UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Encapsulación de antioxidantes provenientes de subproductos alimentarios

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Celi Bonilla, Xavier Eduardo

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

Mg. Sc.

Jorge Geovanny Figueroa Hurtado

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÒN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Encapsulación de antioxidantes provenientes de subproductos alimentarios” realizado por Xavier Eduardo Celi Bonilla ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Diciembre del 2016.

f)……

Mg. Sc. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado

C.I: ……

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Xavier Eduardo Celi Bonilla declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Encapsulación de antioxidantes provenientes de subproductos alimentarios de la Titulación de Bioquímica Y Farmacia, siendo Mg. Sc. 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”.

Loja, Diciembre del 2016

F: ……..

Celi Bonilla Xavier Eduardo

C.I: 1104627045

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme día a día y ser mi guía constante para no claudicar en la culminación de este trabajo.

A mis padres, por su apoyo y comprensión en especial a mi madre por su sacrificio constante y sobre todo por siempre creer en mí.

A mis hermanos Cristian y Jeymmi por brindarme su cariño y su apoyo incondicional.
A mi novia Tania por apoyarme y acompañarme a lo largo de esta travesía.

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradezco a Dios y a la Virgencita por las bendiciones derramadas hacia mi persona para permitirme cumplir con una de mis metas trazadas.

A mi director de tesis Mg. Sc. Geovanny Figueroa Hurtado, que supo compartir sus conocimientos y experiencia, para poder culminar este trabajo de la mejor manera, gracias también por la paciencia, confianza y su predisposición en ayudarme.

A los Ingenieros: María Del Cisne Guamán y Ruth Martínez, por su colaboración como miembros del jurado de tesis, que han sabido guiar esta investigación con sus observaciones y sugerencias, por su tiempo y dedicación.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por permitirme ser parte de la misma y poder cumplir una de mis metas, al personal docente por aportar sus conocimientos en el transcurso de mi vida estudiantil.

A mi familia, por apoyarme día a día y creer siempre en mí.
A mis amigos que estuvieron en el transcurso de este camino.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN ii
DEDICATORIA iv
AGRADECIMIENTO v
ÍNDICE DE TABLAS viii
ÍNDICE DE GRÁFICAS viii
ÍNDICE DE FIGURAS viii
ÍNDICE DE ANEXOS ix
NOMENCLATURA x
RESUMEN 1
ABSTRACT 2
INTRODUCCIÓN 3
1. MARCO TEÓRICO 5
1.1. Naranja, tipos y variedades 6
1.2. Aprovechamiento de subproductos 6
1.3. Digestión gastrointestinal *in vitro* 7
1.4. Encapsulación de antioxidantes 7
1.4.1 Agentes encapsulantes. 9
1.4.2 Propiedades de la maltodextrina como agente encapsulante. 9
1.4.3 Estabilidad del encapsulado. 10
1.4.3.1 Humedad. 11
1.5. Antioxidantes 11
1.5.1 Determinación de la capacidad antioxidante. 12
1.5.2 ABTS. 12
1.5.3 DPPH. 12
1.5.4 FRAP. 13
1.6. Fenoles totales 14
2. DISEÑO METODOLÓGICO 15
2.1 Proceso de la investigación 16
2.2 Humedad 17
2.3 Digestión gastrointestinal *in vitro.* 17
2.4 Fenoles totales 19
2.5 ABTS 20

2.6 DPPH 20
2.7 FRAP 20
2.8 Análisis estadístico 24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 25
3.1 Humedad 26
3.2 Fenoles totales 27
3.3 Capacidad secuestrante de radicales libres por el método ABTS 29
3.4 Capacidad secuestrante de radicales libres por el método DPPH 31
3.5 Poder antioxidante de reducción férrica FRAP 33
CONCLUSIONES 37
RECOMENDACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS 38
BIBLIOGRAFÍA 39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y características de algunos métodos de encapsulación. 8
Tabla 2. Ventajas y desventajas de la encapsulación por el método de secado por atomización 9
Tabla 3. Factores que afectan la estabilidad. 10
Tabla 4. Contenido de humedad del encapsulado 26

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Representación gráfica de la estabilidad del contenido de fenoles totales del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante Folin - Ciocalteu. 27
Gráfica 2. Representación gráfica de la estabilidad de la capacidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante ABTS. 30
Gráfica 3. Representación gráfica de la estabilidad de la capacidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante DPPH 32
Gráfica 4. Representación gráfica de la estabilidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante FRAP. 34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Naranja variedad Valencia 6
Figura 2. Reacción de color del ABTS 12
Figura 3. Reacción de color del DPPH 13
Figura 4. Reacción de color FRAP 13
Figura 5. Proceso de la investigación 16
Figura 6. Procedimiento de la Digestión Gastrointestinal *in vitro* 18
Figura 7. Determinación del contenido de fenoles totales 19
Figura 8. Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS 21
Figura 10. Determinación de la capacidad antioxidante por FRAP 23

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Humedad del Encapsulado 48
Anexo 2. Datos de cuantificación de fenoles totales 51
Anexo 3. Datos de cuantificación de ABTS 56
Anexo 4. Resultado del diseño experimental 59

NOMENCLATURA

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)
aprox	Aproximadamente
C_f	Concentración final
C_o	Concentración inicial calculada con la ecuación de la recta
C_{oin}	Concentración de la muestra sin dializar
CV	Coeficiente de variación
d.d	Destilada
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DV	Desviación estándar
ET	Equivalente de Trolox
EAG	Equivalente a ácido gálico
FD	Fase dializada
$FeCl_36H_2O$	Cloruro férrico hexahidratado
FG	Fase gástrica
FRAP	Capacidad de reducción férrica del ion
FSD	Fase sin dializar
g	Gramo
H	Hora
H_2O	Agua
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
$K_2S_2O_8$	Persulfato de potasio
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitro
N	Normal
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
PROM	Promedio
rpm	Revoluciones por minuto
SM	Solución madre

ST	Solución de trabajo
T	Temperatura
TPTZ	2, 4, 6 – tripiridil-s-triazina
µL	Microlitro
µmol	Micromoles
V_B	Volumen de hidróxido de sodio requerido
V_{FG}	Volumen final digestado - fase gástrica
V_{FD}	Volumen final digestado - fase dializada
V_{FSD}	Volumen final digestado – fase sin dializar
V_m	Volumen de muestra inicial
W	Peso

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la estabilidad tanto de la actividad antioxidante como del contenido de fenoles totales de extractos encapsulados de subproductos de naranja sometidos al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* durante ocho semanas de almacenamiento. En todos los tratamientos luego de la fase de digestión gástrica se presentó un incremento en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante. Sin embargo, en la fase dializada estos valores disminuyeron aproximadamente a la mitad respecto a la concentración antes de la digestión *in vitro*. Además se pudo apreciar que en la semana ocho el porcentaje de estabilidad presentó una disminución del 27 % en ABTS, y 49 % en DPPH, sin embargo para FRAP existió un aumento del 16 % respecto a la semana de inicio. La estabilidad del contenido de fenoles totales de la fase dializada mostró diferencia significativa entre la semana de inicio y la semana cuatro disminuyendo un 41 %, entre la semana cuatro y ocho no existió diferencia significativa.

Palabras clave: digestión gastrointestinal *in vitro,* biodisponibilidad de antioxidantes, ABTS, DPPH, FRAP.

ABSTRACT

In the present investigation, it was evaluated the stability of an antioxidant content of total phenols of extracts encapsulated of orange sub products subjected to the process of *in vitro* gastrointestinal digestion during eight weeks of storage. In all treatments after the stage of gastric digestion, an increase was presented in the content of total phenol compounds and their antioxidant capacity. However, in the dialyzed phase these values decreased to approximately the half with regard to the concentration before the ingestion *in vitro.* In addition it was possible to observe that in the eighth week the percentage of stability a decrease of 27% in ABTS, and 49 % in DPPH; however, for FRAP there was an increase of 16 % compared to the week of initiation. The stability of the content of total phenols dialyzed showed a significant difference between the week of initiation and the fourth week decreasing by a 41 %. Nevertheless, between the week fourth and the eighth, there was not any significant difference.

KEY WORDS: *in vitro* gastrointestinal digestion, bioavailability of antioxidants, ABTS, DPPH, FRAP.

INTRODUCCIÓN

Los cítricos representan el cultivo más abundante del mundo, debido a que la producción mundial de naranjas se estima que es de 88 $x10^6$ toneladas, de las cuales el 82 % son destinadas a procesos de industrialización para la obtención de jugos, mermeladas y conservas (Marín, Soler-Rivas, Benavente-García, Castillo & Pérez-Álvarez, 2007). En estos procesos se generan grandes cantidades de subproductos tales como cáscara, pulpa agotada y semillas que representan el 50 % de la masa del fruto (Izquierdo & Sendra, 2003), y la eliminación de estos representa un problema creciente puesto que el material vegetal es propenso al deterioro microbiano, lo que limita su uso posterior (Alzate T et al., 2016).

La naranja variedad Valencia es la más cultivada en todo el mundo a causa de su riqueza en altos contenidos de azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa), ácidos (cítrico y málico), pectinas, vitamina C, carotenoides y fitonutrientes como flavonoides cítricos, antocianinas, ácidos hidroxámicos y una variedad de polifenoles. (El-Otmani, Ait-Oubahou & Zacarías, 2011). Además Peterson et al. (2006) indican que los subproductos como: pulpa agotada, albedo y flavedo poseen compuestos fenólicos.

Las propiedades promotoras de la salud de los compuestos fenólicos de la dieta dependen de su bio-disponibilidad, lo que en última instancia depende de su estabilidad a la digestión gastrointestinal (Apea-Bah, Minnaar, Bester & Duodu, 2016). Existen métodos *in vitro* que permiten evaluar la bioaccesibilidad de compuestos con actividad biológica de los alimentos durante la fase gástrica y la fase intestinal (Bouayed, Hoffmann & Bohn, 2011; Rodríguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez & Martín-Belloso, 2013).

La preservación de las propiedades de los polifenoles depende de su estabilidad digestiva frente a diferentes condiciones de temperatura, pH y enzimas, así como también de distintos parámetros de procesamiento y almacenamiento, ésta última en las que se debe tener en cuenta las condiciones fisicoquímicas como la humedad y actividad de agua, pueden disminuir por la encapsulación (Ceballos, Giraldo & Orrego, 2012), en vista de que es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas de los alimentos (sabores, vitaminas, aceites esenciales, antioxidantes) se introducen en una matriz o se encierran en una pared con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación a causa de la presencia de luz o del oxígeno (Fang & Bhandari, 2010), una ventaja adicional es que a un compuesto encapsulado se lo puede someter a modelos experimentales que simulen las

condiciones gastrointestinales tanto en medios ácidos como en presencia de enzimas, para comprobar la liberación y viabilidad de los compuestos fenólicos (Jiménez & Roldán, 2013)

La estabilidad del encapsulado ante la digestión gastrointestinal *in vitro,* se puede determinar mediante la evaluación de la actividad antioxidante empleando distintos métodos que se caracterizan por ser sistemas generadores de radicales libres los mismos que reaccionan con la muestra para determinar el efecto antioxidante mediante FRAP, ABTS, DPPH (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & Robards, 2002; Medina-Torres et al., 2016) y fenoles totales.

La presente investigación tiene como propósito evaluar la estabilidad antioxidante de extractos encapsulados de subproductos de naranja *Citrus sinensis* (L.) sometidos a una digestión gastrointestinal y su comportamiento durante el almacenamiento. Este documento está dividido en tres capítulos, en el capítulo uno Marco Teórico se refiere a las bases teóricas y definición de términos básicos que sustentan el desarrollo adecuado del trabajo. En el capítulo dos Diseño Metodológico, se detalla los diferentes reactivos y metodologías empleadas. En el capítulo final, se describe los resultados obtenidos, su interpretación y comparación con estudios previos.

Un inconveniente que se encontró durante el desarrollo de la investigación, fue la necesidad de ajustar el pH antes de cuantificar la capacidad antioxidante mediante el método ABTS. Al final de esta investigación se pudo apreciar que la estabilidad de la capacidad antioxidante del encapsulado se mantuvo constante hasta la cuarta semana, y la estabilidad del contenido de fenoles totales no mostró una diferencia significativa entre la semana cuatro y ocho.

.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Naranja, tipos y variedades

La naranja ocupa un lugar destacado en la industria alimentaria por su buen potencial productivo (Pérez, Becerra & Medina, 2005). Según cifras de la FAO (2015) para el año 2014 la producción fue de 59 millones de toneladas, siendo Brasil el principal productor con 19 millones de toneladas producidas en el año 2014. Entre las variedades tradicionalmente cultivadas en todo el mundo, Valencia *Citrus sinensis* (L.) **(Figura 1)**, es la especie vegetal con mayor importancia económica alrededor del mundo porque se caracteriza por tener un alto volumen de jugo, de color excelente y buen sabor (aunque a veces puede ser ligeramente ácido) (Roussos, 2016). Ésta a su vez es considerada una gran fuente de fitoquímicos, vitaminas C y compuestos bioactivos (Islam, Kitamura, Yamano & Kitamura, 2016).

Figura 1. Naranja variedad Valencia
Fuente: El autor
Elaborado: El autor

1.2. Aprovechamiento de subproductos

En los últimos años los zumos de fruta han sufrido un creciente interés, dado que en las zonas tropicales y subtropicales predomina la producción y consumo de zumos de cítricos específicamente de naranja, su consumo implica la generación de gran cantidad de subproductos como pulpa agotada y semillas que constituyen aproximadamente el 45 - 60 % de la fruta el uso de estos es actualmente de interés, desde el punto de vista de la reducción de residuos debido a su contenido de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aminoácidos, proteínas, minerales, aceites y lípidos, además contienen antioxidantes y vitaminas (Fernández-López et al., 2009). Todos estos componentes se encuentran en diferentes cantidades dependiendo de la fracción de la fruta (Gorinstein et al., 2001).

1.3. Digestión gastrointestinal *in vitro*

La evaluación *in vivo* de la biodisponibilidad de los nutrientes por el análisis del contenido intestinal lleva a resultados difíciles de interpretar, porque los productos de digestión son rápidamente absorbidos por el intestino, además estos métodos se caracterizan por ser lentos y costosos. Con el objetivo de facilitar estos ensayos se han desarrollado numerosos métodos de determinación de la digestibilidad *in vitro*, que son más rápidos, reproducibles, baratos, y útiles para la evaluación de un gran número de muestras (Safiyé, 2013). Este consiste en la utilización de pepsina en la fase gástrica y una mezcla de sales de pancreatina y biliares durante el tracto intestinal, el elemento difundido a través de una membrana semipermeable en la fase intestinal se utiliza como una medida de bio-accesibilidad (Silva de Lima et al., 2014).

1.4. Encapsulación de antioxidantes

La encapsulación está tomando cada vez mayor importancia en diversas industrias alimentarias en vista de que es una técnica que permite atrapar un compuesto activo en partículas, cuyo objetivo principal es proteger el material del núcleo a partir de las condiciones ambientales adversas, tales como efectos indeseables de la luz, la humedad y el oxígeno, lo que contribuye a un aumento en la vida útil del producto, y promueve una liberación controlada del encapsulado (Madene, Jacquot, Scher & Desobry, 2006). En la industria alimentaria, el proceso de microencapsulación puede aplicarse para una variedad de razones como: (i) la protección del material del núcleo de la degradación por la reducción de su reactividad a su entorno exterior; (Włodarska, Pawlak-Lemańska, Khmelinskii & Sikorska, 2016) (ii) reducción de la velocidad de evaporación o transferencia del material del núcleo al entorno exterior; (iii) modificación de las características físicas del material original para permitir una manipulación más fácil; (iv) para enmascarar un sabor no deseado o el sabor del material de núcleo, (v) para ayudar a separar los componentes de la mezcla que de lo contrario podrían reaccionar con otro (Kashappa & Park, 2005). Ésta técnica se ha empleado para encapsular Ingredientes alimentarios como acidulantes, agentes aromatizantes, edulcorantes, colorantes, lípidos, vitaminas, minerales, enzimas, microorganismos y antioxidantes. En la **Tabla 1** se indican las técnicas químicas y mecánicas (Toublan, 2014) que se emplean para el proceso de encapsulación.

Tabla 1. Clasificación y características de algunos métodos de encapsulación.

