



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* sobre los compuestos fenólicos en jugo de naranja con adición de subproducto.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Delgado Sánchez, Jessica Paulina

DIRECTOR: Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny, Mgs

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

Mgs.

Jorge Geovanny Figueroa Hurtado.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **Evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* sobre los compuestos fenólicos en jugo de naranja con adición de subproducto** realizado por Delgado Sánchez Jessica Paulina, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, diciembre de 2016

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo **Delgado Sánchez Jessica Paulina** declaro ser autora del presente trabajo de titulación “**Evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* sobre los compuestos fenólicos en jugo de naranja con adición de subproducto**”, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Mgs, Jorge Geovanny Figueroa Hurtado director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f)

Autor: Delgado Sánchez Jessica Paulina

CI: 1105917965

DEDICATORIA

A Dios, por derramar sus bendiciones sobre mí y acompañarme durante el transcurso de mi vida.

A mi madre, por su amor incondicional, sacrificio, comprensión durante toda mi vida, gracias a ti he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mi hijo, por ser mi motivación e inspiración para superarme cada día más.

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradezco a Dios por ser la luz de mi camino y por permitirme cumplir una de mis metas.

Agradezco a mi director de trabajo de fin de titulación Mgs. Geovanny Figueroa, por su apoyo, paciencia, conocimientos impartidos y por brindarme la oportunidad de recibir su experiencia durante este tiempo.

A los ingenieros: Miguel Ángel Meneses y María del Cisne Guamán por su colaboración como miembros del jurado de tesis, que con su experiencia han sabido guiar esta investigación.

A mis profesores, por su colaboración durante mi formación profesional.

A mi familia y amigos que han estado junto a mí en el transcurso de este camino, por su apoyo en cada momento.

TABLA DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS	VIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	5
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Frutos cítricos	8
1.2. Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	8
1.3. Compuestos químicos de la naranja	8
1.4. Subproducto	9
1.5. Radicales libres	9
1.6. Antioxidantes	10
1.7. Compuestos fenólicos	10
1.8. Microencapsulación	11
1.9. Maltodextrina.....	11
1.10. Digestión gastrointestinal <i>in-vitro</i>	12
1.11. Fenoles totales	12
1.12. Cromatografía líquida de alta resolución.....	13
2. DISEÑO METODOLÓGICO.....	14
2.1. Muestras.....	14
2.2. Métodos analíticos	14
2.3. Digestión gastrointestinal <i>in-vitro</i>	16
2.4. Determinación de fenoles totales	17

2.5.	Estabilidad antioxidante.....	19
2.6.	Identificación de compuestos fenólicos.....	19
2.6.1.	Preparación de estándares.....	19
2.6.2.	Cuantificación de los compuestos fenólicos en las muestras.....	20
2.7.	Análisis estadístico.....	20
3.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	22
3.1.	Caracterización del jugo de naranja comercial.....	23
3.1.1.	Análisis de contenido de ácido ascórbico.....	23
3.1.2.	Análisis de determinación de acidez titulable.....	24
3.2.	Análisis del contenido de fenoles totales.....	24
3.2.1.	Cuantificación de fenoles totales.....	24
3.3.	Análisis de estabilidad.....	26
3.4.	Determinación de compuestos fenólicos.....	27
	CONCLUSIONES.....	30
	RECOMENDACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS.....	31
	BIBLIOGRAFÍA.....	32
	ANEXOS.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de estándares inyectados.....	19
Tabla 2. Contenido de vitamina C	23
Tabla 3. Determinación de acidez	24

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Determinación de ácido ascórbico	15
Gráfico 2. Determinación de acidez	16
Gráfico 3. Diagrama de digestión gastrointestinal in-vitro	17
Gráfico 4. Diagrama de determinación de fenoles totales.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contenido fenólico de jugo comercial y jugo enriquecido (mg Eq. Ac. Gálico/mL).25	
Figura 2. Análisis de estabilidad de la digestión intestinal dializada	27
Figura 3. Contenido de hesperidina jugo comercial.....	28

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de ácido ascórbico.....	38
Anexo 2. Preparación de reactivo para la determinación de acidez	38
Anexo 3. Cuantificación de acidez titulable	40
Anexo 4. Preparación de reactivos para digestión gastrointestinal in-vitro	41
Anexo 5. Preparación de reactivo para la determinación de Fenoles totales	43
Anexo 6. Cuantificación de fenoles totales.....	44

Anexo 7. Cálculo de estabilidad antioxidante.	48
Anexo 8. Determinación de compuestos fenólicos.....	49
Anexo 9. Curva de calibración hesperidina	52
Anexo 10. Resultados del diseño experimental.....	53

RESUMEN

En el presente trabajo se enriqueció un jugo comercial de naranja con subproducto obtenido a partir de pulpa agotada de naranja y se evaluó el efecto de la digestión gastrointestinal *in-vitro* sobre el contenido fenólico. Se realizó una extracción acuosa seguida de una microencapsulación con maltodextrina. El contenido de fenoles totales (FT) de cada una de las fases de digestión fue evaluado mediante el método del Folin-Ciocalteu y con HPLC se identificó y cuantificó compuestos individuales. El contenido de FT del jugo comercial y jugo enriquecido fue 47.2 y 62.6 mg Eq. Ác. Gálico/100 mL respectivamente, aumentando en un 32 % el contenido fenólico con la adición del subproducto y obteniendo una bioaccesibilidad elevada de 92 % y 82 % respectivamente. Se logró identificar el compuesto hesperidina con una concentración de 197 mg/L y una bioaccesibilidad de 33 %. Estos resultados nos indican que la adición del subproducto obtenido por microencapsulación aporta un carácter funcional al ser incorporado en el jugo, protegiendo a los compuestos fenólicos contra degradación durante la digestión gástrica.

Palabras clave: subproducto, fenoles totales, digestión gastrointestinal *in-vitro*, hesperidina.

ABSTRACT

In the research work a commercial orange juice was enriched with a by-product obtained from orange pulp and the effect of *in-vitro* gastrointestinal digestion on phenolic content was evaluated. An aqueous extraction followed by microencapsulation with maltodextrin was performed. The total phenol content (TP) of each of the digestion phases was evaluated by the Folin-Ciocalteu method and individual compounds were identified and quantified with HPLC. The FT content of commercial juice and enriched juice was 47.2 and 62.6 mg Eq. Gallic Acid/100 mL respectively, increasing in a 32% the phenolic content with addition of the by-product and obtaining a high bio-accessibility of 92% and 82% respectively. It was possible to identify the compound hesperidin with a concentration of 197 mg/L and a bio-accessibility of 33%. These results indicate that addition of the by-product obtained by microencapsulation provides a functional character when incorporated into the juice, protecting the phenolic compounds against degradation during gastric digestion.

Key words: by-product, total phenol, *in-vitro* gastrointestinal digestion, hesperidin

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Ácido Ascórbico
Ac:	Ácido
Af:	Aforo
AOAC:	Association of Official Analytical Chemists
AT:	Acidez titulable
Co:	Concentración
Cof:	Concentración final
Csm:	Concentración solución madre
Dig:	Digestión
EAG:	Equivalentes de ácido gálico
EQ:	Equivalente químico
FT:	Fenoles totales
g:	Gramo
HCl:	Ácido clorhídrico
L:	Litro
m:	masa
M:	Molar
MeOH:	Metanol
mg:	miligramos
Min:	Minuto
mL:	Mililitro
N:	Normal
NaHCO ₃ :	Bicarbonato de sodio
NaOH:	Hidróxido de sodio
nm:	Nanómetros
r:	Coefficiente de correlación
rpm:	Revoluciones por minuto
SEAG:	Solución estándar de ácido gálico
ST:	Estándar
µg:	Microgramo

μL :	Microlitro
v:	Volumen
Vf:	Volumen final
Vgb:	Volumen gastado de blanco
Vgm:	Volumen gastado de muestra
Vit:	Vitamina
Vm:	Volumen muestra
w:	Peso

INTRODUCCIÓN

Frutas y verduras, son una fuente importante de nutrientes, ya que contienen vitamina C, folatos, fibra dietaria entre otros compuestos bioactivos, como carotenoides y flavonoides. Estos compuestos aportan en gran parte a la prevención de enfermedades (Denny & Buttriss, 2007). Varios estudios han demostrado una asociación entre el consumo de dietas ricas en frutas y verduras y un menor riesgo de enfermedades crónicas como el cáncer (Palafox, Ayala & González, 2011) y enfermedades degenerativas (Tripoli, La Guardia, Giammanco, Di Majo & Giammanco, 2007).

El consumo de naranjas, ha obtenido un mayor interés debido a su potencial en compuestos fenólicos y antocianinas (Fallico, Ballistreri, Arena, Brighina & Rapisarda, 2017), llegando a ser las frutas de mayor producción a escala mundial. Además la producción de alimentos a partir de cítricos, en especial de la naranja ha incrementado (Cháfer, Ortolá, Chiralt & Fito, 2005), siendo destinados a la producción de jugo concentrado. Durante la producción de alimentos se generan productos que no son utilizados, que representan aproximadamente el 50 % de la masa total del fruto original (Marín, Soler, Benavente, Castillo & Pérez, 2007), a los cuales se los denomina subproductos, estos no son aptos para el consumo humano, sin su ulterior procesamiento. Estos subproductos están compuestos por pulpa agotada, cáscara y semillas.

