

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**“MODELO DE DIGESTIÓN *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE
CO-PRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA”**

TRABAJO FIN DE GRADO

Marzo-2015

Autor: Raquel Torá Gil

Tutor/es: Juana Fernández López

Manuel Viuda Martos

MODELO DE DIGESTIÓN *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE CO-PRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

RESUMEN

Hoy en día se ha incrementado de manera notable la cantidad de co-productos que se generan en las industrias agroalimentarias, de ahí la importancia que a estos se les intente dar un uso secundario para ser aprovechados y así no se acumulen en las industrias. En este trabajo, los co-productos, procedentes de la industrialización del limón y la chufa, ricos en fibra dietética antioxidante serán sometidos a un sistema modelo de digestión *In Vitro*, para intentar elucidar como varía su actividad antioxidante así como su contenido en compuestos fenólicos (compuestos bioactivos más estudiados en cuanto a la actividad antioxidante que aportan a los alimentos en los que se encuentran y que contribuyen a hacerlos más saludables) en cada una de las fases del proceso digestivo.

Palabras claves: digestión *In Vitro*, co-productos, antioxidante, fenoles, flavonoides.

IN VITRO DIGESTION MODEL OF EXTRACTS FROM CO-PRODUCTS OF FOOD INDUSTRY

ABSTRACT

At present, the amount of co-products generated in food industry has increased greatly, hence the importance that these will try to give them a secondary use to be exploited and thus do not accumulate in industries. As discussed in this work, the co-products, from the industrialization of lemon and chufa, rich in dietary fiber antioxidant will be submitted a model system of *In Vitro* digestion, to try to elucidate how changes its antioxidant activity and its content in phenolic compounds (the most studied bioactive compounds for antioxidant activity contributing to food and those who are contributing to make them healthier) in each of the stages of the digestive process.

Keywords: *In Vitro* digestion, co-products, antioxidant, phenols, flavonoids.

Quisiera agradecer este trabajo a mis tutores, Manuel Viuda Martos y Juana Fernández López, por todo su tiempo y dedicación y, sobre todo, por su gran ayuda y predisposición en todo momento para llevarlo a cabo.

A mis padres, Manolo y Fina, a mi hermano Fran y a mis hermanas, Susana y Mónica, por todo el ánimo y apoyo recibido y por aguantarme en esos momentos de nervios y bajos de ánimo.

Al resto de mi familia.

Y a todos mis compañeros que durante estos años han sido más que compañeros amigos.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. CO-PRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA	9
1.1.1. INDUSTRIAS DE PRODUCCIÓN DE ZUMO DE LIMÓN	10
1.1.2. INDUSTRIAS DE PRODUCCIÓN DE HORCHATA DE CHUFA.....	11
1.2. FIBRA DIETÉTICA	17
1.2.1. COMPONENTES DE LA FIBRA DIETÉTICA	19
1.2.1. CLASIFICACIÓN	23
1.2.2. PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES	25
1.2.3. EFECTOS FISIOLÓGICOS Y TERAPÉUTICOS DERIVADOS DEL CONSUMO DE FIBRA DIETÉTICA	26
1.3. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	30
1.3.1. RADICALES LIBRES Y SU IMPLICACIÓN EN LA SALUD	33
1.4. MODELOS DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	35
1.4.1. <i>Digestión In Vitro</i> y enzimas	36
1.4.2. <i>Digestión In Vitro</i> y condiciones de la muestra	37
1.4.3. <i>Digestión</i> y tiempo de tránsito	37
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	38
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1. MATERIAL VEGETAL	40
3.2. SIMULACIÓN DE UN SISTEMA DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	40
3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	41
3.3.1. <i>Preparación de los extractos</i>	41
3.3.2. <i>Actividad antioxidante utilizando el radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)</i> . 41	

3.3.3. Poder antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP)	42
3.3.4. Capacidad quelante del ión ferroso (FIC).....	42
3.3.5. Ensayo de sustancias de reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs).....	43
3.4. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT)	43
3.5. CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (CFIT)	43
3.6. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	44
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1. CONTENIDO EN FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES	45
4.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	50
4.3. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	59
5. CONCLUSIONES	63
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7. ANEXOS.	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 12

Tabla 2. 14

Tabla 3. 19

Tabla 4. 25

Tabla 5. 45

Tabla 6. 52

Tabla 7. 56



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 10

Figura 2. 16

Figura 3. 33

Figura 4. 34



1. INTRODUCCIÓN

1.1. CO-PRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

El aprovechamiento de los co-productos en la industria agroalimentaria es un tema de gran interés a nivel internacional y en los últimos años existe la tendencia a obtener producciones sin “materias primas secundarias”, por representar una importante fuente de beneficio económico debido a las posibilidades de desarrollo de nuevos productos (Larrauri, 1994).

Se define co-producto como aquel material que no representa una unidad o un valor económico para el que lo produce (Sánchez, 2003).

Consideramos los co-productos como aquellas fracciones de la materia prima que no forman parte del producto final y que se generan durante el proceso productivo. Estos co-productos alimentarios tienen una composición similar a la de los productos finales, es decir están constituidos mayoritariamente por proteínas, hidratos de carbono y grasas (Berganza et al., 2003).

En la actualidad gran parte del volumen total de co-productos generados en la industria agroalimentaria se depositan directamente en vertedero o se emplean en aprovechamientos de escaso valor, compostaje, fertilizante o en alimentación animal directa. Sin embargo, las últimas tendencias apuntan hacia una revalorización de estas “materias primas secundarias” hacia productos con mayor potencial de comercialización en ámbitos diferentes a la alimentación tradicional (farmacéutico, dietético, etc.) (Berganza et al., 2003).

1.1.1. INDUSTRIAS DE PRODUCCIÓN DE ZUMO DE LIMÓN

1.1.1.1. EL LIMÓN

El limón (*Citrus limon* (L.) Burm f.) es la tercera especie de cítrico de mayor importancia en el mundo después del naranjo y el mandarino. España es actualmente el principal país productor de limones de la Cuenca Mediterránea superando a Italia y a Turquía. Es también el principal país exportador de fruto fresco del mundo (García et al., 2003).

La figura 1 muestra la producción de cítricos en España, siendo de un 12% la producción de limones. Por su parte, la Región de Murcia ocupa el 62% de la producción nacional de estos, seguido de la Comunidad Valenciana y Andalucía.

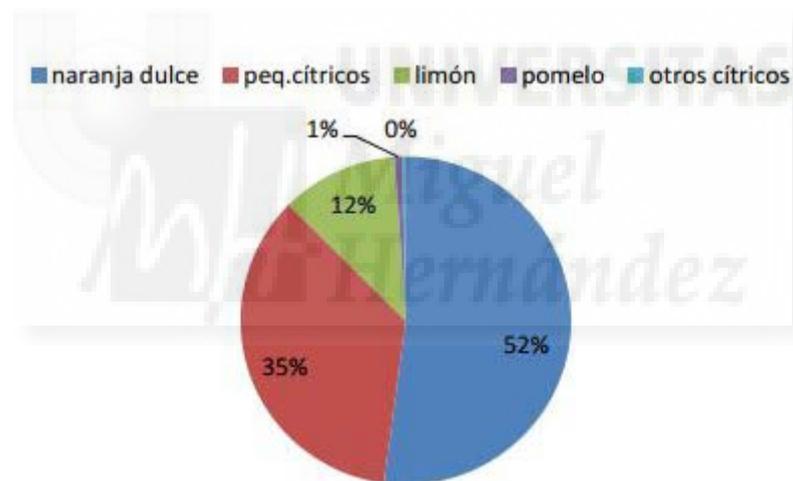


Figura 1. Producción de cítricos en España. MAPA, Superficie y producción de frutas y hortalizas en España, Años 2008-2012.

El limón se caracteriza por su color amarillo, una muy elevada acidez y anteriormente se empleaba para la producción de ácido cítrico, pero ahora se utilizan métodos más baratos. Presentan el mayor grado de divergencia de todas las especies de cítricos y se destinan principalmente a la producción de zumo de limón y limonada (Kimball, 2002).

1.1.1.2. CO-PRODUCTOS GENERADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ZUMO DE LIMÓN

En el caso de la industria transformadora de cítricos, y más concretamente en la industria de elaboración de zumos, al exprimir la pulpa de los cítricos se producen unos co-productos (en su gran mayoría constituidos por la corteza de las frutas) que constituyen un problema debido a su inútil acumulación en las fábricas, desprendiendo malos olores al fermentar, por lo que se suelen secar y moler para su posterior empleo (Mollá y col, 1994).

La mayoría de estos co-productos presentan un alto contenido en carbohidratos y fibra alimentaria, componentes importantes en la dieta humana, ya que por un lado tienen un destacado aporte energético derivado de los azúcares disponibles y, por otro lado, la fracción de fibra alimentaria está implicada en propiedades fisiológicas positivas para el organismo (Martín-Cabrejas, 1995).

La fibra alimentaria se encuentra en frutas, verduras, granos y productos de cereales, y cada vez es más frecuente el empleo de fibras alimentarias de co-productos procedentes de industrias agroalimentarias que se adicionan a productos procesados para aumentar su valor (Martín-Cabrejas, 1995; D.Q.A.G., 2002).

1.1.2. INDUSTRIAS DE PRODUCCIÓN DE HORCHATA DE CHUFA

1.1.2.1. LA CHUFA

La chufa (*Cyperus esculentus* L.) es un cultivo representativo de la región del Mediterráneo español donde los tubérculos se utilizan casi exclusivamente para preparar horchata de chufa (Beneyto et al., 2000). Según los datos del Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida “Chufa de Valencia”, la superficie de cultivo dedicada a este tubérculo comprende cerca de 2.450 hectáreas, lo que supone una producción anual de 9.000 t (CRDO, 2012).

La chufa se cultiva también en algunos países del continente americano como Chile (Ormeño-Nuñez et al., 2008), Brasil (De Abreu Matos et al., 2008) y EE.UU., en los estados de Luisiana (Moore et al., 1998), Missouri (Kelley y Fredrickson, 1991), Nuevo México (Taylor y Smith, 2005) y Florida (Mosquera et al., 1996), donde se utiliza

principalmente como alimento para animales o cebo de pesca. En Florida también se utiliza para la fabricación de horchata (Mosquera et al., 1996).

1.1.2.1.1. COMPOSICIÓN

La composición química de la chufa (Tabla 1) comparte características con los tubérculos, pues es uno de ellos, pero también presenta algunas similitudes con ciertos frutos secos. El contenido de humedad es menor que el que presentan tubérculos como la patata (Lombardo et al., 2012; Murniece et al., 2011), el ñame (Abara, 2011), el tupinambo o pataca (Barta y Pátkai, 2007), el yacón (Scher et al., 2009; Ojansivu et al., 2011), el boniato (Olayiwola et al., 2009; Lai et al., 2013) o la yuca o mandioca (Maieves et al., 2012). Coşkuner et al. (2002) indicaron que la chufa pierde una cantidad considerable de agua durante el secado y almacenamiento, por este motivo el contenido de agua es menor que en otros tubérculos.

Tabla 1. Composición química de la chufa (*Cyperus esculentus*)

Componente	g/100g
Humedad	26,00
Lípidos	24,49
Proteínas	5,04
Minerales	1,70
Hidratos de carbono	43,30
Fibra Dietética	8,91
Almidón	29,90
Azúcares totales	15,42
Azúcares reductores	1,70
Sacarosa	13,03

Fuente: Mokady y Dolev (1970); Addy y Eteshola (1984); Linssen et al. (1989); Temple et al. (1989); Coşkuner et al. (2002); Alegría-Torán y Farré-Rovira (2003).

1.1.2.2. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA CHUFA

La aplicación más conocida de la chufa, en la tecnología de los alimentos, es la elaboración de horchata de chufa (Mosquera et al., 1996). Sin embargo, son muchos los alimentos que se pueden obtener a partir de la chufa y estos son elaborados mediante una amplia gama de fórmulas y métodos de preparación.

La chufa se utiliza como agente aromatizante en helados, la harina de chufa tostada es empleada para la fabricación de galletas y otros productos de panadería (Coşkuner et al., 2002); a partir de ella se obtiene almidón y aceite, por lo que también es útil en la elaboración de otros productos no alimentarios, como el jabón (Adejuyitan, 2011). Belewu y Abodurin (2008) han estudiado su utilidad en la preparación de kunnu (una bebida local de Nigeria). El kunnu es una bebida no alcohólica elaborada a partir de cereales (mijo, sorgo, etc.) con adición de azúcar y aromatizada con especias (pimienta, regaliz, jengibre, etc.). La chufa se emplea en la elaboración de esta bebida para compensar la pobre calidad nutricional del kunnu preparado sólo con cereales. En Ghana se prepara también una bebida similar al kunnu, que puede ser elaborada a partir de chufa cruda o tostada (Sanful, 2009). La chufa es también un snack popular en Ghana y en otras partes de África Occidental. En Ghana, las chufas se comen crudas como snack o se trituran y el producto blanco resultante se cocina y se obtiene un puré que se consume como acompañamiento a otros alimentos. El aceite de chufa además, se extrae mediante métodos tradicionales, a pequeña escala, para uso alimentario (Yeboah et al., 2012). Pero como ya se ha mencionado, es la horchata el principal producto obtenido a partir de la chufa.

La horchata de chufa es el extracto acuoso de los tubérculos de chufa (*Cyperus esculentus*). Es una bebida muy popular en España, aunque actualmente su potencial está aumentando en otros países como EE.UU. (Mosquera et al., 1996). Su composición, en comparación con el tubérculo entero se presenta en la Tabla 2. La horchata es una bebida no alcohólica de apariencia lechosa, obtenida a partir de la chufa, mezclada con azúcar y agua, y con un gran impacto económico en la Comunidad Valenciana.

Tabla 2. Composición química de la horchata de chufa (g/100 g peso fresco) comparada con el tubérculo entero.

Componente	Horchata de chufa	Chufa
Humedad	88,00	26,00
Proteínas	0,91	5,04
Grasas	3,09	24,49
Cenizas	0,25	1,70
Fibra Dietética Total	1,03	8,91

Fuente: CRDO (2012); Alegría-Torán y Farré-Rovira (2003).

La elaboración de la horchata (Figura 2) sigue una serie de operaciones básicas entre las que se encuentran, el remojo de la chufa, alrededor de 8 horas, la molienda, el prensado de la pasta resultante y la mezcla con el azúcar (entre 100 y 120 g/L) (Corrales et al., 2012).

El proceso comienza con el lavado de las chufas para su limpieza. Se les da un tratamiento germicida para higienizar las chufas y son lavadas de nuevo para eliminar los restos de germicida. Una vez realizado esto, se ponen en remojo durante 8-12 horas con agitación intermitente y renovación periódica del agua. Posteriormente, se procede a su trituración en un molino. En la trituración se introduce simultáneamente un caudal uniforme de agua (aproximadamente 3 litros por kilo de chufa). Se pone en maceración la masa de chufa triturada con agua; su duración dependerá del tiempo que haya permanecido previamente en remojo. Por prensado se obtiene el primer extracto y se tamiza. El residuo del tamiz y el del prensado se mezclan, añadiendo alrededor de 2 litros de agua por kilogramo de chufa; se prensan y se tamizan, formando un segundo extracto que se une al anterior, con lo que se obtiene el extracto final. Finalmente, el proceso de elaboración de la horchata se completa disolviendo la proporción deseada de azúcar, por lo general entre 100 y 150 gramos por litro de extracto y se tamiza de nuevo. Este proceso industrial genera gran cantidad de residuos, entre los que se encuentra el agua con la que se realizan los lavados, y un residuo sólido final o “torta”, compuesto por el 60% de la materia prima original y el agua que queda retenida (CRDO, 2012).

La producción industrial de horchata alcanza los 40-50 millones de litros al año, lo que representa un valor de mercado, al por menor, de unos 60 millones de euros (CRDO, 2012).

La horchata natural tiene un pH en el rango de 6,3-6,8 y es una bebida rica en almidón. Por lo tanto, no puede ser sometida a calentamiento por encima de 72°C ya que esto causaría que el almidón gelificase, alterándose las características organolépticas el producto (Cortés et al., 2005). La horchata de chufa es un producto de alta calidad nutricional y por lo tanto tiene un gran potencial en el mercado alimentario, limitado por su muy corta vida útil (Selma et al., 2003). El contenido graso es del 3%, siendo rica en ácido oleico (75% de la grasa total) y en ácido linoleico (9-10% de la grasa total). La arginina es el principal aminoácido, seguido por el ácido glutámico y el ácido aspártico. Con excepción de la histidina, los aminoácidos esenciales presentes en la horchata de chufa entran dentro de la proteína modelo propuesto para los adultos por la FAO/OMS (Cortés et al., 2005).



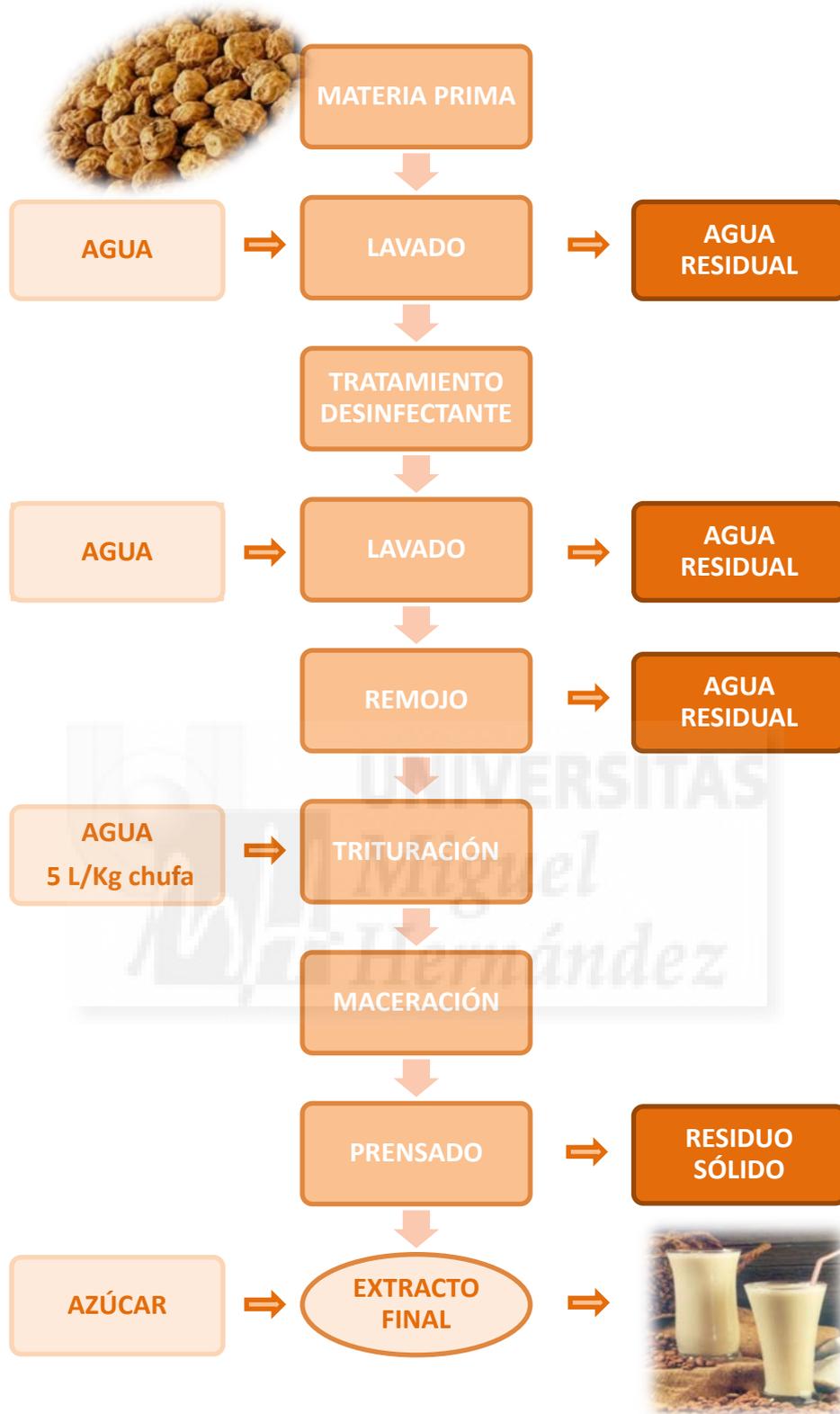


Figura 2. Diagrama de flujo simplificado del proceso de elaboración de la horchata de chufa (CRDO, 2012).

La horchata de chufa también se ha utilizado como una fuente alternativa a la leche en la producción de yogur (Sanful, 2009); también se ha utilizado para obtener “miel”, o elaborar productos como turrón, mermeladas, cerveza y licor (CRDO, 2012).

1.2. FIBRA DIETÉTICA

Hoy en día existe un gran interés por la fibra dietética. Este interés no es nuevo, ya en 1809, Einhof, un investigador alemán, desarrolló un método gravimétrico para medir la cantidad aproximada de *fibra cruda* en los alimentos para animales. El término de *fibra cruda* se utilizaba para designar el residuo (principalmente, celulosa y lignina) que se obtenía después de la extracción de los vegetales con éter y posteriormente con ácido y álcali débiles (Hernández et al., 1999).

Hispley, en 1953, fue el primer científico que reflejó por escrito el término de fibra dietética, definiendo a ésta como los constituyentes no digeribles que se encuentran en la pared de la célula vegetal, haciendo sinónimos los términos fibra vegetal y fibra dietética.

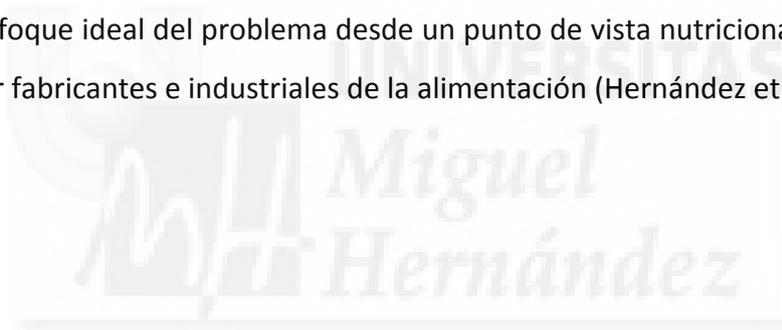
Entre 1972 y 1976, Burkitt, Trowell y Painter adoptaron un término más amplio de fibra dietética debido a que diversos estudios epidemiológicos encontraron una correlación entre el consumo de determinados alimentos no digeribles y la disminución de ciertas enfermedades, como el estreñimiento, la obesidad, la diabetes, las enfermedades coronarias e, incluso, determinados tipos de cáncer, proponiendo la conocida hipótesis de la fibra dietética (Gil, 2010).

En 2001, la American Association of Cereal Chemist amplió aún más el concepto de fibra dietética: la fibra dietética es la parte comestible de las plantas y los hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y la absorción en el intestino delgado, con completa o parcial fermentación en el intestino grueso. La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas de la planta. Las fibras dietéticas promueven efectos beneficiosos fisiológicos y/o atenúan los niveles de colesterol y/o glucosa en sangre (Gil, 2010).

Miembros de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), y la Organización Mundial de la Salud (OMS), opinan que la definición de fibra debe estar claramente vinculada a los vegetales, frutas y granos de cereales (Consumer, 2007).

En la actualidad, la fibra dietética se puede definir como una sustancia de origen vegetal que no puede ser digerida por las enzimas del tracto digestivo humano. Son polisacáridos estructurales de las plantas, que incluyen la celulosa, hemicelulosa, betaglucanos, pectinas, mucílagos, gomas y lignina; este último no tiene estructura de polisacárido porque son polímeros de fenilpropano. Las diferencias estructurales de cada uno de ellos determinan propiedades físico químicas diferentes y como consecuencia, comportamientos fisiológicos diversos (Segundo et al., 2011).

Aunque no es universalmente aceptada por los diferentes expertos, esta definición parece el enfoque ideal del problema desde un punto de vista nutricional, y así ha sido admitida por fabricantes e industriales de la alimentación (Hernández et al., 1999).



1.2.1. COMPONENTES DE LA FIBRA DIETÉTICA

En la tabla 3 se pueden observar los principales componentes de la fibra dietética.

Tabla 3. Principales componentes de la fibra dietética

Principales constituyentes de la fibra dietética
<p>Polisacáridos Celulosa Hemicelulosas Pectinas Gomas Mucílagos Polifruktosas</p>
<p>Análogos de hidratos de carbono Dextrinas no digeribles Maltodextrinas resistentes Polidextrosa Metilcelulosa Hidroxipropilmetilcelulosa Almidón resistente Hidratos de carbono sintéticos</p>
<p>Oligosacáridos Inulina Fructooligosacáridos Galactooligosacáridos</p>
<p>Derivados no hidratos de carbono Lignina Ceras Fitatos Cutinas y suberinas Compuestos polifenólicos (taninos)</p>

Fuente: Gil, (2010).