TIPO DE TÉCNICA	MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN	TAMAÑO DE PARTÍCULA(μM)
QUÍMICAS	Co-aservación simple	20 - 200
	Co-aservación compleja	5 - 200
	Inclusión molecular	5 - 50
MECÁNICAS	Secado por atomización	1 - 50
	Enfriamiento por atomización	20 - 200
	Extracción	200 - 2000
	Fluidización en lecho	>100

Fuente: (Toublan, 2014)
Elaboración: El autor

La utilización de polifenoles encapsulados en lugar de compuestos libres puede superar los inconvenientes de su inestabilidad, enmascarar sabores desagradables, así como mejorar la biodisponibilidad y la vida media del compuesto (Fang & Bhandari, 2010). Dicha encapsulación se la puede realizar mediante la técnica de secado por aspersión que consiste en la atomización de una solución o suspensión líquida en pequeñas gotas, seguido de secado en una corriente de aire caliente para producir macropartículas sólidas (Di Battista, Constenla, Ramírez-Rigo & Piña, 2015), que se componen de un material de pared (shell) y un núcleo (material encapsulado) (Medina-Torres et al., 2016). El material de revestimiento del encapsulado utilizado en los productos alimentarios debe ser de calidad alimentaria (Poomkokrak, Niamnuy, Choicharoen & Devahastin, 2015). Siendo uno de los encapsulantes más utilizados la maltodextrina, que permite la protección de los compuestos fenólicos (Medina-Torres et al., 2016), reduce la viscosidad y mejora la estabilidad del producto (Oberoi & Sogi, 2015). En la **Tabla 2**. se señalan las ventajas y desventajas de emplear esta técnica para el proceso de encapsulación (Ribeiro et al., 2015). Sormoli y Langrish (2016) mencionan además que el secado por pulverización es una técnica eficaz para el secado de polifenoles sensibles al calor.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la encapsulación por el método de secado por atomización

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Bajo costo de operación	Falta de uniformidad de las cápsulas
Alta calidad de las cápsulas	Limitación en la elección de material encapsulante
Rápida solubilidad de las cápsulas Tamaño pequeño	Producción de polvos muy finos, que necesitan un procesamiento posterior
Alta estabilidad de las cápsulas	No siempre óptimo para materiales sensibles al calor.

Fuente. (Ribeiro et al., 2015)
Elaboración: El autor

1.4.1 Agentes encapsulantes.

En la industria de alimentos se emplean diversos materiales que funcionan como recubrimiento, mejor conocidos como materiales encapsulantes (Flores-Belmont & Jiménez-Munguía, 2013), tradicionalmente la formación de una micro-cápsula requiere que haya incompatibilidad entre la capa y el agente activo, de modo que existirá un revestimiento en la superficie del ingrediente activo (Sobel, Versic & Gaonkar, 2014). El uso de algunos agentes de secado tales como la goma arábiga, maltodextrina y sacarosa conducen a un secado eficaz (Caliskan & Dirim, 2013).

1.4.2 Propiedades de la maltodextrina como agente encapsulante.

Las maltodextrinas son algunos de los agentes de transporte más importantes, principalmente porque forman soluciones de baja viscosidad a altas concentraciones que pueden ser eficientemente secadas por pulverización (Lavelli, Harsha & Spigno, 2016). Además se caracterizan por ser solubles en agua, se utiliza como modificador de textura, sustituto de la grasa, potenciadores de volumen, crioprotectores, agente gelificante, y para extender la vida útil del producto, sobre todo como matriz de encapsulación (Takeiti & Kieckbusch, 2010).

Se la ha utilizado comúnmente para los procesos de secado por pulverización, tales como el secado de aceite de pescado, pigmentos negros de antocianina de zanahoria, hidrolizado de proteínas de la carne de pollo, esencia de mandarina, jugo de manzana de marañón, pulpa de acai, oleorresina Cinnamon, y la oleorresina de cardamomo (Caliskan & Dirim, 2013). Además actualmente, se utilizan sola o en combinación con otros materiales en el procesamiento de alimentos, medicamentos, aditivos aromáticos, carotenoides y vitaminas. Estos compuestos a su vez poseen baja temperatura de transición vítrea, que lleva a la formación de cristales, y que pueden llegar a alterar la integridad estructural, y producir la

aglomeración o aglutinación de micropartículas de polvos (Sansone et al., 2011). Las temperaturas de transición vítrea, están en el rango de 140-180 °C, por lo que se recomienda la adición de maltodextrina a nivel de 50 % (w/w por total de sólido seco) para lograr un efecto significativo sobre la transición vítrea (Roos, Maidannyk & Nurhadi, 2016).

1.4.3 Estabilidad del encapsulado.

Un encapsulado consta de un material activo recubierto o incrustado en una membrana protectora o agente encapsulante de origen polimérico, la funcionalidad del material encapsulado y las propiedades fisicoquímicas está en función de las propiedades de la membrana protectora, las que a su vez también dependen de la interacción entre los biopolímeros y otros ingredientes que lo constituyen, así como también de su estructura y de los mecanismos difusivos que puedan darse a través de esta (Carrillo, Cruz, Barrera & Pérez, 2010). En la **Tabla 3** se indican algunos factores que afectan la estabilidad del encapsulado (Lee, Lee & Donovan, 2014).

Tabla 3. Factores que afectan la estabilidad.

FACTORES QUE AFECTAN ESTABILIDAD DE LA PARED	FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DEL NÚCLEO
La Morfología de la Superficie y características	Luz
Tamaño de partícula	El pH
Contenido de humedad	La temperatura
Actividad de agua	El oxígeno

Fuente: (Lee et al., 2014)
Elaboración: El autor

Se han desarrollado métodos *in vitro* que son muy útiles para la evaluación de los efectos de factores tales como; la matriz de los alimentos, las condiciones de digestión o la interacción con otros compuestos sobre la estabilidad y las propiedades de los polifenoles que pueden afectar a su bioaccesibilidad y destino metabólico definitivo (Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán & García-Conesa, 2007).

1.4.3.1 Humedad.

Los ensayos de las humedades pueden ser uno de los análisis más importantes llevados a cabo sobre un producto alimentario y, a pesar de todo, uno de los más difíciles a la hora de obtener datos exactos y precisos, este valor analítico es de gran importancia económica para un fabricante de alimentos (Nielsen, 1998).

En la industria de microencapsulados se requiere de un control riguroso que garantice productos de alta calidad al consumidor, uno de los principales indicadores de calidad es la humedad, que es un factor determinante de la vida útil del encapsulado, para determinar el contenido de humedad de los microencapsulados se puede aplicar los siguientes métodos: Karl Fisher, técnica de destilación azeotrópica y secado en estufa a presión atmosférica o vacío (Reineccius, 2004).

El contenido de humedad de un producto microencapsulado se expresa como un porcentaje que van de 0 a 100 %, ésta variará en gran medida dependiendo de las temperaturas de transición vítrea (Tg) de la matriz, generalmente en el proceso de microencapsulación el contenido de humedad está entre 1 y 6 % (Lee et al., 2014).

1.5. Antioxidantes

Los antioxidantes pueden ser definidos como sustancias que, cuando están presentes en los alimentos, inhiben la oxidación y reducen el deterioro de los alimentos (Shahidi, 2015). Según Morais et al. (2015) las frutas proporcionan una fuente importante de antioxidantes que a su vez exhiben propiedades, antiinflamatorias y antitrombóticas.

Un problema importante en una amplia gama de industrias alimentarias es la tasa de oxidación de diferentes productos alimenticios, este fenómeno se puede evitar o retardar por medio de antioxidantes, ya sean estos sintéticos o naturales, los antioxidantes sintéticos no son ampliamente utilizados por razones toxicológicas, a causa de esto el interés por los compuestos naturales está en constante aumento (Włodarska et al., 2016). En este sentido, los subproductos cítricos podrían ser interesantes por su capacidad antioxidante y contenido de vitaminas, así como otros compuestos bioactivos asociados, tales como flavonoides y terpenos que exhiben propiedades antioxidantes interesantes (Garau, Simal, Rossell & Femenia, 2007).

1.5.1 Determinación de la capacidad antioxidante.

Una variedad de métodos se han utilizado para evaluar la capacidad antioxidante ya sea *in vivo* o *in vitro.* Los más usados son, (FRAP) basado en la capacidad de reducción férrica, (DPPH) 2,2-difenil-1- picrilhidrazil (Włodarska et al., 2016), (ABTS) 2,29–azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (Cerón-Carrasco, Haan, Peña-García, Contreras-García & Pérez-Sánchez, 2016), estos son aplicados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los subproductos de frutas para captar los radicales libres generados (Włodarska et al., 2016).

1.5.2 ABTS.

La generación de ABTS ácido 2,29-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónato radical catiónico, constituye uno de los métodos más importantes que se han aplicado para la medición de la actividad antioxidante total de las soluciones de las sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas. En este método el radical (ABTS) reacciona con el compuesto polifenólico, ocasionando la formación de ABTS incoloro y la oxidación del compuesto fenólico (ver **Figura 2)** (Re et al., 1999), se absorbe a una longitud de onda de 734 nm (Schaich, Tian & Xie, 2015).

.

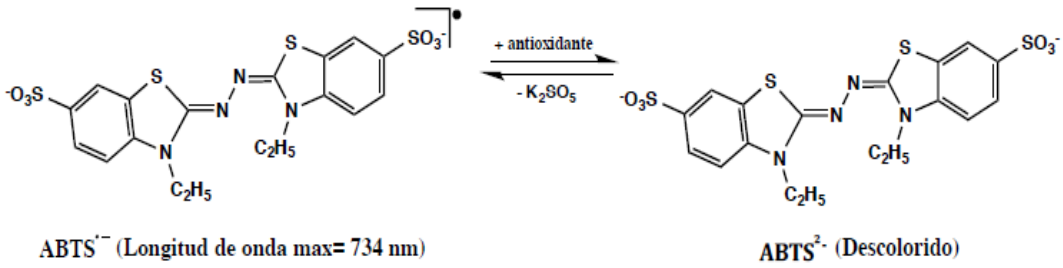


Figura 2. Reacción de color del ABTS
Fuente: (Dejian, Boxin & Prior, 2005)
Elaboración: El autor

1.5.3 DPPH.

Entre los ensayos que miden la capacidad de captación de radicales, el 2,2-difenil-1 picrilhidrazil DPPH es uno de los más utilizados (Musa, Abdullah & Al-Haiqi, 2016), en este método se produce la decoloración de radical cromógeno estable púrpura a su correspondiente amarillo pálido hidracina (ver **Figura 3**), por acción de una sustancia

oxidante, este a su vez se evalúa a una longitud de onda de 515 nm (Karadag, Ozcelik & Saner, 2009)

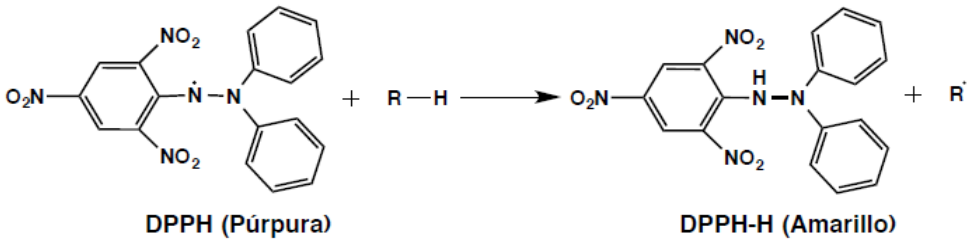


Figura 3. Reacción de color del DPPH
Fuente: (N. Liang & Kitts, 2014)
Elaboración: El autor

DPPH es hidrófoba por lo que sus reacciones se deben ejecutar en disolventes orgánicos como el metanol (Schaich et al., 2015). Además ofrece algunas ventajas debido a que es rápido, sensible, rentable y, utiliza menos reactivos, así mismo se puede almacenar durante un máximo de 6 meses (Musa et al., 2016).

1.5.4 FRAP.

Con este método se evalúa la propiedad antioxidante a partir de una reacción redox (Martins et al., 2013). Se monitorea la reacción de Fe^{+3} a Fe^{+2} con 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (ver **Figura 4**) la misma que estará acompañada de una coloración azul-violeta a 593 nm (Bolanos De La Torre, Henderson, Nigam & Owusu-Apenten, 2015). Se caracteriza por ser una prueba sólida y potencialmente útil, usando reactivos y equipos baratos (Berker, Guclu, Tor & Apak, 2007).

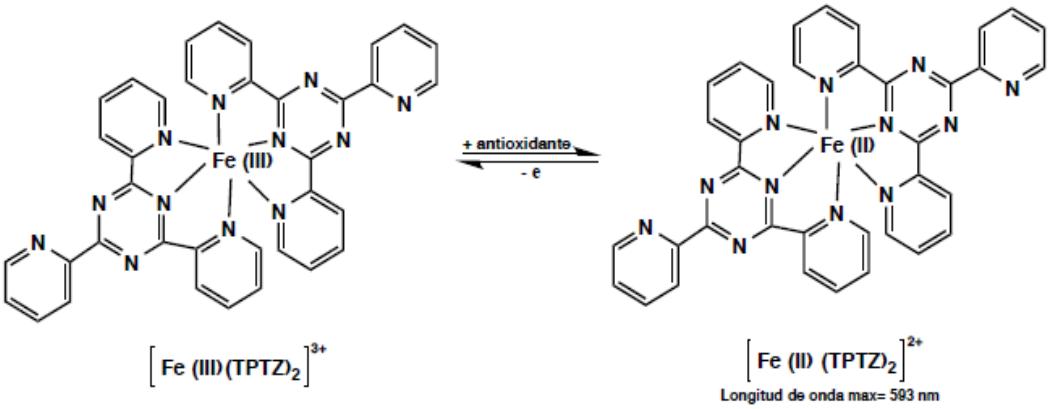


Figura 4. Reacción de color FRAP
Fuente: (Dejian et al., 2005)
Elaboración: El autor

1.6. Fenoles totales

Para este análisis se utiliza Folin-Ciocalteu, que se utiliza ampliamente para determinar los fenoles totales (Włodarska et al., 2016). Es un método colorimétrico que permite el análisis de compuestos orgánicos que se han hidroxilado a anillos aromáticos. El método es sensible y permite la medición del contenido de compuesto fenólicos, teniendo en cuenta que estos reaccionan al reactivo Folin-Ciocalteu, dando como resultado una coloración azul que se puede determinar espectrofotométricamente a 750 nm el ácidos gálico o caféico a menudo se utilizan como patrones de referencia (Velázquez et al., 2015).

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1 Proceso de la investigación

Se usó naranja (*Citrus sinensis* L) variedad Valencia, proveniente de la región costa del Ecuador, en la **Figura 5** se indica la proceso de la investigación.

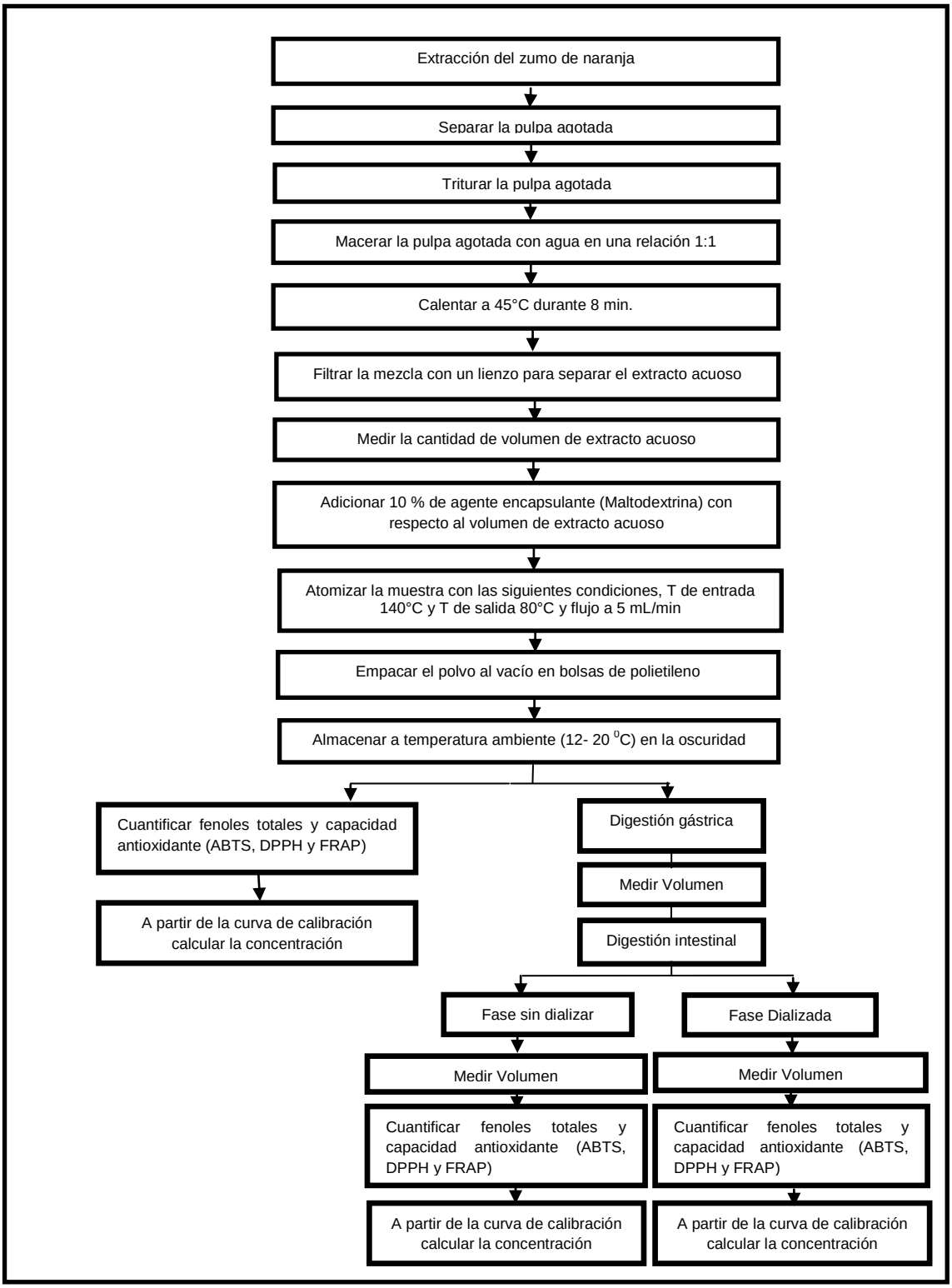


Figura 5. Proceso de la investigación
Fuente: El autor
Elaboración: El autor

Se evaluó la estabilidad antioxidante de las muestras durante un periodo de almacenamiento de ocho semanas, realizando el proceso de digestión *in vitro* y cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante en las semanas cero, cuatro y ocho.

