



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La universidad católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TITULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* y capacidad antioxidante en jugo de naranja adicionado con subproducto.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: González Arévalo, Soledad Nathaly

DIRECTOR: Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny, Mg. Sc

LOJA ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

Jorge Geovanny Figueroa Hurtado

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación “Evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* y capacidad antioxidante en jugo de naranja adicionado con subproducto” realizado por González Arévalo Soledad Nathaly, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, diciembre de 2016

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Soledad Nathaly González Arévalo declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* y capacidad antioxidante en jugo de naranja adicionado con subproducto**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Jorge Geovanny Figueroa Hurtado director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad.

f.

Autora: González Arévalo, Soledad Nathaly

Cédula: 1105880312

DEDICATORIA

A Dios por ser el Guía durante todo mi transcurso por la vida.

A mis padres, por todos los esfuerzos, sacrificios que realizan cada día,

Ellos mi ejemplo a seguir

A mis hermanos y confidentes Paula y Camilo, por el apoyo constante y las risas compartidas.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a Dios por darme la oportunidad de vivir y disfrutar cada día de su maravillosa creación

A mi tutor de trabajo de titulación Mg. Sc. Geovanny Figueroa Hurtado por todos los conocimientos compartidos, ayuda y sobretodo, paciencia brindada durante toda esta etapa de formación.

A los docentes Natalí Solano y Felipe Reyes por el tiempo, dedicación y colaboración como miembro de jurado, sus sugerencias y observaciones son aporte importante para esta investigación.

A cada uno de los maestros de los cuales tuve la oportunidad de aprender, sus conocimientos no solo me formaron como estudiante si no como persona

A mi querida familia, amigos y compañeros de laboratorio, su apoyo incondicional y sus palabras de ánimo durante mis años de formación fueron el motor para seguir esforzándome cada día.

ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Naranja	6
1.2. Subproductos	6
1.3. Radical Libre	7
1.4. Antioxidantes.....	7
1.5. Compuestos fenólicos	7
1.6. Digestión <i>in-vitro</i>	8
1.7. Microencapsulación	8
1.8. Determinación de antioxidantes.....	9
1.8.1. DPPH.	9
1.8.2. ABTS.....	10
1.8.3. FRAP.....	10
2. DISEÑO METODOLÓGICO	11
2.1 Preparación de la muestra.....	12
2.2 Digestión gastrointestinal <i>in-vitro</i>	12
2.3 Determinación de capacidad antioxidante	13
2.3.1 Método DPPH.....	14
2.3.2 Método ABTS.	15

2.3.3 Poder antioxidante de reducción férrica FRAP.....	16
2.4 Estabilidad antioxidante	17
2.5 Análisis estadístico	17
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	18
3.1 Análisis de actividad antioxidante	19
3.1.1 DPPH.....	19
3.1.2 ABTS.	20
3.1.3 Poder antioxidante de reducción férrica.	22
3.2 Estabilidad antioxidante	23
CONCLUSIONES	25
RECOMENDACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27
ANEXOS	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Atomizador Mini Spray Dryer.....	12
Figura 2. Procesos de Digestión gastrointestinal in-vitro	13
Figura 3. Cuantificación de actividad de capacidad antioxidante mediante método DPPH..	14
Figura 4. Determinación de capacidad antioxidante: método ABTS	15
Figura 5. Metodología para determinación de capacidad antioxidante según método FRAP	16

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Capacidad antioxidante DPPH durante las fases de digestión gastrointestinal in-vitro.....	19
Gráfica 2. Capacidad antioxidante ABTS de las fases de la digestión gastrointestinal in-vitro	21
Gráfica 3. Capacidad antioxidante de las fases de digestión gastrointestinal in-vitro determinada por el método FRAP.....	23

Gráfica 4. Estabilidad antioxidante de la fase intestinal dializada (FI-D) mediante los métodos ABTS, DPPH y FRAP.....	24
---	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos y enzimas digestivas	35
Anexo 2. Cuantificación de actividad antioxidante método DPPH	37
Anexo 3. Cuantificación de actividad antioxidante método ABTS.....	41
Anexo 4. Cuantificación de actividad antioxidante método FRAP.....	45
Anexo 5. Estabilidad antioxidante	49
Anexo 6. Resultados del análisis estadístico.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

% CV: Coeficiente de Variación

μl: microlitro

μM: micromolar

μmol: micromoles

Abs: Absorbancia

ABTS: 2, 2 Azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

Agua dd: Agua Destilada

Co: Concentración

DG: Digestión gástrica

DGI: Digestión gastro intestinal

DPPH: 2,2 difenil-1-picril hidrazilo

Eq. Trolox/L: Equivalentes de Trolox por cada litro

Eq. Trolox/mL: Equivalentes de Trolox por cada mililitro

ET: Equivalentes de Trolox

FI-D: Fase Intestinal Dializada

F-IN: Fase Inicial

FI-SD: Fase Intestinal Sin Dializar

FRAP: Poder antioxidante de reducción férrica

g: gramo

h: hora

H₂O: Agua

HCl: Ácido Clorhídrico

L: Litro

M: Molar

MeOH: Metanol

mg: miligramo

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

N: Normal

NaHCO₃: Bicarbonato de Sodio

NaOH: Hidróxido de Sodio

nm: nanómetro

rpm: revoluciones por minuto

SM: Solución Madre

SMT: Solución Madre Trolox

ST: Solución de Trabajo

TPTZ: 2, 4, 6- tripiridil-s-triazina

λ :Longitud de onda

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la bioaccesibilidad de antioxidantes luego de una digestión gastrointestinal *in-vitro* (DGI) en jugo comercial de naranja y jugo comercial enriquecido con un extracto acuoso obtenido de pulpa agotada de naranja, el cual fue previamente micro encapsulado con maltodextrina. La capacidad antioxidante fue evaluada mediante los métodos de DPPH, ABTS y FRAP, en los cuales se obtuvo incremento de concentraciones de 76 %, 81 % y 110 % de jugo comercial enriquecido con subproducto microencapsulado en relación a la muestra de jugo comercial. Se presentó mayor estabilidad de antioxidantes en la muestra de jugo comercial enriquecido con subproducto con 110 % y 38 % para los métodos ABTS y DPPH respectivamente, aunque para el método FRAP la estabilidad fue menor, su concentración de capacidad antioxidante de 16 $\mu\text{mol Eq.Trolox/mL}$ fue mayor al contenido de antioxidantes de jugo comercial con 8 $\mu\text{mol Eq.Trolox/mL}$. Los resultados mostrados en el presente trabajo demuestran la propiedad protectora del material encapsulante y su efecto en la liberación controlada de antioxidantes durante el proceso de digestión *in-vitro*.

Palabras Claves: *capacidad antioxidante, subproducto, bioaccesibilidad, digestión in-vitro, microencapsulación*

ABSTRACT

In the present study, the bioaccessibility of antioxidant was evaluated, after a digestion gastrointestinal *in-vitro* test (DGI) with juice regular commercial Orange juice and commercial juice enriched with an extract aqueous retrieved of pulp exhausted of Orange which was previously micro encapsulated with maltodextrin. The antioxidant capacity was evaluated through the methods of DPPH, ABTS and FRAP, which there was an increase in concentrations of 76 %, 81 % and 110 % of commercial juice enriched with by-product microencapsulated in relation to regular commercial juice sample. There was also a greater stability of antioxidant in the sample of commercial juice enriched with a by-product with 110 % and 38 % for methods ABTS and DPPH respectively; although for the method FRAP the stability was lower, its concentration of capacity antioxidant of $16 \mu\text{mol Eq. Trolox} / \text{mL}$ was greater to the content of antioxidants of commercial juice with $8 \mu\text{mol Eq. Trolox} / \text{mL}$. The results displayed in the present work prove the protective property of the encapsulating material and its effect in the controlled release of antioxidant during the process of digestion *in-vitro*.

Keywords: by-product, antioxidant capacity, *in-vitro* digestion, bioaccessibility, microencapsulation

INTRODUCCIÓN

Una de las frutas más populares en la industria de alimentos es la naranja (Hernández-Carranza et al., 2016), su popularidad en gran parte se da por su alto contenido de vitamina C y antioxidantes en todo el fruto (Ayala-Zavala et al., 2011; Ejaz, Ejaz, Matsuda & Lim, 2006) sin embargo la fruta no es aprovechada en su totalidad debido a que durante el procesamiento su pulpa agotada, corteza y semillas son descartadas (O'Shea, Arendt & Gallagher, 2012) perdiendo una gran cantidad de compuestos funcionales.

En la actualidad muchas empresas buscan procesos que les permita disminuir el desecho de subproductos para aplicarlos como posibles aditivos en alimentos y bebidas (O'Shea et al., 2015) y ofrecer al consumidor productos con más nutrientes. La idea de usar este tipo de subproductos está sustentado en el trabajo de investigadores que han demostrado mediante métodos de cuantificación de antioxidantes como: ABTS, DPPH, FRAP la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas (Chen, Chu, Chyau, Chu & Duh, 2012; Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros Zevallos & Hawkins Byrne, 2006). No obstante los compuestos bioactivos encontrados en las investigaciones son propensos a oxidación e inestables a la luz, pH, temperatura y enzimas (Tonon, Brabet, Pallet & Brat, 2009), por la presencia de estos inconvenientes, científicos como Kha, Nguyen y Roach (2010), Kuck y Zapata Noreña (2016) y Robert et al. (2010) recurrieron a procesos de micro encapsulación con biopolímeros para brindar a los componentes antioxidantes presentes en los co-productos protección contra la humedad, además, ofrecer mayor solubilidad y retención de las mismas. Algunos investigadores analizaron el efecto de la micro encapsulación durante los procesos gastrointestinales utilizando técnicas de digestión *in-vitro* (Flores, Singh, Kerr, Pegg & Kong, 2014; Gil-Izquierdo, Zafrilla & Tomás-Barberán, 2002) para demostrar su bioaccesibilidad en el organismo y el efecto de las enzimas usadas durante la digestión con la disminución de la capacidad antioxidante.

Tomando en cuenta las investigaciones mencionadas, se ha decidido en el presente trabajo de titulación, evaluar la capacidad antioxidante de un jugo comercial enriquecido con subproducto de naranja microencapsulado y conocer el comportamiento de la actividad antioxidante durante las fases de digestión gastrointestinal *in-vitro* y su bioaccesibilidad al final de esta.

El siguiente trabajo se desarrolla en tres capítulos, en el capítulo uno se abarca las investigaciones previas y estado de arte actual del tema, la metodología utilizada se encuentra en el capítulo dos donde se detalla la atomización de un extracto acuoso de pulpa agotada de naranja micro encapsulado con maltodextrina, la técnica de digestión intestinal

in-vitro tomada del autor Gil-Izquierdo con algunas modificaciones aplicadas y la cuantificación de capacidad antioxidante mediante DPPH, ABTS y FRAP durante todas las fases de digestión *in-vitro*. Finalmente, el análisis y discusión de resultados se exponen en el capítulo tres.

Durante el desarrollo de capacidad antioxidante se detectaron inconvenientes en la lectura de las muestras medidas por el método ABTS, el cual fue corregido ajustando el pH.