En la industria alimentaria se observa un exceso de subproductos, en donde la mayoría de los casos son desechados. El aprovechamiento de los subproductos beneficiarían a la industria, ya que les permitirá obtener ingresos a partir de la utilización de estos, y a los consumidores, debido a que aporta un valor nutritivo adicional (Goñi & Hervert-Hernandez, 2011). Estos subproductos se pueden utilizar como aditivos alimentarios: antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, saborizantes y espesantes (Ayala-Zavala et al., 2011). Los Compuestos fenólicos son importantes micronutrientes en la dieta, y la evidencia de su papel en la prevención de enfermedades degenerativas está emergiendo. Son componentes principales que se encuentran comúnmente en alimentos, plantas y bebidas (Esfanjani & Jafari, 2016). Su incorporación en formulaciones es limitada debido muchas razones como su fácil degradación por factores ambientales y su baja biodisponibilidad. La utilización de los subproductos con el fin de mejorar las cualidades de los productos, y reducir el desecho de estos, nos ha llevado a realizar el presente estudio.

Los estudios *in-vitro* llevados a cabo han sido diseñados para simular las condiciones en el estómago e intestino delgado, con el fin de estudiar los cambios en componentes de la dieta, debido a factores que afectan su disponibilidad (Bouayed, Hoffmann & Bohn, 2011).

Este método ha demostrado una buena correlación con la biodisponibilidad observada *in vivo* (Gil, Zafrilla & Tomás, 2002). La reducción del potencial de los compuestos presentes en los alimentos durante las diferentes fases de digestión gastrointestinal, es lo que nos ha llevado al empleo de la microencapsulación del producto, con el fin de proteger ingredientes alimentarios como los compuestos fenólicos contra la degradación y así mejorar su estabilidad y prolongar su vida útil (Moser et al., 2017). La elección del agente encapsulante es de suma importancia, ya que determinará la estabilidad de las micropartículas y el grado de protección de su núcleo (Moser et al., 2017).

El presente trabajo de titulación tuvo como finalidad determinar el efecto de la digestión gastrointestinal *in-vitro* sobre los compuestos fenólicos en jugo de naranja con adición de subproducto obtenido a partir del extracto acuoso de pulpa agotada de naranja, para lo cual se realizó una digestión gastrointestinal *in-vitro* de las muestras obtenidas con el fin de evaluar la bioaccesibilidad.

Este documento está compuesto de tres capítulos. El primer capítulo titulado Marco teórico abarca temas relacionados con la investigación, en el cual se analizan diferentes estudios realizados previamente referentes al problema de investigación. En el capítulo siguiente denominado Diseño metodológico, se presenta la parte práctica de la investigación, mencionando los métodos, así como los materiales y reactivos usados en los mismos. El capítulo final llamado Discusión de resultados y análisis, se centra principalmente en los resultados obtenidos, la interpretación de estos y análisis en comparación con estudios previos, además se presenta el análisis estadístico llevado a cabo en el software Minitab16.

La determinación del contenido de fenoles totales en jugo comercial y enriquecido, pone de manifiesto que al enriquecer el jugo con subproducto aumenta la concentración de FT, aportando cierto carácter funcional y a la vez proporcionando información valiosa para un mejor aprovechamiento de los subproductos en la industria.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Frutos cítricos

Los frutos cítricos proveniente de la familia Rutaceae, son los cultivos frutales más importantes que existen. Se cultiva ampliamente en zonas tropicales y subtropicales del mundo, y muchas otras áreas, teniendo una producción anual de aproximadamente 102 millones de toneladas (Zou, Xi, Hu, Nie & Zhou, 2016).

Los cítricos son un importante cultivo frutal en el mundo, casi 100 países productores y 6 millones de hectáreas plantadas por las franjas climáticas tropical y subtropical lo atestiguan. La mitad de esa superficie está dedicada al naranjo. Engloban a un valioso grupo de plantas cuya importancia comercial es enorme, y sus frutos, muy ricos en vitamina C, se consumen en fresco y también industrializados en forma de zumos, gajos, jaleas y mermeladas, obteniéndose además subproductos para cosmética y medicina (Zaragoza et al., 2011).

Los frutos cítricos son una fuente de importantes nutrientes, ya que contienen vitamina C, folatos, fibra dietaría entre otros compuestos bioactivos, como carotenoides y flavonoides, los cuales han surgido como responsables en la prevención del cáncer y enfermedades degenerativas (Tripoli et al., 2007). Son un gran género, en donde se incluye varias especies cultivadas como la naranja *Citrus sinensis*.

1.2. Naranja (*Citrus sinensis*)

Las naranjas son los frutos de mayor producción a escala mundial, y la producción de alimentos a partir de cítricos ha incrementado (Cháfer et al., 2005). La naranja representó aproximadamente el 55 % de la producción mundial de cítricos, tanto para la fruta fresca y el consumo de jugo de procesado (FAO, 2015). Siendo destinados a la producción de jugo concentrado.

La naranja es el fruto del naranjo dulce, árbol que pertenece al género *Citrus* de la familia de las rutáceas. El naranjo dulce (*Citrus sinensis*), cultivado desde antigüedad como árbol ornamental y para obtener fragancias de sus frutos. Estos frutos, llamados hespérides, tienen la particularidad de que su pulpa está formada por numerosas vesículas llenas de jugo. Presentan un color anaranjado, al que deben su nombre, aunque algunas especies son casi verdes cuando están maduras. Su sabor varía desde el amargo hasta el dulce, es originaria del sureste de China y norte de Birmania, aunque se la conoce en el área mediterránea desde hace aproximadamente tres mil años (Adem, 2010).

1.3. Compuestos químicos de la naranja

Estudios *in-vitro* han demostrado la alta capacidad antioxidante en jugos de naranja, debido a sus contenidos fenólicos (Kelebek, Canbas & Selli, 2008). Además contienen importantes

cantidades de los ácido hidroxicinámico, ácido ferrúlico, ácido caféico y ácido cumárico, ordenados de mayor a menor en función de su actividad antioxidante. Las naranjas son ricas en flavonoides. Los más conocidos son: hesperidina, neohesperidina, naringina, narirutina, tangeretina y nobiletina, a los cuales se les han atribuido múltiples funciones (Adem, 2010). Estudios previos realizados por Viuda, Fernandez, Sayas, Sendra y Perez (2011) en aguas de lavado de naranja ponen de manifiesto la presencia de los siguientes compuestos fenólicos: narirutina 38.91 mg/L y hesperidina 33.09 mg/L, ácido caféico 3.56 mg/L, ácido ferrulico 5.15 mg/L, ácido cumárico 1.48 mg/L, eriocitrina 2.89 mg/L, neohesperidina 2.01 mg/L.

1.4. Subproducto

Durante la producción de alimentos se generan productos que no se aprovechan, los cuales representan aproximadamente el 50 % de la masa total del fruto original (Marín et al., 2007), a los cuales se los denomina subproductos, estos no son aptos para el consumo humano, sin su ulterior procesamiento y están compuestos de pulpa agotada, cáscara y semillas.

Un número importante de subproductos tienen características nutritivas diferentes según su origen y el tipo de procesos industrial. Por lo general tienen la particularidad de ser muy concentrados en uno o más nutrientes, por lo que se deben analizar cuidadosamente para así poder combinarlos en forma correcta con otros alimentos en dietas equilibradas (INTA, 2002; Martínez et al., 2012). Además, pueden ser utilizados como aditivos alimentarios: antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, saborizantes y espesantes (Ayala-Zavala et al., 2011).

La integración de estos subproductos provenientes de la industria agroalimentaria como ingredientes en formulaciones ayudan a satisfacer las necesidades de los consumidores (Aruoma, Coles, Landes & Repine, 2012) y aportan cierto carácter funcional, incrementando la calidad del producto (Kneafsey, Dowler, Lambie, Inman & Collier, 2013).

1.5. Radicales libres

La utilización de oxígeno y otros factores de nuestra vida originan radicales libres; los cuales son moléculas caracterizadas por la presencia de un electrón desapareado en su órbita externa, lo que lo torna inestable y capaz de reaccionar inmediatamente con cualquier molécula que se encuentre a su alrededor, robando un electrón (oxidación).

Si hay un exceso de radicales libres, se crea un estrés oxidativo, el cual produce daños a los núcleos celulares originando envejecimiento precoz, cáncer, diabetes, infartos, entre otras patologías (Rosales, 2011).

1.6. Antioxidantes

Antioxidante es una molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos (Shen et al., 2017). La actividad antioxidante indica la capacidad de un compuesto bioactivo para mantener la estructura y la función celular en la limpieza efectiva de radicales libres, inhibición de reacciones de peroxidación lipídica, y prevenir daño oxidativo (Zou et al., 2016).

Hay un creciente interés en antioxidantes naturales debido al efecto protector de dietas ricas en frutas y verduras contra enfermedades crónicas y ciertos tipos de cáncer (Benavente, Castillo, Lorente, Ortuno & Del Rio, 2000). Por lo tanto, un estudio profundo de antioxidantes naturales, tales como los de frutas y verduras, es de gran importancia para la salud humana.

1.7. Compuestos fenólicos

Los polifenoles comprenden una variedad de compuestos bioactivos que son comúnmente dividido en varias clases, ácido hidroxibenzoico, ácido hidroxicinámico, antocianinas, proantocianidinas, flavonoides, estilbenos y lignanos (Zou et al., 2016).

Los compuesto fenólicos se forman a través de dos vías. La vía predominante es la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. La vía del ácido malónico es la fuente predominante de metabolitos secundarios en las plantas inferiores, hongos, y bacterias (Wildman & Wallace, 2016).

La principal fuente de antioxidantes naturales son las frutas y vegetales los cuales contienen compuestos fenólicos en abundancia. Estos compuestos están estrechamente asociados con el color y sabor de los alimentos de origen vegetal, así como con su calidad nutricional por sus propiedades antioxidantes (Wildman & Wallace, 2016).

