicación	Referencia
Inhibición de células cancerígenas	Industria farmacéutica	Kim <i>et al.</i> , (2012b)
Antiinflamatoria	Industria farmacéutica	Wang <i>et al.</i> , (2008) Ortuño <i>et al.</i> , (2004)
Antioxidante	Industria alimentaria, cosmética	Marin <i>et al.</i> , (2002)
Antimicrobiana	Múltiples usos	Miyake and Hiramitsu., (2011) Viuda-Martos <i>et al.</i> , (2008a)

6. Tecnologías para la extracción de compuestos antioxidantes

Tradicionalmente, la extracción de polifenoles y de otros compuestos de interés, se fundamentaba solamente en la extracción con diferentes solventes. Los solventes usados mayoritariamente eran hexano, éter, cloroformo, acetonitrilo, benceno y etanol. Todos ellos, a excepción del etanol, son tóxicos para los humanos y peligrosos para el medioambiente. Hoy día se sigue usando la extracción con solventes pero se intenta, cada vez más, usar otros sistemas de extracción y/o fomentar el uso de solventes de grado alimentarios reconocidos como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

Algunos de los métodos de extracción más populares en los últimos tiempos son la extracción por presión (Parniakov *et al.*, 2013), la extracción con fluidos supercríticos (Plaza *et al.*, 2010a), la extracción asistida por microondas, (Al Bittar *et al.*, 2013), la extracción asistida por ultrasonido (Şahin and Şamlı, 2013) y la tecnología más reciente usada con este fin, la extracción asistida por campos eléctricos pulsados conocida como PEF (Zderic *et al.*, 2013).

6.1 Clásica con disolventes

La extracción con solventes se usa en suelos, polímeros, bacterias, hongos, algas, microalgas y en plantas superiores (Gil-Chávez *et al.*, 2013; Plaza *et al.*, 2010b). El proceso más habitual de separación es la centrifugación y/o filtración para eliminar los restos de sólidos en suspensión.

En estas extracciones influyen los factores tiempo de extracción y/o la temperatura (Juntachote *et al.*, 2006; Segovia *et al.*, 2014a; Spigno *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011a). El aumento de la temperatura de extracción no supone siempre un aumento lineal en la extracción del compuesto de interés. Al aumentar la temperatura en exceso se puede producir la degradación del compuesto de interés (Odrizola-Serrano *et al.*, 2009).

También es importante la *ratio* solvente/masa empleada en la extracción, así como el número de extracciones previstas. Para asegurar la total extracción del compuesto de

interés, debe haber suficiente solvente, capaz de solubilizar todo el soluto extraído antes de llegar a la saturación (Wijngaard *et al.*, 2012). En ocasiones, se puede necesitar una doble extracción o extracción en serie para alcanzar dicho propósito.

6.2 Asistida por presión

Recientemente se ha propuesto un nuevo sistema de extracción, como sustituto a la extracción convencional por solvente: la extracción con líquido asistida por presión. Se basa en el uso de solventes orgánicos a altas temperaturas (de 50 a 200°C) y a una presión de entre 1450 a 2175 psi para asegurar una extracción rápida de los compuestos. El factor temperatura se puede usar como marcador de la polaridad del solvente y la alta presión ayuda a la extracción impulsando al contenido intracelular a salir de la matriz sólida (Gil-Chávez *et al.*, 2013). Esta técnica aumenta la velocidad de extracción y obtiene mejores resultados (Miron *et al.*, 2010).

Por otro lado, supone una desventaja ya que las altas temperaturas pueden degradar compuestos diana no termoestables (Gil-Chávez *et al.*, 2013; Parniakov *et al.*, 2013). Así pues, dependiendo del tipo de compuesto, es recomendable revisar la temperatura de trabajo.

La extracción asistida por presión también ha sido usada en algunos trabajos (Luengo *et al.*, 2013; Parniakov *et al.*, 2013) combinada con otras técnicas de extracción como los PEF.

6.3 Con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos está descrita como una tecnología segura para el medio ambiente con elevada selectividad y corto tiempo de extracción. El sistema se basa en mantener a los fluidos usados como solventes en un estado entre sólido y gas. Este estado permite un elevado grado de penetrabilidad del solvente en la matriz sólida y una extracción de los compuestos diana muy eficaz.

Se puede llevar a cabo con múltiples solventes (como el etileno, metano o nitrógeno), pero ofrece muy buenos resultados usando agua o dióxido de carbono (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

Existen numerosos estudios sobre su efectividad en la extracción de compuestos antioxidantes y carotenoides (Macías-Sánchez *et al.*, 2008; Nobre *et al.*, 2006), en la extracción de la luteína (Yen *et al.*, 2012) e incluso tiene usos industriales en la descafeinización del café o en la refinación de aceites (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

6.4 Asistida por microondas

Las microondas son radiaciones electromagnéticas con una longitud de onda de 0,001 a 1 m que al pasar a través de un medio, éste absorbe su energía y se convierte en energía térmica. En las células, las microondas producen el calentamiento del citoplasma y aumento de la porosidad de las membranas favoreciendo la difusión del solvente en la matriz biológica. Esto supone, por un lado, una mejora del rendimiento de la extracción y, por otro, la reducción del uso de solventes (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

En la literatura se describen numerosos trabajos de investigación donde se extraen, por ejemplo, compuestos fenólicos y carotenoides (Al Bittar *et al.*, 2013) para la mejora de las propiedades del zumo de uva o; en la revalorización de productos agroalimentarios (Dahmoune *et al.*, 2013)

6.5 Asistida por ultrasonidos

La tecnología de ultrasonidos no es nueva, pero, en la última década se ha explorado ampliamente su potencial y se ha usado como método de extracción de compuestos bioactivos (Soria and Villamiel, 2010). La extracción con ultrasonidos aporta una mejora en la eficacia de extracción en comparación con la extracción convencional con solventes. Además, permite controlar el tiempo y la temperatura de extracción de forma independiente (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

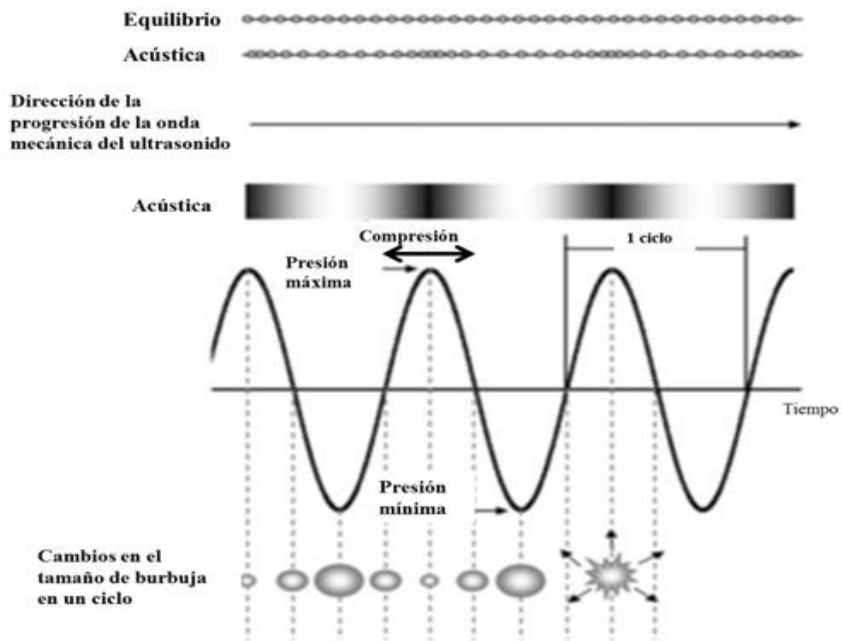


Figura 4: Funcionamiento del sistema de cavitación por sonido de los ultrasonidos. Modificado de Soria and Villamiel, (2010).

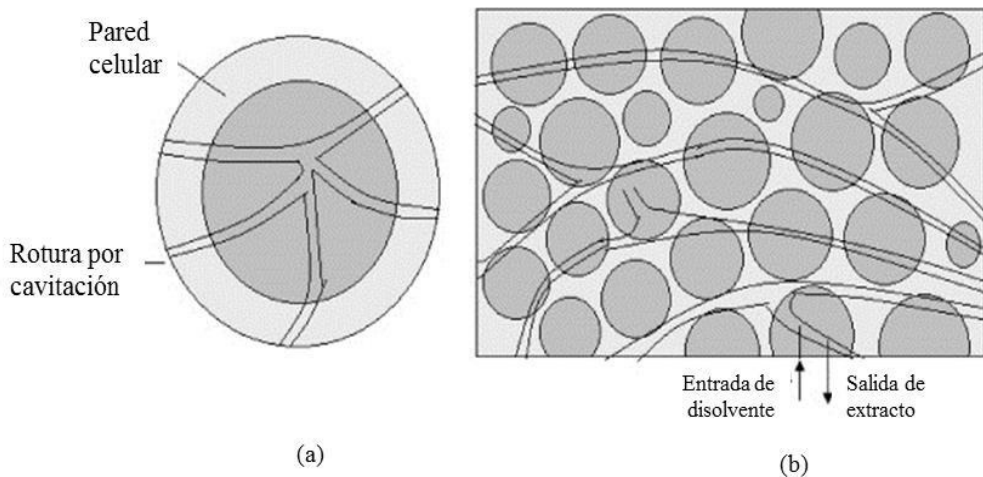


Figura 5: Mecanismo de rotura celular. (a) rotura de la pared debida a la cavitación, (b) difusión de solventes dentro del tejido. Modificado de Shirsath *et al.*, (2012).

La mejora de la eficiencia de extracción está relacionada con un fenómeno llamado “cavitación acústica”. Cuando la intensidad del ultrasonido es suficiente, se crean cavidades o micro-burbujas en el líquido (**Figura 4**). Éstas, una vez formadas, absorben la energía de la onda acústica y crecen con la intensidad de onda hasta su colapso. El colapso de las burbujas produce un incremento local del calor y de la presión por un periodo de tiempo muy corto (Elia *et al.*, 2012; Soria and Villamiel, 2010). Este proceso (**Figura 5**) produce la rotura de las paredes celulares, disminuye el tamaño de partícula de la matriz y facilita la liberación de los compuestos intracelulares (Dahmoune *et al.*, 2013; Shirsath *et al.*, 2012).

La extracción por ultrasonidos se puede realizar en dos modalidades, en pulsos (que amortiguan el efecto del aumento de la temperatura) o en continuo (Pan *et al.*, 2012) donde es aconsejable el uso de sistemas de refrigeración.

La configuración más habitual es la extracción por ultrasonidos indirecta mediante un baño de ultrasonidos, aunque existen otras posibilidades como la sonicación directa de las muestras o extracción directa acoplando el equipo a un agitador. Todas las conformaciones son válidas y han demostrado buenos resultados en su uso para extracción (Shirsath *et al.*, 2012).

Se han descrito trabajos de extracción de polifenoles por ultrasonidos a partir de diversas materias primas como por ejemplo la manzana (Virost *et al.*, 2010), la granada (Pan *et al.*, 2012) o el té negro (Both *et al.*, 2014), todos ellos con resultados muy favorables.

6.6 Asistida por campos eléctricos pulsados

La aplicación de los campos eléctricos pulsados, (PEF) en procesos de extracción, es una tecnología emergente. Se basa en la aplicación de dichos campos eléctricos pulsados que inducen la permeabilización de las membranas celulares, fenómeno también conocido como “electroporación” (Asavasanti *et al.*, 2011; Puértolas, *et al.*, 2013). Los pulsos siguen ciclos de microsegundos y crean una diferencia en el potencial de la membrana celular que rompe la rigidez dieléctrica de las células y abre

microporos. Los microporos celulares (**Figura 6**) hacen posible la penetración de los disolventes así como la salida de los compuestos diana (Asavasanti *et al.*, 2011; Takaki *et al.*, 2011).

La electroporación también tiene aplicaciones en biología molecular. Por ejemplo, aplicando pulsos con cortos periodos de tiempo se consigue introducir material genético dentro de la célula permitiendo la regeneración de la pared celular de ésta (Miller *et al.*, 1988).

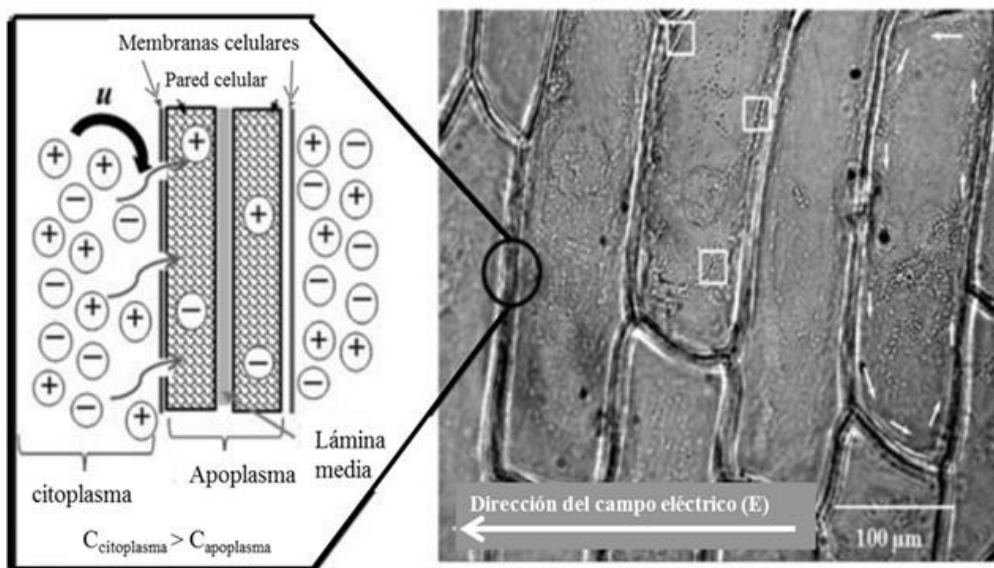


Figura 6: Efecto del PEF en tejidos vegetales. Modificado de Asavasanti *et al.*, (2011).

La extracción asistida por PEF es una tecnología no térmica y, por consiguiente, no afecta a la calidad del producto extraído ni produce desnaturalización y/o rotura de enlaces moleculares que degradan los compuestos de interés. Además, permite su uso en continuo, en plantas pilotos o a escala industrial por lo que se obtiene una mayor efectividad del tratamiento (Puértolas *et al.*, 2010a).

Cabe señalar que es posible usar la tecnología PEF para otras aplicaciones dentro de la industria alimentaria como la descontaminación e inactivación microbiana de todo tipo de productos alimentarios envasados y no envasados (Monfort *et al.*, 2012) y, también,

en el pretratamiento de productos destinados a la elaboración de productos alimentarios como los zumos (Jaeger *et al.*, 2012) y el aceite de oliva (Abenoza *et al.*, 2012).

7. Aplicaciones de antioxidantes en la industria alimentaria

Los compuestos con actividad antioxidante de origen natural pueden ser usados en la industria farmacéutica, cosmética o alimentaria como aditivos para preservar la degradación de grasas y otros compuestos (Carocho *et al.* 2014).

La tendencia actual es fabricar productos con pocos compuestos químicos y lo más naturales posibles (Bearth *et al.*, 2014; Devcich *et al.*, 2007). En éste sentido existen tres opciones; aplicar los compuestos antioxidantes en el producto, en coberturas comestibles, o en el propio envase creando los llamados envases activos.

7.1 Aplicaciones en el producto

7.1.1 Descripción

La opción clásica, y hasta la fecha la más usada, es la de aplicar los antioxidantes y todos los aditivos en general directamente en el producto. En su aplicación, los productores deben tener en cuenta la ingesta reconocida como segura de cada uno de los compuestos añadidos, la ADI. Se calcula por día y peso corporal y viene determinada por la EFSA en Europa y por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) en Estados Unidos. Además, estas dos organizaciones, bajo la aprobación de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), determinan las dosis más altas que no presentan efectos adversos en las especies animales más susceptibles, las denominadas NOAEL, Efectos Adversos No Observados (Carocho *et al.*, 2014).

En el marco legal de la Unión Europea se han actualizado, recientemente y se publicaron la Directiva EC 601/2014 (European Parliament 2014) el listado de aditivos permitidos y las cualidades que estos aportan.

7.1.2 Antioxidantes naturales testados

Existe gran variedad de antioxidantes naturales testados con éxito en diferentes productos frescos que tienen una vida útil relativamente corta como son carnes y pescados. Las carnes son el mayor foco de estudio (Weiss *et al.*, 2010). En concreto, la industria cárnica es una de las industrias del sector de alimentos y bebidas al que se le augura un mayor crecimiento a nivel mundial (FAO, 2014). Se espera que el mercado mundial llegue a ser el doble de lo que es ahora en el año 2050. En este contexto, buscar nuevos aditivos aplicables a la industria cárnica es aspecto relevante y conlleva un elevado valor económico. En la literatura se describe la actividad de gran número de extractos naturales sobre todo tipo de carne como pollo, cerdo o ternera. En la **Tabla 5** se recogen algunos ejemplos.

Tabla 5: Relación de compuestos con actividad antioxidantes testada en carnes.

Extracto/compuesto	Alimento	Referencia
Té verde	Carne cruda de cerdo Comida preparada a base de carne	Jo <i>et al.</i> , (2003) Price <i>et al.</i> , (2013)
Cítricos (naranjas, limones)	Varias carnes, cocidas y crudas	Fernández-López <i>et al.</i> , (2004)
Limón (albedo)	Hamburguesas de ternera elaboradas en planta piloto	Aleson-Carbonell <i>et al.</i> , (2005)
α - tocoferol	Carne de ternera y pollo	Tang <i>et al.</i> , (2001)
Borraja	Salchichas fermentadas	García-Iñiguez <i>et al.</i> , (2009)
Extracto de Romero y melisa	Carne de cerdo cocida	Lara <i>et al.</i> , (2011)
Extracto de propolis	Carne de ternera	Vargas-Sánchez <i>et al.</i> , (2014)
Lichi	Carne magra de cerdo cruda	Qi <i>et al.</i> , (2015)

7.2 Aplicación en coberturas comestibles

7.2.1 Descripción

Las coberturas comestibles son una fina capa de material apto para el consumo e ingestión que protege al alimento de la degradación. La cobertura puede ser de dos tipos; i) completa, cubriendo completamente el alimento o ii) parcial, cubriendo solamente una parte de éste (Bourtoom, 2008).

7.2.2 Coberturas desarrolladas

Existen varios antecedentes bibliográficos de elaboración de coberturas con propiedades antioxidantes usando materiales como proteínas (Ghidelli *et al.*, 2015), suero de proteínas (Rodríguez-Turienzo *et al.*, 2011), quitosano (Ojeda *et al.*, 2014; Silva-Weiss *et al.*, 2013) o gelatinas (Emiroğlu *et al.*, 2010) entre otros.

Algunas de las coberturas comestibles se han testado sobre frutas y hortalizas. Por ejemplo, aquellas que inhiben el deterioro de color (Ojeda *et al.*, 2014) elaboradas con almidón de mandioca y aplicadas a boniatos.

Estas coberturas comestibles muestran a su vez buenos resultados como inhibidores de la peroxidación lipídica en modelos de alimento como pueden ser las emulsiones (Taherian *et al.*, 2011), carnes y productos del mar, entre otros. En la **Tabla 6** se recogen algunos ejemplos característicos.

Tabla 6: Relación de coberturas comestibles con actividad testada en carnes, pescados y mariscos.

Composición de la cobertura	Alimento	Referencia
Quitosano, proteína de leche, ácido láctico y alginatos	Productos cárnicos*	Coma, (2008)
Quitosano y té	Carne de cerdo	Qin <i>et al.</i> , (2013)
Suero proteico	Salmón	Rodriguez-Turienzo <i>et al.</i> , (2011)
Quitosano	Camarón	Wu, (2014)

* Capacidad antimicrobiana y antioxidante

7.3 Aplicación en envases y coberturas activas no comestibles

Con la finalidad de reducir la cantidad de aditivos incorporados al alimento, se han desarrollado los envases o films activos.

7.3.1 Descripción

Los envases activos son envases diseñados para interactuar de forma activa y continua con su contenido. Esta interacción implica siempre una transferencia de masa, ya sea para incorporar sustancias al contenido del envase (el alimento y su entorno) o absorber componentes del mismo. La finalidad de esta interacción es ampliar el tiempo de conservación o mantener, incluso mejorar, el estado de los alimentos (AESAN, 2010).

Los materiales activos son capaces de modificar determinadas condiciones o procesos como el de oxidación, deterioro por microorganismos, etc. Legalmente se denominan materiales y objetos activos en contacto con alimentos y se definen como “materiales y objetos destinados a ampliar el tiempo de conservación, o a mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados y están diseñados para incorporar componentes a los alimentos envasados o al entorno de estos” Reglamento (CE) N° 1935/2004 (European Parliament, 2004).

Pueden estar formados por varios tipos de polímeros y pueden contener capas adicionales que ralenticen la liberación del producto de interés o lo protejan de agentes como la radiación ultravioleta (Gómez-Estaca *et al.*, 2014). En la **Figura 7 (A)** se presenta un esquema de un envase monocapa tipo. Se observa que la difusión del compuesto activo es muy alta ya que está directamente en contacto con el alimento. La **Figura 7 (B)** muestra un esquema de un envase multicapa donde se puede ver que, además de una capa protectora que ralentiza la difusión, también hay una capa externa de material que aporta soporte estructural al envase.

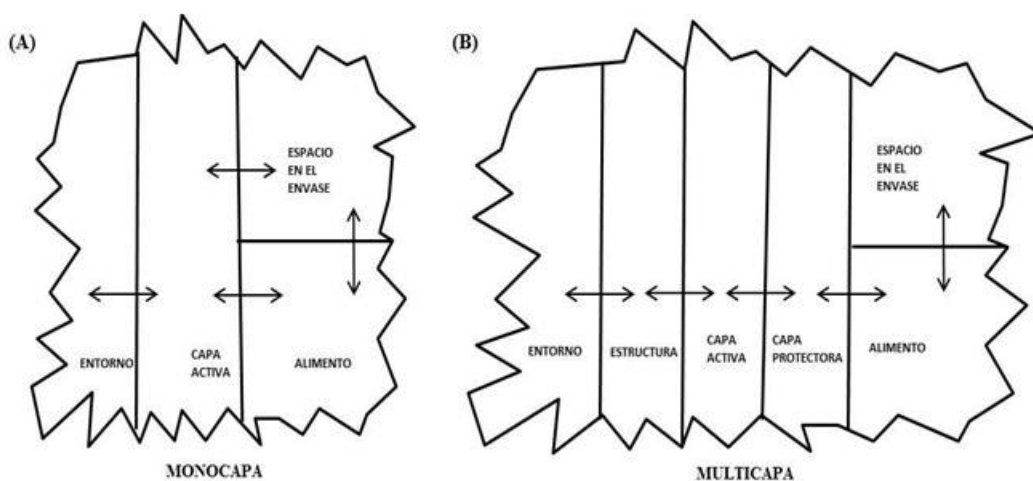


Figura 7: Esquema de envases tipo monocapa (A) y multicapa (B). Basado en Gomez-Estaca *et al.*, 2014.

Los polímeros usados en la producción de envases activos también deben estar autorizados para su uso en alimentos. Los más comunes son: Polietileno (PE), Polipropileno (PP) y Tereftalato de Polietileno Poli (PET) (Pankaj *et al.*, 2014).

Asimismo, se está estudiando la posibilidad de usar biopolímeros en la producción de envases activos, como por ejemplo el Polihidroxialcanoato (PHA), producido por algas y microorganismos (Tan *et al.*, 2014).

Las técnicas usadas en la fabricación y creación de estos films son diversas. Cabe destacar la extrusión, la adición de la cobertura del producto activo por *road coating*

con o sin activación de superficies con plasma (Pankaj *et al.*, 2014). Actualmente, muchos de los procesos usados y muchos de las formulaciones de los envases activos creados se encuentran bajo patente. Por ejemplo, los desarrollados por Colon and Nerin, (2012).

7.3.2 Películas activas desarrolladas

Los antecedentes bibliográficos sobre la actividad de los films en productos alimentarios no son muy numerosos. Suelen hacer referencia al desarrollo de éstos y sus características. En la **Tabla 7** se muestran algunos de los trabajos más relevantes que describen películas activas con propiedades antioxidantes.

Tabla 7: Relación de films activos, compuestos antioxidantes contenidos y productos en los que se han testado.

Composición principal del envase activo	Compuesto antioxidante	Referencia
PET	Extractos de té verde, café verde y pomelo	Colon and Nerin, (2012)
PP + plastificantes	Catequinas	Castro-López <i>et al.</i> , (2014)
PET	Cítricos	Contini <i>et al.</i> , (2012)
PP	Flavonoides (catequinas y té verde)	López de Dicastillo <i>et al.</i> , (2013)
PP	Té verde	Castro-López <i>et al.</i> , (2014)

8. Envase tradicional *versus* envases activos e inteligentes

Las coberturas activas y los films activos suponen una ventaja para el envasado de productos frescos. Sin embargo existen otras posibilidades como los novedosos envases inteligentes (que confieren información del producto envasado) o la aplicación de atmosfera modificada en los envases tradicionales (AESAN, 2010).

Muchos alimentos y productos pueden almacenarse en varios tipos de envase simultáneamente. Por ejemplo el caso de un alimento con una cobertura comestible envasado en un envase tradicional donde se usa la atmósfera modificada (Mastromatteo

et al., 2011). A continuación se expone una visión global de los sistemas de envasado existentes y sus ventajas de uso.

8.1 Producto en envase tradicional

Los envases tradicionales son barreras pasivas al medio exterior que retrasan su efecto adverso y contienen al alimento (AESAN, 2010). Estos envases pueden ser monocapa, formados por un solo material, o multicapa, donde el material en contacto con el alimento y el material en contacto con el exterior puede ser diferente o puede intercalar capas de material diferente que aporten al envase otras propiedades, como son, por ejemplo, la rigidez (Gómez-Estaca *et al.*, 2014).

La principal función de todos los envases es la de proteger al alimento del deterioro (Zhou *et al.*, 2010) que se hace más evidente en productos frescos, como las carnes, con un margen de vida útil limitado. Efectivamente, uno de los productos frescos más usados para el estudio de los envases y coberturas activos y en general para el estudio de efectividad de productos antioxidantes es la carne fresca, especialmente la carne picada en forma de albóndigas o hamburguesas.

8.1.1 Envasado al vacío

Los materiales usados para el envasado al vacío suelen estar formados por un film multicapa de baja permeabilidad al oxígeno. Un ejemplo de conformación del film es etilvinil acetato/polivinildieno/etilvinil acetato. La baja concentración de oxígeno, casi ausencia total, minimiza las reacciones de oxidación y reduce el crecimiento de bacterias aerobias (Zhou *et al.*, 2010).

8.1.2 Envasado en atmosfera modificada

Existe una diversidad considerable en la composición y proporción de gases usados para obtener una atmosfera controlada dentro del envase. Mayoritariamente la proporción de gases (calculados en volumen de aire seco en el momento del sellado) es:

20% de CO₂ y 80% de O₂. Estos porcentajes pueden variar según necesidades específicas del producto o, también, según recomendaciones legislativas concretas (McMillin, 2008).

8.2 El envase inteligente

Se llaman así a aquellos que controlan el estado de los alimentos. Monitorizan las condiciones de alimentos envasados, para dar información acerca de la calidad del mismo durante el transporte y almacenamiento (AESAN, 2010). Legalmente se definen como “materiales y objetos inteligentes en contacto con alimentos” y se definen como los materiales y objetos que controlan el estado de los alimentos envasados o el entorno de éstos (European Parliament, 2004).

En Europa el desarrollo y la aplicación de estos envases es todavía limitado debido a las restricciones legislativas. No se contemplaba legalmente el uso de estos envases hasta el 2004. A partir de entonces, los materiales y objetos inteligentes se autorizan en el reglamento 1935/2004 (European Parliament, 2004). En el reglamento 450/2009 (European Parliament, 2009) se especifica y se establecen los requisitos especiales que deben cumplir.

8.3 El envase activo

Los envases activos, con capacidad antioxidante, se han descrito en el Apartado 7.3. Además de los envases que contienen compuestos activos de liberación en el alimento también existen los envases activos absorbentes o eliminadores. En general los envases activos se pueden clasificar según su función en:

i) Absorbentes o eliminadores

Los absorbentes reducen y controlan de manera activa los niveles de gases dentro del envase. Los más comúnmente utilizados son los absorbentes de oxígeno, de etileno y de humedad. Los primeros reducen la concentración de etileno (hormona en forma de gas responsable de la maduración) alargando la

conservación de frutas y verduras; los absorbentes de oxígeno ralentizan los fenómenos de oxidación y enranciamiento de grasas y aceites y también evitan el desarrollo de microorganismos aerobios e, incluso, la infestación por insectos y vermes. Por último, los absorbentes o reguladores de humedad mejoran el aspecto del alimento y reducen también la aparición de microorganismos (AESAN, 2010).

ii) Liberadores o emisores

Su acción implica una transferencia de masa desde el sistema o material activo al contenido en del envase. Se han desarrollado un gran número de agentes liberadores con características biocidas, productores de CO₂, liberadores de etanol, de polisacáridos, etc. (Kerry *et al.*, 2006).

De entre los envases activos liberadores caben destacar los liberadores de extractos naturales o componentes obtenidos de los mismos con, por ejemplo, propiedades antimicrobianas y antioxidantes (AESAN, 2010). Algunos de los extractos naturales estudiados son los de semillas de uva (Coma, 2008), o los de orégano o romero, (Camo *et al.*, 2008). Los primeros son los de mayor interés, ya que suponen el reutilizar un residuo alimentario para otro fin que entraña un beneficio económico más allá de generar biomasa.

CAPÍTULO 2: INTERÉS Y OBJETIVOS

Los residuos agroalimentarios, especialmente los procedentes de la industria de zumos, se generan en grandes cantidades. En pocos casos suponen un beneficio para estas industrias; más bien al contrario, suponen un gasto debido al proceso de eliminación.

Podrían tener un alto potencial económico, pues es posible extraer de ellos compuestos bioactivos utilizados en otros campos, aportando un valor añadido. En esta línea cabe destacar la extracción de antioxidantes, con múltiples opciones de uso como aditivos (en la industria cosmética, alimentaria e incluso farmacéutica).

Por otra parte, el té es una de las plantas más estudiadas con actividad antioxidante. Sin embargo el té blanco todavía tiene un potencial de estudio por explotar.

En la presente Tesis Doctoral se pretende profundizar en el estudio de los residuos del limón y en el té blanco definiendo los siguientes objetivos.

OBJETIVO PRINCIPAL:

Optimizar la extracción de té blanco y revalorizar residuos agroalimentarios del limón como fuente de antioxidantes naturales. Paralelamente analizar su uso en productos alimentarios. Este objetivo principal se subdivide en los siguientes objetivos concretos:

1. Optimizar el proceso de extracción de polifenoles del té blanco mediante metodología de superficie respuesta (RSM), aplicando un diseño experimental factorial y analizar la repercusión de las variables tiempo, temperatura y porcentaje de disolvente orgánico (etanol) empleado, así como sus posibles interacciones.
2. Aplicar distintas formas de extracción de polifenoles a los residuos de limón, especialmente “*Green Technology*”: tradicionales, con diferentes disolventes y con la incorporación de campos eléctricos pulsados.

3. Caracterizar la actividad antimicrobiana y de protección frente al estrés oxidativo inducido sobre DNA y modelos celulares de los extractos obtenidos de residuo de limón.
4. Analizar la actividad antioxidante del té blanco en sistemas cárnicos reales, estudiando la evolución de la oxidación de la carne en diferentes condiciones de almacenamiento.
5. Analizar el uso de los extractos de té blanco y residuo de limón en envases activos de Polietileno (PE) comercial sobre carne de ternera picada, midiendo la oxidación de la carne y el grado de contaminación.
6. Diseñar un nuevo film con ácido poliláctico y té blanco que permita la liberación controlada en el seno de una emulsión, disminuyendo la velocidad de oxidación.

CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de residuos y material vegetal

El té blanco usado en esta Tesis Doctoral fue suministrado por *Manantial de la Salud* (Herbocat S.L., Barcelona, España). Se picaron 0,5 kg de té con una picadora doméstica (Multritio 2, Molinex, Barcelona, España) y se homogeneizaron. Se almacenó en porciones de 50 g en un desecador, a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Para la obtención de liofilizados, se realizó una extracción por infusión de 60 g de té seco y triturado /L de agua destilada a ebullición, durante 30 minutos. A continuación los extractos se filtraron por un filtro Whatman n°1, se congelaron a -80°C y se liofilizaron durante 48 h a -60°C (Telstar Cryodos, Barcelona, España). El liofilizado resultante se almacenó en un desecador protegido de la luz.

El residuo de limón procedente del procesado de la industria de zumos fue proporcionado por dos empresas del sector: Tana, S.L. y Derivados Cítricos, ambas localizadas en Murcia, España. Todo el residuo que se obtuvo fue del cultivar Fino, (*Citrus limon* cv. Fino), descrita como la variedad con más capacidad antioxidante (González-Molina *et al.*, 2009). 2 kg de residuo de limón se homogeneizaron y, posteriormente, se trituraron con una picadora doméstica (Multritio 2, Molinex, Barcelona, España). El residuo se almacenó protegido de la luz, en porciones de 100 g de homogenizado a -80°C.

Para la obtención de extractos liofilizados, se realizaron extracciones de limón (200 g/L) en etanol:agua (40:60) durante 30 minutos ,en agitación constante, a la temperatura de 2°C. A continuación se liofilizaron (Telstar Cryodos) previa evaporación del etanol mediante un rotavapor (Büchi, Flawil, Suiza) y baño a 40°C. Los liofilizados resultantes fueron almacenados en un desecador, protegidos de la luz.

En el estudio de optimización de la extracción de polifenoles por PEF, se obtuvieron limones de un mercado local de la misma variedad y se usó sólo el flavelo y el albedo

del limón fresco desprovisto de pulpa y cortado con un sacabocados a varios tamaños. En el estudio de la extracción por ultrasonidos se exprimió el fruto y se procedió a picar el residuo (Multricio 2, Molinex, Barcelona, España).

2. Métodos de optimización de la extracción de los compuestos de interés

En el Apartado 6 del Capítulo 1 se han expuesto las técnicas más usuales de extracción de compuestos bioactivos. En la presente Tesis Doctoral se realizaron varias extracciones con solventes y extracción asistida por PEF. El resultado de las extracciones se optimizó usando herramientas estadísticas detalladas en el Apartado 6 de este Capítulo.

2.1 Extracción acelerada con solventes

La extracción acelerada de polifenoles se realizó con etanol, solvente considerado de grado alimentario (Gil-Chávez *et al.*, 2013) a varias concentraciones y, por tanto, de seguridad probada en el consumo humano.

La optimización de la extracción de polifenoles en el té blanco se llevó a cabo mediante el uso de un diseño de experimentos (DoE) y Metodología de Superficie Respuesta (RSM). Los factores analizados fueron: % de etanol (0, 48 y 96%), temperatura (40, 65 y 90°C) y tiempo (5, 90 y 47,5 min). En la optimización de la extracción realizada por la metodología RSM se obtuvo un diseño de experimentos final de 17 extracciones. Se realizaron por triplicado usando 4 g de té blanco seco por 100 mL de solvente en todos los casos.

2.2 Extracción por presión asistida por campos eléctricos pulsados (PEF)

La técnica de presión asistida por PEF se utilizó en la optimización de la extracción de compuestos fenólicos del residuo de limón. El estudio se llevó a cabo conjuntamente con la Universidad de Zaragoza (Departamento de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Zaragoza, España) y se siguió el método usado por (Luengo *et al.*, 2013) con algunas modificaciones.

El equipo de PEF usado (Modulator PG, Scandinova, Uppsala, Suecia) genera pulsos en forma de ondas de 3 μ s, con una frecuencia de hasta 200 Hz. La máxima potencia de salida fue de 20 kV y 200 A. Se usó una cámara de tratamiento con una distancia entre electrodos de 2 cm y con un diámetro externo total de 5 cm. La cámara permitió tratar $20 \pm 0,5$ g de muestra en cada carga o *batch*. El voltaje real y la intensidad eléctrica real se midieron mediante una sonda de alto voltaje (Tektronix, Oregon, EEUU). Los tratamientos testados fueron de 5 a 50 pulsos de 3 μ s (15 to 150 μ s) y se probaron pulsos eléctricos de 1 a 9 kV/cm. La energía específica de esos tratamientos se determinó en un rango de entre 0 y 7,6 kJ/kg. La frecuencia de los pulsos usada fue de 1 Hz.

Para cuantificar la efectividad de los PEF en la rotura celular se usó el índice de desintegración celular (Z_p) que cuantifica la permeabilidad celular del tejido vegetal (Angersbach *et al.*, 1999). El cálculo del Z_p se realizó por la medida de la impedancia (DIL, Quakenbrück, Alemania) calculada según describe Luengo *et al.*, (2013) aplicando la siguiente ecuación:

$$Z_p = 1 - \left(\frac{K_h}{K'_h} \right) \cdot \frac{(K'_h - K'_l)}{(K_h - K_l)} \quad (1)$$

donde K_l y K'_l son las conductividades eléctricas de las muestras tratadas y sin tratar a baja frecuencia de campo (1 kHz) y donde K' y K_h' son las conductividades eléctricas de las muestras tratadas a alta frecuencia de campo eléctrico (2 MHz). La Z_p varía entre 0 y 1; el valor máximo, 1, indica que los tejidos tienen todas las células permeabilizadas.

La presión se aplicó con una prensa a escala de laboratorio de volumen 400 mL, y de pistón de 7,5 cm de diámetro. La presión, aplicada con gas y controlada por un manómetro analógico fue de 2,5 y 5 bars. Para el tratamiento se usaron ciclos de 5 minutos y en cada uno de los ciclos se retiraron 1,5 mL del volumen para análisis.

En este Apartado se evaluó, por un lado, la influencia del tamaño (1, 2 y 3 cm) de muestra tratada en la efectividad del PEF y, por otro, se estudiaron las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes del limón. Para el estudio de optimización se realizó un DoE, se analizaron los datos por RSM para obtener los máximos de extracción y se realizó la prueba de ajuste al modelo de extracción (cinética de extracción) propuesto en Luengo *et al.*, (2013).

3. Caracterización de la eficacia y composición de los extractos obtenidos

3.1 Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se puede determinar con varios ensayos. La mayoría se basan en la medida del potencial reductor (Dotan *et al.*, 2014). La máxima fiabilidad de los resultados se obtiene mediante el uso de varios de ellos (Tabart *et al.*, 2009). Los diferentes ensayos realizados durante la presente Tesis Doctoral fueron ORAC, TEAC y DPPH.

3.1.1 Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno (ORAC)

El método ORAC, descrito por Ou *et al.*, (2001) es usado extensamente en alimentos y en productos biológicos para la determinación de la capacidad antioxidante. Se fundamenta en la medida de la disminución de la fluorescencia emitida por la fluoresceína (FL), en presencia de un radical peroxilo (superóxido 2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH), preparado en una solución de tampón

fosfato salino (PBS), atemperada a 37°C. Para determinar la capacidad antioxidante por el método ORAC se usó el protocolo descrito en Segovia *et al.*, (2014a), adaptado a placas de 96 pocillos.

Se midió la disminución de fluorescencia (excitación 485 nm, y emisión a 520 nm) de una solución de FL de 78 nM inducida por el radical AAPH (221 mM) a lo largo del tiempo, en presencia y ausencia del extracto antioxidante. La actividad antioxidante se calculó por la medida del área bajo la curva (AUC), de la fluorescencia de la FL a lo largo del tiempo según la fórmula:

$$AUC = \left(0,5 + \left(\sum_{i=1}^{i=31} \frac{f_i}{f_1} \right) \right) \cdot CT \quad (2)$$

donde: i: es el número de ciclos, f: el valor de la fluorescencia en unidades arbitrarias y CT: el tiempo de cada ciclo (en este caso 2 minutos).

Los resultados se expresaron en μM de Trolox Equivalente (TE)/g de peso seco, fresco o liofilizado o por mL de volumen obtenido, según el experimento realizado. Para su cuantificación se usó una recta patrón realizada con Trolox (ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic), un análogo de la vitamina E hidrosoluble (Sigma Aldrich, Sant Louis, EEUU). Se realizó una recta patrón en cada una de las placas de 96 pocillos usadas.

3.1.2 Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC)

También llamado ensayo del radical ABTS^+ , basado en el método de Re *et al.*, (1999) con algunas modificaciones como se detalla en Skowrya *et al.*, (2014b). Este método se fundamenta en la habilidad del compuesto antioxidante de neutralizar el radical catión ABTS^+ en comparación a la neutralización producida por el antioxidante de referencia (Trolox).

Para este ensayo primeramente se preparó una solución del radical ABTS⁺ mezclando ABTS (7 mmol/L) con peroxodisulfato de potasio (2,45 mmol/L). La solución se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución de trabajo del ABTS⁺ se preparó por dilución (1:10) en PBS (pH 7,4) a 30°C y se ajustó la absorbancia del radical a $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Para cuantificar la capacidad antioxidante se diluyó 10 veces la solución problema (con el extracto) en la solución de trabajo de ABTS⁺. La recta patrón se determinó en el intervalo de concentraciones de Trolox de 1 a 10 μ M. Para el blanco se usó agua. La absorbancia se midió a 734 nm inmediatamente antes de añadir la muestra (t=0) y cada minuto durante 5 minutos, después de añadirla. El porcentaje de inhibición se calculó con la absorbancia a los 7 minutos. El cambio relativo en la absorbancia se calculó según la siguiente ecuación:

$$\Delta A_{\text{muestra}} = \frac{A_{t=0(\text{muestra})} - A_{t=5(\text{muestra})}}{A_{t=0(\text{muestra})}} - \frac{A_{t=0(\text{control})} - A_{t=5(\text{control})}}{A_{t=0(\text{control})}} \quad (3)$$

donde A es la absorbancia a 734 nm y t , el tiempo transcurrido expresado en minutos. El valor de TEAC se determinó como μ mol de Trolox Equivalente (TE)/g de muestra inicial.

3.1.3 Actividad antiradicalaria por el método de DPPH

La determinación de la actividad antiradicalaria usando el método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) se basa en la reacción de reducción del radical DPPH[•] por parte del compuesto antioxidante. Esta reducción implica un cambio de color: de violeta (con un pico de absorbancia a 517 nm) a amarillo.

Se realizó según el método descrito en El-Abbassi *et al.*, (2012). Se mezclaron, dentro de una cubeta, 100 μ L de muestra a la dilución adecuada con 3 mL de una solución de DPPH (4 mg de DPPH 100 mL de etanol). La mezcla se incubó protegida de la luz durante 60 minutos. Se midió su absorbancia a 517 nm con un espectrofotómetro ultravioleta/visible (Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis, Massachusetts, EEUU).

La actividad antiradicalaria de la muestra se calculó en % de inhibición del radical sobre un control con etanol siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% I = \left\{ 1 - \left(\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \cdot 100 \quad (4)$$

donde I es la inhibición y A es la absorbancia de la muestra con DPPH•

3.2. Determinación de Polifenoles Totales (TP)

La cuantificación de Polifenoles Totales (TP) se determinó según el método *Folin-Ciocalteu* basado originalmente en Singleton *et al.*, (1999) y descrito en Gallego *et al.*, (2013). Dicho método se basa en la reducción de una mezcla de ácidos (ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) a una mezcla de óxidos (óxido de tungsteno y molibdeno) que aportan un color azul con un máximo de absorbancia en 725 nm. Para este ensayo se mezcló en el siguiente orden: la dilución adecuada de la muestra, el reactivo Folin para determinación de polifenoles (Sigma Aldrich, Sant Louis, EEUU), una solución saturada de carbonato de sodio y agua en proporciones de 10, 5, 15 y 70% en volumen respectivamente. La mezcla se agitó y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 hora. A continuación se midió la absorbancia a 725 nm. El valor de TP se determinó por una recta patrón con ácido gálico (entre 2 y 100 mg/L). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente por gramo (GAE/g) de peso fresco, seco o liofilizado de la muestra, según el experimento realizado.

