

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE
EXTRACTOS DE MAQUI MEDIANTE EL USO DE UN
MODELO DE DIGESTIÓN *IN VITRO*”**

TRABAJO FIN DE GRADO

Julio- 2019

Autor: Sergio Navarro Covas

Tutor/es: Manuel Viuda Martos



DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE MAQUI MEDIANTE EL USO DE UN MODELO DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

RESUMEN

En la última década, la demanda de los alimentos funcionales se ha incrementado debido a los beneficios que obtienen los consumidores, por ello se están realizando diversos estudios para saber el potencial de los alimentos con diversos métodos. El objetivo principal de este estudio ha sido la determinación antioxidante del maqui (*Aristotelia chilensis*). Para ello, se han realizado diferentes métodos: Fenoles totales, flavonoides totales, DPPH, FRAP, FIC y ABTS. Estas determinaciones se realizaron en las 3 etapas de la digestión *in vitro*: boca, estomago e intestino tanto para la fase líquida como la sólida. Los resultados obtenidos nos permitieron estudiar el efecto de la digestión sobre el metabolismo y la biodisponibilidad de los compuestos presentes en la baya.

Palabras clave: digestión *in vitro*, antioxidantes, antocianinas, maqui.

DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT EFFECT IN MAQUI EXTRACTS THROUGH THE USE OF AN MODEL *IN VITRO* DIGESTION

ABSTRACT

In the last decade, the demand of functional foods has increased due to the benefits obtained for consumers, Therefore, several studies are being done in order to know the potential of food with various methods. The main aim of this study has been the antioxidant determination of the maqui berry (*Aristotelia chilensis*). So, different methods have been carried out: Total phenol content, total flavonoid content, DPPH, FRAP, FIC and ABTS. These determinations were made in the 3 stages of *in vitro* digestion: oral, gastric and intestinal digestion both for the liquid and solid phases. The results obtained allowed us to study the effect of digestion on the metabolism and bioavailability of the compounds present in the berry.

Keywords: *in vitro* digestión, antioxidant, anthocyanins, maqui berry.

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
1. INTRODUCCION	1
1.1. Maqui	7
1.2. Antocianinas	10
1.3. Estrés oxidativo y antioxidantes	12
1.4. Digestión <i>in vitro</i>	15
1.4.1. Digestión <i>in vitro</i> y enzimas	16
1.4.2. Digestión <i>in vitro</i> y condiciones de la muestra	17
1.4.3. Digestión <i>in vitro</i> y tiempo de tránsito	17
1.5. Justificación del trabajo	18
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo general	19
2.2. Objetivos particulares	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Obtención de las muestras	20
3.2. Simulación de un sistema de digestión <i>in vitro</i>	20
3.3. Índice de recuperación e índice de bioaccesibilidad	21
3.4. Determinación actividad antioxidante	22
3.4.1. Preparación de los extractos	22
3.4.2. Actividad antioxidante utilizando el radical 2,2' –diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	22
3.4.3 Poder antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP)	23
3.4.4. Capacidad quelante del ión ferroso (FIC)	23
3.4.5. Contenido de fenoles totales (CFT)	24
3.4.6. Contenido de flavonoides totales (CFIT)	24
3.4.7. Determinación compuestos polifenólicos	24
3.5. Análisis estadístico	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Índice de recuperación e índice de bioaccesibilidad	26
4.2. Estabilidad de los compuestos polifenólicos presentes en la digestión gastrointestinal simulada <i>in vitro</i>	28
4.3. Propiedades antioxidantes	35
5. CONCLUSIONES	40
6. BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>A. chilensis</i>	7
Tabla 2. Estructuras de las distintos tipos de antocianinas	10
Tabla 3. Principales sistemas de defensa antioxidante y su función	14
Tabla 4. Perfil polifenólico de las dos fracciones (fracción sólida (FS) y fracción líquida (FL)) obtenidas después de la etapa oral, de extractos de maqui en la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	32
Tabla 5. Perfil polifenólico de las dos fracciones (fracción sólida (FS) y fracción líquida (FL)) obtenidas después de la etapa gástrica, de extractos de maqui en la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	33
Tabla 6. Perfil polifenólico de las dos fracciones (fracción sólida (FS) y fracción líquida (FL)) obtenidas después de la etapa intestinal, de extractos de maqui en la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	34
Tabla 7. Propiedades antioxidantes de las 2 fracciones (líquida y sólida) medidas con los métodos DPPH, FRAP, FIC y ABTS después de cada etapa (oral, gástrica e intestinal) de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	35
Tabla 8. Los valores de la correlación entre el contenido fenólico total (CFT) o el contenido de flavonoides total (CFIT) y la actividad antioxidante medidos con los métodos DPPH, FRAP, FIC y ABTS después de cada fase (oral, gástrica e intestinal) de la digestión gastrointestinal	39



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Flores de la <i>Aristotelia chilensis</i>	8
Figura 2. Variación de coloración en frutos de <i>Aristotelia chilensis</i> , durante el periodo de maduración	8
Figura 3. Capacidad de absorción de los radicales del oxígeno (ORAC)	9
Figura 4. Estructura de las antocianinas	10
Figura 5. Representación gráfica de las distintas etapas de la digestión	21
Figura 6. Índice de recuperación de CFT y CTIP en cada fase intestinal.	27



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Maqui (*Aristotelia Chilensis*)

Aristotelia Chilensis (Molina Stunz) o comúnmente conocida como maqui es una planta de la familia de las eleocarpáceas (*Aristotelia maqui*), de hasta 5 metros de alturas; hojas opuestas, ovales, dentadas y con estípulas caducas; flores blanco-amarillentas, dispuestas en cimas en la axila de las hojas, y fruto en baya comestible de unos 5 milímetros, negro o violáceo y de sabor dulce y ácido.

Esta planta chilena vegeta en lugares húmedos y sombríos desde la provincia de Coquimbo hasta la de Chiloé; en el archipiélago Juan Fernández es una especie invasora. Tolera diferentes tipos de suelos, y puede plantarse a pleno sol o semi-sombra (Benedetti, 2012).

El fruto ha sido reconocido por sus múltiples beneficios que son atribuidos a su alto contenido en polifenoles, así como también a su amplia variedad de flavonoides y antocianinas (Fredes, et al. 2012). Según Thorne (1992), Strasburger et al., (1994) y Hoffmann (1997). La clasificación taxonómica de la *A. chilensis* es la que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *A. chilensis*

REINO	<i>Plantae</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
ORDEN	<i>Oxalidales</i>
FAMILIA	<i>Eleocarpaceae</i>
GÉNERO	<i>Aristotelia</i>
ESPECIE	<i>Aristotelia chilensis</i> (Molina Stuntz)
NOMBRE COMÚN	<i>Maqui, Maki, Queldrón, Koleón</i>

Tanto las flores femeninas como las masculinas se disponen en racimos en árboles separados. Las flores se encuentran en inflorescencia en corimbo de 2 a 3, que nacen de las axilas de las hojas, presentando flores unisexuales (Muñoz, 1980; Hoffman,

1992; Matthei, 1995; Cardenas, 1998; Cabello, 2003). Estas flores son de color amarillo claro (figura 1), de 5-6 mm de diámetro, con un cáliz campanulado de 5 a 6 sépalos lanceolados, agudos de 2 a 2,5 y 1 a 1,5 mm de ancho, con 5 a 6 pétalos libres, transovados, de 3 a 4 mm de largo (Rodriguez et al., 1983; Hoffman, 1997; Cabello, 2003).



Figura 1: Flores de la *Aristotelia chilensis*.

El fruto del maqui es una baya redonda comestible de color negro brillante en su madurez, aunque posee el color verde y rojo en etapas tempranas del crecimiento (figura 2), de unos 5 mm de diámetro, de pulpa dulce en cuyo interior hay dos semillas angulosas (Hoffmann, 1997), otros autores mencionan que posee entre 2 a 4 semillas angulosas de 3 mm de largo y 2 mm de ancho (Oyanadel, 2002). Bittner et al., (1995), menciona que el color púrpura del fruto se debe a la presencia de antocianinas. Este fruto posee alto valor alimenticio y un porcentaje de humedad de 56,4% (Correa y Yesid, 1992; Santibáñez, 2008).

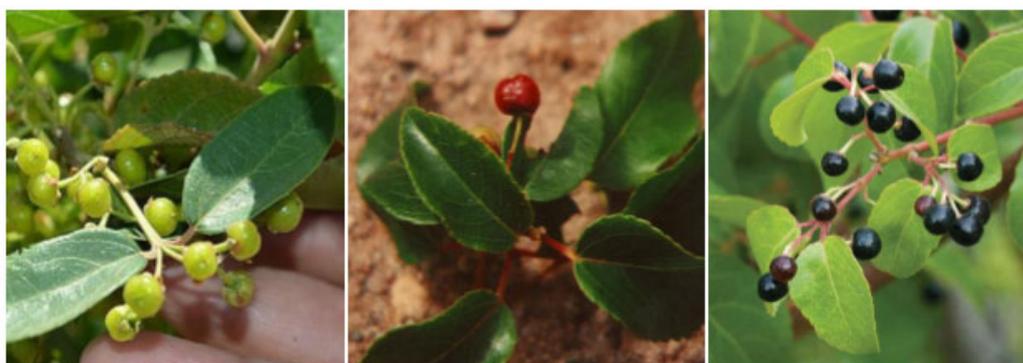


Figura 2: Variación de coloración en frutos de *Aristotelia chilensis*, durante el periodo de maduración.

En sus frutos se ha detectado la presencia de flavonoides con capacidad antioxidantes (Valdebenito et al., 2006) 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) (Figura 3) de todas las frutas conocidas y medidas por el Brunswick Laboratories de EE.UU (Fundación Chile, 2012). La presencia de estos antioxidantes en el fruto es a través de Antocianidinas, las cuales serían responsables del color púrpura característico de los frutos (Silva y Bittner, 1992).

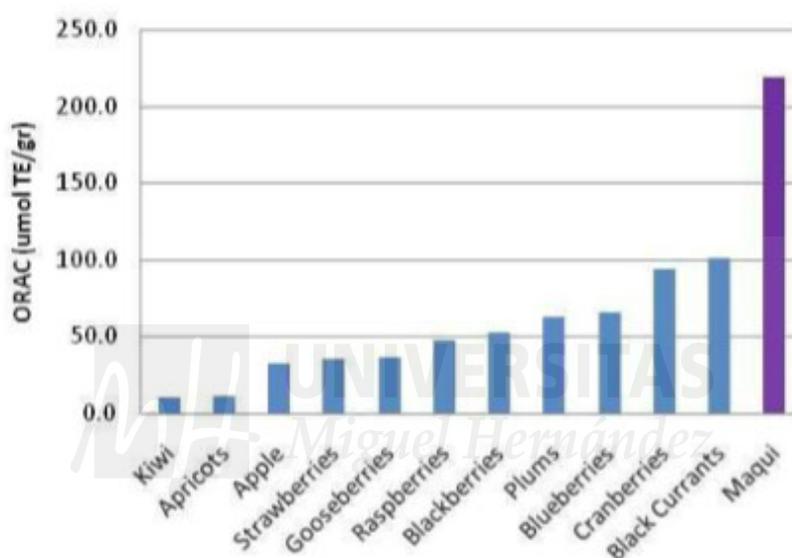


Figura 3: Capacidad de absorción de los radicales del oxígeno (ORAC).

