

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE**  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA AFROALIMENTARIA  
AREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS  
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



Curso 2015-2016

Bioaccesibilidad, cambios en potencial  
antioxidante y estabilidad de los  
compuestos bioactivos presentes en dos  
extractos ricos en fibra sometidos a un  
proceso de digestión *In vitro*

---

**AUTOR:** Daniel Adrián López López

**TUTORES:** Manuel Viuda Martos y José Ángel Pérez Álvarez

## **RESUMEN:**

Los coproductos generados en la industrialización del limón (*Citrus limon*) y el higo chumbo (*Opuntia ficus-indica*) son ricos en compuestos bioactivos de alto valor añadido como la fibra, vitaminas y compuestos polifenólicos, entre otras sustancias. Estos coproductos pueden ser utilizados como ingredientes en la elaboración de diversos alimentos siendo introducidos en forma de harinas. Para conocer el efecto de dichas harinas en el organismo, se someten tres muestras, de harina de piel de limón, de harina de piel de higo y de las harinas de limón e higo conjuntamente, a una simulación *In vitro* de la digestión humana. Esta digestión está dividida en tres fases, la fase bucal, la fase estomacal y la fase intestinal. En cada fase, las muestras son analizadas con métodos que determinan su capacidad antioxidante como son DPPH, ABTS, FIC y FRAP. Las muestras de limón y de higo muestran un alto grado de recuperación de compuestos fenólicos y flavonoides en las fases bucal y estomacal, mientras que un elevado grado de bioaccesibilidad para compuestos fenólicos en la fase final de la digestión. Los métodos antioxidantes utilizados muestran que existe una elevada cantidad de compuestos antioxidantes en nuestras muestras y se observa una sinergia positiva en la muestra de limón e higo, lo que muestra que en conjunto se potencia la actividad antioxidante de las harinas utilizadas.

## **ABSTRACT:**

The products generated in the industrialization of lemon (*Citrus limon*) and prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) are rich in bioactive compounds with high added value such as fiber, vitamins and polyphenolic compounds. These co-products can be used as ingredients in the production of different alimentary products, being introduced in the form of flour. To know the effect of this flours in the body, three samples were taken: peel lemon flour, peel fig flour and the mix of these two flours for an *In vitro* digestion simulated. This digestion is divided into three phases, the oral phase, the stomach phase and the intestinal phase. In each phase, the samples are analyzed using methods that determine their antioxidant capacity as DPPH, ABTS, FRAP and FIC. Samples of fig and lemon show a high degree of recovery of flavonoids and phenolic compounds in the mouth and stomach phases, while a high degree of bioavailability for phenolic compounds in the final phase of digestion. Antioxidants methods show that there is a high amount of antioxidant compounds in our samples and a positive synergy is observed in the mix sample showing that antioxidant activity is enhanced using the two flours at the same time.

**PALABRAS CLAVE:** Fibra, Actividad Antioxidante, Polifenoles, Digestión *In vitro*

**KEY WORDS:** Fiber, Antioxidant Activity, Polyphenols, *In vitro* Digestion

# ÍNDICE

1. Introducción.....	4
1.1 Fibra dietética.....	5
1.2 Actividad Antioxidante.....	6
1.3 Digestión <i>In vitro</i> .....	8
1.4 Justificación del trabajo.....	8
2. Antecedentes y objetivos.....	9
2.1 Objetivo general.....	10
2.2 Objetivos particulares.....	10
3. Materiales y métodos.....	11
3.1 Obtención de las muestras.....	12
3.2 Determinación del contenido en fibra dietética total (FDT), fibra dietética soluble (FDS) y fibra dietética insoluble (FDI) de los extractos de fibra.....	13
3.3 Simulación de un sistema de digestión <i>In vitro</i> .....	13
3.4 Índice de recuperación e índice de bioaccesibilidad.....	15
3.5 Preparación de los extractos.....	16
3.6 Contenido de fenoles totales (CFT).....	18
3.7 Contenido de flavonoides totales (CFIT).....	18
3.8 Análisis Estadístico.....	18
4. Resultados y discusión.....	20
4.1 Contenido en Fibra dietética en las harinas de corteza de limón y de higo.....	21
4.2 Índice de recuperación e índice de bioaccesibilidad.....	21
4.3 Métodos antioxidantes en la digestión gastrointestinal.....	25
5. Conclusiones y proyección futura.....	33
5.1 Conclusiones.....	34
5.2 Proyección futura.....	34
6. Bibliografía.....	35



# 1. INTRODUCCIÓN

## **1.1 Fibra dietética**

La primera definición de fibra dietética se realizó a mediados del siglo XX. En 1953 Hipsley define la fibra dietética como los componentes no digeribles que conforman la pared celular vegetal. Más tarde, en 1972 fue Trowell el que amplió la definición de Hipsley, basándose en unas hipótesis sobre la relación de la fibra con la salud, incluyendo la prevención de la Diverticulitis y el cáncer de colon (Burkitt et al, 1972; Trowell 1972), los efectos adversos de consumir carbohidratos refinados (Cleave et al. 1966) y la necesidad de sustituir el término "fibra cruda". La definición pasó a ser " el esqueleto de la pared celular de células vegetales que son resistentes a la digestión (hidrólisis) por las enzimas del hombre" (Trowell, 1972).

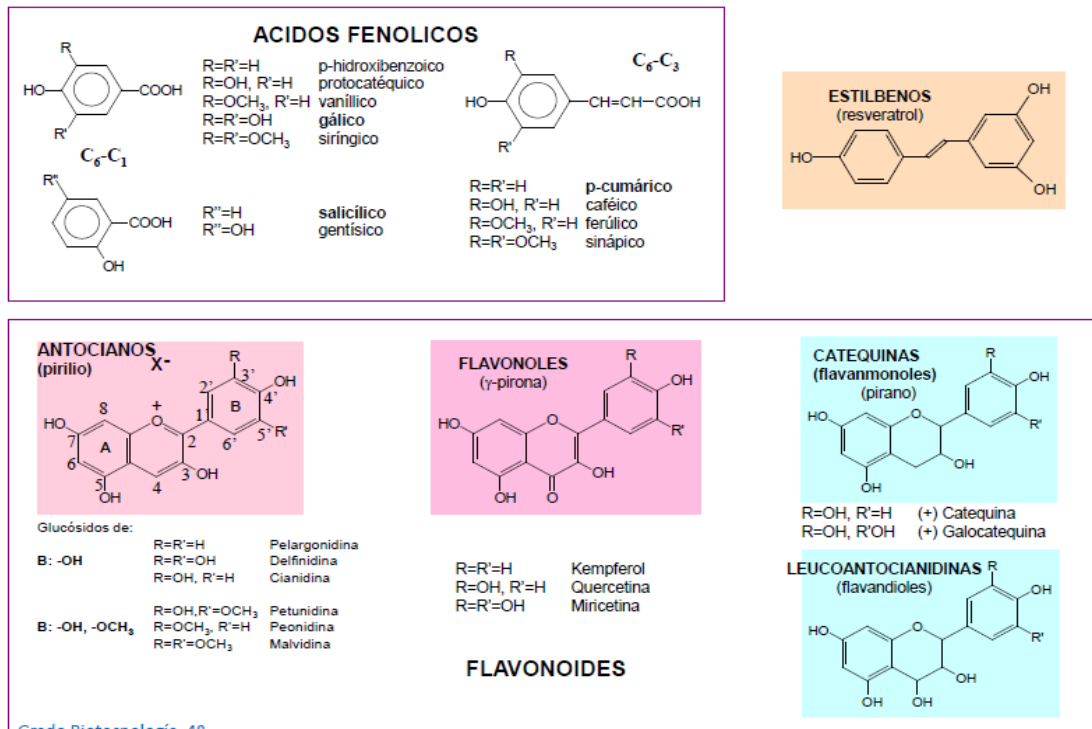
Actualmente la fibra dietética se clasifica en base a dos características: su solubilidad en agua y su capacidad de ser fermentada en el colon por la flora bacteriana. Así se habla de Fibra soluble o fermentable, y fibra insoluble o escasamente fermentable. El primer tipo incluye pectinas, algunas hemicelulosas, mucílagos, gomas,  $\beta$ -glucano. Suelen formar soluciones viscosas en agua y a ello deben sus efectos de enlentecimiento del vaciamiento gástrico y la digestión. Este tipo de fibra se fermenta por las bacterias del colon dando lugar a ácidos grasos de cadena corta que son responsables de los efectos beneficiosos de esta fibra sobre las concentraciones séricas de colesterol y de glucosa. La fibra insoluble incluye celulosa, algunas hemicelulosas y lignina. Tiene gran capacidad de retención de agua. Su efecto principal es aumentar el volumen de las heces y acelerar la velocidad de tránsito intestinal, previniendo el estreñimiento, las hemorroides, los divertículos, etc. y se ha propuesto que puede reducir el riesgo de cáncer de colon.