El análisis de TP se efectuó sin problema en muestras en agua, etanol y etanol: agua siempre realizando el patrón en el mismo solvente en el que se encontraba la muestra para evitar interferencias.

Por otro lado, en algunos análisis donde la muestra a estudiar era isoctano, fue necesario un paso previo de evaporación y re-disolución en agua:etanol para poder realizar la analítica. Las muestras (500 μ L) se evaporaron por completo mediante Nitrógeno gas usando un equipo de evaporación por nitrógeno (Desarrollado por IRIS,

S.L. Barcelona, España). A continuación, se repusieron en igual volumen de etanol:agua y se procedió al análisis de PT de forma normalizada.

3.3 Cuantificación de la composición de los extractos

La técnica más usada para la determinación de la composición es la cromatografía. Existen varios tipos de cromatografía. En la presente Tesis Doctoral se usaron dos de ellas, la cromatografía capilar micelar electrocinética (MECK) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

3.3.1 MECK

Es un tipo de electroforesis capilar capaz de separar compuestos con diferentes cargas. Se basa en el principio de migración diferencial de micelas iónicas y de un tampón, bajo condiciones de electroforesis entre el analito y la micela. La micela se forma por adición de un surfactante (diodecilsulfato sódico, SDS) en el tampón. Esta técnica es muy adecuada para separar y cuantificar los antioxidantes naturales por su elevada eficacia de separación, su velocidad, su bajo consumo de reactivos y su bajo coste (López *et al.*, 2011; Terabe, 2009).

La MECK se realizó con un detector Diode-Array a una longitud de onda de 280 nm. El capilar usado fue un capilar de sílica con un diámetro interno de 50 μm y una extensión total de 34 cm (25,5 cm de extensión efectiva de separación). El voltaje aplicado fue de 30 kV y la intensidad de 35 μA . El capilar se atemperó a 21°C. Con el objetivo de obtener una buena precisión, el capilar se preparó y acondicionó, antes de su uso, con una limpieza consistente en un flujo abundante de NaOH 0,1 M durante 10 minutos, después con lavado de 155 minutos con una solución tampón de pH 7 (formada por 5 mM de tetraborato de sodio, 60 mM de sodio fosfato dibásico y 5 mM de SDS). Para la cuantificación de los polifenoles (catequina, epicatequina (EC), galato de epicatequina (ECG), epigalocatequina (EGC) y galato de epigalocatequina (EGCG)) se prepararon soluciones patrón y se analizaron con el mismo método.

3.3.2 HPLC

Se determinó la concentración de polifenoles mayoritarios y otros compuestos por HPLC. En función de los compuestos a determinar se han usado diversas metodologías de trabajo y diferentes cromatógrafos pertenecientes al Departamento de Ingeniería Química de la Univesitat Politècnica de Catalunya (UPC) o al Parc Científic de la Universitat de Barcelona (PCB). En este Apartado se describen con detalle los métodos usados.

Previamente a la cuantificación, se filtraron todas las muestras mediante un filtro de membrana Millipore de poro de 0,45 μm y se ajustó la concentración del extracto que estaba dentro del rango de determinación del aparato, con inyecciones de diluciones logarítmicas.

3.3.2.1 Cuantificación de los polifenoles mayoritarios

Se determinó la concentración de los polifenoles mayoritarios en el té blanco y en el residuo de limón. Para ello se usó el equipo *Agilent Alliance Waters* con módulo de separación y autoinyector de bomba cuaternaria, acoplado a un detector Diode-array (Waters, Milford, MA, EEUU). La columna usada fue una C18 de fase reversa (Kinetix Phenomenex Inc., Torrance, EEUU). Para procesar los datos se usó el software Millennium (Waters, Milford, MA, EEUU).

En la cuantificación de los polifenoles de té blanco (C, EGCG, EGC, ECG) y de la cafeína se usó el método cromatográfico en gradiente basado en Friedman *et al.*, (2005) con algunas modificaciones. Se inyectaron 10 μL de muestra y se aplicó un flujo constante de 1 mL/minuto. La fase móvil aplicada fue A: agua MQ acidificada (0,1 % de ácido acético glacial) y B: metanol calidad HPLC, suministrados por Panreac Química SAU, Barcelona, España. El método usado comienza con 85% de A y en 5 minutos baja a 80%; en 3 minutos más pasa a 70% de A y recupera el valor inicial en 4 minutos más. De manera que el tiempo total del método fue de 12 minutos. Se preparó una recta patrón de, al menos, 5 puntos para cada uno de los compuestos estudiados.

En la cuantificación de los polifenoles mayoritarios del residuo de limón (hesperidina y eriocitrina) se usó el método cromatográfico basado en Gonzalez-Molina *et al.*, (2010) con algunas modificaciones. Se inyectaron 10 μL de muestra y se aplicó un flujo constante de 0,5 mL/minuto. Los eluyentes usados en la fase móvil fueron: A: agua MQ acidificada (0,1% de ácido acético glacial) y B: acetonitrilo acidificado (0,1 % ácido acético glacial). El método cromatográfico comienza por un 90% de A durante 2 minutos, en 8 minutos baja a 70% y permanece en esa composición 2 minutos. Finalmente en 5 minutos recupera el valor inicial de 90% de A. Para la cuantificación de los polifenoles se usaron las rectas patrones de eriocitrina y de hesperidina.

3.3.2.2 Cuantificación de ácido ascórbico

Se cuantificó la vitamina C contenida en el residuo de limón en forma de ácido ascórbico (AA) y de ácido dehidroascórbico (DHAA) siguiendo el método descrito en González-Molina *et al.*, (2009) con pequeñas modificaciones. Se añadieron 0,25 mL de DL-1,4-ditiotreitol (DTT) 2% y 0,5 mL de Na_2CO_3 0,2 M a 1 mL de la muestra a analizar. A continuación la muestra se incubó durante 10 minutos en oscuridad. Por último, se le añadió 0,83 mL de la fase móvil usada en el método cromatográfico: KH_2PO_4 0,5% y DTT 0,1 % en agua. Se inyectaron 20 μL de la muestra en el equipo de HPLC (Waters Milfor, MA, EEUU). La columna empleada fue C18 de fase reversa Mediterrane Sea, Teknokroma® (5 μm). El método cromatográfico fue isocrático con A (KH_2PO_4 0,5% y DTT 0,1 % en agua): 99% y B (metanol): 1%. Se ajustó a un flujo constante de 1 mL/ min y se leyó a 265 nm (detector Waters 2996, Milford, MA, EEUU). La cuantificación de la vitamina se llevó a cabo mediante una recta patrón de 5 puntos de vitamina C (Sigma Aldrich, Sant Louis, EEUU).

3.3.2.3 Cuantificación de ácido cítrico

La determinación del ácido cítrico se basó en Carballo *et al.*, (2014). Se usó una columna AMinex PX-8H (300 x 7,8 cm) de BioRad y detector Jasco V-1570 a 210 nm. Se inyectaron 100 μL de muestra en la dilución correspondiente. El eluyente usado fue en su totalidad H_2SO_4 0,01 M con un flujo constante de 0,6 mL/ minuto. La cuantificación del ácido cítrico se realizó contra una recta de calibrado en 5 puntos con ácido cítrico (Sigma Aldrich, Sant Louis, EEUU).

3.4 Determinación de proteínas por Bradford test

La determinación del contenido proteico se llevó a cabo mediante el uso de un kit comercial (BioRad) basado el método Bradford. Para la Cuantificación se siguieron las instrucciones del kit y se usó una recta de calibración con Albúmina Sérica Bovina (BSA).

3.5 Capacidad antimicrobiana de los extractos

Se estudió la actividad antimicrobiana de los extractos procedentes del residuo de limón liofilizados, reconstituidos en agua y esterilizados por filtración (filtro de 0,2 μm de poro). Dicha actividad fue testada frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos. Los microorganismos usados, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT-Valencia, España), se han mantenido en condiciones óptimas en el laboratorio de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Farmacia (UB).

Las cepas usadas, el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento se detallan en la **Tabla 8**. Todos los medios de cultivo fueron distribuidos por Oxoid, (*ThermoFisher Cientific* Hamshire, Reino Unido) y esterilizados convenientemente (por autoclave a vapor (JP Selecta, Barcelona, España) a 121°C durante 20 minutos.

3.5.1 Test de difusión en disco

La actividad antimicrobiana del residuo de limón se determinó por el método del test de difusión en disco basado en Santas *et al.*, (2010a) con modificaciones.

Se testaron varios extractos de residuo de limón frente a un gran número de cepas de microorganismos, detalladas en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Relación de microorganismos usados en los test de capacidad antimicrobiana.

Microorganismo	Especie	CECT	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
Bacterias Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	239	TSA	37°C o/n
	<i>Enterococcus faecalis</i>	795	TSA	37°C o/n
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	4308	MRS	37°C o/n., en 5% de CO ₂ *
	<i>Clostridium perfringens</i>	376	CRM	37°C, anaerobiosis**
	<i>Micrococcus luteus</i>	245	TSA	37°C o/n
Bacterias Gram negativas	<i>Escherichia coli</i>	516	TSA	37°C o/n
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	111	TSA	37°C o/n
	<i>Salmonella enterica</i>	4155	TSA	37°C o/n
	<i>Shigella sonnei</i>	4631	TSA	37°C o/n
	<i>Acinetobacter sp.</i>	5798	TSA	37°C o/n
	<i>Proteus mirabilis</i>	170	TSA	37°C o/n
	<i>Serratia marcescens</i>	159	TSA	30°C o/n
Hongos	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	2574	Sb	RT, 4-6 días
	<i>Candida albicans</i>	1394	Sb	30°C 48 h

TSA: Tripton Soja Agar; MRS: de Man, Rogosa and Sharpe; CRM: Clostridium Reinforced Medium; Sb: Saboraud o/n: *overnight*. RT: Temperatua ambiente

* Se usó un incubador de CO₂ (Nuair, Plymouth, EEUU).

** Las condiciones de anerobiosis se crearon por incubación en jarra de anaerobios con AnaeroGen (Oxoid, Thermofisher Scietific, Inglaterra).

Para ello se inocularon los microorganismos a testar en cultivo confluyente mediante la técnica de la doble capa de agar (siembra en agar superficial que permite obtener un crecimiento muy homogéneo en toda la superficie). Se vertieron 5 mL de agar blando (7,5 g/L de agar en el medio de cultivo) atemperado en un baño termostático (J.P. Selecta, Barcelona, España) a 42°C inoculado sobre una placa de agar del medio de cultivo adecuado situada en una superficie totalmente plana. Para el inóculo se usaron 50 µL de un cultivo puro del microorganismo en fase estacionaria ajustando a 5x10⁵ UFC/mL el inóculo final. El agar blando usado para el inóculo de todas las bacterias fue Mueller Hinton (MH) (Oxoid) con la excepción de *Clostridium* y *Lactobacillus*, que fueron inoculados con Medio de cultivo reforzado para *Clostridium* (CRM) (Oxoid) y de Man Rogosa Sharpe Medium (MRS) (Oxoid) respectivamente. Los hongos se inocularon en agar Saboraud (Sb) (Oxoid). Para obtener las resuspensiones microbianas, se centrifugaron los cultivos en fase estacionara a 4000 r.p.m. durante 10

minutos. Los sobrenadantes fueron descartados y el sedimento se resuspendió en igual volumen de Ringer ¼. En el caso de los hongos se realizó una resuspensión de esporas desde un cultivo en placa de agar Sb en Ringer + 0,05% de Tween 80 (Panreac, Barcelona). Para obtener la resuspensión, se vertieron hasta 10 mL de Ringer (en series de 1 mL), se deslizó sin aplicar presión el asa de Kolle en la superficie de las esporas y se recogió la suspensión con la pipeta, inclinando la placa para evitar en todo momento arrastrar micelio.

A continuación se procedió al recuento de microorganismos por el método de dilución y recuento en placa. Los cultivos fueron almacenados para su uso a 4°C un máximo de 24 horas en el caso de las bacterias y hasta 2 semanas en el caso de los hongos.

Se impregnaron discos de antibiograma estériles (Millipore, Merck Millipore, Alemania) (de 6 mm de diámetro) con 15 µL del extracto a estudiar. Se dejaron secar bajo la campana de flujo laminar durante 30 minutos y se impregnaron de nuevo con 15 µL más siguiendo el mismo procedimiento de secado. A continuación, se colocaron los discos sobre las placas inoculadas con agar blando, previamente sometidas a un proceso de secado durante 30 minutos en la cabina de flujo laminar. Se colocaron un máximo de 7 discos por placa, equidistantes entre sí. A continuación, las placas se incubaron en las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo, especificadas en la **Tabla 8**.

El halo de inhibición se calculó siguiendo la siguiente formula:

$$I = \text{diámetro del halo de inhibición (mm)} - \text{diámetro del disco (mm)} \quad (5)$$

donde el diámetro del halo es la media de las medidas del diámetro del halo en vertical y en horizontal.

El efecto pH del extracto de limón como inhibidor del crecimiento, se evaluó en un experimento posterior se replicó el test usando agar blando tamponado (PBS a pH 7,4) en la inoculación de la cepa en lugar de agar blando convencional. Los extractos de té blanco ya habían sido estudiados con anterioridad por el grupo de investigación y los resultados ya estaban publicados (Almajano *et al.*, 2008).

3.5.2 Cuantificación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

La MIC se determinó en los microorganismos que presentaron alguna actividad en el test de difusión en disco usando placas de micro titulación de 96 pocillos según el método descrito en (Fernandez-López *et al.*, 2005). El volumen final por pocillo fue de 100 μ L de Mueller Hinton (MH) o MRS. La concentración del extracto fue de 100 a 0,78 mg/mL. En cada pocillo se inocularon 5 μ L de una suspensión microbiana ajustada a 5×10^5 UFC/mL (en el volumen final). Las placas se incubaron durante 24 h y se determinó su densidad óptica a 620 nm a las 0, 3, 6 y 24 h usando un lector de placas de microtitulación ELISA ELX80 (BioTek, Vermont, EEUU). La MIC es la concentración más baja de extracto que inhibe el crecimiento de cada microorganismo estudiado.

3.6 Actividad de protección frente al estrés oxidativo inducido

Se estudió la protección al material genético y a cultivos celulares que ofrecen los extractos obtenidos frente a un estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.

3.6.1 Capacidad de protección sobre DNA

Se evaluó el efecto protector del extracto de residuo de limón sobre el DNA plasmídico (plásmido pGEM-T de 3000 pb y con banda entre 1000 y 1500 en su conformación plegada) por inhibición de la fragmentación de éste al ser sometido a un estrés oxidativo inducido. El pGEM-T, con resistencia a la ampicilina y de alto número de copia, se aisló de una cepa de *Escherichia coli* mutante (obtenida y conservada por el Departamento Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Universidad de Barcelona) mediante el Kit de extracción plasmídica, Zyppy plasmid Miniprep (Zymo Research, EEUU).

Para el proceso de aislamiento se incubó la cepa o/n a 37°C en Luria–Bertani (LB) caldo suplementado con ampicilina (60 μ g/ mL). El antibiótico fue preparado en una concentración 100 x, filtrado a través de un filtro estéril de membrana de 33 mm de diámetro y 0,2 μ m de diámetro poro (Merk-Millipore, Madrid, España) y añadido en el

medio de cultivo ya esterilizado. La cuantificación del plásmido obtenido (resuspendido en agua MQ, en el último paso del kit) se evaluó mediante la intensidad de banda observada en un gel de electroforesis (agarosa (Sigma Aldrich) al 0,8% en Tampón Tris-acetato-EDTA ((TAE), 50 mM y pH de 7,5-7,8) y 4 μ L de solución de bromuro de etidio (10 mg/ mL) (Sigma, Aldrich, Reino Unido). Para la carga de las muestras se usó tampón de carga 5x (Bioline, EEUU). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 30 minutos. Para visualizar la banda, se colocó el gel en un transiluminador con luz ultravioleta (312 nm) acoplado a una cámara fotográfica (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EEUU). El estrés oxidativo se generó por el radical hidroxilo producido por la reacción de Fenton al mezclar FeSO_4 y H_2O_2 según el método descrito en Tian and Hua, (2005) con algunas modificaciones. La reacción se llevó a cabo mezclando: 4 μ L de pGEM-T; 1,5 μ L de tampón 50 mM (PBS a un pH de 7,4); 1,5 μ L de FeSO_4 , 3 μ L del extracto de residuo de limón liofilizado (50 mg/mL en PBS a pH 7,4) y 2 μ L de H_2O_2 al 30%. En las muestras control se añadió agua MQ en lugar de H_2O_2 . La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalmente, las muestras se cargaron en un gel de electroforesis en las mismas condiciones usadas para visualizar el plásmidos después de la extracción. Como marcador de pesos moleculares se usó HypperLadder I (Bioline), de 10000 a 200 pb; cargado, en al menos un carril, en cada uno de los geles preparados.

3.6.2 Capacidad de protección celular

En estudios previos (Almajano *et al.*, 2011), se determinó la capacidad de protección del té blanco frente al estrés oxidativo inducido en células neuronales animales. Siguiendo la estela de este trabajo, se estudió el efecto de protección del residuo del limón sobre las mismas células (células neuronales inmortalizadas derivadas del tipo salvaje STHdh^{Q7} (descritas ampliamente en Trettel *et al.*, (2000)). La línea celular se mantuvo en cultivos seriados (pases) a 33°C en un incubador de flujo de CO_2 al 5% (Nuair, Plymouth, EEUU) en medio de cultivo DMEM (Medio de Cultivo Dulbecco obtenido por Modificación del Medio de Cultivo Basal Eagle) (Sigma Aldrich, Sant Louis, EEUU), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de

estreptomomicina-penicilina, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 400 µg/mL de gentamicina G418 (Gibco-BRL Gaithersburg, MD, EEUU).

Para la actividad protectora del extracto de residuos de limón, se obtuvieron cultivos neuronales en placas estériles de 24 pocillos con una densidad celular de 1×10^5 células por pocillo. El recuento se obtuvo por recuento visual en cámara de Neubauer (Brand, Alemania). A continuación se expusieron los cultivos durante 24 h a tres concentraciones diferentes del extracto (400, 200 y 100 µg/ mL), previamente esterilizado por filtración por un filtro estéril de 0,2 µm de poro. La inducción del estrés oxidativo se llevó a cabo exponiendo a las células a dos concentraciones distintas de H₂O₂, 200 y 400 µM. Seguidamente se realizó un lavado con tripsina y luego se le adicionó DMEM.

La cuantificación de la viabilidad celular, se midió por citometría de flujo según el método descrito por Sakulnarmrat *et al.*, (2013) con modificaciones. Se usó el equipo de citometría Gallios (Beckman Coulter, EEUU) en el filtro azul (488 nm) añadiendo 4 µL de yoduro de propidio (Invitrogen, Life Technologies, Madrid, España) por muestra; un fluorocromo de tinción nuclear no permeable a las células vivas con máximo de excitación a 535 nm y máximo de emisión a 617 nm. Por cada lectura se fijó una adquisición de 10000 células o un tiempo máximo de paso de flujo por el citómetro 60 s por muestra. Como control se usaron células no tratadas. Los datos obtenidos se procesaron con el programa Summit 4.3 (Dako, Colorado, EEUU), representando los datos en forma de distribuciones de frecuencia y en histogramas donde se representó el número de células y la intensidad de fluorescencia para cada muestra.

4. Aplicación de los extractos en carnes

La posibilidad de aplicar los compuestos y extractos con potencial capacidad antioxidante en carne picada cruda ecológica, sin aditivos añadidos, permite evaluar su efecto en alimentos de vida útil corta y, asimismo, asegurar que el efecto observado es debido sólo al extracto aplicado. Se estudió el efecto del té blanco (WT) en carne envasada en MAP (80% de O₂ y 20% de CO₂), en condiciones de vacío y en atmosfera estándar.

4.1 Preparación de las muestras de carne

Se obtuvo carne ecológica de ternera procedente de la tapa (Ecològica dels Pirineus S.L.-ROIA, La Pobla de Segur, España). Se picó con una picadora semiautomática dos veces a través de una placa con orificios de 4 mm de diámetro (Castellvall PM-160, Riudellots de la Selva, España) lo que permitió obtener una carne muy homogénea. Se añadió sal (15 g de sal/ kg de carne). A continuación, se prepararon porciones de carne en las que se mezclaron diferentes concentraciones de té blanco picado (WT-G) y extracto de té blanco liofilizado (WT-FW) y se elaboraron hamburguesas exactamente iguales pesando la carne y usando un molde para su preparación.

En un primer experimento se comparó la efectividad de ambas formulaciones en la inhibición de la LPO en envasado de atmósfera de aire (atmosfera estándar). Para ello se ajustó la concentración de WT en las hamburguesas según su contenido en TP. Se prepararon hamburguesas con 1,8 g /kg de WT-G y con 0,19 g /kg de WT-FD (lo que equivale a 0,5 g de GAE /kg de carne en todas las muestras). A continuación se realizaron experimentos para determinar la concentración óptima de WT. Se prepararon hamburguesas con WT-G a 5 g /kg, 1,0 g/kg y 0,5 g/ kg y se envasaron en MAP y en vacío, (ORVED Vacuum Sealer - VMF0001, Italia). Además, se prepararon muestras con BHT (0,15g /kg) como control positivo y muestras sin añadir ningún antioxidante (control negativo). Las muestras se colocaron en bandejas de poliestireno para su envasado, y se almacenaron a 4°C protegidas de la luz. En cada bandeja se colocó una

hamburguesa con una formulación distinta de WT-G (más los controles) usando tres bandejas para cada punto de muestreo.

4.2 Seguimiento de la oxidación de la carne

4.2.1 TBARS

El método de cuantificación de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) se emplea en la valoración de la oxidación secundaria de grasas y aceites. Se usó un protocolo basado en el descrito en Lee *et al.*, (1999). A una muestra de 0,5 g de carne se le añadieron 8 mL del reactivo TBARS (15% ácido tricloroacético, 0,375% ácido tiobarbiturico y 2,1% de ácido clorhídrico). Se homogeneizó con un politrón, durante 1 minuto Ultra-Turrax (Ika®-Werke, Staufen, Alemania o PT-300 IKA, según el experimento) e inmediatamente después, las muestras se trataron con ultrasonidos (baño de ultrasonidos Sonowat, Barcelona, España) durante 10 minutos y se sometieron a un baño de agua a temperatura de 95°C durante 20 minutos. Las muestras se centrifugaron (6000 r.p.m., 10 min), el sobrenadante se recuperó y se leyó a 532 nm. Los valores de TBARS se determinaron por una recta patrón con Malondialdehído (MDA). Los resultados se expresaron como mg de MDA/kg de carne.

4.2.2 pH

El pH se determinó según el método descrito en Lee, *et al.*, (1999). Se homogeneizó 1 g de muestra en agua destilada (1/10) usando el politrón (16.000 r.p.m., 1 minuto) y se midió el pH del homogeneizado resultante.

4.2.3 Color

La evaluación del color se realizó según el estándar internacional CEI-Lab (*Commission Internationale d'Eclairage*): a*, b* L* donde: a* determina el rojo, b* el amarillo y L* el brillo (León *et al.*, 2006). Para su cuantificación se tomó la medida del

color en el centro de la carne y en los extremos mediante un colorímetro (Datacolor DC 3891 Elrepho-166, Eichhof Holding AG, Lucerne, Suiza).

4.3 Análisis microbiológico

Se determinaron los microorganismos mesófilos y psicrófilos totales contenidos en la muestra de carne. Para ello se homogenizaron 10 g de carne en 90 mL de Ringer ¼ estéril con un *stomacher* durante 2 minutos. A continuación se hizo un banco de diluciones seriadas en Ringer ¼ y se sembraron 100 µL de la dilución correspondiente en superficie en placas de PCA (Agar para Recuento en Placa). Las placas se incubaron a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 48 h (mesófilos) y a $6 \pm 2^\circ\text{C}$, 7 días (psicrófilos). Los resultados se expresaron en UFC/g de carne.

5. Aplicación en envases activos

5.1 Envase activo antioxidante de PE

El PE es uno de los plásticos más usados en los envases de uso alimentario. Por este motivo se seleccionó como base para desarrollar un recubrimiento activo con propiedades antioxidantes.

5.1.1 Elaboración de los films de PE

Se usó una lámina comercial de PE 200 galgas, 50 µm (Comercial la Bolsera, Barcelona, España), cortada en secciones de 10 x 10 cm. A cada sección se le aplicó el extracto a estudiar mediante recubrimiento por carriles, (Printcoat Instruments, EEUU) usando la barra de cobertura de 24 µm de grosor. Para facilitar la adherencia del extracto al PE, se pre-trató con plasma de Descarga Dieléctrica en Barrera (DBD-plasma) (IRIS, S.L., España) en atmosfera de aire durante 1 minuto a 60 kV y con una

distancia entre electrodos de 2 cm. El equipo de plasma usado es un prototipo desarrollado por la empresa IRIS-Innovació i Recerca Industrial i Sostenible- S.L. y por razones de confidencialidad no es posible proporcionar más información sobre sus características.

5.1.2 Estudio de la capacidad antimicrobiana del plasma

Se estudió la capacidad del DBD plasma (IRIS, S.L.) como método no térmico de descontaminación biológica de superficies. Para ello se probaron tres tratamientos de plasma (6, 60 y 100 segundos a 60 kV) sobre tres microorganismos modelo, *E.coli*, *S.aureus* y *Aspergillus brasiliensis* inoculados sobre membranas de filtración de diámetro de poro de 0,2 μm (Merck Millipore, España). Se realizaron cultivos o/n de las bacterias y una resuspensión de esporas del hongo según se describe en el Apartado 3.5 de este Capítulo. A continuación, se lavaron los cultivos con Ringer +Tween o Ringer $\frac{1}{4}$ por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 10 minutos y se procedió a realizar la cuantificación celular. Se filtró 1 mL de las resuspensiones celulares ajustadas a 10^2 , 10^4 y 10^6 usando un equipo de filtración estéril (Nahita, China) y aplicando vacío (Escofred, Salvador Escoda, Barcelona, España). A continuación, se trataron con plasma las membranas individualmente en el interior de una placa de Petri estéril de 90 mm de diámetro. Una vez tratadas se sembraron en el medio de cultivo correspondiente (TSA para las membranas inoculadas con *E.coli* y *S.aureus*, y agar Sb para las inoculadas con *Aspergillus*). Como control, se sembraron placas con membranas no tratadas. Finalmente se incubaron las placas y se realizaron los recuentos de colonias viables. Los medios de cultivo usado y las condiciones de incubación se resumen en la **Tabla 8**.

También se determinó el efecto del plasma directamente sobre PE. Se usó el tratamiento más efectivo descrito en los ensayos previos inoculando la concentración de microorganismo determinada como susceptible a ser descontaminada en los ensayos previos. Se recortó el film en secciones de igual tamaño que las membranas de filtración y se inocularon por adición de 10 μL del inóculo adecuado en pequeños volúmenes (2 μL) depositados sobre la superficie del film con distribución equidistante.

A continuación los films se dejaron secar bajo condiciones estériles en la cabina de flujo laminar durante una noche. Una vez completamente secos se trataron con plasma individualmente en placas Petri. La evaluación de la efectividad se realizó usando el método de la placa de contacto (RODAC, *Replicate Organisms Direct Agar Count*).

5.1.2 Caracterización de los films de PE

5.1.2.1 Capacidad antioxidante del film

La capacidad antioxidante del film se determinó con el método del radical DPPH descrito en el Apartado 3.1 de este Capítulo. Previamente se realizó la extracción del recubrimiento contenido en el PE. El proceso de extracción se basó en Calatayud *et al.*, (2013) con algunas modificaciones. El film de PE (10 cm x 10 cm) elaborado con 250 μ L de extracto, se cortó en porciones de 10 mm x 10 mm. Estas porciones se sumergieron en un volumen de 5 mL de etanol y fueron sometidas a un proceso de ultrasonidos a 40 Hz (Sonowat, Santa Perpètua de la Mogoda, España) durante 60 minutos a una temperatura de 40°C, protegidas de la luz. Como control de extracción se usó una solución de 250 μ L de extracto de residuo de limón y de extracto de té blanco diluidos directamente en 5 mL de etanol, el mismo volumen que el usado en la extracción por ultrasonidos.

5.1.2.2 Color y opacidad

Se midió el color del film según CEI-Lab (L^* , a^* , b^*) usando un colorímetro (Datacolor, Suiza). La opacidad se determinó según el método descrito en Siripatrawan and Harte, (2010). Se cortaron los films en secciones de 3 cm x 1,5 cm y se midió su absorbancia a 600 nm (Perkin Elmer spectrometer UV/Vis, Massachusetts, EEUU). Como blanco se usó aire. La opacidad se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$T = \frac{A_{600}}{x} \quad (6)$$

donde T es la transparencia y x el grosor en mm. Según esta ecuación, los valores más altos indican menor transparencia y más opacidad de la muestra. El grosor se determinó mediante un micrómetro digital (RS- 705-1229; Reino Unido).

5.1.2.3 Medida del ángulo de contacto

La evaluación del efecto del DBD plasma en la modificación de la superficie del PE, se realizó mediante la medida del ángulo de contacto en agua destilada (WCA). Se usó el equipo *See system E V3* (Advex Instruments, Republica Checa) siguiendo el método descrito en Tian *et al.*, (2012). Todas las medidas se elaboraron en condiciones atmosféricas. El ángulo de contacto se midió tomando fotografías cada 0,1 s y se calculó usando el ángulo obtenido a 0,6 segundos después del contacto de la gota con la superficie del material.

5.1.2.4 Liberación de polifenoles

Se estudió la cinética de liberación de polifenoles a simulantes alimentarios siguiendo el método descrito en Serrano-Cruz *et al.*, (2013) con algunas modificaciones. La elección de los simulantes alimentarios se realizó siguiendo la normativa europea 10/2011/EU (European Parliament, 2011), aplicable a los materiales en contacto con alimentos. Se usaron los simulantes alimentarios A (etanol 10%) e isoctano 100% recomendado por la legislación como sustituto del simulante D2. El simulante A es simulante de carnes y hortalizas y el simulante D2 de alimentos con componentes grasos y de aceite vegetal. Se cortaron porciones de film de 30 mm x 40 mm y se sumergieron en 20 mL de simulante. Se recogieron 0,5 mL de muestra a intervalos regulares. Los tubos se mantuvieron protegidos de la luz, cerrados herméticamente y a temperatura de 20°C.

5.1.3 Actividad antioxidante de los films

Se evaluó la capacidad antioxidante se los films usándolos como films separadores en hamburguesa. Para ello se determinó el TBARS tal y como se describe en el Apartado 4 de este Capítulo.

5.2 Envase activo de PLA

5.2.1 Elaboración de los films de PLA

Se elaboraron films de ácido poliláctico (PLA) en colaboración con el Real Instituto de Tecnología de Estocolmo, Suecia (KTH). El PLA se mezcló en una proporción de 3 a 100 con té blanco. Se homogeneizó en cloroformo. A continuación se llevó a 40°C en agitación continua hasta obtener la total homogenización del PLA. Se decantó sobre placas de Petri de 185 mm de diámetro y se procedió al secado completo de la solución por dos métodos diferentes: a temperatura ambiente y en cabina de extracción de gases durante un periodo de una semana (hasta asegurar la total evaporación del cloroformo). Por último, se acondicionaron los films en un horno de vacío durante otra semana. Durante todo el proceso se mantuvieron los films protegidos de la luz.

5.2.2 Caracterización de los films de PLA

5.2.2.2 Estudio del análisis térmico

Se realizó el análisis Termo Gravimétrico (TGA) usando el equipo Mettler-Toledo TGA/SDTA 851e (Barcelona, España). Para ello se recortaron secciones de film y se colocaron en crisoles de aluminio, sin tapa. Las muestras se calentaron de 50 °C a 600°C con un incremento de temperatura de 10 °C/min. El flujo de oxígeno durante el análisis de TGA fue de 50 mL/min.

También se utilizó la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para evaluar las propiedades térmicas y de cristalización de los films (DSC Mettler-Toledo DSC 820), (Barcelona, España). Se usaron secciones de film de 2 a 5 mg en crisoles de aluminio sellados. Se usó el método basado en Efrati *et al.*, (2014). Las muestras se calentaron desde -30°C a 240 °C con un incremento de temperatura de 10 °C/min y se mantuvieron a 240 °C durante 2 minutos. A continuación se enfriaron las muestras hasta -30 °C usando una disminución de 10 °C/min. Las muestras se mantuvieron a -30 °C durante 2 min y se recalentaron a 240 °C (10 °C/min). Se usó un flujo de nitrógeno

de 50 mL/min. Los termogramas se obtuvieron usando el método descrito en Bor *et al.*, (2012) desarrollado en el KTH, (Estocolmo, Suecia). La temperatura de transición (T_g) se tomó en el punto central de transición en la segunda fase de calentamiento. La temperatura de fusión (T_m) se determinó desde el primer scan desde el pico de fusión. Este pico no se observó en el segundo periodo de calentamiento debido a la lenta cristalización del PLA. Todas las muestras se analizaron por triplicado. El grado de cristalización se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$w_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} * 100 \quad (7)$$

donde w_c es la temperatura de cristalización, ΔH_f es la entalpía de fusión de la muestra y ΔH_f^0 es la entalpía hasta el 100% de cristalización teórica (93 J/g según lo descrito en (Bor *et al.*, 2012).

5.2.2.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Con el objetivo de detectar la presencia del té blanco en los films, se usó la Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), con un microscopio de sobremesa Hitachi TM-1000 (Japón) con un voltaje de 15 kV. Para preparar las muestras los films se colocaron directamente en una cinta de carbono sobre apoyos metálicos. En este equipo, a diferencia de los SEM clásicos, no necesita cubrirse la muestra por grafito u oro, ya que con un juego de equilibrio con el vacío, logra encontrar las condiciones de conducción ideal para que los electrones se mantengan fluyendo sobre la superficie.

5.2.2.1 Actividad antioxidante de los films

La capacidad antioxidante de los films de PLA se llevó a cabo mediante un test en emulsiones aceite en agua (O/W). Las emulsiones, debido a su gran distribución en alimentos y su alta sensibilidad a los cambios físico-químicos (Ries *et al.*, 2010) son usadas como modelo de alimentos y por tanto, candidatas fiables en cuanto a estudios de efectividad antioxidante se refiere (Decker *et al.*, 2005). Las emulsiones se prepararon adicionando aceite de girasol gota a gota sobre una fase acuosa con Tween-

20 disuelto (proporción 10%) por sonicación continua durante 2 minutos (Sonics and Materis, Newton, CT, EEUU). Las proporciones usadas de aceite y agua fueron 10:89. Al aceite se le extrajeron previamente sus antioxidantes naturales, (pasando por alúmina (Al_2O_3) dos veces) con el fin de evitar interferencias de éstos en el estudio.

El tiempo óptimo de sonicación se determinó en ensayos previos. Se probaron tiempos de 30, 60, 90, 120 y 180 segundos y se evaluó el tamaño de gota por observación directa al microscopio óptico (Leica, Alemania), usando el objetivo de 40 aumento y visualizando las muestras en fresco y sin tinción.

La evaluación de la evolución de la oxidación de las emulsiones se realizó por determinación del Valor Peróxido (PV) (oxidación primaria) y TBARS (oxidación secundaria). Para la determinación del PV se usó el método del tiocianato de hierro (II), previa calibración según el método descrito en (Gallego *et al.*, (2013)). Se pesó con una precisión de 0,1 mg de emulsión y se diluyó en una cantidad apropiada de etanol. Se añadieron 1,875% v/v de una solución de cloruro de hierro (II) en ácido hidrociorhídrico (concentración final de 2 mM) y la misma proporción de Tiocianato de amonio (concentración final 2 mM). Se leyó la absorbancia a 500 nm.

La evaluación de la oxidación secundaria se realizó por TBARS usando un método muy similar al empleado en carnes (Apartado 4.1.2.1 de este Capítulo) y descrito con detalle en Gallego *et al.*, (2013).

6. Análisis estadístico de los datos y modelización

6.1 Análisis estadístico

Se usó el software Minitab versión 16 (Minitab Inc., State College, PA, EEUU), Statgraphics Plus 5.1. (Statistical Graphics Corporation, EEUU) y Matlab versión R2013b (The MathWorks Inc., Natick, MA, EEUU). Las figuras y gráficos se realizaron también con Minitab y con Microsoft Excel versión 2010 (Microsoft

Corporation, EEUU). El análisis estadístico se realizó según la metodología analítica descrita en Granato *et al.*, 2014 donde se sugiere usar el test de la normalidad seguido del test de Tukey para comparación entre muestras.

6.2 Metodología de optimización por Superficie Respuesta (RSM)

Se usó el diseño Experimental o Diseño de Experimentos (DoE) para definir los puntos a analizar y la metodología RSM para a modelización y análisis de los datos.

6.3 Ajuste de cinética de extracción

Con la finalidad de evaluar y comparar la cinética de extracción de las muestras de residuo de limón tratadas con diferentes tratamientos de PEF se analizó la cinética de extracción. También se evaluó el ajuste al modelo en el ensayo de cinética de liberación de compuestos antioxidantes. Para esta evaluación, se ajustaron los datos experimentales a la ecuación descrita en López *et al.*, (2009):

$$Y_t = Y_{\max} (1 - e^{-kt}) \quad (8)$$

donde Y_t es la eficacia de extracción en el tiempo t (min); Y_{\max} es la eficacia de extracción en el equilibrio ($t=\infty$) y k es la constante de extracción (min^{-1}). k tiene en cuenta el coeficiente de difusión del extracto de polifenoles, el área total, el volumen del solvente y la geometría de la partícula.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Optimización de la extracción de compuestos polifenólicos

Se ensayaron diversas metodologías para optimizar la extracción de polifenoles a partir de té blanco (WT) y residuos de limón (LW) procedentes de la industria de zumos. Se usó la extracción clásica por disolventes y temperatura para la extracción para el WT y la extracción por presión asistida por campos eléctricos pulsados (PEF) para LW. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

1.1 Optimización de la extracción de polifenoles del té blanco por disolventes y temperatura

Selección de los disolventes de extracción

La elección del disolvente es un factor clave en la optimización de la extracción de compuestos polifenólicos. Varios estudios (Ferruzzi and Green, 2006; Mariya *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011b) han demostrado que los disolventes más efectivos para este fin son etanol y metanol. En este estudio se seleccionó el etanol, más económico que el metanol y de grado alimentario.

Diseño experimental

Se consideraron tres variables independientes: concentración de etanol (% EtOH), tiempo (t, minutos) y temperatura (T, °C). Se programó un diseño de experimentos (DoE) usando el software Minitab 16 (EEUU). Los niveles codificados para las variables independientes se detallan en la **Tabla 9**. Los resultados experimentales (respuestas) se analizaron mediante Metodología Superficie Respuesta (RSM) para llegar al óptimo de extracción.

Tabla 9: Variables y rangos usados en el diseño experimental para el estudio de la Temperatura (T), tiempo (t) y % etanol.

Variables	Rango y nivel		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	40	65	90
tiempo (min)	5	47,5	90
% EtOH	0	48	96

Los niveles del DoE se delimitaron teniendo en cuenta los resultados experimentales obtenidos en pruebas preliminares que tanteaban los niveles máximos de extracción. Al final, se creó un DoE de diseño factorial completo de tres variables a dos niveles (α y $-\alpha$), aumentado con tres replicas en el punto central. Fueron necesarios 17 experimentos para resolver la matriz (se detalla en la **Tabla 10**). Los experimentos se realizaron por triplicado siguiendo el orden aleatorio determinado en el DoE. Los resultados (media \pm desviación estándar (sd)) del análisis de polifenoles totales (TP), capacidad antioxidante (por el método TEAC y ORAC) y composición de polifenoles se resumen en la **Tabla 10**.

El análisis estadístico completo de todos los factores analizados (modelo inicial) muestra algunos valores de p (p-valor) no significativos (**Tabla 10**). Este resultado sugiere que algunos factores no influyen en el modelo. Para llegar a un modelo de optimización de la extracción más fiable, se redujo el modelo inicial, suprimiendo de este los valores de p no significativos. Como resultado (**Tabla 11**) se obtuvo un modelo reducido (modelo final) con un valor de R^2 mayor que el predicho, lo que permitió optimizar el modelo de estima de la respuesta. TP, ORAC, TEAC y la cafeína fueron las respuestas que mostraron un mayor número de interacciones con términos estadísticamente significativos (valores $p < 0,05$) y por tanto fueron lo que obtuvieron un mejor ajuste.

Tabla 10: Diseño experimental y valores experimentales obtenidos a partir de la determinación de polifenoles totales (TP), capacidad antioxidante de los extractos, evaluada mediante TEAC y ORAC, y composición en polifenoles y cafeína.

Ensayo n°	EtOH (%)	t (min)	T (°C)	Valores experimentales							
				TP	TEAC	ORAC	Cafeína	EGC	EGCG	ECG	EC
1	0	5	40	62,4 ± 3,1	596 ± 27	710 ± 83	11,31 ± 6,34	1,19 ± 0,53	3,22 ± 1,97	0,46 ± 0,26	0,55 ± 0,37
2	96	5	40	20,9 ± 2,2	209 ± 23	437 ± 102	2,05 ± 0,43	1,86 ± 0,05	4,97 ± 0,44	1,08 ± 0,08	0,00 ± 0,00
3	0	90	40	95,7 ± 4,1	945 ± 27	1396 ± 146	21,08 ± 0,90	4,00 ± 1,24	9,97 ± 3,58	0,97 ± 0,40	1,86 ± 0,53
4	96	90	40	36,5 ± 8,6	348 ± 92	718 ± 156	3,68 ± 1,42	3,42 ± 1,83	10,50 ± 5,76	2,58 ± 1,36	0,33 ± 0,31
5	0	5	90	96,1 ± 3,5	1067 ± 60	1053 ± 213	28,16 ± 2,13	0,64 ± 0,68	1,92 ± 1,04	0,30 ± 0,06	0,14 ± 0,05
6	96	5	90	31,9 ± 2,9	341 ± 32	548 ± 177	3,52 ± 0,28	1,38 ± 0,21	1,21 ± 0,78	0,28 ± 0,17	0,22 ± 0,06
7	0	90	90	112,6 ± 6,6	1165 ± 132	1355 ± 134	27,84 ± 1,88	1,16 ± 0,61	3,55 ± 2,44	0,64 ± 0,55	0,45 ± 0,45
8	96	90	90	104,8 ± 2,1	1083 ± 50	1405 ± 45	9,18 ± 0,39	5,04 ± 0,20	10,90 ± 4,97	2,17 ± 0,93	1,29 ± 0,17
9	0	47,5	65	94,8 ± 7,9	1042 ± 82	1244 ± 60	22,72 ± 2,26	0,80 ± 0,68	1,60 ± 0,76	0,18 ± 0,08	0,18 ± 0,20
10	96	47,5	65	113,3 ± 24,9	529 ± 126	906 ± 285	3,49 ± 0,83	4,79 ± 2,28	18,73 ± 12,90	4,66 ± 3,15	0,68 ± 0,34
11	48	5	65	148,5 ± 6,8	1777 ± 25	1914 ± 171	27,84 ± 0,82	1,71 ± 1,60	7,81 ± 6,41	1,25 ± 1,07	0,20 ± 0,34
12	48	90	65	138,1 ± 25,6	1433 ± 221	1749 ± 296	20,36 ± 3,38	1,06 ± 0,32	5,88 ± 1,91	0,90 ± 0,43	0,15 ± 0,12
13	48	47,5	40	144,4 ± 16,0	1466 ± 124	2387 ± 467	23,08 ± 1,73	2,01 ± 0,52	10,05 ± 3,88	1,71 ± 0,89	0,44 ± 0,19
14	48	47,5	90	173,4 ± 7,9	1940 ± 117	2174 ± 245	26,66 ± 0,64	4,01 ± 0,20	19,51 ± 2,59	3,20 ± 0,44	1,28 ± 0,42
15	48	47,5	65	163,3 ± 13,8	1674 ± 130	1811 ± 105	25,08 ± 0,11	3,96 ± 0,72	21,25 ± 6,78	3,58 ± 1,02	1,77 ± 0,40
16	48	47,5	65	164,9 ± 7,9	1745 ± 130	1936 ± 205	26,85 ± 1,72	5,03 ± 1,06	27,45 ± 7,87	4,83 ± 1,26	1,31 ± 0,20
17	48	47,5	65	178,7 ± 5,2	1820 ± 60	2132 ± 342	27,48 ± 2,37	4,71 ± 1,23	29,60 ± 10,60	5,40 ± 2,09	2,48 ± 1,10

Resultados presentados como la media de 3 réplicas ± sd. TP: en mg GAE/g ; TEAC en µM TE/g; ORAC: e mg GA/g; Cafeína, EGC, EGCG, ECG y EC en mg /g.