Como resultados se obtuvo mayor capacidad antioxidante en la muestra con enriquecimiento de subproducto microencapsulado para todos los métodos y estabilidad antioxidante al finalizar el proceso de digestión *in-vitro* para los métodos ABTS y DPPH

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Naranja

La naranja (*Citrus sinensis*), es una de las frutas de mayor producción y aporte económico a nivel mundial según el último informe de la FAO, con una producción de 116 millones de toneladas (FAO, 2012). En Ecuador, las provincias con mayor producción de este fruto son Azuay, Santa Elena, Manabí y Carchi (INEC, 2013).

El fruto está formado por una capa externa rugosa que suele ser verde o amarillenta, denominada flavedo, seguida de esta se encuentra adherido el albedo que consiste en una capa blanquecina que en su interior almacena el endocarpo, compuesto de segmentos con pelos vesiculares, pedunculares y fusiformes los cuales contienen el jugo y semillas (Vargas & Pinoargote, 2011).

La pulpa como su cáscara y semillas son una excelente fuente de vitamina C, folatos, fibra dietaria, compuestos fenólicos y flavonoides como hesperidina, neohesperidina, eriocitrina, naringina (Peterson et al., 2006) responsables de la prevención de enfermedades degenerativas y cardiovasculares (Ejaz et al., 2006).

1.2. Subproductos

Denominamos subproducto a los desechos de frutas que no son utilizados a nivel comercial y que habitualmente no se consumen directamente, pero que pueden ser utilizados después de un tratamiento (Rustad, Storror & Slizyte, 2011).

Debido al crecimiento del sector agrícola para cumplir la demanda de producción de frutas y verduras, existe una gran cantidad de subproductos que son desechados, sin tomar en cuenta la cantidad de compuestos activos que poseen, como ejemplo podemos mencionar frutos como naranja, mango, papaya y café, que luego del procesamiento se han encontrado compuestos funcionales en sus subproductos (Ayala-Zavala et al., 2011; Martínez et al., 2012).

En el caso de la naranja, globalmente a nivel industrial, existen 15 millones de toneladas de subproductos como corteza, semillas y restos de pulpa (Marín, Soler-Rivas, Benavente-García, Castillo & Pérez-Alvarez, 2007), a pesar que estos subproductos son fuente de compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos, flavonas, y flavonoides glicosilados (Chen et al., 2012). Estudios realizados en cortezas y pulpas de frutos cítricos demostraron que el elevado contenido de componentes funcionales en los co-productos mencionados significarían una excelente fuente de antioxidantes que pueden ser usados en productos alimenticios como preservantes naturales e impidiendo la

oxidación lipídica por lo tanto promoviendo propiedades para la salud (Rudge, Pinto & Genovese, 2012).

En la actualidad estos subproductos son empleados en la alimentación de animales (Vargas & Pinoargote, 2011) y en la industria química para la extracción de aceites esenciales y flavonoides (Ayala-Zavala et al., 2011).

1.3. Radical Libre

Un radical libre (ROS) puede ser definido como cualquier especie molecular con un electrón desapareado con capacidad de captar y donar electrones de otras moléculas vecinas, actuando como agentes oxidantes o reductores (Laguna, Piña, Martínez, Pardo & Rivero, 2013). Entre los agentes oxidantes más reactivos e inestables se encuentran radical hidroxilo, anión superóxido, peróxido de hidrógeno (Lobo, Patil, Phatak & Chandra, 2010). A pesar que los ROS se encuentran en nuestras células cumpliendo funciones normales (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy & De, 2010), un exceso de estas especies reactivas, como ocurre en el estrés oxidativo, producen daños a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Avello & Suwalsky, 2006) y consecuentemente la aparición de enfermedades cardiovasculares, degenerativas y cáncer (National Cancer Institute, 2014).

1.4. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que se encargan de proteger al organismo del estrés oxidativo producido por el exceso de radicales libres (Avello & Suwalsky, 2006), lo realizan donando sus propios electrones a radicales dañinos y neutralizándolos, deteniendo así la cadena de reacción (Lobo et al., 2010). Estas sustancias protectoras se encuentran en nuestro organismo, sin embargo no cumplen con la demanda total que el cuerpo necesita, por lo que es imprescindible el consumo de antioxidantes externos captados en la dieta, principalmente en frutas y verduras ricos en vitamina C y compuestos fenólicos (Szajdek & Borowska, 2008).

1.5. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son considerados metabolitos secundarios derivados de tirosina y fenilalanina, su estructura base está formada por un anillo aromático y un grupo hidroxilo (Wildman & Kelley, 2007) a partir de ésta se forman moléculas como antocianinas, cumarinas, flavonoides, taninos y ligninas. Este tipo de moléculas, en

especial flavonoides, cumplen un papel interesante en nuestro organismo que se demuestran en investigaciones donde se resalta la actividad farmacológica como eliminadores de radicales libres tanto en sistemas *in vivo* como *in-vitro* (Yao et al., 2004). Las principales fuentes alimenticias de flavonoides las podemos encontrar en frutos cítricos, vegetales, cereales y variedades de frutos secos (Soto-Vaca, Gutierrez, Losso, Xu & Finley, 2012).

1.6. Digestión *in-vitro*

La digestión *in-vitro* es un método que nos permite estudiar la liberación de los compuestos a partir de la matriz del alimento y su transformación durante la digestión (Gil-Izquierdo et al., 2002), además de que permite evaluar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos (Rodríguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez & Martín-Belloso, 2013a). Este método cumple con la premisa que, los compuestos dializados luego estarán disponibles para su absorción (Rodríguez-Roque et al., 2013a), esta es la principal razón por la que este procedimiento *in-vitro* está involucrado con el estudio de absorción de componentes bioactivos como Vitamina C y compuestos fenólicos. Estudios realizados por Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini y Conte (2010) demuestran que el 62 % de compuestos fenólicos, encontrados luego de la digestión gástrica e intestinal, fueron bioaccesibles y posiblemente disponibles para su absorción en el tracto intestinal *in vivo*. Estas investigaciones demuestran que la evaluación de la bioaccesibilidad de modelos *in-vitro* pueden ser comparados con resultados obtenidos de estudios en humanos y animales (Biehler & Bohn, 2010).

1.7. Microencapsulación

La microencapsulación se define al proceso en el que diversos compuestos bioactivos están inmersos en una matriz o sistema de membranas (Lopes & Barata de Silva, 2012) que provee una barrera física entre los componentes que se encuentran dentro del núcleo y los demás compuestos del producto (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley & Saurel, 2007). Su principal objetivo es proteger al contenido del núcleo de condiciones ambientales adversas como humedad, efectos indeseables de la luz y oxígeno, aumentando de esta manera el tiempo de vida útil del producto y la liberación controlada de los compuestos de su interior (Mahdavi, Jafari, Assadpoor & Dehnad, 2016) .

Una de las técnicas más utilizadas para encapsular componentes activos es el secado por pulverización, este método consiste en la atomización del producto líquido, ya sea si

se encuentra como emulsión o en suspensión, en una corriente de gas caliente, para obtener de forma instantánea un polvo, el gas usado generalmente en este proceso es aire, rara vez nitrógeno (Gharsallaoui et al., 2007), esta efectiva técnica brinda a los productos secados buenas características reconstitucionales y adecuación correcta para el transporte y almacenamiento (Kha et al., 2010). Sin embargo algunos de estos polvos productos de “spray drying” pueden presentar problemas como pegajosidad y alta higroscopicidad (Tonon et al., 2009), para evitar este tipo de inconvenientes se debe añadir biopolímeros como goma arábica y maltodextrina (Tonon et al., 2009). Uno de los agentes encapsulantes más comunes es maltodextrina, usada principalmente para materiales difíciles de secar como jugos de fruta, saborizantes, enzimas o endulzantes (Reiniccius, 2001).

Kha et al. (2010) estudió las condiciones de microencapsulación por spray drying y su efecto en las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de la fruta gac (*Momordica cochinchinensis*) donde usó como agente encapsulante maltodextrina en concentración 10 % y 120 °C de temperatura de entrada, concluyendo que las condiciones usadas preservan el color y mejoran las características del polvo.

1.8. Determinación de antioxidantes

A través de los años el interés por la actividad antioxidante de compuestos fenólicos ha incrementado, en consecuencia se han desarrollado métodos para su detección. Estos métodos involucran la generación de especies radicales, en donde la presencia de antioxidantes determina la desaparición de especies reactivas (Arnao, Cano & Acosta, 2001). Entre las técnicas más comunes encontramos: ABTS, DPPH, FRAP y el ensayo de fenoles totales (Pérez-Jiménez et al., 2008).

1.8.1. DPPH.

Cuantifica la capacidad captadora de radicales libres por la reducción del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) frente a los antioxidantes de la muestra a medida que su absorbancia disminuye (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995). Su resultado se mide en una longitud de onda de 515 nm (Arnao et al., 2001). Este ensayo indirecto es calificado como un método más reproducible y selectivo que el método ABTS dado que no reacciona con flavonoides que no tengan grupos hidroxilo en su estructura de anillo benzoico (Roginsky & Lissi, 2005).

1.8.2. ABTS.

Método de detección indirecta. Se fundamenta en la capacidad secuestrante de radicales libres por decoloración del radical ABTS^+ producida por la oxidación de 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) causada por la adición de una muestra con antioxidantes (Roginsky & Lissi, 2005). Actualmente la mayoría de investigaciones realizan las mediciones en una longitud de onda de 734 nm (Schempp, Christof, Mayr & Treutter, 2016; Zheng, Zhao, Xiao, Zhao & Su, 2016).

1.8.3. FRAP.

El método poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) mide la habilidad de los compuestos para reducir los complejos amarillos férricos (Fe III) a ferrosos (Fe II) por acción electrodonadora de los antioxidantes (Benzie & Strain, 1996). En este método se realiza la transferencia de un sólo electrón (Pérez-Jiménez et al., 2008).

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1 Preparación de la muestra

Un total de 12 naranjas fueron utilizadas para cada preparación de muestra. Las cuales fueron compradas en el mercado de la localidad y provenientes de la provincia de Los Ríos. Las frutas fueron lavadas, secadas y exprimidas. Se procedió a extraer la pulpa agotada, la cual fue triturada hasta obtener un tamaño uniforme. Para la maceración, se colocó 600 g de pulpa agotada triturada en 600 mL de agua, esta preparación se calentó a 45 °C durante 8 minutos (Viuda-Martos, Fernández-López, Sayas-Barbera, Sendra & Pérez-Álvarez, 2011). Transcurrido este tiempo la maceración se filtró, obteniendo así el agua de lavado.

En un atomizador Mini Spray Dryer marca Büchi modelo B-290 (Figura 1.) para secado por pulverización, se procedió a atomizar el agua de lavado, para el cual se adicionó maltodextrina en concentración de 10 % como agente encapsulante, se mezcló durante 30 minutos a 1800 rpm y se colocó en el atomizador con las siguientes condiciones: Temperatura de entrada 140 °C, con un flujo de alimentación de 5 mL/min.

El polvo resultante de microencapsulación se adicionó en jugo de naranja comercial en una concentración de 4 % y se usó para el resto de análisis.



Figura 1. Atomizador Mini Spray Dryer

Fuente: La Autora

2.2 Digestión gastrointestinal *in-vitro*

La metodología de digestión gastrointestinal *in-vitro* se lo realizó de acuerdo a lo descrito por Miller, Schricker, Rasmussen y Van Campen (1981), con modificaciones de Gil-Izquierdo et al. (2002). (Ver Figura 2.)