2.2 Humedad

La determinación de humedad se realizó de acuerdo al método 934.06 de la AOAC con modificaciones. En este método se pesó 0,5 g de polvo encapsulado en una cápsula previamente secada y se coloca en una estufa a $105^0C \pm 1^0C$ por un tiempo estimado entre 2 – 3 horas, pasado este tiempo la muestra es retirada de la estufa para colocarla en un desecador por 30 minutos, dicho procedimiento se realiza continuamente hasta alcanzar un peso constante (1mg de diferencia mínimo entre el peso anterior y el actual). Los resultados se obtuvieron por pérdida de peso y se expresaron como la media ± desviación estándar de tres réplicas. Mediante la siguiente fórmula se determinó la humedad y los resultados se indican en el **Anexo 1.**

$$\textbf{\% Humedad} = \left[1 - \left(\frac{W final - W\ cápsula}{W\ muestra}\right)\right] * 100 \quad \textbf{(Ecuación 1)}$$

DONDE:

W_{final} **:** Peso final de la cápsula más muestra

$W_{cápsula}$ **:** Peso de la cápsula vacía

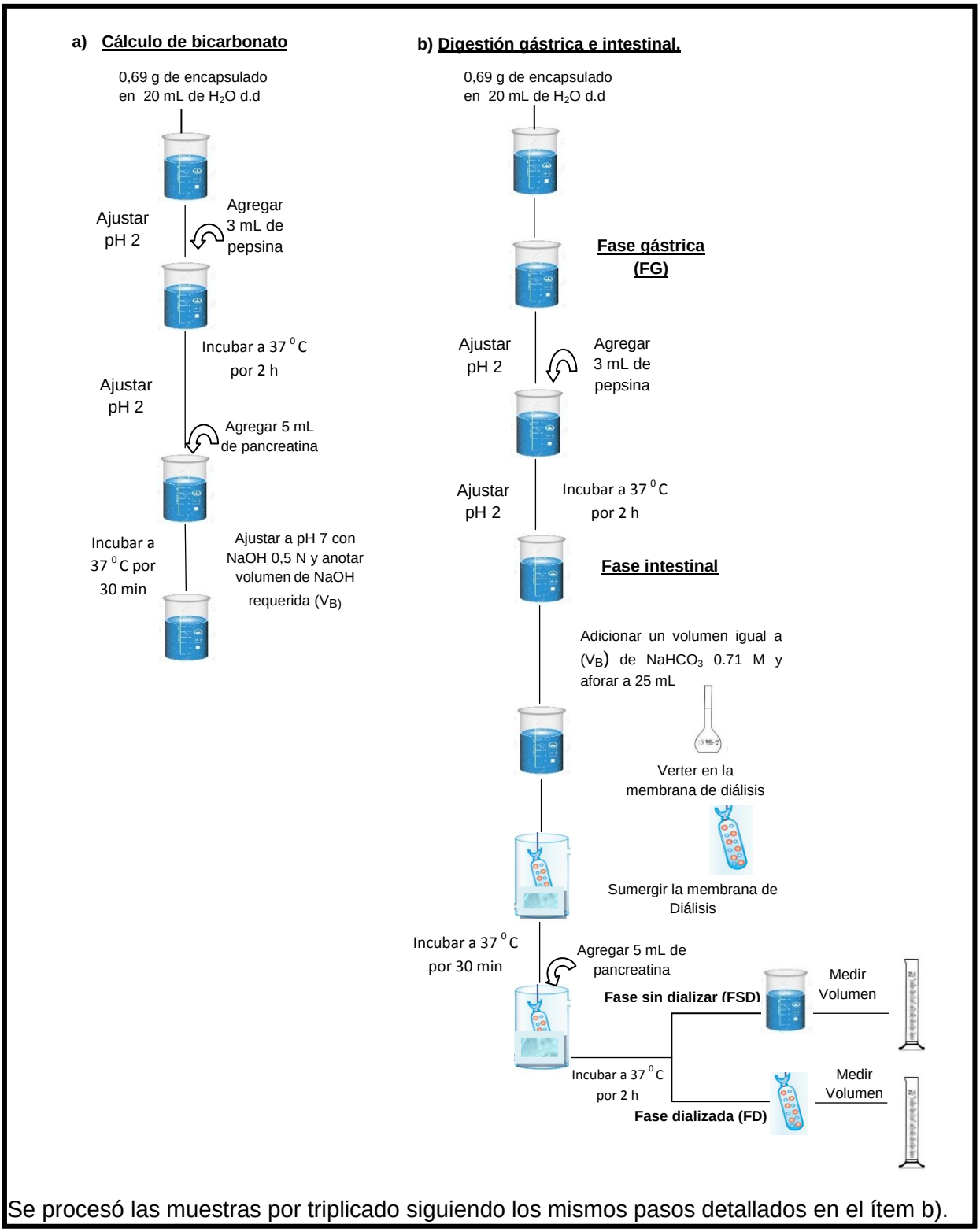
$W_{muestra}$ **:** Peso de la muestra

2.3 Digestión gastrointestinal *in vitro.*

La metodología de la simulación gastrointestinal *in vitro*, se realizó según lo descrito por Miller, Schricker, Rasmussen y Van Campen (1981), con algunas modificaciones efectuadas por Gil-Izquierdo, Zafrilla y Tomás (2002).

Las enzimas digestivas utilizadas fueron preparadas justo antes de aplicar este método. El procedimiento de la fase gástrica (FG), el cálculo de la cantidad de bicarbonato de sodio 0,71 M y el procedimiento de la fase intestinal se detalla en la **Figura 6.** Luego se procedió al análisis de fenoles totales y capacidad antioxidante de la fase gástrica (FG) y fase intestinal la misma que se divide en fase sin dializar (FSD) y fase dializada (FD) empleando

los métodos Folin – Ciocalteu, ABTS, DPPH, FRAP, los mismos que se detallan en la **Figuras 7, 8, 9, 10.**



Se procesó las muestras por triplicado siguiendo los mismos pasos detallados en el ítem b).

Figura 6. Procedimiento de la Digestión Gastrointestinal *in vitro.*
Fuente: Gil-Izquierdo et al. (2002).
Elaboración: El autor

2.4 Fenoles totales

El método colorimétrico de Folin Ciocalteu, adaptado por Swain y Hillis (1959) y modificado por Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros y Byrne (2006) se siguió para realizar la determinación del contenido de fenoles totales de las muestras procesadas mediante el método de digestión *in vitro* en las cuáles tenemos la fase gástrica (FG) fase intestinal sin dializar (FSD) y fase intestinal dializada (FD). Los resultados se expresaron como porcentaje de estabilidad. En la **Figura 7** se detalla el procedimiento a seguir para el desarrollo de este método y en el **Anexo 2**. Se detalla un ejemplo del cálculo. En las muestras muy concentradas se realizó dilución con agua.

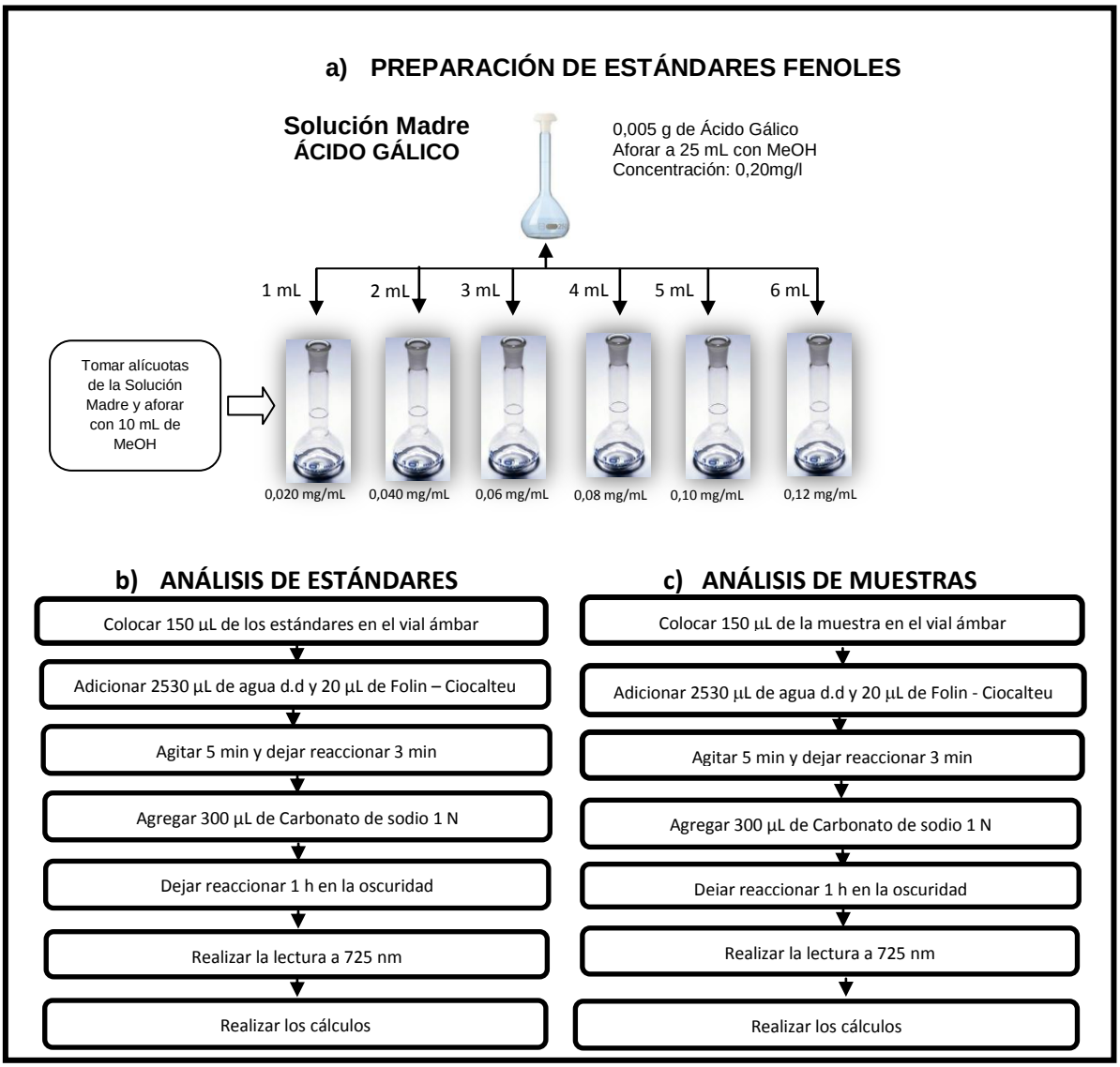


Figura 7. Determinación del contenido de fenoles totales: a) Preparación solución madre; b) Preparación solución trabajo; c) Preparación de estándares; d) Procedimiento para el análisis de estándares; e) Procedimiento para el análisis de la muestra
Fuente: Thaipong et al. (2006)
Elaboración: El autor

2.5 ABTS

Para realizar la determinación de la capacidad antioxidante mediante este método se siguió la metodología descrita por Arnao y Acosta (2001) y ajustada por Thaipong et al. (2006). Para ello se utilizó como estándar para las curvas de calibración el reactivo Trolox cuya pureza es de 97 % y se procedió a medir las absorbancias a 734 nm. Los resultados obtenidos son expresados como porcentaje de estabilidad. En la **Figura 8** se detalla la preparación de la solución madre y solución de trabajo empleados para este método. En las muestras muy concentradas se realizó dilución con agua. En el **Anexo 3** se detalla un ejemplo de cálculo.

2.6 DPPH

La técnica de Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995) con modificaciones de Thaipong et al. (2006). La utilizamos para medir la habilidad de los antioxidantes para capturar el radical DPPH. Se utilizó como estándar para las curvas de calibración el reactivo Trolox y se procedió a medir las absorbancias a 515 nm. Los resultados obtenidos son expresados como porcentaje de estabilidad. En la **Figura 9** se detalla la preparación de la solución madre (Miller et al., 1981), solución de trabajo (Argyri, Komaitis & Kapsokefalou), estándares, y el procedimiento para el análisis de estándares y muestras. En las muestras muy concentradas se realizó dilución con agua.

2.7 FRAP

Para este método se aplicó la metodología de Benzie y Strain (1998) el cual tiene como objetivo determinar la capacidad antioxidante mediante el mecanismo de reducción de metales, con modificaciones descritas por Thaipong et al. (2006). Se utilizó el reactivo Trolox como patrón de referencia y se midió las absorbancias a 593 nm. Los resultados obtenidos son expresados como porcentaje de estabilidad. En la **Figura 10** se detalla la preparación de los reactivos, solución trabajo (ST), preparación de estándares y el procedimiento para el análisis de estándares y muestras. En las muestras muy concentradas se realizó dilución con agua.