Resultados y Discusión: Optimización de la extracción

Tabla 11: *p*-valor obtenido para cada una de las constantes en la ecuación del modelo matemático.

Termino	<i>p</i> -Valor							
	Respuesta							
	TP	Cafeína	EGC	EGCG	ECG	EC	ORAC	TEAC
Modelo Completo								
Constante	0,986	0,562	0,230	0,742	0,496	0,150	0,003	0,174
% EtOH	0,000	0,000	0,000	0,118	0,000	0,690	0,000	0,000
t (min)	0,008	0,156	0,002	0,007	0,003	0,007	0,170	0,416
T (°C)	0,115	0,337	0,798	0,752	0,960	0,458	0,053	0,724
% EtOH x % EtOH	0,000	0,000	0,610	0,045	0,786	0,270	0,000	0,000
t (min) x t (min)	0,000	0,550	0,004	0,002	0,004	0,000	0,013	0,130
T x T	0,157	0,959	0,470	0,717	0,550	0,563	0,049	0,958
EtOH x t (min)	0,204	0,692	0,490	0,590	0,715	0,175	0,740	0,133
% EtOH x T (°C)	0,344	0,004	0,720	0,730	0,209	0,269	0,276	0,538
t x T	0,184	0,269	0,400	0,940	0,385	0,980	0,671	0,220
Modelo Reducido								
Constante	0,038	0,003	0,027	0,344	0,771	0,069	0,001	0,003
% EtOH	0,000	0,000	0,017	0,060	0,016	-	0,000	0,000
t (min)	0,000	0,000	0,096	0,000	0,130	0,041	0,006	0,000
T (°C)	0,000	0,000	-	-	-	-	0,089	0,000
% EtOH x % EtOH	0,000	0,000	-	0,018	-	-	0,000	0,000
t (min) x t (min)	-	-	0,001	0,000	0,001	0,000	0,052	-
T x T	0,000	-	-	-	-	-	-	-
EtOH x t (min)	-	-	-	-	-	-	-	-
% EtOH x T (°C)	-	0,003	-	-	-	-	-	-
t x T	-	-	-	-	-	-	-	-

Contenido en Polifenoles Totales

El análisis de Polifenoles Totales (TP) por el método Folin Ciocalteu de todos los extractos obtenidos muestra unos resultados en el rango de entre 20,93 a 178,70 mg de GAE/g de té blanco seco picado (WT-G) siendo el valor más alto el obtenido a 47,5 min, 65°C y 48% de etanol (**Tabla 10**).

El modelo final para los TP (**Tabla 11**) resulta en el coeficiente lineal y los coeficientes cuadráticos (EtOH^2t^2) significativos. La respuesta final utilizada en la predicción (usando unidades no codificadas) se muestra en la siguiente ecuación (**Ec. 9**).

$$TP = 24,1036 + 2,3871\text{EtOH} + 1,7821 t + 0,6350 T - 0,0270 \text{EtOH}^2 - 0,0156 t^2 \quad (9)$$

donde TP es la variable de respuesta y EtOH, t y T son respectivamente los valores de las variables independientes, es decir la concentración de etanol, temperatura y tiempo de extracción.

El coeficiente de determinación en una ecuación de regresión múltiple mide la fuerza de la relación entre las variables independientes y la respuesta (dependiente). El valor del coeficiente de determinación de la ecuación de polifenoles del WT es $R^2 = 0,873$, que indica que sólo el 13% de la variación total no es explicada por el modelo.

La representación gráfica de la superficie respuesta y el diagrama de contorno obtenidos usando el modelo, (**Figura 8A**), muestran que la dependencia de TP es cuadrática, y que los resultados óptimos de la extracción (usando una temperatura de 90°C) se obtendrían con un 45% ETOH durante 57 minutos.

En otros estudios (Komes *et al.*, 2011; López *et al.*, 2011; Unachukwu *et al.*, 2010; Zimmermann and Gleichenhagen, 2011) se determinó que el pH también puede ser un factor clave en la extracción de polifenoles. En concreto, en el último trabajo mencionado se obtuvo un aumento del 20% en la extracción de algunos polifenoles (ECG) en soluciones de pH=3. Este efecto se atribuye a dos mecanismos posibles; a que a pH bajo, puede aumentar la difusión de los flavonoides desde el material vegetal a la fase acuosa y/ o a que a estos valores de pH se degradan las estructuras vegetales permitiendo una mejor accesibilidad del solvente a los compuestos celulares.

Algunos trabajos (Del Río *et al.*, 2004; González-Molina *et al.*, 2008), presentan la extracción de TP del té usando el jugo de limón para bajar el pH sin considerar su aporte en antioxidantes. Esto sugiere que la capacidad antioxidante del WT enmascara la del limón.

Composición

Se analizó el contenido de cafeína, EGC, EGCG, ECG, EC, catequina y ácido gálico (GA) de todos los extractos obtenidos mediante cromatografía MECK. En ninguno de ellos se detectó la presencia de catequina ni de GA. En la **Tabla 10** se muestran los valores obtenidos.

Los niveles de cafeína alcanzados se encuentran en el rango de entre 2,05 y 28,3 mg/GAE/g WT (en peso seco). Los valores mínimos se obtienen en las extracciones con la concentración más alta de etanol; resultado coherente si se tiene en cuenta la polaridad de la molécula de cafeína (muy soluble en agua).

La cafeína muestra una respuesta final al modelo con un buen ajuste ($R^2 = 0,89$). La ecuación, **Ec. 10**, recoge dicho ajuste.

$$\text{Cafeína} = 7,93192 + 0,41115 \text{ EtOH} + 0,21984T - 0,00481\text{EtOH}^2 - 0,00166 \text{ EtOH} \times T \quad (10)$$

El resto de polifenoles cuantificados, EGC, EGCG, ECG y EC tienen un número reducido de términos y de interacciones con p -valor estadísticamente significativos, todas las ecuaciones resultantes muestran un valor de R^2 bajo (<50). Estas ecuaciones (**Ec. 11**, **Ec. 12**, **Ec. 13** y **Ec. 14**) no se han considerado, pues no explican el modelo.

$$\text{EGC} = 0,02699 + 0,017374\text{EtOH} + 0,095928t - 0,000814t^2 \quad (11)$$

$$\text{EGCG} = -2,531099 + 0,28984\text{EtOH} + 0,53818t - 0,00238\text{EtOH}^2 - 0,001275t^2 \quad (12)$$

$$\text{ECG} = -0,771369 + 0,016495\text{EtOH} + 0,130307t - 0,001275t^2 \quad (13)$$

$$\text{EC} = 0,016882 + 0,041244t - 0,000360t^2 \quad (14)$$

Los resultados no significativos sugieren que el modelo TP responde a un efecto sinérgico de todas las catequinas contenidas en la muestra.

A pesar de este mal ajuste, los resultados experimentales muestran que el contenido de ECG estuvo en el rango de 0,64 a 5,04 mg GAE/g WT. En el trabajo de López *et al.*, (2011) se obtuvieron valores de ECG similares (7,95 mg/g de WT) usando un método de extracción ácida. Por otro lado, Rusak *et al.*, (2008) mediante HPLC determinaron un contenido de ECG en sus muestras 10 veces más elevado (42,3 mg/g de WT) aplicando también una extracción ácida. Este último autor alcanzó los 34,4 mg de ECG/g de té seco utilizando un 40% de etanol durante 30 minutos y 12,9 mg/g de té seco, con un 70% de etanol.

La concentración de EGC en el conjunto de los extractos estuvo en el rango entre 1,21 y 29,60 mg/g WT-G. La extracción máxima se logró a una concentración de etanol de entre 48 y 96% durante 47,5 minutos y a un rango de temperaturas de 56 a 90°C. Otros autores (Rusak *et al.*, 2008) lograron extraer EGC en un rango entre 40,2 y 154 mg/ g de WT-G en té envasado en formato comercial en bolsitas y obtuvo una concentración de entre 38,9 y 129 mg/g de WT-G en hojas sueltas. A pesar de que estos valores son superiores a los obtenidos en el presente estudio, otros autores como López *et al.*, (2011) presentaron valores de EGC en rangos similares (11,1 mg/EGC/g de té blanco) a los aquí obtenidos.

Los valores máximos de EC (2,48 mg/g WT-G) se obtuvieron a 48% de EtOH, 47,5 min y 65°C. En otras condiciones se obtuvieron valores inferiores a 1 mg/g WT-G en todos los casos. Los resultados obtenidos son similares a los mostrados en López *et al.*, (2011), quienes lograron 2,13 mg/g WT-G.

Capacidad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante por dos métodos distintos, el TEAC y el ORAC. Se usaron dos métodos a fin de contrastar los resultados obtenidos por (Tabart *et al.*, 2009; Zulueta *et al.*, 2009) quienes afirman diferencias significativas en la determinación de la capacidad antioxidante según la técnica empleada. Describen al método TEAC como el más simple y barato de los dos pero con posibilidad de subestimar la capacidad antioxidante real. Por otro lado, Tabart *et al.*, (2009) propusieron usar la media de los

valores de cuatro métodos distintos de análisis como la mejor estima de la actividad real de la muestra.

Los resultados se procesaron estadísticamente y se optimizó la respuesta por RSM. Asimismo se realizó un estudio comparativo entre ambos métodos, estudiando la correlación existente entre ellos y entre la capacidad antioxidante y el contenido en TP.

a) TEAC

Los resultados experimentales obtenidos se detallan en la **Tabla 10**. Existen diferencias destacables entre las distintas condiciones usadas, con rangos entre los 209 y 1940 $\mu\text{M TE/g WT}$. El análisis por RSM, representado mediante un diagrama de contorno (**Figura 8B**), muestra que la capacidad antioxidante es más elevada en extracciones con un porcentaje de etanol entre el 40 y el 50%. El máximo se alcanza al aplicar condiciones de 43,7% de EtOH durante 90 minutos. El diagrama de superficie muestra dependencia cuadrática del % de EtOH y dependencia lineal en el tiempo de extracción. Todos los coeficientes lineales fueron, otra vez, significativos, pero solo se incluyó uno de los coeficientes cuadráticos (EtOH^2). El modelo de respuesta final para predecir los valores de TEAC se muestra en la siguiente ecuación:

$$TEAC = 325.540 + 33.821EtOH + 2.314t + 8.126T - 0.384EtOH^2 \quad (15)$$

donde TEAC es la variable de respuesta. El valor del coeficiente de determinación obtenido es $R^2 = 0,91$; (sólo el 9% de la variación no es explicada por el modelo), por lo que se puede deducir que hay una buena correlación entre el valor de TEAC y las variables independientes.

Las muestras 14 y 17, presentan los valores TEAC más elevados y a su vez los valores máximos en la determinación de TP. El polifenol mayoritario detectado es EGCG. Se han obtenido concentraciones moderadas de ECG y EGC y bajas de EC (**Tabla 11**).

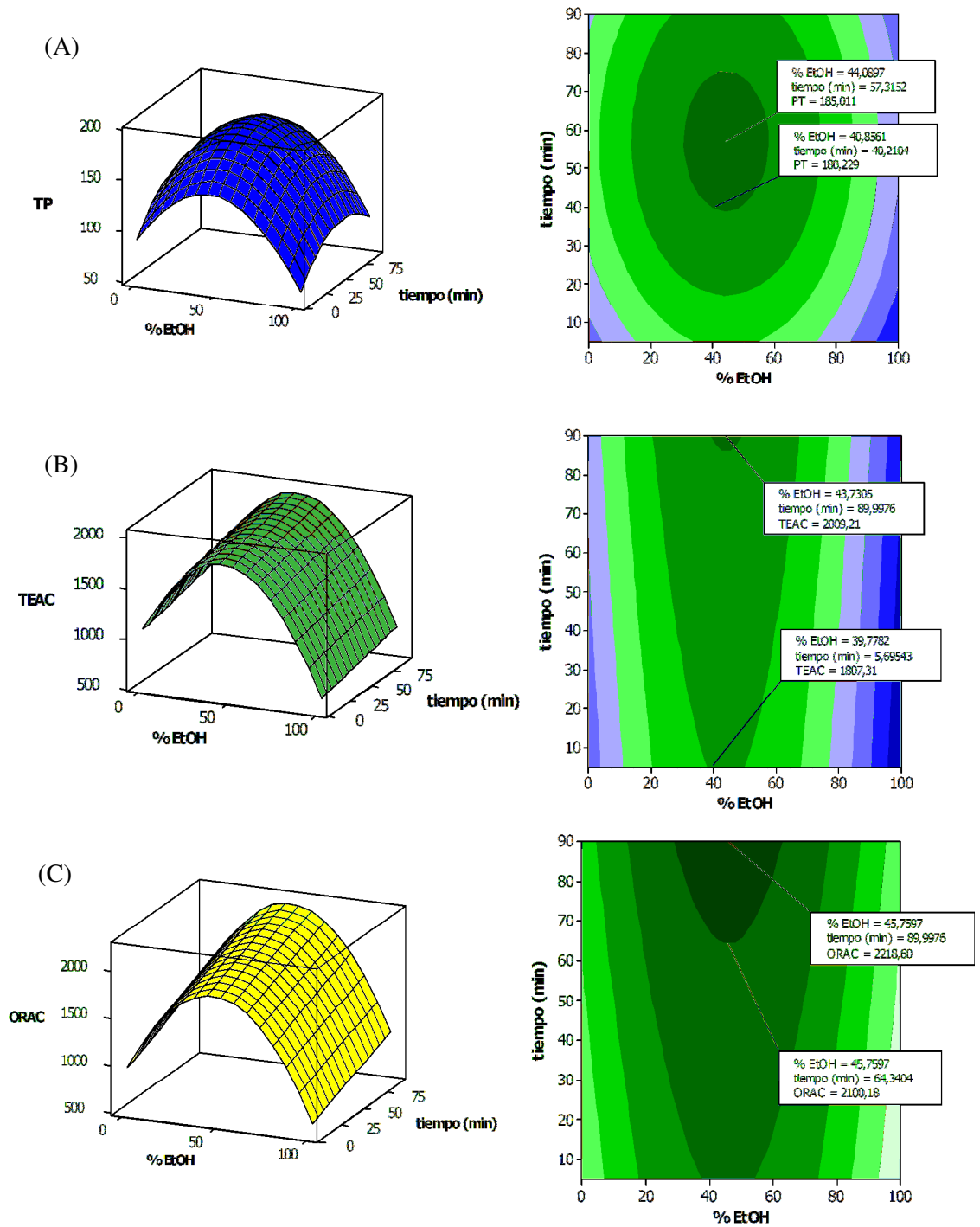


Figura 8: Diagramas de superficie de respuesta (izquierda) y diagramas de contorno (derecha) que muestran el efecto de la concentración de etanol (%) en las extracciones de WT y las relaciones con la capacidad antioxidante evaluada mediante TP, TEAC y ORAC. (A) RSM para TP y EtOH, (B) RSM para TEAC y ETOH, y (C) RSM para ORAC y EtOH.

Salah *et al.*, (1995) estudiaron la actividad antioxidante relativa para las catequinas presentes en el té mediante el método TEAC. Obtuvieron una relación en el orden de ECG>EGCG>EGC>EC, y por tanto se puede afirmar que tanto ECG como EGCG aportan una contribución significativa a la capacidad antioxidante de los extractos. Asimismo, estos resultados fueron confirmados por Azman *et al.*, 2014 quienes demostraron por Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), que la presencia de grupos galato en las catequinas conlleva un aumento en la capacidad antiradicalaria y por tanto un aumento de la actividad antioxidante.

b) ORAC

El modelo inicial usando los valores de ORAC señala que sólo son estadísticamente significativos dos coeficientes lineales (EtOH y t) y un coeficiente cuadrático (EtOH²). Así se determina que el factor temperatura no interfiere en el modelo pero sí lo hace el % de etanol. El modelo de respuesta final para predecir el ORAC se representa gráficamente en la **Figura 8C** y se define por la siguiente ecuación:

$$ORAC = 932.682 + 38.017EtOH + 4.615t - 0.415EtOH^2 \quad (16)$$

donde ORAC es la variable de respuesta. El valor del coeficiente de determinación obtenido para la ecuación es $R^2 = 0,791$, lo que indica que menos del 21% de la variación total no está explicada por el modelo.

Correlación entre TP, TEAC y ORAC

El estudio de la correlación existente entre los métodos de determinación de la capacidad antioxidante y el contenido en TP (**Figura 9**), muestra que existe una elevada correlación entre todos ellos.

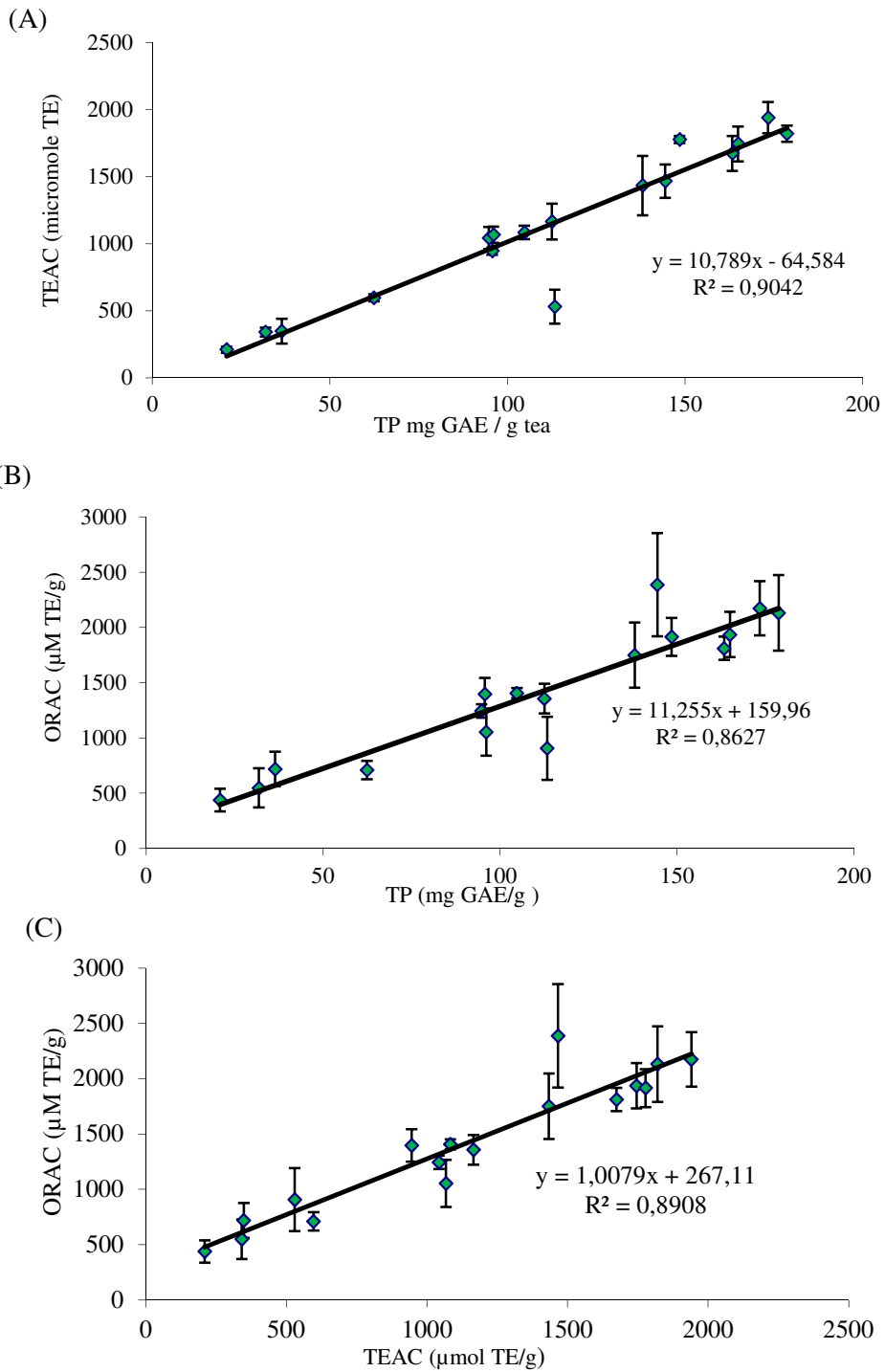


Figura 9: Correlación entre TEAC, ORAC y Polifenoles Totales (TP). (A) Correlación entre TEAC y TP, (B) ORAC y TP y (C) ORAC y TEAC.

La correlación más elevada es la obtenida entre los TP y los valores de TEAC, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,90$. La correlación entre TP y los valores de ORAC es algo más baja ($R^2 = 0,86$). Este hecho se puede atribuir a que el método TEAC sólo mide la actividad del antioxidante de inhibir un solo electrón. El ORAC combina el tiempo y la magnitud de la inhibición, por lo que el efecto de antioxidantes de reacción lenta y los de reacción rápida son distintos en este ensayo, pero no en los ensayos de TP o TEAC.

Las tres variables en el proceso de extracción tienen efectos significativos en los valores de polifenoles y de TEAC. El EtOH y el tiempo tuvieron efectos mayores en los valores de ORAC, mientras que la temperatura tuvo menor efecto.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores como Rusaczonok *et al.*, (2010) o Salah *et al.*, (1995) o donde se demuestra la existencia de una alta correlación entre la actividad antioxidante del TEAC y del ORAC.

Análisis de Superficie Respuesta

En la **Figura 8** se muestran los diagramas de superficie del RSM, en los que se representaron las respuestas ajustadas frente a cambios en los factores: % EtOH y tiempo. La temperatura se mantuvo fija a tres niveles distintos (40, 60 y 90°C). El EtOH y el tiempo están representados en el eje de las x y el TP, el TEAC y el ORAC lo están en el eje de las y. Las condiciones óptimas para la extracción de los polifenoles del té predichas por la ecuación fueron: EtOH= 45%, t= 57 min y T= 90°C. Igualmente, las condiciones para los extractos con valores óptimos de TEAC predichos por la ecuación fueron EtOH= 40%, t= 90 min y T= 90°C. Finalmente, las condiciones para los extractos con valores óptimos de ORAC predichos por la ecuación fueron: EtOH=40-60% y t= 60 min, con ningún efecto significativo de la temperatura.

De esta forma, se describen que los extractos con más actividad antioxidante y de mayor contenido en TP serán los obtenidos a temperaturas de 90°C, alrededor del 40% de EtOH y a un tiempo de extracción de entre 60 y 90 minutos.

1.2 Mejora de la extracción de polifenoles procedentes del residuo de limón por presión y campos eléctricos pulsados

Una de las técnicas más novedosas usadas en la extracción de compuestos antioxidantes son los Campos Eléctricos Pulsados (PEF). Estos producen daños en la estructura celular de los tejidos, aumentando la permeabilidad celular. En este trabajo, los PEF se han usado como pre-tratamiento en la extracción convencional por presión, usando como único solvente el agua. Como materia prima se ha usado el residuo de limón (LW) desprovisto de pulpa y semillas.

Evaluación de la permeabilización producida por el PEF en el residuo de limón

Como paso previo al tratamiento con PEF, se optimizaron las condiciones de trabajo. Se determinó su efecto a varias condiciones de tratamiento y se cuantificó la permeabilización causada en las células usando el Índice de Desintegración Celular (Z_p). Se testaron intensidades de campo eléctrico (EF) de 3, 5, 7 y 9 kV/cm durante un periodo de 1 a 100 pulsos. Cada pulso tiene una duración de 3 μ s con lo que, calculado en unidades de tiempo, se aplicaron tratamientos de 0 a 300 μ s. En la **Figura 10** se muestran los Z_p obtenidos en los diferentes tratamientos.

En general se observa que un incremento en la intensidad de EF y el tiempo de tratamiento producen un aumento en la permeabilización celular. Se alcanza un $Z_p > 0,5$ al aplicar las condiciones de trabajo más intensas, 9 kV/cm, 100 pulsos. Además, los valores de Z_p , independientemente de la intensidad de EF aplicada, aumentan exponencialmente hasta alcanzar los 30 pulsos. A partir de este punto, el incremento es más progresivo.

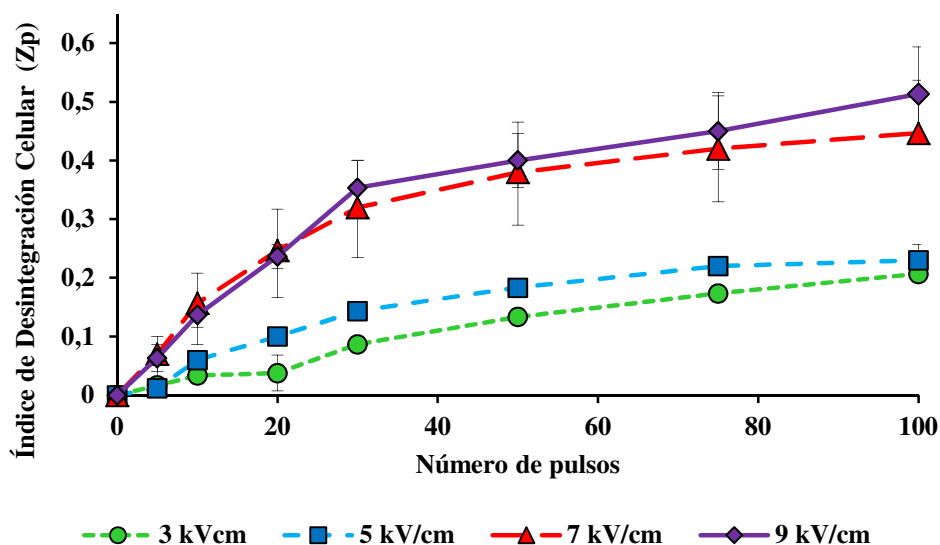


Figura 10: Influencia de la intensidad de campo eléctrico y del número de pulsos en el índice de desintegración celular (Z_p) del residuo de limón a distintos EF.

El análisis de la influencia de EF en relación al daño celular producido define dos tendencias diferenciadas, por un lado, las muestras tratadas a 5 kV/cm o menos obtienen un Z_p bajo ($Z_p < 0,2$) y por otro, las tratadas a 7 kV/cm o más muestran un $Z_p > 0,4$.

El análisis estadístico de comparación entre grupos (Test de Tukey) de los valores de Z_p a tiempo final muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de 3 y 5 kV/cm ni entre los de 7 y 9 kV/cm. Así se define como el tratamiento de EF más efectivo y energéticamente menos costoso el de 7 kV/cm.

Como resultado final del test se define que, las condiciones óptimas para el tratamiento de los residuos de limón son de 30 pulsos y 70 kV/cm. La aplicación de un número superior de pulsos o de un campo eléctrico superior no produciría un incremento significativo en los valores Z_p .

Otros autores (Luengo *et al.*, 2013), realizaron un estudio similar usando piel de naranja y obtuvieron valores de Z_p inferiores a los alcanzados en el residuo de limón a tiempos

de tratamiento similares ($Z_p = 0,3$ a 7 kV/cm). Sin embargo, los valores de Z_p obtenidos por Ersus and Barret, (2010) en rodajas de cebolla son algo superiores, de hasta $0,57$, usando EF de sólo 3 kV/cm. Esto sugiere que las características del tejido vegetal empleado (porosidad, rigidez, etc.) son un factor a considerar en la determinación de las condiciones óptimas en el tratamiento por PEF.

Análisis de la influencia del tamaño de la muestra en el pretratamiento con PEF

Habitualmente, el material vegetal destinado a ser usado como fuente de polifenoles es sometido a procesos de triturado o picado. Algunos autores (Ersus *et al.*, 2010) han demostrado que el uso de los PEF no requiere estos procesos y es posible optimizar el la extracción en muestras de cebolla de hasta 4 cm de diámetro y 2 cm de grosor.

En este trabajo se ha estudiado la hipótesis de usar LW no triturado en y ha analizado la influencia del tamaño en el proceso de extracción. Se ha trabajado con 3 tamaños distintos de LW, 1 , 2 y 3 cm de diámetro y aproximadamente de $0,4$ cm de grosor. El grosor es dependiente del tamaño natural del albedo y el flavelo de limón y ambos pueden variar unos milímetros según el fruto y/o la zona del fruto usada.

Las muestras se trataron a las condiciones de PEF establecidas previamente de 30 pulsos (90 μ s) de 7 kV/cm. Posteriormente se sometieron a un proceso de extracción por presión de 5 bar durante 30 min usando agua como solvente. Se determinó el contenido en TP siguiendo el método de Folin Ciocalteau y se analizaron los resultados comparando el contenido en TP con muestras donde sólo se aplicó presión (muestras control).

Los resultados (**Figura 11**), señalan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras control y las muestras tratadas con PEF. En las muestras sin PEF, los niveles de extracción de TP varían significativamente según el tamaño del residuo (1 cm: $98,63 \pm 5,32$; 2 cm: $75,84 \pm 2,5$; 3 cm: $64,56 \pm 10,33$ mg GAE/100 g FW). Sin embargo, en las muestras donde se usaron los PEF, las diferencias entre tamaños son mínimas (1 cm: $163,89 \pm 4,38$; 2 cm: $163,56 \pm 3,91$; 3 cm: $161,46 \pm 2,82$ mg GAE/100 g FW) y no estadísticamente significativas.

Las diferencias en las muestras control se podrían explicar únicamente por la transferencia de masas (sólido/líquido) y atribuir las a las diferencias de tamaño de la matriz (Janositz *et al.*, 2011; Puértolas *et al.*, 2010a). Por el contrario en las muestras tratadas con PEF, el tamaño de muestra no resulta ser un factor a considerar. Con independencia del tamaño, el tratamiento con PEF incrementa la extracción de TP, de media, en un 204,54%. Esto implica que esta tecnología aporta ventajas industriales, aumenta la extracción de TP y permite suprimir el paso de triturado en procesos de reutilización de residuos agroalimentarios.

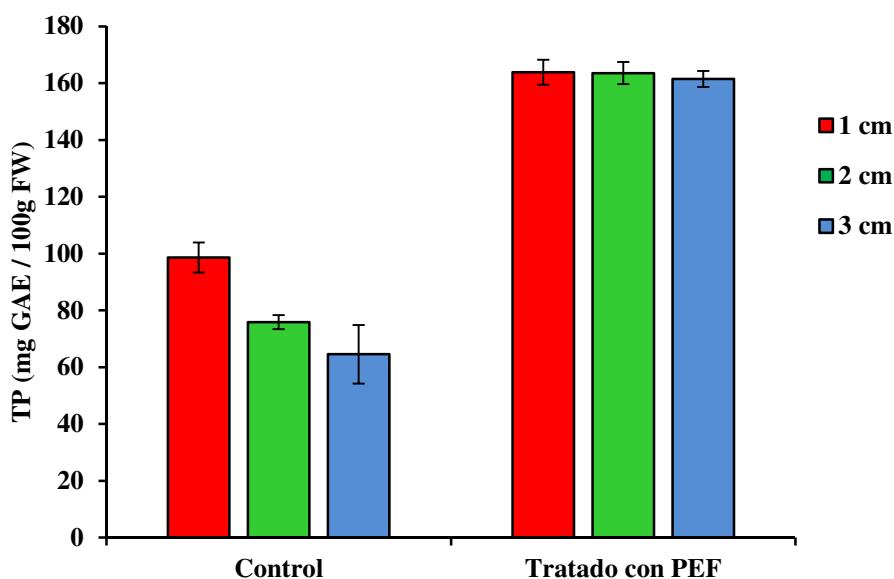


Figura 11: Efecto del tamaño del residuo de limón en la extracción de polifenoles totales en tratamientos de 90 μ s a 7 kV/cm.

Efecto del tratamiento de PEF en la extracción de polifenoles por presión

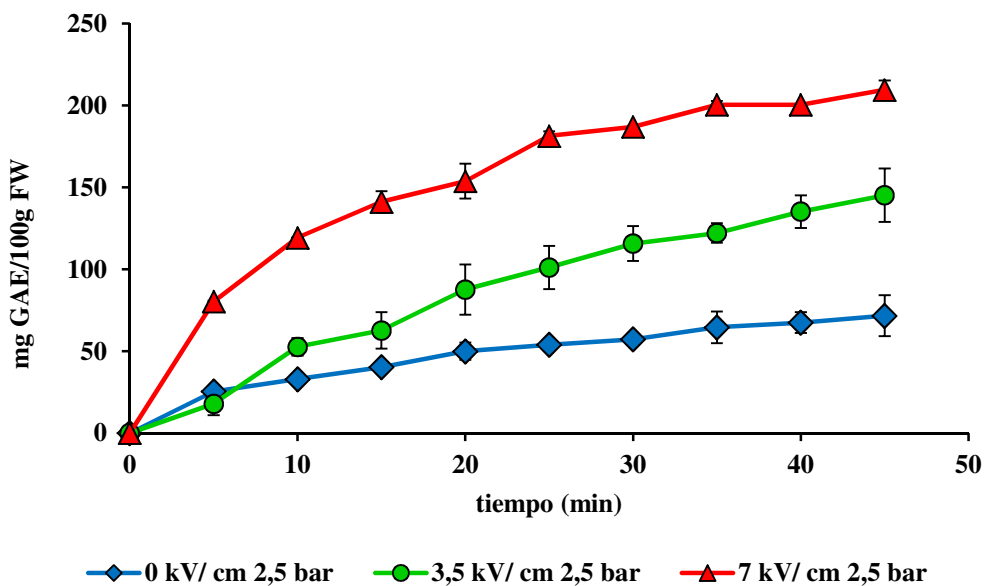
Se realizaron extracciones usando muestras de 3 cm de diámetro a 0, 2,5 y 5 bar de presión con pre-tratamiento de PEF de 0, 3,5 y 7 kV/cm y 30 pulsos de duración. Durante el proceso de extracción, se tomó muestra cada 5 minutos y, se estudió la evolución de TP a lo largo de un total de 45 minutos. Algunos de los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 12**. Además, con la finalidad de explicar las interacciones obtenidas, en la **Figura 12**, se representan gráficamente algunos de estos resultados en forma de curva de extracción.

Tabla 12: Resultado del análisis de Polifenoles totales, ORAC, Eriocitrina (E) y Hesperidina (H) a varios campos eléctricos (EF), a diferente presión de extracción (P) a tiempos (t) 5, 25 y 45 minutos.

EF (kV/cm)	P (bar)	t (min)	TP (mg GAE/100 g)	ORAC (μ M TE/100 g)	E (mg/ 100 g)	H (mg/ 100 g)
0	0	5	21,86 \pm 0,63	158 \pm 137	7,76 \pm 0,35	3,42 \pm 0,46
		25	45,97 \pm 1,56	661 \pm 105	9,78 \pm 0,35	5,00 \pm 0,57
		45	58,58 \pm 1,25	1000 \pm 30	30,39 \pm 2,12	15,9 \pm 2,12
0	2,5	5	25,40 \pm 3,13	354 \pm 58	8,43 \pm 2,57	3,74 \pm 1,51
		25	53,94 \pm 2,82	642 \pm 79	10,73 \pm 3,76	4,77 \pm 1,35
		45	71,63 \pm 12,52	1038 \pm 14	34,37 \pm 3,66	17,5 \pm 2,19
0	5	5	17,67 \pm 4,69	109 \pm 34	10,01 \pm 3,44	4,47 \pm 1,21
		25	63,58 \pm 8,77	623 \pm 14	16,72 \pm 2,01	7,89 \pm 1,99
		45	94,97 \pm 13,47	1043 \pm 28	44,20 \pm 0,03	27,92 \pm 0,00
3,5	0	5	32,70 \pm 4,07	399 \pm 20	9,53 \pm 0,61	4,68 \pm 0,55
		25	61,68 \pm 0,63	770 \pm 90	10,90 \pm 0,34	5,35 \pm 0,15
		45	93,37 \pm 17,55	1411 \pm 40	36,29 \pm 5,15	20,64 \pm 6,01
3,5	2,5	5	17,88 \pm 6,89	557 \pm 40	13,12 \pm 0,05	6,19 \pm 0,67
		25	101,06 \pm 13,14	1530 \pm 85	25,94 \pm 3,85	12,87 \pm 1,90
		45	145,13 \pm 16,27	2221 \pm 138	79,52 \pm 7,33	38,16 \pm 6,23
3,5	5	5	77,17 \pm 10,65	1200 \pm 132	23,55 \pm 6,41	14,14 \pm 3,8
		25	175,84 \pm 0,63	2427 \pm 55	59,59 \pm 0,86	30,63 \pm 1,03
		45	230,04 \pm 4,07	2844 \pm 33	150,06 \pm 10,30	72,43 \pm 6,71
7	0	5	43,10 \pm 3,75	814 \pm 170	12,92 \pm 1,76	7,73 \pm 0,57
		25	85,27 \pm 6,88	1485 \pm 246	20,17 \pm 2,76	11,71 \pm 0,34
		45	119,80 \pm 5,94	2015 \pm 208	30,14 \pm 2,01	17,04 \pm 4,28
7	2,5	5	80,27 \pm 0,63	1312 \pm 60	26,16 \pm 1,66	13,42 \pm 1,28
		25	181,37 \pm 2,82	2234 \pm 233	49,09 \pm 10,40	22,47 \pm 3,79
		45	209,47 \pm 5,63	3008 \pm 238	176,35 \pm 15,39	84,44 \pm 8,35
7	5	5	65,44 \pm 3,44	1063 \pm 106	59,13 \pm 7,98	36,85 \pm 6,39
		25	172,96 \pm 15,33	2298 \pm 13	90,69 \pm 0,75	52,57 \pm 5,38
		45	227,83 \pm 22,21	2931 \pm 58	167,84 \pm 3,52	91,87 \pm 3,82

Resultados mostrados como la media \pm sd de tres réplicas. EF: kV/cm; P: presión, bar.; TP: mg GAE/100 g; ORAC: μ M TE/100 g; E= eriocitrina en mg/ 100 g; H= hesperidina en mg/100 g.

(A)



(B)

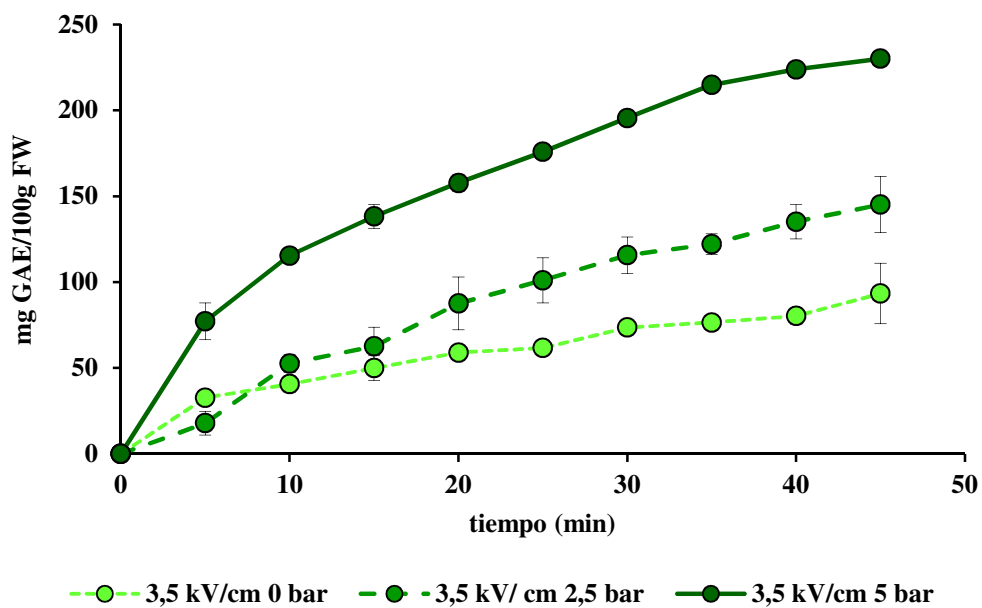


Figura 12: Análisis de la cinética de extracción de polifenoles totales (TP). (A): tratamientos de 2,5 bar y diferentes intensidades de campo eléctrico 0, 3,5 y 7 kV/cm. (B): tratamientos de 3,5 kV de campo eléctrico y diferentes presiones.

El efecto de la EF en la extracción por presión a lo largo del tiempo se ilustra en la **Figura 12A**. Los resultados muestran que el contenido en polifenoles mejoró considerablemente al incrementar el EF. Por ejemplo, a tiempo final (45 min) la concentración de TP en las muestras pre-tratadas con EF de 7 kV/cm y 3,5 kV/cm aumentó el 292% y el 144% respectivamente en comparación con las muestras control (sin pre-tratamiento de PEF).

En la **Figura 12B** se observa el efecto de la intensidad de la presión aplicada. Las curvas de extracción obtenidas señalan un incremento en el contenido en TP al aumentar la presión aplicada. En concreto, a presiones de 2,5 y 5 bar aumenta en un 156% y en un 247% respectivamente, en comparación con las muestras control (sin presión). La misma tendencia (gráficamente no representada) se observa en los otros tratamientos de PEF. Esto implica un incremento en la extracción de TP cuando la presión y la energía aplicada en la extracción son más elevadas.

Otros autores obtuvieron resultados similares a los encontrados. Luengo *et al.*, (2013) demostraron un incremento de hasta el 192% en la extracción de TP en los tratamientos de EF = 7 kV y Parniakov *et al.*, (2013) obtuvieron un incremento del 100% en la extracción de TP a partir champiñones (*Agaricus bisporus*).

Análisis de la cinética de extracción de TP

Se analizó el ajuste de la extracción al modelo descrito en López *et al.*, (2009) y utilizado en Luengo *et al.*, (2013). Se calculó la Y_{\max} (eficacia de extracción al equilibrio) y los k-valores (velocidad de la extracción), sus límites de confianza y el coeficiente de determinación (**Tabla 13**).

En general, los EF más elevados presentan valores más altos de extracción (Y_{\max}). Estos resultados están en concordancia con otros trabajos como son los de López *et al.*, 2009 o los de Spigno *et al.*, 2007.

Tabla 13: Y_{\max} y K-valores obtenidos del ajuste a la ecuación 8, curva de eficacia de la extracción de polifenoles.

EF (kV/cm)	Presión (bar)	Y_{\max}	95% CL	K (min^{-1})	95% CL	R^2
0	0	6,16	5,71 - 6,62	0,062	0,048 - 0,076	0,981
	2,5	7,91	6,39 - 9,42	0,048	0,024 - 0,082	0,940
	5	13,78	2,73 - 24,84	0,026	0,000 - 0,062	0,851
3,5	0	8,53	7,583 - 9,488	0,062	0,042 - 0,082	0,965
	2,5	18,04	10,02 - 26,06	0,036	0,003 - 0,069	0,873
	5	24,84	22,72 - 26,97	0,054	0,041 - 0,066	0,983
7	0	8,99	8,37 - 9,61	0,122	0,084 - 0,159	0,945
	2,5	21,01	19,91 - 22,04	0,075	0,062 - 0,087	0,988
	5	23,11	20,53 - 25,70	0,055	0,038 - 0,072	0,972

CL: Límites de Confianza

El análisis estadístico de los valores de Y_{\max} revela que en las muestras tratadas sin PEF no hay diferencias estadísticamente significativas. Esto implica la necesidad de usar la tecnología de PEF en la maximización de la extracción de compuestos bioactivos del LW.