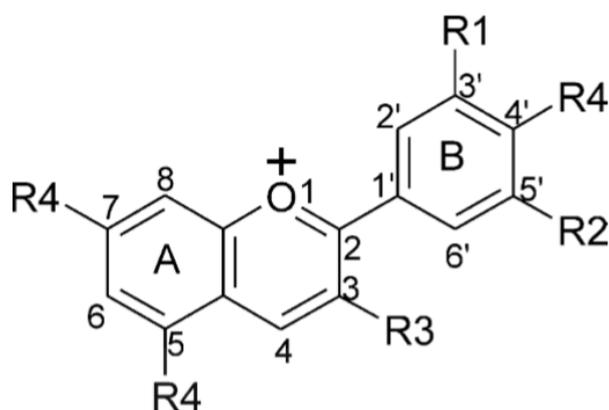
En cuanto a la composición química del fruto, cada 100 g de frutos contiene 150 calorías, 0,8 g de proteínas, 0,8 g de fibra cruda, 1,2 g de cenizas, 87 mg de calcio, 44 mg de fósforo, 30,5 mg de hierro y 296 mg de potasio. Contiene también un considerable porcentaje de vitamina C y oligoelementos, destacando la presencia de Br, Zn, Cl, Co, Cr, Vn, Tn, y Mo. Las hojas maduras del maqui solo se diferencian de las jóvenes por su menor contenido de potasio y mayor de sodio. Cabe señalar que los contenidos de magnesio, cloro, calcio, titanio y vanadio no varían entre hojas de plantas de sitios con diferente pluviosidad anual (MNL Group, 2016).

1.2 Antocianinas

Las antocianinas son los pigmentos más importantes de las plantas visibles al ojo humano. Pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos llamado flavonoides.

En la figura 3 y tabla 2 podemos observar la estructura de las antocianinas y los distintos tipos de antocianinas que hay.

Figura 4: Estructura de las antocianinas



Nombre	Abreviación	3	5	6	7	3'	4'	5'	Color
Apigeninidina	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	Naranja
Aurantidinina	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Naranja
Capensinidina	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Rojo/azulado
Cianidina	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Naranja/rojo
Delphinidina	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rojo-azulado
Europinidina	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Rojo-azulado
Hirsutidina	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Rojo-azulado
6Hidroxicianidina	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Rojo
Luteolinidina	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Naranja
Malvidina	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Rojo/azulado
5Methylcianidina	5MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Naranja/rojo
Pelargonidina	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Naranja
Peonidina	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Naranja/rojo
Petunidina	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Rojo/azulado
Pulchellidina	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Rojo/azulado
Rosinidina	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Rojo
Tricetinidina	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rojo

Tabla 2: Estructuras de las distintos tipos de antocianinas

En cuanto a las funciones que desempeñan las antocianinas, una de ellas es la de revertir los déficits cognitivos y neuronales relacionados con la edad (Joseph et al., 1999).

La actividad biológica de las antocianinas hace posible que sean unos compuestos antiinflamatorios y antiedema (Wagner, 1985), es posible que las antocianinas puedan reemplazar a la rutina y a sus derivados en el tratamiento de enfermedades que involucradas en la inflamación de los tejidos o en la fragilidad capilar. Los extractos de antocianina crudos de *Vaccinium myrtillus* se han administrado por vía oral y por inyección intravenosa o intramuscular para reducir la permeabilidad y fragilidad de los capilares.

En un estudio sobre el efecto de las antocianinas en los tumores, no fueron eficaces para suprimir el crecimiento de los tumores (Ghiselli et al., 1998). Sin embargo, un estudio de la actividad antioxidante de las fracciones de antocianina del vino tinto italiano demostró que la fracción de antocianina, fue la más efectiva tanto en la eliminación de especies reactivas de oxígeno como en la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas y la agregación plaquetas (Ghiselli et al., 1998), incluso se le atribuyen actividades antitumorales (Kamei et al., 1998) donde encontraron una fracción de las antocianinas en el vino tinto que suprimía las células HCT-15, el cual derivaban en cáncer de colon o que suprimía las células AGS, responsables del cáncer gástrico. La tasa de supresión en las fracciones de antocianinas fueron significativamente altas respecto a otras fracciones. Además, Zobel et al. (1999) estudiaron los posibles mecanismos protectores de las antocianinas en células de mamíferos comparando su poder antioxidante extracelular e intracelular *in vitro* y en células tumorales humanas del colon, dando como resultado, que los compuestos aislados (agliconas y glucósidos) tenían un alto poder antioxidante *in vitro*.

Koide et al. (1997) también informaron sobre los efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* de los extractos de soja roja, que estaban compuestos principalmente por cianina conjugada con glucosa y ramnosa. Mientras tanto, Satue-Gracia et al. (1997) informaron que las antocianinas actuaban como antioxidantes en los sistemas de

lipoproteínas de baja densidad (LDL) en humanos y lipolecitina *in vitro*. Encontraron que la inhibición de la oxidación aumentaba con la concentración del antioxidante.

1.3. Estrés oxidativo y antioxidantes

El oxígeno tiene un papel fundamental en los organismos aeróbicos, ya que está presente en los procesos metabólicos. Pese a que forme parte de la fisiología humana, pueden generarse complicaciones debido al desequilibrio entre los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno, lo que conocemos como el estrés oxidativo, provocando enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes, además de ser causante del propio envejecimiento Harman et al (1954).

El organismo ha adquirido a lo largo de la evolución mecanismos de defensa contra los radicales libres. Estos mecanismos intentan prevenir la producción de radicales libres, detener o retardar la reacción de oxidación en cadena que desencadena el radical, reparar los daños que causan a las macromoléculas o degradar las lesionadas. Los mecanismos antioxidantes suelen actuar de forma coordinada, ejercen su función en localizaciones subcelulares concretas, y se agrupan en dos sistemas de defensa antioxidante: sistema enzimático y sistema no enzimático.

El sistema antioxidante enzimático constituye la primera y mejor línea de defensa contra los radicales libres. Está integrado por tres enzimas principales que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres: superóxido dismutasa, (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); otras tres enzimas, glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST) y γ -glutamil cisteinil sintetasa (GCS), sin ser estrictamente enzimas antioxidantes, colaboran indirectamente con la GPx ya que contribuyen a regular el pool intracelular de glutatión reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos.

La SOD cataliza la destrucción del radical superóxido, formando peróxido de hidrógeno como producto de una reacción que es acelerada por la SOD. Existen tres formas moleculares: SOD-1, que actúa en el citosol y requiere cobre y zinc; SOD-2, en la mitocondria y precisa de manganeso, y la SOD-3, localizada en el espacio extracelular y

precisa de cobre y zinc. La CAT y GPx neutralizan el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos.

La CAT contiene hierro en su sitio activo y se localiza en los peroxisomas (o en el citosol de los glóbulos rojos); en células sin peroxisomas es una enzima citosólica; además del peróxido de hidrógeno es capaz de neutralizar peróxidos lipídicos, transformándolos en alcoholes inertes.

La GPx es la enzima más importante para eliminar peróxidos en las células de los mamíferos, desarrollando múltiples funciones para la protección de los tejidos frente al daño oxidativo, preservando el ambiente intracelular en un estado reducido; necesita GSH como cofactor, el cual, en presencia de radicales libres, se oxida bajo el control de la enzima convirtiéndose en glutatión oxidado (GSSG). A pesar de que, por sí mismas, ninguna de las tres enzimas es capaz de impedir la acción de uno de los radicales libres más agresivos y nocivos que se conocen, el radical hidroxilo, sin embargo, su acción conjunta sí puede hacerlo, al evitar que la combinación o acción de otros radicales generen este último. Finalmente, la GR regenera los depósitos intracelulares de GSH, a partir de GSSG y poder reductor, el NADPH.

La GST cataliza la conjugación de xenobióticos, radicales libres y toxinas con GSH y, por último, la GCS es la enzima limitante en la biosíntesis hepática del GSH.

El sistema antioxidante no enzimático está integrado por una serie de sustancias que, aun estando presentes a bajas concentraciones, en presencia de compuestos oxidables (como ADN, proteínas o lípidos), se oxidan antes que éstos, y retrasan, inhiben, amortiguan o previenen su oxidación, la producción de radicales libres o los efectos deletéreos de éstos. El sistema antioxidante no enzimático incluye una larga serie de compuestos de bajo peso molecular, siendo los más importantes el glutatión reducido, la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina A (trans-retinol/ β -caroteno). Además, los flavonoides, ácidos fenólicos, ácido α -lipóico, ácido úrico, bilirrubina, algunos azúcares y aminoácidos, coenzima Q o ubiquinona y varios derivados de ésta y una hormona, la melatonina, también forman parte de los antioxidantes no enzimáticos. El manganeso, selenio, cobre, hierro y otros minerales, al ser parte del sitio activo de las enzimas antioxidantes, juegan un papel importante

en la defensa mediada por enzimas, sin ser verdaderos antioxidantes. En la tabla 3, se puede observar un cuadro resumen de los principales sistemas de defensa antioxidante y la función que realiza.

Tabla 3: Principales sistemas de defensa antioxidante y su función

Superóxido dismutasa	Cataliza la dismutación del superóxido
Glutación peroxidasa	Cataliza la oxidación de glutación a glutación disulfuro
Glutación reductasa	Cataliza la reducción del glutación oxidado a glutación reducido
Catalasa	Cataliza la descomposición del peróxido del hidrogeno de oxígeno y
Glucosa 6 fosfato	Cataliza la reacción de la pentosa fosfato
Tocoferol	Protege las membranas lipídicas y evita la catalización de la
Carotenoides	Evita la catalización de la peroxidación
Polifenoles	Capta los radicales libres y actua como quelante de metales
Coenzima Q	Capta radicales libres
Bilirrubina	Capta radicales peroxilo
Vitamina C	Presente en reacciones redox
Flavonoides	Evita la catalización de la peroxidación

Existen diversos estudios desde la década de los noventa, en los que se ha demostrado evidencias epidemiológicas de que los compuestos antioxidantes previenen estas enfermedades como Renaud y Lorgetil (1992) y Gronbaek et al. (1995).

Los antioxidantes son sustancias que evitan, retardando o inhibiendo la oxidación de moléculas que pueden ser oxidadas por las especies reactivas del oxígeno. Estas sustancias, están presentes de forma natural en el organismo, sin embargo, la dieta ocupa un papel fundamental. Los que tienen una mayor importancia por las reacciones metabólicas redox son la vitamina C, beta-carotenos, vitamina E, selenio, cobre, zinc y manganeso.