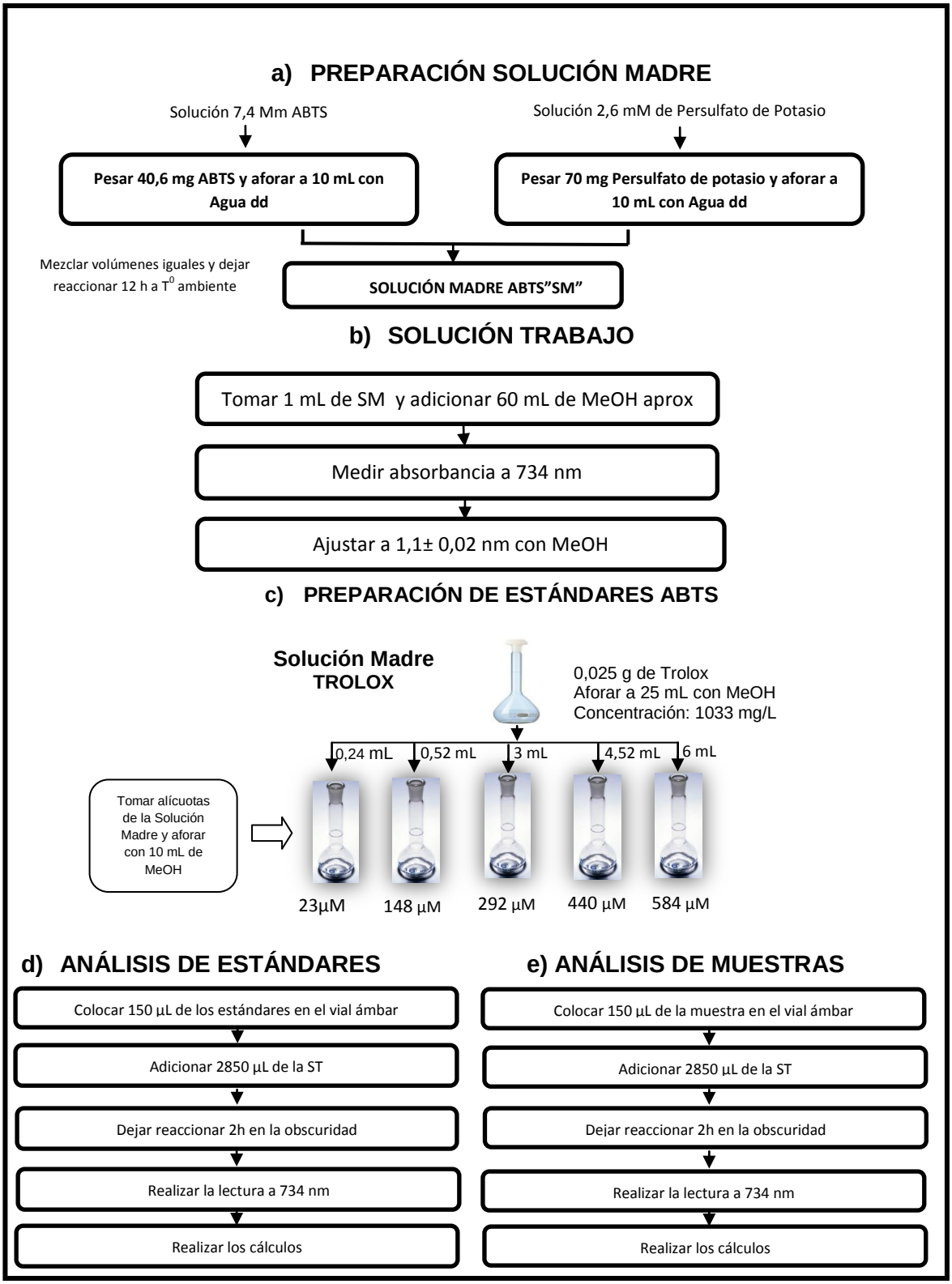


Figura 8. Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS: a) Preparación solución madre; b) Preparación solución trabajo; c) Preparación de estándares; d) Procedimiento para el análisis de estándares; e) Procedimiento para el análisis de la muestra
Fuente: Thaipong et al. (2006)
Elaboración: El autor

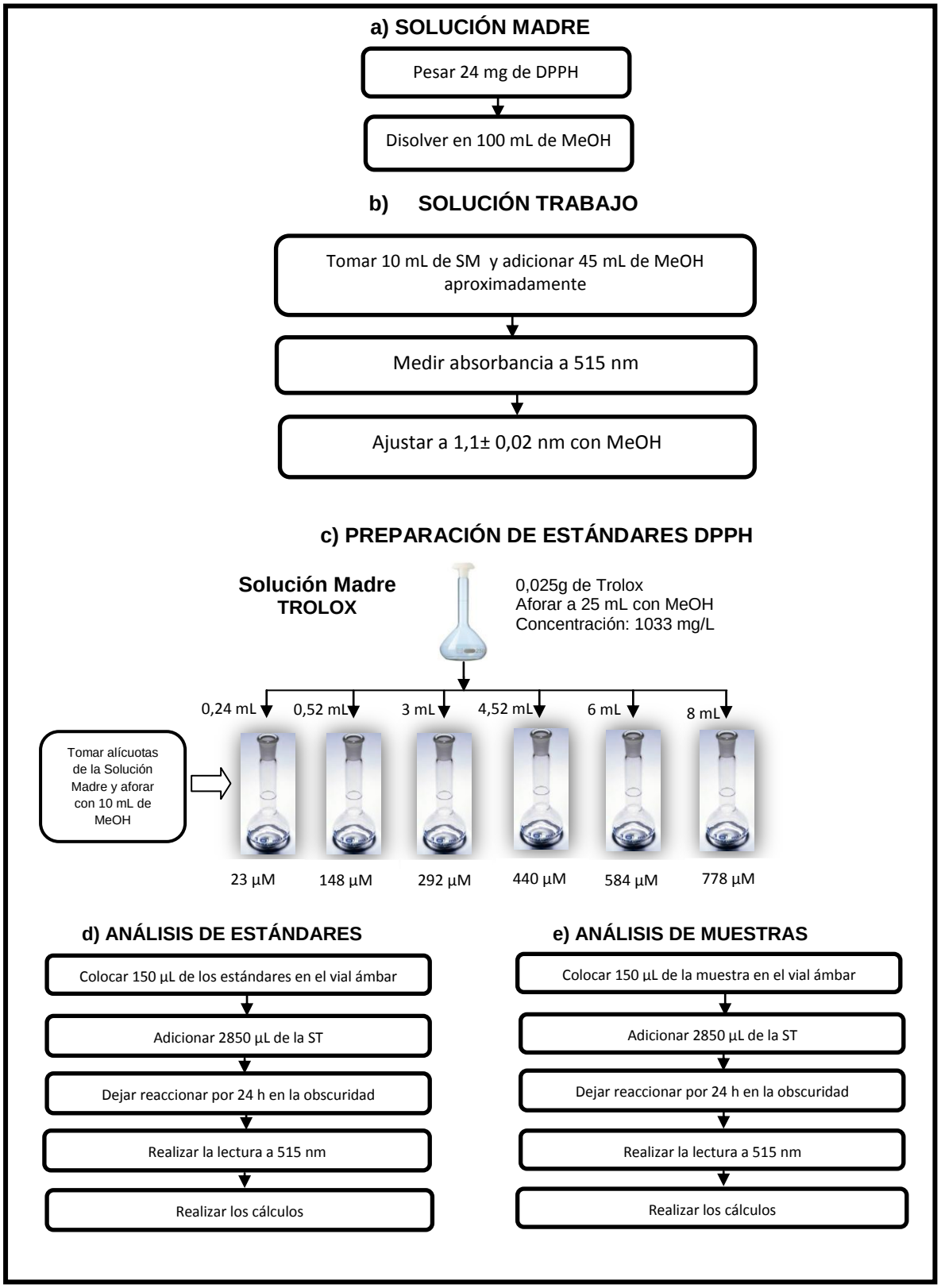


Figura 9. Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH: a) Preparación de la solución madre, b) Solución Trabajo para DPPH, c) Preparación de estándares, d) Análisis de estándares, e) Análisis de muestras.

Fuente: Thaipong et al. (2006)

Elaboración: El autor

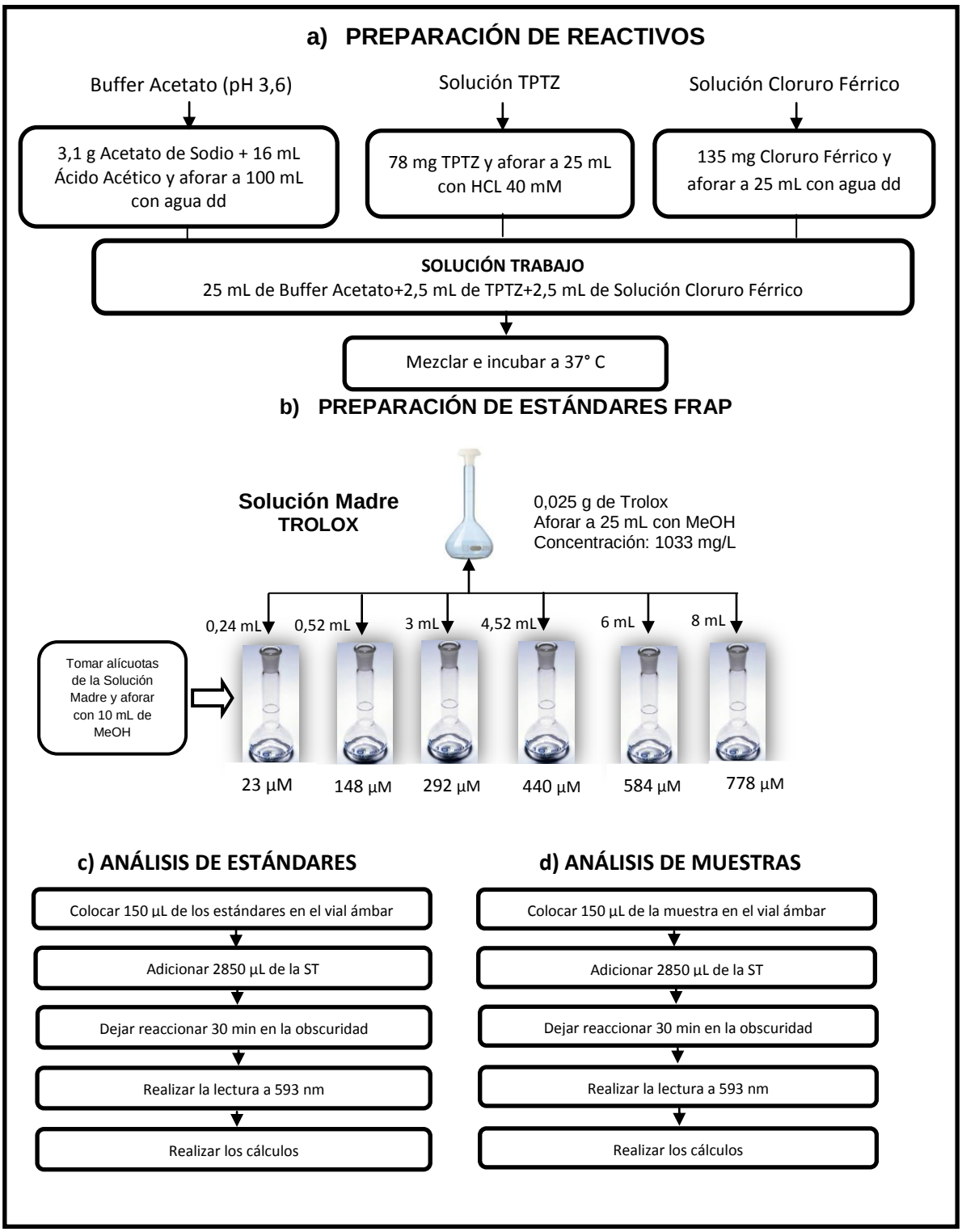


Figura 10. Determinación de la capacidad antioxidante por FRAP: a) Preparación de reactivos para FRAP; b) Preparación de estándares; c) Procedimiento para el análisis de estándares; d) Procedimiento para el análisis de muestras.
Fuente: Thaipong et al. (2006)
Elaboración: El autor

2.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la estabilidad de la capacidad antioxidante y fenoles totales se expresaron como media ± desviación típica y fueron analizados estadísticamente a través del programa Minitab 16, mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de un test de rango múltiple (Tukey), con nivel de confianza del 95 %, para determinar si existió diferencia significativa de la estabilidad de compuestos antioxidantes entre las fases de la digestión gastrointestinal *in vitro* en cada una de las semanas evaluadas **Anexo 4.**

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Humedad

El polvo encapsulado del subproducto de naranja al ser almacenado a una temperatura de 12 – 20 ^{0}C durante ocho semanas presentó una humedad comprendida entre 0,3 a 0,74 % ($p < 0.05$), los mismos que se indican en la **Tabla 4**, se puede observar que existió una variación del porcentaje de humedad en un 0,4 % y 0,3 % para la semana cuatro y ocho respecto a la semana de inicio. Lee et al. (2014) mencionan que el contenido de humedad varía dependiendo de la temperatura y que generalmente en el proceso de microencapsulación el contenido de humedad está entre 1 y 6%, de esta manera se indica que el contenido de humedad del encapsulado se mantuvo estable.

Tabla 4. Contenido de humedad del encapsulado

SEMANA	HUMEDAD (%)
0	$0,3 \pm 0,04^{c}$
4	$0,74 \pm 0,04^{a}$
8	$0,6 \pm 0,04^{b}$

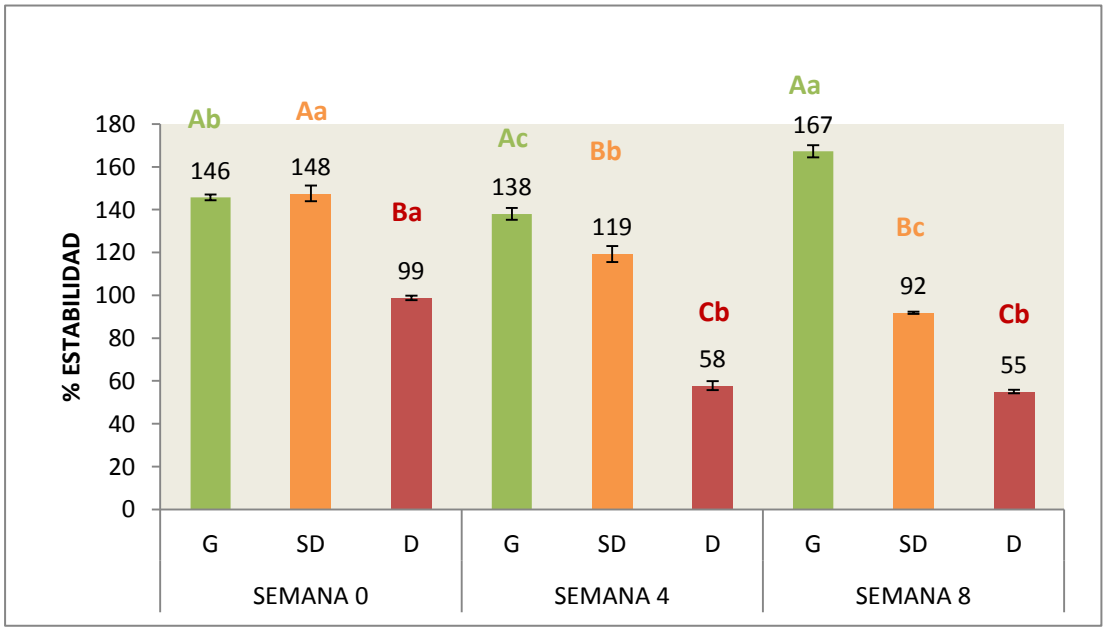
Cada valor es la media con la desviación estándar de tres réplicas. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes**.**
Fuente. El autor
Elaboración: El autor

En un estudio realizado por Patthamakanokporn, Puwastien, Nitithamyong y Sirichakwal (2008) en el que evaluaron los cambios de la actividad antioxidante en base seca de varias frutas como guayaba, papaya, plátano y dos frutos indígenas makiang y maluod durante tres meses de almacenamiento a -20 ° C indican que el porcentaje de humedad para la semana cuatro se incrementó un 1,9 % y para la semana ocho 1,8 %. Basándonos en estos resultados se puede indicar que el porcentaje de humedad del encapsulado no se incrementó de manera drástica en las semanas analizadas. Esto puede ser a causa de que las muestras encapsuladas se almacenaron en bolsas de polietileno extrayendo el aire presente.

3.2 Fenoles totales

En la **Gráfica 1** se indica el porcentaje de estabilidad del contenido de fenoles totales del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante el método Folin – Ciocalteu.

Durante la semana cero el porcentaje de estabilidad aumento un 46 % en la fase gástrica (FG) con respecto al inicial, este aumento se debe a que el proceso de digestión afecta directamente a la composición de los extractos en función de la simulación de las condiciones fisiológicas y la secuencia de eventos en el tracto gastrointestinal (Pavan, Sancho & Pastore, 2014). De igual forma en un estudio realizado por Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini y Conte (2010) en el que evaluaron la bio-accesibilidad y la actividad antioxidante de los polifenoles de uva demostraron que la cantidad de polifenoles bio-accesibles (antocianinas) aumentaron durante la digestión gástrica un 40,8 % con respecto al inicial.



La fase gástrica está representada por (G) y las fases de la fase intestinal sin dializar (SD) y dializada (D). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa de la estabilidad de la actividad antioxidante en las diferentes etapas de la digestión para cada una de las semanas evaluadas. Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa del porcentaje de estabilidad para cada etapa de digestión entre las semanas evaluadas.

Gráfica 1. Representación gráfica de la estabilidad del contenido de fenoles totales del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante Folin – Ciocalteu.

En lo que respecta a la fase intestinal, se puede apreciar que la fase sin dializar (FSD) de la semana cero no presentó un porcentaje de estabilidad significativamente diferente ($p > 0,05$)

a la FG, similares resultados se encontraron en el estudio realizado por Vallejo, Gil-Izquierdo, Pérez-Vicente y García-Viguera (2004) en el que determinaron la estabilidad química de los compuestos de brócoli en condiciones fisiológicas simuladas, indicando que en la FG no existió ningún efecto sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos. Contrariamente estudios realizados por Wu, Teng, Huang, Xia y Wei (2015) indican que el 56 % de polifenoles se perdieron durante la transición desde el entorno gástrico ácido a la intestinal alcalina.