Frutas cítricas son ricas en ácidos fenólicos, los cuales presentan diferentes niveles de captación de radicales libres y muestran propiedades antioxidantes a través de la deshidrogenación de grupos hidroxilo y el efecto de orto-sustitución en un anillo de benceno (Zou et al., 2016).

1.8. Microencapsulación

La microencapsulación se describe como una técnica en donde compuestos bioactivos son cubiertos por un biopolímero protegiéndolo del oxígeno, agua, condiciones de luz o de otro tipo, con el fin de mejorar su estabilidad y también para cambiar las soluciones líquidas a polvos para más fácil manipulación (Paz et al., 2010). Este proceso se ha utilizado para la microencapsulación de componentes alimenticios con alto contenido de antioxidantes, como el licopeno, antocianinas y polifenoles (Tonon, Brabet, Pallet, Brat & Hubinger, 2009).

Los polifenoles tienen una pobre estabilidad a largo plazo, y se ven afectados por la variación del pH, presencia de iones metálicos, luz, temperatura, oxígeno, y las actividades enzimáticas (Aizpurua-Olaizola et al., 2016). El recubrimiento del material que protege los compuestos bioactivos contra la degradación y liberación de los compuestos, ayudará a ampliar considerablemente la vida útil de los compuestos encapsulados (Aizpurua-Olaizola et al., 2016).

1.9. Maltodextrina

Los polvos de zumo de fruta obtenidos por secado por pulverización en ocasiones pueden tener problemas en sus propiedades, como pegajosidad, higroscopicidad y solubilidad, debido a la presencia de azúcares de bajo peso molecular y ácidos (Tonon, Brabet & Hubinger, 2008), lo que ocasiona que el producto se adhiera a las paredes de la cámara, conduciendo a un bajo rendimiento del producto y problemas operacionales (Tonon et al., 2008).

Este tipo de inconvenientes puede resolverse mediante la adición de agentes portadores, tales como polímeros y gomas, al producto antes de ser atomizado. Por ello en el presente trabajo se usó maltodextrina como agente encapsulante.

La maltodextrina es un almidón hidrolizado producido por la acción de ácidos o enzimas. Los almidones hidrolizados tienen las ventajas de ser bajo costo, suave en sabor, y buena protección contra oxidación (Paz et al., 2010). La maltodextrina es usada comúnmente como agente encapsulante por su alta solubilidad en agua, baja viscosidad, bajo contenido de azúcar y debido a que sus soluciones son incoloras (Mahdavi, Jafari, Assadpoor & Dehnad, 2016).

Ha sido utilizada para secado de sandía, piña, mango, dando como resultado polvos con bajo contenido de humedad, mejor solubilidad, menor higroscopicidad y mayor retención de vitamina C (Tonon et al., 2009). Por lo tanto la maltodextrina es un material portador útil para fines de microencapsulación, con el fin de proteger los alimentos o ingredientes sensibles

frente a diferentes condiciones, aumentar su estabilidad o incluso promover su liberación controlada (Tonon et al., 2009).

1.10. Digestión gastrointestinal *in-vitro*

Métodos de digestión *in-vitro* simulan los procesos de digestión, se utilizan ampliamente para estudiar el comportamiento gastro-intestinal de los alimentos y productos farmacéuticos. Estos métodos tienen la ventaja de ser más rápidos y menos costosos. La simulación de métodos de digestión incluyen la oral, gástrica e intestinales (Minekus et al., 2014). Estos métodos tratan de simular las condiciones fisiológicas en el estómago e intestino delgado (Gil et al., 2002), teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión, concentraciones de sal, entre otros factores (Minekus et al., 2014). Este método ha demostrado una buena correlación con la biodisponibilidad observada *in vivo* (Gil et al., 2002).

1.11. Fenoles totales

El método fenoles totales es una reacción colorimétrica ampliamente utilizada. Se basa en la oxidación de compuestos fenólicos con el método de Folin Ciocalteu, reactivo que contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico. El reactivo se reduce en parte, lo que resulta en la producción del complejo de tungsteno molibdeno azul, que se mide espectrofotométricamente. Esta es una técnica fácil de realizar, rápida y aplicable en el uso rutinario de laboratorio, y de bajo costo (Pelozo, Carvalho & Palazzo, 2008).

Estudios realizados en los últimos años indican que frutas y verduras son una fuente importante para la prevención de enfermedades. Entre estos productos se encuentra la naranja, la cual es una fuente rica de compuestos fenólicos, los cuales poseen acción promotora de la salud (Gil, Gil, Ferreres & Tomás, 2001).

La actividad antioxidante de los subproductos de naranja puede ser atribuido a los compuestos fenólicos y flavonoides que contienen, los cuales actúan como secuestradores de radicales gracias a su capacidad de donación de hidrógeno (Viuda et al., 2011).

Estudios realizados previamente por Gardner, White, McPhail y Duthie (2000), ponen de manifiesto un alto contenido de fenoles totales en jugos naturales de naranja de diferentes tipos en donde se hallan valores comprendidos entre 591 mg Eq. Ác. Gálico/L y 755 mg Eq. Ác. Gálico /L. Los beneficios para la salud que aporta la naranja se debe a un gran número de compuestos fenólicos con actividad biológica, los cuales previenen algunos tipos de

cáncer y enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Rodríguez, Rojas, Elez & Martín, 2013a).

1.12. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. El HPLC consta de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y un ordenador para visualizar los resultados y controlar el equipo. En este método un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema emigraran con un tiempo diferente (Harris, 2006).

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1. Muestras

Naranjas (*Citrus sinensis*) variedad valencia fueron utilizadas para cada preparación de muestra. Las cuales fueron compradas en el mercado de la localidad. Las naranjas fueron lavadas y secadas, previa a la extracción del jugo. A continuación se separó la pulpa agotada, la cual fue triturada hasta obtener un tamaño uniforme.

Para la obtención del extracto acuoso el cual será denominado agua de lavado se pesaron 600 g de pulpa agotada y se adicionaron 600 g de agua, esta preparación se calentó a 45°C durante 8 minutos. Transcurrido este tiempo se filtró, obteniendo así el extracto.

Posteriormente se tomaron 600 mL de agua de lavado y se adicionaron 60 g de maltodextrina (10 %), como agente encapsulante, mediante agitación mecánica se mezcló se mezcló durante 30 minutos a 1800 rpm.

En un atomizador Mini Spray Dryer marca Büchi modelo B-290 para secado por pulverización, se procedió a atomizar el agua de lavado. El equipo se usó con las siguientes condiciones: Temperatura de ingreso 140 °C, aspirador 100 %, bomba 20 %, con un flujo de alimentación de 5 mL/min. Una vez el equipo alcanzó la temperatura deseada se procedió a ingresar la muestra para la microencapsulación, obteniendo así el encapsulado, con el cual se fortificó un jugo comercial de naranja con 4 % de este encapsulado y se usó para posteriores análisis.

2.2. Métodos analíticos

2.2.1. Determinación de vitamina C.

La evaluación de la cantidad de vitamina C se realizó mediante el método volumétrico del 2,6-Dicloroindofenol descrito en la AOAC 45.1.14 (Horowitz & Latimer, 2005). Los reactivos que se utilizaron fueron ácido acético metafosfórico, solución de indofenol y estándar de ácido ascórbico.

Preparación de reactivos.

- **Solución patrón de ácido ascórbico:** se pesaron 10 mg de ácido ascórbico en un matraz y se disolvieron en 10 mL de agua destilada, la solución se preparó antes de usar.
- **Disolución de ácido metafosfórico - ácido acético:** se pesaron 15 g de ácido metafosfórico, los cuales se disolvieron en 40 mL de ácido acético (96 %) y se aforó en 250 mL de agua destilada. Luego se procedió a filtrar empleando un papel filtro Whatman N°1 y se guardó en refrigeración hasta su uso.

- **Disolución de indofenol:** se disolvieron 42 mg de bicarbonato de sodio en 50 mL de agua destilada, luego se adicionaron 50 mg de sal sódica del 2,6- dicloroindofenol y se agitó hasta disolver. Seguido se aforó a 200 mL con agua destilada. Se filtró y almacenó en una botella de vidrio color ámbar, en refrigeración hasta su uso.

El procedimiento para la determinación se encuentra detallada en el **Gráfico 1**, los cálculos se encuentran detallados en el **Anexo 1**. Los resultados están expresados en mg de ácido ascórbico /100 mL.