La fibra insoluble se encuentra principalmente en los cereales, las leguminosas, algunos frutos secos y algunas hortalizas y frutas. La fibra fermentable se encuentra en manzanas, cítricos, plátanos, espinacas, coliflor, legum-bres, la avena y la cebada.

El consumo de fibra dietética tiene numerosos efectos sobre la salud. Existen numerosas evidencias que indican que el consumo de dietas con más de 25 g/día de fibra de cereales no refinados, integrales, frutas y hortalizas se relacionan con un menor riesgo a padecer estreñimiento, diverticulosis, hemorroides, litiasis biliar, cáncer de colon, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y control del peso corporal. Existen beneficios adicionales de las dietas ricas en fibra como el menor aporte de grasa total, menor densidad energética y mayor contenido de vitaminas, minerales y componentes con acción antineoplásica y antioxidante

## **1.2 . Actividad antioxidante**

El consumo de frutas y verduras está asociado al bajo riesgo de incidencias y mortalidad de cáncer, y a menores índices de mortalidad por enfermedad coronaria, según se desprende de diversos estudios epidemiológicos. Los fenoles, especialmente los flavonoides y los antocianos, presentes en estos productos, muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades tales como: cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas. Poseen actividades anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica. En la siguiente imagen se muestran los grupos polifenólicos más presentes en los alimentos:



**Imagen 1:** Principales Grupos Polifenólicos. Fuente: Desarrollo de Moléculas Bioactivas 2014-2015

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *In vitro* o *In vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *In vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *In vivo*.

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo. Debido a ello, se mejoraron los métodos *In vitro*, de manera que se asemejaran lo más posible a una situación real.

### **1.3 Digestión In vitro**

Los métodos in vitro pretenden simular la digestión de los alimentos a lo largo del sistema digestivo de los humanos. Las ventajas de los métodos in vitro son su rapidez y su bajo coste; no obstante, los resultados obtenidos in vitro deben tomarse con cierta precaución. Las industrias, farmacéutica, parafarmacia y por supuesto la industria alimentaria en su desarrollo de alimentos funcionales se apoyan cada día más en la tecnología implementada en los modelos de digestión in vitro, modelos que simulan la digestión gastrointestinal, completados con cultivos celulares, que simulan nuestras células, para evaluar la biodisponibilidad de un compuesto activo (cantidad que es realmente utilizado por nuestro organismo). Estos avances son imprescindibles para conocer la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos activos presentes y/o incorporados en sus productos.

En otras palabras, gracias a esta tecnología se puede comprobar qué cantidad de estos compuestos bioactivos presentes y/o incorporados en diferentes matrices (medicamentos, alimentos) puede ser potencialmente absorbido por el sistema digestivo (bioaccesibilidad) y cuáles de ellas son realmente absorbidas y metabolizadas por el organismo, llegando al plasma sanguíneo y produciendo en él el efecto buscado (biodisponibilidad).

### **1.4 Justificación del trabajo**

Hoy en día, existen grandes evidencias de los efectos beneficiosos de algunas plantas, frutas o vegetales, y de sus coproductos en la industria, pero muy pocos datos del comportamiento de dichos coproductos sometidos a una digestión humana, y especialmente, de los compuestos saludables que la componen sometidos al pH de la boca, estómago o intestino.

Dicho comportamiento es el que nos interesa estudiar en este trabajo para conocer de forma clara y concisa los cambios sufridos por estos compuestos bioactivos durante el proceso biológico de la digestión



## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS



## **2.1. Objetivo General**

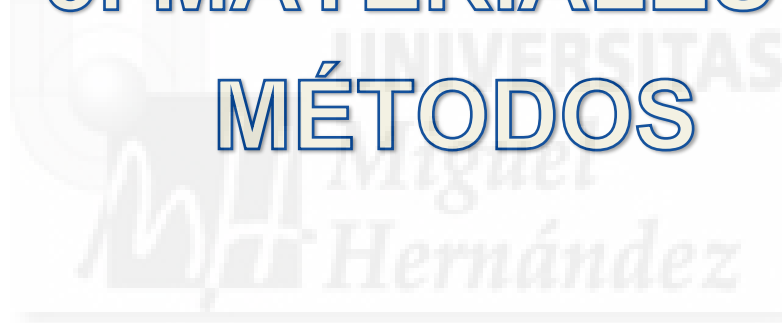
El objetivo general del presente trabajo es analizar el efecto sobre las propiedades antioxidantes y el contenido en compuestos bioactivos presentes en dos extractos ricos en fibra obtenidos a partir de coproductos generados en la industria agroalimentaria, de un proceso de simulación de una digestión *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) Determinar el índice de recuperación y la bioaccesibilidad para fenoles y flavonoides.
- 4) 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, ABTS, FIC y FRAP, 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.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS



### 3.1 Obtención de las muestras.

#### **3.1.1.- Preparación de las harinas.**

Las muestras de higo chumbo (*Opuntia ficus-indica*) y limón (*Citrus limon*) fueron recogidas de la finca experimental que dispone la Universidad Miguel Hernández en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela y trasladadas inmediatamente a las instalaciones de la planta piloto del Grupo de Investigación de Industrialización de Productos de Origen Animal (POA) de la Universidad Miguel Hernández. Posteriormente se procedió al pelado manual de ambas muestras desechando la pulpa y obteniendo como material de estudio la piel de *Opuntia ficus-indica* y *Citrus limón*. En la Figura 1 se muestra el diagrama de flujo del proceso para obtener las harinas a partir de la piel del higo chumbo y de la piel del limón.



