

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**“DETERMINACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE DE  
EXTRACTOS DE BAYAS ADICIONADOS A UN PRODUCTO  
CÁRNICO FRESCO SOMETIDO A UN PROCESO DE DIGESTIÓN  
IN VITRO”**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

Autor: Javier Vargas Lapaz

Tutor/es: Manuel Viuda Martos



## RESUMEN

El estrés oxidativo se encuentra implicado en la aparición de muchas enfermedades y al proceso de envejecimiento, este término hace referencia a la inestabilidad entre especies oxidantes y la capacidad de defensa del organismo frente a la agresión oxidativa, por ello es de gran relevancia e importancia encontrar alternativas y soluciones para mejorar la capacidad antioxidante del organismo humano.

Por ello el estudio realizado busca valorar si la adición de extracto vegetal procedente de bayas de la especie *Aristotelia chilensis* y *Vaccinium oxycoccus* en productos cárnicos representa una mejora para el organismo humano, por ello las muestras elaboradas serán sometidas a un proceso de digestión in vitro donde se valorará su capacidad antioxidante, su cantidad de fenoles y flavonoides en cada fase del proceso de digestión.

**Palabras claves:** estrés oxidativo, especies oxidantes, antioxidantes, fenoles, flavonoides, digestión in vitro.

## ABSTRACT

Oxidative stress is involved in the onset of many diseases and the aging process, this term refers to instability between oxidizing species and the ability to defend the body against oxidative stress, so it is of great significance to have important alternatives and solutions to improve the antioxidant capacity of the human organism.

Therefore, the study seeks to evaluate whether the addition of vegetable extract from berries *Aristotelia chilensis* and *Vaccinium oxycoccus* species in meat products represents an improvement to the human body, so the samples drawn will be subjected to digestion in vitro where it is valued its antioxidant capacity, the amount of phenols and flavonoids in each phase of digestion.

**Keywords:** Oxidative stress, oxidizing species, antioxidant, phenols, flavonoids, digestion in vitro.

## ÍNDICE

	Pag
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 MAQUI (ARISTOTELIAL CHILENSIS)	6
1.2 ARÁNDANO (VACCINIUM CORYMBOSUM)	9
1.3 EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA SALUD	11
1.4 ESPECIES OXIDANTES	12
1.5 ESTRÉS OXIDATIVO Y SU RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES	15
1.6 ENVEJECIMIENTO	16
1.7. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	17
1.8. MODELOS DE DIGESTIÓN IN VITRO	19
1.8.1. DIGESTIÓN IN VITRO Y ENZIMAS	20
1.8.2. DIGESTIÓN IN VITRO Y CONDICIONES DE LA MUESTRA	20
1.8.3. DIGESTIÓN Y TIEMPO DE TRÁNSITO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GENERAL	23
2.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PRODUCTO CÁRNICO FRESCO TIPO HAMBURGUESA	24
3.2. PROCESO DE DIGESTIÓN IN VITRO	25
3.3 CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (CFIT)	27

3.4 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES	27
3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	28
3.5.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS	28
3.5.2. CAPACIDAD QUELANTE DEL IÓN FERROSO (FIC)	28
3.5.3. PODER ANTIOXIDANTE POR REDUCCIÓN DEL IÓN FÉRRICO (FRAP)	29
3.5.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE UTILIZANDO EL RADICAL 2,2'- DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH).	29
3.6 ANÁLISIS DE LA TEXTURA DEL PRODUCTO FINAL	30
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. CONTENIDO EN FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES	32
4.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	36
4.3 RESULTADOS TEXTURÓMETRO	43
5. CONCLUSIONES	46
6. BIBLIOGRAFIA	47

## 1. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo ha sido implicado en el desarrollo de numerosas enfermedades crónicas y en el proceso de envejecimiento (Halliwell y Whiteman, 2004). La dieta humana contiene diferentes antioxidantes naturales que pueden contribuir al refuerzo de las defensas naturales del organismo. Así, los efectos beneficiosos derivados del consumo de dietas ricas en alimentos vegetales.

Debido a que la prevención de enfermedades crónicas constituye una mejor estrategia que su tratamiento, reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares o el cáncer se ha convertido en una materia de gran interés para profesionales de la salud, científicos y también para la industria alimentaria (Liu, 2003).

Entre las fuentes habituales de antioxidantes de la dieta, las frutas rojas y bayas son ricas en compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, los cuales se caracterizan por su actividad anticarcinogénica, antiinflamatoria, antiaterogénica, antimicrobiana y antioxidante (Robards et al., 1999; Moure et al., 2001).

Por esta razón, el uso de bayas como son los arándanos y maqui como ingredientes en productos cárnicos podría ser una buena estrategia para la obtención de alimentos funcionales ricos en compuestos fenólicos y capaces de aportar beneficios a la salud del consumidor.

### 1.1. Maqui (*Aristotelia chilensis*)

*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz es conocido comúnmente con el nombre de maqui. Es un árbol autóctono de los bosques subantárticos de Chile y Argentina.

Se desarrolla preferentemente en suelos húmedos del valle central, en las faldas de ambas cordilleras, quebradas o márgenes de bosques, desde el nivel del mar hasta los 2.500 metros sobre el nivel del mar. El maqui se distribuye desde la Región de Coquimbo hasta la de Aysén, incluso es posible encontrarlo en el Archipiélago Juan Fernández. (Información tecnológica de productos forestales).

La baya de maqui presenta la siguiente clasificación taxonómica la cual se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación Taxonómica de la baya de maqui (*Aristotelia chilensis*).

REINO	PLANTAE
DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
ORDEN	OXALIDALES
FAMILIA	ELEOCARPACEAE
GÉNERO	ARISTOTELIA
ESPECIE	ARISTOTELIA CHILENSIS (MOL.) STUNTZ
NOMBRE COMÚN	MAQUI

El fruto del maqui es una baya redonda comestible de color negro brillante, de unos 5 mm de diámetro, de pulpa dulce en cuyo interior hay dos semillas angulosas (Hoffmann, 1997) y su color púrpura viene determinada por sus concentración en antocianinas. Este fruto posee alto valor alimenticio y un porcentaje de humedad de 56,4% (Correa y Yesid, 1992; Santibáñez y Carla, 2008). En la Figura 1 se observa las bayas de maqui y cómo evoluciona el color durante la maduración.



Figura 1: Evolución del color de la bayas de maqui durante maduración.

En sus frutos se ha detectado la presencia de flavonoides con capacidad antioxidantes (Fauré et al., 1990) y concentraciones bajas de alcaloides de tipo indólico como la aristotelina, aristotelona, aristona y aristotelinina.

Es así como el maqui tiene el más alto nivel de antioxidantes (ORAC) de todas las frutas conocidas y medidas por el Brunswick Laboratories de EE.UU (Fundación Chile, 2012)

De acuerdo a Silva et al., (1997), entre los compuestos químicos aislados de plantas de maqui figuran, antocianos, flavonoides, cumarinas, esteroides y alcaloides. Estos autores indican que el jugo de maqui, además de ser rico en antioxidante, es rico también en fenoles, por lo que podría tener propiedades antiaterogénicas.

Otros estudios realizados por Escribano-Bailón et al., (2006) también dan cuenta que la composición es particularmente rica en antocianos donde un 34% correspondería a delfinidina- 3 sambubiosido-5-glucosido.

Respecto al potencial bioactivo estudios in vitro realizados por Miranda-Rottmanns et al., (2002) dan cuenta que la capacidad de los polifenoles del extracto del maqui para proteger de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y contra el daño oxidativo, dando a entender que los polifenoles de esta baya presenta un potente anti-aterogénico.

Según la Tabla 2 de composición química de los alimentos chilenos, que se extrae de Antecedentes Nutricionales y Potencialidades de Usos de Fruto de PEUMO *Cryptocarya alba* (Mol.) Looser, ESPINO, *Acacia caven* (Mol.) Mol., y MAQUI, *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz los frutos de maqui presentan la siguiente composición nutricional para 100 g.



**Tabla 2:** Composición química de la muestra de baya *Aristotelia chilensis* en 100 g de muestra.

HUMEDAD (g)	56,4
CENIZAS (g)	1,2
PROTEÍNAS (g)	0,8
GRASA CRUDA (g)	TRAZAS
FIBRA CRUDA (g)	0,8
HIDRATOS DE CARBONO (g)	20,62
ENERGÍA (Kcal)	150

Los países con mayor demanda de bayas de Maqui en el año 2011 se encuentran reflejado en la Figura 2, actualmente el orden de demanda presenta el mismo orden que en el año 2011.