1.2.1.1. Polisacáridos

Los polisacáridos son todos los polímeros de carbohidratos que contienen al menos veinte residuos de monosacáridos. El almidón digerido y absorbido en el intestino delgado es un polisacárido, por ello se utiliza el término polisacárido no almidón (NSP), para aquellos que llegan al colon y poseen los efectos fisiológicos de la fibra. Podríamos clasificarlos en celulosa, β -glucanos, hemicelulosas, pectinas, gomas y mucílagos (Escudero & González, 2006).

Celulosa

La celulosa es un polisacárido lineal formado por unidades de D-glucosa (hasta 10.000), unidas por un enlace β -1,4 (Gil, 2010). Es el componente principal de las paredes de las células vegetales, donde se encuentra asociada a hemicelulosas, pectina y lignina. Este polisacárido no es atacado por las enzimas del aparato digestivo del organismo humano y constituye por ello, junto al resto de polisacáridos llamados inertes, la parte no digestible de los alimentos de origen vegetal denominada fibra bruta, de gran significación como inductora del peristaltismo intestinal.

A causa de su alto peso molecular y de la estructura firmemente ordenada es insoluble en agua (Belitz & Grosch, 1997).

Hemicelulosas

Las hemicelulosas se suponía que eran precursores de bajo peso molecular (y por tanto más solubles) de la celulosa. Aunque esta idea se descartó hace ya mucho tiempo, se conserva el nombre (Coulter, 1996).

Son polímeros más pequeños que la celulosa (50-2.000 residuos), formados por diversos tipos de azúcares y con estructura ramificada. Por lo tanto, se diferencian de la celulosa en el tamaño de la molécula, en el tipo de sus monómeros -que en la celulosa es sólo glucosa, mientras que en la hemicelulosa, además de glucosa, hay otros tipos de azúcares como la xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico (Freudenberg, 1965)- y, finalmente, en su estructura espacial (Gil, 2010).

Pectinas

Las pectinas son muy abundantes en todo el reino vegetal. Se obtienen de las pieles de los cítricos y de restos de manzanas. Están formadas fundamentalmente por restos de ácido α -D-galacturónico unidos por enlaces (1 \rightarrow 4).

Las pectinas forman geles termorreversibles a pH \approx 3 y en presencia de iones Ca^{2+} también a pH más alto. La capacidad de formación de geles es, en condiciones por lo demás iguales, directamente proporcional al peso molecular e inversamente al grado de esterificación. Las pectinas menos esterificadas necesitan, para llegar a formar geles, valores muy bajos de pH y/o presencia de iones calcio; pero gelifican sin embargo en presencia de menores concentraciones de azúcar.

Las más esterificadas, por el contrario, necesitan concentraciones crecientes de azúcar con el incremento del grado de esterificación.

A causa de su gran capacidad para la formación de geles, se utilizan grandes cantidades de pectinas para la elaboración de mermeladas y jaleas (Belitz & Grosch, 1997).

Gomas

Las gomas son polisacáridos complejos, siempre heterogéneos y ramificados, que contienen diversos azúcares neutros y ácidos urónicos, que pueden estar metilados o acetilados. Proviene de la transformación de polisacáridos de la pared celular, pudiendo incluso proceder del almidón (Gil, 2010).

La característica distintiva de las gomas es su gran afinidad por el agua y la alta viscosidad de sus disoluciones acuosas. Sin embargo, no forman geles y mantienen su plasticidad incluso a concentraciones altas (Coultate, 1996). Entre sus fuentes podemos encontrar arábica, karaya, tragacanto y gelana.

Mucílagos

Son polisacáridos hidrosolubles, presentes en muchas semillas, capaces de absorber entre 60 y 100 veces su peso en agua formando geles. Están formados por cadenas de arabinoxilanos muy ramificados (Hernández et al., 1995; Cervera et al., 1999; Gallardo,

2003). Algunas de sus fuentes son semillas del plántago, flores de malva, semillas de lino y algas.

1.2.1.2. Almidón resistente

El almidón se encuentra distribuido ampliamente en tubérculos como la patata, en granos y semillas, en un gran número de frutos y en los rizomas de muchas plantas. En un principio se pensaba que la totalidad del almidón ingerido se dissociaba y se absorbía a lo largo del aparato intestinal. Estudios posteriores han demostrado que al menos el 10% del almidón escapa a los procesos de digestión. El almidón resistente se define como la suma del almidón y productos de su degradación que no han sido absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos.

Existen diferentes factores que hacen que el almidón sea resistente a la α -amilasa humana: la forma física del alimento, el proceso de retrogradación y factores extrínsecos (Gil, 2010).

1.2.1.3. Oligosacáridos

Los oligosacáridos son hidratos de carbono con un nivel de polimerización menor, tienen de tres a diez o más moléculas de monosacáridos (Escudero & González, 2006).

Existen dos tipos de oligosacáridos de importancia en la industria alimentaria: fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS).

Los FOS más importantes son 1-cestosa, nistosa y fructosilnistosa, constituidos por una molécula de sacarosa y una, dos o tres de fructosa, respectivamente. Se encuentran en productos de origen vegetal, como la cebolla, la alcachofa, el tomate y la remolacha.

En los GOS, se une una molécula de lactosa, también en disposición lineal, a cuatro galactosas.

Además de FOS Y GOS, existen otros oligosacáridos que se ingieren con diferentes alimentos, como la inulina (cebolla), la rafinosa, la verbascosa y la estaquiosa, que se encuentran fundamentalmente en las legumbres (Gil, 2010).

1.2.1.4. Lignina

La lignina que contribuye a la rigidez estructural de la pared celular de la planta, no es un polisacárido sino un polímero aromático complejo que contiene ácidos y alcoholes fenilpropílicos de peso molecular variable. Es muy resistente a la digestión en el intestino delgado y no es atacada por la microflora bacteriana del colon (Hernández et al., 1999).

En nutrición, la lignina se ve siempre asociada a celulosas y hemicelulosas, por lo tanto se considera uno de los componentes importantes de la fibra.

Una de sus propiedades más interesantes es su capacidad de unirse a los ácidos biliares y al colesterol retrasando o disminuyendo su absorción en el intestino delgado (Escudero & González, 2006).

1.2.1. CLASIFICACIÓN

Las diversas fibras se diferencian por las distintas características que las definen y que han ido ampliando su concepto. En este sentido, las fibras se podrían encuadrar en función de su composición química, su situación en la planta o sus propiedades fisicoquímicas (Gil, 2010). Tradicionalmente, se han venido agrupando en función de su mayor o menor capacidad para retener agua, ya que esta propiedad determina en gran medida las propiedades fisicoquímicas de los compuestos no digeribles y sus efectos fisiológicos en el tracto gastrointestinal. La solubilidad en agua condiciona un determinado comportamiento fisiológico porque el agua, por un lado, vehiculiza y facilita la acción de las enzimas, ya sean digestivas o de origen bacteriano y, por otro lado, aumenta la viscosidad del medio, reteniendo componentes alimentarios (glucosa, grasa, minerales, etc.), enlenteciendo o dificultando su absorción a través de la mucosa intestinal y/o dificultando el contacto de determinadas sustancias nocivas con el epitelio intestinal (Mataix, 2009).

Fibra dietética soluble

La fibra dietética soluble o altamente fermentable contiene mayoritariamente polisacáridos no celulósicos tales como pectina, gomas, mucílagos, almidón resistente,

ciertos tipos de hemicelulosas y polisacáridos de reserva de la planta no amiláceos. La mayor parte de estos compuestos son muy hidratables, de ahí su gran capacidad de absorber agua y formación de geles en el intestino delgado. La fibra soluble se caracteriza porque retrasa la absorción de glucosa y grasa en el intestino delgado, es decir, capta sustancias a nivel intestinal impidiendo su absorción, tales como el colesterol.

Gran parte de ella sufre un proceso bacteriano de fermentación en el colon, con producción de ácidos grasos de cadena corta, que son absorbidos por el organismo. Se encuentra en las legumbres y la mayoría de las frutas, en frutos secos u oleaginosos, algas marinas, cereales, etc. En los cítricos (naranja, limón, pomelo), abunda en la parte blanquecina, entre la cáscara y en el interior comestible (Escudero & González, 2006).

La fracción soluble es variable, existiendo proporciones elevadas de la misma respecto al total de fibra dietética, en frutas es del 38%, 32% en verduras y hortalizas y en legumbres un 25% (Guarner, 2008).

Fibra dietética insoluble

La fibra dietética insoluble se compone fundamentalmente de fragmentos de las paredes celulares que contienen celulosa, algunas hemicelulosas, lignina y otros polifenoles como los taninos condensados. Apenas sufre procesos fermentativos en el colon y tiene un efecto más marcado en la regulación intestinal, por su capacidad de aumentar el tránsito intestinal (Guarner, 2008).

La celulosa es un polisacárido que no es atacado por las enzimas del aparato digestivo del organismo humano y que constituye junto al resto de los polisacáridos llamados inertes o resistentes, la parte no digerible de los alimentos de origen vegetal denominada fibra bruta, de gran significado como inductora del peristaltismo intestinal (Belitz & Grosch, 1997).

Predomina en los cereales, hortalizas, productos integrales y en todo tipo de salvado, también en hortalizas como la col rizada y en verduras, pero en menor medida (Amway, 2009).

En la tabla 4 se puede observar la clasificación de la fibra dietética según la solubilidad que presenta.

Tabla 4. Clasificación de la fibra dietética (definición fisiológico/nutricional) según su solubilidad

Fibra insoluble

Celulosa.
Algunas hemicelulosas.
Lignina.

Fibra soluble

Pectinas.
Algunas hemicelulosas (beta-glucanos).
Gomas (goma de guar, gomas de cereales).
Mucílagos.
Polisacáridos de algas (aditivos alimentarios).
Polisacáridos bacterianos (aditivos alimentarios).
Fructo-polisacáridos y fructo-oligosacáridos (inulina, olifrufructosa).
Almidón resistente.
Polidextrosa.

Fuente: Hernández et al. (1999).

Fibra dietética total

La fibra dietética total de un alimento incluye a la fibra soluble y a la insoluble de éste (Amway, 2009).

1.2.2. PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

La fibra dietética es un componente de ciertos alimentos de origen vegetal, que tiene la particularidad de desempeñar importantes funciones en el organismo. Entre ellas, está la de ayudar al paso de los demás alimentos a través del intestino y hacer más fácil la evacuación de los materiales no aprovechables en forma de defecaciones más húmedas y abundantes y, por lo tanto, más fáciles de eliminar. Esto sucede porque los alimentos ricos en fibra retienen mejor los líquidos, ayudando a controlar el estreñimiento (Salas & Megias, 2008).

Capacidad de retención de agua

Cuanto mayor sea la capacidad de retención de agua de una fibra mayor será el aumento de peso de las heces y menor el tiempo de tránsito intestinal, lo que provocará menor absorción de nutrientes y, por tanto, menor energía (Rodríguez et al., 2008).

Capacidad de retención de lípidos y otras sustancias

La existencia de tantos y tan diversos radicales activos en muchos de los componentes de la fibra dietética explica la retención de muchas sustancias en la misma, lo que lleva consigo a diversos efectos de los cuales algunos pueden tener especial significación nutricional, como son: adsorción de sales biliares, adsorción de colesterol, adsorción de grasa y adsorción de otras sustancias y componentes de la dieta (Mataix, 2009).

Fermentabilidad

Es probablemente la fermentabilidad, la propiedad más importante de un gran número de fibras, ya que de ella derivan multitud de efectos tanto locales como sistémicos. La fermentabilidad está bastante relacionada con la solubilidad de cada fibra.

La fibra dietética llega al intestino grueso de forma inalterada y aquí las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas de gran actividad metabólica, pueden digerirla en mayor o menor medida dependiendo de su estructura. Este proceso de digestión se produce en condiciones anaerobias, por lo que se denomina fermentación (Zaruelo, 2005).

1.2.3. EFECTOS FISIOLÓGICOS Y TERAPÉUTICOS DERIVADOS DEL CONSUMO DE FIBRA DIETÉTICA

La fibra afecta a todos los aspectos de la función gastrointestinal, desde la masticación del alimento hasta la evacuación de las heces. En la boca, las dietas con un elevado contenido en fibra requieren un mayor grado de masticación, enlenteciendo la velocidad de deglución. Esto comporta mayor salivación y favorece la higiene dental (Hernández et al., 1999).

Efectos sobre el estómago e intestino delgado

Los efectos de la fibra en el estómago y en el intestino dependen de la estructura química y de las propiedades físicas del polisacárido. En función de éstas la fibra dietética se divide en aquella que es soluble en agua, y puede formar soluciones viscosas o geles con el contenido gastrointestinal, y aquella que es insoluble. Las fibras solubles, como consecuencia de su viscosidad, enlentecen el vaciado gástrico y disminuyen la velocidad de absorción de glucosa, lípidos y aminoácidos. Esto es debido a que, por un lado, existe un retraso en el paso del contenido gástrico al intestino delgado, y por otro, el aumento de la viscosidad produce un aumento del espesor de la capa de agua estacionaria a través de la cual los solutos han de difundir para alcanzar la membrana celular del enterocito (Hernández et al., 1999).

Múltiples estudios experimentales han demostrado que una dieta sin fibra produce atrofia de la mucosa del íleon y del colon, mientras que las dietas suplementadas con fibra ejercen un efecto proliferativo en la mucosa. Así mismo, las dietas líquidas sin fibra pueden ocasionar una reducción de la actividad de algunas enzimas, un efecto que es contrarrestado con la suplementación de la dieta con fibra dietética.

La absorción de minerales, en especial calcio, hierro, cobre y zinc, puede disminuir de forma considerable si se ingieren cantidades importantes de fibra.

Por otro lado, la fibra puede disminuir la absorción de ácidos biliares, ya que éstos se unen a los residuos fenólicos y urónicos en la matriz de los polisacáridos. Esto puede alterar la formación de micelas y la absorción de las grasas. Como consecuencia de la depleción del *pool* de ácidos biliares pueden disminuir los niveles de colesterol, al utilizarse éste en la síntesis de *novo* de ácidos biliares (Hernández et al., 1999).

Efectos sobre el colon

La flora bacteriana colónica produce enzimas que son capaces de digerir los carbohidratos y proteínas endógenos y exógenos, estos últimos procedentes de la dieta y que escapan de la digestión en el intestino delgado. Como este proceso de digestión se produce en condiciones anaeróbicas se denomina fermentación. Se ha demostrado que todas las clases de fibra dietética, excepto la lignina, pueden ser

hidrolizadas de forma parcial o completa por estos microorganismos. Sin embargo, la fibra insoluble es bastante resistente a la degradación bacteriana en el colon y es excretada prácticamente intacta en las heces. Por este motivo y por su capacidad de retener agua contribuye sustancialmente a aumentar la masa fecal y a aumentar la peristalsis colónica. Dado que la flora bacteriana anaeróbica utiliza carbohidratos no absorbidos como sustratos energéticos para su propio mantenimiento y crecimiento, la degradación de la fibra soluble origina un aumento de la masa bacteriana, que a su vez provoca un aumento de la masa fecal (Hernández et al., 1999).

Por otro lado, la fibra soluble es, en general, muy fermentable y, por tanto, es degradada rápida y completamente. Su efecto primordial es la formación de compuestos importantes desde el punto de vista metabólico como son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) los cuales pueden afectar al transporte de fluidos y la función epitelial en el colon (Hernández et al., 1999).

Estreñimiento

Como se ha mencionado, tanto la fibra fermentable como la fibra poco fermentable son eficaces en la prevención y el tratamiento del estreñimiento, pero el mecanismo por el que ejercen su efecto es distinto. La fibra poco fermentable, en general insoluble, incrementa la masa intestinal de manera directa y, de esta forma, acelera el tránsito intestinal, al estimular los movimientos propulsores y disminuir los movimientos mezcladores. La fibra muy fermentable, en general soluble, es la que más aumenta de volumen por su gran capacidad de retener agua, pero su estructura se destruye al ser fermentada en el colon y pierde esa propiedad. No obstante, aumenta la masa fecal intestinal al favorecer el crecimiento bacteriano. Además, los AGCC generados como consecuencia de su fermentación tienen un efecto directo sobre la motilidad intestinal colónica, y los distintos gases (CO_2 , H_2 y CH_4) que se producen impulsan la masa fecal al actuar como bomba de propulsión.

Por todos estos mecanismos, la fibra consigue que las deposiciones sean más frecuentes y las heces más voluminosas y blandas. De hecho, los suplementos de fibra constituyen la medida de elección en el tratamiento del estreñimiento funcional en

situaciones especiales, como la gestación o cuando la ingesta de comida se reduce, como ocurre en los ancianos con poca actividad física (Gil, 2010).

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus representa un importante problema de salud en el mundo y su prevalencia va en ascenso.

Hoy día se está insistiendo en que la ingesta de una dieta con bajo índice de azúcares a base de polisacáridos complejos contenidos en cereales, vegetales, leguminosas y frutas, con una adecuada preparación y la práctica del ejercicio físico diario, son factores que impiden, en gran medida, la instauración de la diabetes mellitus.

Hay certeza de que la fibra dietética soluble contribuye a disminuir la concentración de glucosa e insulina en el suero posprandial tanto en los individuos sanos como en los que padecen de diabetes mellitus.

Entre los mecanismos propuestos para explicar el efecto beneficioso se encuentran:

- 1.- el aumento de la viscosidad del contenido de nutrientes en el intestino delgado, lo cual retarda la difusión de la glucosa hacia el borde ciliado de la mucosa intestinal.
- 2.- la unión de la glucosa a la fibra dietética y disminución de su disponibilidad para la absorción.
- 3.- inhibición de la acción de la amilasa sobre el almidón.

Todos los efectos anteriores provocan un retardo del vaciamiento gástrico que aumenta la saciedad en el individuo (Segundo et al., 2011).

Obesidad

La obesidad es un trastorno metabólico que se debe a un desequilibrio entre el aporte calórico de la dieta y su utilización. Su elevada incidencia en los países industrializados se debe a un aumento progresivo del consumo de grasas y azúcares refinados, significativamente mayor en las personas obesas, acompañado de una disminución de la ingesta de verdura y fruta, lo que condiciona un déficit de fibra en la dieta. Las únicas medidas para el tratamiento de la obesidad son la restricción calórica y el

ejercicio físico. En este sentido, la fibra ayuda a controlar la ingesta calórica por diversos mecanismos, entre los que destacan los siguientes (Gil, 2010):

- La fibra tiene una elevada capacidad para retener agua y un bajo poder energético, con lo que contribuye a disminuir la densidad calórica de la dieta.
- Los alimentos ricos en fibra requieren una masticación mayor y, por lo tanto, mayor tiempo para su ingestión. Esta mayor masticación, a la vez, estimula la secreción de saliva y jugo gástrico, que favorecen la sensación de saciedad.
- Se reduce la velocidad del vaciamiento gástrico y, como consecuencia, disminuye el hambre y se prolonga la sensación de saciedad.
- La fibra disminuye la absorción de ácidos grasos e hidratos de carbono en el intestino delgado, reduciendo el aporte calórico.
- La fibra aumenta el volumen fecal y corrige el estreñimiento que muchos pacientes sufren en el transcurso de las dietas de adelgazamiento.

Hipercolesterolemia

Estudios realizados tanto en pacientes con hipercolesterolemia como en sujetos sanos han mostrado que la fibra soluble (goma guar, pectina, salvado de avena) disminuyen los niveles séricos de colesterol. En cambio, la fibra insoluble (celulosa, lignina) es inactiva a este respecto.

Aunque el mecanismo de acción es poco conocido, se sabe que la fibra fija las sales biliares y aumenta su excreción, disminuyendo su disponibilidad para la digestión y la absorción de lípidos. Otras explicaciones incluyen el posible efecto de los AGCC originados durante la fermentación bacteriana de la fibra. En este sentido, se ha postulado que el propionato inhibe la síntesis de colesterol hepática (Hernández et al., 1999).

1.3. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En el reino vegetal podemos distinguir cuatro grandes grupos de compuestos fitoquímicos: sustancias fenólicas, sustancias terpénicas, sustancias azufradas y sustancias nitrogenadas (alcaloides). De estos cuatro grupos, son los tres primeros los que tienen mayor importancia como constituyentes de las frutas y hortalizas y los

alimentos derivados con relevancia en la alimentación humana y los polifenoles son los que se encuentran de forma general en todos los alimentos de origen vegetal (Tomás-Barberán, 2003).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, derivados de complejas rutas metabólicas de origen mixto (siquímico-acetato y acetato-mevalonato), y de reacciones enzimáticas como hidroxilaciones, metilaciones, acetilaciones y glicosilaciones (Palacios et al., 2004; Lapornik et al., 2005), y determinantes en la calidad sensorial y nutricional de las frutas y vegetales. Son comúnmente encontrados en las plantas comestibles y no comestibles, y, a ellos se les atribuyen múltiples efectos biológicos, incluyendo la capacidad antioxidante (Rice-Evans et al., 1996).

Tienen al menos un anillo aromático con un grupo hidroxilo (OH) como mínimo unido a él. Han sido identificados más de 8.000 metabolitos secundarios fenólicos de plantas y varían desde moléculas simples con un solo anillo aromático a moléculas fenólicas complejas con más de un anillo (Webb, 2007).

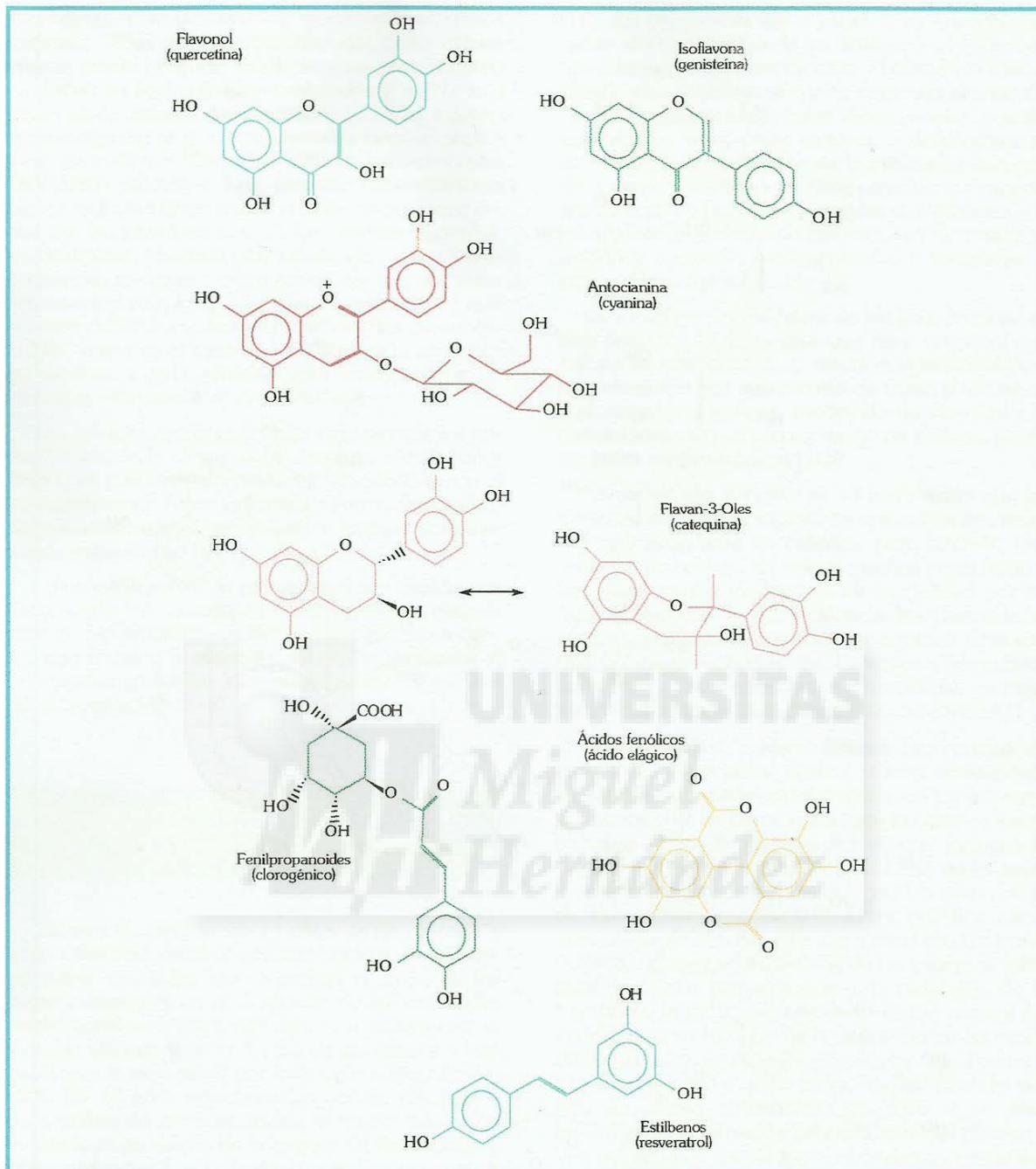
Las sustancias fenólicas o polifenoles constituyen un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas, desde algunas relativamente simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de relativamente elevada masa molecular, como los taninos hidrolizables y condensados.