En tanto que la FD presentó una disminución del 33 % ($p > 0.05$) con respecto a FSD, y una estabilidad del 99 % respecto a la concentración sin dializar. Según Bermúdez-Soto et al. (2007) indican que la estabilidad se ve afectada, por factores tales como: volumen, composición del tampón utilizado, concentraciones de azúcar en la muestra y la capacidad de ciertas moléculas para unirse con la membrana de diálisis. Bouayed et al. (2011) determinaron que para la manzana mutsu la cantidad de fenoles en la FD disminuyó un 20 % con respecto a la FSD mediante extracciones con metanol, otro estudio realizado por Vallejo et al. (2004) en el que determinaron la estabilidad química de los compuestos de brócoli en condiciones fisiológicas simuladas, indican que la concentración de fenoles en la FD se redujo un 94,1 %, con respecto al inicial. Antonio Pérez-Vicente y García-Viguera (2002) evaluaron la concentración de fenoles totales de jugo fresco de granada sometido al proceso de digestión gastrointestinal, indicando que el 29 % de los compuestos fenólicos están presentes en la FD. Demostrando de esta manera que los compuestos fenólicos presentes en el encapsulado poseen una alto porcentaje de bioaccesibilidad porque no existió una disminución drástica del porcentaje de estabilidad en relación con el inicial.

Con respecto al porcentaje de estabilidad no se encontró estudios en los que hayan evaluado la estabilidad del contenido de fenoles totales del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* durante un periodo de almacenamiento. En la fase intestinal específicamente la FD en la semana de inicio se obtuvo 99 % de estabilidad, mientras que en la semana cuatro disminuyo un 41 %, y para la semana ocho manifestó una disminución del 44 %. Estos resultados indican que el porcentaje de estabilidad no es significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las semana cuatro y ocho, además la disminución que se presentó con respecto a la semana cero, se puede deber a la interrupción de la integridad estructural de matriz de la pared del encapsulado durante el tiempo de almacenamiento (Akhavan, Mahdi & Assadpour, 2016). En un estudio realizado por Galmarini et al. (2013) en el que evaluaron la estabilidad de los compuestos fenólicos individuales durante 70 días de almacenamiento de vino tinto en polvo determinaron que el

contenido de fenoles decreció en un 61 % con respecto al primer día. En otro estudio realizado por Estupiñan, Schwartz y Garzón (2011) en el que evaluaron la estabilidad de compuestos fenólicos totales de bebidas isotónicas de mora andina (*Rubus glaucus Benth*) indican que para el día 63 el porcentaje de estabilidad se redujo en un 21,9 % con respecto al inicial. Basándonos en estos estudios se puede indicar que el porcentaje de estabilidad del contenido de fenoles totales no disminuyó drásticamente.

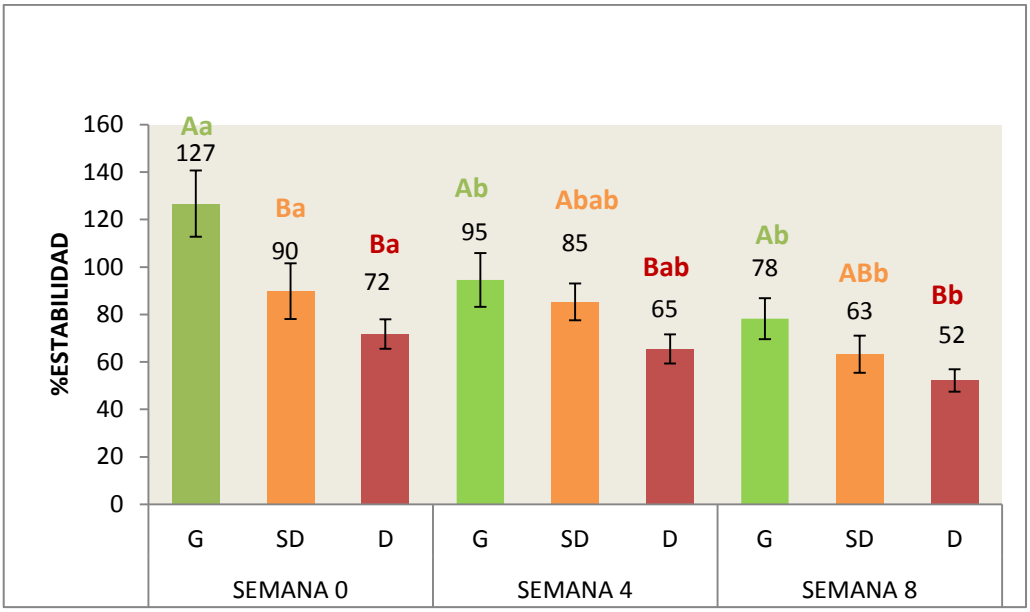
El comportamiento del porcentaje de estabilidad del contenido de fenoles totales durante el periodo de almacenamiento es muy parecido entre las semanas evaluadas, en vista de que la FG presentó mayor porcentaje de estabilidad, frente a la FSD y FD que son las fases que corresponden a la fase intestinal. Así tenemos que el porcentaje de estabilidad para la FG de la semana cuatro fue de 138 % el mismo que disminuyó un 5 % ($p > 0.05$) con respecto a la semana cero, para la semana ocho fue de 167 % el mismo que indica un incremento del 15 % ($p > 0.05$) con respecto a la semana cero. Este incremento puede deberse a la formación de nuevos compuestos que se producen por la reacción de Maillard (Alessadra, Piga, Pinna, Fenu & Agabbio, 2004), que tiene como base la interacción entre azúcares reductores y aminoácidos libres o grupos aminos terminales de las proteínas a través de tiempos de almacenamiento prolongados (Barreiro & Sandoval, 2006).

Para la fase FSD el porcentaje de estabilidad para la semana cuatro fue de 119 % y para la semana ocho 92 % lo que indica una disminución ($p > 0.05$) del 19 % y 38 % respecto a la semana cero.

3.3 Capacidad secuestrante de radicales libres por el método ABTS

En la **Gráfica 2** se indica el porcentaje de estabilidad de la capacidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante ABTS.

El porcentaje de estabilidad en la FG de la semana cero fue de 127 % lo que representa un aumento del 27 % con respecto al inicial, este incremento puede deberse a la acción enzimática ejercida por la pepsina. En el estudio realizado por Lucas-Gonzalez et al. (2016) señalan que el porcentaje de estabilidad de la fase gástrica mediante ABTS disminuyó un 31,8 % con respecto al inicial.



La fase gástrica está representada por (G) y las fases de la fase intestinal sin dializar (SD) y dializada (D). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa de la estabilidad de la actividad antioxidante en las diferentes etapas de la digestión para cada una de las semanas evaluadas. Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa del porcentaje de estabilidad para cada etapa de digestión entre las semanas evaluadas.

Gráfica 2. Representación gráfica de la estabilidad de la capacidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante ABTS.

En la FSD se presenció una disminución del 29 % ($p > 0.05$) con respecto a FG y una estabilidad de 90 %. Esta disminución puede deberse a factores ya mencionados antes por Celep, Charehsaz, Akyüz, Acar y Yesilada (2015). Lucas-Gonzalez et al. (2016) al emplear el método ABTS para evaluar el porcentaje de estabilidad en la FSD, determinaron una disminución del 88 % con respecto al inicial. El porcentaje de estabilidad de antioxidantes en los resultados obtenidos no disminuyo significativamente en relación con el inicial.

En la FD se apreció una disminución del 20 % ($p > 0.05$) con respecto a FSD y una estabilidad del 72 %. En el estudio realizado por L. Liang et al. (2012) mostraron que en la FD, el porcentaje de estabilidad de la actividad antioxidante disminuyó un 43 % con respecto a SD. Bouayed et al. (2011) determinaron que el porcentaje de la capacidad antioxidante en la FD de manzana se redujo un 46 % en comparación con los antioxidantes totales de manzanas frescas. De igual manera Lucas-Gonzalez et al. (2016) expone que el porcentaje de estabilidad correspondiente a la FD disminuyó un 96 % con respecto al inicial. Así se puede apreciar que en los resultados obtenidos el porcentaje de la estabilidad antioxidante no presento una disminución drástica con respecto al inicial.

Para comparar los resultados no se encontró estudios en los que hayan empleado el método ABTS para evaluar la estabilidad de la actividad antioxidante del encapsulado sometido al

proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* durante un periodo de almacenamiento. En los resultados obtenidos se indica que en la fase intestinal, la FD de la semana de inicio obtuvo un 72 % de estabilidad, mientras que en la semana cuatro disminuyó un 9 % y para la semana ocho un 27 %, estos resultados indican que el porcentaje de estabilidad no es significativamente diferente ($p < 0.05$) entre la semana cero y la semana cuatro, la disminución que se presentó en la semana ocho con respecto a la semana de cero, se debe a factores que ya se señaló anteriormente. Serea, Barna, Manley y Kidd (2014) realizaron un estudio de la actividad antioxidante de cultivos de lechuga durante 15 días de almacenamiento en donde indican que en los primeros 6 días se produjo una disminución de la actividad antioxidante en un 21 % y 39,5 %.

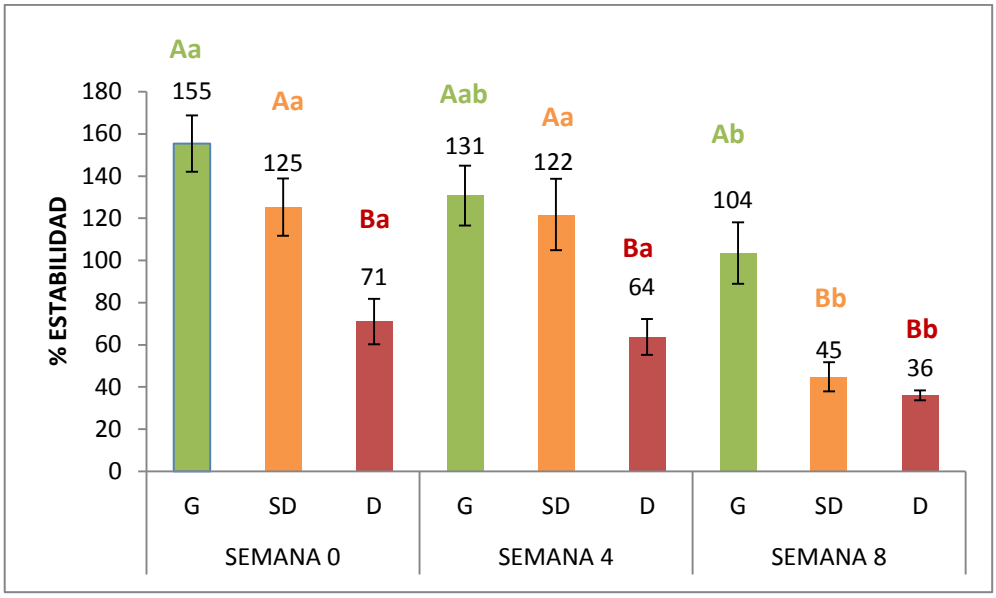
El comportamiento del porcentaje de estabilidad de la actividad antioxidante en las semanas analizadas fue similar, teniendo en cuenta que la FG presentó mayor porcentaje de estabilidad frente a la fase intestinal que se divide en FSD y FD. Así tenemos que el porcentaje de estabilidad para la FG de la semana cuatro fue de 95 % el mismo que disminuyó un 25 % ($p > 0.05$) con respecto a la semana cero, y para la semana ocho disminuyo 13 % ($p > 0.05$), siendo 78 % el porcentaje de estabilidad.

En lo concerniente a la FSD el porcentaje de estabilidad para la semana cuatro fue de 85 % y para la semana ocho 63 % lo que indica una disminución del 5 % y 30 % respecto a la semana cero, indicando de esta manera que el porcentaje de estabilidad se mantuvo constante ($p < 0.05$) durante la semana cero y la semana cuatro, existiendo una leve disminución en la semana ocho.

3.4 Capacidad secuestrante de radicales libres por el método DPPH

En la **Gráfica 3** se indica el porcentaje de estabilidad de la capacidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante DPPH.

En estos resultados se puede apreciar que el porcentaje de estabilidad para la FG de la semana de inicio se incrementó un 55 % con respecto al inicial. Este aumento puede deberse a factores ya descritos antes por Pavan et al. (2014). Contrariamente a estos resultados Lucas-Gonzalez et al. (2016) señaló en sus estudios que la baya maqui al ser sometida a digestión gastrointestinal *in vitro*, disminuyó el porcentaje de estabilidad en la FG en un 27 % con respecto al inicial.



La fase gástrica está representada por (G) y las fases de la fase intestinal sin dializar (SD) y dializada (D). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa de la estabilidad de la actividad antioxidante en las diferentes etapas de la digestión para cada una de las semanas evaluadas. Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa del porcentaje de estabilidad para cada etapa de digestión entre las semanas evaluadas.

Gráfica 3. Representación gráfica de la estabilidad de la capacidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante DPPH.

La FSD de la semana cero presentó un porcentaje de estabilidad de 125 % el mismo que disminuyó un 20 % ($p > 0.05$) con respecto a FG. L. Liang et al. (2012) expone que el porcentaje de bioaccesibilidad de antocianinas mediante DPPH de la FSD fue de 4,58 %. De igual manera Lucas-Gonzalez et al. (2016) al emplear el método DPPH para el análisis del porcentaje de estabilidad de la FSD de maqui, reportó una disminución del 80 % con respecto al inicial. Los resultados obtenidos al ser comparados con estos permiten dar a conocer que el porcentaje de estabilidad de la capacidad antioxidante no disminuye drásticamente en relación con la FG.

El porcentaje de estabilidad en la FD disminuyó un 43 % ($p > 0.05$) con respecto a la SD, siendo 71 % el porcentaje de estabilidad. L. Liang et al. (2012) indican que en su estudio realizado el porcentaje de bioaccesibilidad de antocianinas fue de 0,34 % en la FD. Lucas-Gonzalez et al. (2016) indican que el porcentaje de estabilidad de la capacidad antioxidante de la FD mediante el método DPPH, disminuyó un 95 % con respecto al inicial. De esta manera se puede apreciar que en los resultados expuestos el porcentaje de bioaccesibilidad de los antioxidantes es alto porque no existió una disminución tan marcada.

No se encontró estudios previos donde evalúen la estabilidad de la actividad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* durante un periodo de almacenamiento. Es por ello que se indica, que en los resultados obtenidos en este estudio la FD en la semana cero obtuvo un 71 % de estabilidad este a su vez, para la semana cuatro disminuyó un 10 % , estadísticamente estos resultados no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) lo que indicaría que el porcentaje de bioaccesibilidad hasta la semana cuatro es alto, en tanto que para la semana ocho se observó una disminución del 49 % ($p > 0.05$), esto puede deberse a la desintegración estructural de la pared del encapsulado durante el tiempo de almacenamiento (Akhavan et al., 2016). En el estudio expuesto anteriormente por Galmarini et al. (2013) indican que al aplicar el método DPPH para evaluar la estabilidad de la capacidad antioxidante durante 70 días de almacenamiento hubo una disminución del 18 % con respecto al inicial. Al igual que Estupiñan et al. (2011) al aplicar este método, indican que para el día 63 se redujo la estabilidad antioxidante en un 62,22 % con respecto al inicial.