**Figura 1.** Diagrama de flujo de la obtención de las harinas de piel de limón y de higo

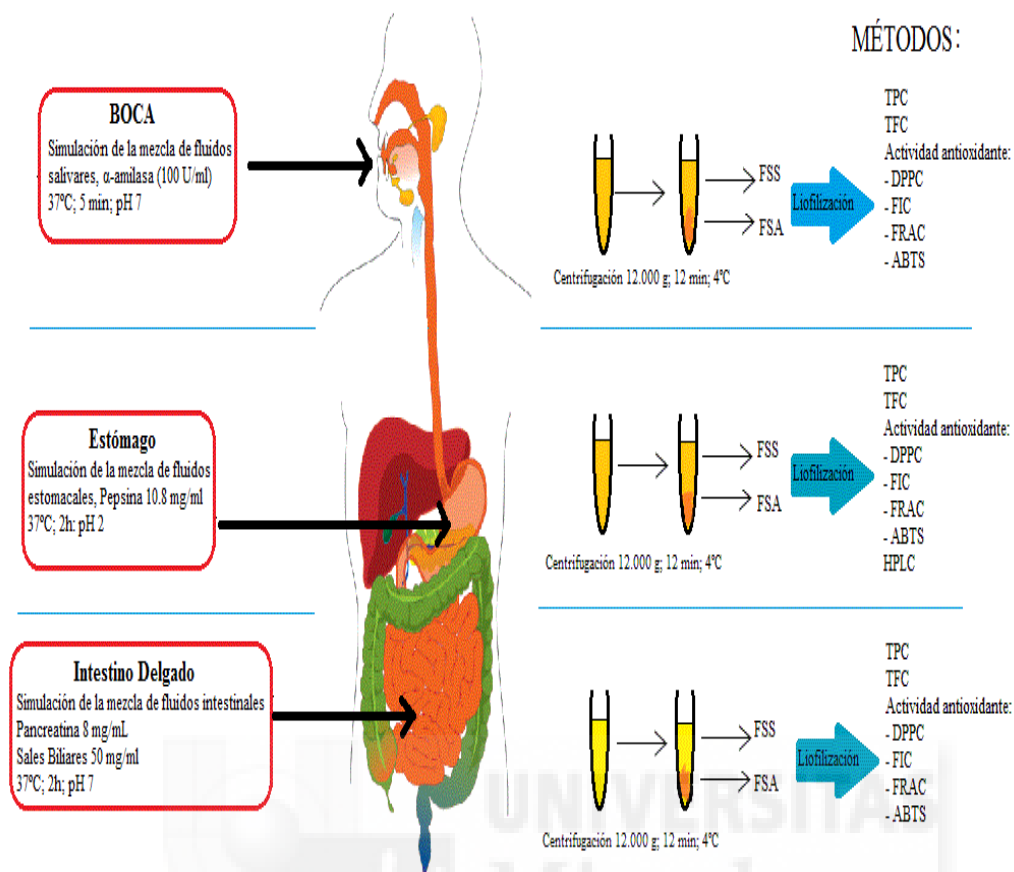
Para ello, en primer lugar se procedió, por separado a triturar la piel de cada una de las dos muestras analizadas en una cutter vertical (Tecator 1094 Homogeneizer, Tekator, Hoganas, Suecia) durante 40 segundos para obtener así partículas de un tamaño uniforme y aumentar la superficie de contacto durante el lavado que se realizó con una proporción de 1 L de agua por kg de producto. La mezcla se agitó constantemente y la temperatura del agua se mantuvo a 45 °C durante los 8 minutos que duró el proceso de lavado. Finalizado el lavado, se procedió al escurrido y posterior secado del co-producto sólido en una estufa de aire forzado durante 24 horas a 45 °C. Una vez secas, las dos fracciones se trituraron, por separado, en una cutter vertical y se envasaron, a vacío, en bolsas herméticas para su posterior uso. Las dos fracciones obtenidas y sobre las cuales se realizaran todos los análisis fueron: harina de la piel de higo chumbo (HPH) y harina de la piel de limón (HPL).

### **3.2. Determinación del contenido en fibra dietética total (FDT), fibra dietética soluble (FDS) y fibra dietética insoluble (FDI) de los extractos de fibra.**

La determinación del contenido en fibra de las muestras se realizó siguiendo el método gravimétrico-enzimático AOAC 991.43 (AOAC, 2000). La fibra dietética soluble se determinó como la diferencia entre la fibra dietética total y la fibra dietética insoluble. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **3.3. Simulación de un sistema de digestión *In vitro***

El proceso que simula la digestión *In vitro* de las distintas muestras analizadas 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 (Figura 2).



**Figura 2 :** Esquema de la simulación de las 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  $\alpha$ -amilasa (Sigma, Alemania) la cual se diluyó en  $\text{CaCl}_2$  (1 mM), el pH se ajustó a un valor de 6,9 mediante el empleo de  $\text{NaHCO}_3$  (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  $\text{NaHCO}_3$  (0,5 M; 10 ml) y 2,5 mL de mezcla de sales biliares (Sigma) (500 mg) disueltas en  $\text{NaHCO}_3$  (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 e intestino (después de la diálisis), las mezclas de la digestión se centrifugaron durante 10 min a 11000 rpm a 4 °C, produciendo una fracción soluble de quimo (FSS) y una fracción de sedimento (FSA). 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.

### **3.4. Índice de recuperación e índice de bioaccesibilidad**

Para evaluar el efecto de la composición de la matriz sobre la digestión de los grupos fenólicos presentes (ácidos fenólicos y flavonoides) se utilizaron dos tipos de índices propuestos por Ortega et al (2011): El porcentaje de recuperación y el porcentaje de bioaccesibilidad. El porcentaje de recuperación muestra la cantidad de grupos fenólicos después de la digestión completa (FSS y FSA) en la fase bucal, gástrica e intestinal de las muestras utilizadas, de acuerdo con (Ecuación 1):

$$\text{Porcentaje de recuperación (\%)} = (\text{PC}_{\text{DF}}/\text{PTPC}) \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde  $\text{PC}_{\text{DF}}$  es el contenido total en fenoles (mg) después de la digestión (FSS+FSA) y PTPC es el contenido total en fenoles de la muestra control.

Para cada grupo fenólico, el índice de bioaccesibilidad está definido por el porcentaje de compuestos polifenólicos solubilizados en FSS después de la diálisis intestinal. Del mismo modo, este índice permite definir la proporción de compuestos polifenólicos disponibles para su absorción en el sistema circulatorio (Ecuación 2):

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = (\text{PC}_{\text{S}}/\text{PC}_{\text{DF}}) \times 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde  $\text{PC}_{\text{S}}$  es el contenido total en fenoles (mg) en FSS después de la diálisis intestinal y  $\text{PC}_{\text{DF}}$  es el contenido total en fenoles (mg) en la muestra digerida

(FSS+FSA) después de la diálisis intestinal.3.5. Determinación de la actividad antioxidante

### **3.5. 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 50 y 200 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 °C. El sobrenadante obtenido fue el que se utilizó para realizar todas las determinaciones de este trabajo.

#### ***3.5.1. 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 (µg TE/g muestra) como valor medio de tres repeticiones.

#### ***3.5.2. 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  $\text{FeCl}_3$  (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 tres repeticiones.

### **3.5.3. Capacidad quelante del ión ferroso (FIC)**

La actividad quelante del ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) se midió inhibiendo la formación del complejo ferrocina- $\text{Fe}^{2+}$  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  $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (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  $\mu\text{g}$  de equivalentes de EDTA por gramo de muestra ( $\mu\text{g}$  EDTA/g muestra) como valor medio de tres repeticiones.

### **3.5.4. ABTS Capacidad secuestrante del radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS•+)**

Para la determinación de la capacidad secuestrante del radical ABTS•+ se siguió la metodología descrita por Leite et al. (2011) con algunas modificaciones. Éste método se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS•+) con el antioxidante presente en la muestra. El radical se obtuvo tras la reacción del ABTS•+ (7 mM) en buffer acetato de sodio 20 mM (pH 4,5) y persulfato de potasio (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C) y diluido en el mismo buffer hasta obtener una absorbancia de 0,70 ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm. Para el ensayo se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de las distintas muestras de aceite esencial y 990  $\mu\text{L}$  de radical ABTS•+ midiendo la absorbancia a 734 nm tras 6 min de incubación. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de Trolox

por gramo de muestra (mg TE/g muestra) como valor medio de tres repeticiones.