Los polifenoles pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica (Tomás-Barberán, 2003).

- I. Flavonoides: son polifenoles que tiene dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Constituyen el mayor grupo de compuestos polifenólicos y se encuentran a menudo en la epidermis de hojas y frutas donde tienen papeles tales como la pigmentación, protección de la planta frente al daño producido por la luz ultravioleta y confieren resistencia a las enfermedades. Los flavonoides se subdividen en:

- Flavonoles tales como quercetina, kaenferol, isorhamnetina, luteolina y miricetina. Se encuentran en vegetales verdes, cebollas, manzanas, frutas de baya, té y vino tinto. Alrededor de un cuarto del peso del extracto de la hoja del *Ginkgo biloba* está compuesto por Flavonoles glucósidos (unidos a un residuo de azúcar), especialmente los tres primeros de los que se han mencionado anteriormente.
 - Flavonas que aunque no están extensamente distribuidas en plantas, se encuentran en el perejil, el tomillo y el apio.
 - Antocianinas que son los pigmentos responsables de la coloración roja, azul o púrpura de algunas flores y frutas como las uvas y las cerezas. Protegen de los daños producidos por la luz y pueden ayudar a atraer insectos polinizadores a las flores.
 - Flavononas están presentes en altas concentraciones en algunos frutos cítricos.
 - Isoflavonas presentes principalmente en las semillas de soja y otras legumbres.
 - Chalconas y dihidrochalconas.
 - Flavan-3-oles que van desde monómeros simples como las catequinas encontradas en el té verde, manzanas y albaricoques, hasta formas más complejas poliméricas llamadas proantocianidinas encontradas en manzanas, chocolate y vino tinto.
- II. Estilbenos: son polifenoles que tienen dos anillos aromáticos unidos por un puente de dos carbonos; son producidos por las plantas en respuesta al ataque por microbios patógenos. Un ejemplo de ellos sería el resveratrol (Webb, 2007; Tomás-Barberán, 2003).

En la figura 3 se pueden observar los principales grupos de compuestos polifenólicos presentes en plantas.



Fuente: Tomás-Barberán, (2003).

Figura 3. Principales grupos de compuestos polifenólicos presentes en plantas.

1.3.1. RADICALES LIBRES Y SU IMPLICACIÓN EN LA SALUD

Hoy en día los antioxidantes han ganado mucha importancia debido a su implicación positiva en la promoción de la salud.

Desde el punto de vista de la actividad biológica, muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere la actividad

antioxidante anteriormente mencionada, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer (Tomás-Barberán, 2003). Por ello, actualmente hay un gran interés en conocer la composición en polifenoles de los diferentes alimentos.

La estructura química de los compuestos polifenólicos es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado (Figura 4) (Pannala et al., 2001). La actividad antioxidante de los polifenoles depende, fundamentalmente, del número y la localización de los grupos hidroxilo que contiene en su estructura (Rice-Evans et al., 1996; Cao et al., 1997).

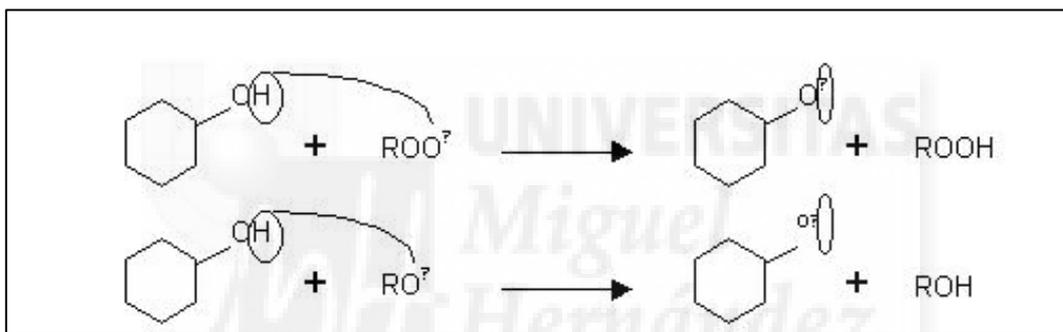


Figura 4. Esquema de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.

Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C6-C3-C6’), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenólicas. Los flavonoides se encuentran mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre (también llamados agliconas flavonoides) (Quiñones et al., 2012). Los flavonoides pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadoras de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} ; catalizar el transporte de electrones; y depurar radicales libres (Saskia et al., 1998). Todas estas acciones le aportan su capacidad antioxidante.

La caracterización del aporte de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante de los diferentes alimentos se ha convertido en una herramienta muy útil para la determinación de posibles propiedades saludables de los mismos.

1.4. MODELOS DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el diseño estructural de los sistemas portadores o “*carriers*” de componentes bioactivos adicionados a los alimentos basados en la encapsulación, protección y liberación de dichos componentes bioactivos para beneficiar la salud humana (McClements, Decker & Park, 2009). Estos sistemas portadores pueden ser diseñados para liberar los componentes bioactivos en una ubicación específica en el tracto gastrointestinal humano, a menudo en respuesta a un desencadenante ambiental como el pH, la fuerza iónica o la actividad enzimática. El sistema portador también puede ser diseñado para controlar la velocidad de liberación del compuesto bioactivo, ya que puede ser por liberación en cascada o liberación prolongada. La eficacia del desarrollo de nuevos sistemas portadores depende de la disponibilidad de los modelos de digestión que simulen con precisión las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas que se producen en el tracto gastrointestinal humano.

En los métodos de alimentación *In Vivo*, en los que se emplean animales o seres humanos, por lo general proporcionan resultados más exactos, pero precisan de mucho tiempo y dinero, por lo que se dedica mayor esfuerzo e interés a la elaboración de procedimientos *In Vitro* (Boisen y Eggum, 1991). En principio, los modelos de digestión *In Vitro* proporcionan una alternativa útil a modelos animales y humanos mediante el cribado rápido de ingredientes alimentarios. El método ideal de digestión *In Vitro* proporcionaría resultados precisos en poco tiempo (Coles, Moughan y Darragh, 2005) y por lo tanto podría servir como una herramienta para la detección rápida de alimentos o sistemas portadores con diferentes composiciones y estructuras. En la práctica, cualquier método *In Vitro*, inevitablemente no va a contar con la precisión que se puede lograr para el estudio de un alimento en un estudio *In Vivo* debido a la complejidad inherente del proceso (Coles et al., 2005; Fuller, 1991). En consecuencia, se necesita un cierto compromiso entre la precisión y la facilidad de utilización de

cualquier modelo de digestión *In Vitro*. Durante los últimos años, la comunidad científica han utilizado un número de modelos de digestión *In Vitro* para probar los cambios estructurales y químicos que se producen en diferentes alimentos en condiciones gastrointestinales simuladas, aunque ninguno de estos métodos ha sido ampliamente aceptado todavía.

1.4.1. Digestión In Vitro y enzimas

Varios factores, tales como las características de la muestra, la actividad enzimática, la composición iónica y los tiempos de digestión, tienen influencias significativas en los resultados de los métodos de digestión *In Vitro*. Por lo tanto, las condiciones *In Vivo* nunca se pueden simular bajo condiciones *In Vitro* (Boisen y Eggum, 1991). Un estudio realizado por Boisen y Eggum (1991) define la relación entre la digestión *In Vitro* y la actividad enzimática. Estos autores informaron que la técnica *In Vitro* puede ser diseñada para utilizar enzimas específicas, ya sea para dar valores de digestibilidad máximas o para medir la velocidad inicial de hidrólisis. El factor más importante en un sistema *In Vitro* en la digestión son las características de la enzima. Varios factores, tales como la concentración, temperatura, pH, estabilidad, activadores, inhibidores y los tiempos de incubación afectan a la actividad de las distintas enzimas (Boisen y Eggum, 1991). La elección de las enzimas y las condiciones de incubación y las necesidades del equipo también dependen de los objetivos del estudio (Boisen y Eggum, 1991). Los métodos en los que se emplea una sola enzima puede ser útil para predecir la digestibilidad de los nutrientes individuales, por ejemplo, proteínas mediante el uso de pepsina, almidón mediante el uso de amilasa, o los lípidos por el uso de lipasas (Boisen y Eggum, 1991).

Existen estudios en los que se indica que el uso de una única enzima purificada, en lugar de una mezcla biológica compleja, es a menudo ventajoso ya que facilita la normalización de los modelos de digestión *In Vitro*, lo que permite comparaciones más consistentes de laboratorio a laboratorio (Coles et al., 2005). Sin embargo, la digestión de un nutriente es a menudo influenciada por la digestión de otros nutrientes, por lo que a menudo es más realista utilizar una compleja mezcla de enzimas en lugar de una sola purificada (Boisen y Eggum, 1991).

1.4.2. Digestión *In Vitro* y condiciones de la muestra

Las características de los alimentos, el tipo de enzima y las concentraciones de enzimas son factores claves que controlan la digestión de los alimentos durante la digestión *In Vitro*. Abdel-Aal (2008) informó que las diferencias en la digestibilidad reflejan las influencias de enzimas proteolíticas, las condiciones de digestión así como el estado de las fuentes de proteínas (puro frente procesado). El aumento de la proteína en la dieta es inducida por un aumento de la secreción de enzimas proteolíticas pancreáticas, mientras que un aumento en la ingesta de almidón o de lípidos induce aumentos en las secreciones de amilasa y lipasa, respectivamente (Boisen y Eggum, 1991). Por lo tanto, las características de digestión *In Vitro*, tales como el tiempo de digestión, el contenido de la enzima o la composición de la enzima se deben ajustar de acuerdo con las características de la muestra. Por ejemplo, si la concentración de la sustancia diana (proteínas, lípidos o hidratos de carbono) se aumenta, entonces la concentración de enzimas o el tiempo de digestión se deben aumentar incluso si el resto del procedimiento de la digestión *In Vitro* se mantiene igual.

1.4.3. Digestión y tiempo de tránsito

El tiempo de digestión para cada etapa del proceso (por ejemplo, la boca, el estómago y el intestino delgado) es un factor importante para establecer un diseño adecuado de digestión *In Vitro*. En los procesos de digestión *In vivo*, el tiempo de digestión depende de las características individuales (edad, sexo, estado de salud, estado mental, la hora del día) y las propiedades de los alimentos (cantidad, composición, tamaño total de partículas), y puede variar considerablemente (McClements et al., 2009). Que el tránsito de un alimento en el intestino delgado sea corto puede limitar la absorción de compuestos bioactivos lipófilos, reduciendo así su biodisponibilidad (Dahan y Hoffman, 2008). Van Citters y Lin (1999) informaron que los lípidos en el tracto gastrointestinal retrasan el vaciado gástrico, es decir, se aumenta el tiempo de tránsito gástrico.

Por lo tanto, en el caso de análisis, en un sistema de digestión *In Vitro*, de muestras con alto contenido en sustancias lipídicas, la concentración de enzimas (lipasa o pancreatina) y sales biliares así como el tiempo de digestión debe aumentarse. En los modelos de digestión *In Vitro* no se suele tener en cuenta los fenómenos que ocurren

en el intestino grueso, ya que la absorción de los compuestos tiene lugar principalmente en el intestino delgado (Brandon et al., 2006). En el mismo sentido, Brandon et al. (2006) informaron de que sólo la bioaccesibilidad determinada en el quimo del intestino delgado es relevante para la evaluación del riesgo. En general, los lípidos no pueden ser fermentados, por lo tanto, los lípidos son menos influenciados durante el paso a través del intestino grueso. Por lo que, el tiempo de tránsito o tiempo de digestión debe ser más corto en muestras de alimentos a base de lípidos en los modelos de digestión *In Vitro*. Sin embargo, el tiempo de tránsito o tiempo de digestión se deben considerar de acuerdo con las características de los alimentos.

1.5. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Hasta ahora hay muy poca información de cuál es el comportamiento de los extractos ricos en fibra procedentes de los co-productos de las industrias agroalimentarias una vez que, tras ser incluidos como ingredientes potencialmente saludables, son ingeridos y sometidos al proceso de digestión; particularmente a su composición en compuestos bioactivos y sus propiedades antioxidantes.

Están ampliamente demostrados sus efectos en ensayos *In Vitro*, pero se desconocen sus propiedades cuando se someten a procesos en los que intervienen cambios bruscos de pH o la actividad de distintas enzimas.

Con este trabajo se pretende dar los primeros pasos para conocer de forma clara y concisa los cambios sufridos por estos compuestos ricos en componentes bioactivos durante el proceso biológico de la digestión.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo es analizar el efecto sobre las propiedades antioxidantes y el contenido en compuestos bioactivos presentes en dos extractos ricos en fibra obtenidos a partir de co-productos generados en la industria agroalimentaria, de un proceso de simulación de una digestión *In Vitro* para observar las diferencias entre cada una de estas fases.

2.2. Objetivos particulares

Para alcanzar dicho objetivo general se plantean los siguientes objetivos particulares:

- 1) Determinar el contenido en fenoles totales en las distintas etapas del proceso de digestión *In Vitro*.
- 2) Determinar el contenido en flavonoides totales en las distintas etapas del proceso de digestión *In Vitro*.
- 3) Evaluar las propiedades antioxidantes de los extractos obtenidos en las distintas etapas del proceso de digestión *In Vitro* mediante el empleo de distintos métodos antioxidantes como son DPPH, FIC, FRAP y TBARs, los cuales presentan diferentes mecanismos de acción antioxidante, como son la capacidad de secuestrar radicales libres, la capacidad de reducción de iones férricos, la capacidad quelante de iones ferrosos y la capacidad de detectar sustancias reactivas.
- 4) Evaluar la variación de los compuestos fenólicos, mediante cromatografía líquida de alta resolución, durante las diferentes etapas del proceso.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

El limón (*Citrus limon* (L.) Burm f.) y la chufa (*Cyperus esculentus* L.) se obtuvieron como co-productos durante los procesos de extracción de zumo o de horchata respectivamente. Los extractos ricos en fibra sometidos a estudio se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Viuda-Martos et al., (2013).

3.2. SIMULACIÓN DE UN SISTEMA DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

La digestión *In Vitro* de las muestras se realizó de acuerdo con el método descrito por Mills et al. (2008) con algunas modificaciones. Esta metodología está basada en el empleo de distintas enzimas y la absorción de los componentes a través de tubos de diálisis. Esta metodología reproduce tres etapas distintas de la digestión: la masticación, la fase gástrica y la fase intestinal. La masticación se simuló usando una solución de saliva preparada con 100 U/mL α -amilasa (Sigma, Alemania) la cual se diluyó en CaCl_2 (1 mM), el pH se ajustó a un valor de 6,9 mediante el empleo de NaHCO_3 (1 M). La saliva simulada (1 mL) se añadió a 2,4 g de la muestra y 9 mL de agua. Esta solución se incubó a 37 °C durante 5 min. En las condiciones gástricas, el pH se ajustó hasta un valor de 2 con HCl (6 M) y luego se añadió 1 mL de pepsina (Sigma) (0,108 g) disuelto en HCl (0,1 M; 10 mL) y se incubó durante 2 h en un baño de agua con agitación a 37 °C y 50 rpm. En las condiciones del intestino delgado, el pH se ajustó a 7 con NaOH (6 M) y se añadieron 2,5 mL de pancreatina (Sigma) (80 mg) disuelta en NaHCO_3 (0,5 M; 10 ml) y 2,5 mL de mezcla de sales biliares (Sigma) (500 mg) disueltas en NaHCO_3 (0,5 M; 10 ml) y se continuó la incubación durante otras 2 h en un baño de agua con agitación a 37 °C y 50 rpm. Después de este tiempo, la solución de la muestra se transfirió a un tubo de diálisis de corte de 3 kDa de peso molecular y se dializó durante 12 horas en una disolución de NaCl (10 mM) a 37 °C para eliminar los productos de digestión de bajo peso molecular. La agitación mecánica de la muestra se empleó para simular los movimientos peristálticos del intestino. Al final de las fases de boca, estómago, intestino (antes de la diálisis) y diálisis, las mezclas de la digestión se centrifugaron durante 10 min a 11000 rpm a 4 °C, produciendo una fracción soluble de quimo (FSQ) y una fracción de sedimento (FS). Ambas fracciones se liofilizaron y se

almacenaron para el análisis cromatográfico de la composición de fenoles y actividad antioxidante.

Todas las soluciones se prepararon con enzimas recién preparadas y esterilizadas por filtración utilizando un filtro de 0,22 μm (Millipore, BillericaMA, EE.UU.) antes de su uso.

3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.3.1. Preparación de los extractos

Para la preparación de los extractos que serán empleados en la determinación de las propiedades antioxidantes, las muestras liofilizadas fueron disueltas en metanol en una concentración comprendida entre 7,4 y 100 mg/mL. Esta mezcla fue sometida a un proceso de extracción en un baño de ultrasonidos durante 20 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min a 10 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante obtenido fue el que se utilizó para realizar todas las determinaciones de este trabajo.

3.3.2. Actividad antioxidante utilizando el radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos sobre el radical DPPH se debe a su capacidad para donar hidrógenos o a la actividad secuestrante de radicales. DPPH es un radical libre estable y que acepta un electrón o radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable (Brand-Williams et al., 1995). Para la determinación de la actividad antioxidante, 100 μL de los diferentes extractos obtenidos se mezclaron con 2 mL de una solución metanólica 0,06 mM de DPPH. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 2 min y se colocaron en la oscuridad durante 15 min. La absorbancia medida a 517 nm se determinó con un espectrofotómetro HP 8451 (Hewell Packard). Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox. Los resultados se expresaron como μg de equivalentes de Trolox (TE) por gramo de muestra ($\mu\text{g TE/g}$ muestra) como valor medio de dos repeticiones. En total el número de muestras analizadas fue de 36.

3.3.3. Poder antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP)

Este método se basa en la evaluación de la capacidad de las muestras para reducir el ión férrico. Para ello se utiliza un cromóforo (la ferricianida). El poder antioxidante por reducción del ión férrico de los distintos extractos obtenidos se determinó siguiendo el método descrito por Oyaizu (1986). Para ello, se mezcló 1 mL de los distintos extractos con 2,5 mL de tampón fosfato (0.2 M; pH 6.6) y 2,5 mL ferricianuro de potasio (1%). Las mezclas fueron incubadas durante 20 min a 50 °C, después se añadió 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%). Una alícuota de la mezcla anteriormente formada se mezcló con 2,5 mL de agua destilada y 0,5 mL FeCl₃ (0,1%). Se midió la absorbancia a 700 nm con un espectrofotómetro HP 8451 (Hewell Packard). Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de Trolox por gramo de muestra (mg TE/g muestra) como valor medio de dos repeticiones. En total el número de muestras analizadas fue de 36.

3.3.4. Capacidad quelante del ión ferroso (FIC)

La actividad quelante del ión ferroso (Fe²⁺) se midió inhibiendo la formación del complejo ferrocina-Fe²⁺ siguiendo el método de Carter (1971) con algunas modificaciones. Se mezcló 1 mL del extracto de las distintas muestras sometidas a estudio con 0,1 mL de FeCl₂·4 H₂O (2 mM) y 3,7 mL de metanol. Tras 5 min de incubación la reacción se inició por la adición de 0,2 mL de ferrocina (5 mM). Se agitó la mezcla vigorosamente y después de otros 10 min de incubación se midió la absorbancia a 562 nm con un espectrofotómetro HP 8451 (Hewell Packard). Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los resultados se expresaron como µg de equivalentes de EDTA por gramo de muestra (µg EDTA/g muestra) como valor medio de dos repeticiones. En total el número de muestras analizadas fue de 36.

3.3.5. Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Para detectar las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs), un producto secundario de la peroxidación lipídica, se utilizó el método descrito por Daker et al. (2008). Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de Trolox por gramo de muestra (mg TE/g muestra) como valor medio de dos repeticiones. En total el número de muestras analizadas fue de 36.

3.4. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT)

La determinación del CFT se realizó usando el reactivo colorimétrico Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965). Un volumen de 0,3 mL de las muestras extraídas fue introducido en tubos de ensayo con 2,5 mL del reactivo colorimétrico de Folin-Ciocalteu (diluido 10 veces con agua) y 2 mL de carbonato de sodio (7,5% p/v). Los tubos fueron agitados en el vórtex, tapados con parafilm e incubados a 50 °C durante 5 min. Se midió la absorbancia a 760 nm con un espectrofotómetro HP 8451 (Hewlett Packard) y fue comparada con una curva de calibración del ácido gálico. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (AGE) por gramo de muestra (mg AGE/g muestra). Se realizaron dos repeticiones por cada muestra analizada. En total el número de muestras analizadas fue de 36.

3.5. CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (CFIT)

Para la determinación del CFIT se usó el método descrito por Blasa et al. (2005), con algunas modificaciones. Se mezcló 1 mL de las muestras con 0,3 mL de NaNO₂ (5%) y transcurridos 5 min se adicionaron 0,3 mL de AlCl₃ (10%). Esta mezcla fue neutralizada con 2 mL de una solución de NaOH 1M. Se midió la absorbancia de todas las muestras a 510 nm con un espectrofotómetro HP 8451 (Hewlett Packard) y se cuantificó la concentración de las muestras con la curva de calibración de diferentes concentraciones de rutina. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de rutina (RE) por g de muestra (mg RE/g muestra). Se realizaron dos repeticiones por cada muestra analizada. En total el número de muestras analizadas fue de 36.

3.6. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La cuantificación e identificación de compuestos fenólicos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Hewlett Packard HP-1100 (Woldbronn, Alemania) siguiendo las indicaciones de Benavente et al. (1999). Los productos de naturaleza fenólica se identificaron mediante comparación del tiempo de retención y su correspondiente espectro de absorción visible-ultravioleta (V/UV) con tiempo de retención y espectro de absorción de los compuestos utilizados como estándares.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La metodología estadística se diseñó para cada uno de los estudios a analizar. La totalidad de los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA) utilizando el programa Analysis of Variance.

Para la determinación de la media y la desviación estándar se siguieron métodos estadísticos convencionales. El análisis estadístico empleado en cada ensayo fue la aplicación de un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores. Para estudiar entre qué variables de los factores principales las diferencias fueron estadísticamente significativas se realizaron contrastes entre las medias, aplicando el test de Tukey.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONTENIDO EN FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES

El proceso de extracción de compuestos fenólicos en diferentes matrices está influenciado por su naturaleza química, el método empleado y la presencia de sustancias que pueden interferir con los compuestos bioactivos (Sotelo et al., 2010).

En la Tabla 5 se pueden observar los valores obtenidos en el contenido de fenoles totales y en el contenido de flavonoides totales de los extractos estudiados durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In Vitro*.

En cuanto a la medida del contenido en fenoles totales, para el extracto de limón, la muestra control presenta un valor de 24,16 mg AGE/g muestra, pero como se observa, el proceso digestivo provoca en la fracción sólida (FS) un descenso en los valores de fenoles totales ($p < 0,05$).

Tabla 5. Valores obtenidos en el contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos estudiados durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In Vitro*.

	Contenido Fenoles Totales (CFT) [§]		Contenido Flavonoides Totales (CFIT) [¶]		
	FS	FSQ	FS	FSQ	
Limón	Control	24,16±1,18 ^{aE}	---	11,04±0,25 ^a	---
	Fase Boca	9,94±1,43 ^{bBK}	32,63±1,40 ^{cA}	9,19±0,39 ^{bB}	31,10±0,23 ^{aA}
	Fase Estómago	10,46±0,85 ^{bB}	55,70±2,08 ^{aA}	10,38±0,49 ^{aB}	23,68±0,64 ^{bA}
	Fase Intestino	11,66±2,04 ^{bB}	18,80±1,03 ^{dA}	7,38±0,21 ^{cB}	17,36±0,44 ^{dA}
	Después Diálisis	11,07±0,38 ^{bB}	44,78±1,40 ^{bA}	6,93±0,00 ^{dB}	22,15±0,10 ^{cA}
Chufa	Control	3,96±2,61 ^a	---	2,24±0,32 ^{cd}	---
	Fase Boca	4,00±4,54 ^{aB}	13,63±2,24 ^{aA}	1,81±0,04 ^{dB}	10,68±0,48 ^{cA}
	Fase Estómago	1,20±0,21 ^{bB}	7,12±0,80 ^{cA}	2,48±0,07 ^{cB}	5,32±0,00 ^{dA}
	Fase Intestino	1,90±0,83 ^{bB}	11,85±1,11 ^{abA}	8,73±0,71 ^{bB}	22,59±0,75 ^{bA}
	Después Diálisis	1,39±0,33 ^{bB}	9,28±1,32 ^{bA}	12,63±0,99 ^{aB}	47,80±1,21 ^{aA}

[§]CFT: expresado en mg Ácido Gálico equivalente/g

[¶]CFIT: expresado en mg Rutina equivalente/g

^KPara un mismo extracto, y una misma determinación. Valores seguidos de la misma letra mayúscula dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en el test de rangos múltiples de Tukey.