1.4 Digestión *in vitro*

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el diseño estructural de los sistemas portadores o “carriers” de componentes bioactivos adicionados a los alimentos basados en la encapsulación, protección y liberación de dichos componentes bioactivos para beneficiar la salud humana (McClements, Decker & Park, 2009). Estos sistemas portadores pueden ser diseñados para liberar los componentes bioactivos en

una ubicación específica en el tracto gastrointestinal humano, a menudo en respuesta a un desencadenante ambiental como el pH, la fuerza iónica o la actividad enzimática. El sistema portador también puede ser diseñado para controlar la velocidad de liberación del compuesto bioactivo, ya que puede ser por liberación en cascada o liberación prolongada. La eficacia del desarrollo de nuevos sistemas portadores depende de la disponibilidad de los modelos de digestión que simulen con precisión las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas que se producen en el tracto gastrointestinal humano.

En los métodos de alimentación In Vivo, en los que se emplean animales o seres humanos, por lo general proporcionan resultados más exactos, pero precisan de mucho tiempo y dinero, por lo que se dedica mayor esfuerzo e interés a la elaboración de procedimientos *in vitro* (Boisen y Eggum, 1991). En principio, los modelos de digestión *in vitro* proporcionan una alternativa útil a modelos animales y humanos mediante el cribado rápido de ingredientes alimentarios. El método ideal de digestión *in vitro* proporcionaría resultados precisos en poco tiempo (Coles, Moughan y Darragh, 2005) y por lo tanto podría servir como una herramienta para la detección rápida de alimentos o sistemas portadores con diferentes composiciones y estructuras. En la práctica, cualquier método *in vitro*, inevitablemente no va a contar con la precisión que se puede lograr para el estudio de un alimento en un estudio In Vivo debido a la complejidad inherente del proceso (Coles et al., 2005; Fuller, 1991). En consecuencia, se necesita un cierto compromiso entre la precisión y la facilidad de utilización de cualquier modelo de digestión *in vitro*. Durante los últimos años, la comunidad científica han utilizado un número de modelos de digestión *in vitro* para probar los cambios estructurales y químicos que se producen en diferentes alimentos en condiciones gastrointestinales simuladas, aunque ninguno de estos métodos ha sido ampliamente aceptado todavía.

1.4.1 Digestión *in vitro* y enzimas

Varios factores, tales como las características de la muestra, la actividad enzimática, la composición iónica y los tiempos de digestión, tienen influencias significativas en los resultados de los métodos de digestión *in vitro*. Por lo tanto, las condiciones In Vivo

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

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

1.4.2. Digestión *in vitro* y condiciones de la muestra

Las características de los alimentos, el tipo de enzima y las concentraciones de enzimas son factores claves que controlan la digestión de los alimentos durante la digestión *in vitro*. Abdel-Aal (2008) informó que las diferencias en la digestibilidad reflejan las influencias de enzimas proteolíticas, las condiciones de digestión así como el estado de las fuentes de proteínas (puro frente procesado). El aumento de la proteína en la dieta es inducida por un aumento de la secreción de enzimas proteolíticas pancreáticas, mientras que un aumento en la ingesta de almidón o de lípidos induce aumentos en las secreciones de amilasa y lipasa, respectivamente (Boisen y Eggum, 1991). Por lo tanto,

las características de digestión *in vitro*, tales como el tiempo de digestión, el contenido de la enzima o la composición de la enzima se deben ajustar de acuerdo con las características de la muestra. Por ejemplo, si la concentración de la sustancia diana (proteínas, lípidos o hidratos de carbono) se aumenta, entonces la concentración de enzimas o el tiempo de digestión se deben aumentar incluso si el resto del procedimiento de la digestión *in vitro* se mantiene igual.

1.4.3. Digestión y tiempo de tránsito

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

Por lo tanto, en el caso de análisis, en un sistema de digestión *in vitro*, de muestras con alto contenido en sustancias lipídicas, la concentración de enzimas (lipasa o pancreatina) y sales biliares así como el tiempo de digestión debe aumentarse. En los modelos de digestión *in vitro* no se suele tener en cuenta los fenómenos que ocurren en el intestino grueso, ya que la absorción de los compuestos tiene lugar principalmente en el intestino delgado (Brandon et al., 2006). En el mismo sentido, Brandon et al. (2006) informaron de que sólo la bioaccesibilidad determinada en el quimo del intestino delgado es relevante para la evaluación del riesgo. En general, los lípidos no pueden ser fermentados, por lo tanto, los lípidos son menos influenciados durante el paso a través del intestino grueso. Por lo que, el tiempo de tránsito o tiempo de digestión debe ser más corto en muestras de alimentos a base de lípidos en los modelos de digestión *in vitro*. Sin embargo, el tiempo de tránsito o tiempo de digestión se deben considerar de acuerdo con las características de los alimentos.

1.5. Justificación del trabajo

En los últimos años, se han producido diversos avances en cuanto a la información mediante evidencias científicas sobre los beneficios que aportan distintos frutos, pero no se conoce la actividad antioxidante del maqui.

Con este estudio, queremos conocer el comportamiento de extractos del maqui durante el proceso de digestión gracias a la simulación de digestión *In Vitro*.



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es analizar el efecto sobre las propiedades antioxidantes y el contenido en compuestos bioactivos presentes en extractos de la baya maqui con el proceso de digestión *in vitro* en las fases de boca, estomago e intestino observando las diferencias entre las ellas.

2.2. Objetivos particulares

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

- Determinar el contenido de fenoles totales en las distintas etapas del proceso de la digestión *in vitro*.
- Determinar el contenido de flavonoides totales en las distintas etapas del proceso de la digestión *in vitro*.
- Determinar el índice de recuperación y la bioaccesibilidad para el grupo fenólico (fenoles y flavonoides).
- 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

La baya maqui (*Aristotelia Chillensis* (Molina Stuntz)) fue proporcionada por SouthAm Freeze Dry S.A. Las muestras se recogieron de la ciudad de Cañete en la región Bio-Bio (Chile), fueron liofilizadas durante 72 horas. El producto obtenido se trituró en un mortero y se tamizó para eliminar las semillas.

3.2. Simulación de un sistema de digestión *in vitro*

La digestión *in vitro* de las muestras se realizó de acuerdo con el método descrito por Gullón et al. (2015). Esta metodología está basada en el empleo de distintas enzimas y la absorción de los componentes a través de tubos de diálisis. Esta metodología reproduce tres etapas distintas de la digestión: la masticación, la fase gástrica y la fase intestinal. La masticación se simuló usando una solución de saliva preparada con 100 U/mL α -amilasa (Sigma, Alemania) la cual se diluyó en CaCl_2 (1 mM), el pH se ajustó a un valor de 6,9 mediante el empleo de NaHCO_3 (1 M). La saliva simulada (1 mL) se añadió a 2,4 g de la muestra y 9 mL de agua. Esta solución se incubó a 37 °C durante 5 min. En las condiciones gástricas, el pH se ajustó hasta un valor de 2 con HCl (6 M) y luego se añadió 1 mL de pepsina (Sigma) (0,108 g) disuelta en HCl (0,1 M; 10 mL) y se incubó durante 2 h en un baño de agua con agitación a 37 °C y 50 rpm. En las condiciones del intestino delgado, el pH se ajustó a 7 con NaOH (6 M) y se añadieron 2,5 mL de pancreatina (Sigma) (80 mg) disuelta en NaHCO_3 (0,5 M; 10 ml) y 2,5 mL de mezcla de sales biliares (Sigma) (500 mg) disueltas en NaHCO_3 (0,5 M; 10 ml) y se continuó la incubación durante otras 2 h en un baño de agua con agitación a 37 °C y 50 rpm. Después de este tiempo, la solución de la muestra se transfirió a un tubo de diálisis de corte de 3 kDa de peso molecular y se dializó durante 12 horas en una disolución de NaCl (10 mM) a 37 °C para eliminar los productos de digestión de bajo peso molecular. La agitación mecánica de la muestra se empleó para simular los movimientos peristálticos del intestino. Al final de las fases de boca, estómago, intestino (antes de la diálisis) y diálisis, las mezclas de la digestión se centrifugaron durante 10 min a 11000 rpm a 4 °C, produciendo una fracción líquida de quimo (FL) y una fracción de sedimento (FS). Ambas fracciones se liofilizaron y se almacenaron para

el análisis cromatográfico de la composición de fenoles y actividad antioxidante. Todas las soluciones se prepararon con enzimas recién preparadas y esterilizadas por filtración utilizando un filtro de 0,22 μm (Millipore, BillericaMA, EE.UU.) antes de su uso. En la Figura 5, se puede observar de forma gráfica, lo que se ha realizado en cada una de las etapas.

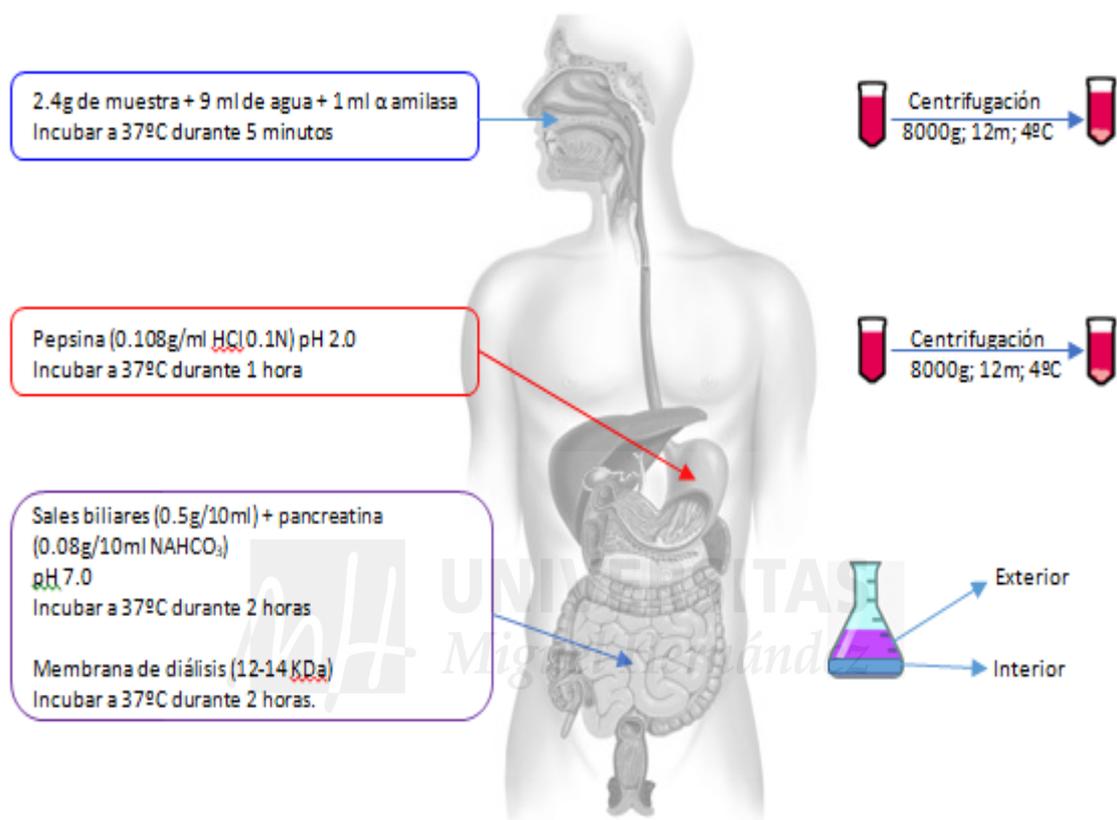


Figura 5: Representación gráfica de las distintas etapas de la digestión

3.3. Índice de recuperación e índice de bioaccesibilidad

Para analizar el efecto de la composición de la matriz en la digestión del grupo fenólico (ácidos fenólicos y flavonoides), se estudiaron dos índices diferentes siguiendo las indicaciones de Ortega et al. (2011): el porcentaje de recuperación y el porcentaje de bioaccesibilidad. El porcentaje de recuperación permite que la cantidad de los grupos fenólicos presentes en la digestión completa (CSF y PF), después de la digestión oral, gástrica e intestinal del alimento de prueba se mide de acuerdo con:

$$\text{Índice de recuperación (\%)} = \left(\frac{CF_{DF}}{CF_{TF}} \right) \times 100$$