### **3.6. 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 tres repeticiones por cada muestra analizada.

### **3.7. 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 NaNO<sub>2</sub> (5%) y transcurridos 5 min se adicionaron 0,3 mL de AlCl<sub>3</sub> (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.

### **3.8. 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 las 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 uno o dos dependiendo del ensayo realizado. Para estudiar entre que variables de los factores principales las diferencias fueron estadísticamente significativas se realizaron contrastes entre las medias aplicando el test de Tukey siguiendo las recomendaciones de Afifi y Azen (1979).



# 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4.1. Contenido en Fibra dietética en las harinas de corteza de limón y de higo**

En la Tabla 1 se muestran se muestran el contenido en fibra dietética total (FDT), el contenido en fibra dietética insoluble (FDI), el contenido en fibra dietética soluble (FDS) y el ratio FDI/FDS de las harinas de piel de limón y de higo.

**Tabla 1.** Contenido en Fibra Dietética Total (FDT), Fibra Dietética Insoluble (FDI) y Fibra Dietética Soluble (FDS) en las muestras de HPH y HPL.

	FDT (g/100g)	FDI (g/100g)	SDF (g/100g)	Ratio FDI/SDF
Limón (HPL)	69,85±2,65	38,23±1,45	31,62±1,33	1,21±0,04
Higo Chumbo	63,58±2,69	12,33±1,29	51,25±1,78	0,24±0,05

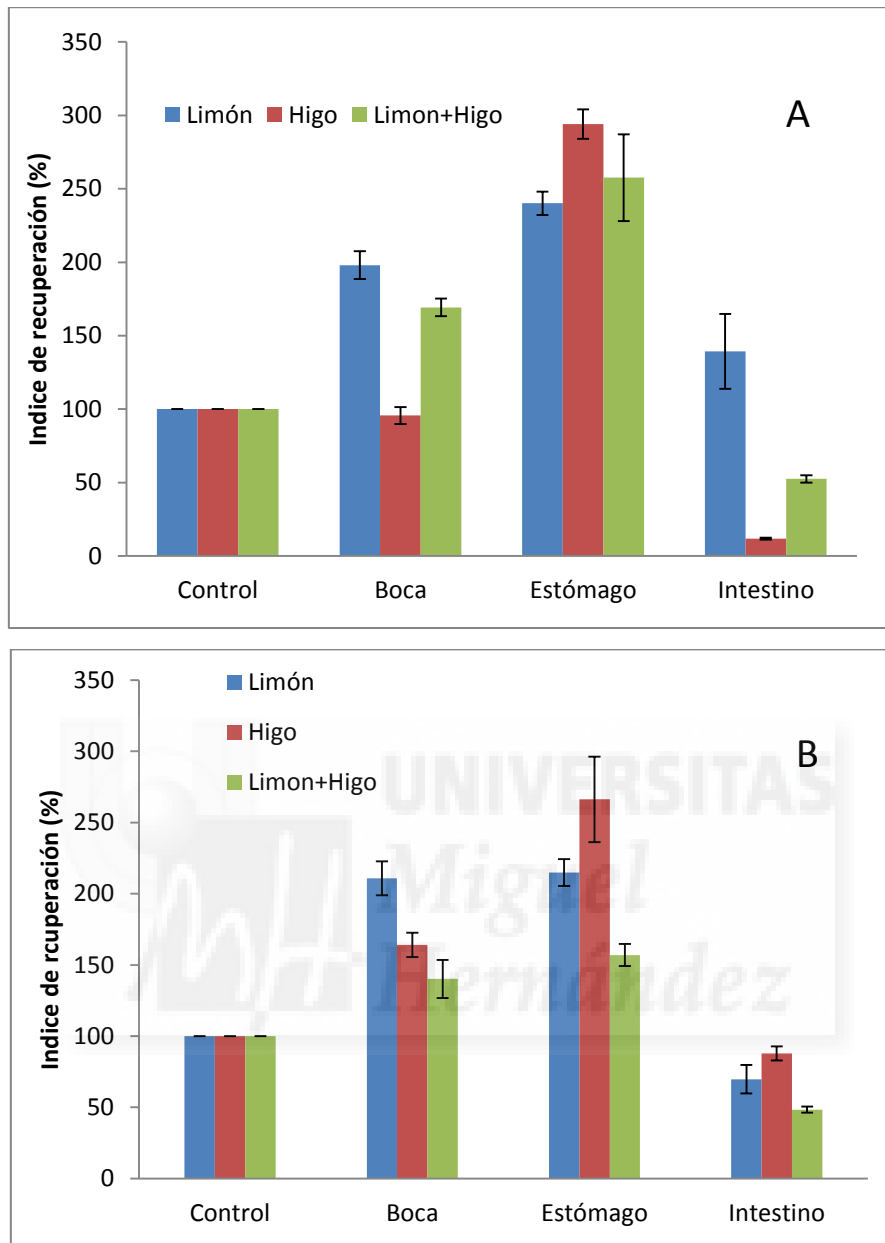
En cuanto al contenido en FDT, se observa un mayor contenido en FDT en la corteza del limón, siendo ligeramente superior al contenido en fibra dietética del higo chumbo. Con respecto al contenido en FDI, se observan diferencias significativas entre ambas muestras, siendo el limón tres veces más rico en FDI que el higo chumbo. Por el contrario, la corteza del higo tiene gran cantidad de FDS, mientras que la corteza del limón tiene aproximadamente la mitad de FDS que la corteza de limón. Comparando con los resultados obtenidos por Cerda-Tapia et al. (2015) sobre sus estudios con harina de manzana, el contenido en FDT es similar al de nuestras muestras (70,91 g/100g), sin embargo difiere en el contenido en FDI y FDS. La harina de manzana presenta un valor de FDI muy superior al de FDS (59.81 y 11.10 g/100g respectivamente).

El ratio FDI/FDS muestra unos valores de 1,21/1 en la corteza del limón y unos valores cercanos a 0, 0,24/1 en la corteza del higo chumbo. En el estudio realizado por Cerda-Tapia et al. (2015) obtienen unos valores para el ratio FDI/FDS de 1,7/1, valores muy por encima de los obtenidos en nuestras muestras. Generalmente se consideran adecuadas cantidades de fibra en alimentos con un ratio de aproximadamente 2/1.

#### **4.2. Índice de recuperación e índice de bioaccesibilidad**

La figura 3 muestra el índice de recuperación en fenoles (TP) y en flavonoides (TF) después de la digestión en las fases bucal, gástrica e intestinal

de HPH, HPL y HPL+HPH.