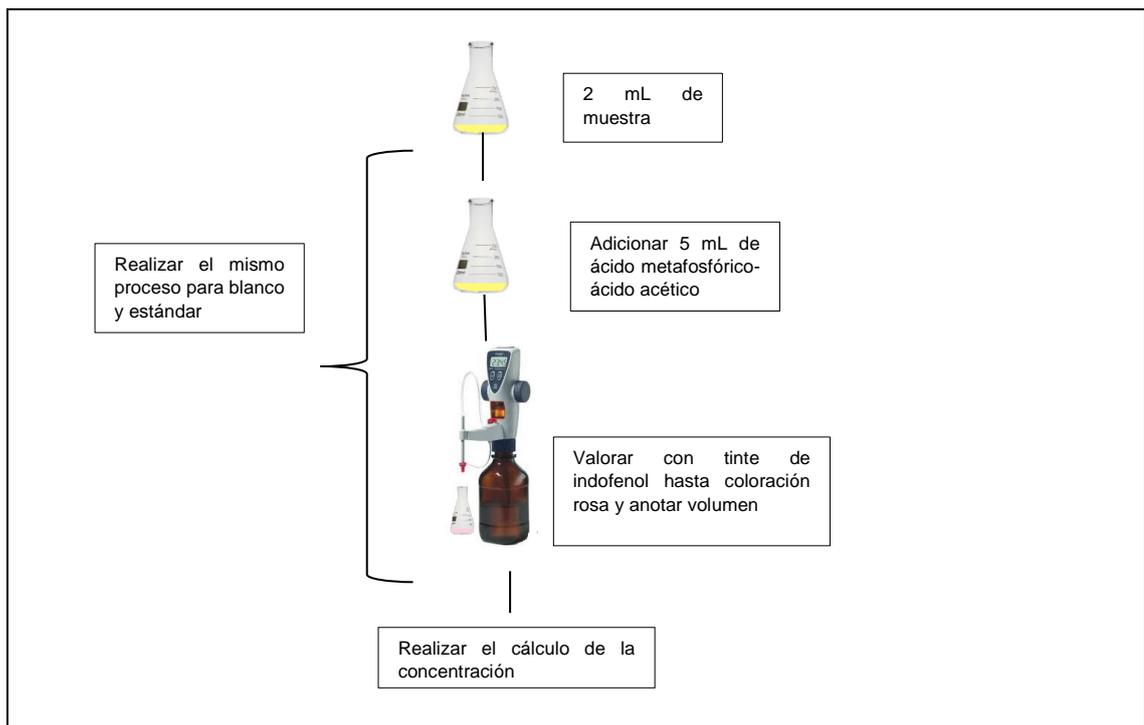


Gráfico 1. Determinación de ácido ascórbico

Fuente: Horowitz y Latimer (2005)

Elaborado por: La autora.

2.2.2. Determinación de acidez.

Para la determinación de acidez se usó el método mencionado en AOAC 37.1.37 (Horowitz & Latimer, 2005), para lo cual se usó el titulador automático. Mettler DL25, usando una solución de Hidróxido de Sodio 0.1 N. La estandarización del NaOH se realizó con Ftalato ácido de potasio. En el **Gráfico 2** se puede observar el uso del titulador automático. Los cálculos correspondientes de reactivo se encuentran en el **Anexo 2** y los de cuantificación en el **Anexo 3**.

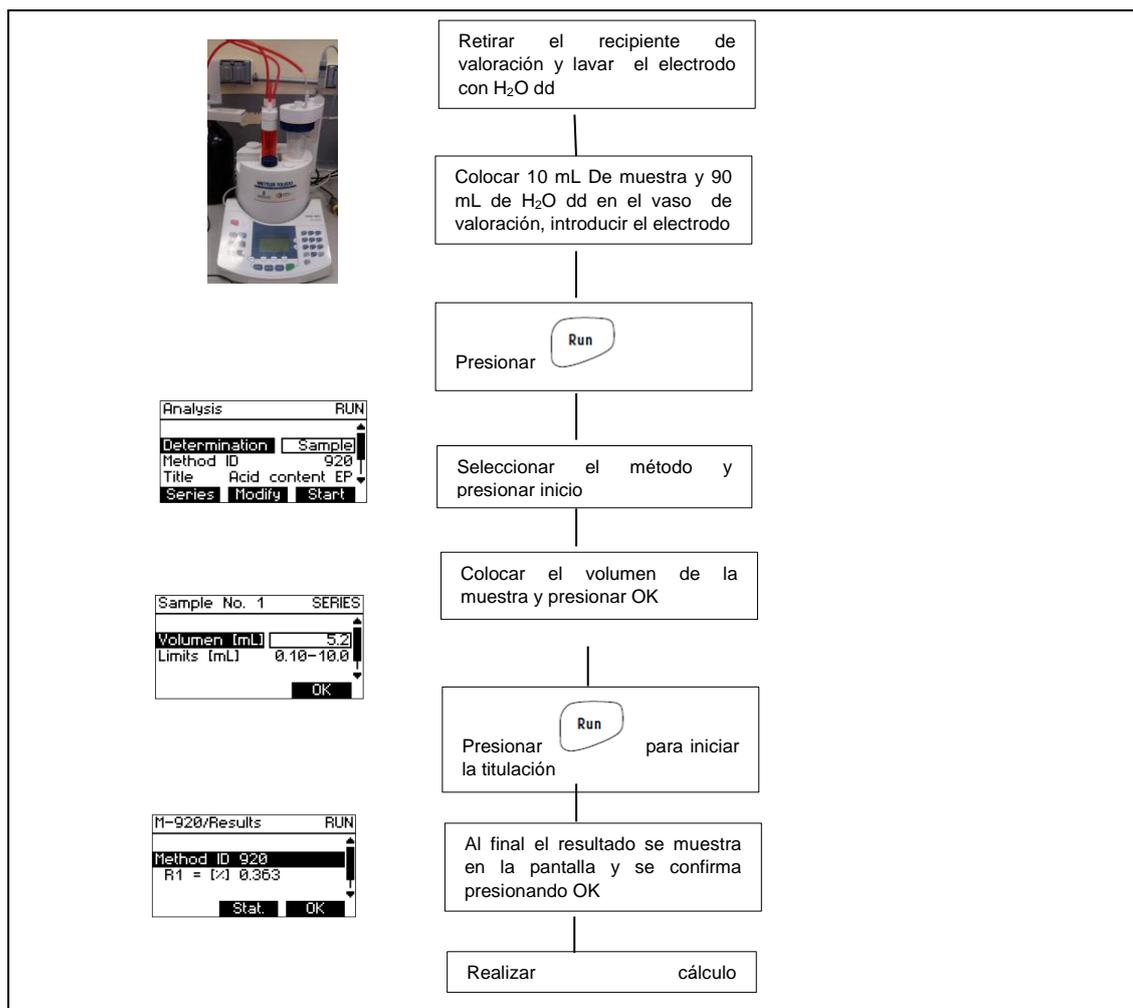


Gráfico 2. Determinación de acidez

Fuente: Horowitz y Latimer (2005) y manual de operación del titulador DL15

Elaborado por: La autora

2.3. Digestión gastrointestinal *in-vitro*

El método usado para la digestión gastrointestinal *in-vitro* es el realizado por Miller, Schricker, Rasmussen y Van Campen (1981) con modificaciones efectuadas por Gil et al. (2002) donde se realiza una fase de digestión gástrica seguida de otra fase de digestión intestinal. Los cálculos de los reactivos se pueden observar en el **Anexo 4** y el resumen de la metodología en el **Gráfico 3**.

Primeramente se preparó la pancreatina para lo cual se pesaron 0.84 g de NaHCO₃, 2.5 g de sales biliares más 0.4 g de pancreatina y se disolvieron en 100 mL de agua; para la pepsina se pesaron 4 g de pepsina se disolvieron en 25 mL de agua. Las enzimas utilizadas en la metodología se las preparó antes de cada uso.

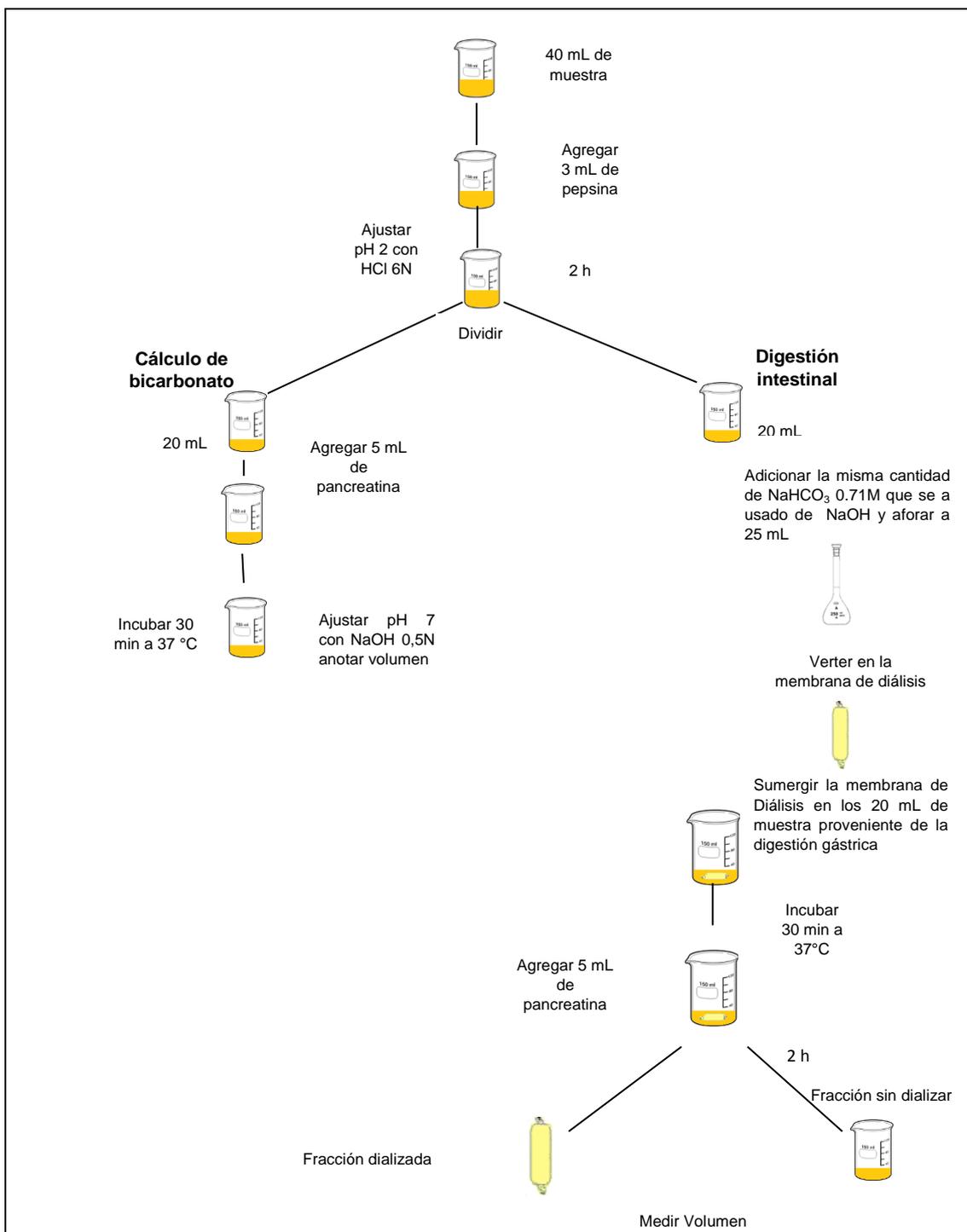


Gráfico 3. Diagrama de digestión gastrointestinal in-vitro

Fuente: Gil et al. (2002)