Las enzimas digestivas fueron preparadas previo a su utilización, mientras que la hidratación de la membrana de diálisis con carbonato de sodio 0,71 M se lo efectuó doce horas antes de

comenzar con la digestión gastrointestinal. Tanto la preparación de reactivos como enzimas digestivas se presentan en el Anexo 1.

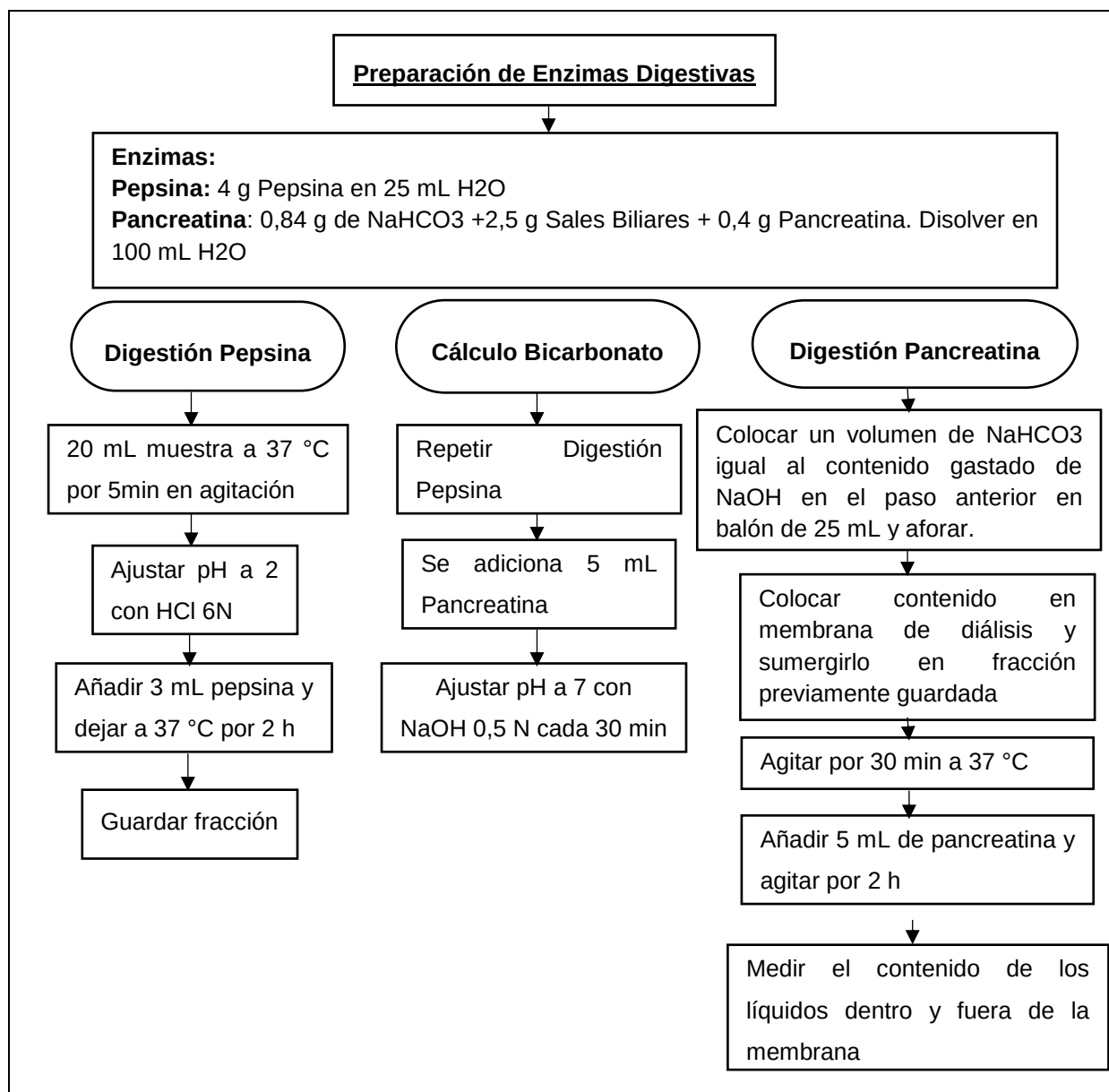


Figura 2. Procesos de Digestión gastrointestinal *in-vitro*

Fuente: Gil Izquierdo (2002).

Elaboración: La Autora

2.3 Determinación de capacidad antioxidante

Para la determinación de capacidad antioxidante se efectuaron los métodos DPPH, ABTS y FRAP.

2.3.1 Método DPPH.

El ensayo de DPPH (ver Figura 3) fue realizado según Brand-Williams et al. (1995) con modificaciones de Thaipong et al. (2006). Se tomó 150 µl de muestras se añadió 2850 µl de solución de trabajo DPPH, para luego de 24 horas de reacción, leer resultados a 515 nm. La curva estándar fue lineal con concentraciones entre 25 y 827 µmol de Trolox. Los resultados fueron expresados en µmol Eq Trolox /mL. Los datos se encuentran especificados en el Anexo 2.

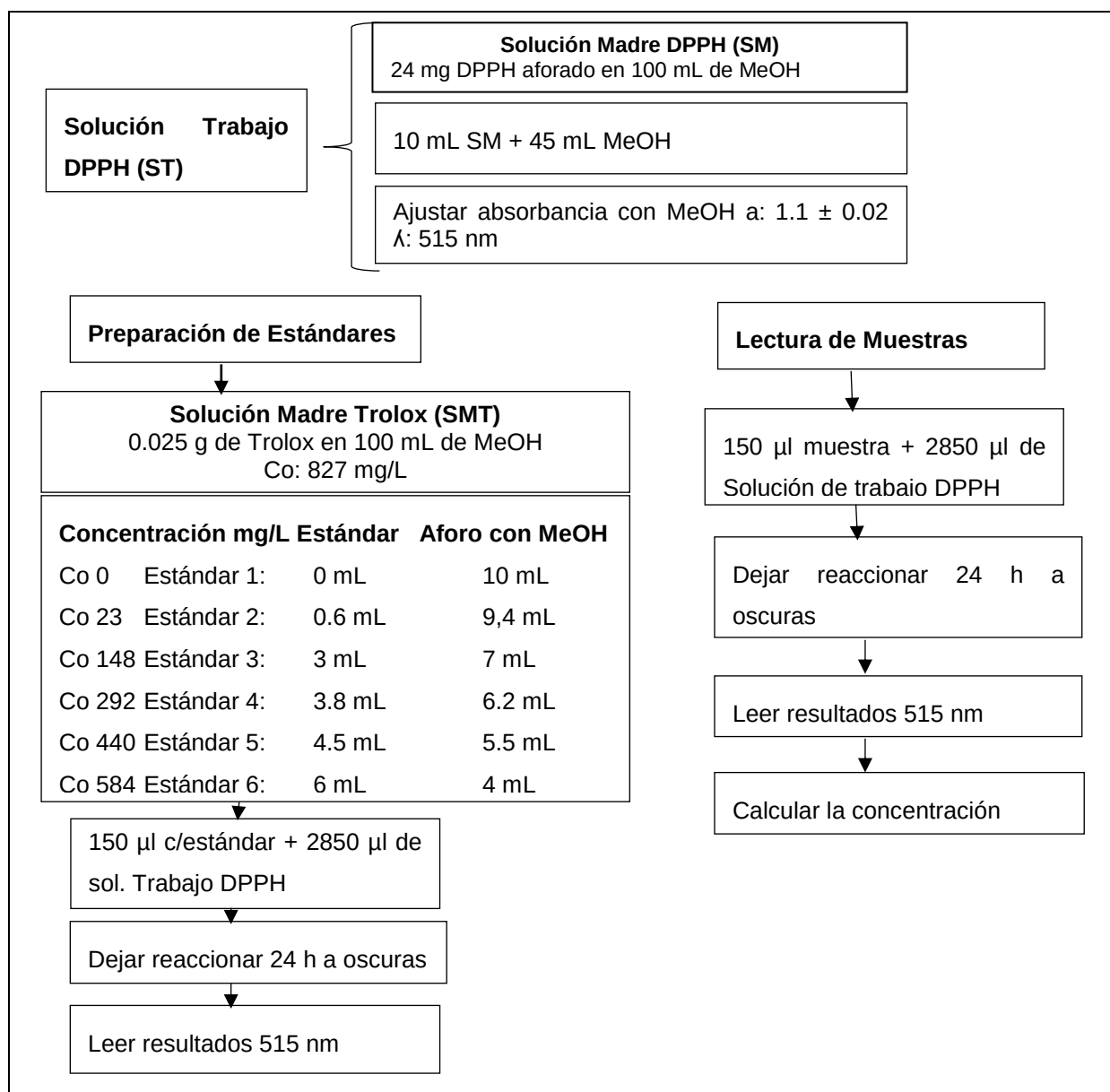


Figura 3. Cuantificación de actividad de capacidad antioxidante mediante método DPPH

Fuente Brand Williams (1995) y Thaipong et al. (2006)

Elaborado: La Autora

2.3.2 Método ABTS.

Para el ensayo de ABTS, se siguió el método descrito por Arnao et al. (2001) con modificaciones de Thaipong et al. (2006), en la Figura 4 se detalla la metodología seguida. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Eq. Trolox /L}$. Resultados y cálculos se especifican en el Anexo 3.