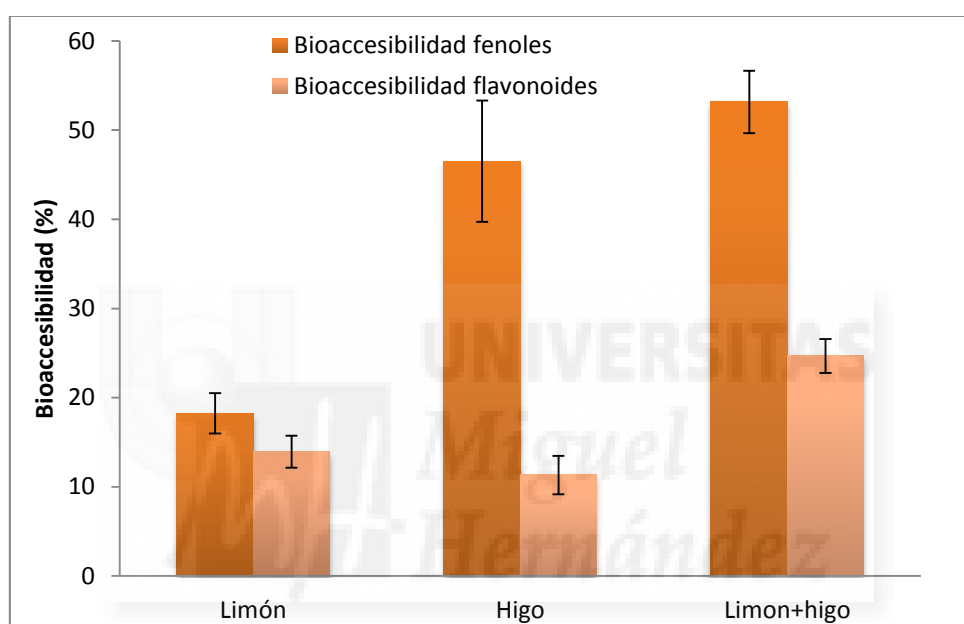


**Figura 3.** Índice de recuperación para el contenido total en fenoles (A) y contenido total en flavonoides (B) en las distintas fases de una simulación de la digestión.

Los valores de la muestra control fueron obtenidos usando una extracción de metanol, y se asumen como el 100% del contenido total en fenoles y flavonoides. Para la fase bucal, se observa un incremento significativo en TP de HPL y HPL+HPH ( $p < 0.05$ ) con valores de 198.03% y 169.29% respectivamente, mientras que para HPH no hay variación ( $p > 0,05$ ) con respecto de la muestra control. Por el contrario, en TF, todas las muestras presentaron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ), siendo la muestra de HPL la que muestra mayor TF con 210.86%. En la fase siguiente de la digestión, gástrica, el valor de TP se incrementa en más del doble ( $p < 0.05$ ) para todas las muestras con respecto de la muestra control, siendo el aumento más significativo ( $p < 0.05$ ) el de HPH triplicando los valores de la fase bucal con 294.04%, mientras que en los valores de TF se observa un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto de la muestra control, pero un incremento mínimo con respecto de la fase bucal en HPL y HPHL, y un aumento considerable ( $p < 0.05$ ) en la muestra HPH con un valor de 266.27%. Esta liberación tanto de flavonoides como fenoles después de la fase bucal y gástrica puede deberse a los compuestos digestivos presentes en boca y estomago que degradan los compuestos hasta convertirlos en proteínas, azúcares o fibra de tamaño menor. De este modo, Saura-Calixto et al. (2007) informó que los compuestos flavonoides ligados a compuestos de alto peso molecular, como proteínas y carbohidratos, pueden liberarse mediante acción enzimática durante la digestión, produciendo un incremento significativo en sus concentraciones después de la digestión estomacal. En la fase final de la digestión, el intestino delgado, los valores tanto de TP y TF disminuyeron considerablemente ( $p < 0.05$ ) con respecto de las anteriores etapas. La disminución más significativa ( $p < 0.05$ ) en TP se aprecia en HPH con un índice de recuperación de 11.90%, muy por debajo de los valores control, bucal y estomacal. Por el contrario, el valor de TP de HPL sigue siendo mayor que el valor control, aunque se observa una gran disminución ( $p < 0.05$ ) con respecto del valor de la fase gástrica. En cuanto a los valores de TF, todos se encuentran por debajo del valor control. Estas observaciones concuerdan con el estudio realizado por Ortega et al. (2011) donde sus índices de recuperación de TP y TF para la harina de algarrobo, disminuyeron después de la fase intestinal. Lo mismo observaron Li et al. (2014) cuando disminuyeron sus

valores TP y TF en su estudio sobre el tomate púrpura. Argyri et al. (2006) observaron que la solubilidad y la disponibilidad de compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides), están influenciadas por el pH y las interacciones con otros compuestos de la dieta como el hierro, la fibra o las proteínas.

Para calcular la bioactividad (Figura 4), tanto los compuestos fenólicos como los compuestos flavonoides deben ser bioaccesibles, es decir, liberados de la matriz del alimento y correctamente solubilizados tal y como propone Bouayed et al. (2011).



**Figura 4.** Bioaccesibilidad para el contenido total en fenoles y flavonoides para las muestras HPH, HPL HPHL en la fase final de la digestión *In vitro*.

La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y flavonoides en HPL al final de la digestión es de 18,25 y 13,94% respectivamente, 46,53 y 11,32% para los valores de HPH y 53,15 y 24,67% para los valores de HPHL. Estos valores sugieren cambios importantes en los compuestos fenólicos y flavonoides como modificaciones de la estructura química, aumento o disminución de la solubilidad o de la interacción con otros compuestos durante la digestión de las harinas utilizadas, que pueden influenciar la bioaccesibilidad. Así mismo, Helal et al. (2014) obtuvieron un valor de bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de 79,8% en una bebida de canela. Beatriz Gullón et al. (2015a) obtuvieron unos valores de bioaccesibilidad para compuestos fenólicos



y flavonoides de 35,90 y 64,02% respectivamente en muestras de harina de piel de granada.

#### **4.3. Métodos antioxidantes en la digestión gastrointestinal.**

La actividad antioxidante de las muestras utilizadas viene determinada por su contenido en ácidos fenólicos y flavonoides. La actividad antioxidante de las muestras está determinada por múltiples reacciones y mecanismos que intervienen a lo largo del proceso digestivo. Es por ello que se necesitan varios métodos para calcular la actividad antioxidante. Dichos métodos se repetirán en cada fase de la digestión *in vitro* ya que dichas reacciones y mecanismos pueden producirse exclusivamente en ciertas fases de la digestión. Tal y como propone Viuda Martos et al. (2011), cada método solo proporciona una estimación subjetiva de la capacidad antioxidante ya que depende de los reactivos y las condiciones utilizadas. Es por ello que en nuestro estudio sobre HPH, HPL y HPHL se realizaron 4 métodos para calcular su capacidad antioxidante, y su análisis por separado permitirá evaluar los cambios producidos durante la digestión simulada. En la Tabla 2 se observan todos los resultados de los métodos antioxidantes utilizados en las distintas fases de la digestión.

**Tabla 2.** Determinación de la capacidad antioxidante de distintas fracciones (Fracción sólida (FSA) y fracción soluble (FSS)) obtenidas a partir de diferentes muestras de harina de piel y pulpa de limón (HPL), harina de piel y pulpa de higo (HPH) y de la mezcla de las harinas de piel y pulpa de limón e higo (HPLH), sometidas a una simulación gastrointestinal (Fases Boca, Estómago, Intestino).