Elaborado por: La autor

2.4. Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales (FT) se determinó usando el método Folin-Ciocalteu, adaptado de Swain y Hillis (1959) con algunas modificaciones de Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros y Byrne (2006). El procedimiento se encuentra detallado en el **Gráfico 4**. Se

realizó una curva de calibración usando ácido gálico (0-0.1 mg/mL). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico, por cada L (mg Eq. Ác. Gálico/L). Los cálculos de los reactivos se encuentran en el **Anexo 5** y los cálculos de la cuantificación de FT en el **Anexo 6**.

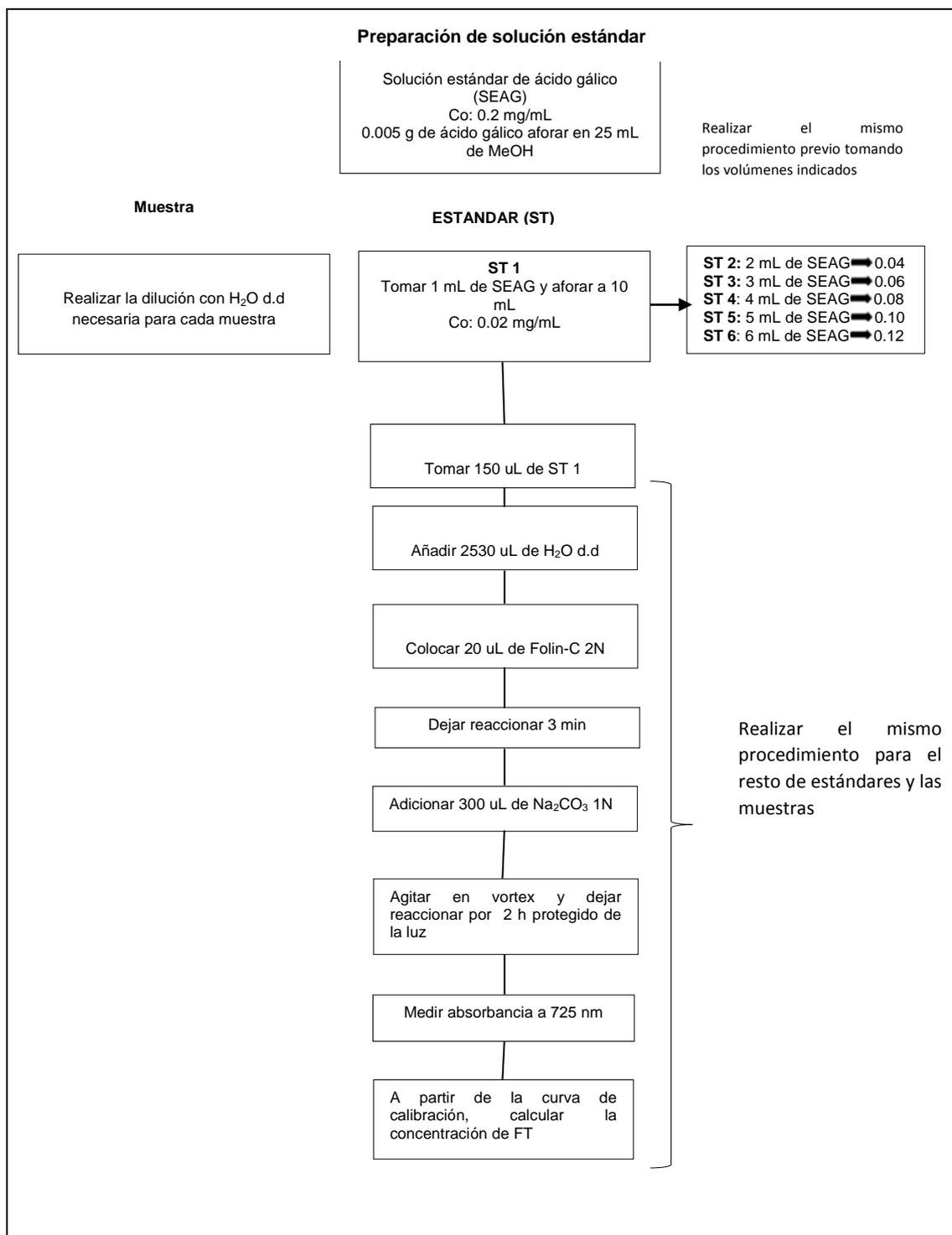


Gráfico 4. Diagrama de determinación de fenoles totales

Fuente: Thaipong et al. (2006)

Elaborado por: La autora

2.5. Estabilidad antioxidante

La estabilidad antioxidante de las muestras en las fases de digestión gastrointestinal *in-vitro* se determinó mediante la **Ecuación 1**. En donde se tomó como 100 % el contenido fenólico de la fracción sin digerir. Los cálculos se encuentran detallados en el **Anexo 7**.

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

Ecuación 1 Estabilidad antioxidante

2.6. Identificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos en las muestras se determinaron utilizando el método descrito por Nantitanon, Yotsawimonwat y Okonogi (2010), con algunas modificaciones realizadas por Jara (2014). Los análisis se realizaron en el equipo de HPLC Waters modelo 2596, con detector de arreglo de diodos Waters modelo 996, un sistema de bombas cuaternario y software, se utilizó una columna empacada C18 de fase reversa con diámetro 250 mm x 4.6 mm, con un diámetro interno de 5 µm. Para la separación se usó un gradiente de ácido acético-agua (5:95, v/v) como disolvente A y ácido acético-agua (95:5 v/v) con acetonitrilo (50:50, v/v) como disolvente B. El proceso se realizó a temperatura ambiente.

2.6.1. Preparación de estándares.

Se pesaron 0.002 g aproximadamente de cada estándar y se aforó a 1500 µL de MeOH, en la **Tabla 1** se muestran los estándares utilizados. Se calculó la concentración de cada uno y se realizó una solución mix con todos los estándares a una concentración de 100 ppm y a partir de este se prepararon soluciones mix de 1, 5, 10, 20 y 30 ppm. Los cálculos se encuentran en el **Anexo 8**.

Tabla 1. Lista de estándares inyectados

Estándar
Ácido Cumárico
Neohesperidina
Ácido Ferrúlico
Hesperidina

Eriocitrina
Ácido caféico
Ácido Trans cinámico
Epicatequina
Catequina
Ácido Clorogénico
Ácido Gálico

Elaborado por: La autora

Todos los estándares fueron adquiridos a casa comercial SIGMA-ALDRICH.

2.6.2. Cuantificación de los compuestos fenólicos en las muestras.

Las muestras obtenidas en los apartados anteriores fueron centrifugadas previamente durante 3 minutos a 1500 rpm, se separó el sobrenadante y centrifugó nuevamente con las mismas condiciones, luego se tomó el sobrenadante y se lo pasó por filtros Millipore Millex-GV de 0.22 μm previo a su inyección, las muestras y estándares se colocaron en el congelador hasta su análisis. Los cálculos de la concentración se encuentran detallados en el **Anexo 9**.

2.7. Análisis estadístico

El análisis y la comparación de medias se realizó mediante el programa Minitab® Statistical Software, versión 16. Los datos obtenidos de vitamina C, acidez y fenoles totales se analizaron por el análisis de varianza unidireccional. La prueba de Turkey se usó para comparar las medias, diferencia significativa se consideró valores de $p < 0.05$. Los resultados del análisis de varianza se muestran en el **Anexo 10**.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Caracterización del jugo de naranja comercial

3.1.1. Análisis de contenido de ácido ascórbico.

La valoración de ácido ascórbico (AA) con 2,6-diclorofenol-indofenol es un método fácil y rápido, por lo que ha sido ampliamente utilizado no sólo en los productos alimenticios, sino también en productos farmacéuticos, entre otros (Meléndez, Vicario & Heredia, 2007). Se evaluó el contenido de AA en jugo comercial de naranja y en el jugo comercial enriquecido.

Tabla 2. Contenido de vitamina C

Muestra	Vit. C (mg / 100 mL)
Jugo comercial	13.1 ± 0.2 ^a
Enriquecido 4 %	35.1 ± 1.1 ^b

Letras diferentes muestran diferencia significativa $p < 0.05$

Elaborado por: La autora

Los resultados obtenidos nos indican que el jugo comercial enriquecido presenta un aumento ($p < 0.05$) de aproximadamente 2 veces más AA que el jugo comercial (ver **Tabla 2**). Por lo tanto la adición del subproducto al jugo comercial ayudó a potenciar el contenido de AA, mejorando así su calidad.