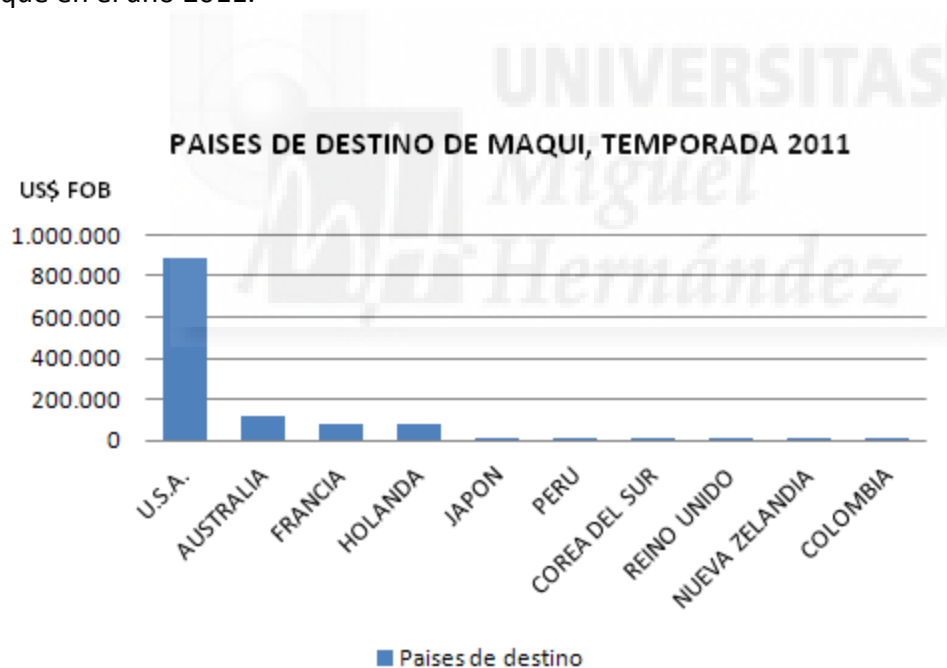


Figura 2: Países de destino de la baya de maqui

### 1.2 Arándano (*Vaccinium corymbosum*)

Los arándanos, también llamados mirtilos son plantas subarborescentes de la familia de las ericáceas, el *Vaccinium myrtillus* común es una planta caducifolia.

El arándano es una planta que procede del norte de Europa, muy habitual en los países escandinavos, también es muy frecuente en toda la zona boreal de Asia, aparece fundamentalmente en suelos ácidos de bosques templados, turberas o zonas pantanosas.

Se trata de un alimento muy rico en antocianinas y otros compuestos antioxidantes, son ricos en cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina y petunidina, la malvidina es la que alcanza la proporción más elevada en esta fruta, este pigmento es responsable de la coloración oscura azulada del arándano (Botanical-online).

Entre las principales virtudes que debemos destacar de las antocianidinas destaca sus propiedades antiinflamatorias, capaces de neutralizar los efectos inflamatorios que las histaminas y las prostaglandinas ejercen en los tejidos corporales.

Francia es el principal país productor en Europa, seguido de Holanda, Alemania, Polonia y España (Botanical-online), a continuación en la Tabla 3 muestra su taxonomía.

**Tabla 3:** Clasificación Taxonómica del arándano (*Vaccinium corymbosum*).

REINO	PLANTAE
DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
ORDEN	ERICALES
FAMILIA	ERICACEAE
GÉNERO	VACCINIUM
ESPECIE	VACCINIUM. CORYMBOSUM
NOMBRE COMÚN	ARÁNDANO

En la Tabla 4 se representa el valor nutricional del arándano 100 g de muestra de arándano.

**Tabla 4:** Composición química de la muestra baya de arándano (<http://www.botanical-online.com>).

HUMEDAD (g)	84,21
PROTEÍNAS (g)	0,74
GRASAS(g)	0,33
FIBRA ALIMENTARIA(g)	2,4
HIDRATOSDE CARBONO (g)	14,49
ENERGÍA (Kcal)	57

### 1.3 El estrés oxidativo en la salud

El oxígeno es esencial para los organismos vivos. Sin embargo, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico. Estas especies oxidativas provoca daño acumulativos en proteínas, lípidos y ADN.

Para poder combatir estos ataques el organismo tiene un sistema de protección frente a estas especies oxidativas, no obstante en ocasiones las defensas antioxidantes pueden encontrarse desbordado por un incremento en la producción de ROS, este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento (Lee et al., 2004).

La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal.

Certezas epidemiológicas asocian el consumo de vegetales y frutas con una menor incidencia de enfermedades crónicas, algunas de estas certezas epidemiológicas son las siguientes, el consumo de frutas y verduras de más de 569 gramos al día reduce el riesgo de mortalidad en un 10% y lo retrasa en 1,12 años, además por cada 200 gramos diarios de incremento en el consumo de frutas y verduras, este riesgo disminuye un 6%, una alimentación rica en frutas y verduras, el riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular se reduce un 15%. Además, más de un 4% de los fallecidos por esta causa se podrían prevenir consumiendo más de 400 gramos diarios de estos alimentos. (Leenders et al., 2013). Junto con la preocupación de los consumidores por mantener un estado de salud adecuado, está suponiendo a la industria de la alimentación a elaborar alimentos funcionales con mayor aporte de antioxidantes.

#### 1.4 Especies oxidantes

Una especie oxidante es aquella capaz de aceptar electrones de modo que va a generar un desequilibrio electrónico en las moléculas vecinas. Mientras que un antioxidante es una sustancia que, estando presente a una concentración más baja comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato. El término especies reactivas del oxígeno es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres (Halliwell y Whiteman 2004). En la Tabla 5 se puede observar las principales especies reactivas de oxígeno.

**Tabla 5:** Especies reactivas de oxígeno, clasificados según si se encuentran en forma de radicales o no radicales.

<b>RADICALES</b>	<b>NO RADICALES</b>
Hidroxilo OH	Peróxidos orgánicos ROOH
Alcoxilo RO <sup>·</sup>	Peróxido de hidrógeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Hidroperoxilo HOO <sup>·</sup>	Ácido hipocloroso HClO
Superóxido O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Ácido nitroso HNO <sub>2</sub>
Peroxilo ROO <sup>·</sup>	Catión nitrilo NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>
Óxido nítrico NO <sup>·</sup>	Peroxinitrito ONOO <sup>-</sup>
Dióxido de nitrógeno NO <sub>2</sub>	Ácido peroxinitroso ONOOH
	Alquil peroxinitritos ROONO
	Ozono O <sub>3</sub>
	Ácido hipobromoso HBrO

Mientras que en la Tabla 6 se encuentran los principales sistema de defensa antioxidante del organismo. (Beckman y Ames 1998; y Lee et al., 2004).

**Tabla 6:** Principales sistemas de defensa antioxidante del organismo y sus funciones

defensivas

SISTEMA	FUNCIÓN
<u>Enzimas</u>	
Superóxido dismutasa	Eliminación de radical superóxido
Catalasa	Eliminación de hidroperóxidos (e.j. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Glutación peroxidasa (GPx)	Eliminación de hidroperóxidos
Glutación reductasa (GRed)	Reducción de glutación oxidado
Glutación-s-transferasa (GST)	Eliminación de peróxidos lipídicos
Metionina sulfóxido reductasa	Reparación de residuos oxidados de metionina
Peroxidasa	Descomposición de peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos
<u>Antioxidantes del plasma/suero</u>	
Ácido úrico	Captador de oxígeno singlete y radicales libres
Albúmina	Actividad peroxidasa en presencia de GSH
Bilirrubina	Captación de radicales peroxilo
Glutación reducido (GSH)	Sustrato para la acción de los enzimas GPx y GST y captador de radicales libres
Ubiquinol (Coenzima Q)	Captador de radicales libres
<u>Antioxidantes de la dieta</u>	
Ácido ascórbico	Reacción con superóxido, oxígeno singlete y radical peroxilo. Regeneración de tocoferoles
Tocoferoles	Protección de membranas lipídicas. Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación.
Carotenoides	Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación
Compuestos fenólicos	Captación de radicales libres y actividad quelante de metales

### 1.5 Estrés oxidativo y su relación con las enfermedades

El término estrés oxidativo hace referencia a un desequilibrio entre la generación de especies oxidantes y los sistemas de defensa antioxidante de un organismo, y el estrés oxidativo puede originarse por dos motivos fundamentales: (Halliwell y Whiteman, 2004).