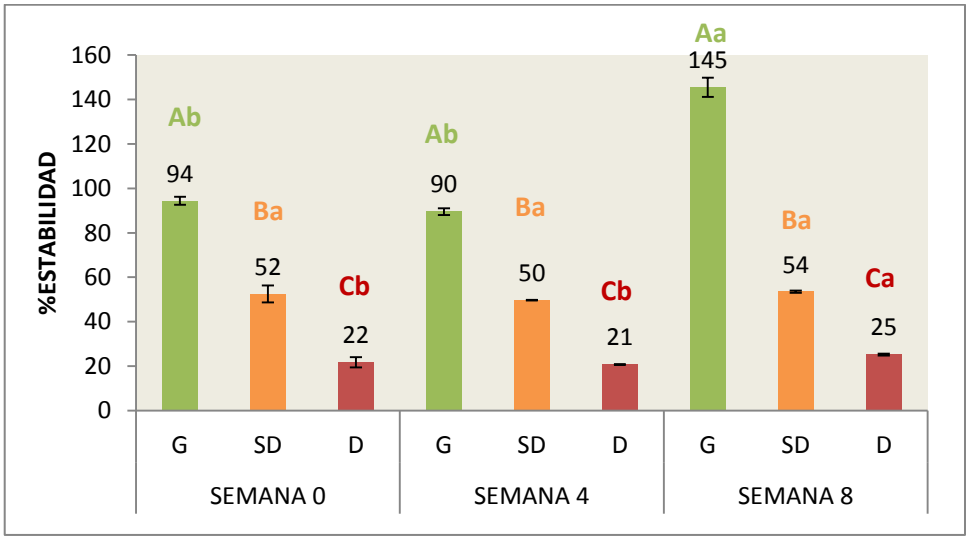
En este estudio, se pudo apreciar que tanto en la semana cero analizada como en la última, el porcentaje de estabilidad de la actividad antioxidante de la FG fue superior respecto a las fases de la fase intestinal. Así tenemos que el porcentaje de estabilidad correspondiente a la FG de la semana cuatro fue de 131 % lo que indica una disminución ($p > 0.05$) del 16 % con respecto a la semana de inicio, para la semana ocho se apreció una disminución ($p > 0.05$) del 34 %, siendo 104 % el porcentaje de estabilidad.

En lo que respecta al porcentaje de estabilidad de la FSD tenemos que para la semana cuatro fue de 122 % y para la semana ocho 45 % lo que indica una disminución ($p < 0.05$) del 3 % y 64 % respecto a la semana cero, como consecuencia de factores que ya se mencionaron en los análisis anteriores.

3.5 Poder antioxidante de reducción férrica FRAP

En la **Gráfica 4** se indica el porcentaje de estabilidad de la capacidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante FRAP.
El resultado de estabilidad correspondiente a la FG fue de 94 % lo que indica una disminución del 6 % con respecto al inicial. Resultados similares encontraron Lucas-Gonzalez et al. (2016) en la que evaluaron la estabilidad antioxidante de dos fracciones, sedimentada y soluble de la baya maqui (*Aristotelia chilensis* Stuntz) durante la digestión gastrointestinal *in vitro,* indican que en la fracción soluble el porcentaje de estabilidad

correspondiente a la FG disminuyó un 11 % con respecto al inicial. La estabilidad de la actividad antioxidante se ve afectada en función de la simulación de las condiciones fisiológicas y la secuencia de eventos en el tracto gastrointestinal (Pavan et al., 2014).



La fase gástrica está representada por (G) y las fases de la fase intestinal sin dializar (SD) y dializada (D). Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa de la estabilidad de la actividad antioxidante en las diferentes etapas de la digestión para cada una de las semanas evaluadas. Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa del porcentaje de estabilidad para cada etapa de digestión entre las semanas evaluadas.

Gráfica 4. Representación gráfica de la estabilidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* mediante FRAP.

La FSD obtuvo un porcentaje de estabilidad de 52 % es decir que decreció un 44 % ($p > 0.05$) con respecto a la FG. La disminución de la actividad antioxidante es relacionada con cambios de pH en el medio de digestión, otro factor de este cambio es el efecto de las enzimas digestivas (Celep et al., 2015). Un estudio realizado por Lucas-Gonzalez et al. (2016) en la que evaluaron la estabilidad antioxidante de dos fracciones una sedimentada y una soluble de la baya maqui durante la digestión gastrointestinal *in vitro,* encontraron que en la fracción sedimentada el porcentaje de estabilidad correspondiente a la FSD disminuyó un 77 % con respecto a la FG . Este hecho fue en concordancia con Gullon et al. (2015) donde indica que los valores de FRAP de la digestión de cáscara de granada aumentaron después de la FG . De esta manera se indica que el porcentaje de estabilidad no disminuye de manera drástica.

El porcentaje de estabilidad para la FD presentó una disminución del 59 % ($p > 0.05$) con respecto a FSD, dado que dicha fase obtuvo un 22 % de porcentaje de estabilidad antioxidante. La disminución de la actividad antioxidante se debe a factores tales como, el volumen, la composición del tampón que se utilizó, las concentraciones de azúcar en la muestra y la capacidad de ciertas moléculas para unirse con la membrana de diálisis

(Bermúdez-Soto et al., 2007). Kamiloglu, Pasli, Ozcelik, Van Camp y Capanoglu (2015) realizaron un estudio de la estabilidad de antocianinas y la capacidad antioxidante en dulces y mermeladas de zanahoria negra (*Daucus carota*) indicando que el porcentaje de bioaccesibilidad para cada uno de ellos fue de 2.6 % y 4.3 %. Otro estudio realizado por Lucas-Gonzalez et al. (2016) en la que evaluaron la estabilidad antioxidante de dos fracciones una sedimentada y una soluble de la baya maqui (*Aristotelia chilensis Stuntz)* durante la digestión gastrointestinal *in vitro,* indican que en la fracción sedimentada el porcentaje de estabilidad correspondiente a la FD disminuyó un 94 %. Indicando de tal manera que en los compuestos con actividad antioxidante presentes en el encapsulado poseen un alto porcentaje de bioaccesibilidad ya que no existió una disminución significativa ($p < 0,05$) del porcentaje de estabilidad en relación con el inicial.

En lo que concierne al porcentaje de estabilidad no se encontró estudios en los que hayan evaluado la estabilidad de la actividad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* durante un periodo de almacenamiento. En los resultados se indica que en la fase intestinal, la FD en la semana de inicio se obtuvo un 22 % de estabilidad, mientras que en la semana cuatro disminuyo 4 % y para la semana ocho se produjo un leve aumento del 16 %, estos resultados indican que el porcentaje de estabilidad no es significativamente diferente ($p < 0,05$) entre las semanas analizadas. Galmarini et al. (2013) evaluó la estabilidad de la capacidad antioxidante durante 70 días de almacenamiento de vino tinto en polvo en el que mencionan que decreció en un 14 % con respecto al primer día de almacenamiento. Un estudio realizado por Estupiñan et al. (2011) sobre la estabilidad de la capacidad antioxidante de bebidas isotónicas de mora andina (*Rubus glaucus Benth*) en la que indica que para el día 63 el porcentaje de estabilidad se redujo un 62 % con respecto al inicial. Contrariamente en un estudio realizado por Patthamakanokporn et al. (2008) en el que evaluaron los cambios de la actividad antioxidante en base seca de varias frutas como guayaba, papaya, plátano, mangostán y dos frutos indígenas makiang y maluod durante tres meses de almacenamiento a -20 ° C indicando que en guayaba el porcentaje de estabilidad se incrementó en un 18 % en la octava semana con respecto a la semana uno. En función a estos estudios se puede indicar que los resultados del porcentaje de estabilidad antioxidante se mantuvieron constantes con respecto al inicial. Esto puede ser por el agente encapsulante que utilizamos (maltodextrina), puesto que es uno de los principales materiales de pared que se utilizan para proteger a los compuestos polifenólicos, ésta forma una película de revestimiento para minimizar el contacto del oxígeno del material encapsulado, además se caracterizan por liberar los materiales encapsulados en condiciones simuladas del tracto digestivo, también por

mantener la estabilidad mecánica de las partículas encapsuladas de polifenoles y preservar su bioactividad (Medina-Torres et al., 2016).

Se puede apreciar que el porcentaje de estabilidad de antioxidantes durante el periodo de almacenamiento es muy parecido entre las semanas que se evaluó ya que la FG presenta mayor porcentaje de estabilidad, frente a la fase intestinal que se divide en FSD y FD. Así tenemos que el porcentaje de estabilidad para la FG de la semana cuatro fue de 90 % el mismo que disminuyó un 5 % ($p < 0.05$) con respecto a la semana de inicio, para la semana ocho fue de 145 % el mismo que se incrementó 54 % con respecto a la semana inicial. Este incremento según Chem (2004) se debe a la formación de nuevos compuestos que se producen por la reacción de Maillard, que tiene como base la interacción entre azúcares reductores y aminoácidos libres o grupos aminos terminales de las proteínas a través de tiempos de almacenamiento prolongados.

Para la FSD el porcentaje de estabilidad para la semana cuatro fue de 50 % y para la semana ocho 54 % lo que indica una disminución del 5 % ($p < 0.05$) y un aumento 2 % ($p < 0.05$) del respecto a la semana inicial, a causa de factores ya mencionados.

CONCLUSIONES

- Se pudo apreciar que en las semanas evaluadas el porcentaje de estabilidad de antioxidantes y el contenido de fenoles totales fue superior en la fase gástrica (FG), con respecto a la fase intestinal que se divide en fase sin dializar (FSD) y dializada (FD).
- Al emplear los métodos (ABTS, DPPH y FRAP) para evaluar la estabilidad de la capacidad antioxidante del encapsulado sometido al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* con respecto al tiempo de almacenamiento, se apreció que el porcentaje de biodisponibilidad de antioxidantes en la fase dializada no fue significativamente diferente ($p < 0,05$) entre la semana cero y la semana cuatro, ya que tanto en ABTS como en DPPH hubo una variación del 9 % y 10 %, y en FRAP una variación del 1 %. En la semana ocho el porcentaje de estabilidad presentó una disminución del 27 % en ABTS, 49 % en DPPH y un 16 % en FRAP con respecto a la semana cero.
- La estabilidad del contenido de fenoles totales de la fase dializada mostró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la semana de inicio y la semana cuatro dado que decreció un 41 %, atribuyendo este cambio a diferentes factores como el tiempo de almacenamiento. El porcentaje de estabilidad en la semana ocho disminuyó un 3 % con respecto a la semana cuatro, indicando de esta manera que la estabilidad del contenido de fenoles totales se mantuvo estable entre estas semanas.
- El polvo encapsulado del subproducto de naranja al ser almacenado a una temperatura de 12 – 20 ^{0}C durante ocho semanas, presentó un porcentaje de humedad menos del 1 %, el cual no se incrementó de forma significativa en las semanas analizadas, lo que indica que se mantuvo estable durante el tiempo de almacenamiento, esto debido a que las muestras encapsuladas se almacenaron en bolsas al vacío.

RECOMENDACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS

- Se recomienda realizar el análisis de compuestos antioxidantes y compuestos fenólicos mediante métodos cromatográficos para la identificación individual de cada compuesto.
- Se recomienda realizar el ajuste de pH a 2 a todas las muestras previo al análisis de capacidad antioxidante ABTS para evitar posibles interferencias y errores en la lectura de sus absorbancias.

BIBLIOGRAFÍA

Akhavan, S., Mahdi, S., & Assadpour, E. (2016). Storage stability of encapsulated barberry ' s anthocyanin and its application in jelly formulation. *Journal of Food Engineering*, 1-8. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.03.003

Alessadra, D. C., Piga, A., Pinna, I., Fenu, P., & Agabbio, M. (2004). Effect of Drying Conditions and Storage Period on Polyphenolic Content , Antioxidant Capacity , and Ascorbic Acid of Prunes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4780-4784.

Alzate T, L. M., González, D., Hincapié, S., Cardona S, B. L., Londoño-Londoño, J., & Jiménez-Cartagena, C. (2016). The profile of bioactive substances in ten vegetable and fruit by-products from a food supply chain in Colombia. *Sustainable Production and Consumption*(July). doi: 10.1016/j.spc.2016.07.005

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst, 127*(1), 183-198. doi: 10.1039/b009171p

Antonio Pérez-Vicente, A. G.-I. 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, 3*, 2308-2312.

Apea-Bah, F. B., Minnaar, A., Bester, M. J., & Duodu, K. G. (2016). Sorghum-cowpea composite porridge as a functional food, Part II: Antioxidant properties as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry, 197*, 307-315. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.121

Argyri, K., Komaitis, M., & Kapsokefalou, M. (2006). Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of *in vitro* digestion. *Food Chemistry, 96*(2), 281-289. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.02.035

Arnao, M. C. A., & Acosta, M. (2001). The hidrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry, 73*(2), 239-244.

Barreiro, J. A., & Sandoval, A. J. (2006). *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*: Equinoccio.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1998). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology, 299*(1995), 15-27. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99005-5

Berker, K., Guclu, K., Tor, I., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta, 72*(3), 1157-1165. doi: 10.1016/j.talanta.2007.01.019

Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., & García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry, 102*(3), 865-874. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.025

Bolanos De La Torre, A. A. S., Henderson, T., Nigam, P. S., & Owusu-Apenten, R. K. (2015). A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chemistry, 174*, 119-123. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.009

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. *LWT - Food Science and Technology, 28*(1), 25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Caliskan, G., & Dirim, S. N. (2013). Food and Bioproducts Processing The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food and Bioproducts Processing, 91*(4), 539-548. doi: 10.1016/j.fbp.2013.06.004

Carrillo, H., Cruz, J., Barrera, J. F., & Pérez, C. (2010). Estabilidad térmica oxidativa de microcápsulas de saborizante de nuez. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales, 23*, 21-26.

Ceballos, A. M., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2012). Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *Journal of Food Engineering, 111*(2), 360-365. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.02.010

Celep, E., Charehsaz, M., Akyüz, S., Acar, E. T., & Yesilada, E. (2015). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. *Food Research International, 78*(October), 209-215. doi: 10.1016/j.foodres.2015.10.009

Cerón-Carrasco, J. P., Haan, H., Peña-García, J., Contreras-García, J., & Pérez-Sánchez, H. (2016). Exploiting the cyclodextrins ability for antioxidants encapsulation : A computational approach to carnosol and carnosic acid embedding. *Computational and Theoretical Chemistry, 1077*, 65-73. doi: 10.1016/j.comptc.2015.10.028

Chem, F. (2004). Effect of Drying Conditions and Storage Period on Polyphenolic Content , Antioxidant Capacity , and Ascorbic Acid of Prunes. 4780-4784.

Dejian, H., Boxin, O., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(APRIL), 1841-1856. doi: 10.1021/jf030723c

Di Battista, C. A., Constenla, D., Ramírez-Rigo, M. V., & Piña, J. (2015). The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology, 286*, 193-201. doi: 10.1016/j.powtec.2015.08.016

El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A., & Zacarías, L. (2011). *21 – Citrus spp.: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime*: Woodhead Publishing Limited.

Estupiñan, D. C., Schwartz, S. J., & Garzón, G. A. (2011). Antioxidant Activity, Total Phenolics Content, Anthocyanin, and Color Stability of Isotonic Model Beverages Colored with Andes Berry (Rubus glaucus Benth) Anthocyanin Powder. *Journal of Food Science, 76*(1). doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01935.x

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends in Food Science and Technology, 21*(10), 510-523. doi: 10.1016/j.tifs.2010.08.003

FAO. (2015). Citrus Fruit Statistics 2015. 53-53.

Fernández-López, J., Sendra-Nadal, E., Navarro, C., Sayas, E., Viuda-Martos, M., & Álvarez, J. A. P. (2009). Storage stability of a high dietary fibre powder from orange by-products. *International Journal of Food Science & Technology, 44*(4), 748-756. doi: 10.1111/j.1365-2621.2008.01892.x

Flores-Belmont, I. a., & Jiménez-Munguía, M. T. (2013). Microencapsulación de compuestos activos con quitosano. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos, 7*(1), 48-56.

Galmarini, M. V., Maury, C., Mehinagic, E., Sánchez, V., Baeza, R. I., Mignot, S., . . . Chirife, J. (2013). Stability of Individual Phenolic Compounds and Antioxidant Activity During Storage of a Red Wine Powder. *Food and Bioprocess Technology, 6*(12), 3585-3595. doi: 10.1007/s11947-012-1035-y

Garau, M. C., Simal, S., Rossell, C., & Femenia, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium v.* Canoneta) by-products. *Food Chemistry, 104*(3), 1014-1024. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.009

Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P., & Tomás, B. (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

Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y.-S., Haruenkit, R., Lojek, A., Ĉíž, M., . . . Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry, 74*(3), 309-315. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00157-1

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

Islam, M. Z., Kitamura, Y., Yamano, Y., & Kitamura, M. (2016). Effect of vacuum spray drying on the physicochemical properties, water sorption and glass transition phenomenon of orange juice powder. *Journal of Food Engineering, 169*, 131-140. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.08.024

Izquierdo, L., & Sendra, J. M. (2003). *Citrus Fruits: Composition and Characterization*. Oxford: Academic Press.

Jiménez, M., & Roldán, J. (2013). Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 15-24.