^EPara un mismo extracto, y una misma fracción. Valores seguidos de la misma letra minúscula dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en el test de rangos múltiples de Tukey.

Tras la fase de digestión realizada en la boca el descenso en el CFT fue del 58,85%. En el estómago el descenso en relación al control fue de 56,70%, es decir, se incrementó el contenido con respecto a los obtenidos en la boca. Esto podría ser debido al efecto, por un lado, del pH ácido del estómago o, por otro lado, al efecto de las enzimas que pueden romper algunas estructuras y liberar compuestos fenólicos. En el intestino se incrementa el CFT con respecto a los presentes en el estómago pasando de valores de 10,46 a 11,66 mg AGE/g muestra aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$). Al igual que ocurre en el estómago, el efecto de las enzimas podría ser el causante de este incremento. Tras el proceso de diálisis, el contenido en fenoles totales disminuye pasando de valores de 11,66 a 11,07 mg AGE/g muestra lo que indica una absorción de 0,59 mg de compuestos fenólicos por cada gramo de extracto.

En cuanto al CFT de la fracción soluble (FSQ) obtenida del extracto de limón, en la boca se obtiene una concentración de fenoles totales de 32,63 mg AGE/g muestra. Este valor procede de la solubilización de los compuestos fenólicos presentes en el extracto sólido influenciado también por la acción de la enzima α -amilasa ya que la suma total de los compuestos fenólicos de la fracción sólida y la fracción líquida es superior a la que presenta la muestra control. En el estómago el contenido en fenoles totales aumenta pasando de un valor de 32,63 a 55,70 mg AGE/g muestra lo cual podría ser debido como ya hemos mencionado anteriormente al efecto del pH o al efecto de las enzimas. En el intestino hay una gran diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$) en el contenido con respecto al presente en el estómago pasando de valores de 55,70 a 18,80 mg AGE/g muestra debido posiblemente al cambio de pH 2 del estómago a pH 7 del intestino. Por último, después del proceso de diálisis, el CFT aumenta pasando de valores de 18,80 a 44,78 mg AGE/g muestra, probablemente porque los compuestos fenólicos todavía se encuentran en disolución.

Por otro lado, en relación a la medida del contenido en fenoles totales para el extracto de chufa en la fracción sólida, la muestra control presenta un valor de 3,96 mg AGE/g muestra. Y, al igual que en el extracto de limón, el proceso de digestión provoca un descenso en los valores de fenoles totales, aunque, en este caso, en la boca dicho valor aumenta hasta 4 mg AGE/g muestra pero no existen diferencias estadísticamente

significativas ($p > 0,05$). En el estómago el descenso con respecto al control fue del 69,70% de modo que aquí si existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), debido posiblemente a la presencia del pH ácido en esta fase. En el intestino el CFT se incrementa en relación a los presentes en el estómago pasando de valores de 1,20 a 1,90 mg AGE/g muestra aunque no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Esto podría ser debido al efecto de las enzimas que, como ya hemos mencionado anteriormente, pueden romper algunas estructuras y liberar compuestos fenólicos. Finalizado el proceso de diálisis, el CFT disminuye pasando de valores de 1,90 a 1,39 mg AGE/g muestra aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Esta disminución demuestra una absorción de 0,51 mg AGE/g muestra de compuestos fenólicos por cada gramo de muestra obtenido.

En la medida del CFT de la fracción soluble obtenida del extracto de chufa, en la boca se puede observar un contenido en fenoles totales de 13,63 mg AGE/g muestra procedente de la solubilización de los compuestos fenólicos presentes en el extracto sólido influenciado por la acción de la enzima α -amilasa al igual que ocurría en la fracción soluble del extracto de limón. En el estómago el contenido en fenoles totales disminuye pasando de un valor de 13,63 a 7,12 mg AGE/g muestra, por tanto, entre la fase de boca y estómago existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Esto podría ser debido al efecto del pH. En el intestino también se muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el contenido de CFT con respecto al presente en el estómago pasando de valores de 7,12 a 11,85 mg AGE/g muestra debido posiblemente al cambio de pH 2 del estómago a pH 7 del intestino. Aunque si comparamos estos valores con los presentes en la boca esta diferencia estadísticamente significativa desaparece ($p > 0,05$). Después del proceso de diálisis, el CFT disminuye pasando de valores de 11,85 a 9,28 mg AGE/g muestra por lo que se obtiene una absorción de 2,57 mg de compuestos fenólicos por cada gramo de extracto.

Pasando a la medida del CFIT, para la fracción sólida del extracto de limón, la muestra control presenta un valor de 11,04 mg RE/g muestra. El proceso digestivo provoca en la fracción sólida un descenso en los valores de flavonoides totales ($p < 0,05$).

Después de la fase de digestión realizada en la boca el descenso en el CFIT fue del 16,76%. En el estómago este descenso con respecto al control fue de 5,98%, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Esto indica que se incrementó el contenido de flavonoides totales con respecto a los obtenidos en la boca, debido posiblemente al efecto del pH ácido del estómago o al efecto de las enzimas que pueden romper algunas estructuras y liberar compuestos fenólicos. En el intestino el CFIT también disminuye un 33,15% con respecto a los valores que presenta la muestra control mostrando, esta vez sí, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El cambio de pH de una fase a otra, pasando de 2 a 7, podría ser la causa de esta disminución. Por último, tras el proceso de diálisis, el contenido en flavonoides totales disminuye en un 37,22% con respecto al control, pasando de valores de 7,38 (fase intestino) a 6,93 mg RE/g muestra lo que indica una absorción de 0,45 mg de compuestos fenólicos por cada gramo de extracto.

Por otro parte, en relación a esta misma medida del contenido en flavonoides totales, para el extracto de chufa en la fracción sólida la muestra control presenta un valor de 2,24 mg RE/g muestra. A diferencia de lo ocurría en el extracto de limón, en este caso el proceso de digestión provoca primeramente un descenso en los valores de flavonoides totales, pero, a continuación, cuando llega al intestino, estos valores aumentan. De modo que, en la boca el CFIT disminuye en un 19,20% produciéndose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en relación al valor obtenido en la muestra control. En el estómago esta disminución con respecto al control corresponde a un 10,71%, por lo que se produjo un incremento en el contenido de flavonoides totales en comparación con los obtenidos en la boca, causado posiblemente por el cambio de pH o la actuación de las enzimas. En el intestino el CFIT se incrementa en relación a los presentes en el estómago pasando de valores de 2,48 a 8,73 mg RE/g muestra existiendo así una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Esto podría ser debido a la liberación de compuestos fenólicos al medio por la acción de las enzimas. Al igual que pasa en el intestino, tras el proceso de diálisis, el CFIT vuelve a aumentar pasando de valores de 8,73 a 12,63 mg RE/g muestra mostrando también aquí diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) y, por

tanto, siendo en esta fase donde se obtuvo el mayor contenido en flavonoides totales en el extracto de la fracción sólida de chufa.

En cuanto al CFIT de la fracción soluble obtenida del extracto de limón, en la boca se obtiene una concentración de fenoles totales de 31,10 mg RE/g muestra. Este valor procede de la solubilización de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de la fracción sólida influenciado también por la acción de la enzima α -amilasa ya que la suma total de los compuestos fenólicos de la fracción sólida y la fracción líquida es superior a la que presenta la muestra control. En el estómago el contenido en flavonoides totales disminuye pasando de un valor de 31,10 a 23,68 mg RE/g muestra, por tanto, entre la fase de boca y estómago existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) que podría ser debido al efecto del pH ácido presente en el estómago. En el intestino vuelve a ver un descenso en el contenido pasando de valores de 23,68 a 17,36 mg RE/g muestra y produciendo de nuevo otra diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el contenido con respecto al presente en el estómago debido posiblemente al cambio de pH 2 del estómago a pH 7 del intestino. En el proceso de diálisis, el CFIT aumenta con respecto a los del intestino pasando de valores de 17,36 a 22,15 mg RE/g muestra, probablemente porque los compuestos fenólicos todavía se encuentren en disolución.

Para finalizar, en la medida del CFIT de la fracción soluble obtenida del extracto de chufa, en la boca se puede observar un contenido en flavonoides totales de 10,68 mg RE/g muestra procedente, como ya hemos mencionado anteriormente, de la solubilización de los compuestos fenólicos presentes en el extracto sólido influenciado por la acción de la enzima α -amilasa. En el estómago el contenido en flavonoides totales disminuye pasando de un valor de 10,68 a 5,32 mg RE/g muestra, por tanto, entre la fase de boca y estómago existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Esto podría ser debido al efecto del pH. En el intestino el contenido con respecto al presente en el estómago pasa de valores de 5,32 a 22,59 mg RE/g muestra con lo que presenta una gran diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) debido posiblemente al cambio de pH entre ambas fases. Por último, tras el proceso de diálisis, el CFIT se ve aumentado pasando de valores de 22,59 a 47,80 mg RE/g muestra

provocando de nuevo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Esto podría ser porque los compuestos fenólicos todavía se encuentran en disolución.

Como observación general, al comparar los valores obtenidos de ambos extractos, podemos observar que los extractos de limón presentan un mayor contenido tanto en fenoles como en flavonoides totales que los extractos de chufa.

4.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay métodos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, el sustrato empleado, la medida del punto final, la técnica instrumental utilizada y las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. Además, los objetivos de los diferentes métodos de medida son diversos. Por ello, a la hora de abordar el estudio de la actividad antioxidante de un alimento es aconsejable emplear varios métodos, ya que cada uno ofrece información diferente. Hay compuestos antioxidantes que no reaccionan con determinadas especies oxidantes y sí con otras, pudiéndose obtener así valores dispares entre los distintos métodos.

En este trabajo se han seleccionado cuatro métodos de análisis *In Vitro* diferentes para tratar de caracterizar la capacidad antioxidante de los extractos de chufa y de limón: dos de ellos se basan en la transferencia de electrones, determinada en un caso mediante la capacidad secuestrante de radicales libres (método de secuestro del radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)), y en el otro mediante la reducción del complejo ferricianida- Fe^{3+} a ferricianida- Fe^{2+} (método de reducción del ión férrico (FRAP)). El tercero se basa en la capacidad quelante de compuestos pro-oxidantes (método de la capacidad quelante del ión ferroso (FIC)) y, por último, el cuarto se trata de detectar sustancias reactivas que reaccionan al emplear ácido tiobarbitúrico (ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)).

El hierro se considera como el pro-oxidante más importante de la oxidación lipídica debido a su alta reactividad. En su estado ferroso (Fe^{2+}) acelera la oxidación lipídica por reaccionar con el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos originando radicales libres vía la reacción de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$). Los agentes quelantes inactivan los iones metálicos inhibiendo el proceso metal-dependiente. La ferrozina puede formar complejos con el Fe^{2+} que son de color rojo. En presencia de otros agentes quelantes, este complejo se rompe con la consiguiente disminución del color rojo. La medida del ritmo de dicha disminución permite estimar la actividad quelante de la muestra.

En la Tabla 6 se pueden observar los valores obtenidos tanto para el método FIC como para el FRAP de los extractos estudiados durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In Vitro*.

Para el método FIC del extracto de limón, la fracción sólida de la muestra control presenta un valor de 0,28 mg EDTAE/g muestra. En esta fracción el proceso de digestión provoca un aumento ($p < 0,05$) en los valores de la capacidad quelante del ión ferroso la cual confiere actividad antioxidante.

En primer lugar, tras la digestión realizada en la boca, el aumento ($p < 0,05$) de dicha capacidad fue del 7,14%. En el estómago este aumento ($p < 0,05$) con respecto a la muestra control fue del 42,86%. Esto puede ser debido a la acción de las enzimas que rompen algunas estructuras y liberan compuestos fenólicos los cuales confieren actividad antioxidante en el medio donde se encuentren. En el intestino todavía se incrementó mucho más la actividad siendo en esta fase donde se obtuvo el valor más alto con un incremento del 72% con respecto al control mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Al igual que ocurría en el estómago, este incremento podría ser debido a la acción de las enzimas. Tras el proceso de diálisis, la capacidad quelante disminuye pasando de un valor de 1 a 0,78 mg EDTAE/g muestra, lo cual quiere decir que se ha producido una absorción de 0,22 mg EDTAE/g muestra de los compuestos responsables de esta actividad.

Tabla 6. Valores obtenidos de los métodos FIC y FRAP de los extractos estudiados durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In Vitro*.

	Capacidad quelante ión ferroso (FIC) [‡]		Poder antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP) [*]		
	FS	FSQ	FS	FSQ	
Limón	Control	0,28±0,01 ^{e‡}	---	20,11±0,42 ^a	---
	Fase Boca	0,30±0,00 ^{dBK}	1,20±0,03 ^{bA}	12,25±0,73 ^{bB}	56,33±0,58 ^{aA}
	Fase Estómago	0,40±0,00 ^{cB}	0,64±0,02 ^{dA}	18,63±1,27 ^{aB}	56,16±2,86 ^{aA}
	Fase Intestino	1,00±0,00 ^{aB}	0,80±0,00 ^{cA}	11,19±0,40 ^{bB}	28,17±0,67 ^{cA}
	Después Diálisis	0,78±0,01 ^{bB}	1,34±0,00 ^{aA}	7,50±0,98 ^{cB}	32,62±1,51 ^{bA}
Chufa	Control	0,30±0,00 ^d	---	2,32±0,09 ^{bB}	---
	Fase Boca	0,31±0,00 ^{cB}	5,18±0,07 ^{aA}	1,70±0,06 ^{dB}	34,75±1,23 ^{aA}
	Fase Estómago	0,18±0,03 ^{eB}	0,37±0,57 ^{dA}	2,73±0,11 ^{aB}	15,22±0,38 ^{bA}
	Fase Intestino	1,01±0,00 ^{aB}	1,09±0,00 ^{cA}	2,55±0,15 ^{abB}	9,89±0,35 ^{cA}
	Después Diálisis	0,65±0,04 ^{bB}	1,52±0,01 ^{bA}	1,99±0,07 ^{cB}	8,42±0,09 ^{dA}

[‡]FIC: expresado en mg EDTA equivalente/g muestra

^{*}FRAP: expresado en mg Trolox equivalente/g muestra

^KPara un mismo extracto, y una misma determinación. Valores seguidos de la misma letra mayúscula dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en el test de rangos múltiples de Tukey.

[‡]Para un mismo extracto, y una misma fracción. Valores seguidos de la misma letra minúscula dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en el test de rangos múltiples de Tukey.

En cuanto a la capacidad quelante del ión ferroso obtenida en la fracción soluble del extracto de limón, en la boca se obtiene un valor de 1,20 mg EDTAE/g muestra que corresponde a la solubilización de los agentes quelantes en el extracto sólido debido probablemente a la acción de la enzima α -amilasa ya que la suma total de dichos agentes de la FS y de la FSQ es superior al valor que presenta la muestra control.

En el estómago disminuye la capacidad quelante pasando de unos valores de 1,20 a 0,64 mg EDTAE/g muestra, por lo que, entre la fase de boca y estómago existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Esto podría ser debido al efecto del pH ácido que posee el estómago. Sin embargo, en el intestino la capacidad quelante aumenta pasando de un valor de 0,64 a 0,80 mg EDTAE/g muestra, lo cual podría ser debido al cambio de pH entre fases y, por tanto, ayuda a que los agentes con actividad quelante estén más biodisponibles y actúen de forma correcta incrementando su actividad. Por último, finalizado el proceso de diálisis, se produce otro aumento al igual que en el intestino pero con un valor más elevado, pasando de valores de 0,80 a 1,34 mg EDTAE/g muestra obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al intestino.

Por otro lado, en relación a la medida de la capacidad quelante del ión ferroso para el extracto de chufa en la fracción sólida, la muestra control presenta un valor de 0,30 mg EDTAE/g muestra. En este caso, el proceso de digestión provoca una variación irregular en los valores de esta capacidad quelante en cada una de las fases, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en todas ellas. En la boca el valor de la capacidad quelante aumentó ($p < 0,05$) en un 3,33% con respecto al control. En el estómago, sin embargo, se produjo un descenso ($p < 0,05$) con respecto al control del 40%, debido posiblemente al efecto del pH ácido. En el intestino la capacidad quelante del ión ferroso volvió a aumentar notablemente sus valores ($p > 0,05$) en relación a los presentes en el estómago pasando de valores de 0,18 a 1,01 mg EDTAE/g muestra. Esto podría ser debido al efecto de las enzimas que, mencionado anteriormente. Después del proceso de diálisis, la capacidad quelante disminuye nuevamente pasando de valores de 1,01 a 0,65 mg EDTAE/g muestra. Esta disminución indica una absorción de 0,36 mg EDTAE/g muestra de compuestos con actividad quelante por cada gramo de muestra obtenido.

Para su medida en la fracción soluble del extracto de chufa, en la boca se obtuvo un valor de 5,18 mg EDTAE/g muestra, siendo este el valor más alto de actividad antioxidante obtenido en el método FIC. Al igual que ocurría en el extracto de limón, esta cantidad de capacidad quelante del ión ferroso corresponde a la solubilización de los agentes quelantes en el extracto sólido. En el estómago este valor disminuye drásticamente ($p < 0,05$) pasando de 5,18 a 0,37 mg EDTAE/g muestra. A continuación, en el intestino, la capacidad quelante aumenta ($p < 0,05$) pasando de unos valores de 0,37 a 1,09 mg EDTAE/g muestra. En ambos casos, el causante tanto de la disminución como del aumento de la capacidad quelante del ión ferroso podría deberse al efecto del pH ya que este varía entre una fase y otra. Finalmente, una vez realizado el proceso de diálisis, los valores de dicha capacidad aumentan de nuevo ($p < 0,05$) pasando de 1,09 a 1,52 mg EDTAE/g muestra. Esto podría ser porque los compuestos con actividad quelante todavía se encuentran en disolución.

En cuanto al método FRAP, mediante el cual se obtiene poder antioxidante por reducción del ión férrico, para el extracto de limón la muestra control presenta un valor de 20,11 mg TE/g muestra. El proceso digestivo provoca, en la fracción sólida, un descenso ($p < 0,05$) en los valores de poder antioxidante. Tras la fase de digestión realizada en la boca, el descenso en el poder antioxidante fue del 39,1%. En el estómago este descenso con respecto al control fue de 7,36%, es decir, se incrementó el poder antioxidante con respecto a los obtenidos en la boca. Esto podría ser debido al efecto del pH ácido del estómago o al efecto de las enzimas que rompen algunas estructuras y liberan compuestos fenólicos aumentando así el poder antioxidante. A continuación, en el intestino el poder antioxidante disminuye en un 44,36% con respecto al control. Al igual que ocurría en el estómago, el efecto de las enzimas podría ser el causante de esta disminución. Finalizado el proceso de diálisis, el poder antioxidante disminuye en un 62,7% con respecto al control y pasando de unos valores de 11,19 (obtenidos en el intestino) a 7,50 mg TE/g muestra, lo que indica una absorción de 3,69 mg TE/g muestra de los agentes reductores que a su vez provoca una disminución del poder antioxidante.

Por otro lado, en relación a la medida del poder antioxidante del ión férrico para el extracto de chufa en la fracción sólida, la muestra control presenta un valor de 2,32 mg TE/g muestra. En este caso, el proceso de digestión provoca una variación irregular en los valores del poder antioxidante en cada una de las fases. En la boca el valor del poder antioxidante disminuye ($p < 0,05$) en un 26,72% con respecto al control. En el estómago, sin embargo, se produjo un aumento ($p < 0,05$) con respecto al control del 17,67%, debido posiblemente al efecto del pH ácido o al efecto de las enzimas. En el intestino el poder antioxidante disminuyó sus valores en relación a los presentes en el estómago pasando de valores de 2,73 a 2,55 mg TE/g muestra, pero con respecto al control sus valores aumentaron en un 9,91%, aunque en ambos casos no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Después del proceso de diálisis, el poder antioxidante disminuye ($p < 0,05$) pasando de valores de 2,55 a 1,99 mg TE/g muestra. Esta disminución indica una absorción de 0,56 mg TE/g muestra de los compuestos con poder reductor por cada gramo de muestra obtenido.

Para su medida en la fracción soluble del extracto de limón, en la boca se obtuvo un valor de 56,33 mg TE/g muestra, siendo este el valor más alto de poder antioxidante obtenido en el método FRAP. Esta cantidad de poder antioxidante por reducción del ión férrico corresponde a la solubilización de los agentes reductores en el extracto sólido. En el estómago este valor disminuye pasando de 56,33 a 56,16 mg TE/g muestra, aunque no se muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). A continuación, en el intestino, el poder antioxidante disminuye ($p < 0,05$) pasando de unos valores de 56,16 a 28,17 mg TE/g muestra. En ambos casos, el causante de la disminución podría deberse al efecto del pH ya que este varía entre una fase y otra. Tras el proceso de diálisis, los valores del poder antioxidante aumentan de nuevo ($p < 0,05$) pasando de 28,17 a 32,62 mg TE/g muestra. Esto podría ser porque los compuestos con actividad reductora todavía se encuentran en disolución.

Para la fracción soluble del extracto de chufa, tras la digestión en la boca se obtuvo un valor de 34,75 mg TE/g muestra. Seguidamente, en el intestino el valor del poder antioxidante disminuyó ($p < 0,05$) pasando de 34,75 a 15,22 mg TE/g muestra, lo cual podría deberse al efecto del pH ácido del estómago. En el intestino los valores volvieron a disminuir ($p < 0,05$) pasando de 15,22 a 9,89 mg TE/g muestra. Esto podría ser debido al cambio de pH 2 a pH 7. Por último, después del proceso de diálisis, el poder antioxidante disminuyó ($p < 0,05$) pasando de unos valores de 9,89 a 8,42 mg TE/g muestra, lo que indica una absorción de 1,47 mg TE/g muestra de los compuestos con actividad reductora por cada gramo de muestra.

Siguiendo con los resultados obtenidos en los métodos utilizados para determinar la actividad antioxidante, en la Tabla 7 se muestran los valores obtenidos en el método DPPH y TBARs de los extractos estudiados durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In Vitro*.

Para la medida de la actividad antioxidante en el método DPPH del extracto de limón, la muestra control presenta un valor de 3,07 mg TE/g muestra. Al contrario que ocurría en el método FIC, el proceso de digestión provoca, en la fracción sólida, una disminución ($p < 0,05$) en los valores de la actividad antioxidante.

Tabla 7. Valores obtenidos de los métodos DPPH y TBARS de los extractos estudiados durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In Vitro*.

	DPPH [‡]		TBARS ^λ	
	FS	FSQ	FS	FSQ
Limón				
Control	3,07±0,57 ^{ae}	---	3,13±0,08 ^b	---
Fase Boca	0,85±0,21 ^{cb*}	4,82±2,02 ^{bcA}	3,45±0,29 ^{bb}	11,72±1,63 ^{aA}
Fase Estómago	0,37±0,35 ^{cdB}	2,93±0,28 ^{ca}	6,62±0,13 ^{ab}	9,38±0,79 ^{aA}
Fase Intestino	1,41±0,17 ^{bb}	4,73±0,22 ^{ba}	6,79±0,46 ^{ab}	5,05±0,15 ^{ca}
Después Diálisis	0,24±0,27 ^{dB}	7,11±0,64 ^{aA}	6,01±0,32 ^{ab}	7,61±0,28 ^{ba}
Chufa				
Control	0,0	---	2,89±0,78 ^b	---
Fase Boca	0,0	0,0	4,35±0,71 ^{bb}	47,73±0,71 ^{aA}
Fase Estómago	0,0	0,0	6,53±0,58 ^{ab}	12,61±0,03 ^{ba}
Fase Intestino	0,0	0,0	6,11±0,18 ^{ab}	6,79±0,04 ^{da}
Después Diálisis	0,0	0,0	6,65±0,68 ^{ab}	9,23±0,31 ^{ca}

[‡]DPPH: expresado en mg Trolox equivalente/g

^λTBARS: expresado en mg Trolox equivalente/g

^{*}Para un mismo extracto, y una misma determinación. Valores seguidos de la misma letra mayúscula dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en el test de rangos múltiples de Tukey.