Ensayo	Muestra	Control	Fase Boca				Fase Estómago				Fase Intestino			
			FSA	FSS	Total	% var.	FSA	FSS	Total	% var.	FSA	FSS	Total	% var.
FIC	HPL	0.04±0.00 <sup>dA</sup>	0.19±0.03 <sup>xA</sup>	0.02±0.00 <sup>yB</sup>	0.21±0.02 <sup>aB</sup>	474.7	0.08±0.01 <sup>xB</sup>	0.01±0.00 <sup>yC</sup>	0.09±0.00 <sup>cC</sup>	137.8	0.11±0.00 <sup>xB</sup>	0.03±0.00 <sup>yB</sup>	0.14±0.00 <sup>bB</sup>	290.8
	HPH	0.05±0.00 <sup>dB</sup>	0.20±0.00 <sup>xA</sup>	0.03±0.00 <sup>yB</sup>	0.23±0.00 <sup>aB</sup>	352.8	0.12±0.00 <sup>xA</sup>	0.02±0.00 <sup>yB</sup>	0.14±0.00 <sup>bA</sup>	169.1	0.08±0.00 <sup>xC</sup>	0.02±0.00 <sup>yC</sup>	0.10±0.00 <sup>cC</sup>	101.3
	HPLH	0.05±0.00 <sup>dB</sup>	0.20±0.00 <sup>xA</sup>	0.06±0.00 <sup>yA</sup>	0.26±0.00 <sup>aA</sup>	420.0	0.05±0.00 <sup>yC</sup>	0.06±0.00 <sup>xA</sup>	0.11±0.00 <sup>bB</sup>	120.0	0.12±0.00 <sup>xA</sup>	0.06±0.00 <sup>yA</sup>	0.18±0.00 <sup>bA</sup>	260.0
FRAP	HPL	4.99±0.06 <sup>dB</sup>	17.01±0.04 <sup>xA</sup>	1.24±0.13 <sup>yC</sup>	18.25±0.82 <sup>bA</sup>	264.4	24.40±1.16 <sup>xA</sup>	3.37±0.37 <sup>yB</sup>	27.77±0.56 <sup>aA</sup>	456.2	4.98±1.04 <sup>xA</sup>	1.46±0.16 <sup>yB</sup>	6.45±0.19 <sup>cA</sup>	29.1
	HPH	4.17±0.48 <sup>cC</sup>	4.73±0.31 <sup>xC</sup>	1.90±0.19 <sup>yA</sup>	6.62±0.09 <sup>bC</sup>	58.9	9.98±0.48 <sup>xC</sup>	6.94±0.64 <sup>yA</sup>	16.92±0.11 <sup>aC</sup>	305.8	0.53±0.10 <sup>xC</sup>	0.36±0.07 <sup>xC</sup>	0.89±0.02 <sup>dC</sup>	-78.6
	HPLH	5.81±0.12 <sup>cA</sup>	12.20±0.53 <sup>xB</sup>	1.68±0.15 <sup>yB</sup>	13.88±0.27 <sup>bB</sup>	138.9	20.17±0.55 <sup>xB</sup>	3.71±0.19 <sup>yB</sup>	23.88±0.25 <sup>aB</sup>	311.0	1.99±0.19 <sup>xB</sup>	1.91±0.02 <sup>xA</sup>	3.90±0.11 <sup>dB</sup>	-32.9
DPPH	HPL	0.60±0.01 <sup>cA</sup>	0.90±0.07 <sup>xB</sup>	0.03±0.02 <sup>yB</sup>	0.93±0.03 <sup>bB</sup>	53.4	1.01±0.06 <sup>xA</sup>	0.17±0.01 <sup>yC</sup>	1.18±0.04 <sup>bB</sup>	95.27	0.66±0.49 <sup>xA</sup>	0.19±0.05 <sup>yA</sup>	0.85±0.13 <sup>bA</sup>	40.8
	HPH	0.60±0.02 <sup>bA</sup>	0.34±0.01 <sup>xC</sup>	0.27±0.02 <sup>yA</sup>	0.62±0.08 <sup>bC</sup>	3.4	1.02±0.08 <sup>xA</sup>	0.64±0.04 <sup>yA</sup>	1.66±0.03 <sup>aA</sup>	176.7	0.00±0.00 <sup>xC</sup>	0.00±0.00 <sup>xC</sup>	0.00±0.00 <sup>cC</sup>	---
	HPLH	0.57±0.01 <sup>bA</sup>	1.15±0.14 <sup>xA</sup>	0.02±0.00 <sup>yB</sup>	1.17±0.09 <sup>aA</sup>	105.3	1.03±0.11 <sup>xA</sup>	0.24±0.02 <sup>yB</sup>	1.28±0.07 <sup>aB</sup>	124.6	0.07±0.01 <sup>xB</sup>	0.03±0.00 <sup>yB</sup>	0.10±0.01 <sup>cB</sup>	-82.5
ABTS	HPL	4.90±0.26 <sup>dB</sup>	9.63±0.11 <sup>xB</sup>	0.47±0.44 <sup>yC</sup>	10.10±0.06 <sup>aB</sup>	106.1	9.32±0.44 <sup>xB</sup>	1.05±0.01 <sup>yB</sup>	10.37±0.30 <sup>aB</sup>	111.6	3.07±0.55 <sup>xB</sup>	0.72±0.10 <sup>yB</sup>	3.79±0.31 <sup>cC</sup>	-22.6
	HPH	3.83±0.26 <sup>bC</sup>	2.54±0.36 <sup>xC</sup>	1.22±0.09 <sup>yB</sup>	3.75±0.20 <sup>bC</sup>	-2.1	4.16±0.29 <sup>xC</sup>	2.42±0.33 <sup>yA</sup>	6.58±0.03 <sup>aC</sup>	71.8	0.32±0.08 <sup>xC</sup>	0.33±0.06 <sup>yC</sup>	0.66±0.01 <sup>cB</sup>	-82.8
	HPLH	6.54±0.11 <sup>cA</sup>	11.36±1.08 <sup>xA</sup>	1.70±0.36 <sup>yA</sup>	13.06±0.51 <sup>bA</sup>	99.7	11.09±1.07 <sup>xA</sup>	2.21±0.24 <sup>yA</sup>	13.30±0.58 <sup>bA</sup>	103.4	5.14±0.27 <sup>xA</sup>	1.51±0.30 <sup>yA</sup>	6.65±0.02 <sup>aA</sup>	1.7

FSA: Fracción sólida; FSS: Fracción soluble.

% Var.: Porcentaje de la variación entre las muestras control y las muestras obtenidas después de la digestión.

Para el mismo ensayo antioxidante y la misma muestra, los valores en la misma fila seguidos del mismo índice de letra (a-d) no muestran diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en acuerdo con el test de Tukey de Rango Múltiple.

Para el mismo ensayo antioxidante y la misma muestra, los valores en la misma fila seguidos del mismo índice de letra (x-y) no muestran diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en acuerdo con el test de Tukey de Rango Múltiple.

Para la misma fase digestiva y el mismo ensayo antioxidante, los valores en la misma columna seguidos del mismo índice de letra (A-B) no muestran diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en acuerdo con el test de Tukey de Rango Múltiple.

FIC: expresado en mg EDTA equivalente/g.; FRAP: expresado en mg Trolox equivalente/g.; ABTS: expresado en mg Trolox equivalente/g.; DPPH: expresado en mg Trolox equivalente/g.

#### **4.3.1. Capacidad quelante del ión ferroso (FIC)**

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos para el método FIC en las distintas fases de la digestión para las muestras HPL, HPH y HPHL. En la fase bucal, se aprecia un importante aumento ( $p < 0,05$ ) del valor del FIC, con respecto de la muestra control, en todas las muestras analizadas. El aumento más significativo ( $p < 0,05$ ) se aprecia en la muestra de HPL donde el aumento es de 474,7 % con respecto de la muestra control. En todas las muestras analizadas, la porción más presente es la FSS, aunque hay un ligero incremento ( $p < 0,05$ ) en la FSS con respecto de la muestra control. En cuanto a la muestra de HPHL, no se observa ningún tipo de sinergia. En la fase estomacal se produce un fuerte descenso ( $p < 0,05$ ) de las variaciones para el valor del FIC en todas las muestras con respecto de la fase bucal. Las muestras de HPL y HPH pasan respectivamente de 474,7 y 352,8% a 137,8 y 169,1% en esta fase de la digestión. En todos los casos, los valores de FSA se reducen ( $p < 0,05$ ) drásticamente con respecto de los valores de FSA en la fase bucal. Mientras tanto, los valores de FSS se mantienen similares ( $p > 0,05$ ) a los de la anterior fase. En la fase intestinal se observa un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la muestra de HPL, mientras que la muestra de HPH sufre una disminución ( $p < 0,05$ ) con respecto de la fase anterior. En ambos casos, los valores son superiores ( $p < 0,05$ ) a los de la muestra control. En esta fase, si se aprecia sinergia en la muestra de HPHL. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Chandrasekara et al. (2012) en sus estudios con grano de mijo en los que el valor del FIC aumenta en la fase intestinal. Este aumento puede deberse a la liberación de distintos compuestos polifenólicos o flavonoides que contribuyen a la capacidad quelante.