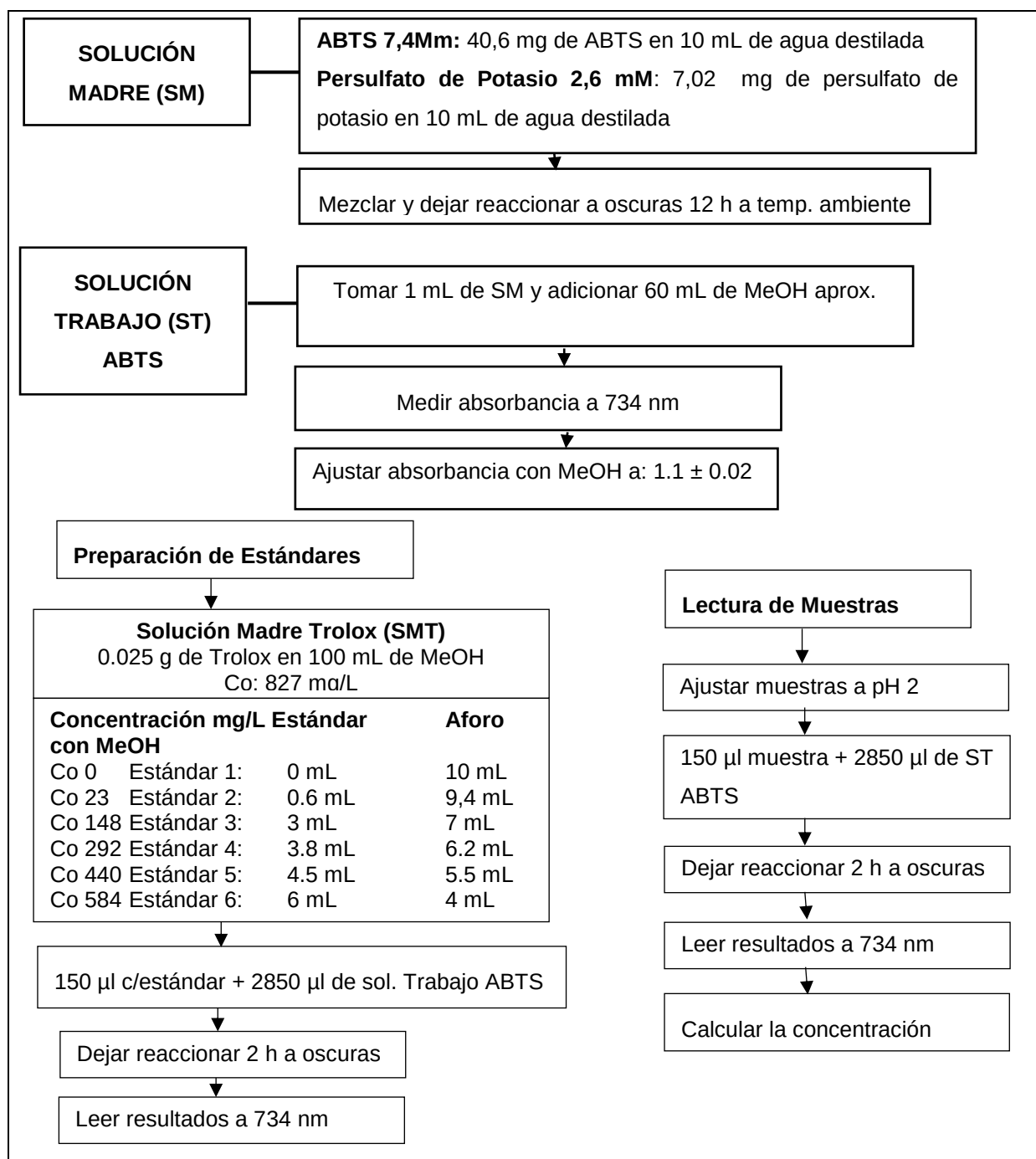


Figura 4. Determinación de capacidad antioxidante: método ABTS

Fuente: Arnao et al. (2001), Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La Autora

2.3.3 Poder antioxidante de reducción férrica FRAP.

Para el ensayo FRAP se realizó de acuerdo a Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones realizadas por Thaipong et al. (2006). Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol Eq. Trolox /mL}$, en la Figura 5 se detalla el procedimiento. Los cálculos se encuentran representados en el Anexo 4.

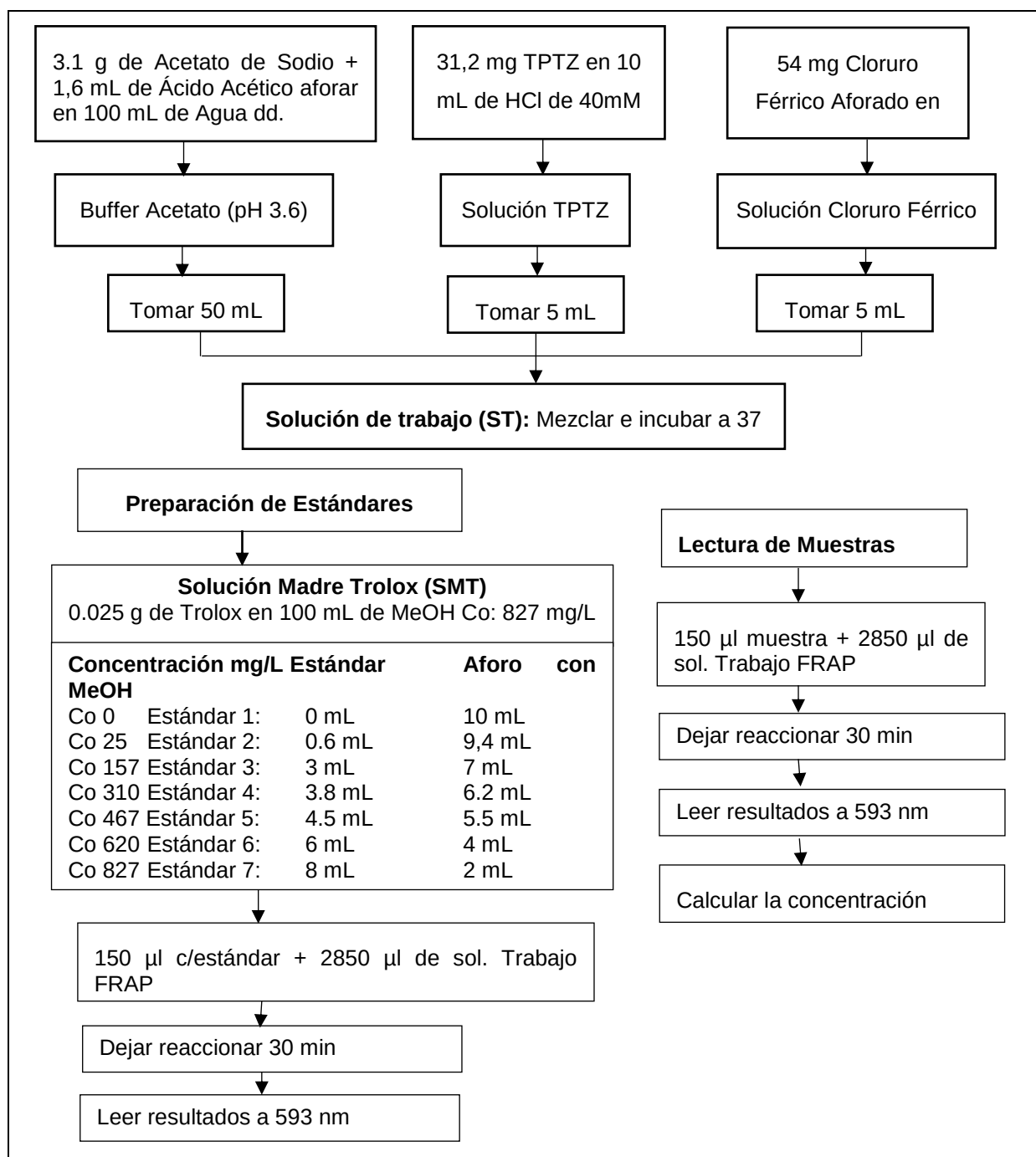


Figura 5. Metodología para determinación de capacidad antioxidante según método FRAP

Fuente: Benzie y Strain (1996) y Thaipong et al. (2006)

Elaboración: La Autora

2.4 Estabilidad antioxidante

Se calculó la estabilidad antioxidante de las muestras en las fases de digestión gastrointestinal *in-vitro*, donde se tomó como 100 % la capacidad antioxidante de la fracción inicial. En la siguiente fórmula se detalla el procedimiento (Ecuación 1). Los resultados y cálculos están representados en el Anexo 5.

Ecuación 1.

$$\text{Estabilidad \%} = \frac{\text{Capacidad antioxidante fases de la digestión} * 100}{\text{Capacidad antioxidante inicial}}$$

2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico y la comparación de medias se realizaron a través del programa Minitab16. Las concentraciones obtenidas en los métodos ABTS, DPPH y FRAP durante el proceso de digestión *in-vitro* se analizaron usando el método de análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con un solo factor. Se aplicó el test de Tukey para comparar los resultados de capacidad antioxidante de las muestras en sus distintas fases de digestión y la diferencia de fase inicial y fase intestinal dializada entre las muestras analizadas. Las diferencias se consideraron significativas en $p < 0,05$. Los resultados del modelo estadístico ANOVA se presentan en el Anexo 6.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y ANÁLISIS

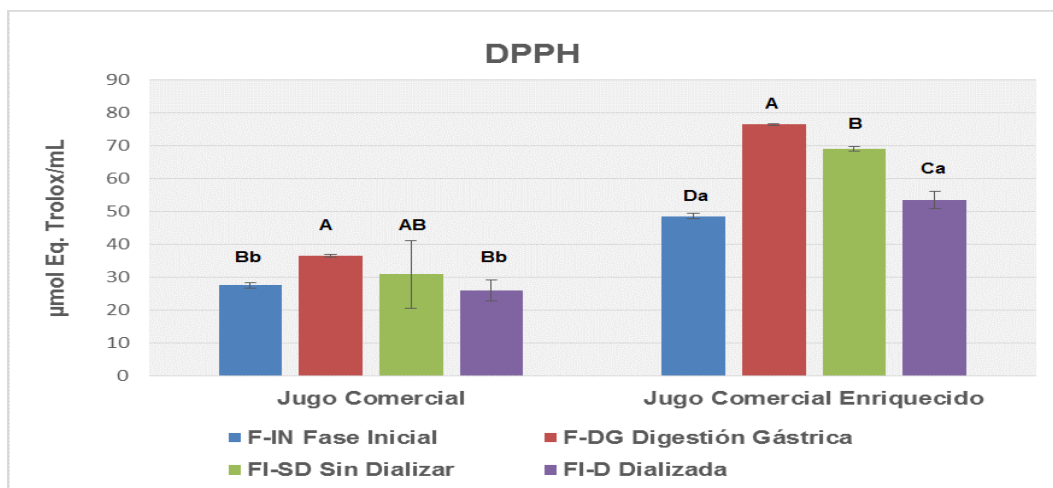
3.1 Análisis de actividad antioxidante

3.1.1 DPPH.

Se analizó las muestras de jugo comercial y jugo comercial enriquecido con subproducto encapsulado al 4 % antes, durante y después de la digestión gastrointestinal *in-vitro*. Los resultados de la capacidad antioxidante en sus distintas fases se muestran en la Gráfica 1 donde la actividad antioxidante del jugo comercial aumentó al añadir un subproducto de naranja.

La fracción inicial (F-IN) del jugo comercial obtuvo 27,6 $\mu\text{mol Eq Trolox/mL}$, al añadir el subproducto encapsulado su actividad antioxidante se incrementó significativamente ($p < 0,05$) en 74 % con concentración de 48,6 $\mu\text{mol Eq Trolox/mL}$.

En el proceso de digestión con pepsina se obtuvo la fase digestión gástrica (DG) de las muestras jugo comercial y jugo comercial enriquecido con subproducto encapsulado al 4 % con aumento ($p < 0,05$) de concentración de actividad antioxidante de 32 % y 57 % respectivamente, Gullon, Pintado y Fernández-López (2015) y Rodríguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez y Martín-Belloso (2013b) explican en sus investigaciones que el incremento de concentración en la etapa de DG está relacionado con la acidez del medio logrando que los compuestos bioactivos se liberen con facilidad.



Para la misma muestra, fases seguidas de una misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acuerdo al Test de rango múltiple de Tukey.

Para diferente muestra, fases seguidas de una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acuerdo al Test de rango múltiple de Tukey.

Gráfica 1. Capacidad antioxidante DPPH durante las fases de digestión gastrointestinal *in-vitro*

Elaboración: La Autora

Luego de la digestión gastrointestinal *in-vitro*, la concentración de capacidad antioxidante en la fase intestinal dializada (FI-D) de la muestra de jugo comercial no existió diferencia significativa ($p > 0,05$) con respecto a F-IN, pero en relación a la fase DG existe disminución de concentración, similar al resultado presentado por Rodríguez-Roque et al. (2013a) en mezclas de jugos frutales, que sugiere que, la actividad antioxidante bajo condiciones intestinales disminuye debido al pH alcalino convirtiendo algunos componentes antioxidantes en diferentes compuestos estructurales, indetectables por métodos de capacidad antioxidante como DPPH (Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán & García-Conesa, 2007).