En el cual, CF_{DF} es el contenido total de fenoles (mg) en la matriz intestinal del intestino digerido (CSF + PF) y CF_{TF} es el contenido total de fenoles (mg). Para cada grupo de fenol, la bioaccesibilidad se define como el porcentaje de compuestos polifenólicos que se solubilizan en el interior de la digestión intestinal. Por lo tanto, este índice define la proporción de los compuestos polifenólicos que podrían estar disponibles para su absorción en la circulación sistemática:

$$\text{Índice de bioaccesibilidad (\%)} = \left(\frac{CF_S}{CF_{DF}} \right) \times 100$$

Donde CF_S es el contenido total de fenoles (mg) en la muestra interior después de la fase de digestión intestinal y CF_{DF} es el contenido total de fenoles (mg) en la muestra digerida (interior + exterior) después de la fase de digestión intestinal.

3.4. Determinación de la actividad antioxidante

3.4.1. 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.

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

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos sobre el radical DPPH se debe a su capacidad para donar hidrógenos o a la actividad secuestrante de radicales. DPPH es un radical libre estable y que acepta un electrón o radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable (Brand-Williams et al., 1995). Para la determinación de la actividad antioxidante, 100 µL de los diferentes extractos obtenidos se mezclaron con 2 mL de una solución metanólica 0,06 mM de DPPH. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 2 min y se colocaron en la oscuridad durante 15 min. La absorbancia medida a 517 nm se determinó con un

espectrofotómetro HP 8451 (Hewell Packard). Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox. Los resultados se expresaron como μg de equivalentes de Trolox (TE) por gramo de muestra ($\mu\text{g TE/g muestra}$) como valor medio de dos repeticiones. En total el número de muestras analizadas fue de 36.

3.4.3. 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 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 36.

3.4.4. 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 $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (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 μg 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 36.

3.4.5. Contenido de fenoles totales (CFT)

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

3.4.6. Contenido de flavonoides totales (CFIT)

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

3.4.7. Determinación de los compuestos polifenólicos

Los perfiles polifenólicos de todas las muestras obtenidas en cada fase de la digestión gastrointestinal *in vitro* se determinaron mediante la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) siguiendo la metodología descrita por Genskowsky et al. (2016). Las muestras se inyectaron en un instrumento Hewlett-Packard HPLC serie 1200 equipado con la columna C18 (Mar Mediterráneo₁₈, 25 × 0,4 cm, 5 µm de tamaño de

partícula) de Teknokroma, (Barcelona, España). Los compuestos fenólicos se analizaron, en soluciones estándar y de muestra, utilizando un gradiente de elución de 1 ml/min. Las fases móviles tuvieron una composición de ácido fórmico en agua (4,5: 95,5, v/v) como disolvente A y el acetonitrilo como disolvente B. Los cromatogramas se registraron a 280nm, 360nm y 520 nm. La identificación de los compuestos polifenólicos se realizó comparando los espectros de absorción UV y los tiempos de retención de cada compuesto con los de los estándares puros inyectados en las mismas condiciones. Cuando los estándares no estaban disponibles, los compuestos se identificaron de manera tentativa comparando sus espectros UV/Visible con los datos publicados anteriormente (Fischer et al., 2011; Fredes et al., 2014; Brauchet al., 2016). La cuantificación de las antocianinas se realizó en base a los estándares. La delfinidina 3-glucosido calibración se utilizó para la cuantificación de derivados de delfinidina, mientras que la cianidina 3-glucósido se utilizó para la calibración de los derivados de la cianidina. Las concentraciones estimadas se multiplicaron posteriormente por un factor de corrección del peso molecular respectivo, según Chandra et al. (2001).

3.5. 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 SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se mostraron como la media \pm la desviación estándar. Las diferencias de los valores medios entre la concentración de los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante obtenida en los diferentes pasos de la digestión gastrointestinal *in vitro* se analizaron mediante un análisis de varianza de (ANOVA). Para estudiar entre qué variables de los factores principales las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se realizaron contrastes entre las medias, aplicando el test de Tukey. El análisis de correlación se realizó entre los compuestos polifenólicos y las actividades antioxidantes de los extractos utilizando el análisis de correlación de Pearson.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Índice de recuperación e índice de bioaccesibilidad

Los compuestos polifenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas) se consideran los componentes bioactivos más importantes de las plantas y las frutas. La presencia de los compuestos polifenólicos en los alimentos y especialmente en las frutas podría ser importante para los consumidores, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud. Además, estos compuestos bioactivos pueden usarse como un indicador importante de varias propiedades funcionales como las capacidades antioxidantes (Gullón et al., 2016).

El índice de recuperación total de fenoles (CFT) y total de flavonoides (CFIT) del maqui obtenido después de las diferentes fases (oral, gástrica e intestinal) de la digestión gastrointestinal *in vitro* se muestra en la Figura 6. Se obtuvieron los valores para la muestra control utilizando una extracción con metanol y estos valores se asumieron como el 100% de CFT o CFIT de la muestra. Después de la digestión oral, se obtuvieron modificaciones mínimas ($p < 0,05$) en la recuperación de la CFIT, ya que el porcentaje de flavonoides recuperado fue del 103,81%. Sin embargo, esta fase tuvo un efecto moderado ($p < 0,05$) en el CFT con un índice de recuperación del 79,79%. En esta fase, se esperaban modificaciones mínimas en el índice de recuperación de CFT o CFIT debido al corto tiempo de exposición y los efectos marginales de la α -amilasa como menciona Mosele et al. (2016). La digestión gástrica tuvo un ligero efecto sobre el índice de recuperación del CFIT, que disminuyó los valores (102,63%) con respecto a los valores obtenidos después de la digestión oral ($p > 0,05$). Por otro lado, se observó un gran aumento, tanto en la muestra control como en la fase oral, en el CFT, con un índice de recuperación del 112,92%. Los compuestos fenólicos liberados de la muestra control después de la digestión gástrica podrían deberse a la ruptura de estos compuestos con proteínas, residuos de fibra o azúcar, como menciona Gullón et al. (2015). Este hecho podría atribuirse al pH ácido y la actividad enzimática que aumenta la capacidad de extracción de los compuestos polifenólicos (ácidos fenólicos y principalmente flavonoides) de la matriz alimentaria (Rodríguez-Roque et al., 2013). En la última fase de la digestión gastrointestinal, la fase intestinal, tanto los índices de

recuperación CFIT como CFT se vieron profundamente afectados ($p < 0,05$) con valores de recuperación del 17,14% y 21,76%, respectivamente. Esta observación estuvo de acuerdo con el trabajo realizado por Mosele et al. (2015) en el que se observó una disminución importante, en el CFT, después de la digestión de la fase intestinal del zumo de granada (42,2%) y la granada de pasta (27,7%). Del mismo modo, Gullón et al. (2015) informaron que el índice de recuperación de los CFT de la harina de bagazo de manzana y la harina de dátil se vio profundamente afectado con una disminución del 80% y 46%, respectivamente. Este fenómeno podría explicarse, ya que es posible que cuando la matriz alimentaria se expone a condiciones gastrointestinales, una proporción de compuestos polifenólicos se transformen en diferentes formas estructurales con diferentes propiedades químicas y diferente biodisponibilidad y actividad biológica (Bermúdez-Soto et al., 2007).

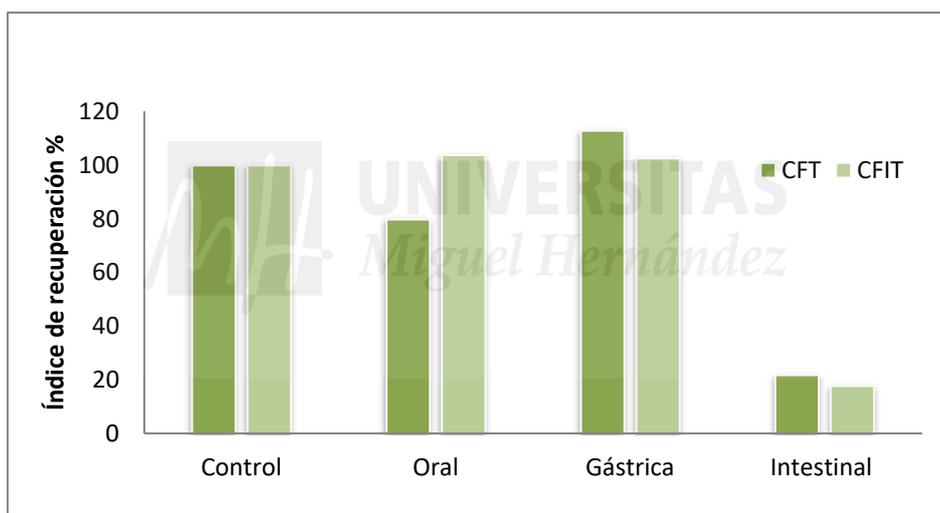


Figura 6. Índice de recuperación de CFT y CFIT en cada fase intestinal.