Kamiloglu, S., Pasli, A. A., Ozcelik, B., Van Camp, J., & Capanoglu, E. (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

Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods, 2*(1), 41-60. doi: 10.1007/s12161-008-9067-7

Kashappa, D., & Park, J. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients *Drying Technology, 3937*, 37-41. doi: 10.1081/DRT-200063478

Lavelli, V., Harsha, P. S. C. S., & Spigno, G. (2016). Modelling the stability of maltodextrin-encapsulated grape skin phenolics used as a new ingredient in apple puree. *Food Chemistry, 209*, 323-331. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.055

Lee, Y., Lee, S.-Y., & Donovan, J. D. (2014). *Stability Characterization and Sensory Testing in Food Products Containing Microencapsulants*: Elsevier Inc.

Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., . . . Yang, L. (2012). *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International, 46*(1), 76-82. doi: 10.1016/j.foodres.2011.11.024

Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules, 19*(11), 19180-19208. doi: 10.3390/molecules191119180

Lucas-Gonzalez, R., Navarro-Coves, S., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products, 94*, 774-782. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.09.0576

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - A review. *International Journal of Food Science and Technology, 41*(1), 1-21. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x

Marín, F. R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., & Pérez-Álvarez, 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

Martins, A. C., Bukman, L., Vargas, A. M. M., Barizão, É. O., Moraes, J. C. G., Visentainer, J. V., & Almeida, V. C. (2013). The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. *Food Chemistry, 138*(1), 574-580. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.143

Medina-Torres, L., Santiago-Adame, R., Calderas, F., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., . . . Manero, O. (2016). Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. *Industrial Crops and Products, 90*, 1-8. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.06.009

Miller, D., Schricker, R., Rasmussen, R., & Van Campen, D. (1981). An *in vitro* availability method for estimation iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition, 43*, 2248-2256.

Morais, D. R., Rotta, E. M., Sargi, S. C., Schmidt, E. M., Bonafe, E. G., Eberlin, M. N., . . . Visentainer, J. V. (2015). Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. *Food Research International, 77*, 392-399. doi: 10.1016/j.foodres.2015.08.036

Musa, K. H., Abdullah, A., & Al-Haiqi, A. (2016). Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks. *Food Chemistry, 194*, 705-711. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.038

Nielsen, S. S. (1998). *Food analysis* (Vol. 86): Springer.

Oberoi, D. P. S., & Sogi, D. S. (2015). Effect of drying methods and maltodextrin concentration on pigment content of watermelon juice powder. *Journal of Food Engineering, 165*, 172-178. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.06.024

Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., & Sirichakwal, P. P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis, 21*(3), 241-248. doi: 10.1016/j.jfca.2007.10.002

Pavan, V., Sancho, R. A., & Pastore, G. M. (2014). The effect of *in vitro* digestion on the antioxidant activity of fruit extracts (*Carica papaya*, *Artocarpus heterophillus* and *Annona marcgravii*). *LWT - Food Science and Technology, 59*(2P2), 1247-1251. doi: 10.1016/j.lwt.2014.05.040

Pérez, O., Becerra, S., & Medina, V. (2005). Comportamiento de crecimiento y rendimiento de naranjo Valencia (*Citrus sinensis* L .) injertado en varios portainjertos en suelos calcisol vértico y pétrico Behaviour of growth and yield of Valencia orange. *Avances en investigacion agropecuaria, 9*(2), 33-51.

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

Poomkokrak, J., Niamnuy, C., Choicharoen, K., & Devahastin, S. (2015). Journal of Food Science and Agricultural Technology Encapsulation of soybean extract using spray drying. *1*, 105-110.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, 26*(9-10), 1231-1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Reineccius, G. A. (2004). The Spray Drying of Food Flavors. *Drying Technology: An International Journal*(November 2012), 1289-1324. doi: 10.1081/DRT-120038731

Ribeiro, A., Ruphuy, G., Carlos, J., Maria, M., Barros, L., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry, 188*, 612-618. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.061

Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). 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*(8), 1859-1867. doi: 10.1021/jf3044204

Roos, H., Maidannyk, V., & Nurhadi, B. (2016). Physical properties of maltodextrin DE 10 : Water sorption , water plasticization and enthalpy relaxation. *Journal of Food Engineering, 174*, 68-74. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.11.018

Roussos, P. A. (2016). *Chapter 20 – Orange (Citrus sinensis (L.) Osbeck)*: Elsevier Inc.

Safiyé, G. (2013). Métodos para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de alimentos para animales monogástricos. *Journal of Chemical Information and Modeling, 53*(9), 1689-1699. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

Sansone, F., Mencherini, T., Picerno, P., Amore, M., Aquino, R. P., & Lauro, M. R. (2011). Maltodextrin / pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *Journal of Food Engineering, 105*(3), 468-476. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.03.004

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Reprint of "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays". *Journal of Functional Foods, 18*, 782-796. doi: 10.1016/j.jff.2015.05.024

Serea, C., Barna, O., Manley, M., & Kidd, M. (2014). Effect of Storage Temperature on the Ascorbic Acid Content, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Lettuce (*Lactuca Sativa L*.). *The Journal of Animal & Pant Sciences, 24*(4), 1173-1177.

Shahidi, F. (2015). *Antioxidants: Principles and applications*: Elsevier Ltd.

Silva de Lima, A. C., Soares, D. J., Ribeiro da Silva, L. M., Wilane de Figueiredo, R., Manchado de Sousa, P. e., & Abreu, E. (2014). *In vitro* bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale L*.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chem, 161*, 142-147. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.123

Sobel, R., Versic, R., & Gaonkar, A. G. (2014). *Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods*: Elsevier Inc.

Sormoli, M. E., & Langrish, T. A. G. (2016). Spray drying bioactive orange-peel extracts produced by Soxhlet extraction : Use of WPI , antioxidant activity and moisture sorption isotherms. *LWT - Food Science and Technology, 72*, 1-8. doi: 10.1016/j.lwt.2016.04.033

Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of Prunus domestica. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 10*(1), 63-68. doi: 10.1002/jsfa.2740100110

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

Takeiti, C. Y., & Kieckbusch, T. G. (2010). Morphological and physicochemical characterization of commercial maltodextrins with different degrees of dextrose-equivalent. *International Journal of Food Properties*(May 2008), 411-425. doi: 10.1080/10942910802181024

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros, L., & 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

Toublan, F. J.-j. (2014). *Fats and Waxes in Microencapsulation of Food Ingredients*: Elsevier Inc.

Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Pérez-Vicente, A., & García-Viguera, C. (2004). *In Vitro* Gastrointestinal Digestion Study of Broccoli Inflorescence Phenolic Compounds, Glucosinolates, and Vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(1), 135-138. doi: 10.1021/jf0305128

Velázquez, C., Villa, M., Álvarez, C., Chávez, J., García, T., Ferriz, R., . . . De La Torre, K. (2015). Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *Food Chemistry, 176*, 480-486. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.050

Włodarska, K., Pawlak-Lemańska, K., Khmelinskii, I., & Sikorska, E. (2016). Explorative study of apple juice fluorescence in relation to antioxidant properties. *Food Chemistry, 210*, 593-599. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.007

Wu, Z., Teng, J., Huang, L., Xia, N., & Wei, B. (2015). Stability, antioxidant activity and *in vitro* bile acid-binding of green, black and dark tea polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *RSC Adv., 5*(112), 92089-92095. doi: 10.1039/C5RA18784B

ANEXOS

Anexo 1. Humedad del Encapsulado

	MUESTRAS	W CAP (g)	W M (g)	WCAP + WM (g)	W 2 H (g)	W 4H (g)	% HUMEDAD	PROMEDIO	Desviación	%CV
SEMANA 0	M1	112,9419	0,5027	113,4446	113,4435	113,4431	0,30	0,3	0,04	12
	M2	95,0741	0,5024	95,5765	95,5754	95,575	0,30			
	M3	93,129	0,5051	93,6341	93,6335	93,6329	0,24			
SEMANA 4	M1	83,161	0,5056	83,6666	83,6648	83,6626	0,79	0,74	0,04	6
	M2	84,9231	0,5061	85,4292	85,4278	85,4256	0,71			
	M3	112,6813	0,5023	113,1836	113,1804	113,18	0,72			
SEMANA 8	M1	112,6656	0,5044	113,17	113,1675	113,1667	0,65	0,6	0,04	7
	M2	113,0096	0,5031	113,5127	113,5108	113,5098	0,58			
	M3	84,9416	0,5016	85,4432	85,4428	85,4403	0,58			

Mediante la **Ecuación 1** se determinó el % de humedad.

WCAP: Peso de la cápsula vacía

WM: Peso de la muestra

WCAP + WM: Peso de la cápsula más peso de la muestra

W 2H: Peso de la cápsula más muestra a las 2 horas

W 4H: Peso de la cápsula más muestra a las 4 horas

Anexo 2. Datos de cuantificación de fenoles totales

	Muestras	Factor de Dilución	Absorbancia	C_o (mg/mL)	Volumen final digestado (mL)	C_f (mg EAG/L)	PROM	DV	% CV	% ESTABILIDAD	PROM	DV
SEMANA 0	FG	5	**0,432**	**0,0779**	**23**	**448**	450,3	2,5	0,6	**147**	146	1,3
		5	0,434	0,0783	23	450				146		
		5	0,436	0,0788	23	453				144		
	FSD	5	0,376	0,0657	28	460	456,13	4,9	1	150	148	3,7
		5	0,375	0,0655	28	458				149		
		5	0,37	0,0644	28	451				143		
	FD	5	0,329	0,0554	22	305	305,2	1,8	0,6	100	99	1
		5	0,328	0,0552	22	304				99		
		5	0,331	0,0559	22	307				98		
SEMANA 4	FG	5	0,417	0,0746	23	429	426,5	2,5	0,6	140	138	2,8
		5	0,415	0,0742	23	427				139		
		5	0,413	0,0737	23	424				135		
	FSD	5	0,32	0,0535	28	374	368,6	6,2	1,7	123	119	3,7
		5	0,317	0,0528	28	370				120		
		5	0,312	0,0517	28	362				115		
	FD	5	0,249	0,038	19	180	178,7	3,9	2,2	59	58	2
		5	0,25	0,0382	19	181				59		
		5	0,243	0,0367	19	174				55		
SEMANA 8	FG	5	0,488	0,0901	23	518,03	516,8	1,3	0,2	170	167	2,8
		5	0,487	0,0899	23	516,78				168		
		5	0,486	0,0897	23	515,52				164		
	FSD	5	0,265	0,0415	27	280	283,8	3,7	1,3	92	92	0,5

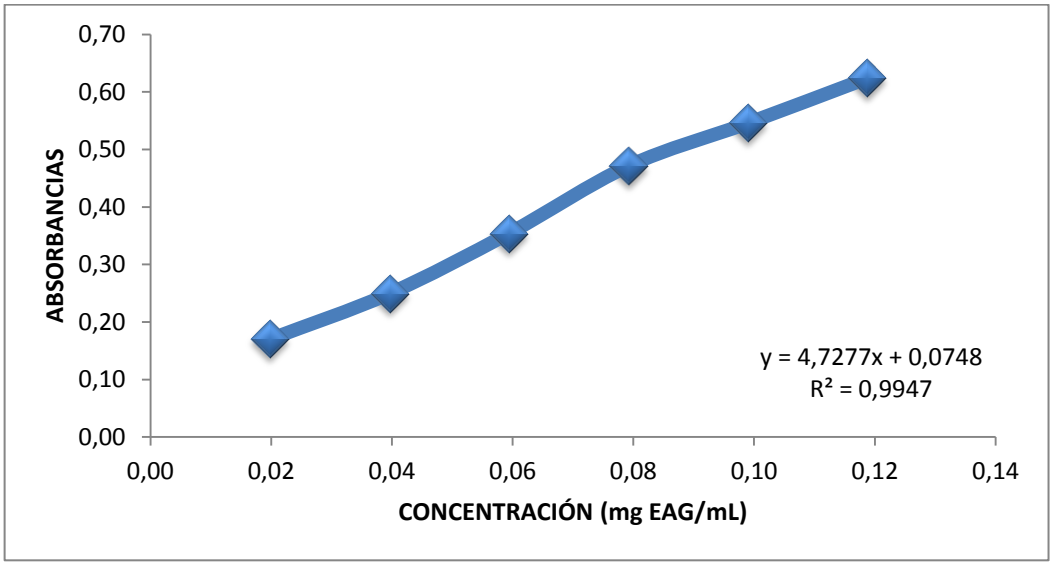
		5	0,268	0,0421	27	284				92		
		5	0,27	0,0426	27	287				91		
	FD	5	0,215	0,0306	22	168	170,1	1,8	1,1	55	55	0,7
		5	0,218	0,0312	22	172				56		
		5	0,217	0,031	22	170				54		

Datos de los estándares utilizados para fenoles totales

Masa (g) AG	PM g/mol	Pureza	Aforo (mL)	Concentración Ácido Gálico (mg/mL)
0,0051	170	0,97	25	0,20

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (mg EAG /mL)	Absorbancias			Promedio
Est1	1	10	0,02	0,189	0,166	0,155	0,17
Est2	2	10	0,04	0,249	0,255	0,244	0,25
Est3	3	10	0,06	0,372	0,341	0,349	0,35
Est4	4	10	0,08	0,457	0,466	0,490	0,47
Est5	5	10	0,10	0,589	0,519	0,529	0,55
Est6	6	10	0,12	0,631	0,604	0,636	0,62

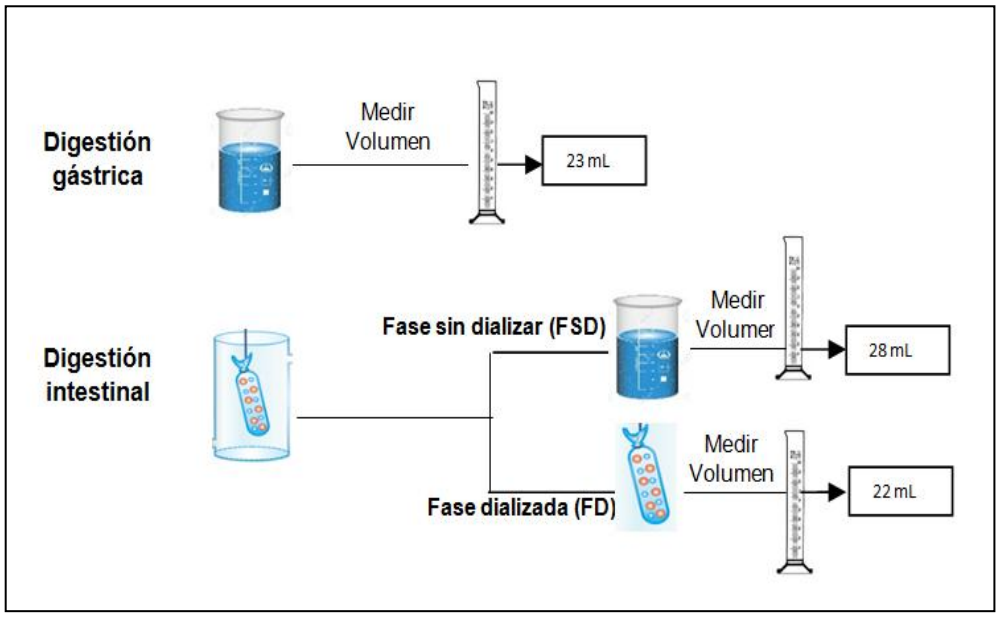
Curva de Calibración



Pendiente	4,727
Intersección	0,074
Coeficiente de correlación	0,994

Datos para el cálculo del contenido de fenoles totales:

Volumen de muestra inicial (V_m)	**20 mL**
Factor de dilución fase gástrica	**5**
Concentración de la muestra sin dializar (C_{oin})	**305 mg/L**
Volumen final digestado fase gástrica (V_{FG})	**23 mL**
Volumen final digestado – fase sin dializar (V_{FSD})	**28 mL**
Volumen final digestado – fase dializada (V_{FD})	**22 mL**



Ejemplo: cálculo del contenido de fenoles totales en la digestión gástrica

Fase gástrica semana 0

$$\boldsymbol{Co = \frac{Abs - Intersección}{Pendiente}} \qquad \textbf{(Ecuación 2)}$$

$$\boldsymbol{Co = \frac{0{,}432 - 0{,}07484444}{4{,}72773302} = 0{,}0779 \frac{mg}{mL}}$$

$$\boldsymbol{Cf = \frac{Co\ x\ Factor\ Dilución\ x\ VFG\ x\ 1000}{Vm}} \qquad \textbf{(Ecuación 3)}$$

$$\boldsymbol{Cf = \frac{0{,}0779 \frac{mg}{mL} x\ 5\ \text{x}\ 23\ \text{mL}\ \text{x}\ 1000\ \text{mL}}{20\ \text{mL}\ \text{x}\ 1\text{L}} = 448 \frac{mg}{L}}$$

Ejemplo: cálculo del porcentaje de estabilidad del contenido de fenoles totales en digestión gástrica

Fase gástrica semana 0

$$\%\boldsymbol{Estabilidad} = \frac{\boldsymbol{Cfx\ 100}}{\boldsymbol{Coin}} \qquad \textbf{(Ecuación 4)}$$

$$\%\boldsymbol{Estabilidad} = \frac{448\frac{mg}{L}x\ 100}{305\frac{\text{mg}}{\text{L}}} = \mathbf{147}\ \%$$

C_o: Concentración inicial calculada con la ecuación de la recta

C_{oin}: Concentración de la muestra sin dializar.