[‡]Para un mismo extracto, y una misma fracción. Valores seguidos de la misma letra minúscula dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en el test de rangos múltiples de Tukey.

Tras la fase de digestión realizada en la boca, el descenso en la actividad antioxidante fue del 72,31%. En el estómago este descenso con respecto al control fue del 87,95%, aunque con respecto a los valores obtenidos en la boca no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). En el intestino los valores disminuyeron en un 54,07%, es decir, se incrementó la actividad antioxidante con respecto a la obtenida en el estómago. Esto podría ser debido al efecto del pH o al efecto de las enzimas que rompen algunas estructuras y liberan compuestos fenólicos que ayudan a aumentar la inhibición del radical DPPH produciendo así un aumento en la actividad antioxidante. Después del proceso de diálisis, la actividad antioxidante disminuye ($p < 0,05$) en un 92,18% con respecto al control y pasando de unos valores de 1,41 (obtenidos en el intestino) a 0,24 mg TE/g muestra, lo que indica que se ha producido una absorción de 1,17 mg TE/g muestra de los compuestos con actividad secuestrante de radicales.

Por otra parte, en la medida de la actividad antioxidante de la fracción soluble del extracto de limón, en la boca se obtuvo un valor de 4,82 mg Te/g muestra, que corresponde a la solubilización de los compuestos con actividad secuestrante de radicales presentes en el extracto sólido.

En el estómago los valores disminuyen pasando de 4,82 a 2,93 mg TE/g muestra, aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). En el intestino los valores de la actividad antioxidante aumentan ($p < 0,05$) pasando de 2,93 a 4,73 mg TE/g muestra. Esto podría ser debido al efecto del pH o al efecto de las enzimas ya mencionado anteriormente en la fracción sólida. Finalizado el proceso digestivo, los valores aumentan de nuevo ($p < 0,05$) pasando de 4,73 a 7,11 mg TE/g muestra, lo cual indica un aumento de la actividad antioxidante ya que los compuestos con actividad secuestrante de radicales todavía se encuentran en disolución.

En cuanto a la actividad antioxidante, medida por el método DPPH, el extracto de chufa tanto en la fracción sólida como en la fracción soluble no mostró actividad antioxidante.

Por último, en el método TBARs, para el extracto de limón la muestra control presenta un valor de 3,13 mg TE/g muestra. En este caso, al contrario que ocurre en el método DPPH, el proceso de digestión provoca, en la fracción sólida, un aumento en los valores de actividad antioxidante. Después de la realización de la digestión en la boca el aumento en la actividad antioxidante fue del 10,22%, aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). En el estómago el aumento fue mucho mayor pasando de valores de 3,45 a 6,62 mg TE/g muestra mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Esto podría ser debido al efecto del pH o al efecto de las enzimas. En el intestino los valores vuelven a aumentar pasando de 6,62 a 6,79 mg TE/g muestra en la fase del intestino, por acción posiblemente del pH. Tras el proceso de digestión, los valores disminuyen pasando de 6,79 a 6,01 mg TE/g muestra, lo que indica una absorción de 0,78 mg TE/g muestra de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por cada gramo de muestra obtenido. Tanto en la fase del intestino como en la fase de después de la diálisis no se muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Para la medida de la actividad antioxidante en el método TBARs del extracto de chufa, la muestra control presenta un valor de 2,89 mg TE/g muestra. Al igual que ocurría en el extracto de limón, el proceso digestivo provoca, en la fracción sólida, un aumento de los valores de la actividad antioxidante. En la boca, la digestión produce un aumento

de los valores pasando de 2,89 a 4,35 mg TE/g muestra, aunque no se muestran diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$). En el estómago el aumento ($p<0,05$) de la actividad antioxidante pasa de unos valores de 4,35 a 6,53 mg TE/g muestra. Esto podría ser debido al efecto del pH ácido del estómago o al efecto de las enzimas. En el intestino los valores disminuyen desde 6,53 a 6,11 mg TE/g muestra, no obstante no se muestran diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$). Después del proceso de diálisis, los valores de la actividad antioxidante volvieron a aumentar pasando de 6,11 a 6,65 mg TE/g muestra, aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$). Este aumento podría deberse a que los compuestos responsables de detectar las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico todavía se encuentran en disolución.

En lo que respecta a la fracción soluble del extracto de limón, en la boca se obtuvo un valor de 11,72 mg Te/g muestra. A continuación, en el estómago los valores de la actividad antioxidante disminuyeron hasta 9,38 mg TE/g muestra, aunque no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$). Esta disminución podría deberse al efecto del pH ácido que presenta el estómago. En el intestino los valores continúan disminuyendo ($p<0,05$) pasando de 9,38 a 5,05 mg TE/g muestra. Al igual que en el estómago, esto podría ser debido al efecto del pH al cambiar de ácido a neutro. Sin embargo, tras el proceso de diálisis, los valores de la actividad antioxidante aumentan ($p<0,05$) pasando de 5,05 a 7,61 mg TE/g muestra.

Para finalizar, para la fracción soluble del extracto de chufa, después de la digestión realizada en la boca se presenta un valor de 47,73 mg TE/g muestra, siendo este el valor más alto de actividad antioxidante obtenido en el método TBARs. En el estómago, este valor disminuye ($p<0,05$) hasta 12,61 mg TE/g muestra. En el intestino el valor de la actividad antioxidante vuelve a disminuir ($p<0,05$) pasando de 12,61 a 6,79 mg TE/g muestra. En ambos casos, tanto en el estómago como en el intestino, esto puede ser debido posiblemente al efecto del pH. Finalmente, tras el proceso de diálisis, los valores de la actividad antioxidante aumentan ($p<0,05$) pasando de 6,79 a 9,23 mg TE/g muestra.

4.3. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

En un estudio previo se demostró que tanto la fracción soluble e insoluble de los extractos de limón y de chufa contenían un gran número de compuestos fenólicos que pertenecen a ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, así como flavonoides. En el presente trabajo, el análisis HPLC de los extractos de limón y de chufa de la simulación de la digestión *In Vitro* revelaron que los perfiles fenólicos eran diferentes a los observados previamente en las muestras control de cada extracto. Esto podría ser debido a la transformación de los compuestos presentes en las muestras control en los procesos de tratamiento térmico y subsiguiente simulación de la digestión *In Vitro*. Sin embargo, las actividades antioxidantes manifestadas en los extractos en el presente trabajo demostraron, además, que los compuestos fenólicos transformados podrían servir como compuestos antioxidantes activos *In Vivo* y ejercer una función protectora en el tracto gastrointestinal del daño oxidativo.

En los perfiles cromatográficos obtenidos tras la realización del análisis por HPLC, se puede observar (Anexos) la variación que se produce de los diferentes compuestos fenólicos tanto en el extracto de limón como en el de chufa en cada una de las fases de la digestión *In Vitro*.

Para la fracción sólida del extracto de limón, en la muestra control (Anexo 1) se puede observar la presencia de tres picos significativos de diferentes compuestos fenólicos, presentando el pico 1 un tiempo de retención (TR) de 16,53; el pico 2 un TR de 20,44 y el pico 3 un TR de 25,16. En la fase de boca (Anexo 2) los picos se mantienen y los TR que presentan con respecto al control apenas se diferencian, sin embargo, la escala, que corresponde a las miliunidades de absorbancia (mAU) la cual se puede relacionar con la concentración en la que se encuentra ese compuesto, disminuye en los tres picos. En la fase de estómago (Anexo 3) ocurre lo mismo que en la boca, aunque aquí se aprecia una gran disminución en el pico 1 bajando a unos valores por debajo de 40 mAU. En la fase del intestino (Anexo 4), se puede apreciar como los picos van desapareciendo, es decir, que ya no son tan destacados como en la muestra control. El único que todavía destaca es el pico 3, aunque se muestra en la escala

correspondiente a 50 mAU. Sin embargo, en la fase de diálisis (Anexo 5), los picos 2 y 3 aumentan en la escala con respecto a los resultados obtenidos en la fase del intestino, aunque siguen siendo más bajos en relación a los de la muestra control. Por otro lado, el pico 2 sigue disminuyendo encontrándose ya en la escala por debajo de los 20 mAU. Esto indica que los procesos digestivos ejercen un efecto muy importante en los procesos de estabilidad de los compuestos fenólicos.

Por otro lado, en la fracción soluble, al contrario que ocurría en la fracción sólida, a medida que avanza el proceso de digestión se van detectando más picos en el perfil cromatográfico con respecto al control, aunque las escalas en las que se encuentran son menores pero no con tanta diferencia como en la fracción sólida.

En la fase de boca (Anexo 6), se pueden apreciar los picos 1 y 2 que se destacaban en la muestra control (Anexo 1) sin apenas ningún cambio. Pero, en este caso, aparece un cuarto pico significativo a la izquierda del pico 1 con un TR de 14,36. En la fase del estómago (Anexo 7) ocurre lo mismo que en la fase de boca, pero las escalas de cada uno de los picos con compuestos fenólicos distintos detectados disminuye. En cambio, en el intestino (Anexo 8), se pueden apreciar, además de los ya presentes en las fases anteriores, numerosos picos situados aproximadamente sobre la escala con valor entre 60-80 mAU. Por último, en la fase de diálisis (Anexo 9), muchos de estos picos detectados en la fase del intestino ya han desaparecido y otros han disminuido de escala y TR aunque todavía siguen presentes. Por otro lado, en esta fase, vuelven a aparecer los tres picos detectados inicialmente en la muestra control (Anexo 1) aunque siempre en una escala menor.

Para el extracto de chufa, en la fracción sólida, en la muestra control (Anexo 10) se puede apreciar la presencia de dos picos significativos de diferentes compuestos fenólicos, presentando el pico 1 un TR de 3,2 y el pico 2 con un TR de 20,36. En la fase de boca (Anexo 11), los picos en comparación con la muestra control apenas varían ya que aparecen los mismos, lo único que la escala en la que se encuentran presenta unas mAU más bajas. En la fase del estómago (Anexo 12) ocurre lo mismo que en la fase anterior, sólo que, en este caso, la escala en la que se encuentran es mucho más baja. En la fase del intestino (Anexo 13) ya se puede observar como muchos picos han

desaparecido, entre ellos el pico 1. El único pico que se mantiene sin apenas cambios con respecto al control, excepto en la escala en la que se encuentra, es el pico 2. Y, por último, en la fase de diálisis (Anexo 14), se puede observar como han desaparecido todos los picos. Si es verdad que aún quedan representados dos pero la escala en la que se presentan es tan baja que son prácticamente despreciables. Esto podría ser debido a que, al finalizar el proceso de diálisis, los compuestos fenólicos que estaban presentes anteriormente han sido absorbidos, por ello no se aprecian en este análisis cromatográfico.

Para finalizar, en lo que respecta a la fracción soluble del extracto de chufa, a medida que transcurre el proceso digestivo los perfiles cromatográficos varían de forma un poco diferente a como ocurría en la fracción sólida.

Tras finalizar la digestión en la boca (Anexo 15), al igual que ocurría en la fracción sólida, apenas hay variaciones entre los picos 1 y 2 destacados respecto a la muestra control. En la fase del estómago (Anexo 16) ocurre lo mismo que en la boca, pero aquí la escala disminuye más pasando a unos rangos de entre 0 y 20 mAU. Sin embargo, en la fase del intestino (Anexo 17), al contrario que ocurría en la fracción sólida, la escala en la que se encuentran los picos pasa hasta unos valores de entre 0 y 70 mAU, produciendo un aumento del TR de los picos con respecto al control pasando en el pico 2 de 20,36 a 20,96 y en el pico 1 de 3,20 a 6,32, aunque este ya es casi despreciable porque se encuentra situado en la escala en el valor de 10 mAU. Al producirse este aumento de escala, se puede apreciar la presencia de un tercer pico que adquiere mayor importancia que el pico 1. Finalmente, tras el proceso de diálisis (Anexo 18), se puede observar como la escala vuelve a disminuir por lo que la mayoría de los componentes fenólicos han desaparecido. Los únicos más representativos que quedan son los correspondientes al pico 1 y pico 3. Esto quiere decir, que al igual que anteriormente se ha mencionado, los compuestos fenólicos han sido absorbidos.

Se ha demostrado que los ácidos hidroxicinámicos, procedentes de la fracción soluble, tales como ácido ferúlico se absorben principalmente en el intestino delgado. Además, han demostrado que una menor cantidad de ácido ferúlico se absorbe después de la liberación a partir de fibra insoluble en el intestino grueso. Sin embargo, estos compuestos fenólicos pueden actuar localmente para proteger a otros antioxidantes en la dieta de la degradación, a nivel intestinal. Por lo tanto, pueden mejorar el estado antioxidante total del cuerpo ejerciendo un efecto protector frente a enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.

En este trabajo se muestra que los compuestos fenólicos de los extractos de limón y de chufa pueden sufrir cambios estructurales durante la digestión *In Vitro*. Por lo tanto, la información generada en la presente investigación sienta las bases para futuros estudios para la identificación de los compuestos formados durante la digestión que exhibieron actividad antioxidante *In Vitro*.



5. CONCLUSIONES

1. Los extractos de limón, tanto los de la fracción sólida como los de la fracción soluble, presentan mayor contenido de compuestos bioactivos que los extractos de chufa (tanto fenoles como flavonoides).
2. El contenido en fenoles totales y flavonoides totales de la fracción soluble obtenida tras la diálisis es superior al contenido en fenoles totales y flavonoides totales de la muestra control tanto para el extracto de chufa como para el extracto de limón.
3. Para el método FIC y el método TBARs la mayor actividad antioxidante se obtuvo en los extractos solubles de chufa, mientras que para los métodos FRAP y DPPH fue en los extractos solubles de limón donde se obtuvo la mayor actividad.
4. En todos los métodos utilizados para medir la actividad antioxidante y en todas las etapas de la digestión analizadas, se obtuvo mayor actividad en los extractos de la fracción soluble que en los extractos pertenecientes a la fracción sólida tanto para la muestra de limón como para la muestra de chufa.
5. En el método FIC la actividad antioxidante de la fracción soluble obtenida tras la diálisis es superior a la actividad antioxidante de la muestra control tanto para el extracto de chufa como para el extracto de limón.
6. En el método FRAP la actividad antioxidante de la fracción soluble obtenida tras la diálisis es superior a la actividad antioxidante de la muestra control tanto para el extracto de chufa como para el extracto de limón.
7. En el método TBARs la actividad antioxidante de la fracción soluble obtenida tras la diálisis es superior a la actividad antioxidante de la muestra control tanto para el extracto de chufa como para el extracto de limón.
8. En el método DPPH la actividad antioxidante de la fracción soluble obtenida tras la diálisis es superior a la actividad antioxidante de la muestra control tanto para el extracto de chufa como para el extracto de limón.
9. El proceso de digestión *In Vitro* modifica cualitativamente el contenido y la concentración de los compuestos bioactivos presentes en los extractos de chufa y en los de limón tanto en la fracción sólida como en la fracción soluble.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARA, A. E. (2011). Proximate and mineral elements composition of the tissue and peel of *Dioscorea bulbifera* tuber. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(6), 543-551.
- ABDEL-AAL, E. S. M. (2008). Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two *In Vitro* digestion methods. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1282-1288.
- ADDY, E. O., ETESHOLA, E. (1984). Nutritive value of a mixture of tiger nut tubers (*Cyperus esculentus* L) and baobab seeds (*Adansonia digitata* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 437-440.
- ADEJUYITAN, J. A. (2011). Tigernut processing: its food uses and health benefits. *American Journal of Food Technology*, 6(3), 197-201.
- ALEGRÍA-TORÁN, A., FARRÉ-ROVIRA, R. (2003). *Horchata y salud: Aspectos nutricionales y dietéticos*. En: Jornada Chufa y Horchata: Tradición y Salud. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación (pp 55-70). Eds., Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, Valencia, Spain.
- AMWAY. (2009). Manual de información de nutrición y salud de productos. Nutrilite.
- BARTA, J., PÁTKAI, G. (2007). Chemical composition and storability of Jerusalem artichoke tubers. *Acta Alimentaria*, 36(2), 257-267.
- BELEWU, M. A., ABODUNRIN, A. O. (2008). Preparation of Kunun from unexploited rich food source: tigernut (*Cyperus esculentus*). *Pakistan Journal of Nutrition*, 7, 109-111.
- BELITZ, H. D., GROSCH, W. (1997). Química de los alimentos. Segunda edición. Ed. Acibia, S.A. Zaragoza, España, 4, 336-360.
- BENAVENTE-GARCÍA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUÑO, A. DEL RÍO, J. A. (1999). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chemistry*, 68, 457-462.

- BENEYTO, H., VARÓ, P., GUILLEM, C., MURILLO, A. D. (2000). Chemical characterization of the natural drink "horchata de chufa" in Alcoiá and Comtat regions (Alicante). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 19, 99-101.
- BERGANZA, J., DE LAS FUENTES, L., GUIJARRO, J., GARAY, I. (2003). Problemática y posibilidades de aprovechamiento de los subproductos generados en la industria alimentaria de la CEE. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Enero: 91-94.
- BLASA, M., CANDIRACCI, M., ACCORSI, A., PIACENTINI, P. M., ALBERTINI, M. C., PIATTI E. (2005). Raw Mille fiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97, 217-222.
- BOISEN, S., EGGUM, B. O. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141-162.
- BRANDON, E. F. A., OOMEN, A. G., ROMPELBERG, C. J. M., VERSANTVOORT, C. H. M., VAN ENGELEN, J. G. M., SIPS, A. (2006). Consumer product in vitro digestion model: bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44, 161-171.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*, 28, 25-30.
- CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, L. R. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 22, 749-760.
- CARTER, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent-ferrozine. *Annual Reviews of Biochemistry*, 40, 450-458.
- CERVERA, P., CLAPES, J., RIGOLFAS, R. (1999). Alimentación y Dietoterapia. Ed. McGraw-Hill, Interamericana Madrid, 63-66.

- COLES, L. T., MOUGHAN, P. J., DARRAGH, A. J. (2005). *In Vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 421-444.
- CORRALES, M., DE SOUZA, P. M., STAHL, M. R., FERNÁNDEZ, A. (2012). Effects of the decontamination of a fresh tiger nuts' milk beverage (horchata) with short wave ultraviolet treatments (UV-C) on quality attributes. *Innovative of the Science of Food and Emerging Technologies*, 13, 163-168.
- CORTÉS, C., ESTEVE, M. J., FRÍGOLA, A., TORREGROSA, F. (2005). Quality characteristics of horchata (a Spanish vegetable beverage) treated with pulse electric fields during shelf-life. *Food Chemistry*, 91, 319-325.
- COŞKUNER, Y., ERCAN, R., KARABABA, E., NAZLICAN, A. N. (2002). Physical and chemical properties of chufa (*Cyperus esculentus* L) tubers grown in the Çukurova region of Turkey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 625-631.
- COULTATE, T. P. (1996). Manual de química y bioquímica de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, 3, 44-53.
- DAHAN, A., HOFFMAN, A. (2007). The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: The ability of *In Vitro* lipolysis and consecutive ex vivo intestinal permeability data to predict in vivo bioavailability in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 96-105.
- DAHAN, A., HOFFMAN, A. (2008). Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an *In Vitro* dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Journal of Controlled Release*, 129, 1-10.
- DE ABREU MATOS, F. J., CAVALCANTI, F. S., PARENTE, J. P. (2008). Qualitative and quantitative agronomic study of *Cyperus esculentus* L. (earth almond) – An unexplored source of energetic food. *Revista Científica Agronómica*, 39(1), 124-129.
- ESCUDERO, E., GONZÁLEZ, P. (2006). Dietary fibre. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 60-71.

- FULLER, M. F. (Ed.). (1991). *In Vitro* digestión for pigs and poultry. Wallington, UK: CAB International.
- GIL, A. (2010). Tratado de Nutrición. Tomo I: "Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. Ed. Panamericana, 9, 235-255.
- GREEN, R. J., MURPHY, A. S., SCHULZ, B., WATKINS, B. A., FERRUZZI, M. G. (2007). Common tea formulations modulate *In Vitro* digestive recovery of Green tea catechins. *Molecular Nutrition Food Research*, 51, 1152-1162.
- GUARNER. (2008). Libro Blanco de la Fibra Dietética. Corporación Alimentaria Peñasanta.
- HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, M., SASTRE GALLEGO, A. (1999). Tratado de Nutrición. Ed. Diaz de Santos, 2(8), 125-135.
- HERNÁNDEZ, T., HERNÁNDEZ, A., MARTÍNEZ, C. (1995). Fibra alimentaria. Concepto, propiedades y métodos de análisis. *Alimentaria*, 261, 19-30.
- KELLEY, J. R., FREDRICKSON, L. H. (1991). *Chufa biology and management*. Fish & Wildlife Leaflet, US Fish & Wildlife Service, USA.
- KIMBALL, DAN A. (2002). Procesado de cítricos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, 2, 30.
- LAI, Y. C., HUANG, C. L., CHAN, C. F., LIEN, C. Y., LIAO, W. C. (2013). Studies of sugar composition and starch morphology of baked sweet potatoes (*Ipomea batatas* (L.) Lam). *Journal of the Science of Food Technology*, 50(6), 1193-1199.
- LAPORNIK, B., PROSEK, M., GOLC A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- LARRAURI GARCÍA, J. A. (1994). Utilización de los hollejos cítricos y las cáscaras de piñas como fuentes de fibra dietética en Cuba. *Alimentaria*, 57-59.

- LINSSEN, J. P. H., COZIJNSEN, J. L., PILNIK, W. (1989). Chufa (*Cyperus esculentus* L): a new source of dietary fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49, 291-296.
- LOMBARDO, S., PANDINO, G., MAUROMICALE, G. (2012). Nutritional and sensory characteristics of “early” potato cultivars under organic and conventional cultivation systems. *Food Chemistry*, 133, 1249-1254.
- MAIEVES, H. A., CARDOSO DE OLIVEIRA, D., BERNARDO, C., DE OLIVEIRA MÜLLER, C. M., AMANTE, E. R. (2012). Microscopy and texture of raw and cooked cassava (*Manihot esculenta crantz*) roots. *Journal of Texture Studies*, 43, 164-173.
- MARTÍN-CABREJAS, M. A.; LÓPEZ-ANDREU, F. J.; VALIENTE, C.; WALDRON, K.; ESTEBAN, R. M. (1995). Estudio del contenido de carbohidratos totales y fibra alimentaria en subproductos de kiwi y pera. *Alimentaria*, 57-61.
- MATAIX VERDÚ, J. (2009). Nutrición y alimentación humana. I. Nutrientes y alimentos. Ed. Ergon, 1(7), 161-171.
- McCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A., PARK, Y. (2009). Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 48-67.
- MOKADY, S. H., DOLEV, A. (1970). Nutritional evaluation of tubers of *Cyperus esculentus* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21, 211-214.
- MOLLÁ, E., ESTEBAN, R. M., VALIENTE, C., LÓPEZ-ANDREU, F. J. (1994). Contenido de fibra alimentaria en los subproductos procedentes de la industria cervecera y de la industria de los cítricos. *Alimentaria*, 61-64.
- MOORE, J. L., HOHMAN, W. L., STARK, T. M., WEISBRICH, G. A. (1998). Shot prevalences and diets of diving ducks five years after ban on use of lead shotshells at catahoula lake, louisiana. *Journal of Wildlife Manage*, 62(2), 564-569.
- MOSQUERA, L. A., SIMS, C. A., BATES, R. P., O’KEEFE, S. F. (1996). Flavor and stability of “horchata de chufa”. *Journal of Food Science*, 61(4), 856-861.

- MURNIECE, I., KARKLINA, D., GALOBURDA, R., SANTARE, D., SKRABULE, I., COSTA, H. S. (2011). Nutritional composition of freshly harvested and stored Latvian potato (*Solanum tuberosum L.*) varieties depending on traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 699-710.
- OJANSIVU, I., FERREIRA, C. L., SALMINEN, S. (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 40-46.
- OLAYIWOLA, I. O., ABUBAKAR, H. N., ADEBAYO, G. B., OLADIPO, F. O. (2009). Study of sweet potato (*Ipomea batatas Lam*) foods for indigenous consumption through chemical and anti-nutritive analysis in Kwara State, Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(12), 1894-1897.
- ORMEÑO-NUÑEZ, J., PINO-ROJAS, G., GARFE-VERGARA, F. (2008). Inhibition of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus L.*) and Bermuda grass (*Cynodon dactylon L.*) by a mulch derived from rye (*Secale cereale L.*) in grapevines. *Chilean Journal of Agriculture*, 68(3), 238-247.
- ORTUÑO-TOMÁS, A. (2003). El limón y sus componentes bioactivos. Región de Murcia: Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Serie Técnica y de Estudios.
- OYAIZU, M. (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- PALACIOS, N., BURTIN, D., LEECH M. (2004). Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6, 67-77.
- PANNALA, A. S., CHAN, T. S., O'BRIEN P. J., RICE-EVANS C. A. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 1161-1168.