#### **4.3.2. Poder antioxidante por reducción del ión férrico FRAP**

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos para el método FRAP en las distintas fases de la digestión para las muestras HPL, HPH y HPHL. En la fase bucal se aprecia un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en todas las muestras analizadas, siendo el aumento más significativo el de la muestra de HPL con un aumento ( $p < 0,05$ ) en el valor del FRAP con respecto de la muestra control de 264,4%. En todos los casos, la proporción de FSA es mayor que la de FSS aunque esta porción aumenta ( $p < 0,05$ ) con respecto de la muestra control. En cuanto a la muestra HPHL, se aprecia sinergia positiva. En la fase estomacal, los valores del FRAP aumentan significativamente ( $p < 0,05$ ) en todas las muestras. El aumento más significativo se

aprecia en la muestra HPH pasando de 58,9% en la variación con respecto de la muestra control en la fase bucal a 305,8%. En esta fase, la porción FSS aumenta ( $p < 0,05$ ) en todas las muestras, al igual que la FSA. La muestra HPHL muestra sinergia negativa. Este incremento de la capacidad antioxidante se puede explicar, en parte, por la liberación de compuestos polifenólicos de la matriz de la comida por la acción de los enzimas presentes en el estómago. Los investigadores Liyanna-Pathirana et al (2005) llegan a la misma conclusión en sus estudios sobre cereales. Por último, en la fase intestinal, los valores del FRAP para nuestras distintas muestras disminuyen considerablemente ( $p < 0,05$ ), incluso a valores por debajo de la muestra control en HPH y HPHL. Estos resultados, están en concordancia por los obtenidos por Beatriz Gullón et al. (2015a) en su trabajo con harina de granada. Estos resultados indican que después de liberación en la fase estomacal de los compuestos polifenólicos con capacidad quelante, estos ven reducida su capacidad reductora, en parte, por el pH del intestin

#### **4.3.3. Actividad antioxidante utilizando los radicales 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH y ABTS**

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para los métodos antioxidantes DPPH y ABTS en todas las fases de la digestión para las muestras HPL, HPH y HPHL. En la fase bucal, en ambos ensayos aumentan ( $p < 0,05$ ) los valores de la muestra HPL y HPHL mientras que la muestra HPH se mantiene igual ( $p > 0,05$ ) que la muestra control. La porción FSA es mayor que la porción FSS en las muestras HPL y HPHL mientras que en la muestra HPH son similares en ambos ensayos. En cuanto a la muestra HPHL, se observa una sinergia positiva elevada. La fase bucal muestra el aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la muestra HPH con respecto de la fase bucal y de la muestra control en ambos ensayos. El aumento en las demás muestras no es significativo ( $p > 0,05$ ). En todos los casos se aprecia un aumento considerable ( $p < 0,05$ ) de la porción FSA con respecto de las anteriores fases. Muchos autores informaron que la fase gástrica tiene un efecto potenciador en la actividad antioxidante determinada con los métodos ABTS y DPPH. Como por ejemplo, Rodríguez-Roque et al. (2013) en su estudio sobre la digestión de leche de soja, determinaron que la inhibición del DPPH aumentaba en un 30% en esta fase. Los investigadores Baublis et al. (2000) informaron que tanto la actividad antioxidante como la liberación de compuestos polifenólicos, se veía favorecida por las características del estómago. Finalmente en la fase intestinal se aprecia un

desplome ( $p < 0,05$ ) de los valores del DPPH y ABTS. En el caso de la muestra HPH en el ensayo DPPH, no se obtuvieron resultados en esta fase, lo que puede indicar que todos los compuestos han sido absorbidos, y por tanto no hay rastro de ellos en el intestino. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Correa-Betanzo et al. (2014) sobre sus estudios con extractos de arándanos, en los cuales los valores de DPPH disminuyen un 50% en la fase intestinal.

#### 4.3.4. Correlaciones de Pearson de los métodos antioxidantes.

Una gran cantidad de artículos científicos evidencian la relación entre los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante de la muestra, lo que demuestra que estos compuestos contribuyen en la actividad antioxidante (Chandrasekara et al., 2012). Las tablas 3,4 y 5 muestran los valores de las correlaciones entre TPC y los métodos antioxidantes utilizados en las diferentes fases de la digestión simulada.

**Tabla 3.** Valores de las correlaciones de Pearson entre TPC y métodos antioxidantes FIC, FRAP, DPPH y ABTS en la muestra de Limón, en todas las fases de la digestión.

Boca	TPC	DPPH	FRAP	FIC	ABTS
TPC	1				
DPPH	0,99190433	1			
FRAP	0,98920173	0,98076592	1		
FIC	0,97560608	0,99220398	0,96391282	1	
ABTS	0,99461497	0,99112651	0,9907392	0,97970076	1

Estómago	TPC	DPPH	FRAP	FIC	ABTS
TPC	1				
DPPH	0,990311	1			
FRAP	0,99245195	0,99418092	1		
FIC	0,98710143	0,98980046	0,99007366	1	
ABTS	0,99879267	0,99456201	0,99246412	0,98800406	1

Intestino	TPC	DPPH	FRAP	FIC	ABTS
TPC	1				
DPPH	0,6703233	1			
FRAP	0,9966266	0,70444976	1		
FIC	0,94436009	0,63921872	0,93175829	1	
ABTS	0,59838979	0,26211959	0,59246849	0,61739034	1

**Tabla 4.** Valores de las correlaciones de Pearson entre TPC y métodos antioxidantes FIC, FRAP, DPPH y ABTS en la muestra de Higo, en todas las fases de la digestión.

Boca	TPC	DPPH	FRAP	FIC	ABTS
TPC	1				
DPPH	0,46910539	1			
FRAP	0,97281993	0,31846362	1		
FIC	0,98994397	0,39268391	0,9828995	1	
ABTS	0,92748085	0,47420921	0,92535539	0,94767474	1

Estómago	TPC	DPPH	FRAP	FIC	ABTS
TPC	1				
DPPH	0,96057596	1			
FRAP	0,93372921	0,90604064	1		
FIC	0,97721402	0,95606898	0,9493966	1	
ABTS	0,93622567	0,91978241	0,90908161	0,95791444	1

Intestino	TPC	DPPH	FRAP	FIC	ABTS
TPC	1				
DPPH	-	1			
FRAP	0,63875953	-	1		
FIC	0,4057051	-	0,68354349	1	
ABTS	-0,03901577	-	-0,10936579	-0,4129279	1

**Tabla 5.** Valores de las correlaciones de Pearson entre TPC y métodos antioxidantes FIC, FRAP, DPPH y ABTS en la muestra de Limón e Higo, en todas las fases de la digestión.