Contrario al resultado de jugo comercial, la muestra de jugo comercial enriquecido con subproducto encapsulado al 4 % experimentó aumento significativo ($p < 0,05$) de concentración de 9 % respecto a F-IN, debido a la protección ofrecida por el encapsulante maltodextrina (Lim & Nyam, 2016). Pazinato, Pastore y Netto (2013) y Saura-Calixto, Serrano y Goni (2007) en sus investigaciones atribuyen el incremento de concentración de actividad antioxidante a la actividad enzimática de la fase intestinal permitiendo que los componentes antioxidantes sean liberados de su matriz.

Mientras tanto, la capacidad antioxidante de la fase intestinal sin dializar (FI-SD) mostró concentraciones de 30,9 $\mu\text{mol Eq Trolox/mL}$ para la muestra de jugo comercial y 69 $\mu\text{mol Eq Trolox/mL}$ para la muestra de jugo comercial con enriquecimiento de subproducto encapsulado, la concentración observada en esta etapa es mayor ($p < 0,05$) a la concentración obtenida en la fase FI-D.

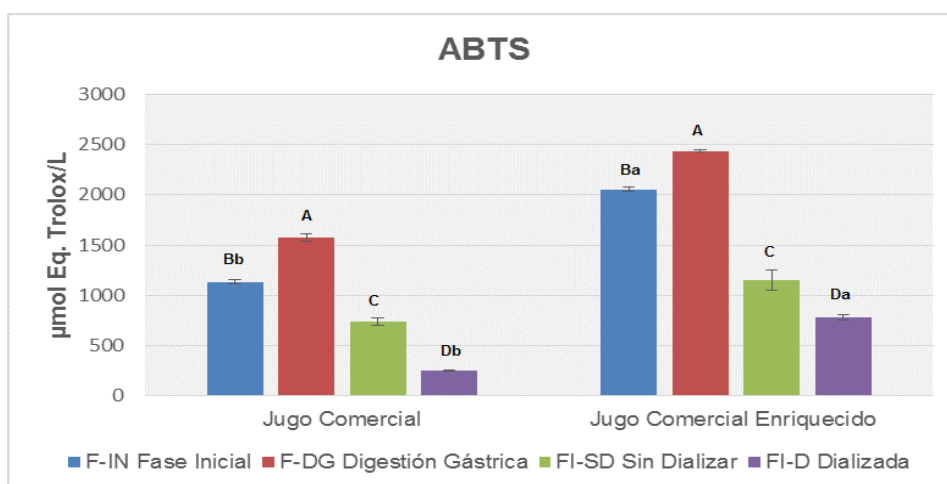
3.1.2 ABTS.

En la Gráfica 2 se muestran los resultados de capacidad antioxidante obtenidos por el método ABTS en las muestras jugo comercial y jugo comercial enriquecido con subproducto encapsulado al 4 %. La concentración de capacidad antioxidante de la muestra de jugo comercial se logró aumentar ($p < 0,05$) un 81 % (2053 $\mu\text{mol Eq Trolox/L}$) al adicionar un subproducto de naranja encapsulado con maltodextrina, resultado menor al obtenido por (Escudero-López et al., 2016) en jugo de naranja pasteurizado con 5450 $\mu\text{mol Eq Trolox/L}$.

Durante el proceso de digestión *in-vitro* se obtuvo las fases DG, las cuales incrementaron ($p < 0,05$) su concentración en 39 % para la muestra jugo comercial y 18 % para jugo comercial enriquecido con subproducto encapsulado. El incremento de concentración durante la fase gástrica (DG) también la experimentó Gullon, Pintado y Fernández-López (2015) y Lim y Nyam (2016) indicando que el aumento de concentración se debe a las condiciones ácidas

(pH 2) del medio y el efecto que ejercen las enzimas digestivas como proteasas sobre la muestras, permitiendo que los compuestos antioxidantes tengan mayor reacción.

Al finalizar el proceso de digestión intestinal se obtuvieron las fases FI-SD y FI-D para ambas muestras, los cuales mostraron disminución significativa ($p < 0,05$) en su concentración. Para FI-SD la muestra de jugo comercial presentó una reducción de 34 % en cambio para la muestra de jugo comercial enriquecido con subproducto el descenso fue mayor con 43 % con respecto a su fase inicial.



Para la misma muestra, fases seguidas de una misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acuerdo al Test de rango múltiple de Tukey.

Para diferente muestra, fases seguidas de una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acuerdo al Test de rango múltiple de Tukey.

Gráfica 2. Capacidad antioxidante ABTS de las fases de la digestión gastrointestinal *in-vitro*

Elaboración: La Autora

En la FI-D se demuestra la concentración de antioxidantes que se encontrarían bioaccesibles para su posterior absorción, en este caso, el jugo al cual se enriqueció con subproducto encapsulado obtuvo mayor ($p < 0,05$) concentración con 779 μmol ET/L pero con pérdida de actividad antioxidante de 62 %, mientras que, la concentración de capacidad de antioxidante del jugo comercial que presentó 253 μmol ET/L con una pérdida de actividad de 77,6 %, este resultado nos demuestra que el material encapsulante ofrece mayor resistencia a la pérdida de actividad de antioxidantes y permite una liberación controlada de antioxidantes durante procesos de digestión gastrointestinal *in-vitro* (Lim & Nyam, 2016).

Al comparar entre la fase FI-D y FI-SD de la muestra de jugo comercial se observó que FI-SD obtuvo mayor ($p < 0,05$) actividad antioxidante, resultados similares a los presentados por (Mosele, Macià, Romero, Motilva & Rubió, 2015) durante su estudio de estabilidad de compuestos fenólicos de jugo, pulpa y extracto de corteza de granada usando el modelo de

digestión gastrointestinal *in-vitro*, indicando que, una gran parte de componentes que no son absorbidos en la fase intestinal son destinados al colon para su respectivo metabolismo.

3.1.3 Poder antioxidante de reducción férrica.

Los resultados obtenidos por el método de capacidad reductora (FRAP) se presentan en la Gráfica 3, donde se puede observar las muestras analizadas en sus distintas fases de digestión gastrointestinal *in-vitro* incluyendo la fracción inicial.

Al igual que en los métodos anteriores, el jugo comercial aumentó ($p < 0,05$) su concentración de capacidad antioxidante, en este caso un 170 % al adicionar subproducto de pulpa agotada de naranja.

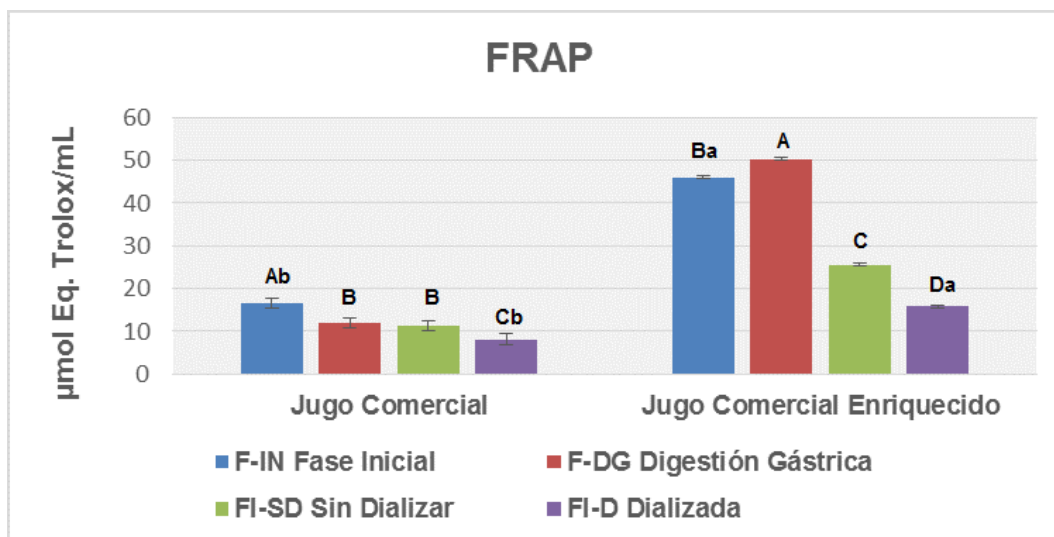
Luego de la acción de la enzima pepsina durante la digestión gástrica, la muestra de jugo comercial disminuyó significativamente ($p < 0,05$) 29,4 % de su capacidad antioxidante, mientras que la muestra de jugo comercial enriquecido con subproducto incrementó ($p < 0,05$) su concentración un 8,6 % respecto a su F-IN.

El incremento de concentración en la muestra de jugo comercial enriquecido con subproducto se explica con los resultados presentados por Gullon, Pintado, Barber, et al. (2015) en muestras de harina de bagazo de manzana y harina de semillas de dátil donde obtuvo aumento de concentración de 64 % y 59 % respectivamente, donde concluye que, el aumento de poder reductor se debe a la acción enzimática ejercida por la pepsina, permitiendo la liberación de polifenoles desde la matriz del alimento.

En cambio, Kamiloglu, Pasli, Ozcelik, Van Camp y Capanoglu (2015) en la evaluación del efecto de digestión *in-vitro* y capacidad antioxidante en jaleas y mermeladas de zanahoria negra y Bouayed, Hoffmann y Bohn (2011) en el análisis de capacidad reductora antioxidante de variedades de manzanas, con disminución de 85 % y 116 % respectivamente; y explican que durante la DG ya existe liberación y degradación de polifenoles y flavonoides logrando descenso de capacidad antioxidante en la fase DG.

Al finalizar el proceso de digestión gastrointestinal *in-vitro*, la FI-D disminuyó ($p < 0,05$) sus concentraciones en 53 % para Jugo Comercial y 65 % para la muestra Jugo Comercial enriquecido con subproducto en relación a la concentración de su F-IN. Los resultados presentados son similares a los obtenidos por Gullon, Pintado y Fernández-López (2015) en muestras de harina de cáscara de granada que al finalizar su proceso de digestión *in-vitro* obtuvieron una reducción de la capacidad antioxidante del 91,22 % respecto a sus muestras

sin digerir, esta disminución se debe a que los compuestos bioactivos se liberan con facilidad con los tratamientos enzimáticos que sufren durante la digestión (Gullon, Pintado & Fernández-López, 2015; Wootton-Beard, Moran & Ryan, 2011). La disminución fue menor en la muestra enriquecida con subproducto encapsulado, esto se debe a que el material encapsulante cumplió con la propiedad de protección a los componentes antioxidantes presentes en el subproducto de naranja.



Para la misma muestra, fases seguidas de una misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acuerdo al Test de rango múltiple de Tukey.

Para diferente muestra, fases seguidas de una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acuerdo al Test de rango múltiple de Tukey.