La concentración de AA del jugo comercial en comparación con otros jugos comerciales de naranja no es muy diferente, por ejemplo Meléndez et al. (2007) obtienen un contenido de AA de 19.6 mg/100 mL, cabe recalcar que en este caso los jugos comerciales son concentrados puros de naranja, a diferencia del jugo comercial usado en el presente trabajo de titulación, el cual es una mezcla de pulpa, agua y otros ingredientes. Por lo que se puede atribuir la razón para la diferencia de AA encontrado. Cabe indicar el contenido de AA del jugo de naranjas también puede ser afectado por diversos factores como: variedad, composición mineral del suelo, madurez, y factores climáticos (Meléndez et al., 2007). Al enriquecer el jugo se observa un aumento de la concentración de AA, cual es cercano a la concentración obtenida por Remini et al. (2015) de jugo de naranja natural, donde obtuvieron 42.6 mg/100 mL.

3.1.2. Análisis de determinación de acidez titulable.

En la **Tabla 3** se muestra la acidez titulable (AT) tanto del jugo comercial como del jugo enriquecido, los resultados obtenidos demuestran que existe una pequeña diferencia ($p < 0,05$) entre estas dos muestras, por lo tanto la concentración de acidez es estable al enriquecer el jugo con el subproducto, cabe recalcar que en este caso el jugos comercia es una mezcla de pulpa agua y otros ingredientes y el jugo de naranja es natural. Es decir no ha pasado por ningún proceso.

Tabla 3. Determinación de acidez

Muestra	Acidez (g Eq. Ac Cítrico / 100 g)
Jugo comercial	0.55 ± 0.001^a
Adicionado 4 %	0.6 ± 0.004^b

Letras diferentes muestran diferencia significativa $p < 0.05$

Elaborado por: La autora

Los valores encontrados presentan una diferencia mínima en comparación a estudios anteriores realizados por Wibowo et al. (2015), en donde analizan jugo de naranja y obtienen una AT de 0.7 g Eq. Ac Cítrico/100 g. La diferencia entre estos valores puede ser debido a que la acidez es un parámetro fuertemente afectado por factores climáticos durante el crecimiento de la fruta (Dorey, Fournier, Léchaudel & Tixier, 2016). Si bien existe diferencia significativa entre la concentración de ácido cítrico entre el jugo comercial y el jugo enriquecido, el incremento es de únicamente 0.05 g Eq. Ác. Cítrico/100 g.

3.2. Análisis del contenido de fenoles totales

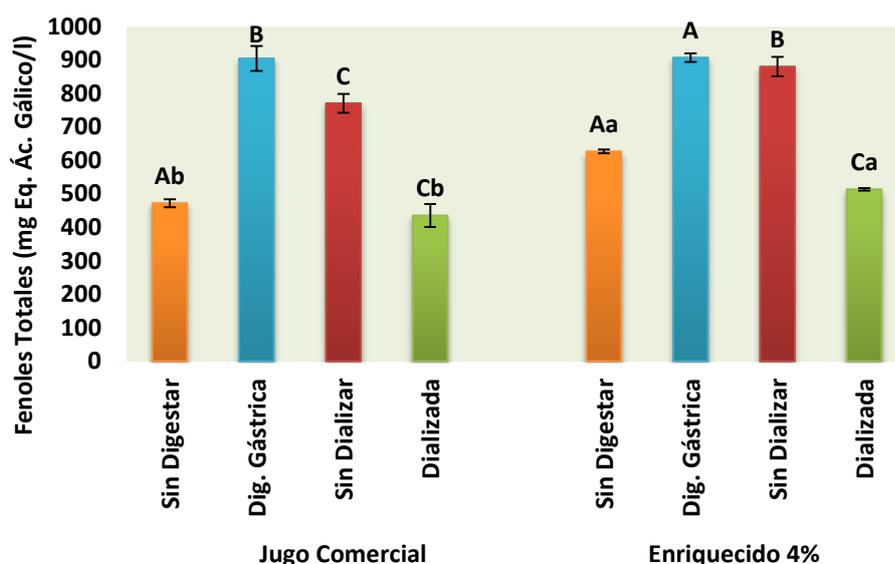
En el presente estudio se determinó el efecto de la digestión gastrointestinal *in-vitro* sobre los compuestos fenólico en jugo de naranja con adición de subproducto.

3.2.1. Cuantificación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales (FT) obtenido en el jugo de naranja comercial (0.47 mg Eq. Ác. Gálico/mL) ver **Figura 1**, es menor que el contenido de FT de jugos naturales de diferentes tipos de naranja analizados por Gardner et al. (2000), en donde obtiene valores comprendidos entre 0.591 y 0.755 mg Eq. Ác. Gálico/mL. Esta diferencia puede ser debido

a la composición del jugo comercial, y a los tratamientos tecnológicos utilizados para la producción del jugo comercial (Gil et al., 2001), así como a las condiciones en las que se encontraba la fruta y variedad (Fazzari et al., 2008).

Con respecto al contenido de FT de las muestras sin digerir (**Figura 1**), podemos observar que la adición del 4 % de subproducto de extracto acuoso de pulpa agotada permite que el contenido de fenoles totales aumente ($p < 0.05$) considerablemente en un 32 % comparado con el jugo comercial. Siendo el valor del jugo enriquecido (0.63 mg Eq. Ác. Gálico/mL) muy similar a los valores obtenidos por Gardner et al. (2000) para jugo natural de naranja con valores comprendidos entre 0.591 a 0.755 mg Eq. Ác. Gálico/mL respectivamente. Estos resultados nos indican que la adición del subproducto está potenciando el contenido de FT y aportando cierto carácter funcional al ser incorporado en el jugo (Kneafsey et al., 2013).



Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de fenoles totales entre las diferentes fases de digestión para cada muestra. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de fenoles totales de las etapas de digestión (sin digerir y dializada) entre muestras.

Figura 1. Contenido fenólico de jugo comercial y jugo enriquecido (mg Eq. Ac. Gálico/mL).

Con respecto al contenido de FT de la digestión gástrica podemos observar un efecto considerable en el contenido de fenoles totales. En las muestras de jugo comercial y jugo comercial enriquecido existió un aumento ($p < 0.05$) del 92 % y 45 % respectivamente. Pero al comparar las concentraciones de estos dos jugos en la fase gástrica, no se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$), de esta forma podemos comprobar que el encapsulado

está cumpliendo su función, es decir permite que los compuestos fenólicos resistan a las condiciones que se encuentran durante la fase gástrica y evita la liberación completa de los compuestos fenólicos presentes durante esta fase de digestión. En esta fase existe una mayor liberación de compuestos fenólicos, debido a algunos factores como el efecto del ácido gástrico (Pérez, Gil-Izquierdo & García, 2002) y actividad enzimática (Rodríguez, Rojas, Elez & Martín, 2013b). Estudios realizados por Wootton, Moran y Ryan (2011) y Rodríguez et al. (2013b) en leche de soya obtienen un aumento del contenido fenólico del 70 %. Estos resultados ponen en manifiesto que el contenido fenólico está disponible en la fase gástrica (Rodríguez, Rojas, Elez & Martín, 2014), lo cual se logra por la liberación de los compuestos fenólicos (Bouayed et al., 2011). Por lo que Liyana y Shahidi (2005) sugieren que las condiciones gástricas aumenta la capacidad de extracción de compuestos fenólicos. Por lo tanto luego de los resultados obtenidos se puede decir que el agente encapsulante ayuda a proteger los compuestos fenólicos presentes a las condiciones en las que se someten, evitando así su descomposición.

La concentración de fenoles totales en la fase intestinal sin dializar disminuyó ($p < 0.05$) un 29 % y 5 % para el jugo comercial y jugo enriquecido respectivamente, en comparación con la fase gástrica. Lo mismo sucedió en el estudio realizado por (Rodríguez et al., 2013a), en donde se analiza jugo de mezcla de frutas y se puede observar una disminución del contenido fenólico en la fase intestinal sin dializar del 14 %. Esta disminución de FT nos puede indicar la inestabilidad de estos compuestos fenólicos a condiciones alcalinas del tracto intestinal, esto probablemente se puede atribuir a la susceptibilidad a degradación oxidativa, polimerización, transformación y formación de complejos con proteínas, iones metálicos y fibras (He et al., 2016).

Por otro lado en la fase intestinal dializada se encontró una disminución ($p < 0.05$) de 44 % y 42 % tanto para jugo comercial como para jugo enriquecido, en comparación con la fase intestinal sin dializar, Rodríguez et al. (2014) obtienen una disminución muy marcada del 72 % en jugo de frutas. Rodríguez et al. (2013a) sugieren que la disminución de la concentración en la fase intestinal dializada puede ser a causa de interacciones entre compuestos fenólicos y otros constituyentes, favoreciendo a la formación de complejos con baja solubilidad o elevado peso molecular, que no pueden cruzar la membrana de diálisis, por lo tanto se obtiene una disminución del contenido fenólico.