- QUIÑONES, M., MIGUEL, M., ALEIXANDRE A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27, 76-89.
- RECORD, I. R., LANE, J. M. (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chemistry*, 73, 481-486.
- RICE-EVANS, C. A, MILLER, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790-795.
- RODRÍGUEZ, HERNÁNDEZ, AGAMA, TOVAR, BELLO. (2008). Caracterization of a fiber rich poder prepares by liquefaction of unripe banana flour. *Food Chemistry*, 107, 1515-1521.
- SALAS, S. J., MEGIAS RANGIL, L. (2002). Nutrición y dietética clínica. Introducción a las dietas controladas en fibra. Ed. Masson, 34, 299-308.
- SÁNCHEZ PINEDA DE LAS INFANTAS, M^a. T. (2003). Residuos generados en la industria de transformados de productos vegetales y sus aprovechamiento. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 92-95.
- SANFUL, R. E. (2009). Production and sensory evaluation of tiger nut beverages. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(5), 688-690.
- SASKIA A. B. E, VAN ACCKER, BAST A. A. L. T. (1998). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. En: *Flavonoids in health and disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 9, 221-251.
- SEGUNDO ÁLVAREZ CRUZ, N., BAGUE SERRANO A. J. (2011). Los alimentos funcionales. Una oportunidad para una mejor salud. Ed. AMV, 8, 210-216.
- SELMA, M. V., FERNÁNDEZ, P. S., VALERO, M., SALMERÓN, M. C. (2003). Control of *Enterobacter aerogenes* by high-intensity pulsed electric fields in horchata, a Spanish low acid beverage. *Food Microbiology*, 20, 105-110.

- SCHER, C. F., DE OLIVEIRA RIOS, A., ZAPATA NOREÑA, C. P. (2009). Hot air drying of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its effect on sugar concentrations. *International Journal of the Science of Food Technology*, 44(1), 2169-2175.
- SINGLETON, V. L., ROSSI, J., A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 6, 144-158.
- SOTELO, D. I., CASAS, F. N., CAMELO, M. G. (2010). Borojó (*Borojoa Patinoi*): fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Vitae*, revista de la facultad de química farmacéutica, 17, 329-336.
- TAYLOR, J. P., SMITH, L. M. (2005). Migratory bird use of belowground foods in moistsoil managed wetlands in the Middle Rio Grande Valley, New Mexico. *Wildlife Society Bulletin*, 33(2), 574-582.
- TEMPLE, V. J., OJEBE, T. O., KAPU, M. M. (1989). Chemical analysis of tiger nuts (*Cyperus esculentus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49, 261-262.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10, 41-53.
- VAN CITERS, G. W., LIN, H. C. (1999). The ileal brake: A fifteen-year progress report. *Current Gastroenterology Reports*, 1, 404-409.
- VIUDA-MARTOS, M., PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A., SENDRA, E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. (2013). In vitro antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel powder extract obtained as coproduct in the juice extraction process. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 772-776.
- WEBB, G. P. (2007). Complementos nutricionales y alimentos funcionales. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, 5, 129-141.

YEBOAH, S. O., MITEI, Y. C., NGILA, J. C., WESSJOHANN, L., SCHMIDT, J. (2012). Compositional and structural studies of the oils from two edible seeds: Tiger nut, *Cyperus esculentus*, and asiato, *Pachira insignis*, from Ghana. *Food Research International*, 47, 259-266.

ZARZUELO, A., GÁLVEZ, J. (2005). Fibra dietética. Tratado de Nutrición. Acción Médica 336-368.

Páginas web consultadas:

www.Consumer.com. (Acceso Diciembre 2014)

www.infoagro.com. (Acceso Diciembre 2014)

www.MAPA.es. (Acceso Diciembre 2014)

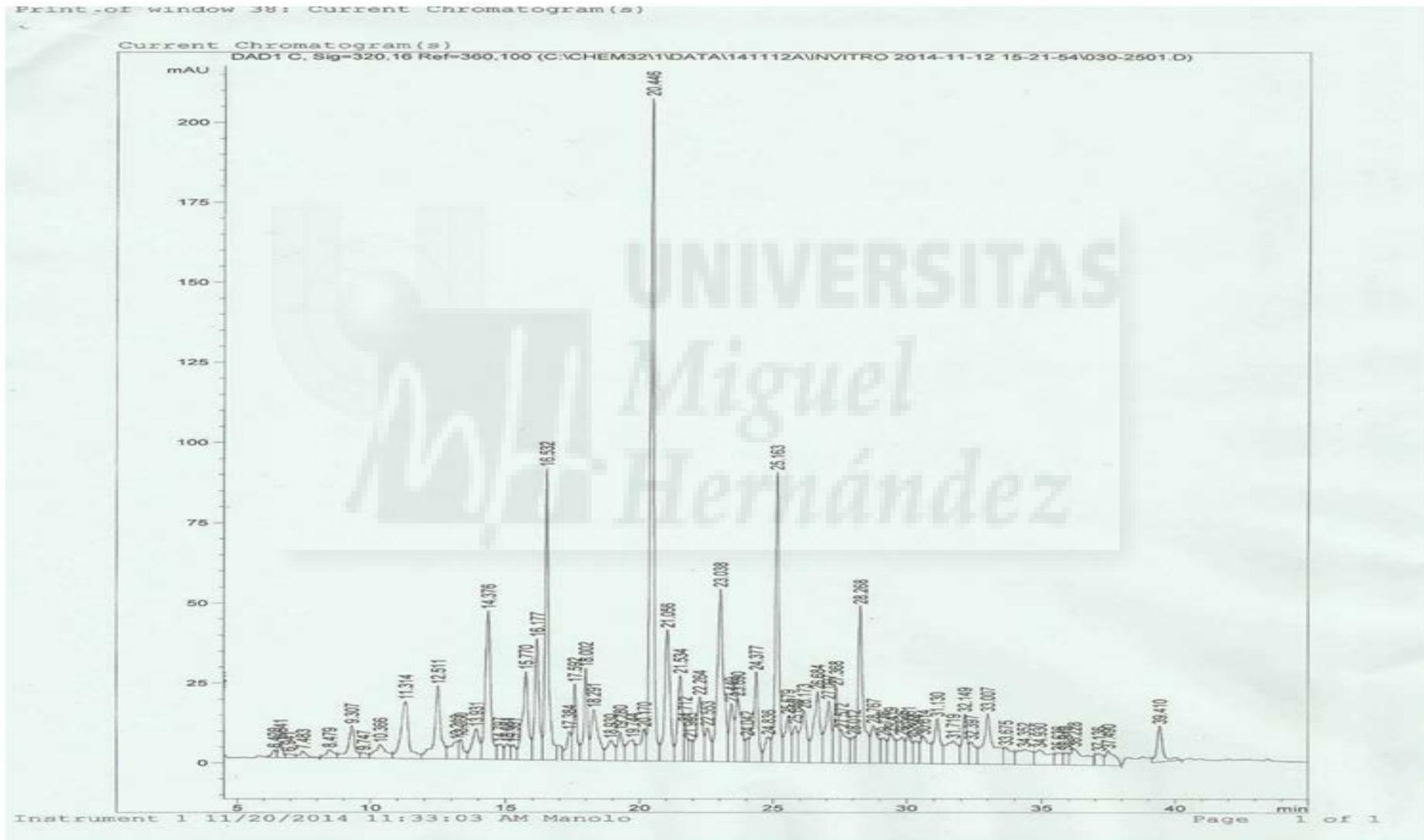
www.chufadevalencia.org. CRDO. (2012). *Consejo Regulador de la Denominación de Origen Chufa de Valencia*. (Acceso Diciembre 2014)

www.opolanco.es.htm. GALLARDO, C. (2003). Nutrición: La fibra dietética. (Acceso Diciembre 2014)



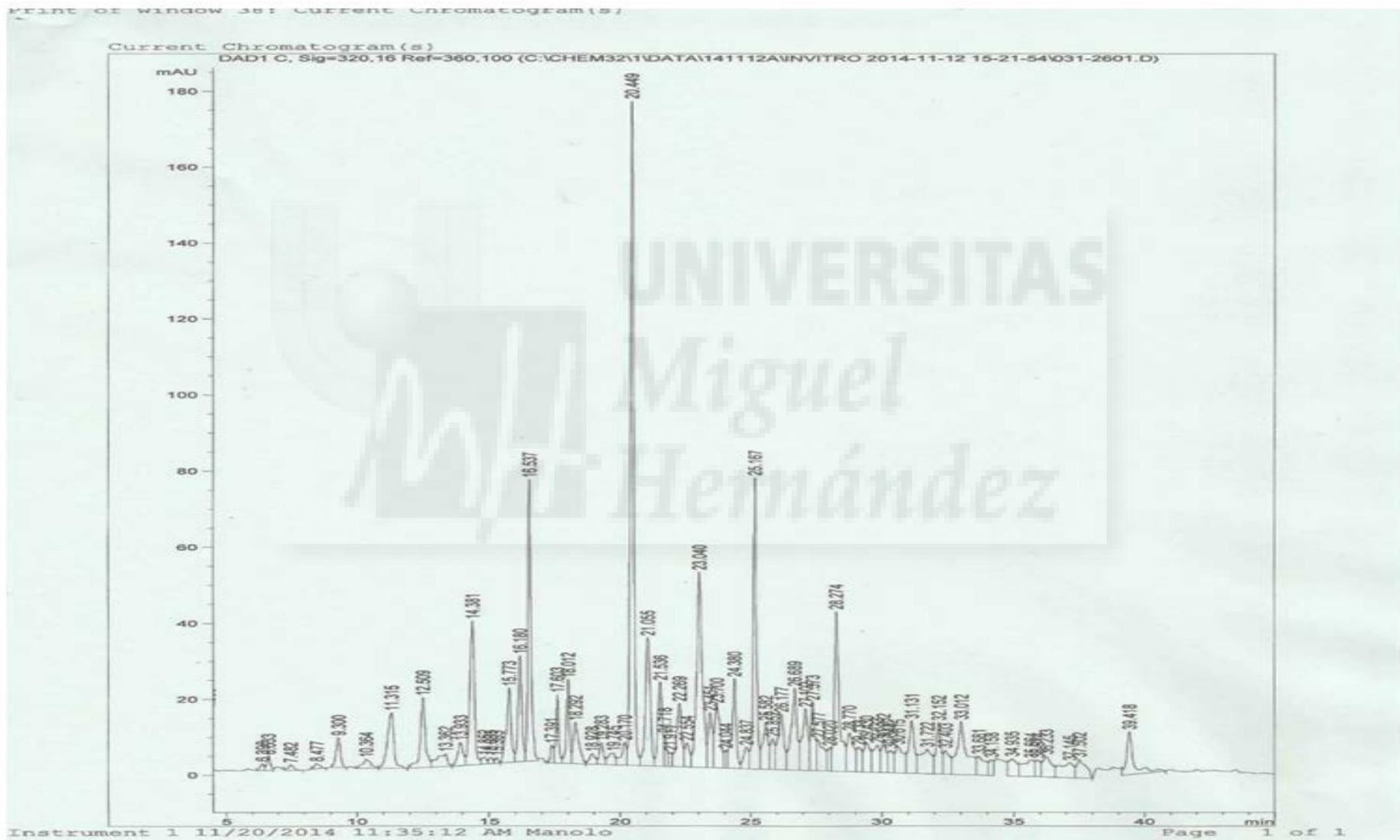
7. ANEXOS.

ANEXO 1. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO DE LIMÓN DE LA MUESTRA CONTROL



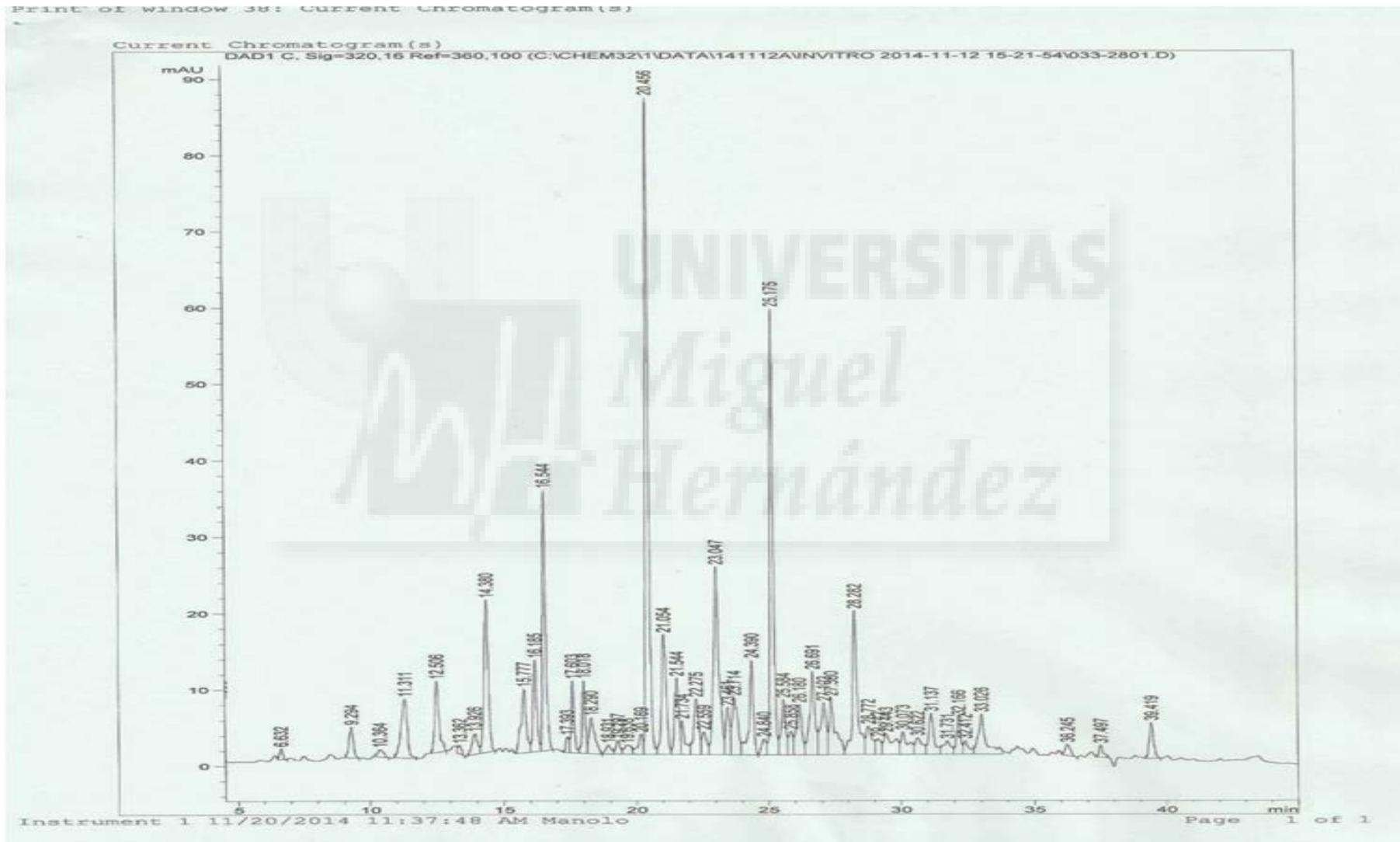
Muestra control

ANEXO 2. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO SÓLIDO DE LIMÓN EN LA FASE DE BOCA