- Incremento en la producción de especies reactivas a causa de la exposición a elevados niveles de  $O_2$  u otras toxinas que en sí mismas son especies reactivas, o bien debido a la activación excesiva de los mecanismos naturales que generan especies reactivas ( ej. activación indebida de fagocitos).
- Disminución de los niveles de antioxidantes debido a mutaciones que afectan la actividad de los enzimas antioxidantes, o a toxinas que causan depleción de las defensas antioxidantes. Dietas de carácter inadecuado con carencia de minerales como el Fe, Cu, Mg etc. y/o antioxidante puede generar estrés oxidativo.

Como las especies oxidativas pueden interactuar y afectar a las proteínas celulares, los lípidos de la membrana celular, y los ácidos nucleótidos, pueden provocar alteraciones lo suficientes significativas para causar peligro en la salud humana llegando a poder provocar cáncer y enfermedades cardiovasculares (Lee et al., 2004).

El daño oxidativo a proteínas incluye la oxidación de grupos sulfhidrilo, reacciones de oxidación catalizadas por metales, estas lesiones de las proteínas, pueden afectar a la función de receptores, enzimas, proteínas transportadoras, e incluso generar nuevos antígenos capaces de desencadenar la respuesta inmune.

Las modificaciones proteicas podrían contribuir al daño secundario a otras biomoléculas, como por ejemplo inactivando los enzimas reparadores de ADN.

En el caso de la oxidación en lípido de membrana el principal efecto es a través de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica, es la pérdida de fluidez de la membrana. Esto altera sus propiedades y funcionalidad, e incluso puede liberar proteínas ligadas a la membrana celular (Beckman y Ames 1998).

Por otro lado en el caso de los ácidos nucleicos estos son susceptibles al daño oxidativo, el cual incluye modificaciones en las bases nitrogenadas, la formación de aductos entre bases y azúcares, uniones entre timina y tirosina, roturas de la hebra de ADN y enlaces cruzados con otras moléculas (Beckman y Ames 1998).

### 1.6 Envejecimiento

Se define como la acumulación en el tiempo de diversos cambios que van deteriorando la funcionalidad de las células y tejidos provocando un incremento en el riesgo de enfermedad y muerte.

El estilo de vida, las condiciones ambientales son factores que afectan al envejecimiento, pero la principal causa es la formación continua in vivo de especies reactivas y radicales libres, se considera que los radicales libres generan al azar acumulación de daños en las macromoléculas biológicas, originando disminución de las funciones vitales y del envejecimiento. En la Figura 3 se observa la actividad de los radicales libres a las células vivas.

Por lo tanto el envejecimiento implica un peor funcionamiento de los sistemas defensivos antioxidantes del organismo, lo que hace a los individuos más vulnerables frente a condiciones patológicas asociadas al estrés oxidativo.

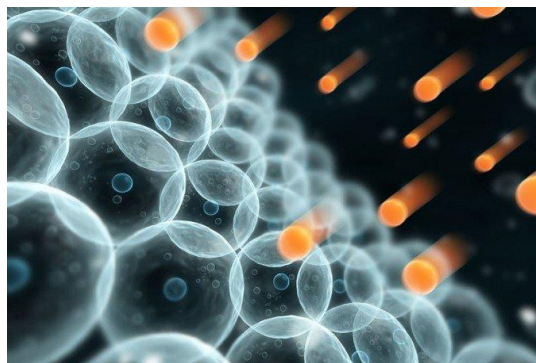


Figura 3: Representación de la actividad de los radicales libres a las células vivas.



## 1.7. 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).

## 1.8. MODELOS DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el diseño estructural de los sistemas de suministro de los alimentos basados en la encapsulación, protección y liberación de componentes bioactivos para beneficiar la salud humana (McClements et al., 2009). Estos sistemas de suministro 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 de suministro 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 de suministro 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 et al., 2005) y por lo tanto podría servir como una herramienta para la detección rápida de alimentos o sistemas de suministro 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.

### 1.8.1. 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).

### 1.8.2. 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.

### 1.8.3. 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.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

El objetivo general del trabajo fue comprobar el efecto de la adición de extracto vegetal procedente de bayas, en productos cárnicos y analizar sus efectos en el organismo, mediante la simulación de un proceso de digestión in vitro, el presente estudio quiere comprobar que la incorporación de extracto de arándano y maqui puede complementar y favorecer los efectos antioxidantes de los productos cárnicos.

#### 2.1.1. *Objetivos particulares*

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

- Evaluar las propiedades antioxidantes del producto complementado con extracto vegetal de baya en las distintas fases de la digestión in vitro, mediante los diferentes métodos antioxidantes como son FIC, TFC, TPC, FRAP, DPPH, los cuales presenta distintos mecanismos de acción de antioxidante.
- Evaluar las propiedades físicas que presenta el producto final ( con extracto de baya), estas propiedades son, fuerza , área, tiempo de resistencia hasta ceder por la fuerza aplicada, dureza, fracturabilidad, adhesividad, elasticidad ,cohesión, gomosidad, masticabilidad y resiliencia.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Proceso de elaboración del producto cárnico fresco tipo hamburguesa

Para obtener la pasta base de las hamburguesas, se empleó una fórmula tradicional con los siguientes ingredientes: 60% de magro de cerdo, 40% de panceta de cerdo, 10 % de agua, 1% sal. Esta mezcla se dividió en tres lotes. La muestra control a la que no se adicione ningún otro elemento. Hamburguesas con maqui (2%) y hamburguesas con arándano (2%).

Para obtener la mezcla base Figura 4 se troceó la carne de cerdo y se picó en una picadora de tornillo con placas de 5 mm (Olotinox, Olot, España). Posteriormente se pasó a una amasadora donde se añadieron el agua y la sal y se mezclaron durante 5 minutos hasta que se formó una pasta uniforme.