Gráfica 3. Capacidad antioxidante de las fases de digestión gastrointestinal *in-vitro* determinada por el método FRAP

Elaboración: La autora

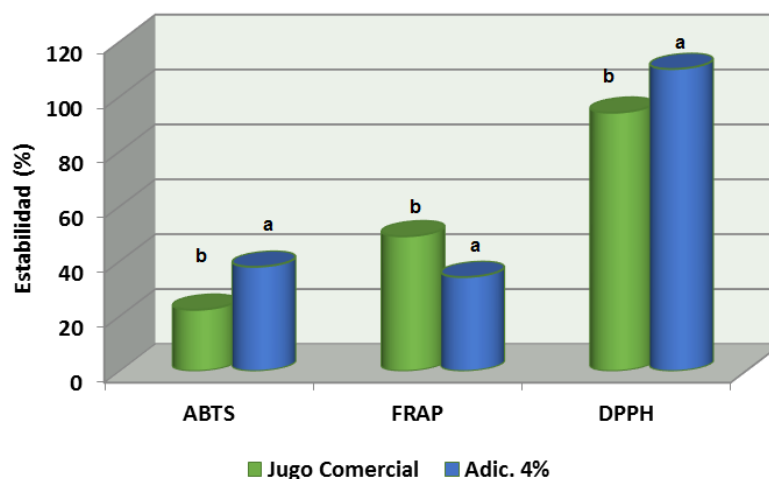
3.2 Estabilidad antioxidante

Al analizar la bioaccesibilidad luego del proceso de digestión *in-vitro* para cada uno de los ensayos (resultados presentados en la Gráfica 4), se observó que, en los métodos ABTS y DPPH, la muestra de jugo comercial con adición de subproducto presentó estabilidad de 38 % y 110 % respectivamente, porcentajes mayores ($p < 0,05$) si comparamos con las muestras de FI-D de jugo comercial (22 % ABTS y 94 % DPPH respectivamente). Resultados similares presentaron bebidas de frutas exóticas enriquecidas con *Stevia rebaudianna* al 2.5 % con 38 % de estabilidad para el método ABTS, trabajo realizado por Carbonell-Capella et al. (2016) donde explica que existe mayor estabilidad brindada por antocianinas y flavonoides resistentes a procesamientos. La presencia de este tipo de compuestos flavonoides en subproductos de naranja se ha demostrado en el trabajo

realizado por Escobedo-Avellaneda, Gutiérrez-Urbe, Valdez-Fragoso, Torres y Welti-Chanes (2013) donde las concentraciones más altas de sus muestras de albedo, flavedo y naranja triturada la presentó la flavonona y hesperidina.

El aumento de estabilidad en las muestras de la presente investigación la podemos atribuir al material encapsulante que se usó (maltodextrina) dado que, bien como lo menciona Mahdavi et al. (2016), este tipo de biopolímero micro encapsulante protege a los antioxidantes de actividad enzimática y permite su liberación controlada de antioxidantes durante las fases de DGI.

La mayor estabilidad en el método FRAP obtuvo el jugo comercial con 49 % frente a 34 % de la muestra de jugo enriquecido con subproducto, sin embargo la actividad antioxidante de la muestra de jugo enriquecido con subproducto ($16 \mu\text{mol eq. Trolox} / \text{mL}$) fue dos veces mayor ($p < 0,05$) que el jugo comercial, lo que quiere decir que, aunque su estabilidad antioxidante sea menor, su aporte para la captación de radicales libres fue mayor.



Para un mismo método, muestras que no comparten una misma letra, tienen diferencia significativa ($p < 0,05$).

Gráfica 4. Estabilidad antioxidante de la fase intestinal dializada (FI-D) mediante los métodos ABTS, DPPH y FRAP

Elaboración: La Autora

CONCLUSIONES

- Al enriquecer un jugo comercial con un subproducto obtenido de pulpa de naranja previamente microencapsulado, se incrementó la concentración de capacidad antioxidante un 76 %, 81 % y 170 % medido por los métodos DPPH, ABTS y FRAP respectivamente.
- Se evaluó cada una de las fases durante el procesamiento de digestión gastrointestinal *in-vitro* y se observó mayor degradación de antioxidantes en la FI-D de la muestra de jugo comercial en el método ABTS con 88 % de disminución de antioxidantes respecto a su F-IN.
- La muestra de jugo comercial enriquecida con subproducto encapsulado al 4 % demostró mayor estabilidad antioxidante para los métodos ABTS y DPPH con concentraciones de 110 % y 37 %, respectivamente. Aunque para el método FRAP la estabilidad fue menor, su capacidad antioxidante resultante fue mayor en relación a la muestra de jugo comercial.

RECOMENDACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS

- Durante el desarrollo del método ABTS, se experimentó interferencias en las lecturas de las muestras y errores en sus absorbancias debido al pH, por lo cual se procedió a su ajuste a pH 2, procedimiento que no se encontraba descrito en previas investigaciones.
- Para facilitar la comparación con diferentes investigaciones, se recomienda en el método DPPH expresar los resultados obtenidos en IC₅₀.
- Durante la preparación de enzimas, disolver la pancreatina mientras se mantiene su temperatura a 37 °C en baño María para impedir la formación de grumos que interfieran en la diálisis de la muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244. doi:10.1016/S0308-8146(00)00324-1
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 11(494), 161-172. doi:10.4067
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Dávila-Aviña, J. E., & González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874. doi:10.1016/j.foodres.2011.02.021
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “ antioxidant power ”: the FRAP assay. 76, 70-76.
- Bermúdez-Soto, M., Tomás-Barberán, F., & García-Conesa, M. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102, 865-874. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.025
- Biehler, E., & Bohn, T. (2010). Methods for assessing aspects of carotenoid bioavailability. *Current Nutrition & Food Science*, 6(1), 44-69. doi:10.2174/157340110790909545
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21. doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.052
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Techonology*, 30, 25-30.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Grimi, N., Vorobiev, E., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2016). Changes of antioxidant compounds in a fruit juice- *Stevia rebaudiana* blend processed by pulsed electric technologies and ultrasound. *Food Bioprocess Technol.*, doi:10.1007/s11947-016-1706-1
- Chen, Z.-T., Chu, H.-L., Chyau, C.-C., Chu, C.-C., & Duh, P.-D. (2012). Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. *Food Chemistry*, 135(4), 2119-2127. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.041

- Ejaz, S., Ejaz, A., Matsuda, K., & Lim, C. W. (2006). Limonoids as cancer chemopreventive agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3), 339-345. doi:10.1002/jsfa.2396
- Escobedo-Avellaneda, Z., Gutiérrez-Urbe, J., Valdez-Fragoso, A., Torres, J. A., & Welti-Chanes, J. (2013). Phytochemicals and antioxidant activity of juice , flavedo , albedo and comminuted orange. *Journal of Functional Foods*, 6, 470-481. doi:10.1016/j.jff.2013.11.013
- Escudero-López, B., Cerrillo, I., Gil-Izquierdo, Á., Hornero-Méndez, D., Herrero-Martín, G., Berná, G., Medina, S., Ferreres, F., Martín, F., & Fernández-Pachón, M. S. (2016). Effect of thermal processing on the profile of bioactive compounds and antioxidant capacity of fermented orange juice. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(7), 779-788. doi:10.1080/09637486.2016.1204428
- FAO. (2012). Citrus fruit fresh and processed annual statistics. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf
- Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Pegg, R. B., & Kong, F. (2014). Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 153, 272-278. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.063
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121. doi:10.1016/j.foodres.2007.07.004
- Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P., & Tomás-Barberán, F. A. (2002). An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, 214(2), 155-159. doi:10.1007/s00217-001-0428-3
- Gullon, 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. doi:10.1016/j.foodres.2015.10.021
- Gullon, B., Pintado, M. E., & Fernández-López, J. (2015). *In vitro* gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products : Changes in

- the antioxidant potential and bioactive compounds. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628. doi:10.1016/j.jff.2015.09.056
- INEC. (2013). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua 2013. Recuperado de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Presentaciones/PRESENTACION-Espac.pdf>
- Kamiloglu, S., Pasli, A., Ozcelik, B., Van Camp, J., & Capanoglu. (2015). Colour retention, anthocyanin stability and antioxidant capacity in black carrot (*Daucus carota*) jams and marmalades: Effect of processing, storage conditions and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 13(October 2014), 1-10. doi:10.1016/j.jff.2014.12.021
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 385-392. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016
- Kuck, L. S., & Zapata Noreña, C. P. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 194, 569-576. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.066
- Laguna, J., Piña, E., Martínez, F., Pardo, J. P., & Rivero, H. (2013). *Bioquímica de Laguna* (7ma ed.). México: Manual Moderno.
- Lim, W.-T., & Nyam, K.-L. (2016). Characteristics and controlled release behavior of microencapsulated kenaf seed oil during *in-vitro* digestion. *Journal of Food Engineering*. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.02.022
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods : Impact on human health. doi:10.4103/0973-7847.70902
- Lopes, C., & Barata de Silva, P. M. (2012). Microencapsulación *Manual de tecnología farmaceutica* (pp. 51-60). Barcelona: Elsevier.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379-385.
- Marín, F. R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized

- functional fibres. *Food Chemistry*, 100(2), 736-741. doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.040
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39-45. doi:10.1016/j.foodres.2012.08.005
- Miller, D. D., Schlicker, B. R., Rasmussen, R. R., & Van Campen, D. (1981). An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248-2256.
- 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. doi:10.1016/j.jff.2015.02.026
- National Cancer Institute. (2014). Antioxidants and Cancer Prevention. Recuperado de <http://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/diet/antioxidants-fact-sheet>
- O'Shea, N., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 1-10. doi:10.1016/j.ifset.2012.06.002
- O'Shea, N., Ktenioudaki, A., Smyth, T. P., McLoughlin, P., Doran, L., Auty, M. A. E., Arendt, E., & Gallagher, E. (2015). Physicochemical assessment of two fruit by-products as functional ingredients: Apple and orange pomace. *Journal of Food Engineering*, 153, 89-95. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.12.014
- Pazinatto, C., Pastore, G. M., & Netto, F. M. (2013). Antioxidant capacity of amaranth products : effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*, 33(3), 485-493.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285. doi:10.1016/j.foodres.2007.12.004
- Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors,

- and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(SUPPL.), 66-73. doi:10.1016/j.jfca.2005.12.006
- Reiniccius, G. A. (2001). Multiple-core encapsulation - The spray drying of food ingredients. In P. Vilstrup (Ed.), (pp. 151-185). UK: Leatherhead Publishing.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(7), 1386-1394. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013a). Changes in vitamin c, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(61), 1859-1867.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013b). Soymilk phenolic compounds , isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206-212. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.115
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235-254. doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.004
- Rudge, H., Pinto, T. A., & Genovese, M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*(134), 1892-1898.
- Rustad, T., Storrø, I., & Slizyte, R. (2011). Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(10), 2001-2014. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02736.x
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goni, I. (2007). Food Chemistry Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492-501. doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.006
- Schempp, H., Christof, S., Mayr, U., & Treutter, D. (2016). Phenolic compounds in juices of apple cultivars and their relation to antioxidant activity. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 20, 11-20. doi:10.5073/JABFQ.2016.089.002

- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., & De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines : Current status and future prospect nitrogen species. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1), 91-100.
- Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J. N., Xu, Z., & Finley, J. W. (2012). Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(60), 6658-6677.
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147-153. doi:10.1007/s11130-008-0097-5
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.030
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., & Brat, P. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 1950-1958. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02012.x
- Vargas, K., & Pinoargote, G. (2011). Aprovechamiento de subproductos de la industrialización de cítricos. *Earth*.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2011). Physicochemical characterization of the orange juice waste water of a citrus by-product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(2), 264-271. doi:10.1111/j.1745-4549.2009.00450.x
- Wildman, R., & Kelley, M. (2007). Handbook of nutraceuticals and functional foods (Second ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu

methods. *Food Research International*, 44(1), 217-224.
doi:10.1016/j.foodres.2010.10.033