3.3. Análisis de estabilidad

En el presente estudio se obtuvo una bioaccesibilidad del 92 y 82 % respectivamente para el jugo comercial y el jugo enriquecido (ver **Figura 2**) en función al contenido de fenoles totales. La bioaccesibilidad obtenida es alta en comparación con otros estudios realizados

por Rodríguez et al. (2013a) en jugo de mezcla de frutas y Gil et al. (2001) en jugo de naranja donde obtienen una bioaccesibilidad del 11.5 % y 36 % respectivamente. La interacción de azúcares propios del jugo comercial o compuestos de la dieta con los compuestos fenólicos, podría tener un papel protector durante el transcurso de la digestión, afectando así la solubilidad y bioaccesibilidad (Martínez, Pinazo, Heredia & Andrés, 2017; Rodríguez et al., 2013b)

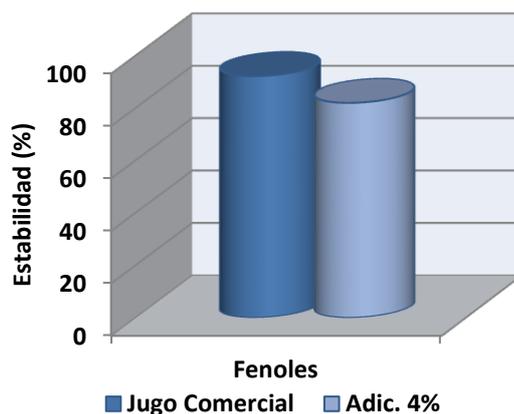


Figura 2. Análisis de estabilidad de la digestión intestinal dializada
 Elaborado por: La autora

Los resultados detallados en la **Figura 2** nos muestran una pequeña disminución de la estabilidad en el jugo enriquecido, esto puede ser a causa del tipo de agente encapsulante, así como las características de la emulsión y condiciones de atomización como la temperatura de entrada y salida, flujo de aire y humedad (Mahdavi et al., 2016).

Si bien la bioaccesibilidad del jugo enriquecido es menor en comparación con el jugo comercial, por otro lado se ha obtenido una concentración de fenoles totales mayor 0.63 mg Eq. Ác. Gálico/mL, que la del jugo comercial 0.47 mg Eq. Ác. Gálico/mL. Este aumento es debido a que al enriquecer el jugo con subproducto, este aumenta el contenido fenólico, así como la microencapsulación está cumpliendo con la función de proteger los compuestos contra degradación.

3.4. Determinación de compuestos fenólicos

De los estándares detallados en la tabla 2, sólo se encontró hesperidina (4'-methoxy-3',5,7-trihydroxyflavanone-7-rutinoside) con un tiempo de retención de 35.25 min en jugo comercial

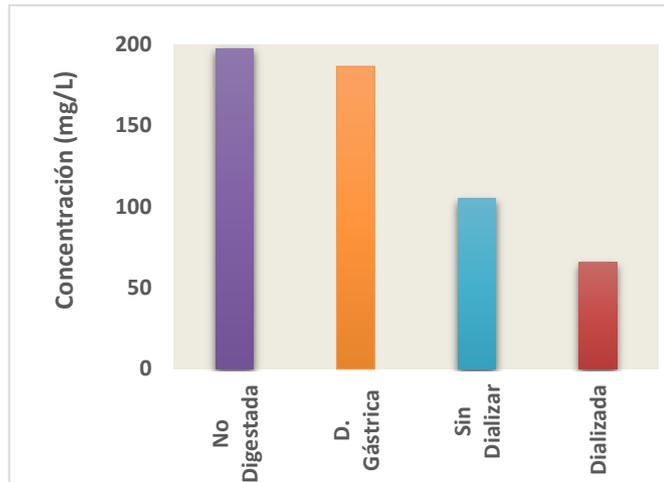


Figura 3. Contenido de hesperidina jugo comercial

Elaborado por: La autora

La **Figura 3** muestra la concentración del compuesto hesperidina durante las diferentes fases de digestión gastrointestinal *in-vitro*. El valor encontrado para hesperidina en el jugo comercial sin digerir (197 mg/L) fue similar a valores encontrados por Kelebek, Selli, Canbas y Cabaroglu (2009) en jugo de naranja, donde obtuvieron 171.17 mg/L, el contenido de hesperidina se puede ver afectado, debido a los tratamientos tecnológicos durante la producción del jugo comercial, o a las características de la naranja usada en la producción del jugo como el cultivo, condiciones ambientales, almacenamiento, entre otras (Gil et al., 2001). La literatura también informa que el contenido de hesperidina en el jugo de naranja depende del método de extracción y almacenamiento (Kelebek et al., 2009). Cabe indicar que el análisis se realizó únicamente mediante una purificación mediante filtros de disco, sin extracción con algún solvente o dilución previa.

Luego de la digestión gastrointestinal *in-vitro* no se observa una variación muy marcada entre el jugo sin digerir y la digestión gástrica, en donde se han obtenido una concentración de 186 mg/L, disminuyendo en 6 % la concentración. Similares resultados se obtienen en análisis realizados por Rodríguez et al. (2013a) donde obtuvieron una disminución del 7 % para el mismo compuesto. Estos resultados obtenidos nos indican que el contenido de hesperidina no se altera durante el tratamiento con pepsina y la acidificación del medio (Gil et al., 2001).

El contenido de hesperidina en el jugo luego de la digestión intestinal sin dializar se observa una disminución del 44 % de la concentración en comparación con la digestión gástrica. Rodríguez et al. (2013a) obtuvieron una disminución menor del 24 %. Esta disminución nos muestra la inestabilidad del compuesto a pH alcalino, ya que se producen reacciones de

oxidación y polimerización con productos químicos, y forman derivados fenólicos que no se pueden absorber como las chalconas (Rodríguez et al., 2013a).

Por otro lado en la fase intestinal dializada se observa una disminución del 37 % en comparación con la fase intestinal sin dializar Rodríguez et al. (2013a), obtuvieron una disminución mayor del 73 %. La disminución que se presenta en la fase intestinal dializada puede ser debido a la concentración de azúcares y sales presentes, ya que pueden afectar la difusión de compuestos fenólicos a través de esta membrana (Gil et al., 2002).

En el presente ensayo se ha obtenido una bioaccesibilidad del 33 %, la cual es mayor que la encontrada en estudios de Rodríguez et al. (2013a) en jugo de frutas, donde obtiene 18.4 %. Estos resultados nos indican que hay mayor cantidad de compuestos biodisponibles para absorción a través de la barrera intestinal (Saura, Serrano & Goñi, 2007).

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en el presente estudio nos indican que se ha logrado extraer los compuestos fenólicos de la pulpa agotada de naranja y se ha demostrado que la microencapsulación con maltodextrina hace posible la protección de compuestos fenólicos contra degradación del medio gástrico.
- El jugo enriquecido presenta una concentración de 62.6 mg Eq. AC Gálico/100 mL y el jugo comercial 47.2 6 mg Eq. AC Gálico 100 mL El enriquecimiento del jugo comercial con 4 % de microencapsulado, demostró que aumenta en un 32 % la concentración de fenoles totales en comparación con el jugo comercial.
- La evaluación de la digestión gastrointestinal *in-vitro* sobre los compuestos fenólicos de jugo de naranja y jugo de naranja enriquecido, pone de manifiesto que los compuestos fenólicos son estables durante la fase gástrica e inestable durante la fase intestinal, siendo la fase intestinal dializada donde se presenta menor contenido fenólico tanto en jugo comercial como para enriquecido 43.5 y 51.3 mg Eq. AC Gálico/100 mL respectivamente. Obteniendo una bioaccesibilidad de 92 % y 82 %.
- El jugo comercial enriquecido presentó menor estabilidad que el jugo comercial, sin embargo en el contenido de fenoles totales se observa un aumento significativo en el jugo enriquecido, por lo tanto pueden ser considerados una fuente de compuestos bioactivos gracias al aumento de FT.

RECOMENDACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS

- Al momento de realizar la pancreatina se recomienda calentar agua a 37 °C y adicionar la pancreatina para que se disuelva en su totalidad y no se presente la formación de grumos.
- Al final de la digestión sería recomendable dejar enfriar las muestras digestadas para que no se presenten perdidas al medir su volumen.
- Para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se recomienda inyectar más estándares como naringina.

BIBLIOGRAFÍA

- Adem, A. (2010). Naranja. Recuperado de http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/naranja_tcm7-315340.pdf
- Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2016). Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food Chemistry*, 190, 614-621.
- Aruoma, O. I., Coles, L. S., Landes, B., & Repine, J. E. (2012). Functional benefits of ergothioneine and fruit and vegetable-derived nutraceuticals: Overview of the supplemental issue contents. *Preventive Medicine*, 54, S4-S8.
- Ayala-Zavala, J., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J., Siddiqui, M. W., . . . González-Aguilar, G. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874.
- Benavente, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., & Del Rio, J. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457-462.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21.
- Cháfer, M., Ortolá, M., Chiralt, A., & Fito, P. (2005). Aprovechamiento alimentario de la corteza de naranja por técnicas de impregnación a vacío. *Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos*. <http://fci.uib.es/Servicios/libros/conferencias/seae/Aprovechamiento-alimentario-de-la-corteza-de.cid221911>
- Denny, A., & Buttriss, J. (2007). Plant foods and health: focus on plant bioactives. *Synthesis report*, 4, 1-64.
- Dorey, E., Fournier, P., Léchaudel, M., & Tixier, P. (2016). A statistical model to predict titratable acidity of pineapple during fruit developing period responding to climatic variables. *Scientia Horticulturae*, 210, 19-24.
- Esfanjani, A. F., & Jafari, S. M. (2016). Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 532-543.
- Fallico, B., Ballistreri, G., Arena, E., Brighina, S., & Rapisarda, P. (2017). Bioactive compounds in blood oranges (*Citrus sinensis (L.) Osbeck*): Level and intake. *Food Chemistry*, 215, 67-75.