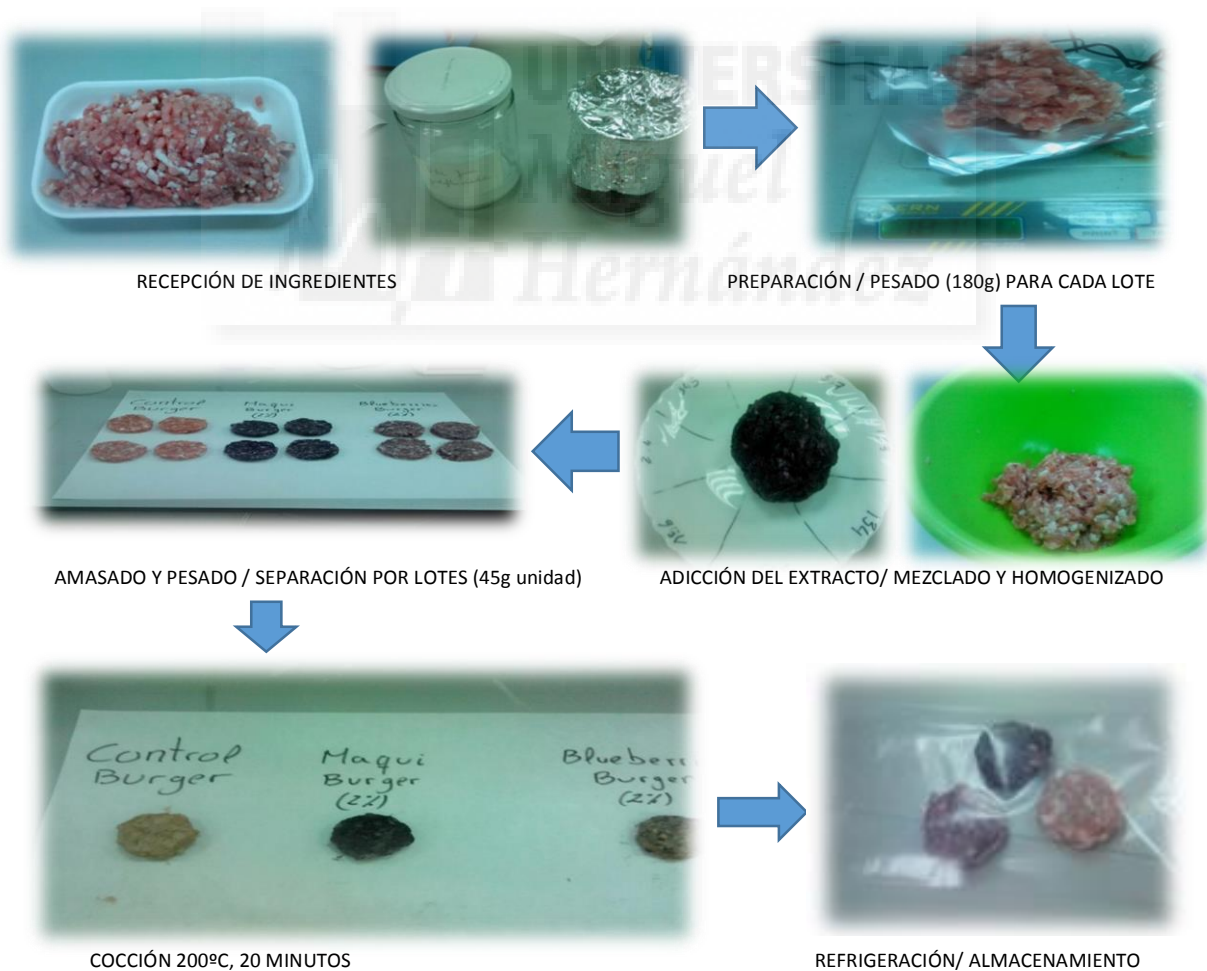


Figura 4 diagrama de flujo del proceso de elaboración de hamburguesas adicionadas con maqui o arándanos



Posteriormente se dividieron los lotes y se añadió la proporción correspondiente al maqui o al arándano y se mezcló de nuevo durante 5 minutos. Esta masa se moldeó con un equipo formador de mini hamburguesas (6 cm diámetro interno), obteniendo hamburguesas de unos 45 g y 1 cm de espesor. Para ayudara a mantener la forma de las hamburguesas se empleó film plástico de hamburguesas, almacenándolas en refrigeración hasta su empleo.

### 3.2. Proceso 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  $\alpha$ -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, 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). La fracción soluble fue liofilizada y almacenada para la determinación del contenido en fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante.

Todas las soluciones se prepararon con enzimas recién preparadas y esterilizadas por filtración utilizando un filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$  (Millipore, BillericaMA, EE.UU.) antes de su uso.

En la Figura 5 se muestra una representación gráfica del proceso de digestión *in vitro*.

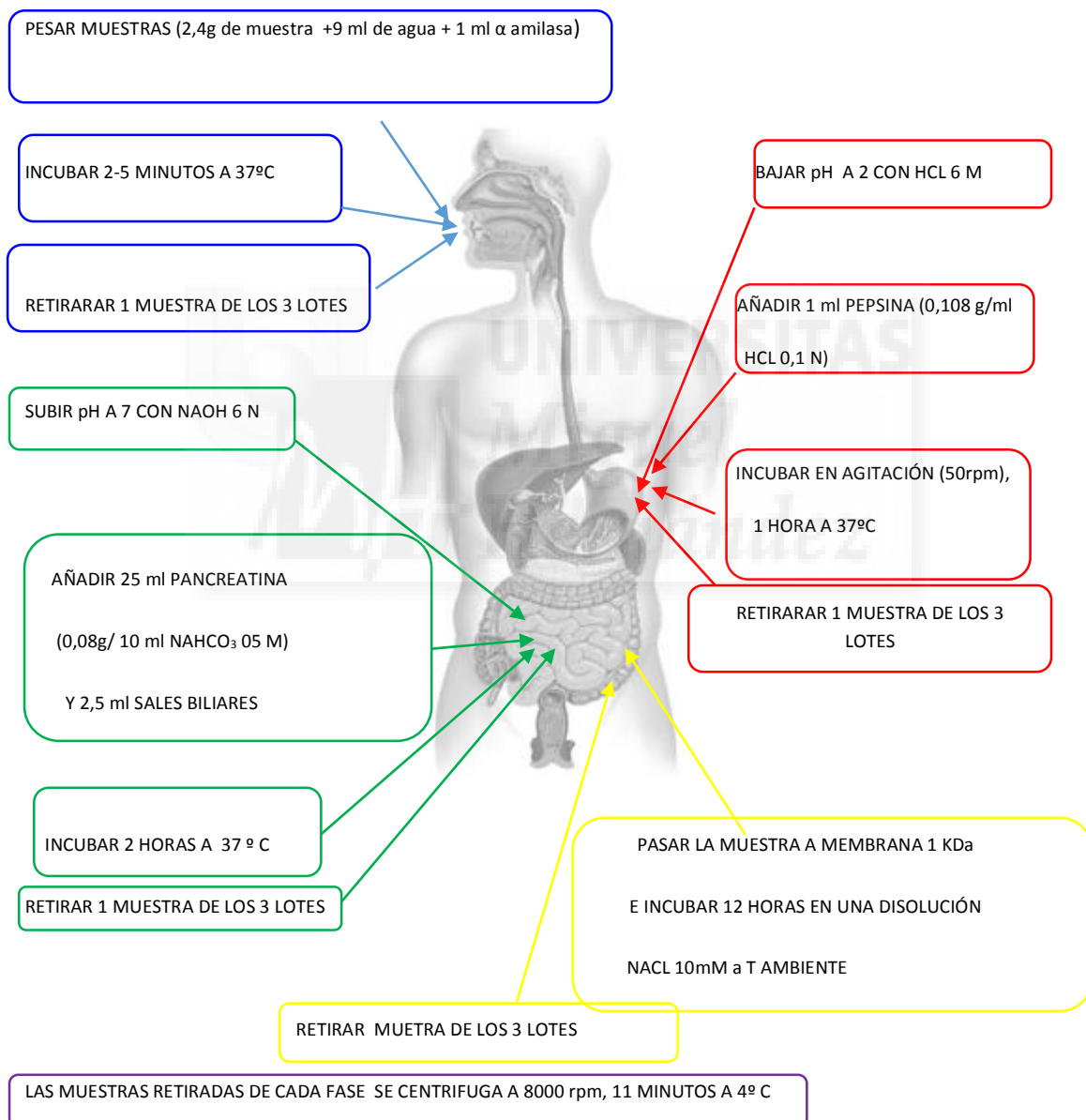


Figura 5 Representación gráfica del proceso de digestión *in vitro*.

### 3.3 Contenido de flavonoides totales (CFIT)

Para la determinación del CFIT se usó el método descrito por Blasa et al. (2005), se mezcló 1 mL de las muestras con 0,3 mL de  $\text{NaNO}_2$  (5%) y transcurridos 5 min se adicionaron 0,3 mL de  $\text{AlCl}_3$  (10%) y se agito durante 1 minuto.

Tras mantenerse en reposo durante 6 minutos la mezcla fue neutralizada con 2 mL de una solución de  $\text{NaOH}$  1M y se mantuvo en reposos durante 5 minutos, Se midió la absorbancia de todas las muestras a 510 nm con un espectrofotómetro y se cuantificó la concentración de las muestras con la curva de calibración de diferentes concentraciones de rutina. Y el total de muestras analizadas fueron de 12.

### 3.4 Contenido de fenoles totales

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. El método que se utiliza actualmente es una modificación efectuada por Singleton y Rossi (1965) la oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 760 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico.

Se colocó un volumen de 0,3 ml de la muestra y se introdujo en un tubo de ensayo, se le adiciona 2,5 mL de solución Folin diluida (1:10), y se mantiene agitando durante 1 minuto.

A continuación se adiciona 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%) y se agita durante 1 minuto, transcurrido ese tiempo se tapan los tubos con parafilms y se incuba durante 5 minutos a 50 °C. Posteriormente se deja enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 760 nm.

### 3.5 Determinación de la actividad antioxidante

En investigación, la medida de la actividad antioxidante total de un alimento, aporta información valiosa sobre procesos de adición y sinergia que se producen como consecuencia de interacciones entre distintas moléculas bioactivas.

Estos procesos dan lugar, por lo general, a una actividad antioxidante total mayor que la correspondiente a la suma de las actividades de los antioxidantes individuales que la componen, lo cual nos dará una aproximación más real al efecto potencial que podría ejercer in vivo un alimento rico en sustancias antioxidantes (Liu 2003).