Es bien sabido que los polifenoles bioactivos deben ser liberados de la matriz alimentaria para ejercer efectos biológicos sobre la salud humana. En este sentido, la bioaccesibilidad fenólica se define como la cantidad de polifenoles ingeridos que están disponibles para la absorción en el intestino después de la digestión (Ahmad-Qasem et al., 2014). La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el maqui, en la última fase de la digestión gastrointestinal tuvieron unos valores del 78,19% y 14,10%, respectivamente. Estos valores sugieren, como se mencionó Gullón et al. (2015), que se han producido varios cambios en los compuestos fenólicos y

flavonoides como (i) modificación de la estructura química, (ii) mayor solubilidad reducida o (iii) interacción durante el desarrollo de la digestión gastrointestinal de la baya maqui, lo que influyó en su bioaccesibilidad. Estos resultados estuvieron de acuerdo con He et al. (2016) donde informaron que la bioaccesibilidad, después de la digestión intestinal, de los compuestos fenólicos del jugo de uva y el jugo de naranja fue del 26,6% y 13,3%, respectivamente. Del mismo modo, Chitindingu et al. (2015) analizaron la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en cinco granos de cereal silvestre y dos domesticados encontrados en Zimbabwe. Estos autores informaron que la bioaccesibilidad de estos cereales en el intestino delgado oscila entre el 16,76% y el 33,06%.

4.2. Estabilidad de los compuestos polifenólicos presentes en la digestión gastrointestinal simulada *in vitro*.

El análisis del HPLC de los extractos de bayas de maqui (Tablas 4, 5 y 6), muestra un total de veinte compuestos polifenólicos, identificados como antocianinas (ocho compuestos), flavonoles (once compuestos) y ácido elágico. Con referencia al contenido de antocianinas, solo se detectaron derivados de delfinidina y derivados de cianidina. Estos resultados estuvieron de acuerdo con varios autores (Schreckinger et al., 2010; Brauch et al., 2016) que informaron de la presencia de ocho antocianinas en frutos de bayas de maqui identificados como delfinidina o derivados de cianidina. Se detectaron antocianinas predominantes: delfinidin-3-glucosidean y delphinidin-3-sambuboside, sin diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre ellos. En la fase oral (Tabla 4), la concentración de todas las antocianinas detectadas disminuyó ($p < 0,05$) con respecto a la inicial (muestra control). El contenido de delfinidina-3-glucósido disminuyó un 54,40% y el contenido de delfinidina-3-sambubósido disminuyó un 54,30%, mientras que la cianidina-3-sambubósido disminuyó un 80,61%. Este hecho sugiere que durante la fase oral las antocianinas se liberaron de manera menos efectiva que durante la extracción química, tal vez debido al bajo tiempo de contacto con la enzima. En la fase gástrica (Tabla 5), las antocianinas detectadas tuvieron un incremento ($p < 0,05$) en cuanto a su concentración con referencia a los valores de la fase oral, aunque su contenido fue mucho menor que en la muestra control. Este pequeño aumento de las antocianinas en la fracción gástrica se debe probablemente a

la degradación parcial de los oligómeros de proantocianina en cianidinas como se informó en Stanisavljević et al. (2015). Además, la actividad enzimática y/o las condiciones de pH podrían facilitar la ruptura de fenoles de alto peso molecular que inicialmente pueden unirse a las proteínas o la fibra.

Con respecto a los compuestos individuales, el contenido de delphinidin-3-glucósido aumentó en un 49,08%, mientras que el contenido de delphinidin-3-sambubósido aumentó un 32,59% con respecto a los valores de la fase oral. En la fase intestinal, se obtuvo una reducción drástica de las antocianinas (Tabla 6). Sólo se detectaron cianidina-3-sambubósido y cianidina-3-glucósido. Estos resultados podrían explicarse por la liberación incompleta de antocianinas de la matriz debido a las posibles interacciones con otros compuestos, como la fibra y los lípidos, por una hidrólisis enzimática pobre y, especialmente, por la inestabilidad de las antocianinas en condiciones alcalinas (Kosinska-Cagnazzo). et al., 2015). De esta manera, Correa-Betanzo et al. (2014) informaron que después de la digestión intestinal de los extractos de arándanos, hubo una clara desaparición de los picos de absorbancia de las antocianinas, lo que indica la división del anillo de la mayoría de las antocianinas, ya que las condiciones del pH del medio cambia de ácido (pH 2) a alcalino (pH 8) según Pérez-Vicente et al. (2002), es importante tener en cuenta que, después de la digestión intestinal, la forma de las antocianinas en flavilio no sería la predominante debido a la condición de pH ligeramente alcalino. Además, la posibilidad de que parte de las antocianinas se metabolice a otras formas oxidadas no coloreadas o se degrade en otras sustancias químicas como mencionan Soriano-Sancho et al. (2015). Igualmente, Mosele et al. (2016) informaron que después de la digestión intestinal de la fruta de *Arbutus unedo*, se encontraron pérdidas importantes de antocianinas (80%). De la misma forma, estos autores (Mosele et al., 2015) informaron que la reducción del contenido de antocianinas en jugo de granada, pulpa de granada y extractos de granada después de la digestión intestinal fue de 70,0%, 69,5% y 28,1% respectivamente. Sin embargo, a pesar de la evidencia de la reducción significativa en antocianinas después de la digestión, el hecho de que no se detectaron antocianinas en los extractos de la digestión intestinal, no implica la pérdida completa o la no absorción de estos compuestos. Existen varios trabajos que informan que se ha

encontrado absorción gástrica de antocianinas y que aproximadamente el 20% de las antocianinas podrían absorberse de esta manera (Fernandes et al., 2014). Por otro lado, Manach et al. (2005) informaron que la absorción intestinal de antocianinas es solo el 1% de la cantidad ingerida por vía oral.

Respecto a los flavonoides y ácidos fenólicos (Tablas 4,5 y 6), se identificaron doce compuestos, principalmente quercetina y derivados de quercetina (ocho compuestos) y miricetina y derivados de la miricetina (tres compuestos); También se identificó el ácido elágico que se encontró en la concentración más alta ($p < 0,05$). En referencia a la quercetina y sus derivados, se encontró dimetoxi-quercetina en la concentración más alta ($p < 0,05$) seguida de la rutina, mientras que la miricetina y sus derivados, la miricetina-3-glucósido mostró la concentración más alta ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos coincidieron con los informados por Brauch et al. (2016) quienes informaron que los derivados de la quercetina y los derivados de la micricetina fueron los constituyentes mayoritarios sin ser antocianina del maqui.

Con el fin de evaluar la estabilidad de cada flavonoide individual y los compuestos de ácido fenólico, presentes en el maqui, la concentración se midió después de cada fase de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Al final de la digestión oral, todos los flavonoides y ácidos fenólicos identificados disminuyeron la concentración ($p < 0,05$) con respecto a la muestra control. Así, el ácido elágico, el componente principal, disminuyó 65,17%, mientras que la dimetoxi-quercetina disminuyó 53,40% respecto a la muestra control ($p < 0,05$). Este fenómeno podría explicarse debido a que estos compuestos podrían unirse a las proteínas o la fibra en la muestra control, a través de diferentes mecanismos, como el enlace con hidrógeno, el enlace covalente o las interacciones hidrofóbicas, por lo que no están disponibles para ser liberados en esta fase debido a, como se mencionó anteriormente, la actividad marginal de la α -amilasa. En la fase gástrica, se identificaron los mismos doce compuestos (Tabla 5) y, como ocurre con las antocianinas, hubo un ligero aumento ($p < 0,05$) en los valores de concentración con respecto a los valores obtenidos en la etapa de digestión oral. Por lo tanto, el contenido de ácido elágico aumentó un 25,36% y el contenido de dimetoxi-quercetina aumentó un 8,19% en referencia a la fase oral. En cualquier caso, hubo una

disminución ($p < 0,05$), en los valores de concentración, con respecto a los valores de la muestra control. Los resultados obtenidos sugirieron que la disminución en la concentración de flavonoides y ácidos fenólicos del maqui con referencia a la muestra control que podría explicarse por la interacción con otros constituyentes de los alimentos, causando cambios en su peso molecular, solubilidad y estructura química (Scalbert y Williamson, 2000), entre otras, como las condiciones gástricas (principalmente la actividad enzimática y el pH) que afectaron la liberación y estabilidad de estos compuestos. Cabe destacar que los flavonoides y los compuestos de ácido fenólico liberados en la digestión gástrica pueden absorberse y pueden tener algún efecto antioxidante local en el intestino delgado (Chandrasekara y Shahidi, 2012). Al final de la digestión intestinal (Tabla 6), se encontró una reducción drástica de los compuestos polifenólicos. Sólo se identificaron cuatro compuestos de flavonoides y el ácido fenólico (rutina, ácido elágico, quercetina-3-galactosidina y dimetoxi-quercetina). Los valores de la concentración fueron mayores ($p < 0,05$) en la fracción exterior que en la fracción interior. En ambas fracciones, interior y exterior, la dimetoxi-quercetina fue el componente principal ($p < 0,05$) seguido por la rutina, el ácido elágico y, finalmente, la quercetina-3-galactósido. Los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con Gullón et al. (2015) que informaron que después de la digestión intestinal, los ácidos fenólicos y los flavonoides presentes en la harina de cáscara de granada se redujeron severamente en comparación con las muestras no digeridas. Estas pérdidas importantes de flavonoides y ácidos fenólicos, después de la fase de digestión intestinal, podrían explicarse por la inestabilidad de estos compuestos en condiciones alcalinas. Así, Tenore et al. (2013) sugirieron que algunos flavonoides glucósidos parecían tener una buena estabilidad en medio del ácido gástrico, pero tenían una gran inestabilidad en condiciones alcalinas de la digestión intestinal. Chen et al. (2016) mencionaron que la inestabilidad de estos compuestos, en condiciones alcalinas, podría atribuirse al hecho de que estos compuestos sufren varios cambios, como la oxidación, la polimerización y la transformación. Además, Saura-Calixto et al. (2007) informaron que la reducción, en la concentración de compuestos fenólicos, en condiciones alcalinas se relacionó con la formación de complejos entre estos compuestos y los iones metálicos, proteínas y/o fibra.