Boca	TPC	DPPH	FRAP	FIC	ABTS
TPC	1				
DPPH	0,99245333	1			
FRAP	0,99936136	0,99385459	1		
FIC	0,99917407	0,98741903	0,99799231	1	
ABTS	0,98799068	0,97518546	0,98590056	0,98917305	1

Estómago	TPC	DPPH	FRAP	FIC	ABTS
TPC	1				
DPPH	0,99046257	1			
FRAP	0,98422735	0,98358174	1		
FIC	-0,4833668	-0,48682037	-0,41329001	1	
ABTS	0,961532	0,96677794	0,98572888	-0,3433884	1

Intestino	TPC	DPPH	FRAP	FIC	ABTS
TPC	1				
DPPH	0,15868062	1			
FRAP	0,11175047	0,33105243	1		
FIC	-0,62094559	0,22458453	0,32263642	1	
ABTS	-0,25518986	0,35205505	0,22398996	0,57491435	1

La Tabla 3 muestra los valores de las correlaciones de Pearson de la muestra del limón entre TPC y los métodos antioxidantes utilizados en cada fase de la digestión. Las fases bucal y estomacal muestran un alto nivel de correlación positiva entre TPC y los métodos antioxidantes utilizados, así como entre los métodos antioxidantes entre sí. En la fase intestinal, los valores de las correlaciones disminuyen para los métodos ABTS y DPPH. Esto tiene sentido dado que son métodos que siguen el mismo principio de transferencia de electron. Estos resultados obtenidos están en concordancia por los obtenidos por muchos autores en los que se muestra la correlación entre los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante. Autores como Carbonell-Capella et al. (2015) demostraron una alta correlación entre los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante en bebidas con stevia sometidas a digestión.

La tabla 4 muestra los valores de las correlaciones de Pearson de la muestra del higo entre TPC y los métodos antioxidantes utilizados en cada fase de la

digestión. Tanto en la boca como en el estómago se observan correlaciones de Pearson con valores muy elevados, salvo en el caso del método DPPH con los demás métodos en la fase bucal. En la fase intestinal se observan correlaciones positivas medias para los métodos TPC y FRAP, así como para los métodos FIC y FRAP. Es normal un alto nivel de correlación positiva entre estos dos métodos, dado que siguen el mismo principio, capacidad quelante. Esta disminución observada en la fase intestinal esta en concordancia con los resultados obtenidos por Gullón et al. (2015b)

La tabla 5 muestra los valores de las correlaciones de Pearson de la muestra de limón e higo entre TPC y los métodos antioxidantes utilizados en cada fase de la digestión. La fase bucal, muestra correlaciones positivas muy elevadas entre todos los métodos entre sí. La fase estomacal muestra unos valores negativos para el método FIC con sus semejantes. Por último, la fase intestinal muestra una disminución de las correlaciones de Pearson para todos los métodos. Estos resultados no se identifican con los resultados propuestos por Chen et al. (2014) sobre su trabajo con 33 tipos de frutas, en el cual descubre una fuerte correlación entre TPC y la actividad antioxidante después de la digestión in vitro. Nuestros resultados muestran una clara disminución de los valores de las correlaciones en la fase intestinal, lo que puede deberse en parte a que los compuestos polifenólicos o con capacidad antioxidante ya han sido absorbidos o degradados por la acción de los diferentes enzimas que actúan en la digestión.



# 5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

## **5.1 Conclusiones**

Las muestras ricas en fibra estudiadas en este trabajo presentaron un elevado índice de recuperación para compuestos fenólicos y flavonoides, presentando el mayor índice de recuperación en la fase estomacal.

La fase final de la digestión muestra una bioaccesibilidad mayor para compuestos fenólicos que para los compuestos flavonoides. Del mismo modo, la muestra de higo muestra una mayor bioaccesibilidad que la muestra de limón.

Los métodos antioxidantes utilizados han demostrado un elevado nivel de actividad antioxidante tanto en la muestra de limón como en la muestra de higo. La muestra mezcla entre el limón y el higo muestra un elevado nivel de actividad antioxidante, por encima de las muestras por separado, lo que indica una sinergia positiva, que aumenta el valor de dicha mezcla en el mercado alimentario.

Los estudios realizados muestran que dichas fibras utilizadas en este estudio contienen un alto valor añadido en materia de contenido y actividad antioxidante por lo que su utilización dentro del mercado alimentario es altamente recomendable.

## **5.2 Proyección Futura**

El siguiente paso a realizar con estas muestras sería realizar el perfil polifenólico de las muestras, de manera a conocer cuáles son los compuestos presentes y que proporcionan la actividad antioxidante.

El siguiente paso interesante a realizar sería el añadir las fibras a los alimentos, y proceder de nuevo a una digestión *In vitro*, de modo que se estudie el efecto de la fibra en el alimento, si mantiene sus propiedades antioxidantes e incluso la disminución de captación de grasas propias del alimento por la fibra añadida.

## 6. BIBLIOGRAFÍA



## **BIBLIOGRAFÍA**

- Argyri, K., Komaitis, M., Kapsokefalou, M. (2006). Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*, 96, 281-289.
- Baublis, A., Decker, E.A., Clydesdale, F.M. (2000). Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. *Food Chemistry*, 68, 1-6.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M.P., Albertini, M.C., Piatti, E. (2005). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97, 217-222
- Bouayed, J., Hoffmann, L., Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14-21.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Esteve, M.J., Frígola, A. (2015). Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. *Food Chemistry*, 184, 122-130.
- Cerda-Tapia, A., Pérez-Chabela, M.L., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Viuda-Martos, M. (2015). Valorization of pomace powder obtained from native Mexican apple (*Malus domestica* var. rayada): Chemical, techno-functional and antioxidant properties. *Plants Food for Human Nutrition*. 70, 310-316.
- Chen, G.L., Chen, S.G., Zhao, Y.Y., Luo, C.X., Li, J., Gao, Y.Q. (2014). Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. *Industrial Crops and Products*, 57, 150-157.

- Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., J. McDonald, K. Schroeter, M. Corredig, G. Paliyath. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 165, 522-531.
- Gullón, B., Pintado, M.E., Barber, X., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos. M. (2015b) Bioaccessibility, changes in the antioxidant potential and colonic fermentation of date pits and apple bagasse flours obtained from co-products during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 78, 169-176.
- Gullón, B., Pintado, M.E., Fernández-López, J., José A. Pérez-Álvarez, Manuel Viuda-Martos. (2015a). In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628.
- Leite, A., Malta, L.G., Riccio, M.F., Eberlin, M.N., Pastore, G.M., Marostica Junior, M.R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2277-2283.
- Li, H., Deng, Z., Liu, R., Loewen, S., Tsao. R.(2014). Bioaccessibility, in vitro antioxidant activities and in vivo anti-inflammatory activities of a purple tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Food Chemistry*, 159, 353-360.
- Mills, D.J.S., Tuohy, K.M., Booth, J., Buck, M., Crabbe, M.J., Gibson, C.G.R., Ames, J.M. (2008). Dietary glycated protein modulates the colonic microbiota towards a more detrimental composition in ulcerative colitis patients and non-ulcerative colitis subjects. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 706-714.
- Ortega, N., Macia, A., Romero, M. P., Reguant, J., Motilva, M. J. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in vitro digestion model. *Food Chemistry*, 124, 65-71.

- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Rodríguez-Roque, M.J., Rojas-Graü, M.A, Elez-Martínez, P., Martín-Belloso. O.,(2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136, 206-212
- Saura-Calixto, F., Díaz-Rubio. M.E.,(2007). Polyphenols associated with dietary fibre in wine: A wine Polyphenols gap?. *Food Research International*, 40, 613-619.
- Singleton, V. L. and Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*, 6, 144-158.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Pérez-Álvarez. J.A, (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum L.*) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44, 1217-1223.