Así, existen numerosos métodos de medida de la actividad antioxidante total, Estos métodos se basan generalmente en la captación o secuestro de radicales libres generados en la mezcla de reacción ( $O_2 \cdot^-$ ,  $\cdot OH$ ,  $ROO\cdot$ ,  $ONOO^-$ , etc.), mientras que otros están basados en la reducción de iones metálicos tales como el  $Fe^{3+}$  o el  $Cu^{2+}$  (Sánchez-Moreno 2002; Schlesier et al., 2002; Prior et al., 2005). En todos los métodos realizados para obtener valores más exactos y evitar cualquier error se diluyó la muestra 1:5.

#### 3.5.1. 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 °C. El sobrenadante obtenido fue el que se utilizó para realizar todas las determinaciones de este trabajo.

#### 3.5.2. Capacidad quelante del ión ferroso (FIC)

La actividad quelante del ión ferroso ( $Fe^{2+}$ ) se midió inhibiendo la formación del complejo ferrocina- $Fe^{2+}$  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  $FeCl_2 \cdot 4 H_2O$  (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 dos repeticiones. En total el número de muestras analizadas fue de 24.

### *3.5.3. 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  $\text{FeCl}_3$  (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 dos repeticiones. En total el número de muestras analizadas fue de 24.

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

Este método se basa en la reducción del radical DPPH $\cdot$  por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. Es un método adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos y extractos vegetales, mientras que no es adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante del plasma o suero, ya que las proteínas precipitan con el metanol del medio de reacción (Sánchez-Moreno 2002).

La decoloración del radical se determina a 517 nm y la cuantificación se realiza por lo general empleando soluciones patrón de Trolox. Los tiempos de reacción son variables dependiendo de la naturaleza de los antioxidantes. En particular, las moléculas pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen aparentemente una mayor actividad antioxidante por este método (Prior et al., 2005).

Para la determinación de la actividad antioxidante mediante el empleo del radical DPPH se siguió la metodología descrita por Brand-Williams et al., (1995). 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 dos repeticiones. En total el número de muestras analizadas fue de 24.

### 3.6 Análisis de la textura del producto final

El tipo de ensayo utilizado para evaluar la textura instrumental es el llamado análisis de perfil de textura instrumental o TPA (Texture Profile Analysis) (Bourne., 1978). Consiste en comprimir una porción del alimento con una sonda cilíndrica en dos ciclos consecutivos imitando la acción de la masticación y extraer de la curva fuerza-tiempo los siguientes parámetros: dureza (g), mastiabilidad ( $g \cdot mm$ ), gomosidad (g), elasticidad (mm) y cohesividad (mm).

La dureza, se define como la fuerza máxima obtenida en el primer ciclo de compresión. La elasticidad viene determinada por la altura que la muestra recupera entre el final de la primera compresión y el principio de la segunda. La cohesividad, es la relación entre el área positiva obtenida durante la segunda compresión y el área positiva obtenida durante la primera. La adhesividad, es el área negativa obtenida tras el primer ciclo de compresión, representando la fuerza necesaria para separar la superficie compresora de la muestra, después de haberla comprimido por primera vez. La gomosidad viene

determinada por el producto de la dureza por la cohesividad. La masticabilidad es el producto de la gomosidad por la elasticidad.

Para ello, se utiliza un texturómetro TAXT2 Texture Analyser (GU7 1YL, Londres, Inglaterra), con una sonda cilíndrica (plato de compresión) de 100 mm de diámetro (P100), la velocidad de la sonda durante la prueba fue de 5 mm / s, y el grado de compresión ejercida fue de un 70 %. Las muestras fueron cortadas en cubos de 1 cm, y se dejaron temperar a la temperatura de ensayo (20 ° C) durante dos horas, hasta la hora de su análisis.

### **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

En la Tabla 7 se muestran los valores del contenido en fenoles totales de las muestras de hamburguesa adicionada con maqui y arándano durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In vitro*.

**Tabla 7:** Contenido de fenoles totales (FT) expresados en mg gálico/g en las distintas muestras de hamburguesas.

Muestras	Boca	Estómago	Intestino D	Diálisis
<b>Control</b>	3,65±0,01 <sup>aA</sup>	2,53±0,02 <sup>bA</sup>	2,43±0,01 <sup>cA</sup>	2,20±0,01 <sup>dA</sup>
<b>Maqui</b>	2,97±0,01 <sup>aB</sup>	2,73±0,01 <sup>bB</sup>	2,07±0,01 <sup>cB</sup>	2,15±0,01 <sup>dB</sup>
<b>Arándano</b>	3,91±0,01 <sup>aC</sup>	2,71±0,02 <sup>bB</sup>	1,11±0,01 <sup>cC</sup>	2,10±0,01 <sup>dC</sup>

Valores seguidos de la misma letra minúscula dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey. Valores seguidos de la misma letra mayúscula dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey.

Cuando se analizan los resultados obtenidos tras la fase que tiene lugar en la boca se observa que la muestra adicionada con arándanos es la que presenta un mayor contenido ( $p < 0,05$ ) en fenoles totales seguida por la muestra control mientras que la muestra adicionada con maqui fue la que presentó menores valores ( $p < 0,05$ ) incluso inferiores a los mostrados por la muestra control. Esto puede ser debido a que en el proceso de cocción de las muestras se hayan producido artefactos que han originado reacciones en las muestras, dando lugar a una menor concentración en comparación con la muestra control que no lleva ningún tipo de extracto y por consiguiente debería tener un contenido en fenoles totales nulo.

En la fase de la digestión que tiene lugar en el estómago, las muestras adicionadas con maqui y arándano son las que presentan un mayor contenido en fenoles totales no



apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ). El descenso de fenoles totales producidos en la etapa de digestión en el estómago de la muestra control en relación a la concentración que presentaba en la fase de digestión de la boca, fue de 30,69% ( $p < 0,05$ ) mientras que en el caso de las muestras con extracto de arándano fue de un 31,74% y la muestra con extracto de maqui presentó una pérdida de tan solo un 8,09%. Esto podría ser debido al efecto del pH ácido del estómago que podría degradar los compuestos fenólicos presentes en las muestras.

En el intestino se observa el efecto contrario, por parte de la muestra control se obtiene unas pérdidas de 3,96%, mientras que en la muestra de extracto de maqui fue de 24,18% y en la muestra de extracto de arándanos es de 59,05%. Estos resultados nos indican que hay mayor absorción en el intestino de FT por parte de las muestras de extracto vegetal, y en este caso por parte de la muestra con extracto de arándano, por lo tanto se observa una importante mejora en la asimilación fenoles totales en el intestino.

Con respecto a la diálisis los resultados nos muestra que hay un aumento de FT con respecto a la fase anterior de digestión, esto ocurre en las dos muestras con extracto, esto nos puede indicar que probablemente los fenoles totales aún se encuentran en disolución. Se puede observar en la Figura 6 la coloración obtenida tras la realización de la determinación del contenido en fenoles totales

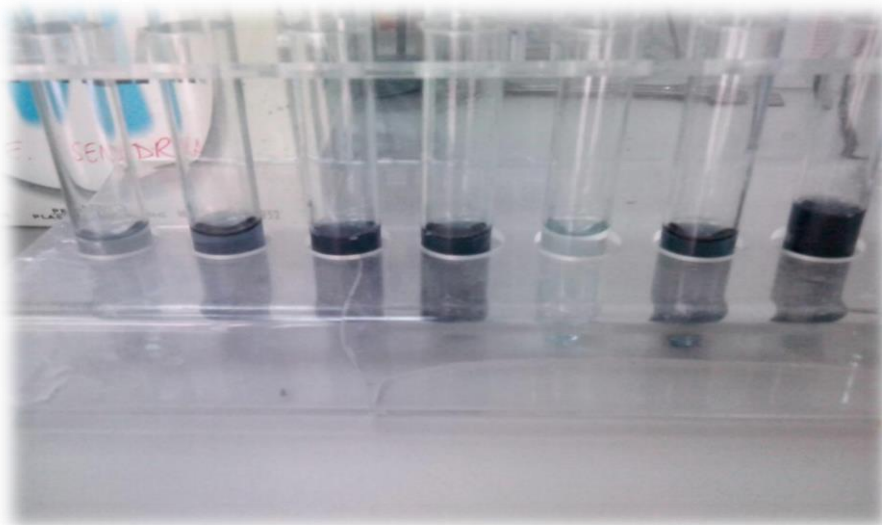


Figura 6 coloración obtenida al final del proceso de evaluación del contenido en fenoles totales

En la Tabla 8 se muestran los valores del contenido en flavonoides totales de las muestras de hamburguesa adicionada con maqui y arándano durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In vitro*.