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods For Human Nutrition*, 59(3), 113-122. doi:10.1007/s11130-004-0049-7

Zheng, L., Zhao, M., Xiao, C., Zhao, Q., & Su, G. (2016). Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. *Food Chemistry*, 192, 288-294. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.015

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos y enzimas digestivas

REACTIVOS

Ácido Clorhídrico HCl 6 N 100mL

36, 45 g HCl 1 N

X= 218.7 g HCl 6 N

218.7 g HCl 1000 mL

X= 21.87 g HCl 100 mL

21.87 g HCl 32 %

X= 68.34 g HCl 100 %

$$D = \frac{m}{v}$$

$$v = \frac{68.34g}{1.19g/mL} = 57.42 \text{ mL HCl}$$

Hidróxido de Sodio NaOH 0.5 N

40 g NaOH 1 N

X= 20 g NaOH 0.5 N

20 g NaOH 1000 mL

X= 2 g NaOH 100 mL

Bicarbonato de Sodio NaHCO₃ 0.71 M 100 mL

84 g NaHCO₃ 1 M

X= 59.64 g NaHCO₃ 0.71 M

59.64 g NaHCO₃1000 mL

X= 5.96 g NaHCO₃ 100 mL

ENZIMAS DIGESTIVAS

Preparación Pepsina

4 g Pepsina 25 mL

X= 8 g Pepsina 50 mL

Preparación Pancreatina

Pancreatina

0,4 g Pancreatina 100 mL

X= 0,16 g Pancreatina 40 mL

Sales biliares

2,5 g Sales Biliares 100 mL

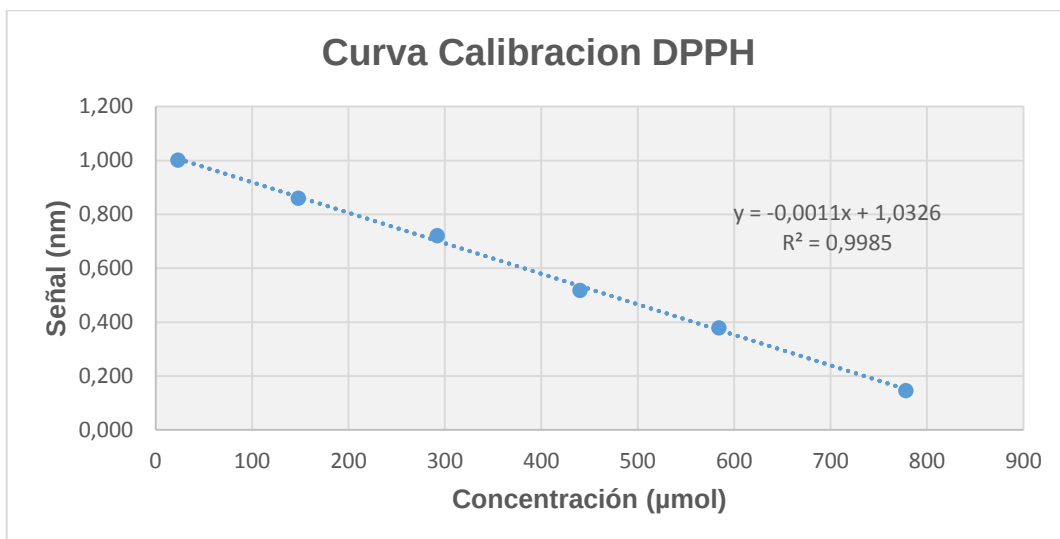
X= 1 g Sales Biliares 40 mL

Bicarbonato de Sodio NaHCO_3

0,84 g NaHCO_3 100 mL

X= 0,336 g NaHCO_3 40 mL

Anexo 2. Cuantificación de actividad antioxidante método DPPH



Estándar	Concentración (µM)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Absorbancia
E1	23	0,6	9,4	1,002
E2	148	3	7	0,861
E3	292	3,8	6,2	0,721
E4	440	4,5	5,5	0,519
E5	584	6	4	0,380
E6	778	8	2	0,147
Pendiente	-0,001133			
intersección	1,0325			
R	0,99924			
R ²	0,9985			

Cálculos para determinar concentración: Fase Intestinal Dializada

$$y = mx + b$$

Donde

y= Absorbancia

m= Pendiente

x= Concentración

b= Intersección

$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$x = \frac{0,875 - 1,0325}{-0,001133} = 139 \mu M$$

139 μM 1000 mL

X= 0,69 μM 5 mL **Factor de dilución**

0,69 μM 0,5 mL **Factor de dilución**

X= 24,32 $\mu mol/mL$ 17,5 mL

Muestra Fase Inicial

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	5	0,726	271	20	27,1	28	17,6	3,0
		0,709	286		28,6			
		0,724	272		27,2			
Jugo Comercial Enriquecido	10	0,752	248	20	49,5	49	48,6	1,0
		0,762	239		47,8			
		0,758	242		48,5			

Muestra Fase Digestión Gástrica

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/mL)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	5	0,669	321	23	36,9	37	0,36	1,0
		0,676	315		36,2			
		0,672	318		36,6			
Jugo Comercial Enriquecido	5	0,278	666	23	76,6	76	0,21	0,3
		0,282	663		76,2			
		0,279	665		76,5			

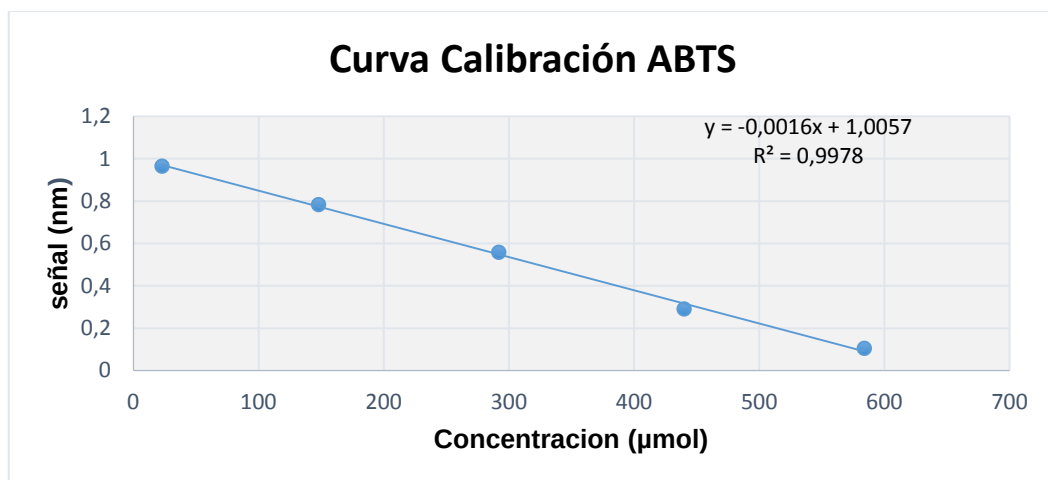
Muestra Fase Intestinal Sin Dializar

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	5	0,877	137	32,5	22,3	31	10,35	4,4
		0,737	261		42,4			
		0,837	173		28,1			
Jugo Comercial Enriquecido	5	0,314	634	22	69,8	69	0,64	0,9
		0,327	623		68,5			
		0,322	627		69,0			

Muestra Fase Intestinal Dializada

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	10	0,875	139	17,5	24,3	26	3,26	12,6
		0,878	136		23,9			
		0,84	170		29,8			
Jugo Comercial Enriquecido	5	0,451	513	22	56,5	53	2,64	4,9
		0,502	468		51,5			
		0,493	476		52,4			

Anexo 3. Cuantificación de actividad antioxidante método ABTS.



Estándar	Concentración (μM)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Absorbancia (nm)
E1	23	0,6	9,4	0,96
E2	148	3	7	0,78
E3	292	3,8	6,2	0,56
E4	440	4,5	5,5	0,29
E5	584	6	4	0,10
Pendiente	-0,002			
intersección	1,006			
R	0,998			
R ²	0,9978			

Cálculos para determinar concentración: Fase Inicial

$$y = mx + b$$

Donde

y= Absorbancia

m= Pendiente

x= Concentración

b= Intersección

$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$x = \frac{0,656 - 1,006}{-0,002} = 223,12 \mu M$$

$$223,12 \mu M \quad \dots\dots \quad 1000 \text{ mL}$$

$$X = 1,1156 \mu M \quad 5 \text{ mL} \quad \text{Factor de dilución}$$

$$1,1156 \mu M \quad \dots\dots \quad 1 \text{ mL} \quad \text{Factor de dilución}$$

$$X = 22,32 \mu \text{mol/mL} \quad 20 \text{ mL}$$

$$22,32 \mu \text{mol/mL} \dots\dots\dots 20 \text{ mL}$$

$$X = 1116 \mu \text{mol/L} \quad 1000 \text{ mL}$$

Muestras Fase Inicial

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	5	0,656	223,128	20	1116	1134	17,6	1,5
		0,645	230,147		1151			
		0,65	226,956		1135			
Jugo Comercial Enriquecido	10	0,687	203,348	20	2033	2053	23,0	1,1
		0,685	204,624		2046			
		0,68	207,814		2078			

Muestras Digestión Gástrica

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	5	0,57	278	23,0	1599	1573	38,30	2,4
		0,589	266		1529			
		0,572	277		1591			
Jugo Comercial Enriquecido	5	0,345	422	23,0	2424	2434	11,21	0,5
		0,343	423		2431			
		0,339	425		2446			

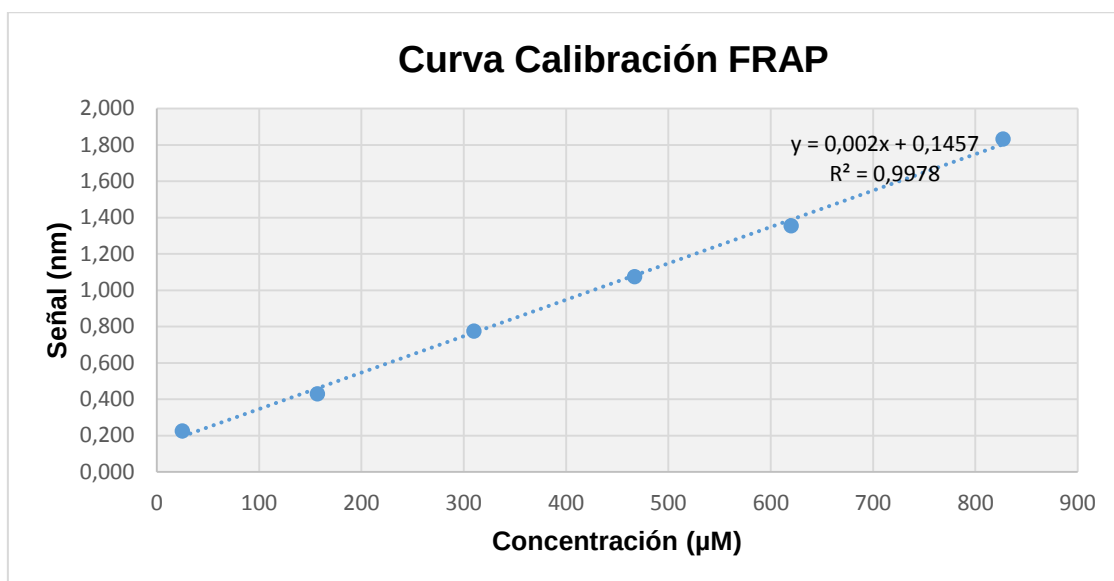
Muestras Fase Intestinal Sin Dializar

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	10	0,911	60	25,5	770	738	32,54	4,4
		0,915	58		738			
		0,919	55		705			
Jugo Comercial Enriquecido	10	0,825	115	22	1268	1151	101,55	8,8
		0,851	99		1086			
		0,849	100		1100			