Los valores de Y_{\max} obtenidos a 2,5 bar de presión muestran un aumento en función del EF aplicado. Se obtienen los valores de Y_{\max} más altos a 7 kV/cm. Sin embargo, esta relación no se observa a 5 bar de presión. Se obtiene el valor más elevado de Y_{\max} a 3,5 kV/cm.

El análisis estadístico de los valores de Y_{\max} obtenidos a 3,5 y 7 kV/cm demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratadas con 2,5 y 5 bar de presión. Esto sugiere que al aplicar estas condiciones de EF y presión se llega al máximo de extracción al equilibrio.

Por otro lado, los valores de K obtenidos, son similares en todas las condiciones estudiadas. El análisis estadístico señala que sólo existen diferencias estadísticamente significativas a 7 kV/cm sin presión. En estas condiciones se obtienen valores significativamente más elevados. Este resultado determina que la aplicación del

tratamiento de PEF a 7 kV/cm aumenta significativamente la velocidad de la extracción.

Los coeficientes de correlación reflejan en general un buen ajuste a la ecuación (con R^2 entre 0,85 y 0,98). El ajuste en las muestras donde no se ha aplicado es superior a 0,94 en todas las condiciones.

Correlación entre la extracción de polifenoles y la actividad antioxidante

Algunos autores (Zhang *et al.*, 2010) sugieren que los PEF pueden modificar y/o causar daños en la actividad de ciertas moléculas. Con el objetivo de comprobar el efecto del tratamiento en la actividad antioxidante, se realizó la cuantificación de esta actividad por el método ORAC, el más sensible de los normalmente aplicados.

Los resultados obtenidos **Tabla 12**, muestran una elevada actividad antioxidante en los extractos con alto contenido en TP. El estudio de la correlación entre ambos métodos se representa gráficamente en la **Figura 13**.

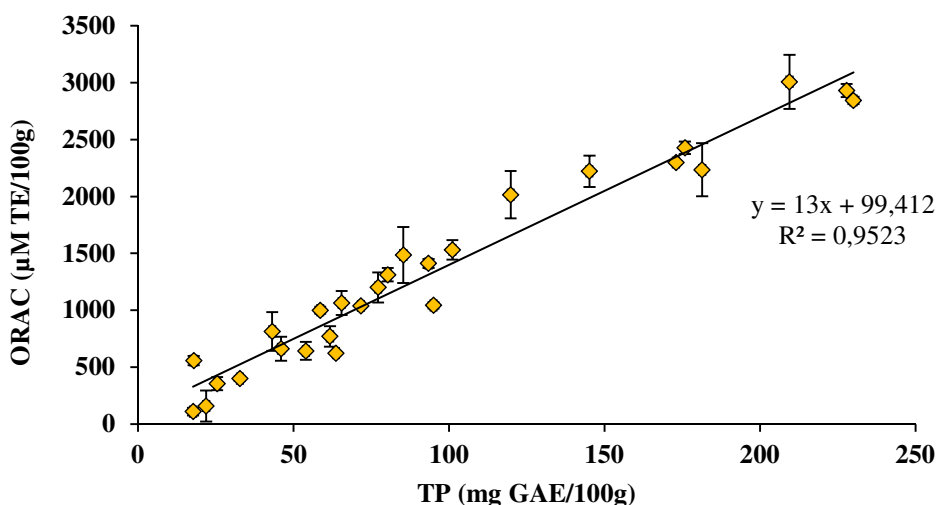


Figura 13: Correlación entre la concentración de TP y capacidad antioxidante por el método ORAC.

El coeficiente de correlación obtenido, $R^2 = 0,95$, es más elevado que el alcanzado en el estudio de optimización de la extracción de polifenoles del WT (Apartado 1 de este Capítulo).

El análisis estadístico de comparación entre muestras refleja que no se detectan diferencias estadísticamente significativas entre el valor de ORAC y el contenido de TP en el conjunto de la muestra.

Estos resultados revelan por un lado, que los PEF no influyen en la capacidad antioxidante de los TP, y por otro, que la actividad antioxidante se debe mayoritariamente a estos compuestos.

Otros autores (Schilling *et al.*, 2007) estudiaron el efecto de los PEF en la extracción de zumo de manzana y obtuvieron resultados similares. Mediante los métodos de DPPH, TEAC y FRAP obtuvieron que los PEF no afectan a la actividad antiradicalaria.

Estudio de la composición de polifenoles por HPLC

Los polifenoles mayoritarios contenidos en el limón son las flavononas eriocitrina y hesperidina (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2012). Se estudió la concentración de ambas por HPLC (**Tabla 12**).

Los datos experimentales obtenidos se analizaron por una ANOVA de regresión múltiple (**Tabla 14**). Como resultado, después de suprimir los factores estadísticamente no significativos ($P > 0,05$), se obtuvo una ecuación polinomial por cada uno de los polifenoles (**Ec. 17** de hesperidina y **Ec. 18** para la eriocitrina).

$$Y = 21,87 - 1,47t - 2,93EF - 2,32P + 0,023t^2 + 0,14804txEF + 0,17txP + 1,17EFxP \quad (17)$$

$$Y = 31,09 - 2,35t - 3,96EF - 6,08P + 0,046t^2 + 0,23txEF + 0,338TxP + 2,20EFxP \quad (18)$$

donde t es el tiempo de extracción, PEF el campo eléctrico y la presión aplicada.

El análisis de la eriocitrina, muestra un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,89$; esto implica que sólo el 11% de los datos no se explican por el modelo. La evaluación del

modelo por la R^2 , la falta de ajuste ($p > 0,05$) y el F-valor (17,42) indican que el modelo es estadísticamente significativo. Por lo tanto, se puede usar para la predicción de la respuesta. En el análisis de la hesperidina se obtuvo una $R^2 = 0,865$ y una F-valor de 23,73 lo que implica que el modelo es significativo ($p < 0,05$). De acuerdo con el F-valor, el tiempo de extracción y el campo eléctrico son los factores más influyentes en la extracción de polifenoles.

Tabla 14: F- y p-valores del análisis de ANOVA desarrollado (Ec. 17 y Ec. 18) para describir la influencia del tiempo de extracción (t), la presión de extracción (P) y el campo eléctrico (EF) en la extracción de polifenoles (mg GAE/100 g FW) del residuo de limón.

	Eriocitrina		Hesperidina	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
Modelo	23,71	<0,0001	17,42	<0,0001
tiempo (t)	56,26	<0,0001	24,97	<0,0001
Campo eléctrico (EF)	35,58	<0,0001	26,53	<0,0001
Presión de extracción (P)	34,36	<0,0001	35,91	<0,0001
t^2	6,20	0,0222	4,50	0,0472
t*EF	9,43	0,0063	11,35	0,0032
t*P	10,37	0,0045	7,60	0,0126
EF*P	13,50	0,0016	11,10	0,0035

En la **Figura 14** se representa gráficamente la respuesta de la eriocitrina (E) y la hesperidina (H) a tiempo máximo de extracción (45 minutos) respecto del campo eléctrico aplicado (EF) y la presión (P).

Los resultados obtenidos denotan un incremento en la concentración de ambos compuestos en relación con la presión y los EF. Se obtiene el máximo de extracción a condiciones máximas de presión y EF.

Estos resultados suponen un comportamiento distinto del modelo en comparación a los observados en la extracción de TP (**Tabla 12**). El nivel de extracción de TP a 5 bar de presión no incrementa significativamente cuando el campo eléctrico sube de 3,5 a 7kV/cm. Además, con la máxima intensidad de campo eléctrico (7 kV/cm), TP tiene

valores similares a los registrados a 2,5 y 5 bar de presión. Sin embargo, en el caso de la concentración de estos dos compuestos (E y H), la extracción de ambos se incrementa de forma constante con la presión y el EF aplicado. Estos resultados sugieren que este incremento no afecta significativamente a la actividad antioxidante global de los extractos.

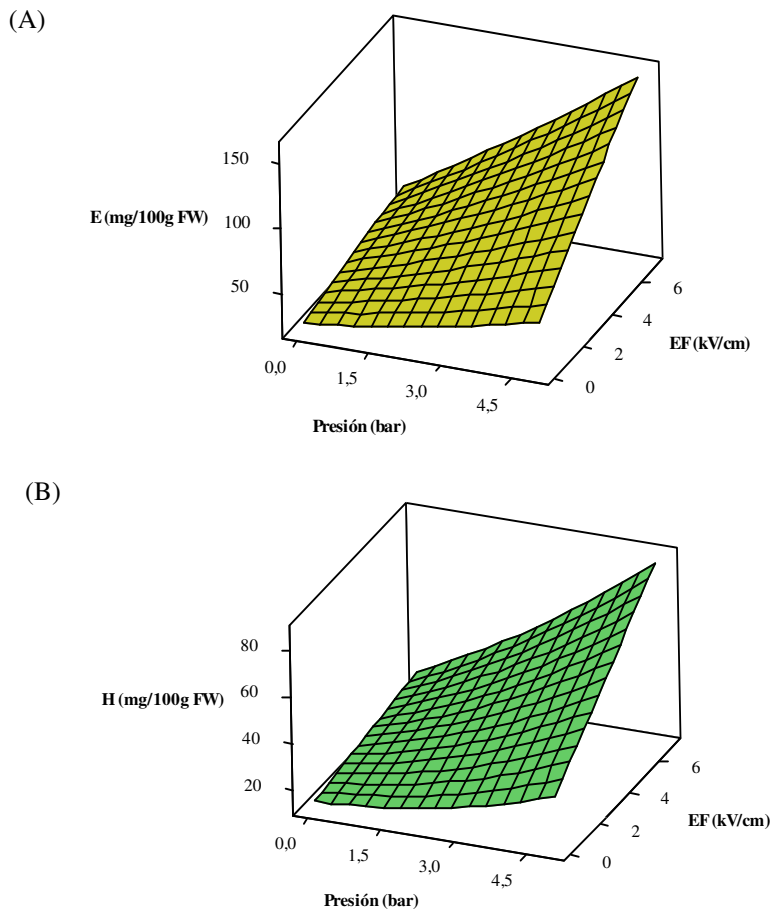


Figura 14: Superficie respuesta obtenida del análisis de la eriocitrina (A) y de la hesperidina (H).

2. Caracterización de los residuos de limón: capacidad antioxidante, antimicrobiana y de protección frente estrés oxidativo inducido

Se caracterizó la actividad biológica del extracto de residuo de limón testando su efecto en células neuronales y analizando su actividad antibacteriana. La actividad del extracto de té blanco se caracterizó en trabajos previos del grupo de investigación (Almajano *et al.*, 2008). Además, se estudió la actividad del residuo de limón (LW) en la protección al DNA.

Caracterización de los extractos usados

Previamente a los estudios de caracterización de la actividad biológica de los extractos, se caracterizó la actividad antioxidante (por el método ORAC) y la composición de los compuestos mayoritarios que producen esta actividad. Se determinó el contenido en Polifenoles Totales (TP), el contenido en los dos polifenoles mayoritarios, las flavononas hesperidina y eriocitrina, el contenido proteico y el contenido en vitamina C y ácido cítrico. En la **Tabla 15** se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 15: Caracterización de la composición y actividad antioxidante de los extractos de LW usados.

	LW-FW	LW-FD
TP ^a	0,61 ± 0,12	15,37 ± 0,53
ORAC ^b	10,8 ± 3,1	148,60 ± 21,8
Eriocitrina ^c	0,79 ± 0,12	9,10 ± 0,51
Hesperidina ^c	1,21 ± 0,29	17,60 ± 0,23
Proteína ^c	<0,2	0,02 ± 0,05
Vitamina C ^c	0,67 ± 0,09	3,50 ± 0,20
Ácido Cítrico ^c	34,30 ± 1,21	126,20 ± 3,38

Valores expresados como la media ± sd de 3 replicas

^a mg GAE/g

^b μmol TE/ g

^c mg/g

En general, el proceso de liofilización se considera el mejor de los métodos de preservación (Chan *et al.*, 2009); sin embargo, este proceso puede producir una pérdida de la actividad y concentración de algunos compuestos, obteniendo valores por debajo del rendimiento en peso del proceso (7,1 g LW-FD por cada 100 g de LW-FW). En el caso del LW, se observa que el proceso de liofilización aumenta los niveles de eriocitrina, hesperidina, TP y en los valores de ORAC en comparación con el rendimiento esperado. En contraposición, se detecta una merma en los niveles de vitamina C y ácido cítrico en LW-FD. Por otro lado, los niveles de proteína de los extractos son muy bajos, inferiores al límite de detección del método en el análisis del extracto fresco (FW) y casi inapreciables en el LW-FD, con lo que se puede obviar su contenido y su posible efecto en los procesos de oxidaciones estudiados.

Los niveles de los polifenoles mayoritarios (eriocitrina y hesperidina) obtenidos en el análisis de LW-FW son del orden de tres veces superior a lo obtenido por otros autores (Del Río *et al.*, 2004) en pieles de limón secas. Así, se sugiere que, por un lado, el albedo, las semillas y la pulpa aportan gran parte de antioxidantes y por otro que, el proceso de secado conlleva la degradación de ciertos los productos de interés (Chan *et al.*, 2009). En otros estudios (Coll *et al.* 1998) se obtuvieron niveles más elevados de ambos polifenoles en residuos recogidos directamente de la planta industrial. En este caso, las diferencias existentes entre los resultados de Coll *et al.*, (1998) y los aquí obtenidos se podrían atribuir al cultivar de limón usado o a la degradación de compuestos durante el almacenamiento y/o transporte del residuo.

Por otro lado, los niveles de TP y de ORAC indican que los extractos tienen capacidad antioxidante, no obstante menor a la encontrada en los extractos de WT (**Tabla 10**).

Capacidad antimicrobiana

Se determinó la capacidad antimicrobiana de los extractos liofilizados (FD) y frescos (FW) de LW sobre 14 microorganismos distintos (bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos) por el método de difusión en disco. Se usó LW extraído en agua y en PBS, además se usó el LW-FD disuelto también en agua y en PBS (S1: LW-FW en agua, S2: LW-FW en PBS, S3: LW-FD en agua; S4: LW-FD en PBS).

Los resultados muestran que el extracto LW fresco sin PBS (S1) tiene actividad antimicrobiana sobre *Lactobacillus plantarum*, (**Figura 15A**). Produce un halo de inhibición de 11 mm. Además, este extracto tiene un efecto de ralentización de la esporulación de *Aspergillus brasiliensis* (**Figura 15B**). En placas con discos de otros extractos, el micelio esporula uniformemente en un periodo de 5 días. Sin embargo, en las placas que contienen S1, al mismo tiempo de incubación, se produce un crecimiento homogéneo del micelio, incluso sobre los discos, pero sin esporulación. Esta se produce algunos días después.

(A)



(B)

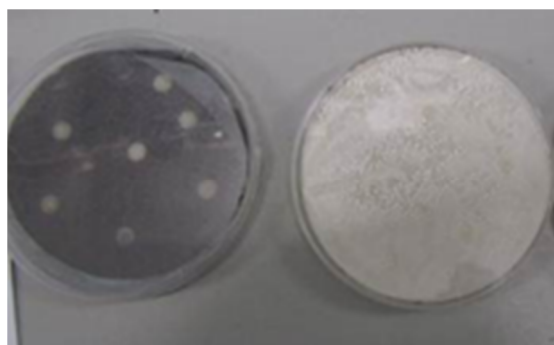


Figura 15: (A): Actividad antimicrobiana frente a *Lactobacillus*. S1: Extracto LW-FW en agua, S2: LW-FD en PBS; S3: LW-FD en agua; S4: LW-FD en PBS. (B): Placas de Sb inoculadas con *A.brasiliensis*. Izq. extractos in efectividad, esporulación. Drcha: replicas del extracto S1, micelio sin esporulación.

Los extractos frescos tamponados (PBS a pH 7,4) y los extractos liofilizados no muestran ninguna actividad antimicrobiana.

Asimismo, se estudió el efecto de la formulación S1, resultante como antimicrobiana usando agar tamponado. Como resultado se obtuvo la no inhibición del crecimiento.

Estos resultados sugieren que uno de factores más influyentes en la actividad antimicrobiana es el bajo pH (3,2) y posiblemente también la merma de compuestos

como son los aceites esenciales que se pueden deteriorar durante el proceso de liofilización. En efecto, algunos autores han descrito el efecto antibacteriano (Teixeira *et al.*, 2013), antifúngico (Viuda-Martos *et al.*, 2008b) e incluso antiviral (Fisher and Phillips, 2008) de los aceites esenciales del limón y Yang *et al.*, (2013) describen que los ácidos orgánicos débiles son comúnmente usados para el control microbiológico en alimentos.

Ashok-Kumar *et al.*, (2011), obtuvieron también una alta efectividad antimicrobiana de extractos de limón elaborados con varios solventes aunque los test realizados implicaban la realización de los ensayos después de 24 h de difusión en disco. Por otro lado, Yang *et al.*, (2013) estudiaron el efecto del zumo de limón sobre carne marinada con el objetivo de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria*; los resultados obtenidos muestran que el limón no es capaz de inhibir su crecimiento aunque sí lo ralentiza.

El efecto inhibitorio de la esporulación fúngica del limón ya fue probado en otro tipo de ensayo por Ortuño *et al.*, (2006), quienes observaron que los flavonoides aislados de limón reducen la esporulación de *Penicillium digitatum*.

Con el objetivo de evaluar la capacidad antimicrobiana real del extracto (LW) sin tamponar sobre *Lactobacillus plantarum*, se realizó la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), la concentración más baja donde el agente produce una reducción visible del crecimiento. Los resultados (**Tabla 16**) muestran una MIC de 100 mg/mL, la concentración más alta probada.

El análisis estadístico de los valores de D.O. obtenidos muestra que es posible detectar diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre concentraciones a tiempos de incubación de 6 horas o superiores. Se determina un tiempo de 6 horas como el tiempo mínimo necesario para detectar diferencias en la eficacia del extracto de LW en cultivos de *Lactobacillus*. Se aprecian diferencias significativas entre grupos (concentraciones) con resultados estadísticamente significativos en los cultivos expuestos a 100 mg/ mL, la concentración determinada como MIC.

Tabla 16: Resultados de D.O. de la lectura de placas de 96 pocillos inoculadas con *Lactobacillus plantarum* sometido a diferentes concentraciones de extracto de residuo de limón en mg de peso fresco de limón (LW-FW) por mL de medio de cultivo.

mg/mL	D.O. 620 nm			
	t inicial	t 3h	t 6h	t 24h
100	0,032±0,045a	0,316 ± 0,411a	0,589±0,494e	0,863 ± 0,623c
50	0,069±0,012a	0,551 ± 0,025a	0,910±0,019abc	1,268 ± 0,001ab
25	0,048±0,006a	0,364 ± 0,233a	0,763±0,228d	1,148 ± 0,182b
12,5	0,032±0,013a	0,486 ± 0,082a	0,845±0,130cd	1,244 ± 0,037ab
6,25	0,069±0,039a	0,488 ± 0,035a	0,907±0,097bcd	1,325 ± 0,018ab
3,125	0,062±0,031a	0,550 ± 0,047a	1,090±0,001ab	1,414 ± 0,005a
1,5625	0,030±0,002a	0,563 ± 0,040a	1,077±0,011ab	1,418 ± 0,008a
0,78125	0,032±0,004a	0,569 ± 0,040a	1,075±0,004a	1,399 ± 0,002a
0	0,043±0,009a	0,577 ± 0,094a	0,992±0,145abc	1,320 ± 0,160ab

Resultados expresados como la medida \pm sd de 3 réplicas, t: tiempo de incubación. Valores con diferente letra en la misma columna, son estadísticamente distintos.

Estos resultados sugieren que si bien el pH parece ser un factor, el LW también es capaz de actuar en soluciones donde el pH queda amortiguado por el medio de cultivo y por tanto el efecto de otros compuestos (seguramente sinérgicamente) es determinante en la inhibición del crecimiento.

Evaluación del efecto protector al DNA

Se estudió la capacidad del LW-FD (a concentraciones de 5 a 50 mg /mL) de inhibir el daño oxidativo inducido al DNA plasmídico. Para ello se incubó el plásmido pGEM-T (de 3000 pb) conjuntamente con H₂O₂ y se evaluó el efecto de protección por determinación de su conformación en un gel de electroforesis (agarosa al 0,8%). El plásmido protegido del estrés oxidativo, mantiene su conformación plegada dando lugar a una banda entre 1000 y 1500 pb, sin embargo, el plásmido dañado dará lugar a una conformación no plegada, con banda a 3000 pb si el daño oxidativo no es demasiado elevado; a dos o más bandas de distinto tamaño si el material genético se fracciona en distintas secciones o a ninguna banda, si el DNA es degradado en exceso.

Los resultados obtenidos (**Figura 16**) muestran que de las concentraciones probadas, sólo la más alta (50 mg/mL) protege al plásmido (carril 3) y lo mantiene en su conformación plegada de entre 1000 y 1500 pb igual que el control (carril 2). Las otras concentraciones testadas, inferiores a 50 mg/mL de LW no consiguen mantener la conformación plasmídica ni mantener fragmentos plasmídicos visibles en el gel.

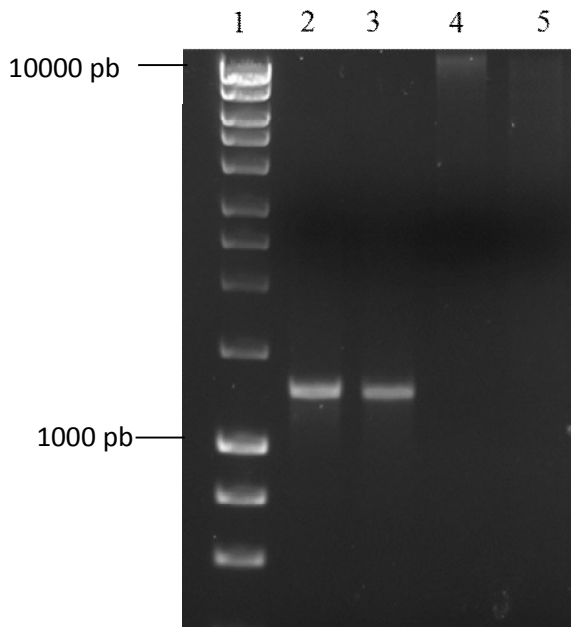


Figura 1: Efecto protector del LW en el plásmido pGEM-T. Carril 1: Marcador Marker Hypper Ladder; Carril 2: pGEM-T control; Carril 3: pGEMT + H₂O₂+Fe + LW 50 mg/mL, Carril 4: GEM-T + H₂O₂+Fe + LW 5 mg/MI; Carril 5: H₂O₂+Fe + LW.

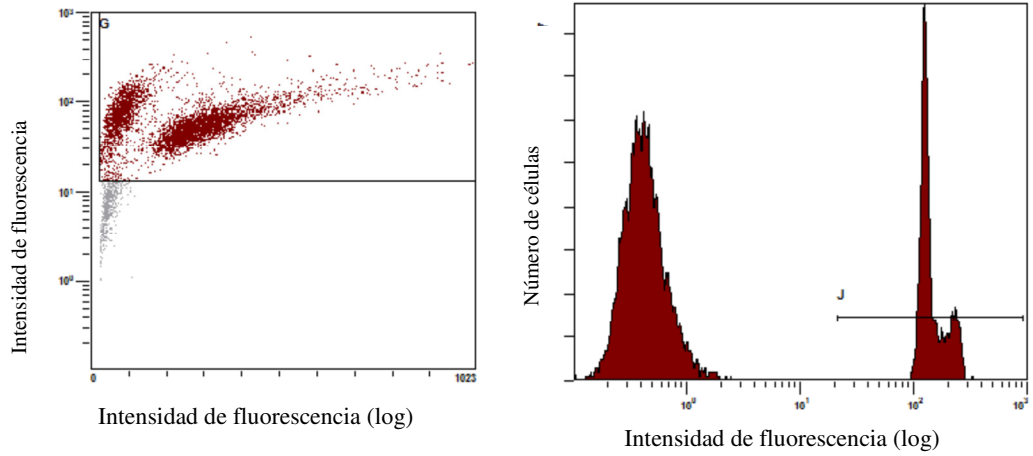
Tian and Hua, (2005), demostraron la capacidad de la aloína y la aloe-emodina (procedentes de la planta de aloe) de protección al DNA plasmídico (pBR322) frente al estrés oxidativo. Así mismo, Habib *et al.*, 2014 obtuvieron resultados positivos en la protección al DNA (también sobre pBR322) que ofrece la miel de diferentes orígenes y describieron a la miel con más polifenoles (la de zonas áridas) como la más protectora. Sin embargo, aunque ambos trabajos señalan a los compuestos antioxidantes como protectores de DNA, las concentraciones que resultan efectivas son más bajas que las necesarias para producir efectos similares usando LW.

Evaluación del efecto protector a células neuronales

Se estudió el efecto del LW como agente protector frente al H₂O₂ en cultivos celulares determinando la mortalidad celular producida por el agente oxidante mediante citometría de flujo y tinción celular con bromuro de propidio. Las células (neuronales STHdh^{Q7}) se incubaron con tres concentraciones distintas de extracto de LW-FD (100, 200 y 400 µg /mL) y a continuación se expusieron a dos concentraciones distintas de peróxido de hidrogeno (250 y 400 µM de H₂O₂ (30 minutos)) siguiendo el modelo experimental descrito en Almajano *et al.*, (2011).

En el recuento celular, se usaron un mínimo 10000 células o 60 segundos de paso por el citómetro usando el PBS como blanco y restando del recuento las partículas, sales u otras partículas de tamaño inferior al tamaño celular determinado. Algunos de los diagramas de flujo celular (citogramas) obtenidos se presentan en la **Figura 17**. En la **Figura 17A**, se puede observar un cultivo sometido a H₂O₂ 250 µM y en la **Figura 17B**, un cultivo pre-tratado con LW 400 mg/ mL y también sometido a las mismas condiciones de estrés. Las células muertas, permeables a la tinción usada (bromuro de propidio), producen una señal en el citómetro que permite distinguir las de las vivas con precisión. En la **Figura 17**, izquierda, se observa la distribución de todas las células. Hay dos grupos celulares claramente marcados, el grupo donde ha penetrado el bromuro de propidio y el que no. Estos dos grupos se separan en las ventanas (*gates*, G en el citograma) y se determina el número de células de cada una de las ventas según su intensidad de fluorescencia (Int. Fl). Además, también es posible separar con éxito los posibles fragmentos celulares o restos de medio de cultivo u otras sustancias y eliminarlas del recuento. Estos fragmentos se dejan fuera de los grupos seleccionados. En la **Figura 17** derecha, se grafica la Int. Fl de los dos grupos, marcado como J el grupo teñido.

(A)



(B)

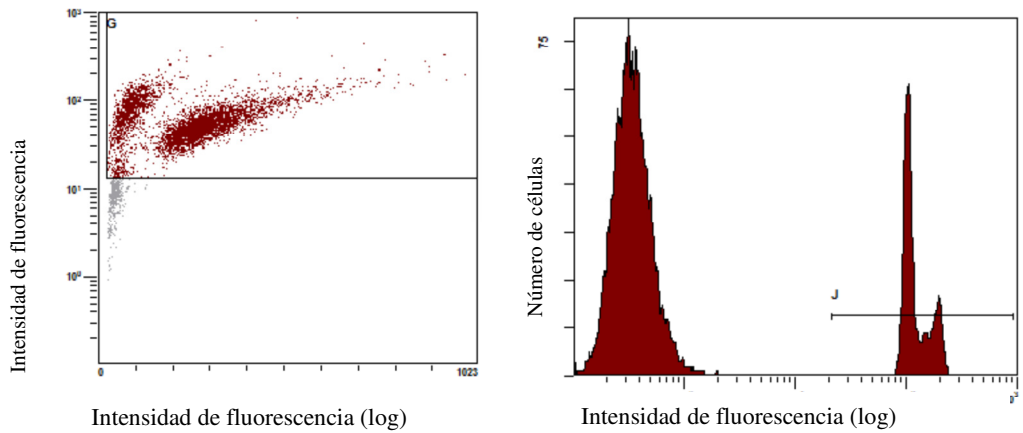


Figura 17: Distribución de frecuencia e histograma obtenidos en el recuento celular. (A): Cultivos sometidos a H₂O₂ 250 μM; (B): cultivos sometidos a H₂O₂ 250 μM pre-tratados con LW a 400 mg/mL.

La efectividad del tratamiento se determinó calculando el número de células vivas y muertas y en % de supervivencia para cada muestra teniendo en cuenta el número total de células analizadas; a continuación se calculó el % relativo tomando como valor para el 100% el número de células vivas en el control (células sin ningún tratamiento y sin aplicar ningún extracto). Esto permite eliminar en los cálculos el % de mortalidad celular debido a la manipulación de la muestra necesaria para el proceso de eliminación de la adhesión celular a la placa de 24 pocillos, resuspensión en PBS, tinción y recuento por paso por el citómetro. Durante todo este proceso, las células no están en cámara de cultivo con CO₂ y son privadas de nutrientes así como de su estado de adhesión natural. La mortalidad celular producida en este proceso es de alrededor del 7%.

En la **Figura 18**, se representan gráficamente los resultados obtenidos en todos los tratamientos realizados. Por un lado, **Figura 18A**, se observa que el extracto de LW usado a diferentes concentraciones no afecta significativamente a la supervivencia celular pero por otro, queda patente que las diferencias entre muestras son bastante grandes (elevada sd). Estas diferencias pueden deberse al propio proceso de manipulación previo al recuento.

La **Figura 18B**, representa el efecto de la aplicación de H₂O₂ a 200 μM usando tres concentraciones distintas de LW-FD. Los resultados obtenidos muestran que la mortalidad celular causada por el H₂O₂ es de alrededor del 30% y, en general, el extracto de LW presenta una protección de alrededor del 15% (± 5). El análisis estadístico de los datos revela que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratadas a esta concentración de LW.

Por último, en la **Figura 18C**, se grafican las diferencias existentes entre las células expuestas a 400 μM de H₂O₂. Los resultados muestran que la mortalidad celular es más baja de lo esperado (sólo un 6% más que las células tratadas con 200 μM de H₂O₂).

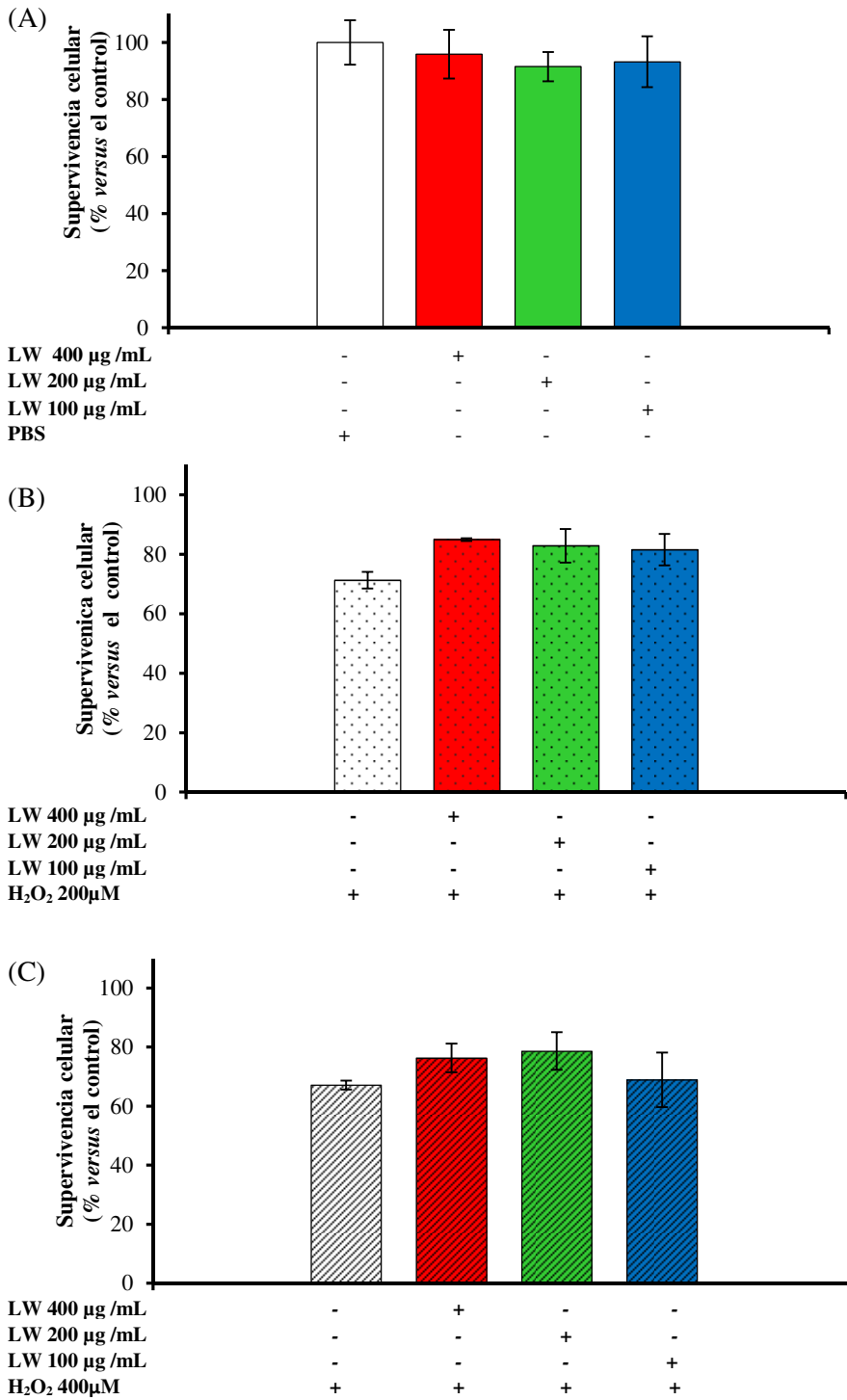


Figura 18: Efecto protector de los extractos de LW liofilizados en la reducción de la mortalidad celular causada por H₂O₂. (A): Muestras control con concentraciones de LW de 400, 200 y 100 µg/mL; (B): Cultivos expuesto a 400, 200 y 100 µg/mL de LW y a 200 µM de H₂O₂. (C): Cultivos expuesto a 400, 200 y 100 µg/mL de LW y a 200 µM de H₂O₂.

El análisis estadístico de los datos refleja que el H₂O₂ afecta significativamente a las células neuronales causando un daño celular significativo. También deja de manifiesto que el extracto de LW no protege significativamente a las células sometidas a 400 µM de H₂O₂ pero sí que muestra un efecto protector (aunque de carácter leve) a las células con un estrés oxidativo inducido producido por una concentración de H₂O₂ de 200 µM.

Anteriormente, Almajano *et al.*, (2011) obtuvieron un efecto protector un 32% superior en las mismas células neuronales usando extractos de WT a una concentración de sólo 100 µg/ mL de WT usando un tiempo de incubación de 24 h. Estos resultados sugieren por un lado que el WT es más eficaz y por otro que al aplicar tiempos de incubación superiores, se permite el crecimiento celular de las células no afectadas (o poco afectadas) por H₂O₂.

Otros estudios (Bhavsar *et al.*, 2007) probaron extractos de limón en células hepáticas (HepG2). Obtuvieron resultados positivos en los tratamientos, aumentaron la viabilidad celular entre un 28 y 83% usando una concentración entre 40 µg /mL y 100 µg/ mL de extracto de limón durante un periodo de incubación de 24 h. Con lo que es posible afirmar que, en efecto, el limón tiene poder de protección celular frente al estrés oxidativo inducido.

Si bien el LW-FD tiene capacidad antioxidante demostrada y contiene una cantidad significativa de polifenoles, son necesarias concentraciones mucho más altas de extracto de residuo de limón para proteger de forma más eficaz a las células sometidas a un estrés oxidativo inducido por H₂O₂.

3. Aplicación de los antioxidantes

Existen numerosas aplicaciones para los antioxidantes. Algunas de las que se atribuyen al té y al limón se resumen en la **Tabla 3** y **Tabla 4** respectivamente. En esta Tesis Doctoral, se han usado los extractos de LW y WT como inhibidores de la oxidación en alimentos (concretamente en carne) y como parte de la formulación de envases activos.

3.1 Aplicación en carnes

En primer lugar, se estudió el efecto antioxidante sobre carne cruda ecológica. Se eligió este producto por ser un alimento fresco que permite obtener resultados de la actividad real de los extractos en un periodo de tiempo relativamente corto. Además, el uso de antioxidantes naturales en carnes conlleva un elevado interés económico. El mercado mundial de carne está en crecimiento, de hecho, la FAO estima que este mercado será el doble en 2050 (<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/home>). Así, es de especial interés el encontrar nuevos antioxidantes naturales que permitan substituir o al menos reducir el uso de los sintéticos, percibidos por los consumidores como menos tóxicos y más saludables (Bearth *et al.*, 2014).

3.1.1 Aplicación de té blanco en hamburguesa de vacuno envasadas en MAP

Caracterización del té blanco usado

Se caracterizó el WT preparado de dos formas distintas, picado (WT-G) y liofilizado (WT-FD). Se valoró su contenido en TP, se determinó su capacidad antioxidante por los métodos ORAC y TEAC y se analizaron los compuestos polifenólicos principales además de su contenido en cafeína mediante HPLC (**Tabla 17**). Se realizó un estudio comparativo de ambos preparados y se determinó el efecto del proceso de liofilización en la actividad antioxidante del WT.

Tabla 17: Contenido en Polifenoles Totales (TP), TEAC, ORAC y principales polifenoles analizados por HPLC.

	WT-G	WT-FD
TP ^a	178,7 ± 7,22	1653 ± 29,95
TEAC ^b	273 ± 60,02	1954 ± 92,6
ORAC ^c	213 ± 45,7	2371 ± 276,3
Cafeína ^d	625 ± 31,8	7009 ± 81,3
EC ^d	16 ± 3,7	154 ± 41,4
EGC ^d	116 ± 2,1	1206 ± 33,5
EGCG ^d	1642 ± 106	11253 ± 97,5
ECG ^d	259 ± 13,5	1411 ± 152,1

Resultados expresados como la media ± sd de tres réplicas

^a mg GAE/g

^b mM TE/g

^c μM TE/g

^d mg/g

La liofilización proporciona una muy buena forma de concentrar y conservar los extractos obtenidos. En el presente caso de estudio, el rendimiento del extracto de WT fue de 9,4 g de WT-FD por cada 100 gramos de WT-G con lo que se esperaba que el extracto WT-FD fuera 9,4 veces más eficaz que el WT-G.

Los resultados del análisis de los TP y del contenido de EC revelan que ambos se mantienen en los rangos esperados. Sin embargo, se observa un incremento en los valores esperados en la capacidad antioxidante por el método ORAC, en la concentración de cafeína y en la concentración de EGC. Este incremento es del 120,4%; 112% y 121,3% respectivamente.

Por otro lado, la concentración de algunas catequinas que incorporan el grupo galato muestran una leve disminución en la ratio, considerándose una pérdida de estos compuestos durante el proceso de liofilización. Concretamente se observa una reducción del 25,8% en EGCG y del 41% en ECG. En la determinación de la capacidad antioxidante por el método TEAC se observa una reducción del 22,5%, atribuible al propio método analítico, sensible a estos grupos galato.

Estos resultados sugieren que la liofilización afecta a los compuestos activos en diferentes grados. Chan *et al.*, (2009), realizaron estudios comparativos de la influencia

en el proceso de secado y liofilizado en la actividad antioxidante y el contenido de TP y concluyeron que, si bien la liofilización es el mejor de los métodos, el proceso puede producir una bajada en el contenido de TP de entre el 10,5% y el 15,78 % en diferentes variedades de jengibre.

Comparación del efecto del WT-G y WT-FD en la carne de hamburguesa

Se realizó un estudio comparativo de la capacidad antioxidante de ambos preparados de té (WT-G y WT-FD) aplicados a carne de hamburguesa envasada en atmosfera estándar de aire. Se elaboraron hamburguesas formuladas con la misma cantidad de polifenoles, 0,5 g de GAE/kg, equivalente a 1,8 g de WT-G por kg de carne y a 0,19 g de WT-FD por kg de carne. La efectividad del WT se evaluó por la medida de la peroxidación lipídica (LPO), determinada como la mayor causa de deterioro de los productos con una vida útil corta (Bañón *et al.*, 2012; Barbosa-Pereira *et al.*, 2014). Para ello se utilizó el método de TBARS.

Los resultados, **Figura 19**, señalan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras control (sin WT) y las muestras con WT añadido. Las primeras denotan unos valores de oxidación lipídica (mg MDA/ kg de carne) mucho más elevados incluso a tiempos de almacenamiento cortos.

Por otro lado, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre WT-G y WT-FD en ninguno de los puntos de muestreo. Por ejemplo, a tiempo final, 6 días, el test de Tukey muestra unos límites de confianza para WT-G y WT-FD de 0,783 a 1,131 y 0,928 a 0,972 mg de MDA/kg respectivamente. Por tanto se afirma que las dos formulaciones presentan una gran eficacia.

Estos resultados están en la línea de los obtenidos por otros autores como Tang *et al.*, (2006), que estudiaron la aplicación de catequinas del té verde (200 mg/ kg) en carne de vacuno. Obtuvieron valores de inhibición de la oxidación del 100% al cabo de un periodo de almacenamiento de 6 días. Otros autores (Alp and Aksu, 2010; Chuechachuychoo, 2011) demostraron también el efecto antioxidante del té verde sobre carne de aves de corral y pescados.

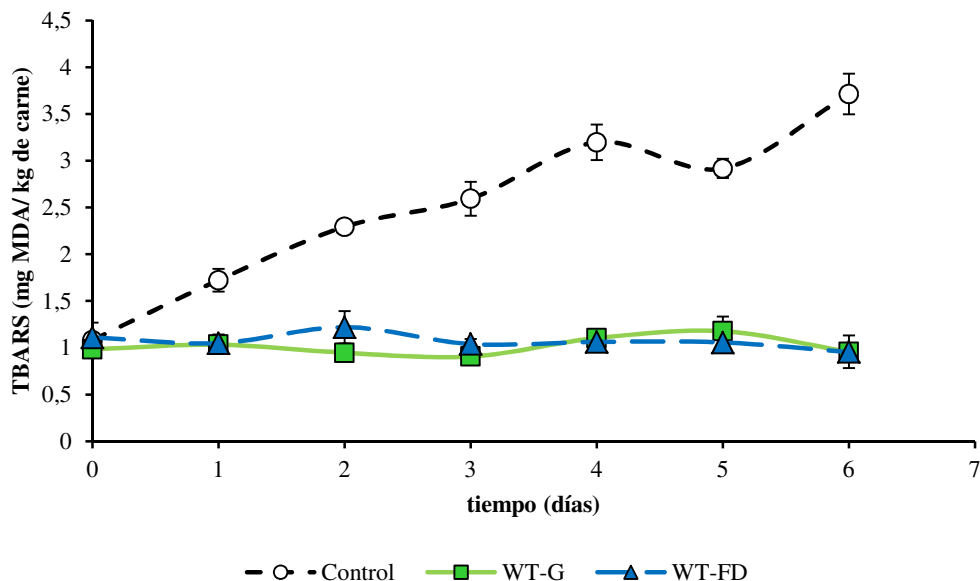


Figura 19: Evolución de la oxidación lipídica en hamburguesas de las dos formulaciones de té blanco, té blanco picado (WT-G) y té blanco liofilizado (WT-FD). Los resultados se representan como la media \pm sd de tres réplicas.

Los resultados obtenidos en la comparación de la efectividad sugieren que, la formulación menos procesada (WT-G) obtiene igual efectividad que la formulación liofilizada (WT-FD). Esto implica que existe una relación proporcional entre la concentración de TP y la efectividad en la inhibición de la oxidación del alimento y por tanto señala a los polifenoles como causa de esta inhibición.