**Tabla 8:** Contenido en flavonoides totales (FIT) expresados en mg rutina/ g obtenidos de las muestras de hamburguesas.

Muestras	Boca	Estómago	Intestino D	Diálisis
<b>Control</b>	8,02±0,01 <sup>aA</sup>	1,51±0,01 <sup>bA</sup>	3,97±0,01 <sup>cA</sup>	5,35±0,01 <sup>dA</sup>
<b>Maqui</b>	12,23±0,01 <sup>aB</sup>	0,36±0,01 <sup>bB</sup>	0,34±0,01 <sup>bB</sup>	1,00±0,01 <sup>cB</sup>
<b>Arándano</b>	10,33±0,01 <sup>aC</sup>	0,27±0,01 <sup>bC</sup>	0,32±0,01 <sup>cB</sup>	12,34±0,01 <sup>dC</sup>

Valores seguidos de la misma letra minúscula dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey.

Valores seguidos de la misma letra mayúscula dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey.

Por otra parte en el caso de los flavonoides totales se obtienen los siguientes resultados, a diferencia que en el caso anterior presenta unos valores adecuados en la fase inicial de digestión en la boca, presentando mayores valores iniciales en las muestras adicionadas con maqui o arándanos existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas ( $p < 0,05$ ). Comenzando con la muestra control se observa una importante pérdida de flavonoides totales en la fase de digestión en el estómago respecto a la fase de digestión en la boca, presentando una pérdida del 81,18% esto se podría deber al pH ácido que presenta el estómago que produce una pérdida de gran calibre.

En el intestino los FIT incrementa su concentración respecto a la fase anterior pasando de 1,51 mg rutina / g a 3,97 mg rutina/ g esto se podría deber al cambio de un pH ácido a uno básico y debido a que las enzimas de esta fase romperán las estructuras liberando FIT. Pasando a la fase de diálisis hay que destacar que vuelven a producirse un aumento

en la concentración eso podría deberse a que los flavonoides aún se encuentran en disolución.

Los valores obtenidos de las muestras adicionadas con extractos de maqui o de arándanos muestran un proceso similar y de misma índole que la muestra control, presentando mayor pérdida en la fase del estómago y un aumento más controlado de concentración en la fase del intestino delgado, en la muestra de maqui en la fase de digestión en la boca por presencia de  $\alpha$ -amilasa tenemos una concentración de 12,23 mg rutina/g que pasa en la fase siguiente a 0,36 mg rutina/g con la consiguiente pérdida de 97,06% frente al 81,18 % de la muestra control, esto se podría deber como he comentado anteriormente a la interacción del pH ácido y a las enzimas presentes en ella, hay que destacar que comparando las tres muestras.

La muestra con extracto de arándano presenta las menores pérdidas de flavonoides a nivel de la fase ácida del estómago que la muestra control y que la muestra de extracto de maqui presentando una pérdida de 97,34%, posteriormente en 2 casos muestra control y muestra de extracto de arándano se observa un aumento en el intestino de la concentración de FIT, y podría deberse a la ruptura de las estructuras por las enzimas presentes que origina la liberación de FIT al medio, y al mismo tiempo coinciden las tres muestras en un aumento en la fase de diálisis cuya explicación ya he comentado antes y es a que los flavonoides aún se podrían encontrar diluidos.

Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos:

Como captadores de radicales libres. Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicados los radicales libres o como quelantes de metales. Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton. Generalmente, los siguientes grupos funcionales se consideran importantes para la actividad quelante de metales (Khokhar, S.; Apenten, R. K. O. (2003)

Además el grado de polimerización de los compuestos fenólicos tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros.

Por ello podemos observar en la Figura 7 que la coloración no resalta y parece que las muestras estén aun diluida.



Figura 7 coloración obtenida al final del proceso de evaluación de FIT

#### 4.2. Actividad antioxidante

Antes de explicar los resultados hay que indicar que 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.

Y cada método interactúa de una manera diferente, en el caso del DPPH y FRAP estos dos métodos 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- $\text{Fe}^{3+}$  a ferricianida- $\text{Fe}^{2+}$  (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)).

En las Tablas 9 y 10 se muestran los valores obtenidos para el método FIC y el método FRAP de los extractos estudiados durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In vitro*.

**Tabla 9.** Valores de la capacidad de quelar metales medida con el método FIC expresada en mg EDTA/g en las distintas muestras de hamburguesas adicionadas con extractos de maqui y arándano y sometidas a un proceso de digestión *in vitro*.

Muestras	Boca	Estómago	Intestino D	Diálisis
<b>Control</b>	1,50±0,01 <sup>aA</sup>	0,24±0,01 <sup>bA</sup>	0,14±0,01 <sup>cA</sup>	0,23±0,01 <sup>dA</sup>
<b>Maqui</b>	0,68±0,01 <sup>aB</sup>	0,28±0,01 <sup>bB</sup>	0,13±0,01 <sup>cA</sup>	0,30±0,02 <sup>dB</sup>
<b>Arándano</b>	1,37±0,01 <sup>aC</sup>	0,21±0,01 <sup>bC</sup>	0,12±0,01 <sup>cA</sup>	0,24±0,00 <sup>dA</sup>

Valores seguidos de la misma letra minúscula dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey. Valores seguidos de la misma letra mayúscula dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey.

Para el método FIC las tres muestras analizadas presentan en la fase de digestión realizada en la boca la mayor capacidad de quelar metales de todas las etapas de la digestión analizadas. Siendo para muestra control la que presenta los valores más elevados ( $p < 0,05$ ) 1,50 mg EDTA/g mientras que para las muestras adicionadas con extractos de maqui y arándano presenta unos valores de 0,68 y 1,37 mg EDTA/g respectivamente, existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambas. Esto podría ser debido a la reacción térmica producida en las muestras, mediante el proceso de cocción, donde se ha generado artefactos que han podido originar reacciones químicas lo que ha podido provocar una reducción de los valores de las muestras de extracto vegetal adicionado frente a la muestra control, por esa razón se observa que inicialmente presenta mayor concentración la muestra control.

En la fase del estómago podemos destacar que aunque la muestra control en la fase anterior mostraba la mayor capacidad de quelar metales es junto a la muestra de

arándano la que sufre mayores pérdidas, presentando una pérdida de 84% la muestra control frente a una pérdida del 58,83% de la muestra de extracto de maqui y un 84,68 % que se produce en la muestra de extracto de arándano. Esto nos podría indicar que el pH ácido y sus enzimas afectan de mayor manera a la muestra de arándano y la control y de manera menos agresiva a la muestra de maqui.

En la fase del intestino respecto a la fase anterior la muestra de arándano presenta una mejor asimilación que la muestra control con un porcentaje del 45,46%, mientras que en la muestra control hay una asimilación del 41,67% frente al valor anterior, cuando en la fase del intestino se hace referencia a pérdida o asimilación lo que estamos indicando que ese porcentaje que ha desaparecido ha sido absorbido por el organismo y utilizado para sus funciones defensivas frente al estrés oxidativo.

Hacemos referencia a este término por el hecho de aclarar que porcentajes elevados de pérdidas en la fase del estómago es un índice negativo ya que estamos degradando los compuestos y no lo asimilamos, mientras que las % de pérdida del intestino hace referencia al porcentaje asimilado por el organismo, aclarado este punto se destaca que la muestra de maqui ha presentado en el intestino respecto a la fase anterior una pérdida de 53,58%, por ello se puede destacar que en el análisis del FIC la muestra de extracto de maqui tiene una buenas valoraciones y rendimiento, la muestra de extracto de arándano también presenta una buena asimilación de FIT a través del intestino, pero sufren demasiadas pérdidas por acción de enzimas estomacales y por el pH ácido.

Por último en las tres muestras analizadas se incrementa la concentración de mg EDTA/g al terminar la diálisis esto nos indica que aún se encuentran compuestos en la disolución. La Figura 8 muestra a coloración adquirida tras la finalización del método.