Tabla 4. Perfil polifenólico de las dos fracciones (fracción sólida (FS) y fracción líquida (FL)) obtenidas después de la etapa oral, de extractos de maqui en la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Componente	Muestra control	Fase Oral		Total
		FS	FL	
Antocianinas				
Delfinidina-3- sambubiosido-5-glucosido	2,91 ± 0,02 ^{aE}	1,40 ± 0,02	0,33 ± 0,00	1,73 ± 0,01 ^{CD}
Delfinidina-3,5-diglucosido	4,13 ± 0,09 ^{aB}	1,83 ± 0,01	0,41 ± 0,01	2,24 ± 0,04 ^{CB}
Cianidina-3-sambubiosido-5-glucosido	2,63 ± 0,11 ^{aF}	0,90 ± 0,01	0,57 ± 0,01	1,47 ± 0,06 ^{CE}
Cianidina-3,5-diglucosida	3,86 ± 0,09 ^{aC}	1,52 ± 0,14	0,53 ± 0,01	2,05 ± 0,05 ^{CC}
Delfinidina-3-sambubiosido-5-glucosido	6,92 ± 0,10 ^{aA}	2,43 ± 0,55	0,73 ± 0,01	3,16 ± 0,15 ^{CA}
Delfinidin-3-glucosida	7,15 ± 0,12 ^{aA}	2,71 ± 0,26	0,55 ± 0,00	3,26 ± 0,25 ^{CA}
Cianidina-3-sambubiosa	3,26 ± 0,04 ^{aD}	0,45 ± 0,12	0,21 ± 0,01	0,65 ± 0,11 ^{CF}
Cianidina-3-glucosido	1,85 ± 0,01 ^{aG}	0,45 ± 0,09	0,16 ± 0,00	0,61 ± 0,02 ^{CF}
Flavonoides				
Miricetina-3-galactosido	50,62 ± 2,4 ^{aI}	16,35 ± 0,30	7,68 ± 0,33	24,03 ± 0,21 ^{CH}
Miricetina-3-glucosido	165,57 ± 3,01 ^{aD}	54,19 ± 0,12	31,15 ± 0,84	85,34 ± 0,54 ^{CD}
Quercetina-glucogalina-hexosa	161,40 ± 2,19 ^{aD}	39,99 ± 0,09	12,61 ± 0,30	52,60 ± 0,15 ^{CF}
Quercetina-glucogalina-hexosa	116,66 ± 2,06 ^{aE}	49,08 ± 0,28	4,75 ± 0,18	53,83 ± 0,24 ^{CF}
Rutina	450,67 ± 2,57 ^{aC}	110,53 ± 0,8	131,19 ± 0,48	241,72 ± 0,61 ^{CB}
Ácido elágico	936,59 ± 1,40 ^{aA}	258,0 ± 0,11	68,15 ± 0,24	326,15 ± 0,16 ^{CA}
Quercetina-3-galactosa	43,74 ± 0,61 ^{aJ}	4,36 ± 0,02	1,93 ± 0,25	6,29 ± 0,09 ^{CJ}
Quercetina-3-glucosa	99,42 ± 1,47 ^{aG}	33,37 ± 0,06	12,61 ± 0,30	45,98 ± 0,18 ^{CG}
Quercetina-3-xilosa	32,69 ± 0,26 ^{aK}	13,98 ± 0,13	4,75 ± 0,18	18,73 ± 0,15 ^{CI}
Dimetoxi-quercetina	502,17 ± 0,91 ^{aB}	188,3 ± 0,35	45,67 ± 0,21	233,99 ± 0,29 ^{CC}
Miricetina	103,13 ± 0,30 ^{aF}	38,65 ± 0,20	5,91 ± 0,17	44,56 ± 0,18 ^{CG}
Quercetina	85,41 ± 0,88 ^{aH}	51,37 ± 0,09	6,10 ± 0,04	57,47 ± 0,06 ^{CE}

Antocianinas (Valores expresados como mg de cada componente/g de muestra)

Flavonoides (Valores expresados como µg de cada componente/g de muestra)

Para el mismo compuesto fenólico, los valores de la misma fila seguidos con la misma letra minúscula (a – d) no son diferentes significativamente ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Para la misma fase de digestión, los valores en la misma columna seguidos con la misma letra mayúscula no son diferentes significativamente ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Tabla 5. Perfil polifenólico de las dos fracciones (fracción sólida (FP) y fracción líquida (FS)) obtenidas después de la etapa gástrica, de extractos de maqui en la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Componente	Muestra control	Fase Gástrica		Total
		FS	FL	
Antocianinas				
Delfinidina-3- sambubiosido-5-glucosido	2,91 ± 0,02 ^{aE}	1,47 ± 0,01	0,61 ± 0,02	2,08 ± 0,01 ^{bE}
Delfinidina-3,5-diglucosido	4,13 ± 0,09 ^{aB}	2,26 ± 0,02	0,92 ± 0,01	3,18 ± 0,00 ^{bC}
Cianidina-3-sambubiosido-5-glucosido	2,63 ± 0,11 ^{aF}	1,08 ± 0,02	0,69 ± 0,00	1,77 ± 0,02 ^{bF}
Cianidina-3,5-diglucosida	3,86 ± 0,09 ^{aC}	1,44 ± 0,03	0,82 ± 0,00	2,26 ± 0,01 ^{bD}
Delfinidina-3-sambubiosido-5-glucosido	6,92 ± 0,10 ^{aA}	2,72 ± 0,06	1,47 ± 0,02	4,19 ± 0,04 ^{bB}
Delfinidin-3-glucosido	7,15 ± 0,12 ^{aA}	3,30 ± 0,02	1,56 ± 0,02	4,86 ± 0,03 ^{bA}
Cianidina-3-sambubiosa	3,26 ± 0,04 ^{aD}	0,53 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,92 ± 0,01 ^{bH}
Cianidina-3-glucosido	1,85 ± 0,01 ^{aG}	0,66 ± 0,01	0,35 ± 0,02	1,01 ± 0,00 ^{bG}
Flavonoides				
Miricetina-3-galactosido	50,62 ± 2,4 ^{aI}	19,81 ± 0,38	13,61 ± 0,02	33,42 ± 0,25 ^{bI}
Miricetina-3-glucosido	165,57 ± 3,01 ^{aD}	56,56 ± 0,31	44,00 ± 0,11	100,56 ± 0,23 ^{bD}
Quercetina-glucogalina-hexosa	161,40 ± 2,19 ^{aD}	47,05 ± 0,73	28,38 ± 0,03	75,43 ± 0,32 ^{bE}
Quercetina-glucogalina-hexosa	116,66 ± 2,06 ^{aE}	40,04 ± 0,34	32,74 ± 0,06	72,78 ± 0,14 ^{bF}
Rutina	450,67 ± 2,57 ^{aC}	111,67 ± 1,68	95,79 ± 0,06	207,46 ± 0,78 ^{bC}
Ácido elálgico	936,59 ± 1,40 ^{aA}	262,74 ± 2,12	146,12 ± 0,05	408,86 ± 1,52 ^{bA}
Quercetina-3-galactosa	43,74 ± 0,61 ^{aJ}	4,51 ± 0,14	3,34 ± 0,07	7,85 ± 0,09 ^{bK}
Quercetina-3-glucosa	99,42 ± 1,47 ^{aG}	30,95 ± 0,23	19,27 ± 0,03	50,22 ± 0,11 ^{bH}
Quercetina-3-xilosa	32,69 ± 0,26 ^{aK}	13,69 ± 0,30	7,36 ± 0,04	21,05 ± 0,13 ^{bJ}
Dimetoxi-quercetina	502,17 ± 0,91 ^{aB}	170,13 ± 1,13	83,03 ± 0,02	253,16 ± 0,43 ^{bB}
Miricetina	103,13 ± 0,30 ^{aF}	35,83 ± 0,31	14,76 ± 0,75	50,59 ± 0,53 ^{bH}
Quercetina	85,41 ± 0,88 ^{aH}	49,31 ± 0,32	16,43 ± 0,05	65,74 ± 0,14 ^{bG}

Antocianinas (Valores expresados como mg de cada componente/g de muestra)

Flavonoides (Valores expresados como µg de cada componente/g de muestra)

Para el mismo compuesto fenólico, los valores de la misma fila seguidos con la misma letra minúscula (a – d) no son diferentes significativamente ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Para la misma fase de digestión, los valores en la misma columna seguidos con la misma letra mayúscula no son diferentes significativamente ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Tabla 6. Perfil polifenólico de las dos fracciones (fracción sólida (FS) y fracción líquida (FL)) obtenidas después de la etapa intestinal, de extractos de maqui en la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Componente	Muestra control	Fase intestinal		Total
		INTERIOR	EXTERIOR	
Antocianinas				
Delfinidina-3-sambubiosa-5-glucosido	2,91 ± 0,02 ^{aE}	N.D.	N.D.	–
Delfinidina-3,5-diglucosida	4,13 ± 0,09 ^{aB}	N.D.	N.D.	–
Cianidina-3-sambubiosa-5-glucosido	2,63 ± 0,11 ^{aF}	N.D.	N.D.	–
Cianidina-3,5-diglucosida	3,86 ± 0,09 ^{aC}	N.D.	N.D.	–
Delfinidina-3-sambubiosa-5-glucosido	6,92 ± 0,10 ^{aA}	N.D.	N.D.	–
Delfinidin-3-glucosido	7,15 ± 0,12 ^{aA}	N.D.	N.D.	–
Cianidina-3-sambubiosa	3,26 ± 0,04 ^{aD}	N.D.	0,02 ± 0.0	0,02 ± 0.0 ^{dA}
Cianidina-3-glucosido	1,85 ± 0,01 ^{aG}	N.D.	0,01 ± 0.0	0,01 ± 0.0 ^{dB}
Flavonoides				
Miricetina-3-galactosida	50,62 ± 2,4 ^{aI}	N.D.	N.D.	–
Miricetina-3-glucosida	165,57 ± 3,01 ^{aD}	N.D.	N.D.	–
Quercetina-glucogalina-hexosa	161,40 ± 2,19 ^{aD}	N.D.	N.D.	–
Quercetina-glucogalina-hexosa	116,66 ± 2,06 ^{aE}	N.D.	N.D.	–
Rutina	450,67 ± 2,57 ^{aC}	9.82 ± 0.28	74,75 ± 1,38	84,57 ± 0,68 ^{dB}
Ácido elágico	936,59 ± 1,40 ^{aA}	3.22 ± 0.09	28,63 ± 0,48	31,85 ± 0,28 ^{dC}
Quercetina-3-galactosa	43,74 ± 0,61 ^{aJ}	2.15 ± 0.04	14,25 ± 0,32	16,40 ± 0,15 ^{dD}
Quercetina-3-glucosa	99,42 ± 1,47 ^{aG}	N.D.	N.D.	–
Quercetina-3-xilosa	32,69 ± 0,26 ^{aK}	N.D.	N.D.	–
Dimetoxi-quercetina	502,17 ± 0,91 ^{aB}	19,48 ± 0.02	118,52 ± 1.87	138,00 ± 0.89 ^{dA}
Miricetina	103,13 ± 0,30 ^{aF}	N.D.	N.D.	–
Quercetina	85,41 ± 0,88 ^{aH}	N.D.	N.D.	–

Antocianinas (Valores expresados como mg de cada componente/g de muestra)

Flavonoides (Valores expresados como µg de cada componente/g de muestra)

Para el mismo compuesto fenólico, los valores de la misma fila seguidos con la misma letra minúscula (a – d) no son diferentes significativamente ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Para la misma fase de digestión, los valores en la misma columna seguidos con la misma letra mayúscula no son diferentes significativamente ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey

4.3. Propiedades antioxidantes.

En este trabajo, la influencia de la digestión gastrointestinal sobre la actividad antioxidante se evaluó mediante el uso de un modelo *in vitro* que mejor simula las condiciones fisiológicas. La actividad antioxidante del maqui, después de cada fase de la digestión gastrointestinal *in vitro*, se mantuvo sin cambios en comparación con el extracto del maqui metanólica. Para determinar las propiedades antioxidantes del maqui, se utilizaron cuatro metodologías diferentes en este trabajo debido a que un solo análisis analítico no puede cuantificar completamente las propiedades totales de la muestra de antioxidantes, básicamente por los diferentes mecanismos que participan de forma natural. Por esta razón, se realizaron una serie de ensayos antioxidantes complementarios una serie de ensayos antioxidantes complementarios. La Tabla 7 muestra los valores de actividad antioxidante obtenidos, después de cada fase de digestión gastrointestinal *in vitro*, de frutos de maqui usando los ensayos DPPH, ABTS, FRAP y FIC.