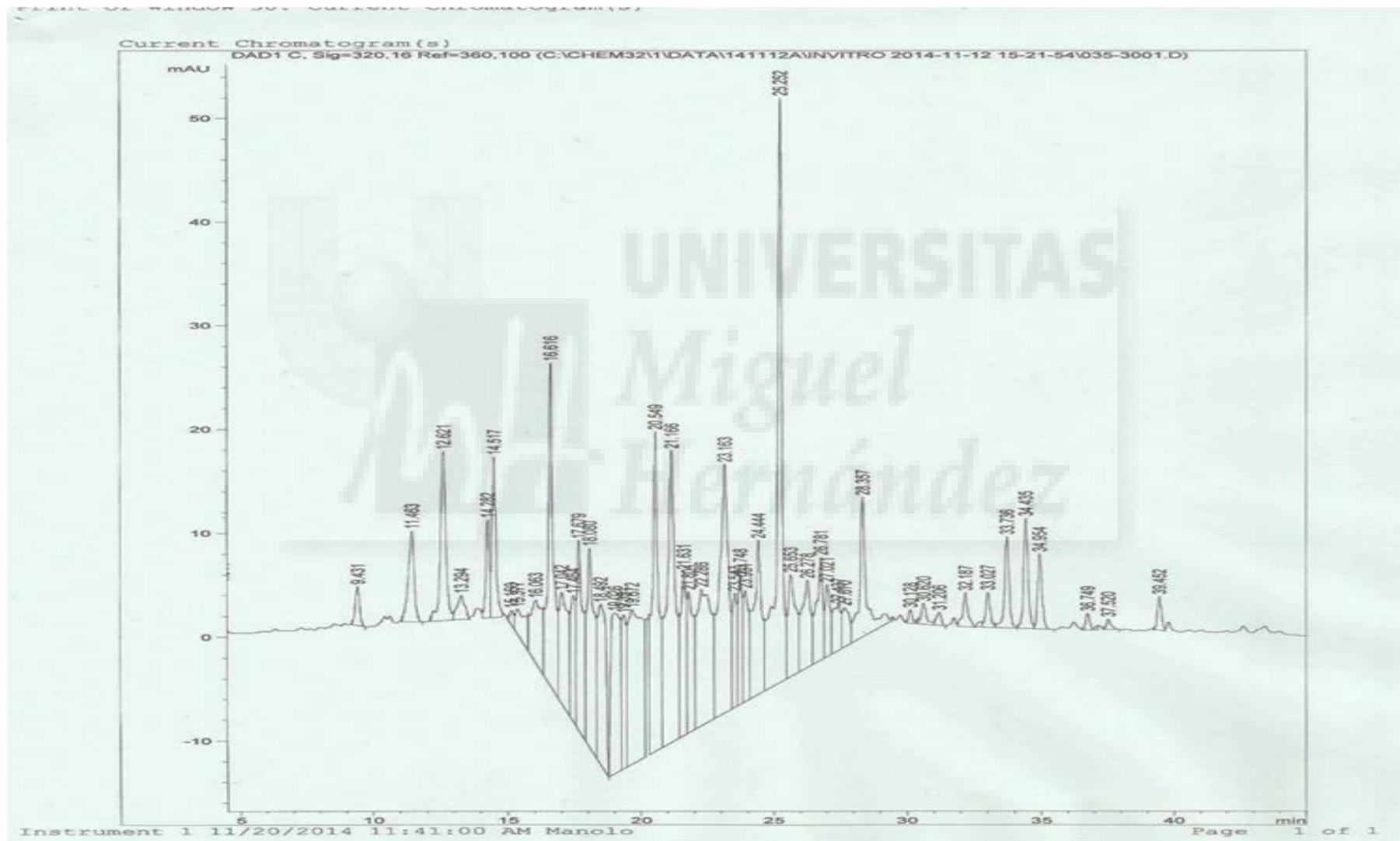
Fase boca

ANEXO 3. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO SÓLIDO DE LIMÓN EN LA FASE DEL ESTÓMAGO



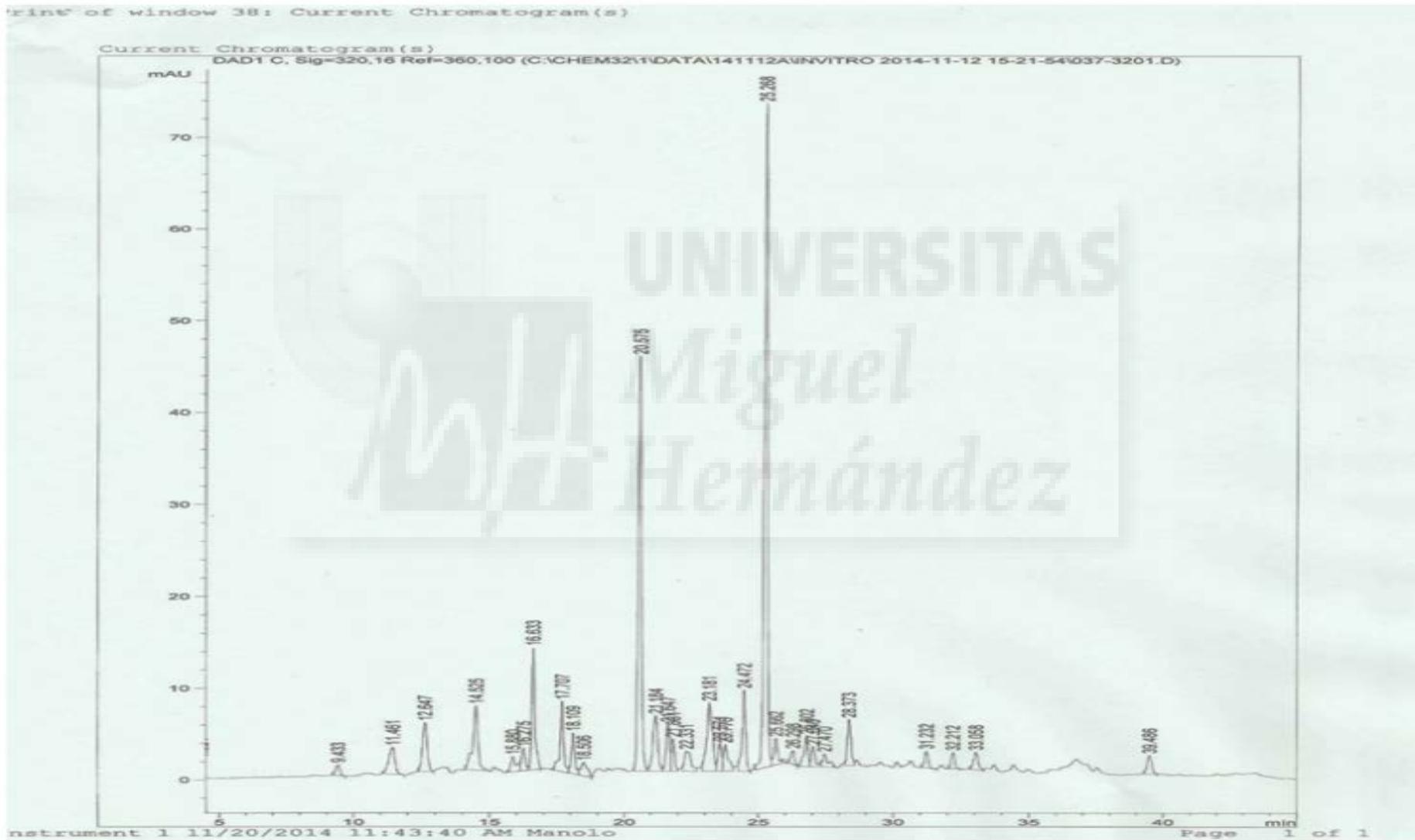
Fase boca + estómago

ANEXO 4. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO SÓLIDO DE LIMÓN EN LA FASE DEL INTESTINO



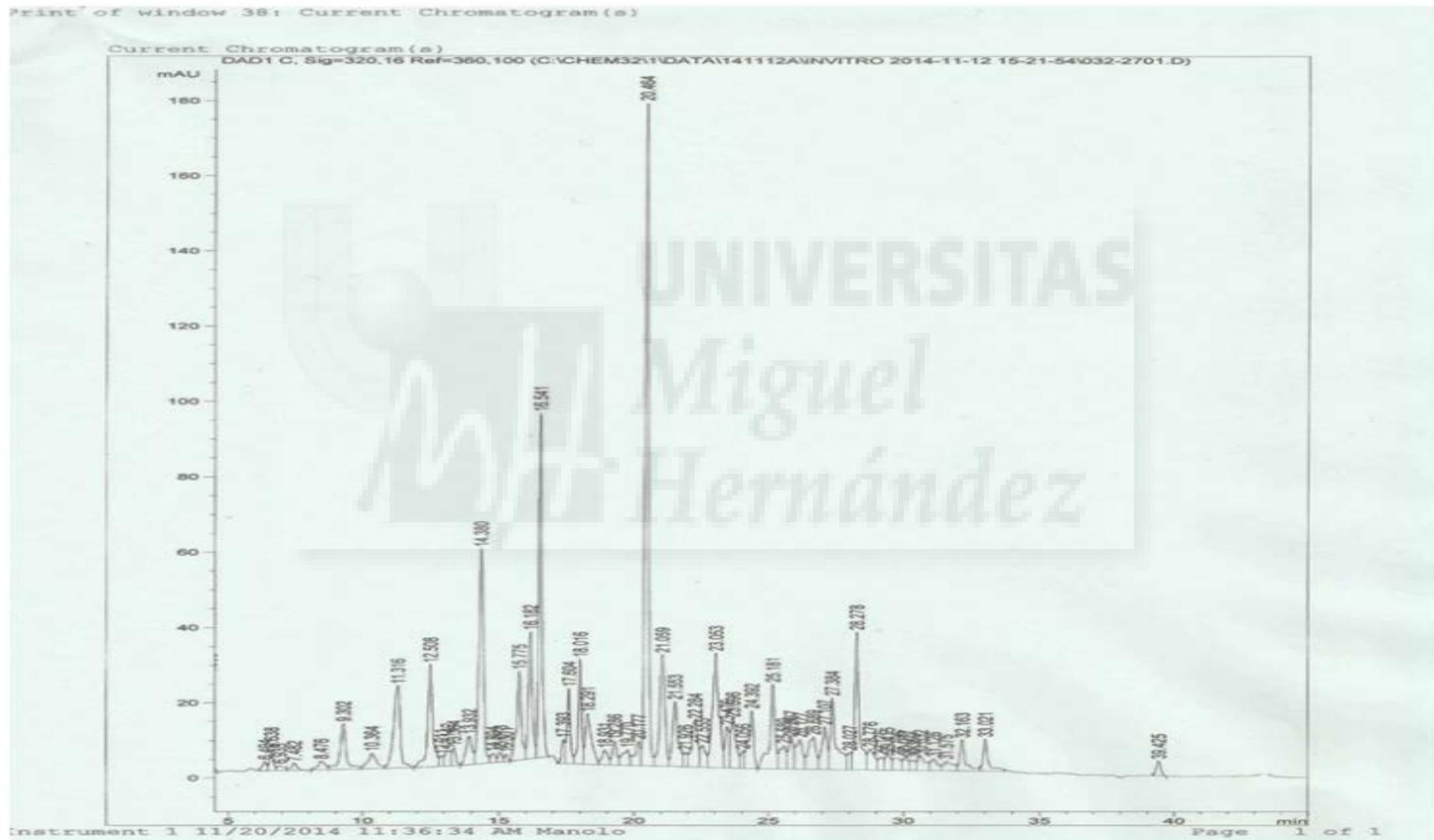
Fase boca + estómago + intestino

ANEXO 5. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO SÓLIDO DE LIMÓN EN LA FASE DE DIÁLISIS



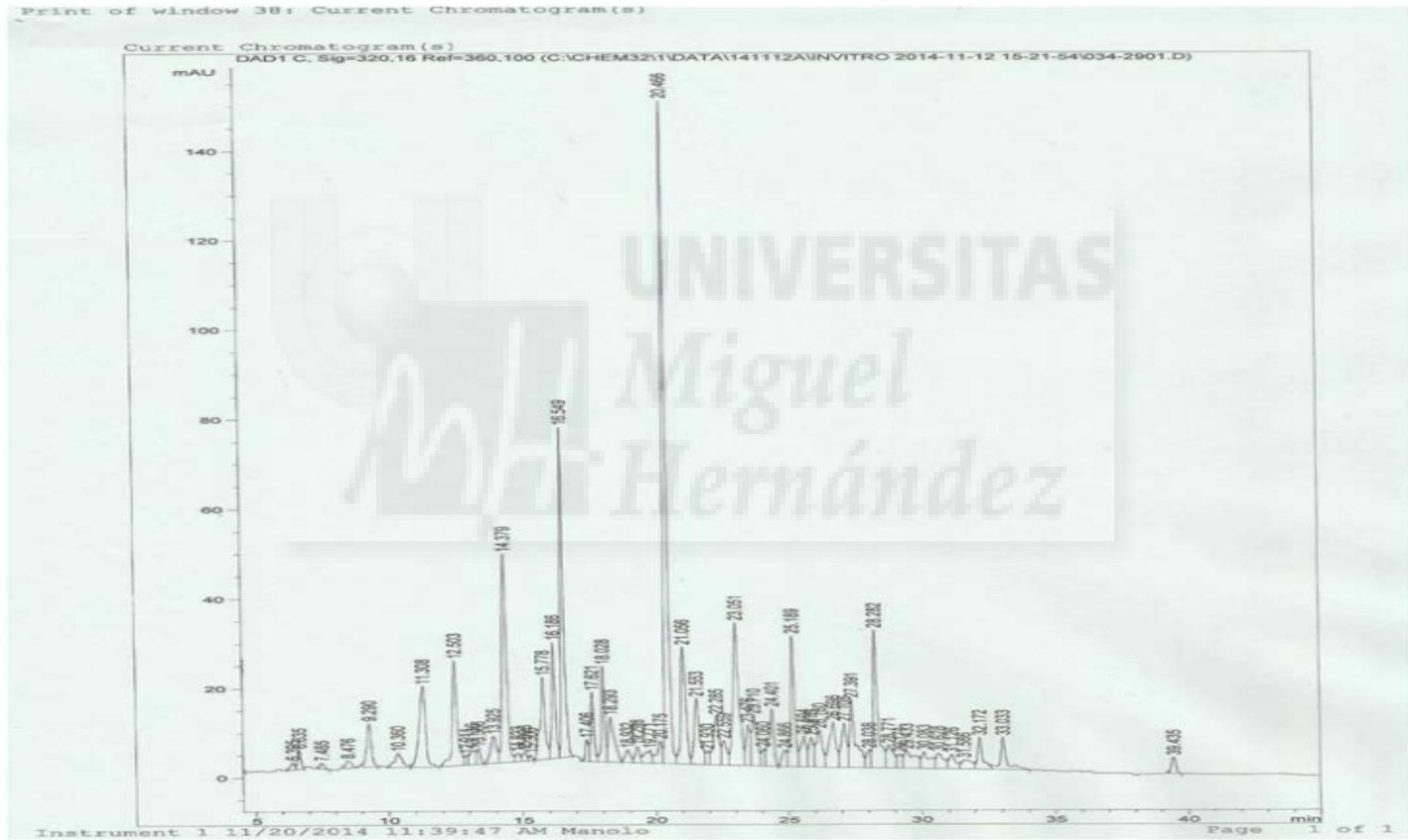
Fase de diálisis

ANEXO 6. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO LÍQUIDO DE LIMÓN EN LA FASE DE BOCA



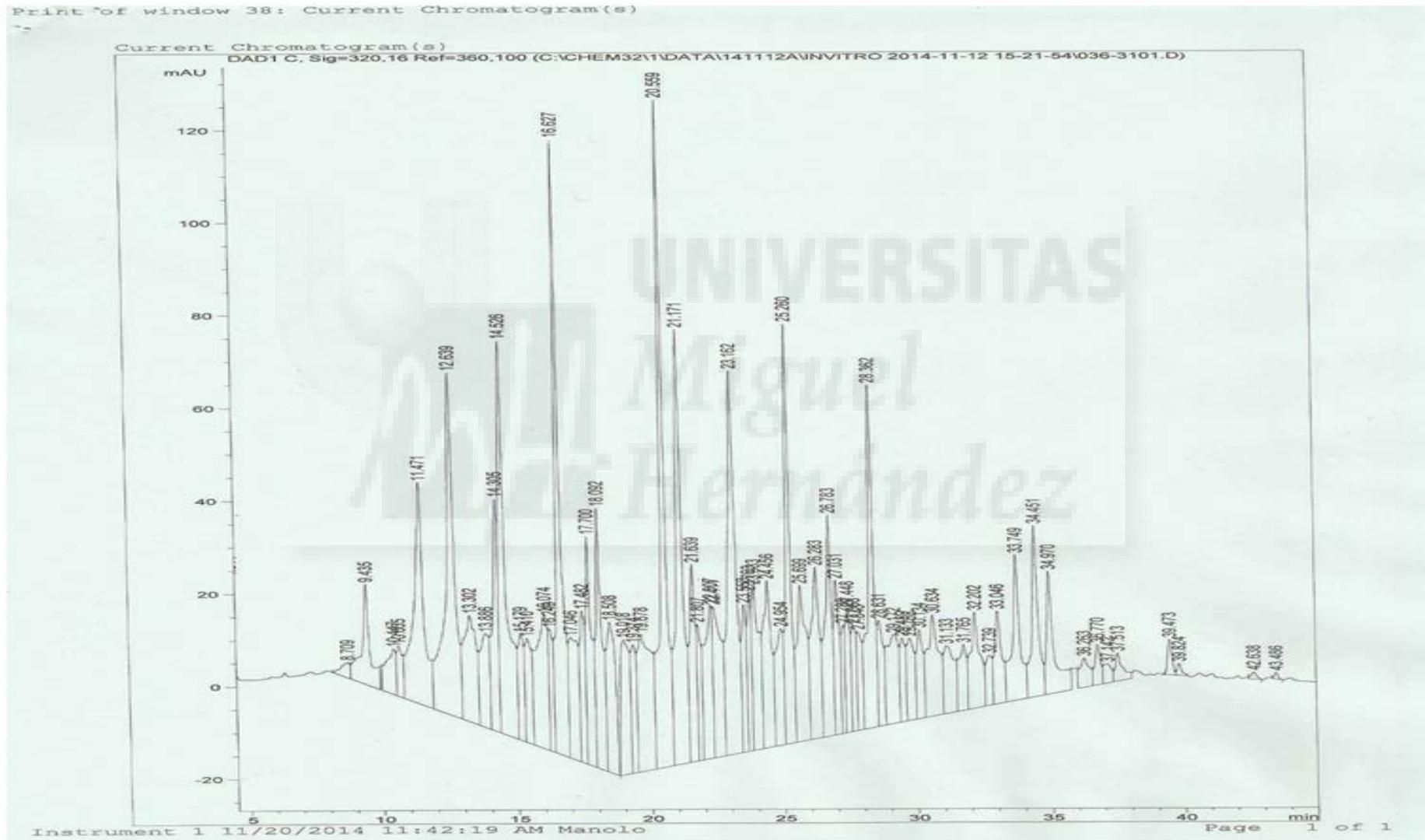
Fase boca

ANEXO 7. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO LÍQUIDO DE LIMÓN EN LA FASE DEL ESTÓMAGO



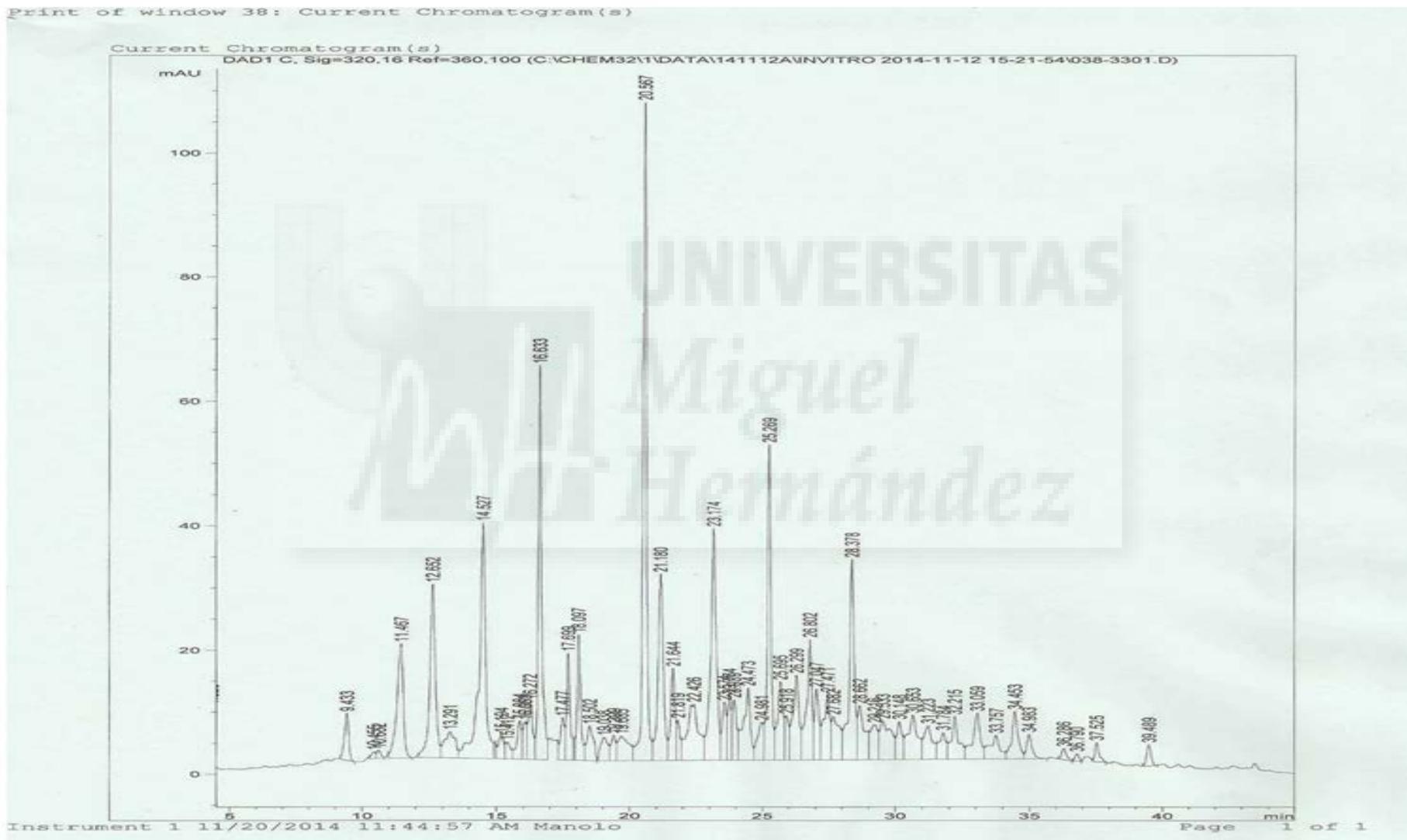
Fase boca + estómago

ANEXO 8. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO LÍQUIDO DE LIMÓN EN LA FASE DEL INTESTINO



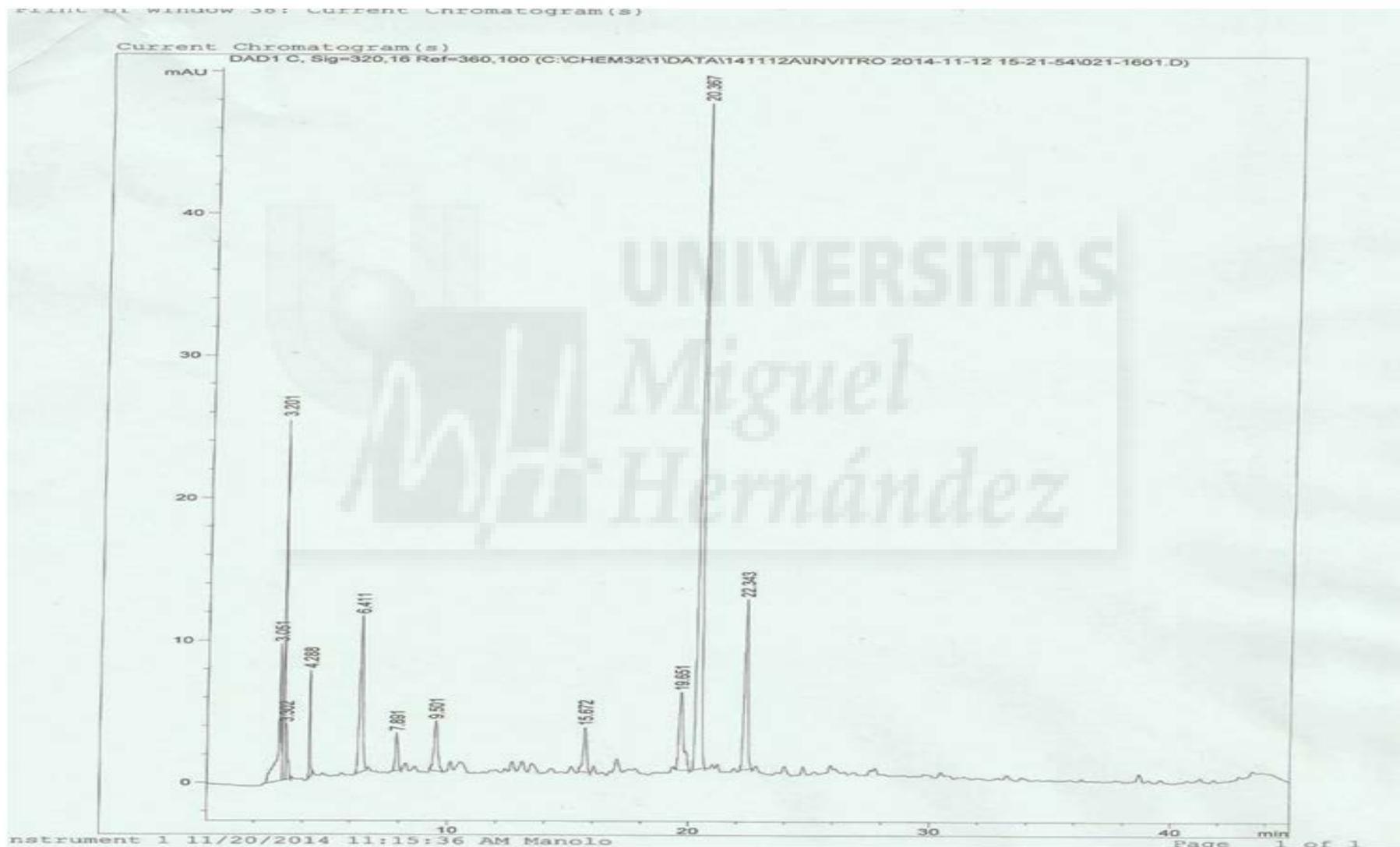
Fase boca + estómago + intestino

ANEXO 9. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO LÍQUIDO DE LIMÓN EN LA FASE DE DIÁLISIS



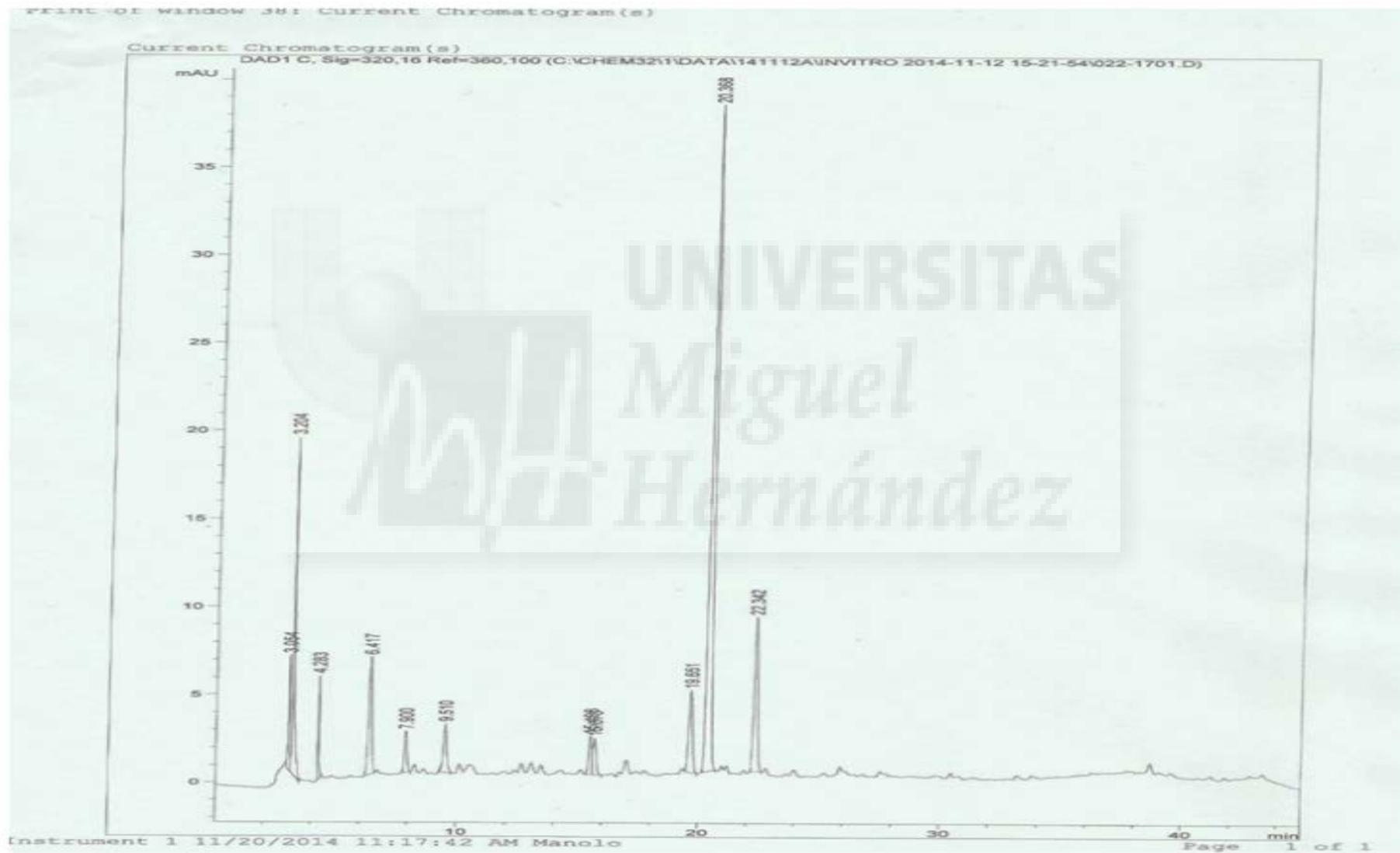
Fase de diálisis

ANEXO 10. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO DE CHUFA DE LA MUESTRA CONTROL



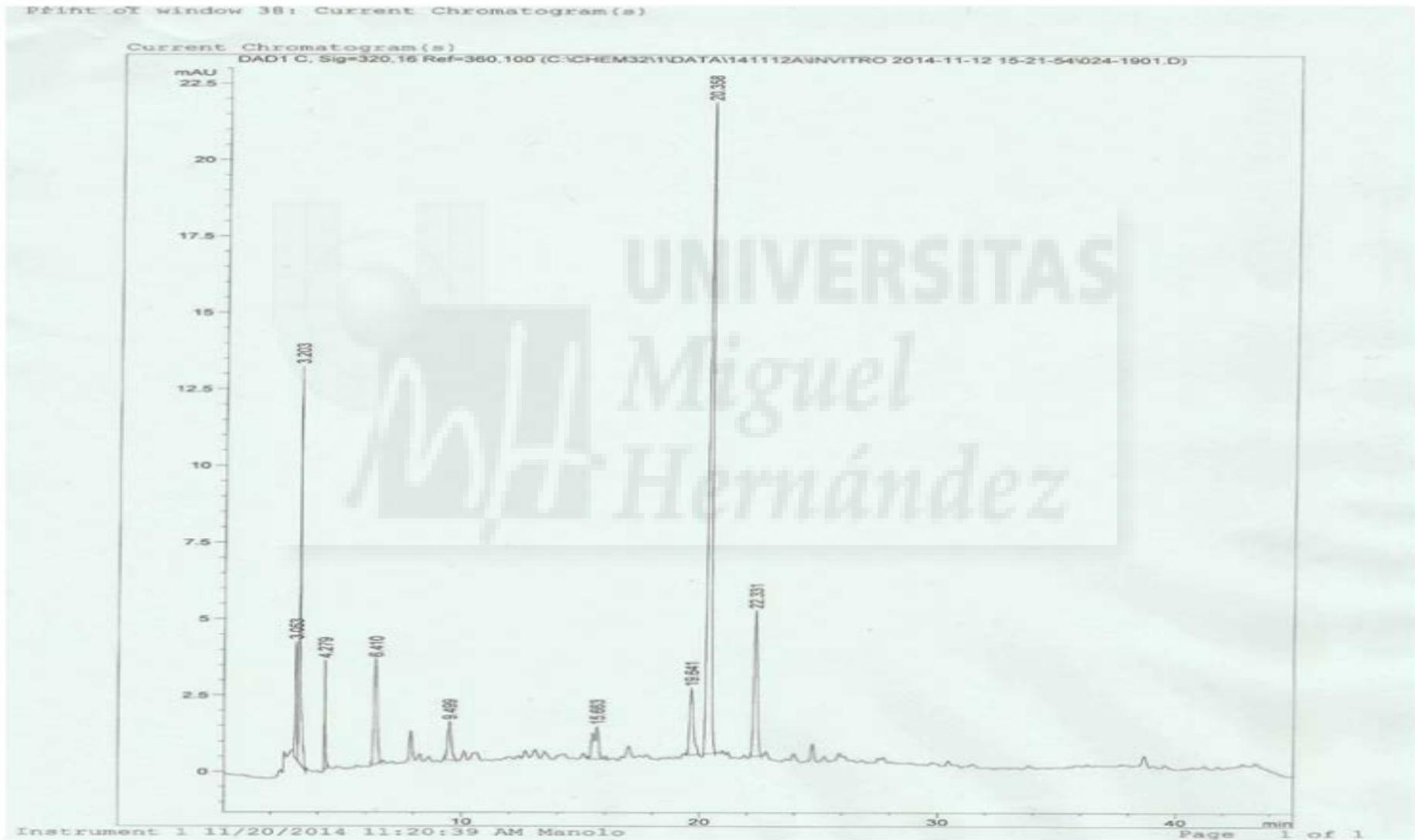
Muestra control

ANEXO 11. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO SÓLIDO DE CHUFA EN LA FASE DE BOCA