C_f: Concentración final

PROM: Promedio

DV: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación

EAG: Equivalente de ácido gálico

V_{FG}: Volumen final digestado – fase gástrica

V_{FSD}: Volumen final digestado – fase sin dializar

V_{FG}: Volumen final digestado – fase dializada

V_m: Volumen de muestra inicial

Anexo 3. Datos de Cuantificación de ABTS

	Muestras	Factor de Dilución	Absorbancia	C_o (µmol/L)	Volumen final digestado (mL)	C_f (µmol ET/L)	PROM	DV	%CV	% ESTABILIDAD	PROM	DV
SEMANA 0	FG	5	**0,818**	**132**	**23**	**761**	771	24,8	3,2	**114**	127	13,9
		5	0,808	139	23	799				124		
		5	0,82	131	23	753				142		
	FSD	10	0,957	39	28	549	545,5	5,4	1	83	90	11,7
		10	0,958	39	28	539				84		
		10	0,957	39	28	549				103		
	FD	10	0,95	44	21	461	437,3	21,5	4,9	69	72	6,2
		10	0,954	41	21	433				67		
		10	0,956	40	21	419				79		
SEMANA 4	FG	5	0,869	98	23	564	574,6	14,6	2,5	85	95	11,3
		5	0,862	103	23	591				92		
		5	0,868	99	23	568				107		
	FSD	10	0,96	37	29	539	519,7	19,4	3,7	81	85	7,7
		10	0,962	36	29	520				81		
		10	0,964	35	29	500				94		
	FD	10	0,954	41	20	412	398,6	13,4	3,4	62	65	6,1
		10	0,956	40	20	399				62		
		10	0,958	39	20	385				73		
SEMANA 8	FG	5	0,89	84	23	483	475,7	7,7	1,6	73	78	8,6
		5	0,892	83	23	476				74		
		5	0,894	81	23	468				88		

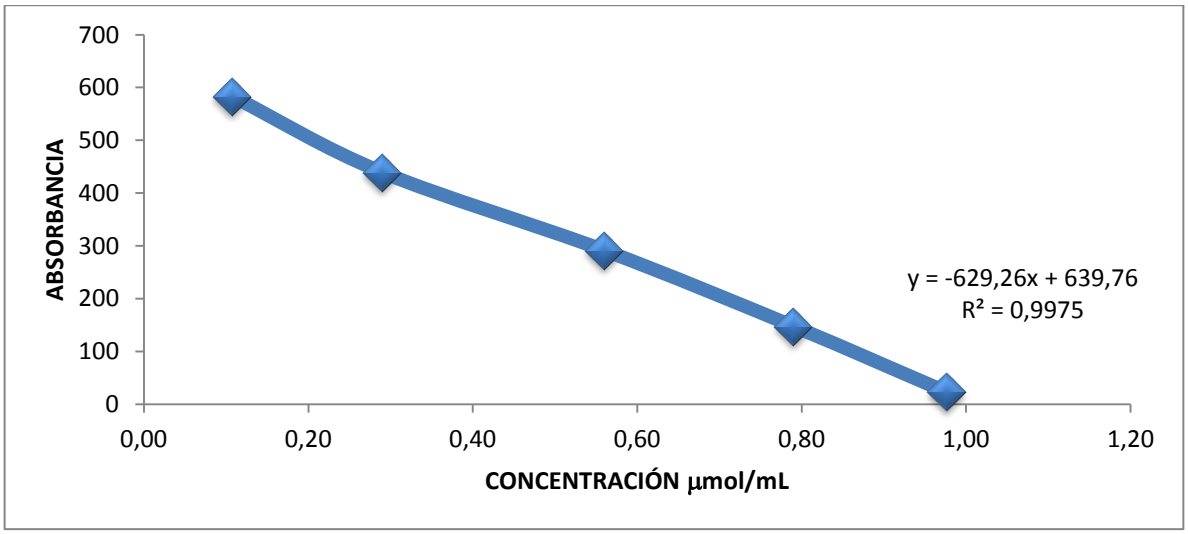
	FSD	10	0,975	27	27	366	384,4	23,9	6,2	55	63	7,8
		10	0,97	30	27	412				64		
		10	0,974	28	27	375				71		
	FD	10	0,97	30	22	335	318,1	15,3	4,8	50	52	4,7
		10	0,973	28	22	313				49		
		10	0,974	28	22	306				58		

Datos de los estándares utilizados para ABTS

Masa (g) Trolox	Peso Mol (g/mol)	Pureza (%)	Aforo MeOH (mL)	Concentración de Solución Madre	
				(mg/L)	µmol
0,0251	250,29	97	100	24	973

Estándar	Alícuota(mL)	Aforo (mL)	Concentración (µmol ET/mL)	Absorbancia			PROMEDIO
Et1	0,24	10	23	0,976	0,978	0,974	0,98
Et2	1,52	10	148	0,794	0,79	0,785	0,79
Et3	3	10	292	0,558	0,560	0,560	0,56
Et4	4,52	10	440	0,290	0,289	0,289	0,29
Et5	6	10	584	0,106	0,107	0,108	0,11

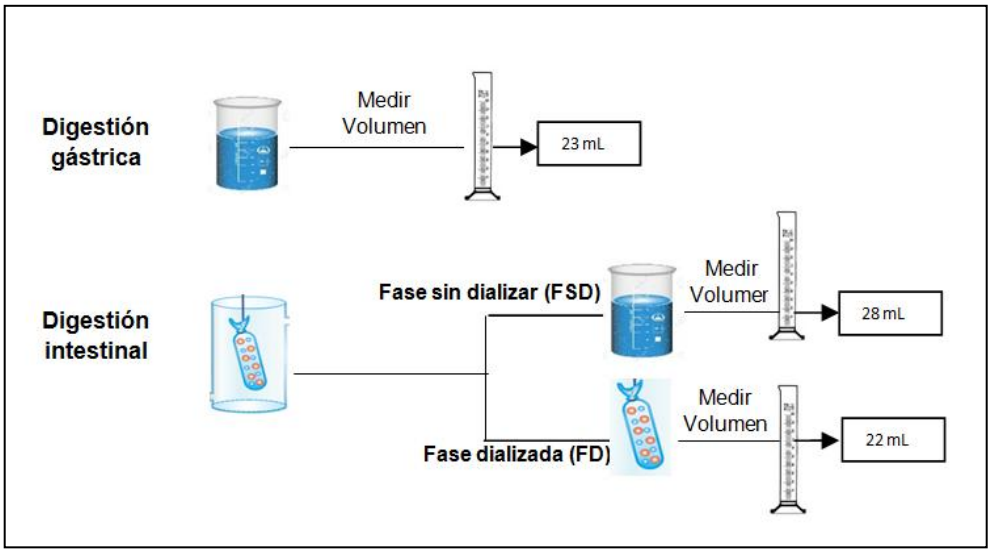
CURVA DE CALIBRADO



Pendiente	**-0,0015**
Intersección	1,0155
Coeficiente de correlación	0,997

Datos para el cálculo de la actividad antioxidante:

Volumen de muestra inicial (V_m)	**20 mL**
Factor de dilución fase gástrica	**5**
Factor de dilución fase gástrica	**10**
Concentración de la muestra sin dializar (C_{oin})	**665 µmol/L**
Volumen final digestado fase gástrica (V_{FG})	**23 mL**
Volumen final digestado – fase sin dializar (V_{FSD})	**28 mL**
Volumen final digestado – fase dializada (V_{FD})	**22 mL**



Ejemplo: Cálculo de la actividad antioxidante digestión gástrica ABTS

Fase gástrica semana 0

$$\boldsymbol{Co} = \frac{Abs - Intersección}{Pendiente} \qquad \textbf{(Ecuación 2)}$$

$$\boldsymbol{Co} = \frac{0{,}818 - 1{,}01550697}{-0{,}0014929} = \mathbf{132{,}30\ \mu mol\ /\ L}$$

$$\boldsymbol{Cf} = \frac{Co\ x\ Factor\ dilución\ x\ VFG\ x\ 1000}{\mathrm{Vm}} \qquad \textbf{(Ecuación 3)}$$

$$\boldsymbol{Cf} = \frac{132{,}30\ \frac{\mu mol}{mL}\ x\ 5\ \mathrm{x}\ 23\ \mathrm{mL}\ \mathrm{x}\ 1000\ \mathrm{mL}}{20\ \mathrm{mL}\ \mathrm{x}\ 1\ \mathrm{L}} = \mathbf{760{,}7\ \frac{\mu mol}{L}}$$

Ejemplo: cálculo del porcentaje de la estabilidad de la capacidad antioxidante digestión gástrica ABTS

Fase gástrica semana 0

$$\%\boldsymbol{Estabilidad} = \frac{Cf\ x\ 100}{\text{Coin}} \qquad \textbf{(Ecuación 4)}$$

$$\%\boldsymbol{Estabilidad} = \frac{760{,}7\,\frac{\mu mol}{L}\,x\ 100}{665\,\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}} = \mathbf{114}\ \%$$

C_o: Concentración inicial calculada con la ecuación de la recta

C_{oin}: Concentración de la muestra sin dializar.

C_f: Concentración final

PROM: Promedio

DV: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación

ET: Equivalente trolox

V_{FG}: Volumen final digestado – fase gástrica

V_{FSD}: Volumen final digestado – fase sin dializar

V_{FG}: Volumen final digestado – fase dializada

V_m: Volumen de muestra inicial

μmol: Micromoles

MeOH: Metanol

Anexo 4. Resultado del diseño experimental

Fenoles totales SEMANA 0

ANOVA unidireccional: FASE GÁSTRICA; SIN DIALIZAR; DIALIZAR

```
Fuente  GL       SC       CM       F      P
Factor   2  4594,59  2297,29  410,91  0,000
Error    6    33,54     5,59
Total    8  4628,13

S = 2,364   R-cuad. = 99,28%   R-cuad.(ajustado) = 99,03%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

               N  Media   Agrupación
SIN DIALIZAR   3  147,609  A
FASE GÁSTRICA  3  145,708  A
DIALIZAR       3   98,757    B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
```

Fenoles totales SEMANA 4

ANOVA unidireccional: FASE GÁSTRICA; SIN DIALIZAR; DIALIZADA

```
Fuente  GL        SC       CM       F      P
Factor   2  10560,06  5280,03  610,64  0,000
Error    6     51,88     8,65
Total    8  10611,94

S = 2,941   R-cuad. = 99,51%   R-cuad.(ajustado) = 99,35%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

              N    Media  Agrupación
FASE GÁSTRICA 3  138,015  A
SIN DIALIZAR  3  119,295    B
DIALIZADA     3   57,822      C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
```

Fenoles totales SEMANA 8

ANOVA unidireccional: FASE GÁSTRICA; SIN DIALIZAR; DIALIZADA

```
Fuente  GL        SC       CM        F      P
Factor   2  19624,09  9812,04  3313,16  0,000
Error    6     17,77     2,96
Total    8  19641,86

S = 1,721   R-cuad. = 99,91%   R-cuad.(ajustado) = 99,88%
```

Agrupar información utilizando el método de Tukey

	N	Media	Agrupación
FASE GÁSTRICA	3	167,22	A
SIN DIALIZAR	3	91,83	B
DIALIZADA	3	55,04	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Fenoles totales SEMANAS

ANOVA unidireccional: FASE GÁSTRICA vs. SEMANAS

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SEMANAS	2	1375,16	687,58	116,33	0,000
Error	6	35,46	5,91		
Total	8	1410,62			

S = 2,431 R-cuad. = 97,49% R-cuad.(ajustado) = 96,65%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

SEMANAS	N	Media	Agrupación
8	3	167,223	A
0	3	145,708	B
4	3	138,015	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: SIN DIALIZAR vs. SEMANAS

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SEMANAS	2	4667,93	2333,96	250,13	0,000
Error	6	55,99	9,33		
Total	8	4723,92			

S = 3,055 R-cuad. = 98,81% R-cuad.(ajustado) = 98,42%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

SEMANAS	N	Media	Agrupación
0	3	147,609	A
4	3	119,295	B
8	3	91,826	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

ANOVA unidireccional: DIALIZAR vs. SEMANAS

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SEMANAS	2	3594,90	1797,45	918,36	0,000
Error	6	11,74	1,96		
Total	8	3606,65			

S = 1,399 R-cuad. = 99,67% R-cuad.(ajustado) = 99,57%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

SEMANAS	N	Media	Agrupación
0	3	98,757	A
4	3	57,822	B

```
8        3  55,036    B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
```

ABTS SEMANA 0

ANOVA unidireccional: FASE GÁSTRICA 0; SIN DIALIZAR 0; DIALIZAR 0

```
Fuente  GL    SC    CM      F      P
Factor   2  4714  2357  19,11  0,002
Error    6   740   123
Total    8  5454

S = 11,11   R-cuad. = 86,43%   R-cuad.(ajustado) = 81,91%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

                N   Media  Agrupación
FASE GÁSTRICA 0 3  126,74    A
SIN DIALIZAR 0  3   89,84    B
DIALIZAR 0      3   71,74    B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
```

ABTS SEMANA 4

ANOVA unidireccional: FASE GÁSTRICA 4; SIN DIALIZAR 4; DIALIZAR 4

```
Fuente  GL      SC     CM     F      P
Factor   2  1325,1  662,6  8,78  0,017
Error    6   452,6   75,4
Total    8  1777,8

S = 8,686   R-cuad. = 74,54%   R-cuad.(ajustado) = 66,05%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

                N   Media Agrupación
FASE GÁSTRICA 4 3  94,532  A
SIN DIALIZAR 4  3  85,310  A B
DIALIZAR 4      3  65,451    B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
```

ABTS SEMANA 8

ANOVA unidireccional: FASE GÁSTRICA 8; SIN DIALIZAR 8; DIALIZAR 8

```
Fuente  GL      SC     CM     F      P
Factor   2  1022,7  511,3  9,69  0,013
Error    6   316,7   52,8
Total    8  1339,3

S = 7,265   R-cuad. = 76,36%   R-cuad.(ajustado) = 68,48%
Agrupar información utilizando el método de Tukey

                N   Media  Agrupación
FASE GÁSTRICA 8 3  78,215  A
SIN DIALIZAR 8  3  63,208  A B
DIALIZAR 8      3  52,207    B
```

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ABTS SEMANAS

ANOVA unidireccional: FASE GÁSTRICA vs. SEMANAS

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SEMANAS	2	3659	1829	13,83	0,006
Error	6	794	132		
Total	8	4452			

S = 11,50 R-cuad. = 82,17% R-cuad.(ajustado) = 76,23%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

SEMANAS	N	Media	Agrupación
0	3	126,74	A
4	3	94,53	B
8	3	78,22	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: SIN DIALIZAR vs. SEMANAS

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SEMANAS	2	1218,3	609,2	7,08	0,026
Error	6	516,4	86,1		
Total	8	1734,7			

S = 9,277 R-cuad. = 70,23% R-cuad.(ajustado) = 60,31%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

SEMANAS	N	Media	Agrupación
0	3	89,840	A
4	3	85,310	A B
8	3	63,208	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: DIALIZAR vs. SEMANAS

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SEMANAS	2	596,7	298,4	8,98	0,016
Error	6	199,2	33,2		
Total	8	796,0			

S = 5,763 R-cuad. = 74,97% R-cuad.(ajustado) = 66,62%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

SEMANAS	N	Media	Agrupación
0	3	71,745	A
4	3	65,451	A B
8	3	52,207	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

HUMEDAD

ANOVA unidireccional: HUMEDAD % vs. TIEMPO

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TIEMPO	2	0,33720	0,16860	97,25	0,000
Error	6	0,01040	0,00173		
Total	8	0,34761			

S = 0,04164 R-cuad. = 97,01% R-cuad.(ajustado) = 96,01%
Agrupar información utilizando el método de Tukey

TIEMPO	N	Media	Agrupación
4	3	0,73972	A
8	3	0,60294	B
0	3	0,27818	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.