Optimización de la concentración de WT-G como agente protector de la oxidación lipídica

Se estudió la concentración de WT-G que proporciona la máxima eficacia antioxidante. Se elaboraron hamburguesas de carne de vacuno añadiendo concentraciones de WT-G de 0,5; 1 y 1,5 g /kg carne. Las muestras fueron envasadas en atmósfera modificada (MAP). Las concentraciones de WT-G usadas equivalen a una concentración en TP de $140 \pm 1,85$; $280 \pm 2,3$ y $420 \pm 2,05$ mg de GAE/ kg respectivamente. Además se usó un antioxidante sintético comercial (BHT) como control negativo del proceso de oxidación a una concentración de 0,150 g/kg. En cada punto de muestreo se analizaron tres

hamburguesas de cada formulación y cada uno de los análisis se realizó por triplicado. Se usaron bandejas independientes para cada uno de los triplicados y para cada punto de muestreo colocando en cada bandeja una hamburguesa elaborada con cada una de las concentraciones, más una hamburguesa con BHT y otra sin antioxidantes. Se analizaron cuatro criterios de calidad: la oxidación lipídica (por el método TBARS), el pH, el contenido microbiano (mesófilos y psicrófilos totales) y el color.

a) Determinación de la oxidación lipídica

La evolución de la oxidación lipídica por TBARS se representa gráficamente en la **Figura 20**. Los resultados muestran una alta efectividad del WT a todas las concentraciones probadas. Con sólo 48 h de almacenamiento los valores de las muestras elaboradas con WT son, de media, un 40% inferiores a las muestras control (sin antioxidantes añadidos). Estas diferencias se incrementan a lo largo del periodo de almacenamiento. Los valores máximos de oxidación de las muestras control (C) se obtienen a los 9 días de almacenamiento ($1,39 \pm 0,095$ mg MDA/kg de carne). A tiempo final, 12 días, se observa una reducción de este valor hasta $1,26 \pm 0,11$ mg MDA /kg. Sin embargo, las muestras elaboradas con WT-G o BHT presentan en todos los tiempos de muestreo valores inferiores a 0,5 mg MDA/kg.

El análisis estadístico a tiempo final determina que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las hamburguesas de distinta composición. La comparación entre muestras indica que, hay diferencias con el grupo control con unos límites de confianza de 1,369 a 1,156 mg MDA /kg. Los valores medios obtenidos son $0,206 \pm 0,004$; $0,235 \pm 0,03$ y $0,243 \pm 0,0122$ mg MDA /kg en las concentraciones de 1,5, 1 y 0,5 g de WT-G/kg respectivamente. Los valores de TBARS encontrados en las muestras con BHT, son ligeramente superiores a los obtenidos en las muestras preparadas con WT-G (con una media de $0,371 \pm 0,012$ mg MDA), a pesar de ello, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

La vida útil de la carne cruda en refrigeración es de alrededor de 7 días (Mitsumoto *et al.*, 2005; Montgomery *et al.*, 2003) y por tanto, reducir la oxidación a los niveles experimentales observados es muy buen resultado.

Otros autores como Segovia *et al.*, (2014) o Tang *et al.*, (2006) también obtuvieron buenos resultados en la inhibición de la oxidación de carne de ternera picada aplicando extractos de semillas de aguacate y de té verde comercial, respectivamente. En ambos trabajos, se usaron extractos procesados, que suponen un coste añadido de producción en comparación con el uso del WT directamente picado.

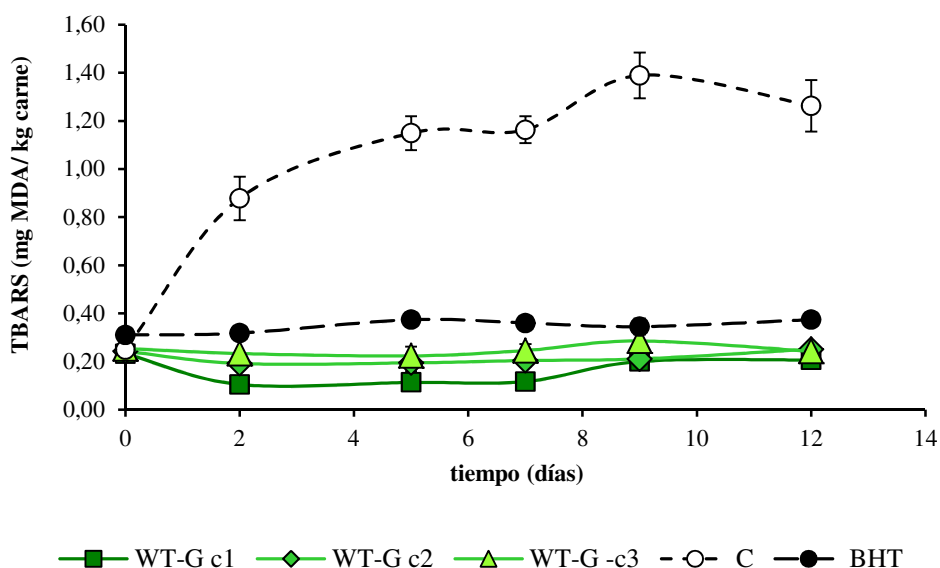


Figura 20: Evolución de la oxidación lipídica por TBARS en hamburguesas con diferentes concentraciones de WT-G: c1: 1,5 g/ kg; c2: 1 g/ kg; c3: 0,5g/ kg; C, Control: 0 g/ kg, BHT: 150 mg/ kg (control positivo). Los resultados se representan como la media \pm sd de tres réplicas.

b) Evolución del pH

En la **Figura 21** se ilustra la evolución del pH durante los 12 días de experimentación. Durante los primeros 7 días, las muestras se mantuvieron en un rango de pH de entre 5,6 y 5,9; valores muy similares a los obtenidos a tiempo inicial ($5,82 \pm 0,2$). A partir de los 7 días, los valores de pH muestran una tendencia a la baja, muy acentuada en las muestras control. A tiempo final, sólo en las muestras con BHT se mantienen los niveles de pH iniciales. El análisis estadístico de los resultados realizado a tiempo final, demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Las concentraciones de WT-G c1 y c2 las que mantienen los niveles de pH más

cercanos a los valores iniciales. Por otro lado, las muestras WT-G c3 no se observan diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control negativo, esto sugiere que WT-G c3 no tiene ningún efecto como estabilizador de pH.

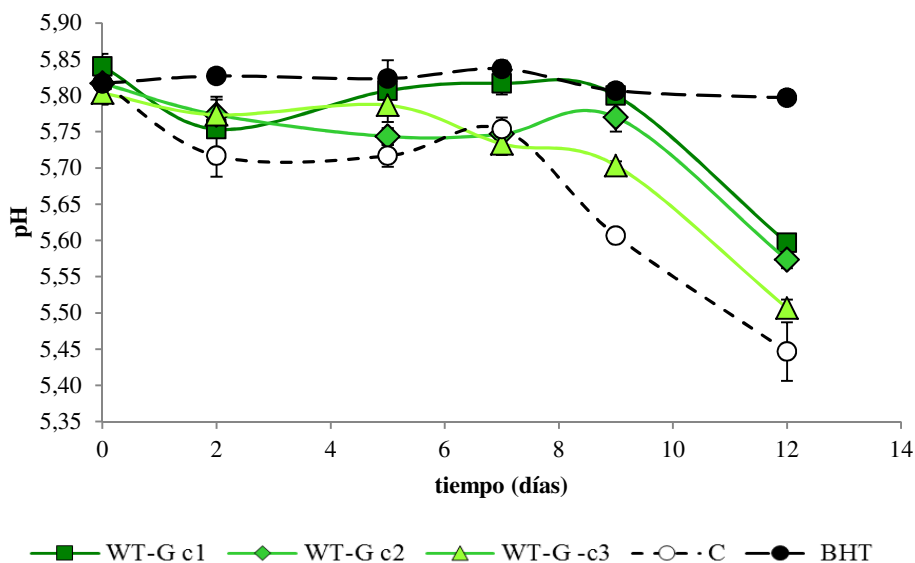


Figura 21: Evolución del pH en carne de hamburguesa con diferentes concentraciones de WT-G: C; c1: 1,5 g /kg; c2: 1 g /kg; c3: 0,5g/ kg; Control: 0 g/ kg, BHT: 150 mg/ kg. Los resultados se representan como la media \pm sd de tres réplicas.

Otros autores, (Kim *et al.*, 2013b) estudiaron el efecto antioxidante de la salsa de soja en salchichas crudas almacenadas en refrigeración. Al contrario de lo aquí mostrado, obtuvieron una bajada del pH en todas las muestras.

En general, se ha demostrado que el pH está relacionado con la degradación bacteriana de la carne (Cayré *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2011). Las bacterias anaerobias facultativas como son las bacterias del ácido láctico y la acumulación de D-lactato y acetato debida a su metabolismo producen una bajada de pH de las muestras (Lambropoulou *et al.*, 1996). Así mismo, el aumento de CO₂ en el agua contenida en la carne también puede ser un factor clave en las variaciones del pH de la carne (Jo *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2013).

c) *Análisis microbiológico*

Se analizó el contenido en mesófilos totales (TMC) y en psicrófilos totales (TPC) de las muestras a tiempo inicial y a tiempo final (día 12). Los resultados obtenidos (**Tabla 18**) se presentan como incremento logarítmico del recuento realizado a tiempo inicial *versus* el tiempo final. El contenido microbiano de la carne, tanto en mesófilos como en psicrófilos es similar en todas las muestras. El análisis estadístico de los resultados por comparación de muestras, indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Estos resultados sugieren que el WT-G a pesar de haber demostrado su efecto antimicrobiano *in vitro* (Almajano *et al.*, 2008), no presenta actividad antimicrobiana en carne de hamburguesa.

Tabla 18: Contenido en bacterias totales, mesófilos y psicrófilos expresado en diferencia logarítmica entre tiempo inicial y final.

	TMC	TPC
WT c1	2,73 ± 0,15a	3,23 ± 0,32a
WT c2	2,81 ± 0,51a	2,94 ± 0,18a
WT c3	2,71 ± 0,08a	3,20 ± 0,10a
Control	2,49 ± 0,19a	3,10 ± 0,32a
BHT	2,44 ± 0,14a	3,30 ± 0,26a

Resultados expresados como la medida \pm sd de dos réplicas. Los valores con la misma letra en la misma columna, no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Limbo *et al.*, (2010), realizaron modelos de predicción de la carga microbiana en muestras de carne picada de vacuno. Obtuvieron, a tiempo inicial una carga en mesófilos totales de 4 logaritmos de media y argumentaron una subida de alrededor de 0,03 logs por día a una temperatura de entre 4 y 8°C. Los resultados obtenidos del análisis microbiológico en este ensayo revela una carga microbiana inicial de aproximadamente 2 logs más elevada (se obtuvo una carga microbiana de 10^6 UFC/g a tiempo inicial). Esto sugiere una mayor contaminación del producto atribuible a la manipulación o a su menor frescura.

Por otro lado, el recuento microbiológico a tiempo final superó las 10^9 UFC/g en todos los casos. Esto seguramente produce la degradación proteica de las muestras y supone cambios significativos en la textura de la carne, síntoma inequívoco de degradación (Broks *et al.*, 2008).

c) Evaluación del color

El color de la carne es uno de los factores clave que lleva al consumidor a tomar la decisión de comprar o no el producto (Price *et al.*, 2013). En general, el color marrón se asocia a una carne en mal estado o de mala calidad (Allen and Cornforth, 2010), y la carne roja, determinada por a^* es aceptada como la más fresca (Sánchez-Escalante *et al.*, 2001). Así, es de gran importancia realizar un análisis exhaustivo del color y determinar el efecto de la incorporación de WT en la carne.

Los resultados obtenidos para los valores de L^* , a^* y b^* , detallados en la **Tabla 19**, demuestran que no hay diferencias estadísticamente significativas en los valores de L^* y b^* entre las distintas muestras en ninguno de los tiempos de muestreo.

En el análisis estadístico de a^* , revela que a tiempo de almacenamiento de 5 días, sí que se describen diferencias estadísticamente significativas. Las muestras formuladas con WT-G (en las tres concentraciones aplicadas) presentan valores de a^* significativamente más altos y más próximos a los valores de a^* de tiempo inicial. Este hecho sugiere que el WT aporta más estabilidad al color de la carne en el rango del rojo con lo que haría a la carne más apreciada por el consumidor. A partir del día 7, no se observan diferencias estadísticamente significativas en a^* en ninguna de las muestras. Sin embargo, el análisis en % de la disminución de este factor a tiempo final (12 días), manifiesta que, las muestras control y las elaboradas con BHT disminuyen a^* en más del 70% de media frente a una reducción de entre el 30 y 55 % en las muestras formuladas con WT-G.

Por otro lado, la adición de WT a la carne no repercute a ninguno de los parámetros de color a tiempo inicial con lo que es posible afirmar que no aporta ninguna característica a la carne que pueda ser detectada, y/o produzca rechazo al consumidor.

Tabla 19: Valores de color en la carne de vacuno almacenada en MAP a 4°C y con una composición de WT-G de c1: 1,5 g/ kg; c2: 1 g/ kg; c3: 0,5g/ kg; Control (C): 0 g/ kg, BHT: 150 mg /kg.

Muestra	tiempo (días)	L*	a*	b*
Control	0	43,68 ± 2,14a	7,80 ± 0,26a	13,74 ± 1,59a
	5	49,05 ± 3,69a	2,34 ± 0,96b	15,13 ± 1,49a
	7	49,21 ± 1,26a	2,59 ± 0,10a	14,63 ± 1,87a
	10	50,10 ± 2,60a	1,87 ± 0,84a	15,35 ± 1,69a
	12	50,23 ± 2,26a	2,49 ± 1,20a	15,97 ± 2,05a
WT-G c1	0	44,79 ± 3,93a	5,37 ± 0,81a	12,66 ± 1,32a
	5	44,57 ± 2,45a	6,55 ± 0,30a	11,65 ± 1,02a
	7	44,15 ± 3,62a	6,23 ± 0,80a	11,66 ± 1,60a
	10	44,94 ± 3,92a	2,74 ± 0,55a	13,99 ± 2,05a
	12	43,31 ± 2,16a	3,72 ± 0,49a	15,75 ± 1,76a
WT-G c2	0	43,20 ± 2,18a	5,90 ± 0,39a	13,00 ± 2,26a
	5	42,23 ± 3,58a	7,03 ± 0,60a	12,03 ± 1,69a
	7	44,67 ± 2,73a	5,95 ± 0,98a	10,56 ± 1,84a
	10	45,04 ± 2,54a	2,81 ± 0,60a	13,94 ± 2,76a
	12	46,78 ± 1,90a	2,61 ± 0,38a	14,18 ± 2,69a
WT-G c3	0	44,32 ± 2,05a	5,63 ± 0,36a	12,86 ± 2,34a
	5	44,21 ± 3,60a	6,98 ± 1,01a	12,09 ± 1,91a
	7	45,93 ± 2,93a	5,42 ± 0,69a	10,57 ± 1,67a
	10	47,21 ± 2,75a	2,07 ± 0,96a	14,45 ± 1,91a
	12	49,34 ± 2,10a	2,84 ± 0,30a	16,45 ± 0,60a
BHT	0	43,56 ± 2,16a	7,07 ± 0,29a	12,22 ± 1,24a
	5	43,31 ± 2,97a	1,72 ± 0,23b	13,76 ± 1,60a
	7	44,76 ± 2,96a	1,54 ± 0,30a	13,11 ± 0,20a
	10	44,53 ± 3,45a	2,00 ± 0,11a	13,12 ± 0,90a
	12	45,18 ± 1,28a	2,37 ± 0,30a	14,79 ± 0,60a

Valores de la media ±sd de tres réplicas. Los valores con la misma letra en el mismo tiempo de almacenamiento en la misma columna, no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Estos resultados son similares a los obtenidos en Jo *et al.*, (2003); y en Tang *et al.*, (2000), donde, usando antioxidantes como la catequina, mostraron que es posible prevenir la decoloración de la carne de vacuno y volatería gracias a su capacidad de evitar la formación de metmioglobina.

3.1.2 Aplicación en carne picada ecológica envasada en vacío

Con el objetivo de evaluar la influencia del WT en carne envasada sin oxígeno, se realizó un ensayo similar al descrito en el Apartado 3.1.1 almacenando las muestras a 4°C envasadas al vacío.

Evolución de TBARS

Se estudió la evolución de la oxidación de la carne durante un periodo de 12 días. Según Jeremiah, (2001), en estas condiciones no debe producirse oxidación en ninguna de las muestras ya que esta depende de las condiciones aeróbicas.

Los resultados obtenidos (**Figura 22**), muestran que, efectivamente, en todos los puntos de muestreo se observan valores de TBARS inferiores a 0,3 MDA/kg. Además, no se detectan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

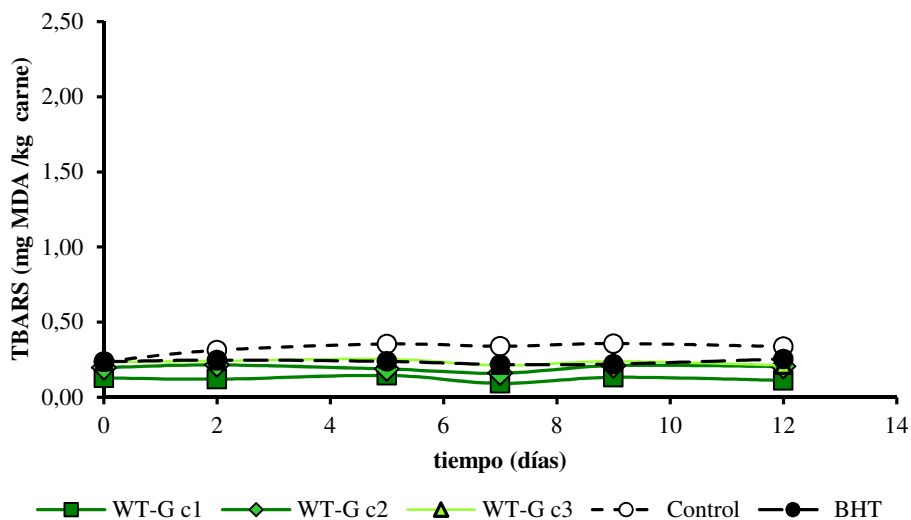


Figura 22: Evolución de la oxidación lipídica por TBARS en hamburguesas con diferentes concentraciones de WT-G: c1: 1,5 g/ kg; c2: 1 g / kg; c3: 0,5 g/ kg; C, control: 0 g/ kg, BHT: 150 mg/ kg (control positivo). Los resultados se representan como la media \pm sd de tres réplicas.

La comparación de estos resultados con los obtenidos en la carne envasada en MAP (**Figura 20**), sugieren que el WT sí que tendría efecto una vez abierto el envase y hasta el consumo del producto. Además, la adición de WT aunque *a priori* no supondría un efecto antioxidante durante el almacenado en vacío, sí que proporcionaría nutrientes adicionales y propiedades beneficiosas para la salud del consumidor (Weis *et al.*, 2010).

Otros autores (Smiddy *et al.*, 2002) estudiaron la relación entre la oxidación y la concentración de oxígeno en carne de vacuno almacenada en vacío (VP) y MAP bajo una luz fluorescente. Concluyeron que los procesos de oxidación requieren cierto nivel de oxígeno y que el exceso de éste no tiene una influencia significativa en la oxidación. En el estudio demuestran que la carne en VP puede sufrir oxidación debido a la permeabilidad del envase al aire y a la influencia de la luz o la temperatura.

Otros estudios realizados en hígado de pollo (Papazoglou *et al.*, 2012) y en morcillas (Cachaldora *et al.*, 2013) también demostraron que, a pesar de ser muy leve, en condiciones de vacío se produce oxidación de las muestras.

Los resultados obtenidos, sugieren que el envase usado no es permeable al oxígeno y que las condiciones de almacenamiento no producen ningún fenómeno de oxidación debido a la temperatura o a otros factores

Evolución de pH

Se estudiaron las variaciones en el pH durante el almacenamiento, los resultados (**Figura 23**) señalan una bajada del pH a partir del día 7 en todas las muestras excepto en BHT donde los valores se mantienen en el rango de los observados a tiempo inicial. El análisis estadístico revela que hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las muestras analizadas a tiempo 7, 9 y 12 días de almacenamiento.

Los resultados obtenidos son similares a los observados en la carne envasada en MAP (**Figura 21**) donde también se detectó una bajada de pH observada a partir del día 7 también se detectó en las muestras almacenadas en MAP, sugiriendo un aumento del contenido microbiano, tal y como se describe en Cayré *et al.*, (2003).

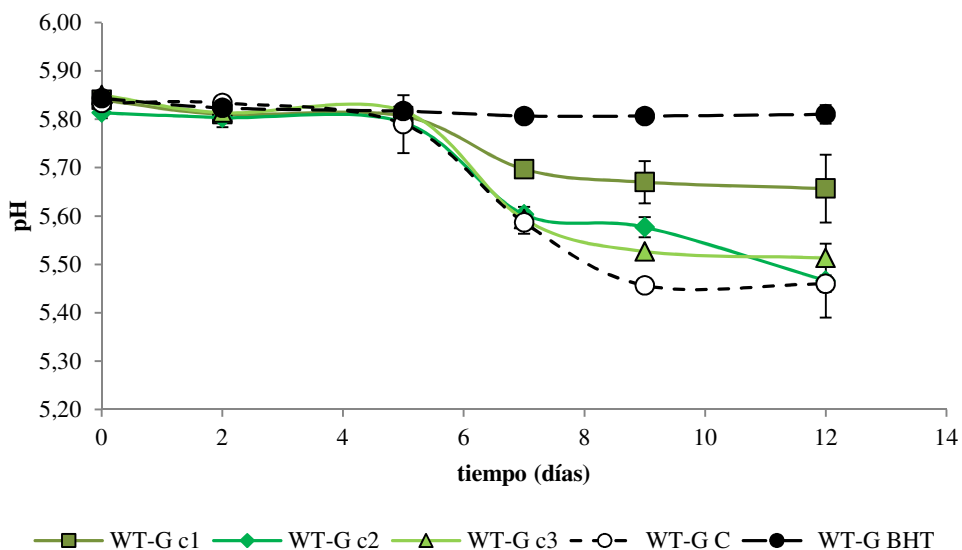


Figura 23: Evolución del pH en carne de hamburguesa con diferentes concentraciones de WT-G: C c1: 1,5 g /kg; c2: 1 g /kg; c3: 0,5g/ kg; Control: 0 g/ kg, BHT: 150 mg/ kg. Los resultados se representan como la media \pm sd de tres réplicas.

Evolución del color

Se evaluó el efecto en el color de la carne al añadir WT-G a varias concentraciones, los resultados (**Tabla 20**), no denotan diferencias estadísticamente significativas entre muestras en ninguno de los parámetros (L^* , a^* b^*) a ninguno de los tiempos de muestreo. Las condiciones de vacío, repercuten en el color, aportan a la carne un color marrón en todas las muestras analizadas independientemente del tiempo de muestreo o de la formulación. Esta modificación en el color también se observa en otros estudios realizados en condiciones de vacío como el desarrollado por Cachaldora *et al.*, (2013).

Por otro lado, y como ya se ha descrito en el Apartado anterior, el añadir WT-G no afecta significativamente al color global de la carne.

Tabla 20: Evolución del color de la carne envasada en VP.

Muestra	tiempo(días)	L*	a*	b*
Control	0	43,68 ± 2,14a	7,80 ± 0,26a	13,74 ± 1,59a
	6	45,05 ± 1,79a	6,21 ± 1,23a	11,98 ± 1,29a
	12	43,36 ± 1,92a	5,67 ± 1,20a	11,86 ± 2,05a
WT-G c1	0	44,79 ± 1,93a	5,37 ± 0,81a	12,66 ± 1,32a
	6	43,03 ± 2,30a	4,88 ± 1,69a	12,00 ± 1,19a
	12	40,15 ± 3,95a	4,79 ± 1,06a	11,90 ± 1,36a
WT-G c2	0	44,79 ± 2,18a	5,90 ± 0,39a	13,01 ± 2,26a
	6	42,72 ± 2,30a	5,19 ± 0,68a	11,37 ± 1,58a
	12	40,59 ± 3,15a	4,75 ± 1,18a	11,01 ± 1,98a
WT-G c3	0	44,32 ± 2,05a	7,82 ± 0,36a	13,74 ± 2,34a
	6	43,71 ± 0,29a	4,96 ± 0,71a	11,99 ± 1,90a
	12	43,1 ± 2,57a	5,67 ± 1,59a	11,86 ± 2,91a
BHT	0	41,56 ± 2,16a	7,07 ± 0,29a	12,22 ± 1,24a
	6	43,72 ± 1,30a	5,89 ± 1,35a	11,38 ± 2,10a
	12	43,89 ± 3,57a	5,29 ± 1,68a	11,37 ± 2,15a

Valores expresados como la media ± sd. Los valores con la misma letra en el mismo tiempo de almacenamiento en la misma columna, no presentan diferencias estadísticamente significativas.

3.2 Aplicación en envases activos

Se investigó la eficacia de los extractos antioxidantes como parte de la composición de envases activos emisores. Para ello se desarrollaron dos tipos de films. Los primeros, de polietileno (PE) donde mediante la tecnología del plasma y *road coating* se aplicó un recubrimiento activo. Los segundos, elaborados a partir de biopolímero, el ácido poliláctico (PLA), se formularon incluyendo el antioxidante en la propia formulación del film.

3.2.1 Films activos de polietileno: Efecto antioxidante de un film activo de PE sobre carne de hamburguesa de vacuno

Evaluación del efecto del plasma de Descarga Dieléctrica (DBD) en la elaboración de los films

Se desarrollaron films activos de polietileno (PE) con los extractos de LW y WT usando la técnica del *Road Coating*, recubrimiento directo del polímero.

Con el objetivo de mejorar la adhesión de los extractos al PE, se evaluó la posibilidad de usar plasma de Descarga Dieléctrica en Barrera (DBD plasma), una tecnología no térmica que actúa en la superficie del film modificando sus características. La evaluación del efecto del plasma se determinó por el ángulo de contacto de agua (WCA). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 24**.

El PE sin tratamiento de plasma demuestra ser un material muy hidrofóbico, con un WCA de $89,9 \pm 1,76$ grados a los 60 s (**Figura 24A**). Después del tratamiento con DBD plasma (1 min a 60 kV), el WCA disminuye a $49,52 \pm 7,29$ grados en el mismo tiempo de medida (**Figura 24B**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores como Kaynak *et al.*, (2013) donde usaron el plasma para reducir el WCA de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o por Cheng *et al.*, (2006) donde demostraron que el

plasma frío puede ser usado en polipropileno (PP) y en politereftalato de etileno (PET) con iguales buenos resultados en la modificación de superficies.

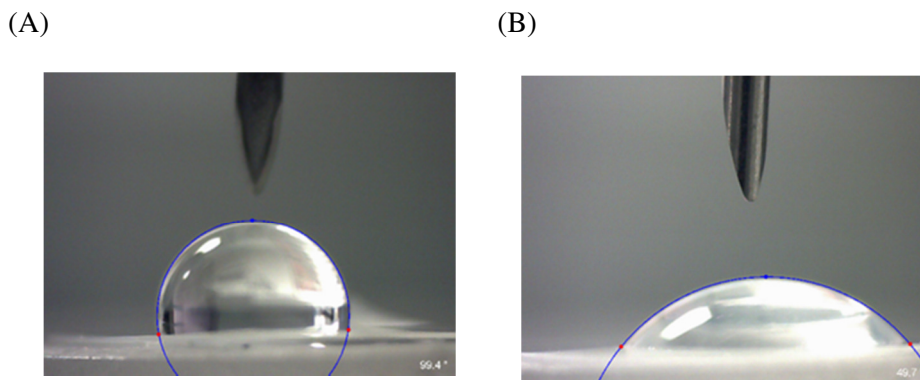


Figura 24: WCA en PE (A) y en PE tratado con plasma (B) después de 60 s de contacto con el material

Capacidad antimicrobiana del plasma

Se ha descrito que el plasma, además de mejorar la adherencia de compuestos a la superficie de films (Pankaj *et al.*, 2014a) tiene propiedades antimicrobianas (Misra *et al.*, 2011, Moreau *et al.*, 2008). Esto abre la posibilidad de usar esta tecnología no sólo para la elaboración de films sino también en la descontaminación de estos. Pankaj *et al.*, (2014b) describen esta posibilidad e incluso reafirman su uso en envases destinados a estar en contacto con alimentos. El plasma afecta a la rugosidad del film pero no tiene efecto en la migración o en otros factores a considerar.

Se determinó la capacidad antimicrobiana del DBD plasma sobre superficies en general y sobre el PE en particular. Se inocularon diferentes concentraciones de *E.coli*, *S.aureus* y *A. brasiliensis* en membranas de filtración y se aplicaron tratamientos de 60 kV durante 6, 10, 60 y 100 segundos sobre ellas.

Los resultados, **Figura 25**, muestran una gran efectividad del tratamiento en Gram negativas y Gram positivas no esporulados. Con sólo 10 segundos de tratamiento de

plasma es posible disminuir la carga de *E.coli* en, como mínimo, 6 logaritmos (la concentración más alta estudiada) y en casi 4 logaritmos la carga de *S.aureus*.

La efectividad en hongos resulta más baja. En 6 segundos se consigue disminuir en 0,5 logaritmos la carga microbiana inicial y son necesarios 100 s para obtener 3 logaritmos de reducción. Esto sugiere que la penetración del plasma en las estructuras del hongo es inferior que en bacterias.

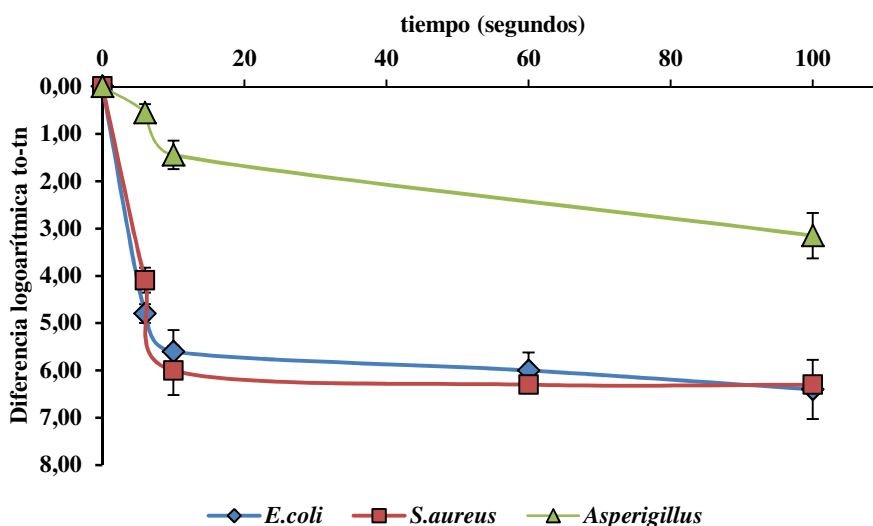


Figura 25: Efecto de diferentes tiempos de tratamiento sobre *E.coli*, *S.aureus* y *Apergillus*. Valores expresados como la media \pm sd de la diferencia en logaritmos de la carga microbiana de la muestras sin tratar y las tratadas.

Con ánimo de realizar una pequeña verificación de la efectividad del plasma directamente sobre el PE, se inoculó sobre el film la carga microbiana testada más elevada con efectividad demostrada. Se trataron los films durante 100 s y se comprobó su efectividad por medio de placas de contacto Rodac del correspondiente medio de cultivo. A pesar de que las placas Rodac no recuperan toda la carga microbiana de la superficie, suponen un test rápido de verificación de la eficacia del plasma sobre el PE.

Los resultados obtenidos muestran que el plasma es capaz de reducir también la contaminación sobre PE abriendo la posibilidad a usarlo en la descontaminación de superficies.

Los resultados son similares los descritos en Fridman *et al.*, 2007 quienes probaron la eficacia del plasma directamente sobre placas de agar obteniendo una reducción de 7 logaritmos en 10 segundos de tratamiento.

En otros estudios, Muranyi *et al.*, 2010 demostraron que es posible obtener una mayor eficacia en la descontaminación de microorganismos, incluso esporulados, usando otro tipo equipo o plasma en atmósfera de nitrógeno.

Evaluación de la homogeneidad de los films

Se estudió la homogeneidad de los films mediante la medida del color y la opacidad. Se evaluaron las diferencias existentes entre los films activos elaborados con *Road Coating* (RC) con y sin pre-tratamiento de plasma. Los films se dividieron en secciones de 3 cm de largo y 2 cm de ancho y se tomaron las medidas justo en el centro.

La homogeneidad de los films se determinó mediante la comparación de medias y el análisis de la desviación estándar (sd) obtenida. Se consideraron los films más homogéneos aquellos con valores de sd más pequeños. En la **Tabla 22**, se detallan los resultados obtenidos del análisis de 6 porciones del mismo film (midiendo cada uno de los parámetros por triplicado).

El *coating* afecta al color del film, en especial de los elaborados con recubrimientos de extractos del WT, con valores estadísticamente significativos en L*, a* y b*. De entre ellos, el parámetro más afectados es b*. El extracto de LW produce cambios de color en a* y en b*. Sin embargo sus efectos sólo se observan al aplicar RC.

Tabla 21: Valores de color y opacidad de los films activos de PE elaborados con y sin plasma (PI).

Film	Trat.	Color			Opacidad
		L*	a*	b*	
PE	RC	90,18 ± 0,08a	2,46 ± 0,13a	-5,53 ± 0,09c	0,022 ± 0,002a
	PI+RC	90,36 ± 0,16a	2,34 ± 0,07ab	-5,65 ± 0,17c	0,020 ± 0,003a
PE + LW	RC	90,25 ± 0,69a	2,37 ± 0,15a	-5,53 ± 0,10c	0,021 ± 0,001a
	PI+RC	90,03 ± 0,13a	2,05 ± 0,07c	-4,96 ± 0,21bc	0,025 ± 0,004a
PE + WT	RC	89,13 ± 0,81b	2,16 ± 0,08d	-2,07 ± 0,69a	0,022 ± 0,002a
	PI+RC	89,85 ± 0,14a	2,20 ± 0,09bc	-4,62 ± 0,27b	0,022 ± 0,002a
PE + BHT	RC	90,14 ± 0,21a	2,28 ± 0,05ab	-5,32 ± 0,07c	0,021 ± 0,005a
	PI+RC	90,01 ± 0,03b	2,39 ± 0,11a	-5,43 ± 0,18c	0,026 ± 0,003a

RC: *Road coating*, PI: Plasma. Los resultados se presentan como la media ± sd de 6 puntos de análisis, tomando las medias por triplicado. Los valores con la misma letra en la misma columna, no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

En general, los films donde se aplicó el plasma son más homogéneos a excepción de los formulados con BHT que presentan unos valores de homogeneidad en a* y b* más elevados en los films elaborados sólo con RC. Esto sugiere que el BHT no se aplica con éxito. A pesar de ello, los valores de sd con RC o con PI+RC no son superiores a los valores de sd obtenidos para RC+PI en L* o en b* (sólo 0,02 más elevado en a*) con lo que se asume una aplicación igualmente de exitosa aplicando PI o sin aplicar PI.

Los valores de opacidad obtenidos al aplicar el recubrimiento son muy similares a los observados en las muestras de PE control. El análisis estadístico de comparación ente grupos, revela que no existen diferencias estadísticamente significativas entre muestras.

Evaluación de la influencia del plasma en la actividad antioxidante

El DBD plasma puede tener un doble efecto. Por un lado modifica las superficies, mejora la adherencia de los productos al film y descontamina la superficie tratada (Pankaj *et al.*, 2014a), pero por otro, produce especies reactivas de oxígeno y genera O₃ muy oxidante y a la vez perjudicial para la salud humana.

Si bien el proceso de elaboración de los films no expone al extracto antioxidante directamente al plasma, la comprobación de la actividad antiradicalaria de los films resultantes es fundamental.

Se determinó la actividad antioxidante de films con recubrimiento de WT elaborados con PI+RC y se comparó su actividad con los elaborados sólo con RC. Para ello, se realizó la extracción del recubrimiento aplicando ultrasonidos. La actividad de los films se evaluó por el método del radical DPPH[•] y los resultados se expresaron en % de inhibición del radical.

Los resultados obtenidos revelan que, de media, el % de actividad antiradicalaria de los films sometidos a tratamientos de plasma es del $87,25 \pm 6,1\%$ y la de los films elaborados sin plasma, del $88,30 \pm 2,9\%$.

Estos resultados indican que la elaboración de los recubrimientos con plasma supone una gran ventaja. Aumentan su homogeneidad sin afectar su actividad.

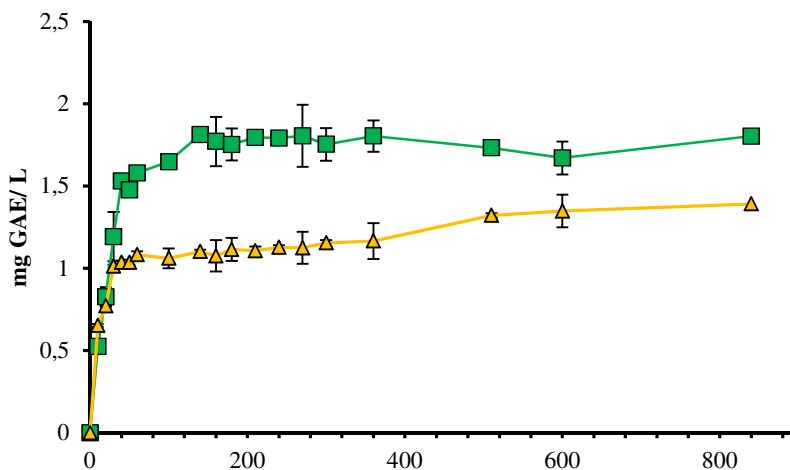
Liberación de polifenoles en simulantes alimentarios

Se estudió la cinética de liberación de antioxidantes en dos simulantes alimentarios distintos; en el simulante alimentario A (10% de etanol) y en isoctano (usado según la norma EU 10/2011 (European Parliament, 2011) en substitución al simulante alimentario D2 (aceite)).

En la **Figura 26** se representa gráficamente la cinética de liberación de los polifenoles contenidos en los films de WT y LW. Los resultados, expresados en mg GAE/L de simulante, indican que se produce una liberación rápida y abundante de polifenoles en simulantes hidrofílicos (simulante A, **Figura 26A**). En simulantes lipofílicos, isoctano, (**Figura 26B**) la liberación es inexistente en los dos films evaluados.

El estudio de liberación en el simulante A, determina que, el valor absoluto de TP obtenido en los films de WT es más elevado que el obtenido en los films de LW. El análisis estadístico de los resultados a tiempo final (800 segundos), así lo determina. A pesar de estas diferencias, los TP liberados se encuentran en un rango muy similar.

(A)



(B)

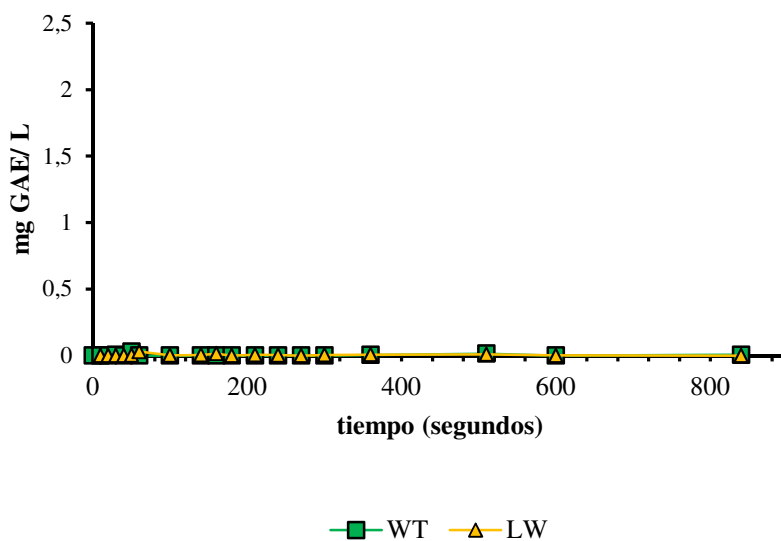


Figura 26: Liberación de TP en envases activos elaborados con WT y LW en el simulante alimentario A = 10% de etanol en agua (A) y en isooctano en sustitución al simulante alimentario D2 (B). Los resultados se representan como la media \pm sd de tres réplicas.

Se evaluó también el ajuste al modelo de liberación descrito en López *et al.*, (2009). Los resultados (**Tabla 22**) muestran una Y_{max} más alta en los films de WT y unos valores de K más elevados en los films de LW. Esto sugiere que los films de WT liberan de forma más progresiva los TP y a su vez presenta un mejor ajuste al modelo.

Tabla 22: Y_{max} y K-valores obtenidos del ajuste a la ecuación de cinética de liberación de los polifenoles contenidos en los films activos en el simulante A.

Film	Y_{max}	95% CL	K (min^{-1})	95% CL	R^2
PE+LW	1,164	1,107 -1,222	0,063	0,043-0,083	0,899
PE+WT	1,771	1,733 – 1,808	0,030	0,033 -0,041	0,980

CL: Límites de confianza

Con la finalidad de ralentizar la liberación de polifenoles al alimento y por tanto de incrementar la efectividad y la estabilidad de estos, algunos autores como Silva-Weiss *et al.*, (2013) añaden a la formulación aditivos como la gelatina o el quitosano.

Capacidad antioxidante de los films en alimentos

Se estudió la efectividad de los films desarrollados sobre carne cruda ecológica. Para ello se colocaron los films a modo de láminas separadoras sobre carne de vacuno (tapa) procesada en forma de hamburguesa. Además, y con el fin de evaluar la importancia del volumen de la carne en la actividad antioxidante, se testaron hamburguesas de dos tamaños distintos (de 3,4 cm de diámetro y 12 g de peso y de 12,5 cm de diámetro y 120 g de peso). La capacidad antioxidante de los films se evaluó midiendo la inhibición de la LPO por el método de TBARS.

Los resultados obtenidos se representan en la **Figura 27**. En las hamburguesas de pequeño tamaño, se observa que hasta un tiempo de almacenamiento de 6 días no se detectan diferencias estadísticamente significativas entre muestras. Posiblemente, el reducido tamaño de las hamburguesas no crea una atmosfera suficientemente aerobia para permitir que se produzca oxidación de la muestra. A un tiempo de almacenamiento de 9 días se produce oxidación y se detectan diferencias estadísticamente significativas entre el control (con film de PE sin recubrimiento) y las muestras cubiertas con un recubrimiento activo. A tiempo final (12 días), los films de WT son los que presentan una mayor capacidad antioxidante, aunque a valores algo inferiores a los que presentan las hamburguesas con film de BHT. Las muestras con LW también protegen a la carne

de la oxidación, aunque en menor grado aunque ambos films (WT y LW) son capaces de preservar la oxidación en hamburguesas pequeñas durante al menos 3 días.