Figura 8 coloración obtenida al final del proceso de evaluación de FIC

En cuanto al método FRAP en la Tabla 10, mediante el cual se obtiene poder antioxidante por reducción del ión férrico, los valores iniciales presentan la misma situación que en el caso anterior. La muestra control en la fase de digestión realizada en la boca, presenta una concentración de 6,89 mg Trolox equivalente/g, partiendo de este valor se observa una reducción continua en la concentración de mg Trolox en todas las fases ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 10:** Valores de FRAP expresados en mg Trolox Equivalente/g en las distintas muestras de hamburguesas adicionadas con extractos de maqui y arándano y sometidas a un proceso de digestión in vitro.

Muestras	Boca	Estómago	Intestino D	Diálisis
Control	6,89±0,02 <sup>aA</sup>	2,20±0,00 <sup>bA</sup>	1,90±0,00 <sup>cA</sup>	1,21±0,01 <sup>dA</sup>
Maqui	5,13±0,00 <sup>aB</sup>	3,02±0,01 <sup>bB</sup>	4,32±0,03 <sup>cB</sup>	1,63±0,02 <sup>dB</sup>
Arándano	5,60±0,01 <sup>aC</sup>	2,84±0,00 <sup>bC</sup>	2,37±0,01 <sup>cC</sup>	1,03±0,00 <sup>dC</sup>

Valores seguidos de la misma letra minúscula dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey.

Valores seguidos de la misma letra mayúscula dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey.



En la fase de digestión en el estómago a causa de una posible interacción de las enzimas y al pH ácido se produce una pérdida de 68,07% con respecto a la concentración de la primera fase, en la fase del intestino se produce otra reducción de la capacidad reductora, pasando de 2,20 mg a 1,9 mg Trolox Equivalente/g originándose una pérdida de 13,64%.

En cuanto a la capacidad quelante del ión ferroso obtenida en la muestra adicionada con un extracto de maqui, partiendo que en la fase de digestión en la boca hay una concentración de 5,13 mg Trolox Equivalente/g se observa una pérdida en la fase posterior (estomago) del 41,15% ( $p < 0,05$ ) que podría ser debido a la presencia de enzimas y al pH ácido.

En la fase del intestino se produce un incremento ( $p < 0,05$ ) de la capacidad de reducción de ion férrico, debido a un incremento de 1,30 mg Trolox Equivalente/g, estos nos indica que debido al cambio de pH entre fases hay un incremento de la capacidad reductora y, por tanto, ayuda a que los agentes con actividad reductora estén más biodisponibles y actúen de forma correcta incrementando su actividad. Por último, finalizado el proceso de diálisis hay una pérdida de 62,27% existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a la muestra adicionada con un extracto de arándano en la fase inicial de digestión, que presenta una concentración de 5,60 mg Trolox Equivalente/g se produce una pérdida significativa de casi la mitad ( $p < 0,05$ ) de la concentración (49,29%), en la fase del intestino sufre una pérdida de 16,55% y terminando con el proceso de diálisis hay una pérdida de 56,55% respecto a la concentración anterior ( $p < 0,05$ ).

Por lo presente evaluando las pérdidas en la fase del estómago donde se produce una degradación del compuesto y no se puede asimilar, y las pérdidas en la fase del intestino y del proceso de diálisis que indica los mg asimilados por el organismo, podemos concluir que en este método el mejor resultado es obtenido por parte de la muestra con extracto de maqui.

La coloración que se obtuvo de las muestras tras la finalización del método se encuentra reflejado en la Figura 9.



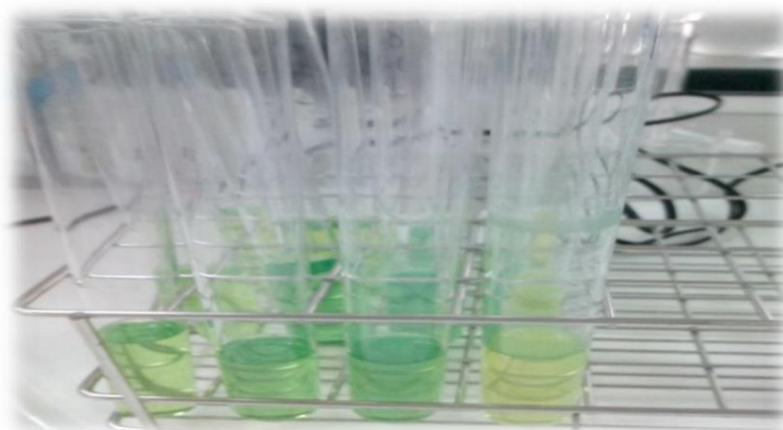


Figura 9 coloración obtenida al final del proceso de evaluación de FRAP

En la Tabla 11 se pueden observar los valores obtenidos por el método DPPH de los extractos estudiados durante su evolución en las distintas etapas del proceso de digestión *In vitro*.

**Tabla 11 DPPH:** Expresado en mg Trolox equivalente/g en las distintas muestras de hamburguesas adicionadas con extractos de maqui y arándano y sometidas a un proceso de digestión *in vitro*.

Muestras	Boca	Estómago	Intestino D	Diálisis
<b>Control</b>	0,55±0,01 <sup>aA</sup>	0,11±0,01 <sup>bA</sup>	0,05±0,01 <sup>cA</sup>	0,08±0,01 <sup>dA</sup>
<b>Maqui</b>	0,28±0,01 <sup>aB</sup>	0,11±0,01 <sup>bA</sup>	0,05±0,01 <sup>cA</sup>	0,10±0,01 <sup>bA</sup>
<b>Arándano</b>	0,49±0,01 <sup>aC</sup>	0,08±0,01 <sup>bC</sup>	0,05±0,01 <sup>cA</sup>	0,08±0,01 <sup>dA</sup>

Valores seguidos de la misma letra minúscula dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey. Valores seguidos de la misma letra mayúscula dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el test de rangos múltiples de Tukey.

Comenzando con la muestra control que presenta tras la digestión mediante  $\alpha$  amilasa una concentración de 0,55 mg Trolox Equivalente/g, en el estómago respecto al valor anterior se produce una pérdida ( $p < 0,05$ ) de 80% más de tres cuartas partes de pierden en muestra control con este método y esto se debe a la interacción de la enzimas en este fase.

En la fase del intestino respecto al valor anterior hay una pérdida de aproximadamente el 50% ( $p < 0,05$ ). Finalmente después de la diálisis se observa un aumento ( $p < 0,05$ ) de la actividad antioxidante indicando la presencia de compuestos con dicha actividad en esta fase.

Comenzando ahora a comparar estos resultados con las muestras adicionadas con maqui o arándano, en el caso de la muestra con extracto de maqui, se observa que inicialmente en la fase de la boca, presentaba un valor de 0,28 mg Trolox Equivalente/g basándonos en este valor en la fase del estómago se observa unas pérdidas de más de la mitad 58,93% ( $p < 0,05$ ) las cuales no se podrán utilizar, en comparación con la muestra control hay una mejoría en esta fracción del sistema de digestión.

En la fase de digestión del intestino se produce una pérdida de la actividad antioxidante 58,27 % con respecto a la concentración anterior eso podría indicar que hay una buena interacción entre las dos fases y entre el cambio de pH, Finalmente tras la fase de diálisis se observa un incremento ( $p < 0,05$ ) de la actividad antioxidante indicando la presencia de compuestos con dicha actividad en esta fase.

Finalizando con la muestra analizada de extracto de arándano, en la fase de digestión estomacal hay una pérdida del 83,68% ( $p < 0,05$ ) con respecto a la fase anterior es la muestra que mayor pérdida presenta, reduciéndose de nuevo su actividad antioxidante en la fase del intestino en un 43,75 % ( $p < 0,05$ ) tras la fase de diálisis al igual que ocurre que en las dos anteriores muestras se observa un aumento de la actividad antioxidante.

Por ello la muestra con mejores resultados de pérdidas en la fase del estómago e asimilación en el intestino es la muestra con extracto de maqui, el aspecto que se obtuvo tras finalizar el método se manifiesta en la Figura 10.