Tabla 7. Propiedades antioxidantes de las 2 fracciones (líquida y sólida) medidas con los métodos DPPH, FRAP, FIC y ABTS después de cada etapa (oral, gástrica e intestinal) de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Método	Boca				% var
	Control	Líquido	Sólido	Total	
DPPH	12,4 ± 0,1b	3,33 ± 0,00B	8,01 ± 0,00A	11,33 ± 0,00c	-8,6
FRAP	36,19 ± 1,6b	10,71 ± 0,36B	24,26 ± 0,96A	34,97 ± 0,52b	-3,4
FIC	0,30 ± 0,01a	0,11 ± 0,00A	0,06 ± 0,00B	0,17 ± 0,00c	-42,6
ABTS	9,08 ± 0,62b	2,65 ± 0,16B	5,46 ± 0,10A	8,11 ± 0,11c	-10,7
		Estomago			
DPPH	12,4 ± 0,1b	3,40 ± 0,00B	10,55 ± 0,01A	13,95 ± 0,57a	12,5
FRAP	36,19 ± 1,6b	13,24 ± 0,12B	31,92 ± 0,78A	45,16 ± 0,55a	24,8
FIC	0,30 ± 0,01a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-100
ABTS	9,08 ± 0,62b	3,97 ± 0,05B	6,39 ± 0,76A	10,37 ± 0,42a	14,1
		Intestino			
DPPH	12,4 ± 0,1b	0,67 ± 0,01B	2,38 ± 0,00A	3,05 ± 0,01d	-75,4
FRAP	36,19 ± 1,6b	2,11 ± 0,01B	7,28 ± 0,18A	9,38 ± 0,10c	-74,1
FIC	0,30 ± 0,01a	0,14 ± 0,00B	0,54 ± 0,00A	0,58 ± 0,01a	126,9
ABTS	9,08 ± 0,62b	0,32 ± 0,01B	1,12 ± 0,16A	1,44 ± 0,02d	-84,2

% Var: Porcentaje de variación entre los valores iniciales y los valores obtenidos después de la digestión.

Para el mismo método antioxidante, los valores de la misma fila seguidos con la misma letra minúscula (a – d) no son diferentes significativamente ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Para la misma fase de digestión, los valores en la misma columna seguidos con la misma letra mayúscula (A – D) no son diferentes significativamente ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

FIC: expresado como mg equivalentes de EDTA/g; FRAP: expresado como mg equivalentes de Trolox/g; ABTS: expresado como mg equivalentes de Trolox/g; DPPH: expresado como mg equivalentes de Trolox/g.

En el ensayo DPPH, la muestra no digerida tuvo valores de 12,40mg TE/g de muestra. Después de la fase oral, los valores de DPPH tuvieron una ligera reducción del 8,62% ($p < 0,05$) con respecto al extracto inicial. Los valores de las fracciones solubles en el quimo (LCR) fueron más bajos ($p < 0,05$) que la fracción del sedimento (PF). Las fases gástrica e intestinal tuvieron un gran impacto en la actividad antioxidante del maqui, determinada con el ensayo DPPH. Por lo tanto, la digestión gástrica causó un aumento de 12,50% en la capacidad antioxidante ($p < 0,05$) con respecto a los valores iniciales del extracto de maqui. Sin embargo, la digestión intestinal produjo una reducción de 75,40% de la actividad antioxidante con referencia a la muestra no digerida. En la comunidad científica, existe información contradictoria sobre el efecto de la digestión gástrica e intestinal sobre la actividad antioxidante medida con el ensayo DPPH. Así, Celep et al. (2015) informaron que la actividad antioxidante (determinada con el ensayo DPPH) de los vinos de arándano y cereza, disminuyó significativamente con respecto a la muestra no digerida. Del mismo modo, Correa-Betanzo et al. (2014) informaron que la actividad de eliminación de DPPH de los extractos de arándanos disminuyó más del 50% después de la digestión intestinal. Por otro lado, Gullón et al. (2015) mencionaron que el efecto antioxidante de la exfoliación de granada después de la digestión gástrica e intestinal aumentó con respecto a la muestra no digerida.

En lo que respecta al ensayo ABTS, como ocurre con el DPPH, se logró una ligera reducción ($p < 0,05$) en la actividad antioxidante después de la fase oral con respecto a la muestra no digerida que tenía valores de 9,08 mg TE / g de muestra. Asimismo, los valores de CSF fueron más bajos ($p < 0,05$) que PF. En la digestión gástrica, los valores ABTS aumentaron 14,13% con respecto a los valores iniciales. Estos valores concordaron con Chandrasekara y Shahidi (2012) quienes informaron que la digestión a base de gas de granos de mijo aumentó los valores ABTS. Sin embargo, Tagliazucchi et al. (2010) informaron que la actividad de eliminación de radicales ABTS de los polifenoles de uva disminuyó durante la digestión gástrica. En la digestión intestinal, se obtuvo una reducción ($p < 0,05$) de la actividad antioxidante (84,16%) con respecto a la muestra no digerida. Esta disminución en la actividad antioxidante podría surgir de la baja concentración de compuestos polifenólicos, principalmente antocianinas, obtenidos en la etapa gastrointestinal. Además, como mencionó, Celep et al. (2015),

las interacciones con otros componentes alimentarios, así como las variaciones en los valores de pH, podrían causar variaciones en la actividad antioxidante. En cualquier caso, esta reducción en la actividad antioxidante obtenida en la fase de la digestión gastrointestinal estuvo de acuerdo con las informadas por varios autores (Correa-Betanzo et al., 2014; Gullón et al., 2015).

Con referencia al poder antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP). Los resultados obtenidos (Tabla 7) mostraron que se logró una ligera reducción ($p > 0,05$) en los valores de FRAP al final de la digestión oral con respecto a la muestra no digerida. Después de la fase gástrica, los valores de FRAP aumentaron ($p < 0,05$) 24,77% con respecto a los valores iniciales de extractos de maqui. Este hecho concuerda con Gullón et al. (2015) quienes informaron que los valores de FRAP de la cáscara de granada digerida aumentaron después de la digestión gástrica. En la última fase de la digestión gastrointestinal, los valores de FRAP son menores en 74,08% con respecto a los valores iniciales ($p < 0,05$). Estos resultados coincidieron con los de Bouayed et al. (2011) quienes informaron que el poder reductor de la manzana digerida fue 57% más baja en comparación con el total de antioxidantes y las manzanas. Los valores de FRAP obtenidos en la fracción "interior" fueron 2,11 mgTE / g de muestra, lo que significa que se logra un poder reductor menor. La Tabla 7 muestra los valores de la actividad quelante de los iones ferrosos (FIC) de extractos digeridos de maqui. Al final de la digestión oral, los valores de FIC se redujeron en 42,64% ($p < 0,05$) con respecto a la muestra inicial. Estos valores sugirieron que los compuestos bioactivos con propiedades quelantes estaban fuertemente unidos a otros constituyentes de la matriz, como fibra o proteínas, y su liberación no ocurrió de forma activa en esta etapa del proceso digestivo. La digestión gástrica afecta significativamente a la capacidad quelante. En esta etapa, se obtuvo una reducción del 100% con respecto a la muestra no digerida, lo que significa que las condiciones de pH y/o las enzimas ejercen un efecto considerable sobre los compuestos bioactivos con capacidad quelante. Sin embargo, al final de la digestión intestinal, la actividad quelante aumentó un 126,85% con respecto a la muestra no digerida ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con Stanisavljević et al. (2015) quienes informaron que la actividad quelante del jugo de aronia aumentó después de la digestión intestinal y

Chandrasekara y Shahidi (2012) informaron que la capacidad quelante del grano de mijo aumentó significativamente al final de la digestión intestinal. Este aumento en la capacidad quelante puede deberse a la liberación de varios compuestos como: ácidos fenólicos, flavonoides u otros constituyentes, como ascorbatos, carbohidratos reductores, tocoferoles, carotenoides o pigmentos que pueden contribuir a la actividad quelante de la muestra digerida (Gullón et al., 2015). De la misma manera Stanisavljević et al. (2015) informaron que el aumento en la capacidad quelante se debe probablemente a la liberación de pequeños péptidos que se originan a partir de proteínas de la matriz. La actividad antioxidante de las soluciones de extracto siempre dependió de la composición y la concentración de sus antioxidantes, principalmente compuestos polifenólicos. Genskowsky et al. (2016) mencionaron que las propiedades antioxidantes de los compuestos polifenólicos presentes en las frutas en general, y en el maqui en particular, son complicadas de vincular a un compuesto específico o a unos compuestos del grupo, debido a su complejidad y variabilidad. Por lo tanto, la actividad antioxidante podría ser causada por los compuestos mayoritarios presentes en el maqui, o un efecto sinérgico entre los compuestos mayoritarios y minoritarios. El análisis de correlación podría ser usado para explicar esta relación. Por lo tanto, la Tabla 8 mostró las correlaciones entre el perfil polifenólico (es decir, CFT y CFIT) y la actividad antioxidante en extractos de maqui medidos con ABTS, DPPH, FIC y FRAP, después de cada fase (oral, gástrica e intestinal) de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

En la digestión oral (Tabla 8) se obtuvo una correlación positiva entre CFT y CFIT y la actividad antioxidante, medida con los ensayos DPPH, FRAP y ABTS. Sin embargo, se logró una correlación negativa para el ensayo FIC y el ensayo CFT y CFIT. En la digestión gástrica, se encontró una alta correlación (Tabla 8) entre la CFT y la actividad antioxidante analizada con las diferentes metodologías.

Tabla 8. Los valores de la correlación entre el contenido fenólico total (CFT) o el contenido de flavonoides total (CFIT) y la actividad antioxidante medidos con los métodos DPPH, FRAP, FIC y ABTS después de cada fase (oral, gástrica e intestinal) de la digestión gastrointestinal

Método	Oral		Gástrica		Intestinal	
	CFT	CFIT	CFT	CFIT	CFT	CFIT
DPPH	0.998	1.000	0.999	-0.763	1.000	0.995
FRAP	0.991	0.996	0.987	-0.844	0.998	0.989
FIC	-0.972	-0.983	0.000	0.000	1.000	0.993
ABTS	0.999	0.999	0.950	-0.913	0.983	0.996

Por otro lado, se logró una correlación negativa entre CFIT y la actividad antioxidante, lo que sugiere que la actividad antioxidante obtenida en esta fase se debe a otros compuestos. Con respecto a la fase intestinal, nuevamente se encontró una correlación positiva entre CFT y CFIT y la actividad antioxidante obtenida con los ensayos DPPH, ABTS FIC y FRAP. Los resultados fueron consistentes con estudios previos (Chandrasekara y Shahidi 2012; Huang et al., 2014; Gullón et al., 2015) que informaron de una alta correlación entre los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante.