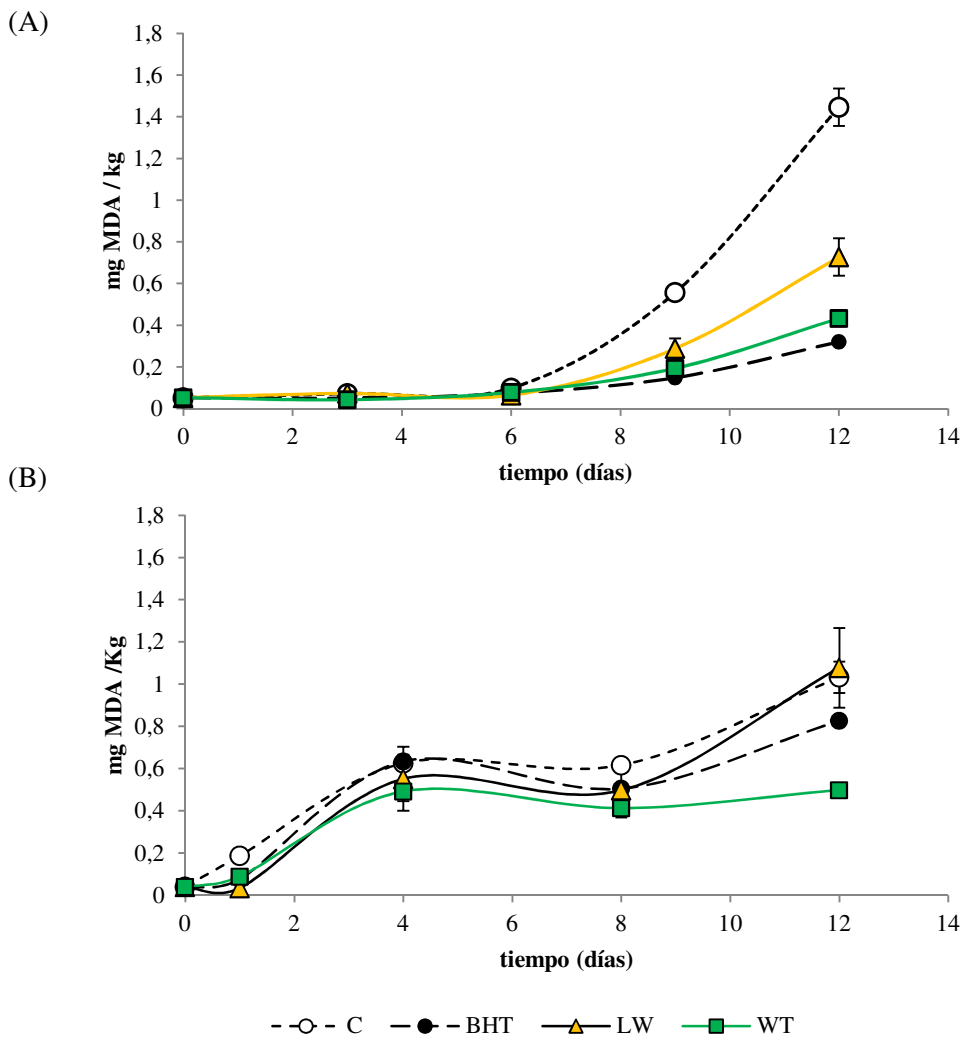


Figura 27: Evaluación de la efectividad de los films activos elaborados sobre carne cruda de hamburguesa por medida de la oxidación de la carne por el método TBARS. (A) en hamburguesas de tamaño 3,4 cm y en (B), hamburguesas de tamaño 12 cm. Los resultados se representan como la media \pm sd de tres réplicas.

En las hamburguesas de mayor tamaño (12 cm de diámetro), (**Figura 27B**), se detecta un aumento de la oxidación de todas las muestras ya a tiempo de almacenamiento de 1 día pero sin diferencias entre muestras. A tiempo final, se observan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Las hamburguesas almacenadas con el film de WT presentan significativamente menos mg de MDA/ kg de carne que el resto, obteniendo un resultado incluso mejor que el de las muestras con el film de BHT. Las muestras envasadas con el film de LW no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto del control con film de PE sin cobertura antioxidante. Sin embargo, los films de WT sí que se muestran eficaces; la carne cubierta con ellos reduce, al menos, 4 días la oxidación en comparación con las muestras control.

Otros autores como Barbosa-Pereira *et al.*, 2004 obtuvieron buenos resultados en la inhibición de la oxidación de carne de vacuno, (90% de reducción) al aplicar films de PE de baja densidad recubiertos con extractos de romero. La aplicación de WT como cobertura antioxidante en films de PE aún no ha sido muy estudiado sin embargo, existen varios trabajos Colon and Nerin, (2012), donde demuestran que es posible elaborar films plásticos con té verde con elevada capacidad antioxidante.

Análisis microbiológico

Se analizó la carga microbiana de la hamburguesa a tiempo inicial y a tiempo final, determinando el contenido en microorganismos mesófilos y en psicrófilos totales. Los resultados obtenidos, expresados como incremento logarítmico de la carga microbiana a tiempo final, se detallan en la **Tabla 23**.

Tabla 23: Incremento logarítmico de la carga microbiana a tiempo final.

	Diámetro	C	WT	LW	BHT
Mesófilos Totales	3,4 cm	3,62±0,51a	3,05±0,28a	3,7±0,45a	3,2±0,21a
	12 cm	2,60±0,21a	2,28±0,02a	2,6±0,25a	2,1±0,31a
Psicrófilos Totales	3,4 cm	3,01 ±0,07a	2,98±0,24a	2,83±0,17a	2,91±0,36a
	12 cm	2,53 ±0,23a	2,35±0,14a	2,44±0,14a	2,21±0,21a

Resultados expresados como la media de dos réplicas ± sd. Los valores con la misma letra en la misma fila, no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

El análisis de los resultados demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes formulaciones en las hamburguesas de mismo tamaño sugiriendo que el recubrimiento aplicado sobre el PE no presenta actividad antimicrobiana.

Sin embargo se observan diferencias entre las hamburguesas de tamaño grande 12 cm, y las de tamaño pequeño 3,4 cm siendo las de tamaño pequeño las que muestran un crecimiento bacteriano más elevado. Posiblemente estas diferencias pueden ser ocasionadas por el crecimiento excesivo de microorganismos en la interfase hamburguesa/atmósfera siendo más elevado del crecimiento de bacterias mesófilas y psicrófilas en estas zonas.

3.2.2 Aplicación en films de PLA: El té blanco como antioxidante natural en envases bioactivos para alimentos

Caracterización de los films de PLA con compuestos antioxidantes

Los films de PLA desarrollados se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM), DSC y TGA evaluando la homogeneidad del WT en la matriz de PLA, las propiedades térmicas y termo-oxidativas.

Las micrografías obtenidas por SEM, **Figura 28**, muestran que el PLA puro (**Figura 28A**) configura una matriz lisa, homogénea y sin roturas del polímero. Esto sugiere una correcta elaboración de los films con una estructura estable, sin grumos ni perforaciones observables. La distribución del WT en el films (**Figura 28B**) es homogénea, se observa una pauta de distribución regular a la largo de todo el film desarrollado.

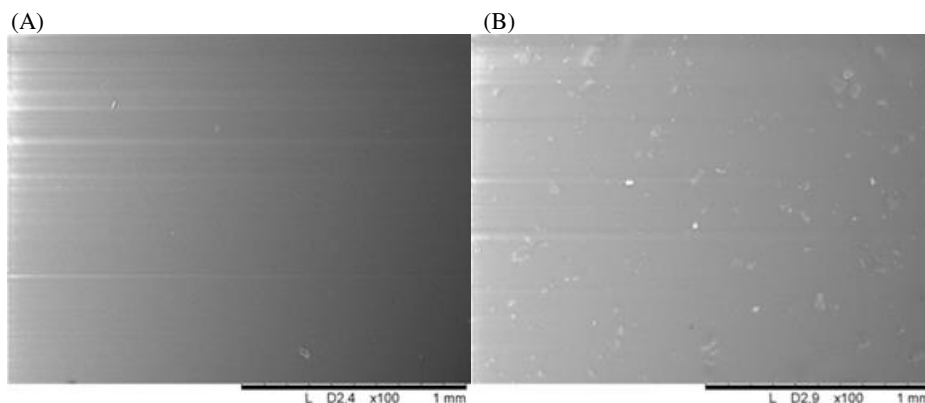


Figura 28: Micrografías por SEM de un film de PLA puro (A) y un film de PLA + WT (B).

El análisis de DSC revela que la adición del WT-G no causa ninguna diferencia significativa en las propiedades térmicas del film de PLA, como son las temperaturas del Tg y Tm. Se determinan unos valores de Tg de 9,2 °C y 9,4 °C y de Tm de 145,1 °C y 144,8 °C respectivamente para el PLA y el PLA/WT-G. Sin embargo, en los films de PLA/WT-G se observa un ligero descenso en el grado de cristalización (4,4% en lugar de 9,2% del PLA puro).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gonçalves *et al.*, (2013) que también obtuvieron un descenso del grado de cristalización al añadir BHT a films de PLA.

De acuerdo con el análisis de TGA, el punto inicial de la temperatura de degradación del film de PLA puro es de 313,4°C e interesantemente, la adición del WT-G en la formulación incrementa este punto inicial hasta 330°C. Esto sugiere que el WT-G tiene un efecto significativo en el film de PLA incrementando su estabilidad termo-oxidativa. Este hecho es de suma importancia, debido a que, el PLA tiene una estabilidad térmica pobre y comúnmente se degrada severamente durante el proceso de elaboración de films. Aunque la degradación es asumida como un proceso no-radical, se han observado procesos de protección después de la adición de inhibidores de radicales que podrían ralentizar estos procesos no deseados. Por otro lado, la utilización de aditivos estabilizadores de origen natural que previenen la degradación, no supone ninguna impedimento para seguir catalogando a los materiales de PLA como materiales de base biológica (Silva-Weiss, *et al.*, 2013).

Efecto antioxidante de los films en emulsiones

a) Estudio del tamaño de gota obtenido en la emulsión

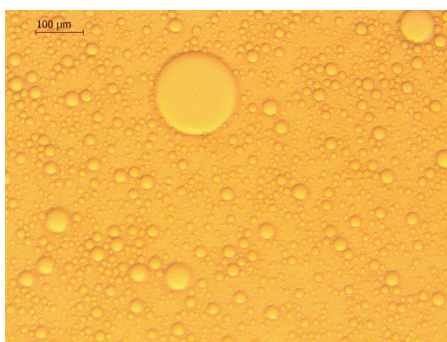
Uno de los factores clave en la oxidación lipídica de las emulsiones aceite en agua (O/W), es el tamaño de gota y las características interfase de las gotas lipídicas y el agente emulsificante (Ries *et al.*, 2010). Así, la obtención de emulsiones con un tamaño de gota homogéneo es de suma importancia en la evaluación del efecto de los films activos en ellas.

Se optimizó el método de elaboración de las emulsiones mediante el estudio del efecto del tiempo de sonicación en el tamaño de la gota. Se prepararon emulsiones usando tiempos de 30 hasta 180 s y se estudió la homogeneidad de la gota por visualización directa en el microscopio óptico.

Las imágenes de microscopía (**Figura 29**) revelan que la distribución del tamaño de gota es más homogéneo a tiempos más elevados. El tiempo óptimo para conseguir la homogeneidad se estableció en 120 s.

A tiempos cortos de homogenización (**Figura 29A**), se observan tamaños heterogéneos, se obtienen gotas mayores de 100 μm . Con el aumento del tiempo de elaboración a 60 s apenas se detectó gotas de más de 10 μm y a tiempos mayores se obtuvieron emulsiones donde todas las gotas presentaron un tamaño siempre inferior a 50 μm .

(A)



(B)

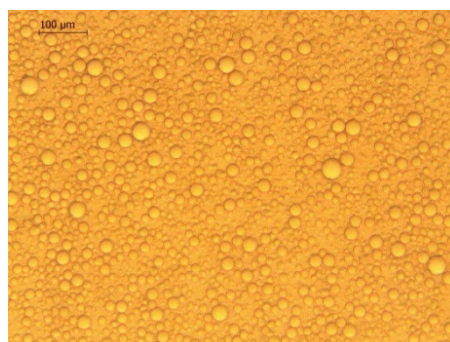


Figura 29: Imagen de microscopía óptica de 40 aumentos. (A) Emulsión de tamaño de gota heterogénea. (B): Emulsión de tamaño de gota homogéneo.

b) Estudio de la capacidad antioxidante de los films en emulsiones

Se determinó la efectividad de los films en inhibir la oxidación de emulsiones O/W durante 29 días. Se analizó la oxidación primaria (por la medida del Valor Peróxido (PV)), el pH y la oxidación secundaria (por el método TBARS).

El análisis de PV (**Figura 30**), muestra que la adición de WT-G en films de PLA reduce la oxidación lipídica y la formación de hidroperóxidos. El tiempo de inducción, determinado como el tiempo en alcanzar 10 meq. de hidroperóxidos / kg de emulsión fue de 4 días para el control (sólo emulsión) y de 13 días para las emulsiones en contacto con los films de PLA. La formulación de PLA/WT-G mantiene la emulsión hasta 11 días. La velocidad de la oxidación, se reduce de 4,1 meq hidroperóxidos / kg

de emulsión y día en las emulsiones con PLA hasta 1,3 meq de hidroperóxidos / kg de emulsión y día en las emulsiones en contacto con PLA/WT.

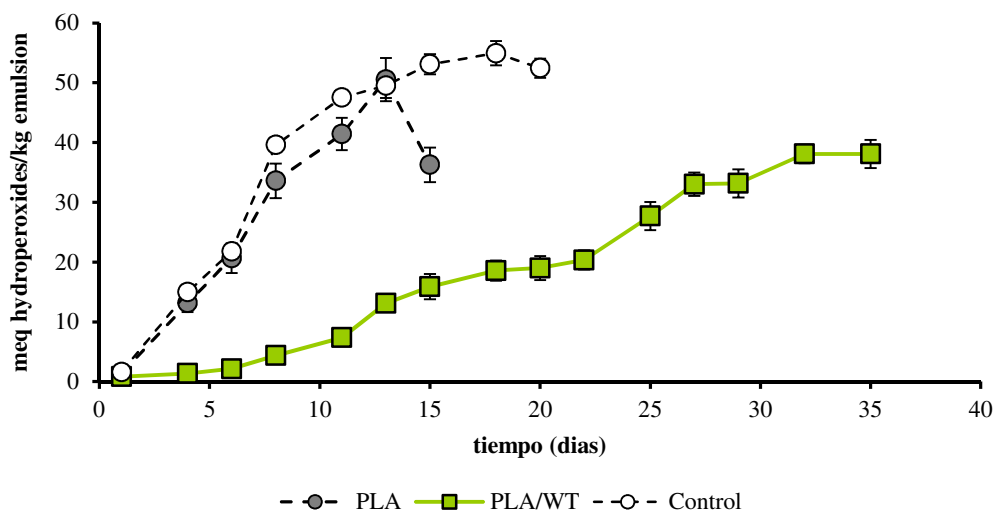


Figura 30: Evolución de la oxidación primaria en las emulsiones en contacto con el film de PLA y PLA/WT. Los resultados se representan como la media \pm sd de tres réplicas.

El efecto antioxidante en emulsiones de varios extractos con elevado contenido en polifenoles fue demostrado con anterioridad en otros trabajos como los de Gallego *et al.*, (2013); Segovia *et al.*, (2014b o Skowrya *et al.*, (2014a), durante un periodo tiempo similar usando extractos de plantas aromáticas (romero, tomillo, y lavanda), borraja y perilla respectivamente.

La evolución del pH (**Figura 31**) a lo largo del tiempo muestra que los films de PLA/WT mejoran la estabilidad del pH de la emulsión en comparación con las emulsiones control.

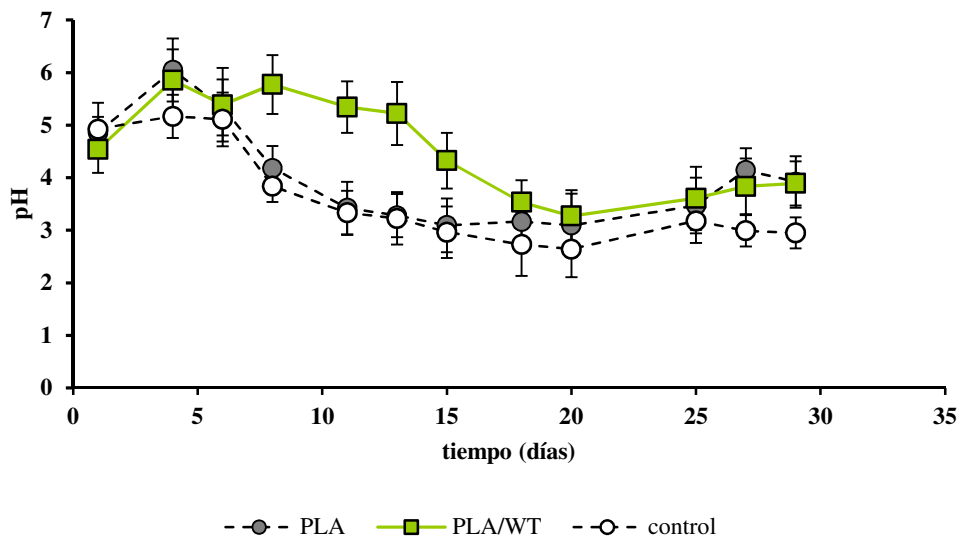


Figura 31: Evolución del pH en las emulsiones o/w en contacto con los films de PLA puro y PLA/WT. Los resultados se representan como la media \pm sd de tres réplicas.

Por otro lado, el análisis de la oxidación secundaria (TBARS, expresado en mg de MDA/ kg de emulsión), muestra que durante las primeras dos semanas, los films de PLA/WT reducen significativamente la oxidación secundaria (**Figura 32**).

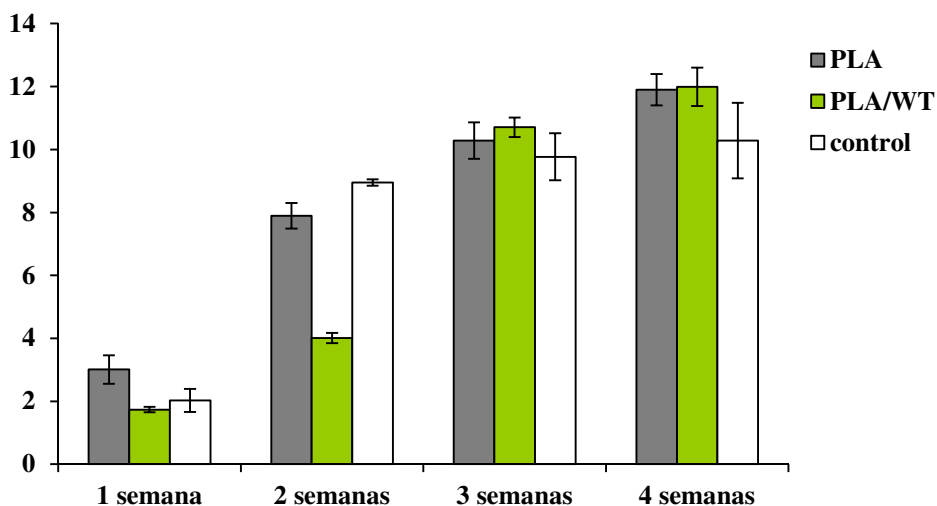


Figura 32: Evolución del TBARS las emulsiones en contacto con los films de PLA, PLA/WT y en emulsiones control. Las barras de error muestran la sd.

Después de 1 y 2 semanas, la cantidad de MDA producido en las emulsiones en contacto con PLA/WT fue un 24% y un 54% inferior respectivamente, en comparación a las emulsiones control. Durante las primeras dos semanas, el film de PLA/WT también mostró un elevado efecto antioxidante en comparación con las muestras que sólo contenían films de PLA, por ejemplo, se observa que, después de 2 semanas, los valores de MDA fueron un 44% más elevados que las emulsiones en contacto con los films de PLA/WT. Después de una exposición prolongada de 3 y 4 semanas, los valores de MDA para la emulsión PLA/WT fueron similares a los obtenidos en las emulsiones elaboradas sólo con PLA y mostraron un leve incremento con lo que es posible afirmar que los films formulados con WT preservan al menos 2 semanas a las emulsiones de la oxidación.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

La presente Tesis Doctoral ocupa la extracción de polifenoles naturales, la optimización del proceso de extracción, (Apartado 1.1 y 1.2 del Capítulo 4), caracterización (Apartado 2) y la aplicación en carnes y en envases activos (Apartados 3.11 y 3.2). Para ello se han usado extractos naturales procedentes de fuentes agroalimentarias (té blanco, (WT)) y residuos de limón (LW) obtenidos en el procesado industrial de zumos. Las aplicaciones de los extractos se han centrado en su uso como aditivos aplicados directamente en carnes y en su aplicación como agentes antioxidantes en films activos.

En la optimización de la extracción de polifenoles de WT (Peiró *et al.*, 2014) se ha usado etanol, descrito como uno de los solventes más efectivos para este fin (Ferruzzi and Green, 2006; Mariya *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011a) además de ser reconocido como solvente de grado alimentario o GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) (Gil-Chávez *et al.*, 2013). Los extractos obtenidos se han caracterizado determinando los polifenoles totales (TP), se han cuantificado los polifenoles mayoritarios y, evaluando su capacidad antioxidante mediante el análisis de TEAC y ORAC. Para el diseño experimental (DoE), se han tenido en cuenta los factores, Temperatura (T), tiempo de extracción (t) y % de etanol, a unos rangos de 40 a 90°C, de 5 a 90 minutos y de 0 a 96% de etanol respectivamente. Para el análisis experimental se ha usado Metodología de Superficie Respuesta (RSM) (Komes *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2011b; Terabe *et al.*, 2009). Se han realizado múltiples ajustes al modelo descartando los coeficientes estadísticamente no significativos ($p > 0.05$) para todos los parámetros analizados. A partir del modelo se han obtenido los parámetros que maximizan la T de extracción (Apartado 1.1) que muestran que es posible extraer una cantidad de polifenoles totales de 178,7 mg GAE/g de té blanco, concentraciones similares a las descritas en López *et al.*, (2011) y en Rusak *et al.*, (2008). Se han determinado las condiciones óptimas de (185 mg GAE/ g té blanco) en 48% de etanol, a 47,5 min y a 65°C.

El estudio de correlación entre TP y los índices de medida de la capacidad antioxidante (TEAC y ORAC) muestran un coeficiente de correlación elevado ($R^2 \geq 0,86$) entre todos

los métodos. Este hecho no se corresponde con las afirmaciones de algunos autores (Tabart *et al.*, 2009; Zulueta *et al.*, 2007) que describen al TEAC como un método económico y rápido pero que subestima la actividad antioxidante.

La optimización de la extracción de polifenoles procedentes del residuo de limón se ha desarrollado aplicando una extracción asistida por presión con pretratamiento de PEF (Apartado 1.2 del Capítulo 4), usando agua como solvente. Según detallan algunos autores (Puértolas *et al.*, 2013) el tratamiento de PEF produce micro-perforación de las membranas celulares (de forma irreversible) liberando el contenido intracelular de los tejidos vegetales. Previamente se optimizaron las condiciones de tratamiento con PEF para obtener la mayor rotura celular. Para ello se evaluó el Índice de Desintegración Celular (Z_p) en tratamientos de 3, 5, 7 y 9 kV/cm durante 100 pulsos. Los resultados obtenidos ($Z_p = 0,55$) muestran que el tratamiento más efectivo es el de 7 kV/cm durante 30 pulsos. Estos valores son significativamente mayores que los obtenidos en otros estudios similares (Luengo *et al.*, 2013) donde obtienen un $Z_p = 0,3$. Por otro lado, Ersus and Barrett (2010), describen valores similares ($Z_p = 0,57$) en rodajas de patata aplicando un potencial eléctrico más bajo. Se sugiere que el tratamiento con PEF aumenta su efectividad al ser aplicado en tejidos más blandos.

Se evaluó la influencia del tratamiento en relación a la matriz vegetal a tratar. Queda demostrado que en los tratamientos con PEF se incrementa la extracción de TP en un 204,5% y que la transferencia de masas (matriz-solvente) descrita en Janositz, *et al.*, (2011) y en Puértolas *et al.*, (2010a; 2010b) no es el único factor que afecta en la extracción.

Los factores a estudiar en el modelo de optimización por PEF, fueron potencial eléctrico (EF), presión aplicada (P) y tiempo de aplicación (t) de la presión. En general, la extracción de polifenoles aumenta cuando la energía y la presión son mayores (7 Kv/cm y 5 bar). Los buenos resultados obtenidos están en línea de los descritos por Luengo *et al.*, (2012) y por Parniakov *et al.*, (2013). El trabajo se completó con una evaluación de la cinética de extracción que revela que, el mayor valor Y_{max} (basándose en los datos experimentales) se obtiene a 3,5 kV/cm y 5 bar de presión. López *et al.*,

(2009) trabajó en la extracción de azúcares de *Beta vulgaris* y obtuvieron resultados similares a los descritos en este trabajo.

La correlación elevada ($R^2=0,95$) entre los polifenoles totales y la actividad antiradicalaria por el método ORAC muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en Rusaczoneck *et al.*, (2010) quienes también obtuvieron correlaciones elevadas.

Por otro lado, se analizó la degradación de polifenoles mayoritarios (eriocitrina y hesperidina) contenidos en el residuo de limón por efecto del PEF. Basándose en los datos, se determinó que no se degradan sino que su concentración aumenta con EF y P. Además, se puede afirmar que la actividad antioxidante es debida a más compuestos, ya que el incremento con presión y potencia no es paralelo, es decir, la actividad antioxidante aumenta más que la eriocitrina y la hesperidina con lo que hay otros compuestos activos o una actividad sinérgica entre ellos.

La actividad biológica del residuo de limón se evaluó estudiando la capacidad antimicrobiana, de protección al DNA y de protección celular a un daño oxidativo inducido (Capítulo 4, Apartado 2). Estos ensayos sólo se realizaron con el residuo limón (LW) ya que, en estudios previos del grupo de investigación (Almajano *et al.*, 2008; Almajano, *et al.*, 2011) se analizó con los extractos de WT. Los estudios antifúngicos muestran que el extracto de residuo de limón es capaz de ralentizar la esporulación de *Aspergillus brasiliensis* y de inhibir el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en medio de cultivo no tamponado mostrando una MIC de 100 mg/mL. La baja eficacia antimicrobiana del extracto de LW está en concordancia con los resultados descritos en Yang *et al.*, (2013). Aplicando los extractos directamente en carnes, se detectó una reducción de la carga microbiana de *Escherichia coli* y *Listeria* pero no una inhibición total del crecimiento. En lo referente a la ralentización de la esporulación, los resultados concuerdan con los hallados en Ortuño *et al.*, (2006) quienes aplicaron un método de inclusión del extracto en el agar para su comprobación. Otros trabajos como el de Ashor and Kumar (2011) muestran que los aceites esenciales del limón sí presentan una actividad antimicrobiana destacable.

La protección que ofrece el extracto de residuo de limón a la oxidación del DNA se evaluó mediante el estudio *in vitro* de la resistencia del plásmido pGEM-T a una oxidación inducida por peróxido de hidrógeno. Los resultados demuestran que el limón puede proteger al DNA pero con un efecto inferior al publicado por otros autores (Tian and Huan, 2005).

La actividad del residuo de limón como agente protector de cultivos celulares (células neuronales estriatales STHdh^{Q7}), frente a un estrés oxidativo inducido, determina que a una concentración de 400 µg/mL de residuo es posible obtener una respuesta estadísticamente significativa. La supervivencia celular, en relación al % total respecto a las células control (no sometidas a estrés oxidativo) es inferior a la obtenida por otros autores con otros extractos naturales de té blanco (Almajano *et al.*, 2011). Estas diferencias se deben, fundamentalmente, al distinto efecto antioxidante que presentan el WT y el LW y al tiempo de incubación celular tras el estrés oxidativo. En el presente estudio, la viabilidad celular se cuantificó inmediatamente después del estrés oxidativo mientras que en Almajano *et al.*, (2011) las células fueron incubadas con posterioridad permitiendo a las viables reproducirse y así aumentar el recuento final celular. La desviación estándar obtenida (7 %) es propia del método de recuento por citometría de flujo, ya que implica una manipulación de las muestras causando mayor mortalidad celular. Estos resultados sugieren que, a pesar de que la citometría (basado en el método de Sakulnarmrat *et al.*, (2013)) es una técnica muy precisa de recuento (y obtiene un recuento total de las células contenidas en la muestra), la manipulación lleva a una mortalidad celular mayor que las técnicas de tinción *in situ* en la propia placa de cultivo celular. Bhavsar *et al.*, (2007) realizaron ensayos en células hepáticas (HepG2) con extractos de limón y hallaron que el limón también protege del estrés oxidativo.

Se evaluó la posibilidad de usar el WT y los LW como aditivos alimentarios capaces de inhibir procesos de oxidación en carne cruda en hamburguesas y en envases activos emisores con propiedades antioxidantes.

En un primer trabajo se evaluó la efectividad del té blanco (WT) en carne picada ecológica de vacuno. Se testaron dos formulaciones de té blanco triturado (WT-G) y liofilizado (WT-FD), ambas aplicadas directamente en la carne. Se determinó la

eficacia de ambas como antioxidante y con ello la posibilidad de innovar y crear un nuevo producto alimentario con valores nutricionales añadidos como se sugiere en Mitsumoto *et al.*, (2005). Los resultados obtenidos (Apartado 3.1.1) muestran que ambas formulaciones son capaces de inhibir la oxidación secundaria de los lípidos (medido por TBARS) durante al menos 6 días, a diferencia de las muestras control, ya oxidadas con solo un día de almacenamiento. Además, con la finalidad de determinar la mínima concentración de WT con capacidad de protección a la oxidación lipídica, se estudió la formulación menos procesada (WT-G) a varias concentraciones en dos tipos de envasado comercial (MAP y vacío (VP)).

En la carne envasada en MAP se determinó que el WT-G es capaz de reducir la oxidación durante un periodo de al menos 12 días en la concentración más baja testada (0,5 g WT-G/kg de carne) y alcanzar los mismos niveles de inhibición de la oxidación que las muestras control positivo, donde se aplicó un antioxidante sintético comercial (BHT). Otros autores (Tang *et al.*, 2006; Alp and Aksu, 2010; Chuchachuychoo, 2011) obtienen resultados similares a los aquí descritos con té verde. En los ensayos con VP (Apartado 3.1.2) no se observó oxidación debido a la ausencia de O₂. Si bien algunos autores si describen oxidación (Cachaldora *et al.*, 2013), la atribuyen a la difusión de aire desde la atmósfera externa al interior de envase. En el estudio realizado no se produjo la difusión de O₂ o si la hubo no alcanzó los niveles mínimos descritos en Arashis *et al.*, (2004) y Smiddy *et al.*, (2002) necesarios para inducir la oxidación.

El color de la carne es un factor crucial en la evaluación de la calidad y aceptabilidad del consumidor final (Price *et al.*, 2013). El color marrón es el peor valorado en comparación con las que tiene un color más rojizo (Allen and Cornforth, 2010). Las muestras en condiciones de VP adquieren un color poco rojizo en su conjunto (valores bajos de a*) debido a la ausencia de oximioglobina (metmioglobina) por lo que es poco aceptable para el consumidor. Todas las muestras analizadas tuvieron valores similares y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre muestras. Cachaldora *et al.*, (2013) obtienen valores similares a los comentados. Sin embargo, con MAP, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el color de a* a los 5 días de almacenamiento a 4°C. Las muestras con WT-G (en las tres

concentraciones) mantienen más estable el color de la carne (valores más altos de a^*) de manera similar a los estudios publicados por Jo *et al.*, (2003), Tang *et al.*, (2000) y Bañón *et al.*, (2007).

La evolución del pH fue muy similar en las hamburguesas envasadas en ambas condiciones con lo que se sugiere que el efecto en la bajada del pH se debe al crecimiento microbiano de bacterias anaerobias y anaerobias facultativas (Chowdhury, *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2011) que producen D-lactato y acetato, que bajan el pH y no viene influenciado por la presencia de WT, tal y como publicaron Kim *et al.*, (2013a).

También se analizó el contenido en microorganismos mesófilos (TMC) y psicrófilos totales (TPC) en las muestras almacenadas en MAP y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre muestras. Esto permite afirmar que el WT no actúa como antimicrobiano en la carne.

Por último se estudió la elaboración de dos tipos de films activos con propiedades antioxidantes. Los primeros se elaboraron con PE (Polietileno) donde el antioxidante (WT y LW) fue depositado en forma de cobertura sobre la superficie, previamente activada con plasma. Los segundos, desarrollados en colaboración con la KTH (Estocolmo, Suecia), se formularon con el biopolímero ácido poliláctico (PLA) y el antioxidante (WT), se incluyó en el proceso de fusión “casting” del propio material. La efectividad de los films de PE se testó sobre carne de ternera picada. Los de PLA, debido a la baja efectividad del LW demostrada en los anteriores, se desarrollaron exclusivamente con WT y su efectividad se testó sobre emulsiones.

En los films de PE, se analizaron varios factores. En primer lugar, el efecto del plasma en la mejora de la adhesión del antioxidante al film de PE y como herramienta para incrementar la homogeneidad. Para ello se midió el ángulo de contacto de agua (WCA) con el PE, el color y la opacidad. Se demostró que el WCA disminuye al aplicar plasma, con lo que hace al PE más receptivo a los extractos; además, se demostró que mejora la homogeneidad. Estos resultado concuerdan con los descritos por otros autores (Kaynak *et al.*, 2013 y Cheng *et al.*, 2006) que demuestran que el tratamiento mejora el proceso de elaboración los films.

También se evaluó la capacidad antimicrobiana del plasma sobre superficies y se demostró que el DBD plasma es capaz de reducir más de 6 unidades logarítmicas en *E.coli*, *S.aureus* y 2 unidades logarítmicas en *Aspergillus* usando tratamientos de 100 segundos. Estos resultados sugieren que el plasma proporciona una desinfección del material usado. Otros estudios como los de Pankay *et al.*, (2014b) o Misra *et al.*, (2011) también describen esta actividad y obtienen resultados similares a los descritos.

Por otro lado, se estudió la influencia del plasma en la capacidad antioxidante y la cinética de liberación de los antioxidantes en simulantes alimentarios, usando los establecidos en la norma EU 10/2011 (European Parliament, 2011). Se estudió el ajuste al modelo teórico de cinética sólido-líquido descrito en en López *et al.*, (2009). Los resultados muestran que el plasma no afecta a la capacidad antioxidante del extracto aplicado.

Las cinéticas de liberación revelan que, en simulantes hidrofílicos, se produce una liberación que tiende rápidamente (200 segundos) al máximo mientras que, en simulantes hidrofóbicos, no se produce liberación de polifenoles. La determinación y ajuste a la velocidad máxima del proceso de liberación, indica que los films PE+WT poseen más liberación de antioxidantes aunque los de PE+LW alcanzan el máximo antes. Estos resultados señalan al WT como antioxidante más recomendado ya que alcanza valores más elevados en el producto y tiene liberación más lenta. La finalidad es aplicar el film en la industria alimentaria y para ello se podría ralentizar los procesos de liberación y conseguir que la liberación se produzca en tiempos más largos; por ello algunos autores (Silva-Weiss *et al.*, 2013) han estudiado el efecto de añadir otros compuestos como quitosano o gelatina a la formulación.

El uso PE en films activos se ha evaluado sobre hamburguesas de vacuno, con dos tamaños distintos (3,4 cm y 12 cm de diámetro). Los resultados indican que los films de PE+LW sólo son efectivos en hamburguesas de tamaño pequeño. Sin embargo, los films de WT muestran una elevada efectividad, retrasando la oxidación de la carne hasta 4 días en ambos casos. No se observan diferencias significativas en la cantidad de

microorganismos totales lo que indica que ninguno de los films formulados es efectivo como agente antimicrobiana.

La efectividad del WT en los films de PE planteó su posible uso en el interior de envases formulados a partir de biopolímeros de ácido poliláctico (PLA). Los films de PLA se desarrollaron sólo con WT, (WT-G), comparable en cuanto a su efectividad al WT-FD. Se evaluó su homogeneidad mediante microscopía electrónica. El análisis de DSC muestra que los films poseen un alto grado de homogeneidad. Otros autores (Panjak *et al.*, 2014b) también consiguieron elaborar films de PLA eficaces con características similares de homogeneidad. A pesar de ello, todas las referencias bibliográficas encontradas usan extractos y no el producto directamente triturado. La efectividad de los films de PLA se testó en emulsiones O/W y se siguió la evolución de la oxidación por pH, PV y TBARS. Los resultados obtenidos demuestran que los films de PLA tienen gran efectividad en la reducción de la oxidación durante un periodo de más de 2 semanas tanto en la oxidación primaria como especialmente en la oxidación secundaria.

Los extractos de LW tienen unas capacidades antioxidantes limitadas. Sin embargo, el WT directo, incluso sin ser sometido a procesos de concentrado (como la liofilización), es un muy buen candidato a ser usado como aditivo natural en carnes y como antioxidante natural en la elaboración de envases activos.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

1. Las condiciones óptimas de extracción de polifenoles del té blanco son $42 \pm 2\%$ de EtOH con $48,5 \pm 8,5$ min de extracción. La cantidad obtenida es $182,62 \pm 2,39$ mg GAE/g WT. La temperatura no influye en el modelo de optimización. La correlación entre los polifenoles totales y su actividad antioxidante (determinada por los métodos TEAC y ORAC) es elevada, $R^2=0,90$ y $0,86$ respectivamente.
2. Se han aplicado campos eléctricos pulsados (PEF) para extraer compuestos bioactivos de los residuos de limón. Los PEF incrementan la extracción en más del 200% sin diferencias significativas respecto el tamaño de residuo tratado. La mayor eficacia de extracción en el equilibrio, a tiempo infinito, se obtiene a $3,5$ kV/cm y 5 bar. La correlación entre concentración de polifenoles y actividad antioxidante es elevada, $R^2= 0,95$.
3. Los máximos valores experimentales de la hesperidina y la eriocitrina (polifenoles mayoritarios del residuo del limón) son $91,8 \pm 3,8$ mg/100 g FW y $176 \pm 15,4$ mg/100 g FW, respectivamente.
4. El residuo de limón presenta actividad antimicrobiana frente a *Lactobacillus plantarum* CECT 4308 en soluciones no tamponadas y ralentiza la formación de esporas en *Aspergillus brasiliensis* CECT 2574. Además actúa como agente protector del DNA (plásmido pGEM-T) y de células neuronales (STHdh^{Q7}) frente a la oxidación inducida por H₂O₂.
5. El té blanco (tanto en extracto liofilizado como directo) protege de la oxidación lipídica durante más de 6 días a la carne cruda. Con atmósfera modificada (MAP) protege de la oxidación durante 10 días más que el control. En envasado al vacío no se encuentran diferencias frente al control.
6. Se han desarrollado films activos de polietileno (PE) con los extractos de residuo de limón y de té blanco por la técnica *road coating*. El pre-tratamiento del polímero con DBD-plasma mejora la homogeneidad del recubrimiento. Los films elaborados

protegen a las hamburguesas de carne cruda de la peroxidación lipídica. El film más efectivo es el elaborado con té blanco.

7. Se han diseñado envases activos de ácido poliláctico con té blanco y un alto grado de homogeneidad. Su uso en emulsiones O/W muestra que tienen gran efectividad en la reducción de la oxidación durante un periodo superior a 2 semanas. Son eficaces tanto en la oxidación primaria como en la oxidación secundaria de los lípidos.

Como **conclusión global** se ha demostrado que el té blanco es un agente antioxidante muy potente y con múltiples aplicaciones como antioxidante natural. Es candidato valorable como sustituto de antioxidantes sintéticos.

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abenoza, M., Benito, M., Saldaña, G., Álvarez, I., Raso, J., Sánchez-Gimeno, C. (2012). Effects of Pulsed Electric Field on Yield Extraction and Quality of Olive Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1367–1373.

AESAN. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los envases activos e inteligentes. *Revista del Comité Científico de la AESAN nº13*, 89-105.

Al Bittar, S., Périno-Issartier, S., Dangles, O., Chemat, F. (2013). An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 141(3), 3268–3272.

Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D. J., Decker, E. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2969–2976.

Albarracin, S. L., Stab, B., Casas, Z., Sutachan, J. J., Samudio, I., Gonzalez, J., Barreto, G. E. (2012). Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutritional Neuroscience*, 15(1), 1–9.

Aleson-Carbonell, L., Fernandez-López, J., Perez-Alvaraez, J. A., Kuri, V. (2005). Characteristics of beef burger as influenced by various types of lemon albedo. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 6(2), 247–255.

Al-Gubory, K. H., Fowler, P. A., Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 42(10), 1634–50.

Allen, K., Cornforth, D. (2010). Comparison of spice-derived antioxidants and metal chelators on fresh beef color stability. *Meat Science*, 85(4), 613–9.

Almajano, M. P., Carbó, R., Delgado, M. E., Gordon, M. H. (2007). Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *Journal of Food Science*, 72(5), C258–C263.

Almajano, M. P., Carbó, R., Jimenez, J. A. L., Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108(1), 55–63.

Almajano, M. P., Vila, I., Gines, S. (2011). Neuroprotective effects of white tea against oxidative stress-induced toxicity in striatal cells. *Neurotoxicity Research*, 20(4), 372–378.

Alp, E., Aksu, M. I. (2010). Effects of water extract of *Urtica dioica* L. and modified atmosphere packaging on the shelf life of ground beef. *Meat Science*, 86(2), 468–473.

Angersbach, A. , Heinz, V., Knorr, D. (1999). Electrophysiological model of intact and processed plant tissues: cell disintegration criteria. *Biotechnology Progress*, 15(4), 753–762.

- Álvarez, R., Carvalho, C. P., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., Londoño-Londoño, J. (2012). Citrus juice extraction systems: effect on chemical composition and antioxidant activity of clementine juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 774–781.
- Anderson, O.M., Jordheim, M. (2006) The anthocyanins. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O.M., Markham, K.R., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 472-551.
- Andrade, J. P. Assunção, M. (2012). Protective effects of chronic green tea consumption on age-related neurodegeneration. *Current Pharmaceutical Design*, 18(1), 4–14.
- Asavasanti, S., Ristenpart, W., Stroeve, P., Barrett, D. M. (2011). Permeabilization of Plant Tissues by Monopolar Pulsed Electric Fields: Effect of Frequency. *Journal of Food Science*, 76(1), E98–E111.
- Ashok-Kumar, K., Narayani, M., Subanthini, A., Jayakumar, M. (2011). Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Citrus Fruit Peels. -*Utilization of Fruit Waste*, 3(6), 5414–5421
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J., Siddiqui, M. W., González-Aguilar, G. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit by products as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866–1874.
- Azman, N. M., Peiró, S., Fajarí, L., Julià, L., Almajano, M. P. (2014). Radical Scavenging of White Tea and Its Flavonoid Constituents by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(25), 5743–5748.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Bañón, S., Díaz, P., Rodríguez, M., Garrido, M. D., Price, A. (2007). Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Science*, 77(4), 626–633.
- Bañón, S., Méndez, L., Almela, E. (2012). Effects of dietary rosemary extract on lamb spoilage under retail display conditions. *Meat Science*, 90(3), 579–583.
- Baradaran, A., Nasri, H., Rafieian-Kopaei, M. (2014). Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of Research in Medical Science*, 19(4), 358–367.
- Barbosa-Pereira, L., Aurrekoetxea, G. P., Angulo, I., Paseiro-Losada, P., Cruz, J. M. (2014). Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef. *Meat Science*, 97(2), 249–254.
- Bearth, A., Cousin, M.-E., Siegrist, M. (2014). The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefit perceptions. *Food Quality and Preference*, 38, 14–23.
- Belletti, N., Nadagijimana, M., Sisto, C., Guerzoni, M. E., Lanciotti, R., Gardini, F. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 6932–6938.

- Bereiter-Hahn, J. (2014). Do we age because we have mitochondria? *Protoplasma*, 251(1), 3–23.
- Bhavsar, S. K., Joshi, P., Shah, M. B., Santani, D. (2007). Investigation into hepatoprotective activity of *Citrus limon*. *Pharmaceutical Biology*, 45(4), 303–311.
- Bocco, A., Cuvelier, M., Richard, H., Berset, C. (1998). Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts, *Jornal of Agriculture and Food Chemistry*.46(6), 2123–2129.
- BOE. (1998). RD 10/1998 de 21 de abril de 1998. Pubicado el 22 de abril de 1998.
- Boluda-Aguilar, M., López-Gómez, A. (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*, 41(1), 188–197.
- Booterweck, A. A., Verhegan, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J., Van den Brant, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hidrooxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*, 38(7), 599–605.
- Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2–3), 325–337.
- Bor, B. Y., Alin, J., Hakkarainen, M. (2012). Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Analysis Reveals Migration of Cyclic Lactide Oligomers from Polylactide Packaging in Contact with Ethanolic Food Simulant. *Packaging Technology and Science*, 25, 427–433.
- Both, S., Chemat, F., Strube, J. (2014). Extraction of polyphenols from black tea – Conventional and ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 1030–1034.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: Characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237–248.
- Bratt, K.; Sunnerheim, K.; Bryngelsson, S.; Fagerlund, A.; Engman, L.; Andersson, R.E.; Dimberg, L.H. (2003). Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and structure-antioxidant activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 594-600.
- Brooks, J. C., Alvarado, M., Stephens, T. P., Kellermeier, J. D., Tittor, A. W., Miller, M. F., et al. (2008). Spoilage and safety characteristics of ground beef packaged in traditional and modified atmosphere packages. *Journal of Food Protection*, 71(2), 293–301.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal Neonatal Medicine*, 15(4), 186–90.
- Cachaldora, A., García, G., Lorenzo, J. M., García-Fontán, M. C. (2013). Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on some quality characteristics and the shelf-life of “morcilla”, a typical cooked blood sausage. *Meat Science*, 93(2), 220–225.
- Cabrera, C., Artacho, R., Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea - A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79–99.