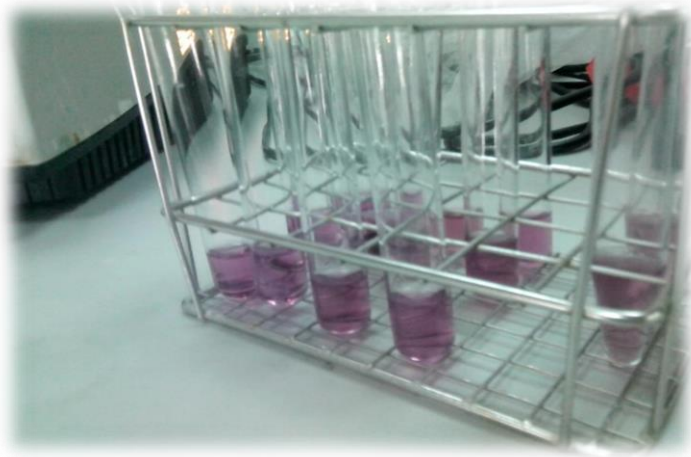


Figura 10 coloración obtenida al final del proceso de evaluación de DPPH

Hay que puntualizar que la variación de valores que puede ocurrir en otros estudios se debe a que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve determinada por su estructura química, por lo que existen grandes diferencias en la efectividad como antioxidantes entre los distintos grupos de compuestos, por ello los resultados que se han obtenidos aunque sean negativos en el caso de las muestras de bayas, se puede deducir que no han interactuado de manera adecuada.

#### 4.3 Resultados texturómetro

Se evaluaron tres muestras que se observan en la Figura 11, la muestra control que solo presenta carne, la muestra con extracto de maqui y la muestra con extracto de arándano. La Tabla 13 muestra los valores de textura de las muestras de hamburguesa adicionadas con extractos de maqui, arándano y la muestra control.



Figura 11: Aspecto de la muestras tras el proceso de cocción.

**Tabla 13:** Resultados de los valores de textura de las muestras de hamburguesa adicionadas con extractos de maqui, arándano y la muestra control

Muestras	Dureza	Elasticidad	Cohesividad	Adhesividad	Gomosidad	Masticabilidad
Control	2006,4 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	-0,33 <sup>a</sup>	1096,20 <sup>a</sup>	325,70 <sup>a</sup>
Maqui	4519,5 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,55 <sup>b</sup>	-11,01 <sup>b</sup>	2519,29 <sup>b</sup>	910,35 <sup>b</sup>
Arándano	3916,5 <sup>c</sup>	0,39 <sup>c</sup>	0,47 <sup>c</sup>	-14,41 <sup>c</sup>	1844,77 <sup>c</sup>	721,50 <sup>c</sup>

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.

El análisis de perfil de textura (TPA) mostró los siguientes resultados descritos en la Tabla 13, en ella se muestra todos los valores obtenidos a excepción de la fracturabilidad que no presentó valores en el análisis.

Como se pudo observar los parámetros elasticidad, y cohesividad no mostraron diferencias significativas, lo que significa que las tres muestras en relación a estos parámetros son muy parecidas.

En contraste la dureza, adhesividad, gomosidad y masticación si presentaron diferencias significativas durante el tiempo de investigación.

Hay que destacar que los valores de adhesividad son negativos, lo cual nos indica que la textura de las muestras es pegajosa o adhesiva, es decir cuando el producto es consumido éste se adhiere al paladar, lo que conlleva a realizar un esfuerzo necesario para retirarlo, esto puede deberse a mayor cantidad de carbohidratos presente por ello las muestras de maqui y arándano presentan unos valores mucho más elevados que la muestra control.

En cuanto a los valores de dureza se observa una mayor dureza en la muestra con extracto de baya y en cuestión en la muestra de extracto de maqui esto está relacionado a la capacidad de retención de humedad y a la cantidad de carbohidratos, a menor capacidad de retención de agua mayor dureza, no obstante aunque en las 3 muestras evaluadas, la pérdida de peso es muy similar las muestras de extracto proporcionan mayor dureza.

Siguiendo en orden de las ideas, la masticabilidad sostiene un comportamiento similar a la dureza, por lo que podemos demostrar que la dureza, la masticabilidad y el esfuerzo de corte aumenta exponencialmente con la disminución del contenido de humedad, lo mismo ocurre con la adhesividad. Mientras que en el parámetro de gomosidad ocurre que se incrementa de mayor medida en las muestras de extracto de baya esto nos indica que se necesita mayor esfuerzo y energía para desintegrar el alimento de modo que esté listo para ser tragado, así que los valores están relacionado perfectamente con los valores de dureza y masticabilidad.



## 5. CONCLUSIONES

1. Para el método de evaluación de los fenoles totales la muestra de maqui presenta menor pérdida y degradación de compuestos bioactivos.
2. Mientras que para el mismo método la muestra de extracto de arándano presenta la mayor asimilación de compuestos en la fase del intestino.
3. Para el estudio del método FIC la muestra de extracto de maqui presenta las menores pérdidas y la mejor asimilación en la fase de intestino con un 53,58%.
4. En el caso del análisis del método FRAP, la muestra de extracto de maqui tiene menores pérdidas y proporciona mayor biodisponibilidad en la fase del intestino, y una muy buena asimilación tras la diálisis junto a la muestra de extracto de arándano que también asimila rangos muy aceptables.
5. Para el método DPPH los mejores rangos de menor pérdida y mayor asimilación lo presenta la muestra de extracto de maqui.
6. En los rangos de valoración de los parámetros de textura , las muestras que presentan extracto vegetal, presentan mayor dureza, mayor masticabilidad y gomosidad , además de presentar valores de adherencia negativos más elevados, todos estos valores indican que las muestras con extracto vegetal presenta más dificultad para masticar.
7. Para concluir los datos nos indica que la incorporación de extracto vegetal principalmente de maqui, beneficia a la asimilación de compuestos antioxidantes y compuestos bioactivos, siendo adecuados para añadir a productos cárnicos, no obstante le confiere más dureza y mayor dificultad para ingerir.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Beckman KB, Ames BN. (1998). The free radical theory of ageing matures. *Physiol, Natural center for biotechnology information*, 78(2),547-81
- 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.
- [Botanical-online.com/propiedadesarandanos.htm](http://Botanical-online.com/propiedadesarandanos.htm)
- Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62-72.
- 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.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent-ferrozine. *Annual Reviews of Biochemistry*, 40(2):450–458
- 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.
- Correa, J. Yesid, H. (1992). Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andres Bello. Tomo VII. Editorial Andres Bello, 547 p.

- 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.
- Escribano-Bailón MT; Alcalde-Eon C, Muñoz O, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. (2006). Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis (mol.) Struntz*). *Phytochemical Analysis*, 17(1), 8-14.
- Fuller, M. F. (Ed.). (1991). *In Vitro digestión for pigs and poultry*. Wallington, UK: CAB International.
- Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231–255
- Hoffmann, (1997). *Flora silvestre de Chile, zona araucana*. Cuarta edición. 257
- Información tecnológica de productos forestales no madereros del bosque nativo en Chile monografía de maqui *aristotelia chilensis (mol.) stuntz*
- Khokhar, S.; Apenten, R. K. O. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative-structure activity relations. *Food Chem*, 81, 133-140.
- 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.
- Lee J, Koo N, Min DB. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33
- Leenders, M. Sluijs, I. Ros MM, Boshuizen, HC. (2013). Fruit and vegetable consumption and mortality: European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*, 178(4), 590-602
- Liu. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of clinical nutrition*, 78, 517- 520



- 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.
- Miranda-Rottmanns S., Aspillaga A. A., Pérez Druso D., Vasquez Luis, Martínez Alvaro L. F., Leighton F. (2002) Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cell against oxidative stress. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 50 (26), 7542–7547
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez. H., Núñez, M.J., Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- 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.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chemistry*, 18;53(10),4290-302
- Rice-Evans, C. A, Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790-795.
- Robards K, Prentzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 66,401-436
- Sánchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*,8.3, 478-489
- Santibáñez, I. Carla G. (2008). Variación poblacional del contenido de antocianinas en bayas de Maqui, *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz. Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía. 39p

- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Rad Res.* 36:177-187
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol ,6, 144-156
- Tomás-Barberán, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10, 41-53.
- Van Citters, G. W., Lin, H. C. (1999). The ileal brake: A fifteen-year progress report. *Current Gastroenterology Reports*, 1, 404-409.
- Webb, G. P. (2007). Complementos nutricionales y alimentos funcionales. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, 5, 129-141.