Muestras Fas Intestinal Dializadas

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	10	0,964	27	19	253	253	6,06	2,4
		0,963	27		259			
		0,965	26		247			
Jugo Comercial Enriquecido	10	0,457	68,72	22	756	779	24,65	3,2
		0,498	73		805			
		0,494	71		777			

Anexo 4. Cuantificación de actividad antioxidante método FRAP



Estándar	Concentración (µM)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Absorbancia
E1	25	0,6	9,4	0,226
E2	157	3	7	0,431
E3	310	3,8	6,2	0,776
E4	467	4,5	5,5	1,075
E5	620	6	4	1,355
E6	827	8	2	1,833
Pendiente	0,0020			
intersección	0,1457			
R	0,99889			
R ²	0,9978			

Cálculos para determinar concentración: Fase Digestión Gástrica

$$y = mx + b$$

Donde

y= Absorbancia

m= Pendiente

x= Concentración

b= Intersección

$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$x = \frac{0,354 - 0,1457}{0,0020} = 104 \mu M$$

104 μM 1000 mL

X= 0,52 μM 5 mL **Factor de dilución**

0,52 μM 1 mL **Factor de dilución**

X= 11,952 $\mu mol/mL$ 23 mL

Muestras Fase Inicial

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración ($\mu mol ET/L$)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	5	0,477	165	20	16,530	17	1,226	7,368
		0,505	179		17,926			
		0,456	155		15,482			
Jugo Comercial Enriquecido	10	0,61	232	20	46,330	46	0,251	0,545
		0,605	229		45,831			
		0,607	230		46,031			

Muestra Fase Digestión Gástrica

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	5	0,354	104	23	11,952	12	0,250	2,073
		0,361	107		12,354			
		0,353	103		11,895			
Jugo Comercial Enriquecido	10	0,584	219	23	50,296	50	0,403	0,801
		0,581	217		49,952			
		0,588	221		50,755			

Muestra Fase Intestinal Sin Dializar

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	10	0,375	42	25,5	10,727	11	1,102	9,696
		0,38	50		12,635			
		0,381	42		10,727			
Jugo Comercial Enriquecido	10	0,23	114	22	25,170	26	0,353	1,380
		0,245	117		25,718			
		0,23	117		25,828			

Muestra Fase Intestinal Dializada

Muestra	Factor de Dilución	Abs (nm)	Co. Preliminar (μM)	Vol. (mL)	Concentración (μmol ET/L)	Promedio	Desviación	%CV
Jugo Comercial	5	0,316	85	19	8,072	8	0,342	4,185
		0,312	83		7,883			
		0,326	90		8,546			
Jugo Comercial Enriquecido	10	0,288	71	22	15,620	16	0,168	1,063
		0,291	72		15,950			
		0,289	72		15,730			

Anexo 5. Estabilidad antioxidante

Estabilidad antioxidante método DPPH

Muestra	Inicial $\mu\text{mol ET/mL}$	Digestión Gástrica $\mu\text{mol ET/mL}$	Sin Dializar $\mu\text{mol ET/mL}$	Dializada $\mu\text{mol ET/mL}$
Jugo Comercial	27,6	36,6	30,9	26,0
Jugo Comercial Enriquecido	48,6	76,4	69,1	53,5

Cálculos estabilidad antioxidante

Como ejemplo se muestra la estabilidad antioxidante de fase dializada de Jugo comercial

$$\text{Estabilidad \%} = \frac{\text{Capacidad antioxidante fases de la digestión} * 100}{\text{Capacidad antioxidante inicial}}$$

$$\text{Estabilidad \%} = \frac{26}{27,6} * 100$$

$$\text{Estabilidad \%} = 94\%$$

Muestra	Estabilidad Fase Dializada %
Jugo Comercial	94
Jugo Comercial Enriquecido	110

Estabilidad antioxidante método ABTS

Muestra	Inicial $\mu\text{mol ET/L}$	Digestión Gástrica $\mu\text{mol ET/L}$	Sin Dializar $\mu\text{mol ET/L}$	Dializada $\mu\text{mol ET/L}$
Jugo Comercial	1134	1573	738	253
Jugo Comercial Enriquecido	2053	2434	1151	779

Muestra	Estabilidad Fase Dializada %
Jugo Comercial	22
Jugo Comercial Enriquecido	38

Estabilidad antioxidante método FRAP

Muestra	Inicial $\mu\text{mol ET/mL}$	Digestión Gástrica $\mu\text{mol ET/mL}$	Sin Dializar $\mu\text{mol ET/mL}$	Dializada $\mu\text{mol ET/mL}$
Jugo Comercial	17	12	11	8
Jugo Comercial Enriquecido	46	50	26	16

Muestra	Estabilidad Fase Dializada %
Jugo Comercial	49
Jugo Comercial + Adición Subproducto Encapsulado	34

Anexo 6. Resultados del análisis estadístico

ANOVA unidireccional: Inicial DPPH vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	659.926	659.926	902.24	0.000
Error	4	2.926	0.731		
Total	5	662.852			

S = 0.8552 R-cuad. = 99.56 % R-cuad.(ajustado)= 99.45 %

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra	N	Media	Agrupación
JC + Adición	4	% 3 48.601	A
Jugo Comercial	3	27.626	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Dializada DPPH vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	1132.46	1132.46	128.37	0.000
Error	4	35.29	8.82		
Total	5	1167.75			

S = 2.970 R-cuad. = 96.98 % R-cuad.(ajustado) = 96.22 %

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra	N	Media	Agrupación
JC + Adición	4	% 3 53.471	A
Jugo Comercial	3	25.994	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Inicial ABTS vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	506.631	506.631	3022.79	0.000

Error 4 0.670 0.168
Total 5 507.302

S = 0.4094 R-cuad. = 99.87 % R-cuad.(ajustado) = 99.83 %

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra N Media Agrupación
JC + Adición 4 % 3 41.053 A
Jugo Comercial 3 22.674 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Dializada ABTS vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	166.346	166.346	1290.86	0.000
Error	4	0.515	0.129		
Total	5	166.862			

S = 0.3590 R-cuad. = 99.69 % R-cuad.(ajustado) = 99.61 %

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra N Media Agrupación
JC + Adición 4 % 3 15.585 A
Jugo Comercial 3 5.055 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Inicial FRAP vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	1298.119	1298.119	1656.53	0.000
Error	4	3.135	0.784		
Total	5	1301.253			

S = 0.8852 R-cuad. = 99.76 % R-cuad.(ajustado) = 99.70 %

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra N Media Agrupación

JC + Adición 4 % 3 46.064 A
 Jugo Comercial 3 16.646 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Dializada FRAP vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	86.6342	86.6342	1195.60	0.000
Error	4	0.2898	0.0725		
Total	5	86.9240			

S = 0.2692 R-cuad. = 99.67 % R-cuad.(ajustado) = 99.58 %

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra	N	Media	Agrupación
JC + Adición	4	15.7668	A
Jugo Comercial	3	8.1671	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Efecto de la digestión *in-vitro* sobre la capacidad antioxidante medido por el método DPPH en el jugo comercial.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Jugo Comercial	3	196,4	65,47	2,21	0,165
Error	8	237,0	29,62		
Total	11	433,4			

Resumen del modelo

S= 5,44267 R-cuad=45,32% R-cuad (ajustado)= 24,82%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Jugo Comercial	N	Media	Agrupación
Digestión Gástrica	3	36,576	A

Sin Dializar	3	30,93	A B
Fase Inicial	3	27,626	B
Dializada	3	25,99	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Efecto de la digestión *in-vitro* sobre la capacidad antioxidante medido por el método DPPH en el jugo comercial enriquecido.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
JC+Adición	3	1534,18	511,394	248,57	0,000
Error	8	16,46	2,057		
Total	11	1550,64			

Resumen del modelo

S= 1,43433 R-cuad.= 98,94% R-cuad (ajustado) 98,54%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

JC+Adición	N	Media	Agrupación
Digestión Gástrica	3	76,445	A
Sin Dializar	3	69,107	B
Dializada	3	53,47	C
Fase Inicial	3	48,601	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Efecto de la digestión *in-vitro* sobre la capacidad antioxidante medido por el método ABTS en el jugo comercial.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
Jugo Comercial ABTS	3	2850714	950238	1323,60	0,000
Error	8	5743	718		
Total	11	2856457			

Resumen del modelo

S= 26,7940 R-cuad= 99,80% R-cuad. (ajustado) 99,72%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Jugo Comercial ABTS	N	Media	Agrupación
Digestión Gástrica	3	1572,8	A
Fase Inicial	3	1133,7	B
Sin Dializar	3	737,8	C
Dializada	3	252,73	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Efecto de la digestión *in-vitro* sobre la capacidad antioxidante medido por el método ABTS en el jugo comercial enriquecido

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
JC+Adición ABTS	3	5324990	1774997	613,39	0,000
Error	8	23150	2894		
Total	11	5348140			

Resumen del modelo

S= 53,7934 R-cuad.= 99,57% R-cuad. (ajustado)= 99,40%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

JC+Adición ABTS	N	Media	Agrupación
Digestión Gástrica	3	2433,80	A
Fase Inicial	3	2052,6	B
Sin Dializar	3	1151,3	C
Dializada	3	779,3	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Efecto de la digestión *in-vitro* sobre la capacidad antioxidante medido por el método FRAP en el jugo comercial.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
Jugo Comercial FRAP	3	110,015	36,6716	50,63	0,000
Error	8	5,795	0,7244		
Total	11	115,810			

Resumen del modelo

S= 0,851096 R-cuad.= 95,00% R-cuad.(ajustado)= 93,12%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Jugo Comercial FRAP	N	Media	Agrupación
Fase Inicial	3	16,646	A
Digestión Gástrica	3	12,067	B
Sin Dializar	3	11,363	B
Dializada	3	8,167	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Efecto de la digestión *in-vitro* sobre la capacidad antioxidante medido por el método FRAP en el jugo comercial enriquecido.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
JC+Adición FRAP	3	2445,20	815,068	8623,99	0,000
Error	8	0,76	0,095		
Total	11	2445,96			

Resumen del modelo

S= 0,307427 R-cuad= 99,97% R-cuad.(ajustado)= 99,96%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

JC+Adición FRAP	N	Media	Agrupación
Digestión Gástrica	3	50,334	A
Fase Inicial	3	46,064	B
Sin Dializar	3	25,572	C
Dializada	3	15,7668	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.