- Calatayud, M., López-de-Dicastillo, C., López-Carballo, G., Vélez, D., Hernández Muñoz, P., Gavara, R. (2013). Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications. *Food Chemistry*, 139(1), 51–58.
- Camo, J., Beltrán, J. A., Roncalés, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*, 80(4), 1086–1091.
- Camouse, M. M., Domingo, D. S., Swain, F. R., Conrad, E. P., Matsui, M. S., Maes, D., Baron, E. D. (2009). Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. *Experimental Dermatology*, 18(6), 522–526.
- Carballo, S., Zingarello, F., Maestre, S. E., Todolí, J. L., Prats, M. S. (2014). Optimisation of analytical methods for the characterisation of oranges, clementines and citrus hybrids cultivated in Spain on the basis of their composition in ascorbic acid, citric acid and major sugars. *International Journal of Food Science Technology*, 49(1), 146–152.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., Ferreira, (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377–399.
- Carocho M, Ferreira ICFR, (2013). The role of phenolics compounds in the fight against cancer—a review. *Anticancer Agents in Medical Chemistry*, 13,1236–1258.
- Carreras-Cardona, A. (2012). Study of the Electron-Transfer properties of phenolics and their relationship with the biological activity on cancer cells. Thesis. Barcelona University – CSIC.
- Castro-López, M. D. M., López-Vilariño, J. M., González-Rodríguez, M. V. (2014). Analytical determination of flavonoids aimed to analysis of natural samples and active packaging applications. *Food Chemistry*, 150(1), 119–127.
- Cayré, M.E.; Vignolo, G; Garro, O; (2003) Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. *Food Microbiology*.20, (5) 561–566.
- Ćetković, G., Savatović, S., Čanadanović-Brunet, J., Djilas, S., Vulić, J., Mandić, A., Četojević-Simin, D. (2012). Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food Chemistry*, 133(3), 938–945.
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, S. K., Lim, K. K., Tan, S. P., Lianto, F. S., Yong, M. Y. (2009). Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*, 113(1), 166–172.
- Chen, L., Hu, J. Y., Wang, S. Q. (2012). The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67(5), 1013–24.
- Cheng, C., Liye, Z., Zhan, R.-J. (2006). Surface modification of polymer fibre by the new atmospheric pressure cold plasma jet. *Surface and Coatings Technology*, 200(24), 6659–6665.
- Cheng, N., Wang, Y., Gao, H., Yuan, J., Feng, F., Cao, W., Zheng, J. (2013). Protective effect of extract of *Crataegus pinnatifida* pollen on DNA damage response to oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 709–714.

- Chowdhury, B. R., Chakraborty, R., Chaudhuri, U. R. (2005). Mathematical modeling of microbial growth of pretreated refrigerated minced goat meat (Black Bengal variety). *Journal of Food Science*, 70(2) M105–M112.
- Chuechachuychoo, A. (2011). Quality characteristics of Raw Cooked Spent Hen Pectoralis major Muscle During Chilled Storage: Effect of Tea Catechins. *International Journal of Poultry Science* 10(1), 12–18.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1–20.
- Coll, M D; Coll, L, Laenicna, J. T.-B. F. A. (1998). Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. *Z.lebensum Unters Forsh A*, 206(6), 404–407.
- Colon, M., Nerin, C. (2012). Role of catechins in the antioxidant capacity of an active film containing green tea, green coffee, and grapefruit extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9842–9849.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1–2), 90–103.
- Contini, C., Katsikogianni, M. G., O'Neill, F. T., O'Sullivan, M., Dowling, D. P., Monahan, F. J. (2012). PET trays coated with Citrus extract exhibit antioxidant activity with cooked turkey meat. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 471–477.
- Cubero, N., Monferrer, A., Villalta, J. (2002). Aditivos Alimentarios. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Crawford, D. R., Suzuki, T., Sesay, J., Davies, K. J. a. (2002). Analysis of gene expression following oxidative stress. *Methods in Molecular Biology*, 196, 155–162.
- Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., Madani, K. (2013). Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 50, 77–87.
- Davis, C.B.; Markey, C.E.; Busch, M.A.; Busch, K.W. (2007) Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 5925-5933.
- Decker, E., Warner, K., Richards, M. P., Shahidi, F. (2005). Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4303–4310.
- Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodriguez, H., Vargas, M. A., Rivas, J., Guerrero, M. G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis sp* (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, 76(1), 51–59.
- Del Río, J., Fuster, M. D., Gómez, P., Porras, I., García-Lidón, Ortuño, A. (2004). *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chemistry*, 84(3), 457–461.

- Descalzo, A. M., Sancho, A. M. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 423–436.
- Devasagayam, T. P. a, Tilak, J. C., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 52,794–804.
- Devcich, D., Pedersen, I. K., Petrie, K. J. (2007). You eat what you are: modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite*, 48(3), 333–337.
- Di Donato, P., Fiorentino, G., Anzelmo, G., Tommonaro, G., Nicolaus, B., Poli, A. (2011). Re-Use of Vegetable Wastes as Cheap Substrates for Extremophile Biomass Production. *Waste and Biomass Valorization*, 2(2), 103–111.
- Dias, R., Alves, M. G., Socorro, S., Silva, B. M., Oliveira, P. F. (2014). White Tea as a Promising Antioxidant Medium Additive for Sperm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(3), 608-617.
- Dickson-Spillmann, M., Siegrist, M., Keller, C. (2011). Attitudes toward chemicals are associated with preference for natural food. *Food Quality and Preference*, 22(1), 149–156.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science Technology*, 17(9), 505–512.
- Djenane, D., Aïder, M., Yangüela, J., Idir, L., Gómez, D., Roncalés, P. (2012). Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science*, 92(4), 667–674.
- Dolatabadi, J. E. N., Kashanian, S. (2010). A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, 43(5), 1223–1230.
- Doolaage, E. H. a, Vossen, E., Raes, K., De Meulenaer, B., Verhé, R., Paelinck, H., De Smet, S. (2012). Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidant concentrations, in reduced nitrite liver pâtés. *Meat Science*, 90(4), 925–931.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227.
- Du, J., Cullen, J. J., Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1826(2), 443–457.
- El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A. (2012). Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*, 132(1), 406–412.
- Efrati, R., Natan, M., Pelah, A., Haberer, A., Banin, E., Dotan, A., Ophir, A. (2014). The combined effect of additives and processing on the thermal stability and controlled release of essential oils in antimicrobial films. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(15).

- EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives , Flavourings , Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to tertiary - Butylhydroquinone (TBHQ) Question number EFSA-Q-2003-141. *EFSA Journal*, 84, 1–50.
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA. *EFSA Journal*, 9(10), 2392.
- EFSA. (2012a). Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS): Guidance for submission for food additives evaluation. *EFSA Journal*, 10(7), 2760.
- EFSA. (2012b). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT. *EFSA Journal*, 10(3), 2588.
- EFSA. (2013a). Scientific Opinion on the safety and efficacy of vitamin C (ascorbic acid, sodium ascorbate, calcium ascorbate , ascorbyl palmitate , sodium calcium ascorbyl phosphate and sodium ascorbyl phosphate) as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal*, 11(2), 3104.
- EFSA. (2013b). Scientific Opinion on the safety evaluation of the active substances citric acid (E330) and sodium hydrogen carbonate (E500ii), used as carbon dioxide generators , together with liquid absorbers cellulose and polyacrylic acid sodium salt crosslinked,. *EFSA Journal*, 11(4), 3152.
- EFSA. (2014). Scientific Opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E 310) as a food. *EFSA Journal*, 12(4), 3642.
- Elia, P., Azoulay, A., Zeiri, Y. (2012). On the efficiency of water soluble antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 314–24.
- Emerton, V., Choi, E. (2008). Essential guide to food additives (Vol 3.). Cambridge, UK: *Leatherhead Publishing*.
- Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86(2), 283–288.
- Encalada, M. A., Hoyos, K. M., Rehecho, S., Berasategi, I., de Ciriano, M. G.-Í., Ansorena, D., Calvo, M. I. (2011). Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon cancer cell line. *Plant Foods for Human Nutrition* 66(4), 328–334.
- Ersus, S., Barrett, D. M. (2010). Determination of membrane integrity in onion tissues treated by pulsed electric fields: Use of microscopic images and ion leakage measurements. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 11(4), 598–603.
- Essa, M. M., Vijayan, R. K., Castellano-Gonzalez, G., Memon, M. A., Braidy, N., Guillemin, G. J. (2012). Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer’s disease. *Neurochemical Research*, 37(9), 1829–1842.
- European Parliament (2004). EC 1935/2004. Official Journal of the European Union.
- European Parliament (2006). EC 2006/52. Official Journal of the European Union.
- European Parliament (2009). EC 450/2009. Official Journal of the European Union.

European Parliament (2011). EC 10/2011 Official Journal of the European Union.

European Parliament (2014). EC 601/2014. Official Journal of the European Union.

FAO (2014) <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/home>. Acceso el día 5 de noviembre de 2014.

Farshid, A. A., Tamaddonfard, E., Ranjbar, S. (2013). Oral administration of vitamin C and histidine attenuate cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 45(2), 126–129.

Fava, F., Zanaroli, G., Vannini, L., Guerzoni, E., Bordoni, A., Viaggi, D., Brendle, H.-G. (2013). New advances in the integrated management of food processing by-products in Europe: sustainable exploitation of fruit and cereal processing by-products with the production of new food products (NAMASTE EU). *Biotechnology for the Bio and Green Economy*, 30(6), 647–655.

Fernández-López, J., Fernández-Ginés, J. M., Aleson-Carbonell, L., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Pérez-Alvarez, J. a. (2004). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science Technology*, 15(3–4), 176–185.

Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Alvarez, J., Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69(3), 371–380.

Ferruzzi, M. G., Green, R. J. (2006). Analysis of catechins from milk-tea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 99(3), 484–491.

Fisher, K., Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science Technology*, 19(3), 156–164.

Forman, H. J., Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine*, 22(4–5), 189–216.

Formanek, Z., Kerry, J. P., Higgins, F. M., Buckley, D. J. (2001). Addition of synthetic and natural antioxidants to a -tocopheryl acetate supplemented beef patties : effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Science* 58(6), 337–341.

Friedman, M., Kim, S.-Y., Lee, S.-J., Han, G.-P., Han, J.-S., Lee, K.-R., Kozukue, N. (2005). Distribution of catechins, theaflavins, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in the United States. *Journal of Food Science*, 70(9), C550–C559.

Fridman, G., Brooks, A. D., Balasubramanian, M., Fridman, A., Gutsol, A., Vasilets, V. N., Friedman, G. (2007). Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. *Plasma Processes and Polymers*, 4, 370–37.

Fu, L., Xu, B.-T., Xu, X.-R., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xia, E.-Q., Li, H.-B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129(2), 345–350.

Gallego, M. G., Gordon, M. H., Segovia, F. J., Skowrya, M., Almajano, M. P. (2013). Antioxidant Properties of Three Aromatic Herbs (Rosemary, Thyme and Lavender) in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 90(10), 1559–1568.

- García-Casal, M. N., Ramírez, J., Leets, I., Pereira, A. C., Quiroga, M. F. (2009). Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva sp.*, *Sargassum sp.* and *Porphyra sp.*) in human subjects. *The British Journal of Nutrition*, 101(1), 79–85.
- García-Iñiguez, García-Herreros, C., Larequi, E., Valencia, I., Ansorena, D., Astiasarán, I. (2009). Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in ω -3 PUFA. *Meat Science*, 83(2), 271–277.
- Ghidelli, C., Mateos, M., Rojas-Argudo, C., Pérez-Gago, M. B. (2015). Novel approaches to control browning of fresh-cut artichoke: Effect of a soy protein-based coating and modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 105–113.
- Gil-Chávez, J., Villa, J., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., González-Aguilar, G. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5–23.
- Gironés-Vilaplana, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreres, F., Moreno, D., García-Viguera, C. (2012). Phytochemical profile of a blend of black chokeberry and lemon juice with cholinesterase inhibitory effect and antioxidant potential. *Food Chemistry* 134(4), 2090–2096.
- Goetz, M. E., Luch, A. (2008). Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Letters*, 266(1), 73–83.
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science Technology*, 35(1), 42–51.
- Gonçalves, C. M. B., Tomé, L. C., Garcia, H., Brandão, L., Mendes, A. M., Marrucho, I. M. (2013). Effect of natural and synthetic antioxidants incorporation on the gas permeation properties of poly(lactic acid) films. *Journal of Food Engineering*, 116, 562–571.
- Gonzalez-Molina, E., Dominguez-Perles, R., Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 327–345.
- González-Molina, E., Moreno, D., García-Viguera, C. (2008). Genotype and harvest time influence the phytochemical quality of Fino lemon juice (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) for industrial use. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1669–1675.
- González-Molina, E., Moreno, D. a., García-Viguera, C. (2009). Comparison of “Verna” lemon juice quality for new ingredients and food products. *Scientia Horticulturae*, 120(3), 353–359.
- Granato, D., de Araújo Calado, V. M., Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*, 55, 137–149.
- Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561–564.
- Habib, H. M., Al Meqbali, F. T., Kamal, H., Souka, U. D., Ibrahim, W. H. (2014). Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chemistry*, 153, 28–34.

- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97, 1634–1658.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255.
- Hayes, J. E., Stepanyan, V., Allen, P., O’Grady, M. N., Kerry, J. P. (2011). Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 164–172.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of nutritional Biochemistry* 13(10), 572–584.
- Hellín, P., Laencina, J., Ros, J. M. (2003). Isolation and characterisation of resistant-to-fermentation carbohydrate polymers from cultures of *Rhizopus nigricans* grown on agrofood waste materials. *Biotechnology Letters*, 25(22), 1875–1880.
- Hilal, Y., Engelhardt, U. (2007). Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2(4), 414–421.
- Islam, M. S. (2011). Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 19(1), 25–31.
- Jaeger, H., Schulz, M., Lu, P., Knorr, D. (2012). Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 14, 46–60.
- Janositz, A., Noack, A.-K., Knorr, D. (2011). Pulsed electric fields and their impact on the diffusion characteristics of potato slices. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1939–1945.
- Jard, G., Marfaing, H., Carrère, H., Delgenes, J. P., Steyer, J. P., Dumas, C. (2013). French Brittany macroalgae screening: composition and methane potential for potential alternative sources of energy and products. *Bioresource Technology*, 144, 492–498.
- Jayamani, J., Shanmugam, G. (2014). Gallic Acid, one of the components in many plant tissues, is a potential inhibitor for insulin amyloid fibril formation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85, 352–358.
- Jeong, C.-H., Kwak, J. H., Kim, J. H., Choi, G. N., Kim, D.-O., Heo, H. J. (2011). Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using *in vitro* model system. *Food Chemistry*, 125(2), 417–422.
- Jeremiah, L. E. (2001). Packaging alternatives to deliver fresh meats using short-or long-term distribution. *Food Research International, Barking*, 34, 749-772.
- Jo, C., Son, J. H., Son, C. B., Byun, M. W. (2003). Functional properties of raw and cooked pork patties with added irradiated, freeze-dried green tea leaf extract powder during storage at 4 °C. *Meat Science*, 64(1), 13–17.

- Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F., Siebenhandl, S. (2006). The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(2), 121–133.
- Karori, S. M., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K., Ngure, R. M. (2007). Antioxidant capacity of different types of tea products. *African Journal of Biotechnology*, 6(19), 2287–2296.
- Kasapidou, E., Wood, J. D., Richardson, R. I., Sinclair, L., Wilkinson, R. G., Enser, M. (2012). Effect of vitamin E supplementation and diet on fatty acid composition and on meat colour and lipid oxidation of lamb leg steaks displayed in modified atmosphere packs. *Meat Science*, 90(4), 908–916.
- Kaynak, A., Mehmood, T., Dai, X., Magniez, K., Kouzani, A. (2013). Study of Radio Frequency Plasma Treatment of PVDF Film Using Ar, O₂ and (Ar + O₂) Gases for Improved Polypyrrole Adhesion. *Materials*, 6(8), 3482–3493
- Kenny, O., Smyth, T. J., Walsh, D., Kelleher, C. T., Hewage, C. M., Brunton, N. P. (2014). Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*, 161, 79–86.
- Kerry, J. P., O’Grady, M. N., Hogan, S. A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science* 74 (1)113-130.
- Khan, H., Flint, S., Yu, P.-L. (2010). Enterococci in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1-2), 1–10.
- Khatua, S., Paul, S., Acharya, K. (2013). Mushroom as the Potential Source of New Generation of Antioxidant : *Research Journal. Pharmacy. and Techechnolgy*, 6(5), 496–505.
- Kim, T. S., Decker, E. A., Lee, J. (2012a). Antioxidant capacities of α -tocopherol, trolox, ascorbic acid, and ascorbyl palmitate in riboflavin photosensitized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 133(1), 68–75.
- Kim, J., Jayaprakasha, G. K., Uckoo, R. M., Patil, B. S. (2012b). Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effect of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 423–430.
- Kim, S.-J., Cho, A. R., Han, J. (2013a). Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*, 29(1), 112–120.
- Kim, H.-W., Choi, Y.-S., Choi, J.-H., Kim, H.-Y., Hwang, K.-E., Song, D.-H., Kim, C.-J. (2013b). Antioxidant effects of soy sauce on color stability and lipid oxidation of raw beef patties during cold storage. *Meat Science*, 95(3), 641–646.
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., Rusak, G., Likić, S., Berendika, M. (2011). Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochemical Analysis*, 22(2), 172–180.

- Kuda, T., Kawahara, M., Nemoto, M., Takahashi, H., Kimura, B. (2014). In vitro antioxidant and anti-inflammation properties of lactic acid bacteria isolated from fish intestines and fermented fish from the Sanriku Satoumi region in Japan. *Food Research International*, 64, 248–255.
- Lafka, T.-I., Sinanoglou, V., Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104(3), 1206–1214.
- Lambropoulou, K., Drosinos, E., Nychas, G. (1996). The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 30(3), 281–291.
- Lara, M. S., Gutierrez, J. I., Timón, M., Andrés, I. (2011). Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. *Meat Science*, 88(3), 4881–4888.
- Lee, K. T. (2010). Quality and safety aspects of meat products as affected by various physical manipulations of packaging materials. *Meat Science*, 86(1), 138–150.
- Lee, B., G Hendricks, D., P Cornforth, D. (1999). A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef pattie model system. *Meat Science*, 51(3), 245–253.
- León, K., Mery, D., Pedreschi, F., León, J. (2006). Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084–1091.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288–306.
- Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D. Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*, 135(3), 1914–1919.
- Limbo, S., Torri, L., Sinelli, N., Franzetti, L., Casiraghi, E. (2010). Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science*, 84(1), 129–136.
- Lin, Y., Huang, M., Zhou, G., Zou, Y., Xu, X. (2011). Prooxidant Effects of the Combination of Green Tea Extract and Sodium Nitrite for Accelerating Lipolysis and Lipid Oxidation in Pepperoni during Storage. *Journal of Food Science*, 76(5), 694–700.
- Liu, C.-F., Tseng, K.-C., Chiang, S.-S., Lee, B.-H., Hsu, W.-H., Pan, T.-M. (2011). Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2284–2291.
- Liu, M., Xu, Y.-F., Yang, F.-Q., Luo, J., Zhai, W., Che, J.-P., Zheng, J.-H. (2013). Epigallocatechin gallate attenuates interstitial cystitis in human bladder urothelium cells by modulating purinergic receptors. *Journal of Surgical Research*, 183(1), 397–404.
- Liu, M., Zhang, M., Lin, S., Liu, J., Yang, Y., Jin, Y. (2012). Optimization of extraction parameters for protein from beer waste brewing yeast treated by pulsed electric fields (PEF). *African Journal of Microbiology Research*, 6(22), 4739–4746.

Lodi, F., Gartlon, J., Kenigswald, G. (2011). The European Food Safety Authority (EFSA) re-evaluation of EU approved food additives. *Toxicological Letters*, 205, S242–3.

Loft, S., Møller, P., Cooke, M. S., Rozalski, R., Olinski, R. (2008). Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker? *European Journal of Nutrition*, 47 Suppl 2, 19–28.

López, V., Calvo, M. I. (2011). White tea (*Camellia sinensis* Kuntze) exerts neuroprotection against hydrogen peroxide-induced toxicity in PC12 cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(1), 22–26.

López de Dicastillo, C., Castro-lópez, M. M., López-Vilariño, J. M., González-Rodríguez, M. V. (2013). Immobilization of green tea extract on polypropylene films to control the antioxidant activity in food packaging. *FRIN*, 53(1), 522–528.

López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I. (2009). Enhancement of the solid-liquid extraction of sucrose from sugar beet (*Beta vulgaris*) by pulsed electric fields. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1674–1680.

López, M., Vilariño, J. M. L., Rodríguez, M. V. G., Losada, L. F. B. (2011). Development, validation and application of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography method for routine analysis of catechins, quercetin and thymol in natural samples. *Microchemical Journal*, 99(2), 461–469.

Luengo, E., Álvarez, I., Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 17, 79–84.

Macías-Sánchez, M. D., Serrano, C. M., Rodríguez, M. R., de la Ossa, E. M., Lubián, L. M., Montero, O. (2008). Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. *Journal of Separation Science*, 31(8), 1352–1362.

Madrid, A. (2003). Refrigeración, congelación y envasado de los alimentos (p. 303). Mundi-Prensa. Madrid, España.

Mahro, B., Timm, M. (2007). Potential of Biowaste from the Food Industry as a Biomass Resource. *Engineering in Life Sciences*, 7(5), 457–468.

Makris, D. P., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 125–132.

Malacrida, C. R., Kimura, M., Jorge, N. (2012). Phytochemicals and Antioxidant Activity of Citrus Seed Oils. *Food Science and Technology Research*, 18(3), 399–404.

Maragkoudakis, P. a, Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 219–26.

- Marin, F. R., Martinez, M., Uribesalgo, T., Castillo, S., Frutos, M. J. (2002). Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems, *Food chemistry* 78, 319–324.
- Mariya John, K. M., Vijayan, D., Raj Kumar, R., Premkumar, R. (2006). Factors influencing the efficiency of extraction of polyphenols from young tea leaves. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5(1), 123–126.
- Marrazzo, G., Barbagallo, I., Galvano, F., Malaguarnera, M., Frigiola, A., Orazio, N. D., Volti, G. L. I. (2014). Role of Dietary and Endogenous Antioxidants in Diabetes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 1599–1616.
- Martí, N., Mena, P., Cánovas, J. A., Micol, V., Saura, D. (2009). Vitamin C and the role of citrus juices as functional food. *Natural Product Communications*, 4(5), 677–700.
- Martín, R., Miquel, S., Ulmer, J., Kechaou, N., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G. (2013). Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microbial Cell Factories*, 12, 71.
- Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., Alessandro, M., Nobile, D. (2011). Combined effect of active coating and MAP to prolong the shelf life of minimally processed kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward). *FRIN*, 44(5), 1224–1230.
- McCarthy, T. L. M., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., Buckley, D. J. (2001a). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science* 57 (2), 177–174.
- McCarthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., Buckley, D. J. (2001b). Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*, 58(1), 45–52.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(6), 577–606.
- McMillin, K. W. (2008). Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, 80(1), 43–65.
- Miller, J. F., Dowert, W. J., Tompkins, L. S. (1988). High-voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proceeding of National Academy of Sciences of United States of America*, 85(3), 856–860
- Minami, M., Kita, M., Nakaya, T., Yamamoto, T., Kuriyama, H., Imanishi, J. (2003). The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiology and Immunology*, 47(9), 681–468.
- Miron, T., Plaza, M., Bahrim, G., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010). Chemical and composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Chromatography*, 1218(30), 4918–4927.
- Misharina, T. A., Terenina, M. B., Krikunova, N. I., Kalinichenko, M. A. (2011). The influence of the composition of essential lemon oils on their antioxidant properties and the stability of the components. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 37(7), 883–887.

- Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., Cullen, P. J. (2011). Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens. *Food Engineering Reviews*, 3(3-4), 159–170.
- Mitsumoto, M., O'Grady, M. N., Kerry, J. P., Joe Buckley, D. (2005). Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. *Meat Science*, 69(4), 773–779.
- Miyake, Y., Hiramitsu, M. (2011). Isolation and extraction of antimicrobial substances against oral bacteria from lemon peel. *Journal of Food Science and Technology*, 48(5), 635–639.
- Moderno, P. M., Carvalho, M., Silva, B. M. (2009). Recent patents on *Camellia sinensis*: source of health promoting compounds. *Recent Patents on Food, Nutrition Agriculture*, 1(3), 182–192.
- Monfort, S., Saldaña, G., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I. (2012). Inactivation of *Salmonella spp.* in liquid whole egg using pulsed electric fields, heat, and additives. *Food Microbiology*, 30(2), 393–399.
- Montgomery, J. L., Parrish, F. C., Olson, D. G., Dickson, J. S., Niebuhr, S. (2003). Storage and packaging effects on sensory and color characteristics of ground beef. *Meat Science*, 64(4), 357–363.
- Moreau, M., Orange, N., Feuilleley, M. G. J. (2008). Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances*, 26, 610–617.
- Morelli, R., Russo-Volpe, S., Bruno, N., Lo Scalzo, R. (2003). Fenton-Dependent Damage to Carbohydrates: Free Radical Scavenging Activity of Some Simple Sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7418–7425.
- Moure, Â., Cruz, J. M., Franco, D., Domôânguez, J. M., Sineiro, J., Domôânguez, H. Parajo, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72 (2), 145-171.
- Müller, N., Ellinger, S., Alteheld, B., Ulrich-Merzenich, G., Berthold, H. K., Vetter, H., Stehle, P. (2010). Bolus ingestion of white and green tea increases the concentration of several flavan-3-ols in plasma, but does not affect markers of oxidative stress in healthy non-smokers. *Molecular Nutrition Food Research*, 54(11), 1636–45.
- Muranyi, P., Wunderlich, J., Langowski, H.-C. (2010). Modification of bacterial structures by a low-temperature gas plasma and influence on packaging material. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 1875–1885.
- Nattress, F. M., Yost, C. K., Baker, L. P. (2001). Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1-2), 111–119.
- Nerín, C., Tovar, L., Salafranca, J. (2008). Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 313–320.
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), 469–484.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology Medicine*, 49(4), 503–515.

- Nobre, B., Marcelo, F., Passos, R., Beirão, L., Palavra, A., Gouveia, L., Mendes, R. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *European Food Research and Technology*, 223(6), 787–790.
- O’Grady, M. N., Maher, M., Troy, D. J., Moloney, P., Kerry, J. P. (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, 73(1), 132–143.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2008). Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*, 228(2), 239–248.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2009). Influence of storage temperature on the kinetics of the changes in anthocyanins, vitamin C, and antioxidant capacity in fresh-cut strawberries stored under high-oxygen atmospheres. *Journal of Food Science*, 74(2), C184–191.
- Oh, J., Jo, H., Cho, A. R., Kim, S., Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31(2), 403–409.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Nakanishi, K. (2000). Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 81–90.
- Ojeda, G., Sgroppo, S. C., Zaritzky, N. E. (2014). Application of edible coatings in minimally processed sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) to prevent enzymatic browning. *International Journal of Food Science Technology*, 49(3), 876–883.
- Ortuño, A.; Báidez, A.; Gómez, P., Arcas, M. C., Porras, I., García-Lidón, Río, J. Del. (2006). *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 98(2), 351–358.
- Ortuño, A., Gomez, P., Baidez, A., Benavente, O., Castillo, J., Foell, R., Del Rio, J. A. (2004). *Citrus* sp.: A source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 228, U71–U71.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626.
- Ozcan, A., Korkmaz, A., Oter, S., Coskun, O. (2005). Contribution of flavonoid antioxidants to the preventive effect of mesna in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Archives of Toxicology*, 79(8), 461–465.
- Pacifico, S., Gallicchio, M., Fiorentino, A., Fischer, A., Meyer, U., Stintzing, F. C. (2012). Antioxidant properties and cytotoxic effects on human cancer cell lines of aqueous fermented and lipophilic quince (*Cydonia oblonga* Mill.) preparations. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(11), 4130–4135.
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., McHugh, T. H. (2012a). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 365–372.

- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Donnell, C. P. O., Bourke, P., Keener, K. M., Cullen, P. J. (2014a). Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science Technology*, 35(1), 5–17.
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., O'Neill, L., Jiménez, Bourke, P., Cullen, P. J. (2014b). Characterization of polylactic acid films for food packaging as affected by dielectric barrier discharge atmospheric plasma. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21, 107–113.
- Papazoglou, S., Tsiraki, M., Savvaidis, I. N. (2012). Effect of Thyme Oil on the Preservation of Vacuum-Packaged Chicken Liver. *Journal of Food Science*, 77(8), M473–M480.
- Parniakov, O., Lebovka, N. I., Van Hecke, E., Vorobiev, E. (2013). Pulsed Electric Field Assisted Pressure Extraction and Solvent Extraction from Mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Bioprocess Technology*, 1–10.
- Peiró, S., Gordon, M., Blanco, M., Pérez-Llamas, F., Segovia, F., Almajano, M.P. (2014). Modelling Extraction of White Tea Polyphenols: The Influence of Temperature and Ethanol Concentration. *Antioxidants*, 3(4), 684–699.
- Pejin, B., Bogdanovic-Pristov, J., Pejin, I., M, S. (2013). Potential antioxidant activity of the moss *Bryum moravicum*. *Natural Product Research*, 27(10), 900–902.
- Perumalla, A. V. S., Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44(4), 827–839.
- Peschel, W., Sánchez-Rabeneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137–150.
- Pieniz, S., Andreazz, R., Anghinoni, T., Camargo, F., Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 3, 251–256.
- Pina-Pérez, M. C., Martínez-López, A., Rodrigo, D. (2013). Cocoa powder as a natural ingredient revealing an enhancing effect to inactivate *Cronobacter sakazakii* cells treated by Pulsed Electric Fields in infant milk formula. *Food Control*, 32(1), 87–92.
- Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(6), 638–647.
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010a). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, 43(10), 2341–2348.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F. J., Ibáñez, E. (2010b). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 450–455.
- Poljšak, B., Fink, R. (2014). The Protective Role of Antioxidants in the Defence against ROS/RNS-Mediated Environmental Pollution. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2014, 22.

- Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Taran, F., Rosa, P., Dufossé, L., Guérard, F., Pondaven, P. (2008). Antioxidant and free radical scavenging properties of marennine, a blue-green polyphenolic pigment from the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen responsible for the natural greening of cultured oysters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6278–6286.
- Price, A., Díaz, P., Bañón, S., Garrido, M. D. (2013). Natural extracts versus sodium ascorbate to extend the shelf life of meat-based ready-to-eat meals. *Food Science and Technology International*, 19(5), 427–438.
- Prior. (1999). Forum : Oxidative Stress Status in vivo total antioxidant capacity : comparison of different, *Free Radical Biology Medicine*, 27(99), 1173–1181.
- Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Puértolas, E., Cregenzán, O., Luengo, E., Álvarez, I., Raso, J. (2013). Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1330–1336.
- Puértolas, E., Saldaña, G., Álvarez, I., Raso, J. (2010a). Effect of Pulsed Electric Field Processing of Red Grapes on Wine Chromatic and Phenolic Characteristics during Aging in Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2351–2357.
- Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., Raso, J. (2010b). Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, 119(3), 1063–1070.
- Qi, S., Huang, H., Huang, J., Wang, Q., Wei, Q. (2015). Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) seed water extract as potential antioxidant and anti-obese natural additive in meat products. *Food Control*, 50, 195–201.
- Qin, Y.-Y., Yang, J.-Y., Lu, H.-B., Wang, S.-S., Yang, J., Yang, X.-C., Cao, J.-X. (2013). Effect of chitosan film incorporated with tea polyphenol on quality and shelf life of pork meat patties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 312–316.
- Ranalli, A., Lucera, L., Contento, S. (2003). Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26)7636–7641.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C. O., Lewis, G., Krissansen, G. W., Buchanan, P. K. (2014). Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 3(2), 41–51.
- Ries, D., Ye, A., Haisman, D., Singh, H. (2010). Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 20(2), 72–78.

- Rodriguez-Turienzo, L., Cobos, A., Moreno, V., Caride, A., Vieites, J. M., Diaz, O. (2011). Whey protein-based coatings on frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*): Influence of the plasticiser and the moment of coating on quality preservation. *Food Chemistry*, 128(1), 187–194.
- Row, K. H., Jin, Y. (2006). Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. *Bioresource Technology*, 97(5), 790–793.
- Rusaczonok, A., Swiderski, F., Waszkiewicz-Robak, B. (2010). Antioxidant Properties of Tea and Herbal Infusions - a Short Report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(1), 33–35.
- Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzic, D., Kovac, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4), 852–858.
- Şahin, S., Şamlı, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595–602.
- Sakulnarmrat, K., Fenech, M., Thomas, P., Konczak, I. (2013). Cytoprotective and pro-apoptotic activities of native Australian herbs polyphenolic-rich extracts. *Food Chemistry*, 136(1), 9–17.
- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., Rice-Evans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(2), 339–346.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J. A., Roncalés, P. (2001). The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 58(4), 421–429.
- Santas, J., Almajano, M.P., Carbo, R. (2010a). Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(2), 403–409.
- Santas, J., Almajano, M. P., Carbo, R. (2010b). Onion A natural alternative to artificial food preservatives. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 21(5), 44–46.
- Sarmadi, B. H., Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949–56.
- Schilling, S., Alber, T., Toepfl, S., Neidhart, S., Knorr, D., Schieber, A., Carle, R. (2007). Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 127–134.
- Segovia, F., Lupo, B., Peiró, S., Gordon, M., Almajano, M. (2014a). Extraction of Antioxidants from Borage (*Borago officinalis* L.) Leaves—Optimization by Response Surface Method and Application in Oil-in-Water Emulsions. *Antioxidants*, 3(2), 339–357.
- Segovia, F., Peiro, S., Gallego, M. G., Azman, N., Almajano, M. P. (2014b). Avocado Seeds: Extraction Optimization and Possible Use as Antioxidant in Food. *Antioxidants*, 3(2), 439–454.

- Serrano-Cruz, M. R., Villanueva-Carvajal, A., Morales Rosales, E. J., Ramírez Dávila, J. F., Dominguez-López, A. (2013). Controlled release and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein, and pectin. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 554–561.
- Shanab, S. M. M., Mostafa, S. S. M., Shalaby, E. A., Mahmoud, G. I. (2012). Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(8), 608–615.
- Sharangi, A. B. (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) - A review. *Food Research International*, 42(5-6), 529–535.
- Shim, S.-M., Seo, S. H., Lee, Y., Moon, G.-I., Kim, M.-S., Park, J.-H. (2011). Consumers' knowledge and safety perceptions of food additives: Evaluation on the effectiveness of transmitting information on preservatives. *Food Control*, 22(7), 1054–1060.
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10–23.
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P. J. A., Gómez-Guillén, M. C., Bifani, V. (2013). Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Engineering Reviews*, 5(4), 200–216.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Siripatrawan, U., Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770–775.
- Singh, B. N., Singh, B. R., Singh, R. L., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., Singh, H. B. (2009). Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1109–1116.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite*, 51(3), 456–467.
- Skowrya, M., Falguera, V., Azman, N., Segovia, F., Almajano, M.P. (2014a). The Effect of *Perilla frutescens* Extract on the Oxidative Stability of Model Food Emulsions. *Antioxidants*, 3(1), 38–54.
- Skowrya, M., Falguera, V., Gallego, G., Peiró, S., Almajano, M. P. (2014b). Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods in vitro and in model food emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 911–918.
- Slameňová, D., Horváthová, E., Wsólóvá, L., Šramková, M., Navarová, J. (2009). Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 677(1-2), 46–52.

- Smiddy, M., Fitzgerald, M., Kerry, J. P., Papkovsky, D. B. (2002). Use of oxygen sensors to non-destructively measure the oxygen content in modified atmosphere and vacuum packed beef: impact of oxygen content on lipid oxidation. *Meat Science* 61, 285–290.
- Soria, A. C., Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 323–331.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208.
- Spyropoulos, B. G., Misiakos, E. P., Fotiadis, C., Stoidis, C. N. (2011). Antioxidant Properties of Probiotics and Their Protective Effects in the Pathogenesis of Radiation-Induced Enteritis and Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(2), 285–294.
- Stadtman, E. R., Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4), 207–218.
- Steele, M. L., Truong, J., Govindaraghavan, S., Ooi, L., Sucher, N. J., Münch, G. (2013). Cytoprotective properties of traditional Chinese medicinal herbal extracts in hydrogen peroxide challenged human U373 astroglia cells. *Neurochemistry International*, 62(5), 522–529.
- Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Yu, D. (2011a). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 243–249.
- Sun, Y., Xu, W., Zhang, W., Hu, Q., Zeng, X. (2011b). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 78(3), 311–320.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226–1233.
- Taherian, A. R., Britten, M., Sabik, H., Fustier, P. (2011). Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 868–878.
- Takaki, K., Hatayama, H., Koide, S., Kawamura, Y. (2011). Improvement of polyphenol extraction from grape skin by pulse electric field. In *Digest of Technical Papers-IEEE International Pulsed Power Conference* (pp. 1262–1265).
- Tan, G.-Y., Chen, C.-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I., Wang, J.-Y. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6(3), 706–754.
- Tang, S., Kerry, J. P., Sheehan, D., Buckley, D. J. (2001). A comparative study of tea catechins and α -tocopherol as antioxidants in cooked beef and chicken meat. *European Food Research and Technology*, 213(4-5), 286–289.
- Tang, S. Z., Kerry, J. P., Sheehan, D., Buckley, D. J. (2002). Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. *Food Chemistry*, 76(1), 45–51.

- Tang, S. Z., Kerry, J. P., Sheehan, D., Buckley, D. J., Morrissey, P. A. (2000). Dietary tea catechins and iron-induced lipid oxidation in chicken meat, liver and heart. *Meat Science*, 56(3), 285–290.
- Tang, S. Z., Ou, S. Y., Huang, X. S., Li, W., Kerry, J. P., Buckley, D. J. (2006). Effects of added tea catechins on colour stability and lipid oxidation in minced beef patties held under aerobic and modified atmospheric packaging conditions. *Journal of Food Engineering*, 77(2), 248–253.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587–595.
- Terabe, S. (2009). Capillary separation: Micellar electrokinetic chromatography. *Annual Review of Analytical Chemistry* (2) 99-120.
- Theivendran, S., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogens* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. *Journal of Food Science*, 71(2).
- Thring, T. S. A., Hili, P., Naughton, D. P. (2011). Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. *Journal of Inflammation*, 8(27).
- Tian, B., Hua, Y. (2005). Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. *Food Chemistry*, 91(3), 413–418.
- Tian, F., Decker, E. A., Goddard, J. M. (2012). Control of lipid oxidation by nonmigratory active packaging films prepared by photoinitiated graft polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31) 7710-7718.
- Terabe, S. (2009). Capillary separation: Micellar electrokinetic chromatography. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2, 99-120.
- Traber, M. G., Stevens, J. F. (2011). Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology Medicine*, 51(5), 1000–1013.
- Trettel, F., Rigamonti, D., Hilditch-Maguire, P., Wheeler, V. C., Sharp, a H., Persichetti, F., MacDonald, M. E. (2000). Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STH^{dh}(Q111) striatal cells. *Human Molecular Genetics*, 9(19), 2799–2809.
- Tripoli, E., Guardia, M. La, Giammanco, S., Majo, D. Di, Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466–479.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.
- Unachukwu, U. J., Ahmed, S., Kavalier, A., Lyles, J. T., Kennelly, E. J. (2010). White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. *Journal of Food Science*, 75(6), C541–8.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Vallverdú-Queralt, A., Arranz, S., Casals-Ribes, I., Lamuela-Reventós, R. M. (2012). Stability of the phenolic and carotenoid profile of gazpachos during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1987–1988.
- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Acedo-Félix, E., Carvajal-Millán, E., González-Córdova, A. F., Vallejo-Galland, B., Sánchez-Escalante, A. (2014). Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. *Journal of Food Science*, 79(8), C1499–504.
- Venditti, E., Bacchetti, T., Tiano, L., Carloni, P., Greci, L., Damiani, E. (2010). Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity?. *Food Chemistry*, 119(4), 1597–1604.
- Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1066–1074.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. (2008a). Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Journal of Food Safety*, 28(4), 567–576.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. (2008b). Antifungal activity of lemon (*Citrus limon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19(12), 1130–1138.
- Wang, Y.-C., Chuang, Y.-C., Hsu, H.-W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106(1), 277–284.
- Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S., Dykes, G. A. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 21(10), 1408–1414.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*, 86(1), 196–213.
- Wettasinghe, M., Shahidi, F. (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70(1), 17–26.
- Wijngaard, H. H., Brunton, N. (2010). The optimisation of solid-liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 96(1), 134–140.
- Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 46(2), 505–513.

- Wiseman, H., Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313(1), 17–29.
- Woldegiorgis, A. Z., Abate, D., Haki, G. D., Ziegler, G. R. (2014). Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. *Food Chemistry*, 157, 30–36.
- Wu, S. (2014). Effect of chitosan-based edible coating on preservation of white shrimp during partially frozen storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 325–328.
- Yang, J., Lee, D., Afaisen, S., Gadi, R. (2013). Inactivation by lemon juice of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* in beef marinating for the ethnic food kelaguen. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 353–9.
- Yang, Y., McClements, D. J. (2013). Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. *Food Chemistry*, 141(1), 473–481.
- Yen, W.-J., Chyau, C.-C., Lee, C.-P., Chu, H.-L., Chang, L.-W., Duh, P.-D. (2013). Cytoprotective effect of white tea against H₂O₂-induced oxidative stress in vitro. *Food Chemistry*, 141(4), 4107–14.
- Yen, H.-W., Chiang, W.-C., Sun, C.-H. (2012). Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(1), 53–57.
- Zderic, A., Zondervan, E., Meuldijk, J. (2013). Breakage of cellular tissue by pulsed electric field: Extraction of polyphenols from fresh tea leaves. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1795–1800.
- Zhang, Y., Seeram, N. P., Lee, R., Feng, L., Heber, D. (2008). Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 670–675.
- Zhang, Y., Sun, J., Hu, X., Liao, X. (2010). Spectral alteration and degradation of cyanidin-3-glucoside exposed to pulsed electric field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3524–3531
- Zheng, G., Fu, Y., He, C. (2014). Nucleic acid oxidation in DNA damage repair and epigenetics. *Chemical Reviews*, 114(8), 4602–4620.
- Zhou, G. H., Xu, X. L., Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat - a review. *Meat Science*, 86(1), 119–128.
- Zimmermann, B. F., Gleichenhagen, M. (2011). The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea: How to get most out of it. *Food Chemistry*, 124(4), 1543–1548.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., Frasquet, I., Frígola, A. (2007). Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chemistry*, 103(4), 1365–1374.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316.