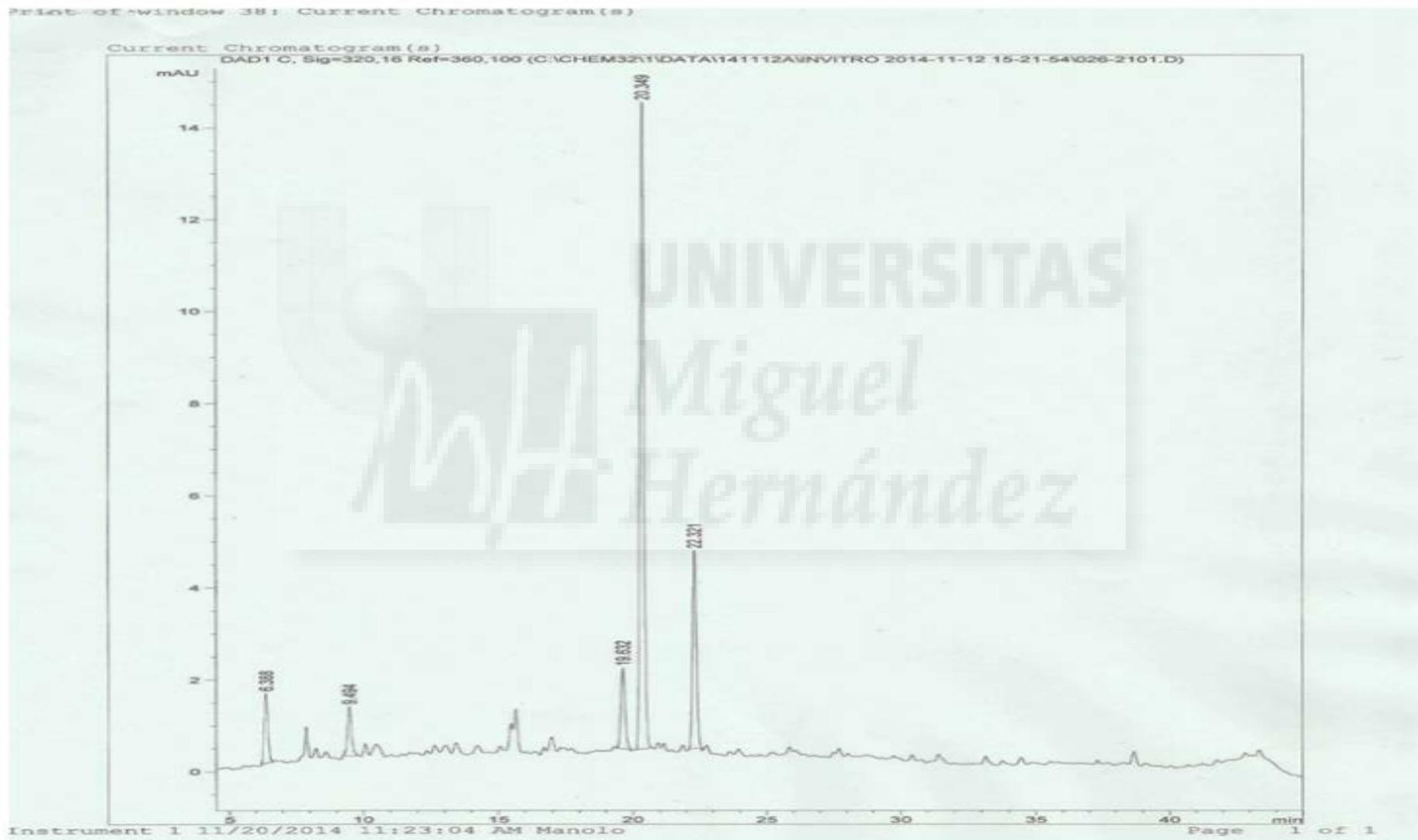
Fase boca

ANEXO 12. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO SÓLIDO DE CHUFA EN LA FASE DEL ESTÓMAGO



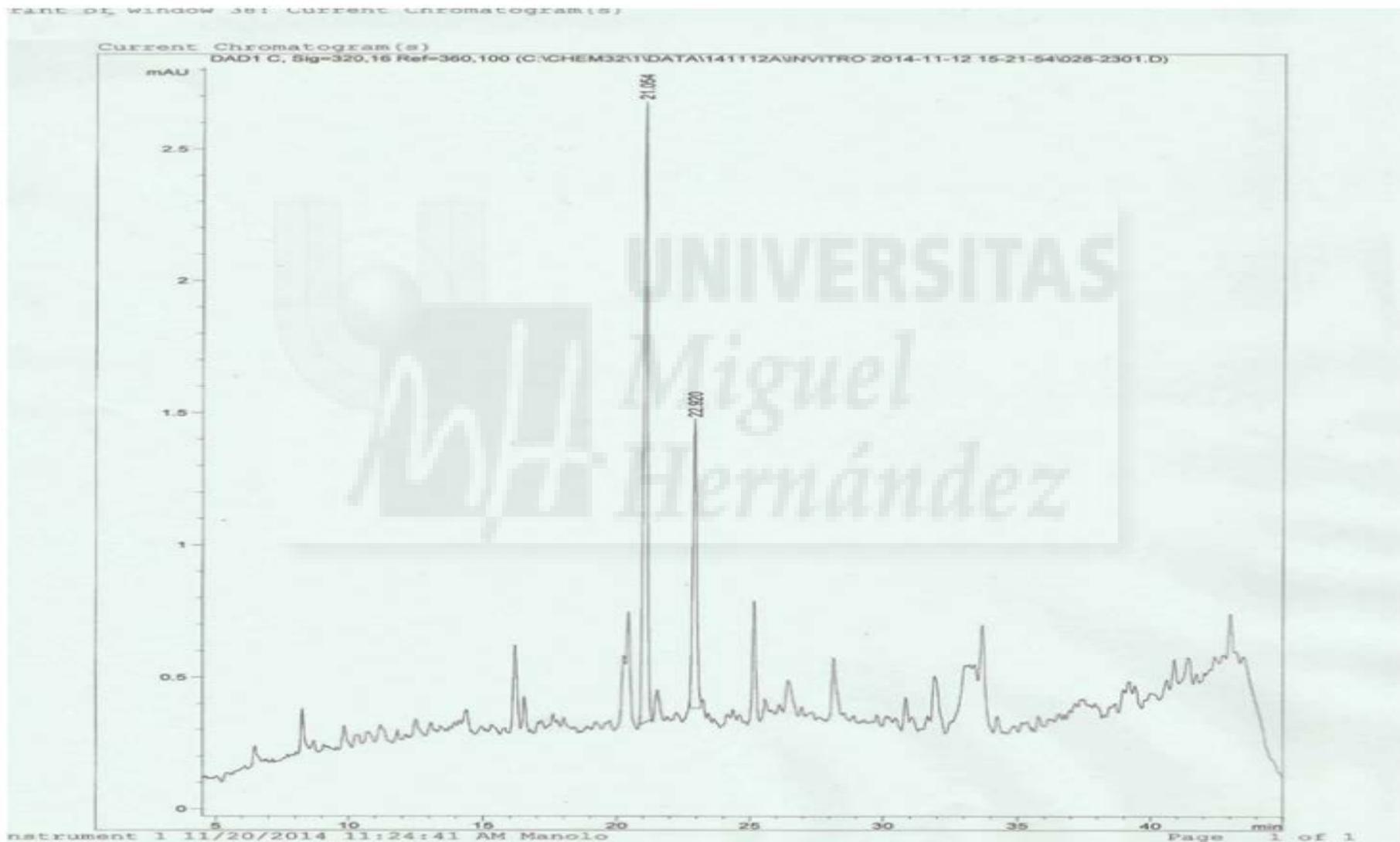
Fase boca + estómago

ANEXO 13. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO SÓLIDO DE CHUFA EN LA FASE DEL INTESTINO



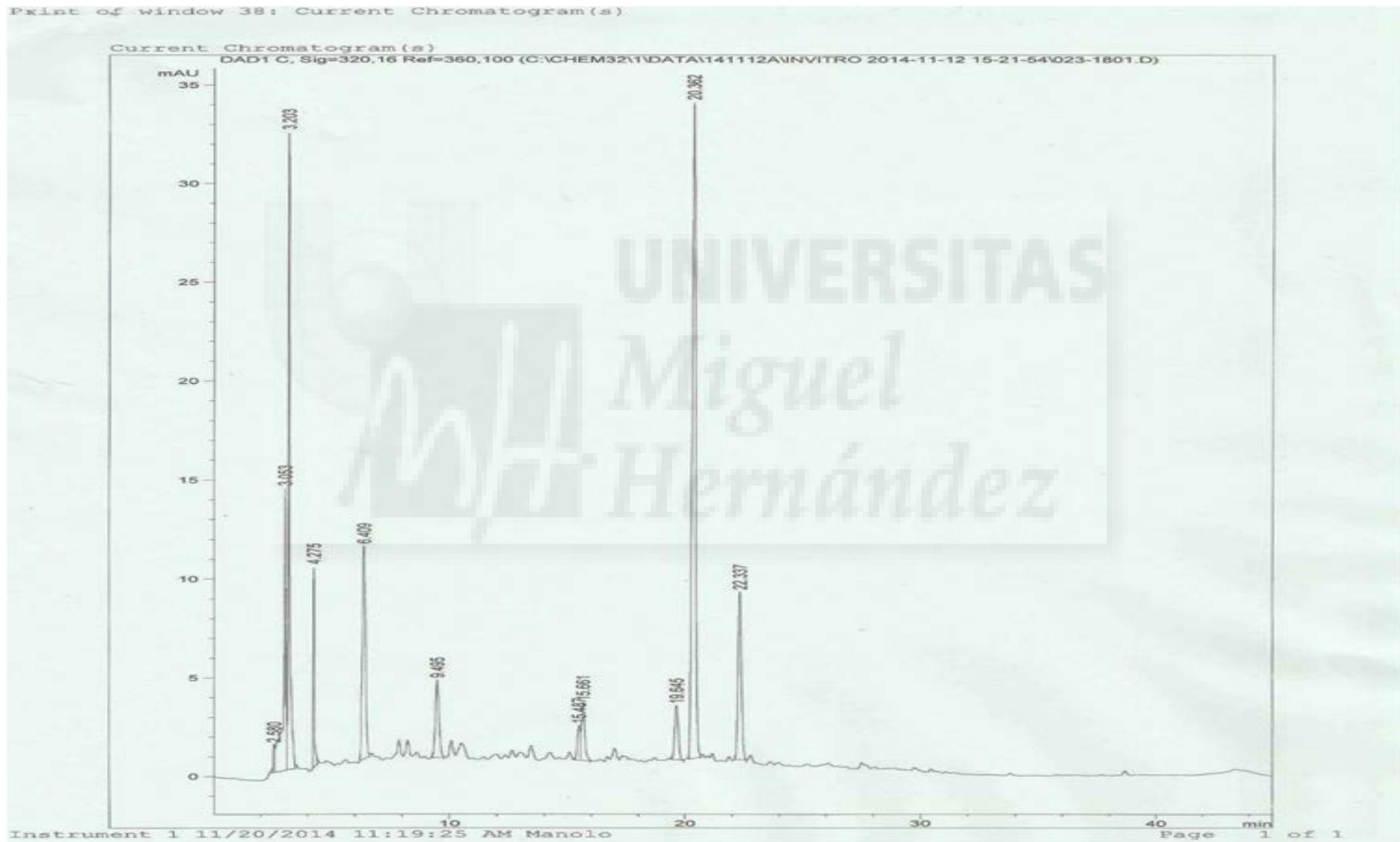
Fase boca + estómago + intestino

ANEXO 14. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO SÓLIDO DE CHUFA EN LA FASE DE DIÁLISIS



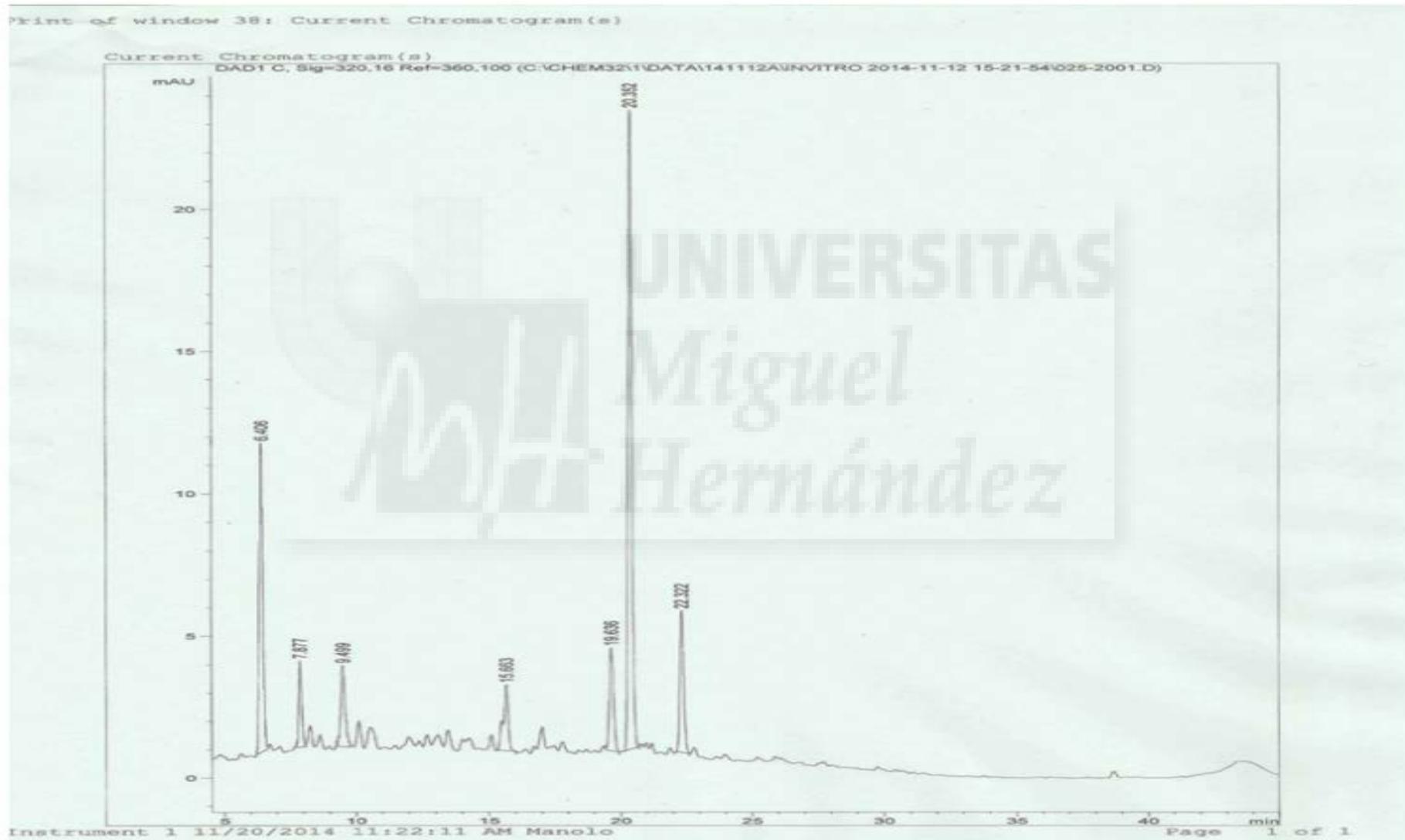
Fase de diálisis

ANEXO 15. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO LÍQUIDO DE CHUFA EN LA FASE DE BOCA



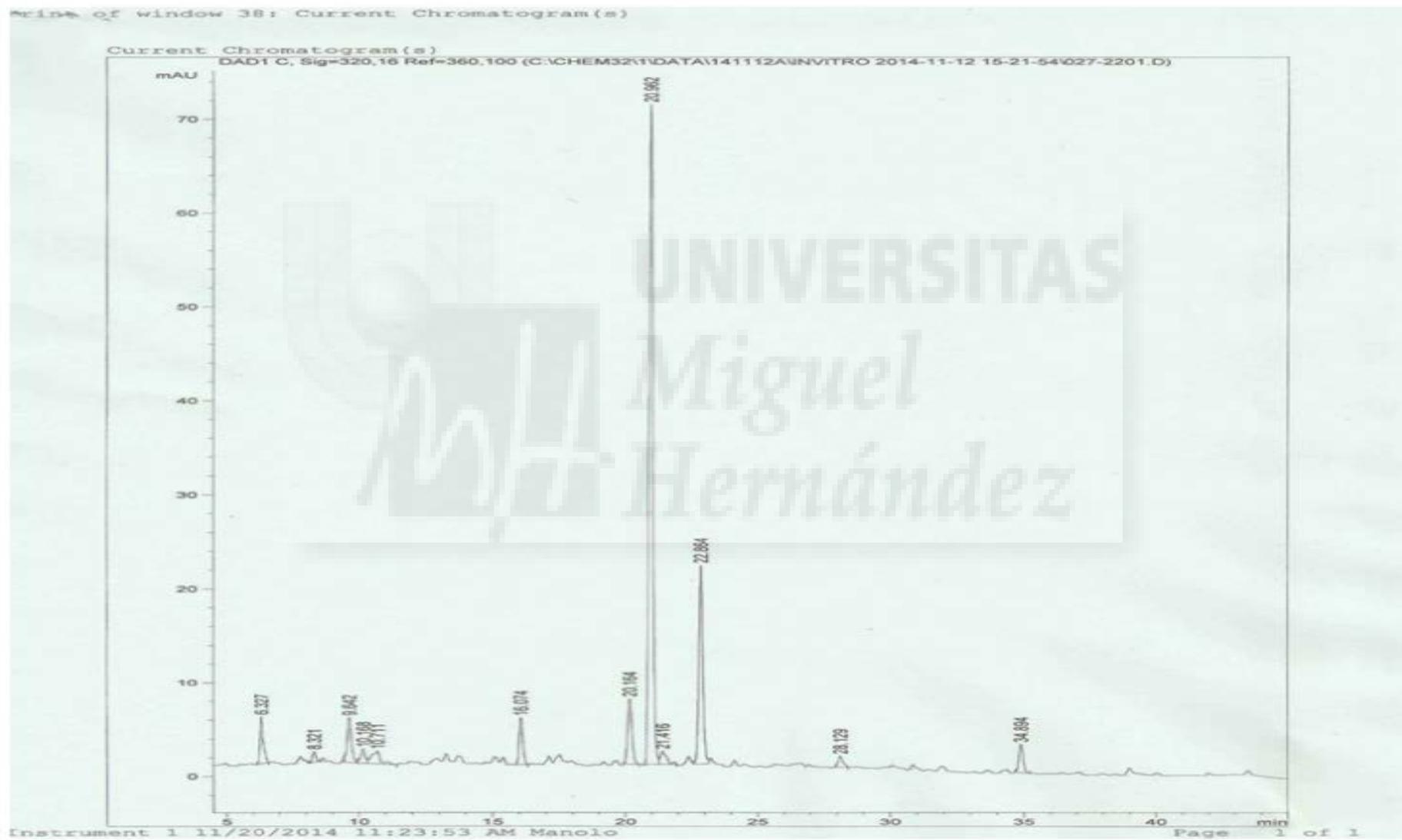
Fase boca

ANEXO 16. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO LÍQUIDO DE CHUFA EN LA FASE DEL ESTÓMAGO



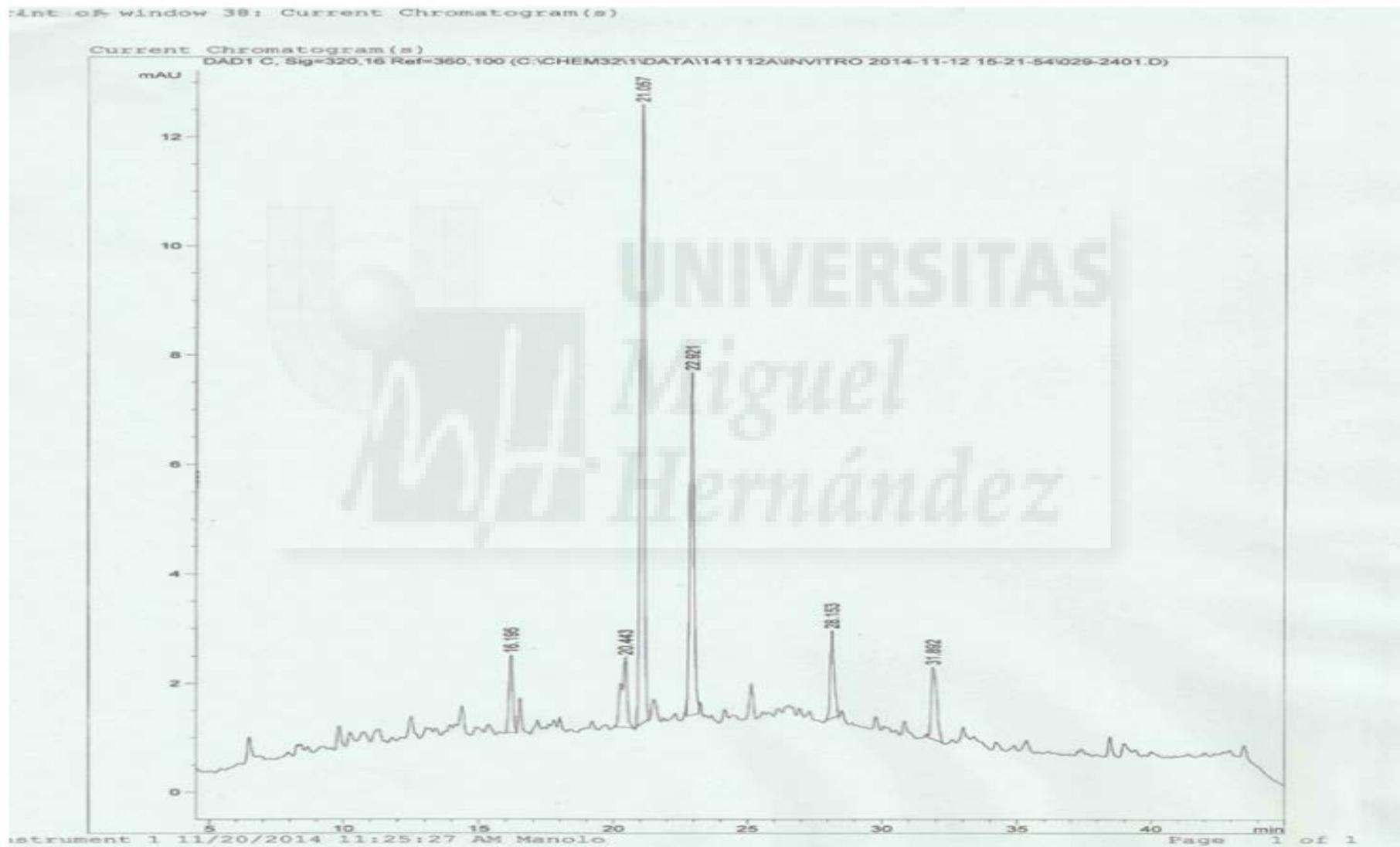
Fase boca + estómago

ANEXO 17. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO LÍQUIDO DE CHUFA EN LA FASE DEL INTESTINO



Fase boca + estómago + intestino

ANEXO 18. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO LÍQUIDO DE CHUFA EN LA FASE DE DIÁLISIS



Fase de diálisis