5. CONCLUSIÓN

1. Las muestras de extractos de maqui presentaron un elevado índice de recuperación para los compuestos fenólicos y flavonoides, presentando el mayor índice de recuperación en la fase gástrica.
2. La última etapa de la digestión muestra una bioaccesibilidad mayor para los compuestos fenólicos que para los flavonoides.
3. Los compuestos polifenólicos presentes en el maqui se liberan en las fases tempranas de la digestión gastrointestinal, donde podrían ejercer bioactividad, como compuestos antioxidantes, después de su absorción en la digestión gástrica.
4. La estabilidad de los compuestos polifenólicos y fundamentalmente de las antocianinas, se ven profundamente afectados en la última fase de la digestión, probablemente modificando sus propiedades físico-químicas.
5. Para el método FIC, la actividad antioxidante en la fase intestinal fue superior al resto de fases y a la propia muestra control, siendo nula en la fase gástrica.
6. En el método FRAP, DPPH y ABTS, la actividad antioxidante de la fracción sólida en todas las fases fue superior a la líquida. Así, en la fase intestinal la actividad antioxidante disminuyó considerablemente.
7. El proceso de la digestión *in vitro* modifica la actividad antioxidante de todos los compuestos bioactivos en los extractos de maqui.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Ahmad-Qasem, M. H., Cánovas, J., Barraji3n-Catal3n, E., Carreres, J. E., Micol, V., Garc3a-P3rez, J. V., 2014. Influence of olive leaf processing on the bioaccessibility of bioactive polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62, 6190–6198.
- Bermúdez-Soto, M. J., Tom3s-Barber3n, F. A., Garc3a-Conesa, M. T., 2007. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry* 102, 865–874.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, P. M., Albertini, M. C., Piatti, E., 2005. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*. 97, 217–222
- Boisen, S., Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141-162.
- Brandon, E. F. A., Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Versantvoort, C. H. M., Van Engelen, J. G. M., Sips, A. 2006. Consumer product *in vitro* digestion model: bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44, 161-171.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT— Food Science and Technology* 28, 25–30.
- Brauch, J. E., Buchweitz, M., Schweiggert, R. M., Carle, R., 2016. Detailed analyses of fresh and dried maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) berries and juice. *Food Chemistry*. 190, 308–316.
- Cardenas, C. 1998. Aspectos De La Morfolog3a Floral, Producci3n De N3ctar Y Fructificaci3n En *Berberis Darwinii* Hook., *Aristotelia Chilensis* (Mol.) Stuntz, Y *Ugni Molinae* Turcz. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral De Chile. Facultad De Ciencias Agrarias. 111p.
- Carter, P., 1971. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*. 40, 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-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., Paliyath, G., 2014. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*. 165, 522–531.
- Chandra, A., Rana, J., Li, Y., 2001. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC–MS. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3515–3521.
- Chandrasekara, A., Shahidi, F., 2012. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*. 4, 226–237.
- Chen, G. L., Chen, S. G., Chen, F., Xie, Y. Q., Han, M. D., Luo, C. X., Zhao, Y. Y., Gao, Y. Q., 2016. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*. 20, 317–331.
- Chitindingu, K., Benhura, M.A.N., Muchuweti, M., 2015. *In vitro* bioaccessibility assessment of phenolic compounds from selected cereal grains: a prediction tool of nutritional efficiency. *LWT-Food Science and Technology*. 63, 575–581.
- 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.
- Denham Harman, M. D., Ph. D., July 1956, Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry *Journal of Gerontology*, Volume 11, Issue 3, Pages 298–300,
- Dröge, W., *Physiol Revision* 2002 January, Free radicals in the physiological control of cell function. 82(1):47-95.

- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., Mateus, N., 2014. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*. 7, 54–66.
- Fischer, U.A., Carle, R., Kammerer, D.R., 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chem.* 127, 807–821.
- Fredes, C., Yousef, G.G., Robert, P., Grace, M.H., Lila, M.A., Gómez, M., Gebauer, M., Montenegro, G., 2014. Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) from different geographical regions in Chile. *J. Sci. Food Agric.* 94, 2639–2648.
- Fuller, M. F. (Ed.). (1991). *In Vitro* digestion for pigs and poultry. Wallington, UK: CAB International.
- Genskowsky, E., Puente, L.A., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Muñoz, L.A., Viuda-Martos, M., 2016. Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *J. Sci. Food Agric.*, <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7628> (in press).
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., Scaccini, C., 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (2), 361–367.
- Gronbaek M., Deis A., Soresen T. I., Becjer U, Schnohr P and Jensen G. Mortality associated with moderate intake of wine, beer or spirit 1995, *BHJ* 310, 1165-1169.
- Gullón, B., Pintado, M. E., Barber, X., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., Viuda-Martos, M. 2015. *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.
- Gullón, B., Pintado, M. E., Barber, X., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., Viuda-Martos, M., 2015. 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., Perez-Alvarez, J. A., Viuda-Martos, M., 2016. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. Food Control 59,94–98.
- He, Z., Tao, Y., Zeng, M., Zhang, S., Tao, G., Qin, F., Chen, J., 2016. High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect *in vitro* bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. Food Chemistry. 200, 107–116.
- Hoffman, 1997. Flora silvestre de Chile, zona araucana. Cuarta edición. 257
- Huang, H., Sun, Y., Lou, S., Li, H., Ye, X., 2014. *In vitro* digestion combined with cellular assay to determine the antioxidant activity in Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb et Zucc.) fruits: a comparison with traditional methods. Food Chemistry. 146, 363–370.
- Jin-Ming Kong, Lian-Sai Chia,, Ngoh-Khang Goh, Tet-Fatt Chia, R. Brouillard. Analysis and biological activities of anthocyanins.
- Kamei, H., Hashimoto, Y., Koide, T., Kojima, T., Hasegawa, M., 1998. Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. Cancer Biotherapy and Radiopharmacology 13 (6), 447–452.
- Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T., Hasegawa, M., 1997. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soy beans and red beans *in vitro* and *in vivo*. Cancer Biotherapy and Radiopharmacology 12 (4), 277–280.
- Kosinska-Cagnazzo, A., Diering, S., Prim, D., Andlauer, W., 2015. Identification of bioaccessibility and up taken phenolic compounds from strawberry fruits in *in vitro* digestion/Caco-2 absorption model. Food Chemistry. 170, 88–294.
- Luisa B. Lima Hernández. 2011. Estrés oxidativo y antioxidantes. Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. The American Journal of Clinical Nutrition. 81, 230–242.

- Matthei, O. 1995 Manual de las malezas que crecen en Chile. Alfabeta Impresores. Santiago. Chile. 545p.
- 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.
- Minekus M., Alminger M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C. F. et al. 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus.
- MNL Group Delphinidin-Rich Maqui Berry Extract (Delphinol,,) Lowers Fasting and Postprandial Glycemia and Insulinemia in Prediabetic Individuals during Oral Glucose Tolerance Tests (2016) Hindawi Volume 2016, Article ID 9070537, 10 pages
- Mosele, J. I., Macià, A., Romero, M. P., Motilva, M. J., 2016. Stability and metabolism of Arbutus unedo bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation. *Food Chemistry*. 201, 120–130.
- Mosele, J. I., Macià, A., Romero, M. P., Motilva, M. J., RubiÓ, L., 2015. Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*. 14, 529–540.
- Muñoz, M. 1980. Flora Del Parque Nacional Puyehue. Universitaria. Santiago, Chile. 557p.
- Olate, V. 2008. Estudio químico de la actividad antioxidante de los antocianos presentes en los frutos de maqui. Tesis de grado Licenciado en Tecnología Médica. Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Talca. 66 pp.
- Ortega, N., Macià, 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. *Japanese Journal of Nutrition*. 44,307–315.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., García-Viguera, C., 2002. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 2308–2312.
- Pollyanna A. S. White, Rita C. M. Oliveira, Aldeidia P. Oliveira, Mairim R. Serafini, Adriano A. S. Araújo, Daniel P. Gelain, Jose C. F. Moreira, Jackson R. G. S. Almeida, Jullyana S. S. Quintans, Lucindo J. Quintans-Junior and Marcio R. V. Santos. Revision 2004. Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review.
- Renaud SC, Guergen R, Siest G, Salomon R, Wine beer and mortality in middle aged men from eastern France. 1999 *Archives of Internal Medicine* 159, 1865-1870.
- Renaud SC, Guergen R, Siest G, Salomon R. Wine beer and mortality in middle aged men from eastern France. (1999) *Archives of Internal Medicine* 159, 1865-1870.
- 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.
- Satué-Gracia M. T. Marina Heinonen, Edwin N. Frankel (1997). Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems. *Journal of Functional Foods*. 45, 9, 3362-3367
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goni, I., 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*. 101, 492–501.
- Schreckinger, M.E., Lotton, J., Lila, M.A., de Mejia, E.G., 2010. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. *Journal of Medical Foods*. 13, 233–246.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16,144-158.

- Soriano-Sancho, R.A., Pavan, V., Pastore, G.M., 2015. Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International*. 76, 74–78.
- Stanisavljević, N., Samardžić, J., Janković, T., Savikin, K., Mojsin, M., Topalović, V., Stevanović, M., 2015. Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chemistry*. 175, 516–522.
- Strausburger, E., Noll, F., Schenk, H. Y. Schimper, A. 1994. *Tratado de Botánica*. 8ª ed. Barcelona. Omega. 1068 p.
- Sun Jin Hur, Beong Ou Lim, Eric A. Decker, D. Julian McClements. Revision 2010 *In vitro* human digestion models for food applications.
- Susana Benedetti R., Diciembre de 2012, Monografía de Maqui *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz.
- Tenore, G. C., Campiglia, P., Ritieni, A., Novellino, E., 2013. *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). *Food Chemistry*. 141, 3519–3524.
- Thorne, R., Classification and geography of the flowering plants. 1992. *The Botanical Review*. (U.S.A) 58(3): 225-350
- Valdebenito, G. 2006. Paquete Tecnológico Del Maqui. [Http://www.Gestionforestal.Cl](http://www.Gestionforestal.Cl). Instituto Forestal (10/6/2012).
- Van Citters, G. W., Lin, H. C., 1999. The ileal brake: A fifteen-year progress report. *Current Gastroenterology Reports*, 1, 404-409.
- Wagner, H., 1985. *Annual Proceedings of Phytochemical Society of Europe* 25, 409.
- Zobel, B., Schuermann, M., Ludwig, R., Jurkschat, K., Dakternieks, D., Duthie, A., 1999. Syntheses and structures of novel molecular organotin chalcogenides. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Related Elements*. 150, 325–332.