CAPÍTULO 8: PUBLICACIONES

Trabajos enviados derivados de esta Tesis Doctoral:

- **Sara Peiró**, Elisa Luengo, Francisco Segovia, Javier Raso, María Pilar Almajano. *Improvement of pressing-assisted extraction of polyphenols from lemon waste by pulsed electric fields.*
- **Sara Peiró**, Silva Ginés, María Pilar Almajano. *Valorization of phenolic extracts from lemon waste, antioxidant, antimicrobial and stress protective effects to oxidative damage.*
- **Sara Peiró**, Xavier F. Hospital, Margarita Dávila, Mónica Ganan, María Pilar Almajano. *Antioxidant properties of white tea in burger meat.*
- **Sara Peiró**, Francisco Segovia, Edurne Gastón, María Pilar Almajano. *Effect of PE active film in burrger beef meat.*
- **Sara Peiró**, Maria Skogsberg, Francisco Segovia, Minna Hakkarainen, María Pilar Almajano. *White tea as a natural antioxidant in active biobased food packaging.*

Article

Modelling Extraction of White Tea Polyphenols: The Influence of Temperature and Ethanol Concentration

Sara Peiró ^{1,2,3}, Michael H. Gordon ⁴, Mónica Blanco ⁵, Francisca Pérez-Llamas ⁶,
Francisco Segovia ³ and María Pilar Almajano ^{3,*}

¹ Department of Health Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, Barcelona University, Avenue Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain; E-Mail: sara.peiro@yahoo.es

² IRIS-Innovació i Recerca Industrial i Sostenible, Avda. Carl Friedrich Gauss n°11, 08860 Barcelona, Spain

³ Chemical Engineering Department, Technical University of Catalonia, Avda Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain; E-Mail: segoviafj@gmail.com

⁴ Department of Food and Nutritional Science, University of Reading, Whiteknights, P.O. Box 226, Reading RG6 6AP, UK; E-Mail: m.h.gordon@reading.ac.uk

⁵ Department of Applied Mathematics III, Technical University of Catalonia, ESAB, Campus del Baix Llobregat, Esteve Terradas 8, 08860 Barcelona, Spain; E-Mail: monica.blanco@upc.edu

⁶ Department of Physiology and Pharmacology, School of Biology, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain; E-Mail: frapella@um.es

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: m.pilar.almajano@upc.edu; Tel.: +34-934-016-686.

External Editors: Maria G. Miguel and João Rocha

Received: 2 July 2014; in revised form: 29 July 2014 / Accepted: 30 September 2014 /

Published: 21 October 2014

Abstract: The optimization of the extraction of natural antioxidants from white tea has fostered intensive research. This study has investigated the effects of ethanol-water mixtures, temperature and time on the extraction of polyphenols and antioxidant components from white tea. The response surface methodology was applied to identify the best extraction conditions. The best conditions to maximize the extraction of total polyphenols were: ethanol, 50%, for 47.5 min. Although the yield of polyphenols was optimal at 65 °C, the maximum antioxidant capacity was achieved with an extraction temperature of 90 °C. This study has identified the optimal conditions for the extraction of tea liquor with the best antioxidant properties. Epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, epigallocatechin and

epicatechin were extracted from white tea at concentrations up to 29.6 ± 10.6 , 5.40 ± 2.09 , 5.04 ± 0.20 and 2.48 ± 1.10 mg/100 g.

Keywords: white tea; polyphenols; extraction; antioxidant; RSM; MECK

1. Introduction

Natural antioxidants are increasingly appreciated by consumers due to both their inherent positive effects [1] and to the possibility of using them as a source of natural additives to replace synthetic ones [2–4]. Tea is a natural plant that is a rich source of natural antioxidants and provides a high free radical scavenger activity [5,6].

Tea, the infusion from *Camellia sinensis* (L), is one of the world's most widely consumed beverages [7,8]. Its medicinal properties have been widely explored [9]. In addition, its health promoting properties have been known from the early periods of the Chinese civilization, going back almost 5000 years [10].

Teas vary in properties depending on geographical origin, climatic conditions and processing methods [7], but in general, they can be classified into three types: unfermented (green and white teas), partially fermented (oolong tea) and completely fermented (black tea) [9,11]. White tea is the least processed tea. It is exclusively prepared from very young tea leaves and buds, which are harvested before being fully open and are processed by air drying [10]. This less extended processing confers to white tea its special and highly appreciated odour and flavour characteristics [12,13].

Some *in vitro* studies have reported and characterised the antioxidant activity of white tea [11,14,15]. Other studies have focused on its protective effects on live cells subject to induced oxidative stress [16–20]. Some of them have concluded that white tea extract is a neuroprotector, because it reduces the effect of hydrogen peroxide on cells [6]. This could be relevant to enhance the protection against neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's or Parkinson's. Recent studies [21] suggest that the protective action of white tea in oxidative stress *in vitro* is related to the maintenance of the normal redox status of cells when they are susceptible to damage by free radicals.

The antioxidant capacity of white tea extracts, which can be measured *in vitro* by various assays, including oxygen radical absorbance capacity (ORAC), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP) or diphenylpicrylhydrazyl assay (DPPH), among others [22–24]. This activity is linked to the high content of flavan-3-ols, which are also known as catechins. The major catechins present in tea are: epigallocatechin (EGC), catechin (C), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC) and epicatechin gallate (ECG) [8,13,25].

These catechins have a high health benefits and industrial interest. They can be used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries as a source of additives or as a source of antioxidants for functional foods [4,9]. As a result of these benefits, more effective extracts are a research focus of interest.

The main goal of this contribution is to determine the optimal extraction conditions of the main antioxidant compounds from white tea. In this study, the response surface methodology (RSM) was used

for the optimization of extraction variables (time, temperature and % of ethanol) to enhance the yield of polyphenols and antioxidant activity [15,26,27].

2. Experimental Section

2.1. Chemicals, Reagents and Equipment

Methanol, ethanol, acetone, sodium carbonate, Folin-Ciocalteu reagent, sodium tetraborate, sodium phosphate dibasic and sodium hydroxide were of analytical grade from Panreac (Barcelona, Spain). Gallic acid (GA), rutin, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,4,6-tris (1-pyridyl)-5-triazine (TPTZ), phosphate buffered saline, ferric chloride, potassium persulfate, Tween 20, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), sodium dodecyl sulphate (SDS), (+)-catechin (C), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and caffeine were purchased from Sigma-Aldrich Company Ltd. (Gillingham, UK). Ultrapure water obtained from a Milli-Q system from Millipore (Milford, MA, USA) was used throughout. Spectrophotometric measurements were taken on a Perkin Elmer FTIR spectrometer (Perkin Elmer, Paris, France). Fluorometric measurements were taken with a Florestar omega fluorimeter. Micellar electrokinetic chromatography (MECK) was carried out using the Packard 3DCE capillary electrophoresis system equipped with a diode-array detector from Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

2.2. Tea Samples and Preparation

White tea was purchased from Manantial de Salud (Herbocat SL, Barcelona, Spain) and was stored at room temperature (22 ± 2 °C) in a desiccator. The samples were extracted by infusion.

Infusions were filtered through Whatman paper filters n.2 (GE Healthcare, Amersham Place, UK). All white tea extracts were protected from light and stored at -20 °C until needed.

2.3. Determination of Total Phenolic Content

The total phenol (TP) content of each extract was determined in duplicate by the Folin-Ciocalteu method according to Almajano *et al.* [16]. The mixture was allowed to stand in the dark at room temperature for 1 h and was finally diluted to an appropriate final volume with distilled water. Absorbance was measured at 765 nm against a blank containing distilled water instead of extract. Values were determined from a calibration curve prepared with gallic acid standard (GAE) (2–14 mg·L⁻¹ final concentration) and rutin (1.25–15 mg·L⁻¹ final concentration). Results are expressed as mg of gallic acid equivalents g⁻¹ of dry weight (mg GAE/g DW) or mg of rutin equivalents/g of dry weight (mg rutin equivalents/g DW), respectively.

2.4. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MECK)

MECK is a separation mode of capillary electrophoresis (CE), which can be applied in the separation of neutral and charged compounds. The principle of separation is based on the differential migration of the ionic micelles and the bulk running buffer under electrophoresis conditions and on the interaction

between the analyte and the micelle. The micelle is prepared by adding a surfactant, generally sodium dodecyl sulphate (SDS), into the running buffer. MECK is suitable for separation and quantification of natural antioxidants, because it is rapid, gives an efficient separation, uses minimum amounts of sample and reagents and is low cost [17,25,27–29].

MECK was carried out with the diode-array detector set at 200 and 260 nm to detect catechins and gallic acid simultaneously. A fused-silica capillary, with extended light path, 50 µm i.d., 34 cm total length and 25.5 cm effective length, was used for the separation. The separation voltage was kept at 30 kV with an intensity of 35 µA. The temperature of the capillary was set to 21 °C and controlled with the help of a thermostat. The capillary was conditioned with NaOH (0.1 M, 10 min) followed by washing with an abundant flow of Milli-Q water and then of the buffer solution (155 min). Buffer (pH 7) was prepared daily with 5 mM sodium tetraborate, 60 mM sodium phosphate dibasic and 50 mM SDS.

All standard solutions (C, EC, GC, EG, EGCG) and sample extracts were injected in triplicate. A calibration curve prepared with standards was used to quantify the components (mg/L).

2.5. Determination of Antioxidant Activity

2.5.1. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

The method used was based on Re *et al.* [30]. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS, 7 mM) and potassium persulfate (2.45 mM, final concentration) were dissolved separately in water, and then, the mixture was made up to volume in a 10 mL volumetric flask. The mixed solution was transferred to an amber bottle, covered with aluminium foil and allowed to stand at room temperature (RT) for 12–16 h in the dark. The ABTS^{•+} solution was diluted with phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4, 1:100) and equilibrated at 30 °C, to an absorbance of 0.7 ± 0.02 at 734 nm, read in a Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer (WaldBronn, Germany). An appropriate dilution of the extract was added to ABTS^{•+} solution in the proportion of 1:100. PBS (pH 7.4) was used as the blank. After mixing, the absorbance at 734 nm was measured immediately and, then, every minute for 5 min. Duplicate determinations were made for triplicate extractions. The percentage inhibition was calculated from the absorbance values at 5 min.

The relative change in sample absorbance was calculated according to the following equation:

$$\Delta A_{\text{sample}} = \frac{A_{t=0(\text{sample})} - A_{t=5(\text{sample})}}{A_{t=0(\text{sample})}} - \frac{A_{t=0(\text{solvent})} - A_{t=5(\text{solvent})}}{A_{t=0(\text{solvent})}} \quad (1)$$

The TEAC value was determined from a Trolox calibration curve (ranging from 1 to 10 µM final concentration). Results are expressed as µmol of Trolox/g of DW.

2.5.2. Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC)

The ORAC method [28,31] is widely used in food science and biology. A stock solution of fluorescein (FL) was prepared by dissolving 2 mg of FL in 100 mL of phosphate buffer (PBS) 75 mM and pH 7. The stock solution was stored under refrigeration in the dark. The working FL solution (78 nM) was prepared daily by adequate stock dilution in PBS. The 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide)

dihydrochloride (AAPH) radical solution (221 mM) was prepared daily by dilution in PBS. The standard used was Trolox solution.

The ORAC values were calculated using a regression equation between the Trolox concentration and the net area of the fluorescence decay curve (area under curve, AUC). ORAC was expressed as μM Trolox equivalents ($\mu\text{M TE}$) and was calculated by applying the formula in Equation 2:

$$AUC = \left(0.5 + \left(\sum_{i=1}^{i=31} \frac{f_i}{f_1} \right) \right) \cdot CT \quad (2)$$

where: i , the number of cycles; f , fluorescence units; CT , time of each cycle in minutes; in this case, CT is 2 min.

2.6. Statistical Analysis

The results obtained were analysed statistically using Minitab 5.1 for Windows (Minitab Inc., State Collage, PA, USA) and expressed as the means \pm standard deviations. Any significant difference between solvents and samples was determined by one-way analysis of variance (ANOVA, considering significant differences at $p < 0.05$).

2.7. Response Surface Methodology (RSM)

The data were modelled and analysed by RSM, which is a collection of mathematical and statistical techniques suitable for problems in which a response of interest is influenced by several variables. It uses quantitative data from appropriate experimental designs to model and optimize the combination of factors that yield a desired response near the optimum [26].

In order to determine the optimum conditions for the extraction of tea polyphenols and to evaluated their activity with TEAC and ORAC, assays were performed using low and high levels for the independent variables, EtOH (%), time (min) and temperature ($^{\circ}\text{C}$), in accordance with a factorial experimental design. The results of the preliminary trials of a two-level, three-variable full factorial design were taken into account, which involved three replicated runs. A two-level, three-factor and central composite design was chosen for this experimental design using the Minitab package for Windows software (Minitab, State Collage, PA, USA). Coded levels for independent variables are presented in Table 1.

Table 1. Variables and ranges used on the experimental design for the study of temperature (T), time (t) and % ethanol.

Variables	Range and Level		
	1	0	1
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	40	65	90
Time (min)	5	47.5	90
% EtOH	0	50	100

Coefficients of the full model were evaluated by regression analysis and tested for their significance. The non-significant coefficients ($p > 0.05$) were eliminated on the basis of p -values after examining the coefficients, and the models were finally refined. For the first-order model, we considered a 2^3 factorial design augmented by three centre points. For the second-order model, we augmented the design with six points (star design). From the values (displayed in Table 1) and assuming a second order polynomial model, at least 17 experiments must be carried out to solve the matrix and the error evaluation. The resulting factorial central composite design for the two-level and three-factor scheme with 17 treatments in total is described in Table 2. The response surface values are the concentrations of resulting tea polyphenols, which are shown in the results section.

3. Results and Discussion

3.1. Selection of Extraction Solvents

It is reported by other researchers [26,32,33] that ethanol and methanol were effective solvents for extracting phenolic compounds. For this study, only ethanol was used, since it is food-grade and also cheaper than methanol.

3.2. Experimental Design

The experimental design was carried out to evaluate the effects of temperature, solvent concentration and time on antioxidant extraction. The variables and ranges used are shown in Table 1. The p -value for each term analysed in each parameter is shown in Table 2. The initial model and the final reduced model are shown in Table 3. The final reduced model, with all statistically significant terms, has a higher predicted R^2 , which means that it is more reliable in estimating a response.

TP, ORAC, TEAC and caffeine show high number interactions with statistical significant terms ($p < 0.05$), and a good adjustment was obtained.

3.3. Total Polyphenol Content

The extraction efficiency of different concentrations of aqueous ethanol, temperature and time for the extraction of total polyphenols from white tea leaves was investigated using a central composite design. The total phenolic content in the white tea extracts ranged from 20.93 to 178.70 mg as GAE/g tea; see Table 2. It was observed that the best yield occurred with 47.5 min of extraction at 65 °C, using 48% ethanol.

All of the linear coefficients and two quadratic coefficients ($EtOH^2$ and t^2) were significant. The final response model (using uncoded units) to predict the yield of tea polyphenols is shown in Equation 3:

$$TP = 24.1036 + 2.3871 EtOH + 1.7821 t + 0.6350 T - 0.0270 EtOH^2 - 0.0156 t^2 \quad (3)$$

where TP is the response variable and $EtOH$, t and T are the values of the independent variables, namely the concentration of ethanol, extraction time and temperature, respectively.

Table 2. Experimental design obtained and the experimental values obtained from the determination of total polyphenols, antioxidant capacity of the extracts assessed by TEAC and ORAC and polyphenol content.

	Assay n°	% EtOH	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	Experimental Values							
					TP	TEAC	ORAC	Caffeine	EGC	EGCG	ECG	EC
2 ³ factorial design	1	0	5	40	62.4 ± 3.1	596 ± 27	710 ± 83	11.31 ± 6.34	1.19 ± 0.53	3.22 ± 1.97	0.46 ± 0.26	0.55 ± 0.37
	2	96	5	40	20.9 ± 2.2	209 ± 23	437 ± 102	2.05 ± 0.43	1.86 ± 0.05	4.97 ± 0.44	1.08 ± 0.08	0.00 ± 0.00
	3	0	90	40	95.7 ± 4.1	945 ± 27	1396 ± 146	21.08 ± 0.90	4.00 ± 1.24	9.97 ± 3.58	0.97 ± 0.40	1.86 ± 0.53
	4	96	90	40	36.5 ± 8.6	348 ± 92	718 ± 156	3.68 ± 1.42	3.42 ± 1.83	10.50 ± 5.76	2.58 ± 1.36	0.33 ± 0.31
	5	0	5	90	96.1 ± 3.5	1067 ± 60	1053 ± 213	28.16 ± 2.13	0.64 ± 0.68	1.92 ± 1.04	0.30 ± 0.06	0.14 ± 0.05
	6	96	5	90	31.9 ± 2.9	341 ± 32	548 ± 177	3.52 ± 0.28	1.38 ± 0.21	1.21 ± 0.78	0.28 ± 0.17	0.22 ± 0.06
	7	0	90	90	112.6 ± 6.6	1165 ± 132	1355 ± 134	27.84 ± 1.88	1.16 ± 0.61	3.55 ± 2.44	0.64 ± 0.55	0.45 ± 0.45
	8	96	90	90	104.8 ± 2.1	1083 ± 50	1405 ± 45	9.18 ± 0.39	5.04 ± 0.20	10.90 ± 4.97	2.17 ± 0.93	1.29 ± 0.17
star design	9	0	47.5	65	94.8 ± 7.9	1042 ± 82	1244 ± 60	22.72 ± 2.26	0.80 ± 0.68	1.60 ± 0.76	0.18 ± 0.08	0.18 ± 0.20
	10	96	47.5	65	113.3 ± 24.9	529 ± 126	906 ± 285	3.49 ± 0.83	4.79 ± 2.28	18.73 ± 12.90	4.66 ± 3.15	0.68 ± 0.34
	11	48	5	65	148.5 ± 6.8	1777 ± 25	1914 ± 171	27.84 ± 0.82	1.71 ± 1.60	7.81 ± 6.41	1.25 ± 1.07	0.20 ± 0.34
	12	48	90	65	138.1 ± 25.6	1433 ± 221	1749 ± 296	20.36 ± 3.38	1.06 ± 0.32	5.88 ± 1.91	0.90 ± 0.43	0.15 ± 0.12
	13	48	47.5	40	144.4 ± 16.0	1466 ± 124	2387 ± 467	23.08 ± 1.73	2.01 ± 0.52	10.05 ± 3.88	1.71 ± 0.89	0.44 ± 0.19
	14	48	47.5	90	173.4 ± 7.9	1940 ± 117	2174 ± 245	26.66 ± 0.64	4.01 ± 0.20	19.51 ± 2.59	3.20 ± 0.44	1.28 ± 0.42
central design	15	48	47.5	65	163.3 ± 13.8	1674 ± 130	1811 ± 105	25.08 ± 0.11	3.96 ± 0.72	21.25 ± 6.78	3.58 ± 1.02	1.77 ± 0.40
	16	48	47.5	65	164.9 ± 7.9	1745 ± 130	1936 ± 205	26.85 ± 1.72	5.03 ± 1.06	27.45 ± 7.87	4.83 ± 1.26	1.31 ± 0.20
	17	48	47.5	65	178.7 ± 5.2	1820 ± 60	2132 ± 342	27.48 ± 2.37	4.71 ± 1.23	29.60 ± 10.60	5.40 ± 2.09	2.48 ± 1.10

Results are expressed as the mean of three replicates ± standard deviation; TP, total polyphenols (mg gallic acid equivalents (GAE)/g); TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity (μM TE/g); ORAC, oxygen radical antioxidant capacity (μM Trolox equivalents (TE)/g tea); Caffeine, epigallocatechin (EGC), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC) and epicatechin gallate (ECG) expressed as mg/g.

Table 3. The *p*-values for each of the constants in the equation of the mathematical model.

Term	<i>p</i> -Value								
	Response								
	TP	Caffeine	EGC	EGCG	ECG	EC	ORAC	TEAC	
Complete Model	Constant	0.986	0.562	0.230	0.742	0.496	0.150	0.003	0.174
	% EtOH	0.000	0.000	0.000	0.118	0.000	0.690	0.000	0.000
	<i>t</i> (min)	0.008	0.156	0.002	0.007	0.003	0.007	0.170	0.416
	<i>T</i> (°C)	0.115	0.337	0.798	0.752	0.960	0.458	0.053	0.724
	% EtOH × % EtOH	0.000	0.000	0.610	0.045	0.786	0.270	0.000	0.000
	<i>t</i> (min) × <i>t</i> (min)	0.000	0.550	0.004	0.002	0.004	0.000	0.013	0.130
	<i>T</i> × <i>T</i>	0.157	0.959	0.470	0.717	0.550	0.563	0.049	0.958
	EtOH × <i>t</i> (min)	0.204	0.692	0.490	0.590	0.715	0.175	0.740	0.133
	% EtOH × <i>T</i> (°C)	0.344	0.004	0.720	0.730	0.209	0.269	0.276	0.538
<i>t</i> × <i>T</i>	0.184	0.269	0.400	0.940	0.385	0.980	0.671	0.220	
Reduced Model	Constant	0.038	0.003	0.027	0.344	−0.771	0.069	0.001	0.003
	% EtOH	0.000	0.000	0.017	0.060	0.016	-	0.000	0.000
	<i>t</i> (min)	0.000	0.000	0.096	0.000	0.130	0.041	0.006	0.000
	<i>T</i> (°C)	0.000	0.000	-	-	-	-	0.089	0.000
	% EtOH × % EtOH	0.000	0.000	-	0.018	-	-	0.000	0.000
	<i>t</i> (min) × <i>t</i> (min)	-	-	0.001	0.000	0.001	0.000	0.052	-
	<i>T</i> × <i>T</i>	0.000	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH × <i>t</i> (min)	-	-	-	-	-	-	-	-
	% EtOH × <i>T</i> (°C)	-	0.003	-	-	-	-	-	-
<i>t</i> × <i>T</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	

- : Term not applied in the Model

The coefficient of determination in a multiple regression equation measures the strength of the relationship between the independent variables and the (dependent) response. The value of the determination coefficient for the equation for tea polyphenols is $R^2 = 0.873$, which indicates that only 13% of the total variation is not explained by the model.

Focusing on the RSM (represented in Figure 1A), it can be deduced that the TP dependency is quadratic, and the optimal results could be obtained by extracting with 45% EtOH for 57 min, at 90 °C.

The results of this study are different from those of other authors; Venditti *et al.* [10] obtained significantly higher values in white tea after steeping in cold water (RT) for two hours. This study found that extraction of polyphenols was poor for water and aqueous ethanol at 40 °C.

Acid pH is reported to improve polyphenol extraction [14,15,17,34]. Zimmerman [34] reported that at pH = 3, ECG extraction increased 20% and suggested that this may be due to two possible mechanisms. At a low pH, either the diffusion of flavonoids from the leaf into the aqueous phase increased or degradation of the leaf structure occurred, permitting better accessibility of the solvent to the leaf components. However, when lemon juice was used to reduce the pH, the antioxidant capacity of the lemon juice bioactive compounds was not considered [35,36].

3.4. Polyphenol and Caffeine Composition

Caffeine, EGC, EGCG, ECG, EC, catechin and gallic acid content were analysed by MECK. Catechin and gallic acid were not detected. All results obtained are shown in Table 2.

Caffeine shows a final response model (Equation 4) with good adjustment ($R^2 = 0.89$) in the model.

$$\text{Caffeine} = 7.93192 + 0.41115EtOH + 0.21984T - 0.00481EtOH^2 - 0.00166EtOH \times T \quad (4)$$

The caffeine extracted was in the range of 2.05–28.3 mg/g dry tea. The minimum values were observed in samples extracted with a high ethanol concentration. This is consistent with the low polarity of the caffeine molecule. There is no literature about the caffeine content of white tea samples.

EC, ECG and EG have a reduce number of terms and interactions with statistical significant p -values (Table 3). They have an equation with low R^2 . This fact suggested that the TP model responds to the synergic effect of all catechins contained in the sample.

Despite this bad adjustment, experimental results (Table 2) show that tea ECG content was in the range from 0.64 to 5.04 mg/g GAE. Lopez *et al.* [37], obtained similar ECG values (7.95 mg/g of tea) using an acid extraction method. Rusak *et al.* [13] reported a very high ECG content (42.3 mg/g of tea) after acid extraction and HPLC analysis. The latter author obtained 34.4 mg ECG/g dry tea using 40% ethanol for 30 min and 12.9 mg/g dry tea using 70% ethanol.

The EGC yield was 1.21–29.60 mg/g dry tea. The maximum yield was obtained with ethanol between 48% and 96% with an extraction time of 47.5 min and a temperature range of 56–90 °C. Rusak *et al.* [13] reported a range between 40.2 and 154 mg of EGC/g of dry white tea in bags and a range between 38.9 and 129 mg/g of EGC/g of dry tea in loose leaves analysed by HPLC. Lopez *et al.* [37] reported 11.1 mg EGC/g white tea, which is well within the range that was found by MECK analysis in this study.

The ECG content of the extracts corresponded to values between 0.18 and 5.40 mg ECG as GAE/g tea. Values reported by Lopez *et al.* [37] (3.19 mg/g dry tea) extracted from acidified samples were within this range. However, Rusak *et al.* [13] reported that 36.6 mg ECG as GAE/g dry white tea was extracted using 40% ethanol for a 15–30 min extraction time.

In EC analysis, a maximum extraction of 2.48 mg/g GAE was obtained in this study, which is similar to the value reported by Lopez *et al.* [37] (2.13 mg/g).

3.5. Antioxidant Capacity

The antioxidant activity of the different white tea infusions was assessed by the TEAC and ORAC assays. Some authors have shown significant differences in free radical scavenging activity according to the assay method used [23,38] and have reported that the TEAC assay is simpler and cheaper than the ORAC assay, but may give an underestimate of the antioxidant capacity. Tabart *et al.* [23] proposed that the mean of the values obtained using four different tests should be used.

A comparison between the two methods used in this study is presented, and the results are analysed using RSM.

3.5.1. TEAC

The contour plot (Figure 1B) shows that the TEAC values were highest for EtOH concentrations between 40% to 50%. The extract with the maximum TEAC value was obtained with 43.7% EtOH for 90 min. Surface plots shows that there was a quadratic dependence on %EtOH and a linear dependence on extraction time. All of the linear coefficients were again significant, but just one quadratic coefficient (EtOH²) was included. The final response model (using uncoded units) to predict TEAC is shown in Equation 5:

$$TEAC = 325.540 + 33.821EtOH + 2.314t + 8.126T - 0.384EtOH^2 \quad (5)$$

where TEAC is the response variable. The value of the determination coefficient for the equation is $R^2 = 0.91$ (only about 9% of the total variation is not explained by the model), so it can be concluded that there is a very good correlation between TEAC and the independent variables.

Samples 14 and 17, which had the highest TEAC values, had the highest TP values (Table 2). The polyphenols present were rich in EGCG, with moderate concentrations of ECG and EGC and a low concentration of EC (see Table 3). Salah *et al.* [39] reported that the relative antioxidant activity of the tea catechins assessed by the TEAC assay was in the order ECG > EGCG > EGC > EC, so it is clear that ECG and EGCG made important contributions to the antioxidant capacity.

3.5.2. ORAC

For assessment of antioxidant capacity by the ORAC assay, only two linear coefficients (EtOH and t) and one quadratic coefficient (EtOH²) were significant. The final response model (using uncoded units) to predict ORAC is defined in Equation 6:

$$ORAC = 932.682 + 38.017EtOH + 4.615t - 0.415EtOH^2 \quad (6)$$

where ORAC is the response variable. The value of the determination coefficient for the equation is $R^2 = 0.791$, which indicates that less than 21% of the total variation was not explained by the model.

3.6. Correlation between TP, TEAC and ORAC

The study of the correlation between experimental data obtained in TP, TEAC and ORAC was also evaluated. Several authors have reported correlations between the results found for radical scavenging activity assessed by the TEAC and ORAC methods [39]. The results of this study show a correlation between TP, TEAC and ORAC values (Figure 2). The best correlation is that between total polyphenols (TP) and TEAC values ($R^2 = 0.90$).

The correlation between TP and the ORAC values is not so good ($R^2 = 0.86$). The most likely reason for this is that the TEAC assay only measures single electron transfer (SET) and can only measure the extent of inhibition by antioxidants. ORAC combines the time and magnitude of the inhibition, so the effects of slow reacting and fast reacting antioxidants differ in this assay, but not in the TP or TEAC assays.

All three variables in the extraction process had a significant effect on the polyphenols and TEAC value. EtOH and time had a much greater effect on the ORAC value, while temperature had less effect.

Figure 1 displays the surface plots of RSM, in which the fitted responses were plotted against changes in the factors, EtOH and time, whereas the temperature was held at three different levels (40 °C, 65 °C and 90 °C). EtOH and time are represented on the *x*-axis, while TP, TEAC and ORAC are shown on the *y*-axis.

Figure 1. Response surface plots (left) and contour plots (right) showing the effect of ethanol concentration % in white tea extractions and the relations with antioxidant capacity evaluated by TP, TEAC and ORAC. (A) Response surface methodology (RSM) for TP and EtOH, (B) RSM for TEAC and ETOH and (C) RSM for ORAC and EtOH.

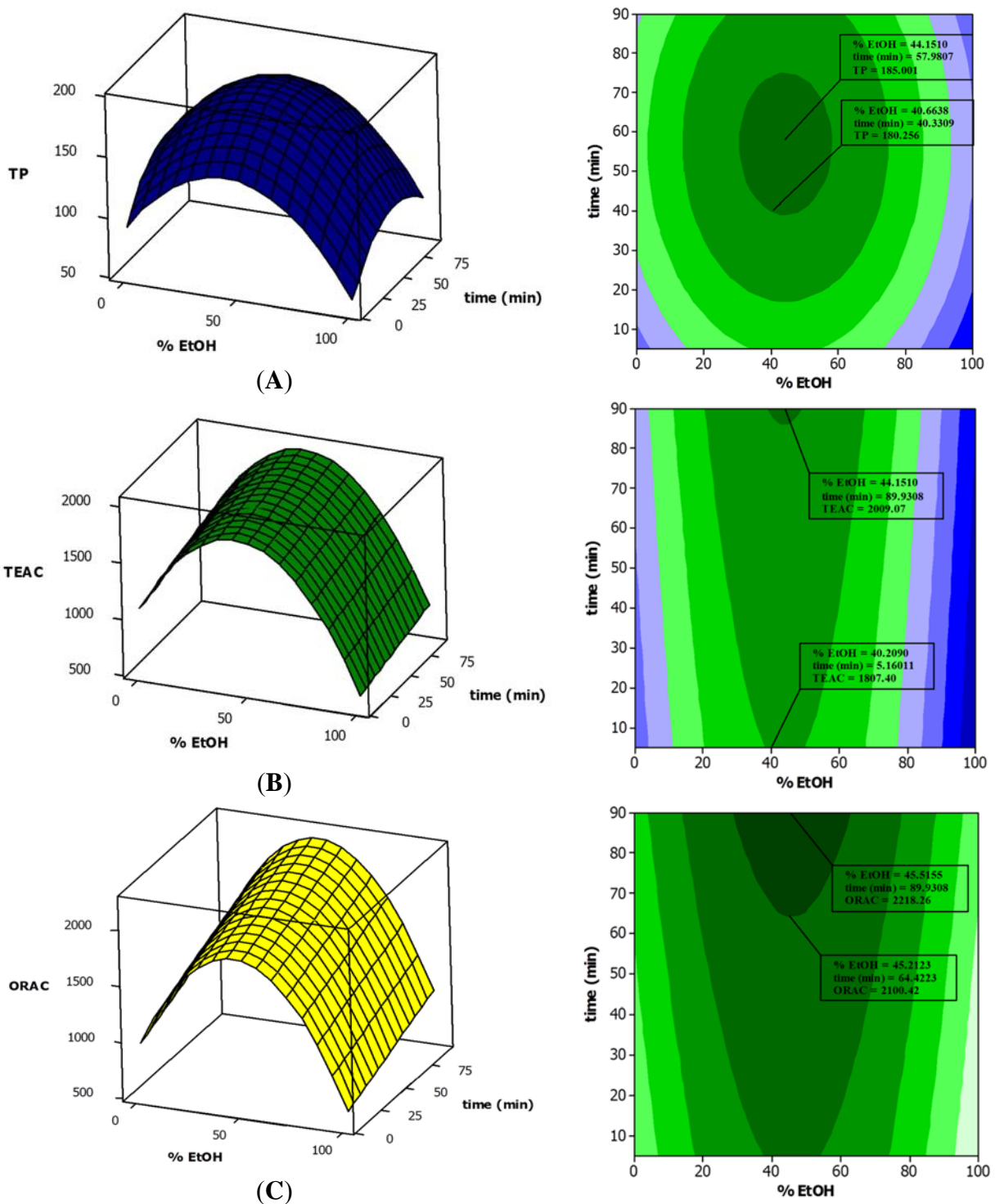
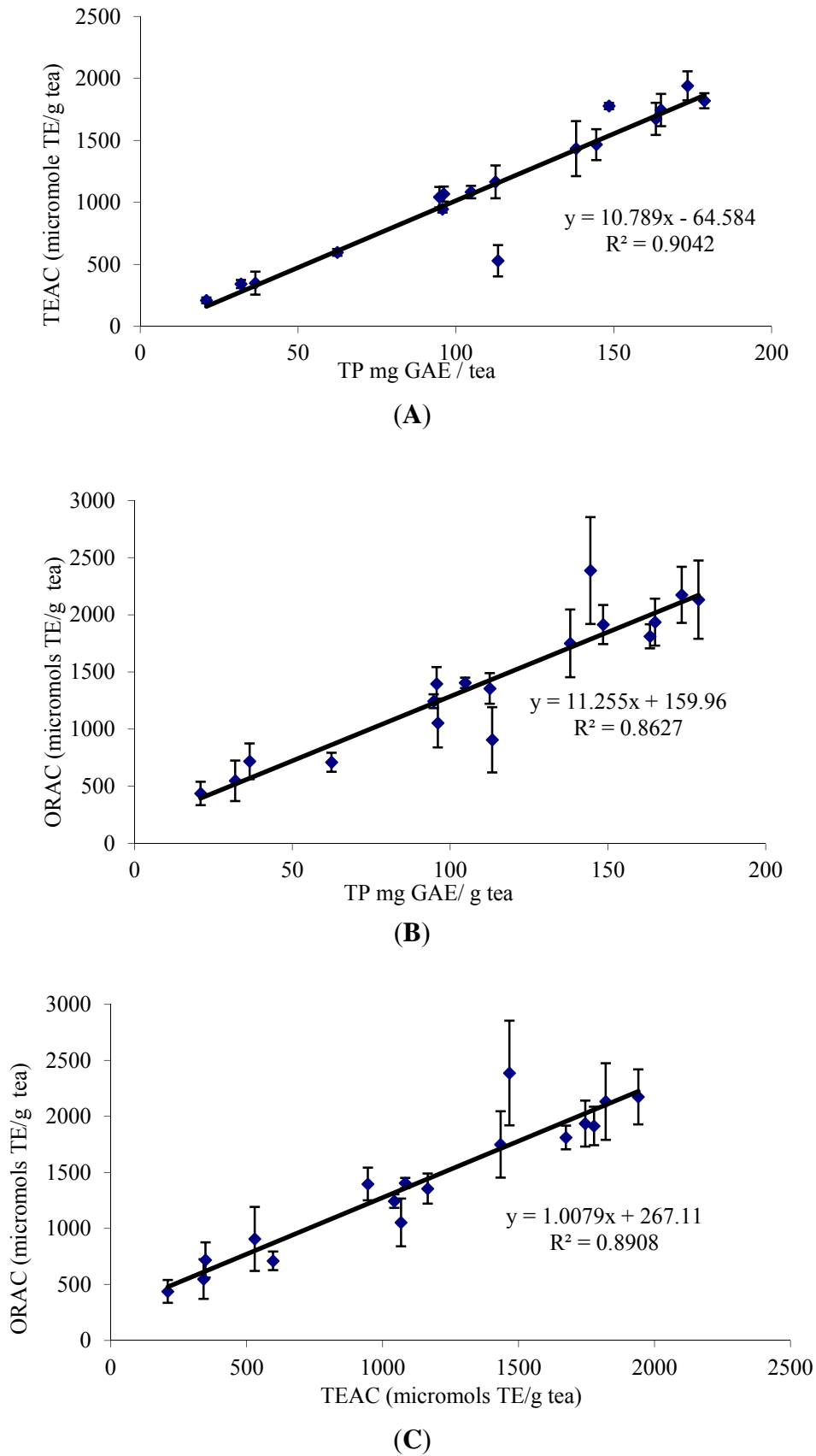


Figure 2. Correlation between TEAC, ORAC and total polyphenols (TP). (A) Correlation between TEAC and TP, (B) ORAC and TP and (C) ORAC and TEAC.



The optimal conditions for the extraction of tea polyphenols predicted by the equation were: EtOH = 45%, $t = 57$ min and $T = 90$ °C. Likewise, the conditions for extracts with optimal TEAC values predicted by the equation were: EtOH = 40%, $t = 90$ min and $T = 90$ °C. Finally, the conditions for extracts with optimal ORAC values predicted by the equation were: EtOH = 40%–60% and $t = 60$ min, with no significant effect of temperature.

4. Conclusions

The highest amounts of polyphenols (both individually and as determined by the Folin-Ciocalteu assay) were extracted at intermediate values of the conditions studied (about 48% ethanol, 47.5 min and 65 °C). The TP values correlated with antioxidant capacity determined by both the ORAC and TEAC assays, although the best temperature for the extraction of radical scavenging components assessed by the TEAC assay was 90 °C. Time is the factor that was less important, in the ranges studied, and %EtOH had the greatest influence. This study has identified optimal conditions for the extraction of tea liquor with the best antioxidant properties.

Acknowledgments

This project was supported by the *Agencia d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR)* (Catalonia, Spain). The authors thanks to Technical University from Catalonia for their support in this research.

Author Contributions

María Pilar Almajano and Francisca Pérez-Llamas conceived and designed the study. Mónica Blanco performed the statistical analysis. Sara Peiró and Francisco Segovia did the experimental work, analysed the data and interpreted results. Sara Peiró wrote the paper and Michael H. Gordon helped with English, with concepts and revised it critically. Finally, María Pilar Almajano reviewed all the manuscript and the final version to be submitted.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Oh, J.; Jo, H.; Cho, A.R.; Kim, S.; Han, J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control* **2013**, *31*, 403–409.
2. Gülçin, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 345–391.
3. Silva-Weiss, A.; Ihl, M.; Sobral, P.J.A.; Gómez-Guillén, M.C.; Bifani, V. Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Eng. Rev.* **2013**, *5*, 200–216.
4. Perumalla, A.V.S.; Hettiarachchy, N.S. Green tea and grape seed extracts—Potential applications in food safety and quality. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 827–839.

5. Gramza, A.; Korczak, J. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 351–358.
6. Almajano, M.P.; Carbo, R.; Jimenez, J.A.L.; Gordon, M.H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* **2008**, *108*, 55–63.
7. Cabrera, C.; Artacho, R.; Giménez, R. Beneficial effects of green tea—A review. *J. Am. Coll. Nutr.* **2006**, *25*, 79–99.
8. Sharangi, A.B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.)—A review. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 529–535.
9. Moderno, P.M.; Carvalho, M.; Silva, B.M. Recent patents on *Camellia sinensis*: Source of health promoting compounds. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* **2009**, *1*, 182–192.
10. Venditti, E.; Bacchetti, T.; Tiano, L.; Carloni, P.; Greci, L.; Damiani, E. Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity? *Food Chem.* **2010**, *119*, 1597–1604.
11. Hilal, Y.; Engelhardt, U. Characterisation of white tea—Comparison to green and black tea. *J. Verbrauch. Lebensm.* **2007**, *2*, 414–421.
12. Müller, N.; Ellinger, S.; Altehled, B.; Ulrich-Merzenich, G.; Berthold, H.K.; Vetter, H.; Stehle, P. Bolus ingestion of white and green tea increases the concentration of several flavan-3-ols in plasma, but does not affect markers of oxidative stress in healthy non-smokers. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 1636–1645.
13. Rusak, G.; Komes, D.; Likić, S.; Horžić, D.; Kovač, M. Phenolic content antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chem.* **2008**, *110*, 852–858.
14. Unachukwu, U.J.; Ahmed, S.; Kavalier, A.; Lyles, J.T.; Kennelly, E.J. White and Green Teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): Variation in Phenolic, Methylxanthine, and Antioxidant Profiles. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, C541–C548.
15. Komes, D.; Belščak-Cvitanović, A.; Horžić, D.; Rusak, G.; Likić, S.; Berendika, M. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochem. Anal.* **2011**, *22*, 172–180.
16. Almajano, M.P.; Vila, I.; Gines, S. Neuroprotective effects of white tea against oxidative stress-induced toxicity in striatal cells. *Neurotox. Res.* **2011**, *20*, 372–378.
17. Lopez, V.; Isabel Calvo, M. White Tea (*Camellia sinensis* Kuntze) Exerts Neuroprotection against Hydrogen Peroxide-Induced Toxicity in PC12 Cells. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2011**, *66*, 22–26.
18. Thring, T.S.A.; Hili, P.; Naughton, D.P. Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. *J. Inflamm.* **2011**, *8*, 27.
19. Yen, W.-J.; Chyau, C.-C.; Lee, C.-P.; Chu, H.-L.; Chang, L.-W.; Duh, P.-D. Cytoprotective effect of white tea against H₂O₂-induced oxidative stress *in vitro*. *Food Chem.* **2013**, *14*, 4107–4114.
20. Camouse, M.M.; Domingo, D.S.; Swain, F.R.; Conrad, E.P.; Matsui, M.S.; Maes, D.; Declercq, L.; Cooper, K.D.; Stevens, S.R.; Baron, E. Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. *Exp. dermatol.* **2009**, *18*, 522–526.
21. Dias, R.; Alves, M.G.; Socorro, S.; Silva, B.M.; Oliveira, P.F. White Tea as a Promising Antioxidant Medium Additive for Sperm. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 608–617.

22. Hengst, C.; Werner, S.; Müller, L.; Fröhlich, K.; Böhm, V. Determination of the antioxidant capacity: Influence of the sample concentration on the measured values. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *230*, 249–254.
23. Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.-O.; Dommès, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* **2009**, *113*, 1226–1233.
24. Rusaczonok, A.; Swiderski, F.; Waszkiewicz-Robak, B. Antioxidant Properties of Tea and Herbal Infusions—A Short Report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2010**, *60*, 33–35.
25. Peres, R.G.; Tonin, F.G.; Tavares, M.F.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Determination of catechins in green tea infusions by reduced flow micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem.* **2011**, *127*, 651–655.
26. Sun, Y.; Liu, D.; Chen, J.; Ye, X.; Yu, D. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-*trans*- β -carotene from citrus peels. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, *18*, 243–249.
27. Terabe, S. Capillary separation: Micellar electrokinetic chromatography. *Annual Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 99–120.
28. Prior, R.L.; Wu, X.L.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302.
29. Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 883–897.
30. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
31. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619–4626.
32. Ferruzzi, M.G.; Green, R.J. Analysis of catechins from milk-tea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* **2006**, *99*, 484–491.
33. Mariya John, K.M.; Vijayan, D.; Raj Kumar, R.; Premkumar, R. Factors influencing the efficiency of extraction of polyphenols from young tea leaves. *Asian J. Plant Sci.* **2006**, *5*, 123–126.
34. Zimmermann, B.F.; Gleichenhagen, M. The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea: How to get most out of it. *Food Chem.* **2011**, *124*, 1543–1548.
35. Del Río, J.A.; Fuster, M.D.; Gómez, P.; Porras, I.; García-Lidón, A.; Ortuño, A. *Citrus limon*: A source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chem.* **2004**, *84*, 457–461.
36. González-Molina, E.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C. Genotype and harvest time influence the phytochemical quality of Fino lemon juice (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) for industrial use. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1669–1675.
37. López, M.D.M.C.; Vilariño, J.M.L.; Rodríguez, M.V.G.; Losada, L.F.B. Development, validation and application of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography method for routine analysis of catechins, quercetin and thymol in natural samples. *Microchem. J.* **2011**, *99*, 461–469.

38. Zulueta, A.; Esteve, M.J.; Frasquet, I.; Frígola, A. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chem.* **2007**, *103*, 1365–1374.
39. Salah, N.; Miller, N.J.; Paganga, G.; Tijburg, L.; Bolwell, G.P.; Rice-Evans, C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *322*, 339–346.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).