- FAO. (2015). Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s0z.htm#bm35.1>
- Fazzari, M., Fukumoto, L., Mazza, G., Livrea, M. A., Tesoriere, L., & Marco, L. D. (2008). *In-vitro* bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3561-3568.
- Gardner, P. T., White, T. A., McPhail, D. B., & Duthie, G. G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68(4), 471-474.
- Gil, A., Gil, M. I., Ferreres, F., & Tomás, F. A. (2001). *In-vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 1035-1041.
- Gil, A., Zafrilla, P., & Tomás, F. A. (2002). An *in-vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, 214(2), 155-159.
- Goñi, I., & Hervert-Hernandez, D. (2011). *By-Products from plant foods are sources of dietary fibre and antioxidants*. España: INTECH Open Access Publisher.
- Harris, D. C. (2006). *Análisis químico cuantitativo* (Tercera Edición ed.). España: Reverté.
- He, Z., Tao, Y., Zeng, M., Zhang, S., Tao, G., Qin, F., & Chen, J. (2016). High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect *in-vitro* bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. *Food Chemistry*, 200, 107-116.
- Horowitz, W., & Latimer, G. (2005). *AOAC official methods of analysis* (18 ed.). Estados Unidos: Association of Official Analytical Chemists.
- INTA. (2002). Los subproductos agroindustriales en la alimentación Recuperado de http://www.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/subproductos_suplementacion.pdf
- Jara, S. (2014). *Potencial antioxidante de los subproductos agroindustriales de mango (Mangifera indica L.)*. (Trabajo de fin de titulación), Universidad Técnica particular de Loja, Loja.
- Kelebek, H., Canbas, A., & Selli, S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry*, 107(4), 1710-1716.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187-192.

- Kneafsey, M., Dowler, E., Lambie, H., Inman, A., & Collier, R. (2013). Consumers and food security: Uncertain or empowered? *Journal of Rural Studies*, 29, 101-112.
- Liyana, C., & Shahidi, F. (2005). Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum L.*) as affected by gastric pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2433-2440.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379-385.
- Marín, F., Soler, C., Benavente, O., Castillo, J., & Pérez, J. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, 100(2), 736-741.
- Martínez, R., Pinazo, A., Heredia, A., & Andrés, A. (2017). Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by *in-vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 214, 478-485.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez, J. A., & Viuda, M. (2012). Chemical, technological and *in-vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, 135(3), 1520-1526.
- Meléndez, A., Vicario, I., & Heredia, F. (2007). Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain. *Food Chemistry*, 101(1), 177-184.
- Miller, D., Schriker, B., Rasmussen, R., & Van Campen, D. (1981). An *in-vitro* method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248-2256.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Dupont, D. (2014). A standardised static *in-vitro* digestion method suitable for food an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124.
- Moser, P., Nicoletti, R., Neves, N., García, E., Gómez, S., & Hermosín, I. (2017). Storage stability of phenolic compounds in powdered brs Violeta grape juice microencapsulated with protein and maltodextrin blends. *Food Chemistry*, 214, 308-318.
- Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., & Okonogi, S. (2010). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *Food science and technology*, 43(7), 1095-1103.

- Palafox, C. H., Ayala, J. F., & González, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), R6-R15.
- Paz, R., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7), 1386-1394.
- Pelozo, M. I., Carvalho, M. L., & Palazzo, J. C. P. (2008). Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(3), 447-451.
- Pérez, A., Gil-Izquierdo, A., & García, C. (2002). *In-vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.
- Remini, H., Mertz, C., Belbahi, A., Achir, N., Dornier, M., & Madani, K. (2015). Degradation kinetic modelling of ascorbic acid and colour intensity in pasteurised blood orange juice during storage. *Food Chemistry*, 173, 665-673.
- Rodríguez, M., Rojas, M., Elez, P., & Martín, O. (2013a). Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in-vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1859-1867.
- Rodríguez, M., Rojas, M., Elez, P., & Martín, O. (2013b). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in-vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206-212.
- Rodríguez, M., Rojas, M., Elez, P., & Martín, O. (2014). *In-vitro* bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice-and milk-based beverages. *Food Research International*, 62, 771-778.
- Rosales, R. (2011). Radicales libres y antioxidantes Recuperado de http://biosalud.saber.ula.ve/db/ssalud/edocs/articulos/Radicales_antioxidantes.pdf
- Saura, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- Shen, M., Zhang, F., Hong, T., Xie, J., Wang, Y., Nie, S., & Xie, M. (2017). Comparative study of the effects of antioxidants on furan formation during thermal processing in model systems. *Food Science and Technology*, 75, 286-292.
- Swain, T., & Hillis, W. (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.

- 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), 669-675.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3), 411-418.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., & Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(10), 1950-1958.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*, 104(2), 466-479.
- Viuda, M., Fernandez, J., Sayas, E., Sendra, E., & Perez, J. a. (2011). Physicochemical characterization of the orange juice waste water of a citrus by-product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(2), 264-271.
- Wibowo, S., Grauwet, T., Santiago, J., Tomic, J., Vervoort, L., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2015). Quality changes of pasteurised orange juice during storage: A kinetic study of specific parameters and their relation to colour instability. *Food Chemistry*, 187, 140-151.
- Wildman, R. E., & Wallace, T. C. (2016). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Londres: CRC press.
- Wootton, P., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in-vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217-224.
- Zaragosa, S., Pina, J., Forner, M., Navarro, L., Medina, A., Soler, G., & Chome, P. (2011). Las variedades de los citricos. Recuperado de <http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/Variedades de Citricos primeras p%C3%A1ginas tcm7-212147.pdf>
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885-896.

ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de ácido ascórbico

1. Datos de cuantificación de Ácido ascórbico

Muestra	Rep	Vm (mL)	V Ác. M (mL)	V Gastado (mL)	Conc F	mg AA/mL	mg AA/ 100 mL	PROM (mg/100 mL)
Jugo Comercial	1	2	5	3.44	0.084	0.133	13.347	13.38
	2	2	5	3.34	0.084	0.129	12.929	
	3	2	5	3.44	0.084	0.133	13.347	
Adición 4 %	1	2	5	8.9	0.084	0.362	36.192	35.077
	2	2	5	8.4	0.084	0.341	34.100	
	3	2	5	8.6	0.084	0.349	34.937	

2. Cálculo de contenido de Ácido ascórbico en jugo comercial

Concentración F

Conc F

$$= \frac{\text{mg de AA en volumen de la solución estándar titulada}}{[(\text{mL promedio para titular los estándares}) - (\text{mL promedio para titular los controles})]}$$

$$\text{Conc F} = \frac{\left(\frac{2 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}\right) * 2 \text{ mL}}{[(5.03 \text{ mL}) - (0.25 \text{ mL})]}$$

$$\text{Conc F} = 0.084$$

Vgb= volumen gastado de blanco

Vgm= volumen gastado de muestra

V= volumen inicial de la solución a ensayar

Y= volumen inicial de la alícuota a ensayar

$$AA = (Vgm - V gb) * \left(\frac{\text{Conc F}}{2}\right) * \left(\frac{V}{Y}\right)$$

$$AA = (3.44 \text{ mL} - 0.25 \text{ mL}) * \left(\frac{0.084 \text{ mg}}{2}\right) * \left(\frac{2 \text{ mL}}{2 \text{ mL}}\right)$$

$$AA = 0.133 \text{ mg/mL}$$

mg de ácido ascórbico por cada 100 mL

0.133 mg.....1 mL

X= 13.34 mg 100 mL

Anexo 2. Preparación de reactivo para la determinación de acidez

Hidróxido de sodio 0.5 N 100 mL

40 g NaOH.....1 N

X= 4 g 0.1 N

4 g NaOH.....1000 mL

X= 1 g 250 mL

Anexo 3. Cuantificación de acidez titulable

1. Datos de cuantificación de acidez titulable

MUESTRA	Repeticiones	Vm (mL)	V Gastado (mL)	% Acidez	Promedio (%)
Jugo Comercial	1	10	9	0.55	0.55
	2	10	9.04	0.55	
	3	10	9	0.55	
Adición 4%	1	10	9.78	0.60	0.59
	2	10	9.66	0.59	
	3	10	9.7	0.59	

2. Cálculos de acidez titulable

Cálculo de acidez titulable de jugo comercial

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(Vm * Vo) * N * W \text{ Eq Ac. Citrico} * 100}{(Vm * 1000)}$$

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(9 \text{ mL} * 0.05 \text{ mL}) * 0.096 * 64.04 * 100}{(10 * 1000)}$$

$$\% \text{ Acidez} = 0.55$$

Anexo 4. Preparación de reactivos para digestión gastrointestinal in-vitro

Hidróxido de sodio 0.5 N 100 mL

40 g NaOH.....1 N

X= 20 g NaOH 0.5 N

20 g NaOH.....1000 mL

X= 2 g NaOH 100 mL

Ácido clorhídrico 0.1 M 25 mL

36.45 HCl.....1 M

X= 3.64g HCL 0.1 M

3.64 g HCL1000 mL

X= 0.36 g HCL 100 mL

0.36 g HCL..... 32 %

X= 1.12 g HCL 100 %

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

$$V = \frac{1.12 \text{ g}}{\frac{1.19 \text{ g}}{\text{mL}}} = 0.94 \text{ mL HCl}$$

Ácido clorhídrico 6 N

36.45 HCl.....1 EQ

X= 218.7g HCL 6 EQ

218.7g HCl.....1000 mL

X= 21.87g HCL 100 mL

21.87 g HCL.....32 %

X= 68.18g HCL 100 %

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

$$V = \frac{68.18g}{\frac{1.19g}{mL}} = 57.29 \text{ mL HCl}$$

Bicarbonato de sodio 0,71 M 100 mL

84 g NaHCO₃.....1 M

X= 59.64 g NaHCO₃ 0.71 M

59.64 g NaHCO₃1000 mL

X= 5.96 g NaHCO₃ 100 mL

Anexo 5. Preparación de reactivo para la determinación de Fenoles totales

Carbonato de sodio 1 N

$$EQ = \frac{106g}{2}$$

$$EQ = 53g/mL$$

53 g.....1000 mL

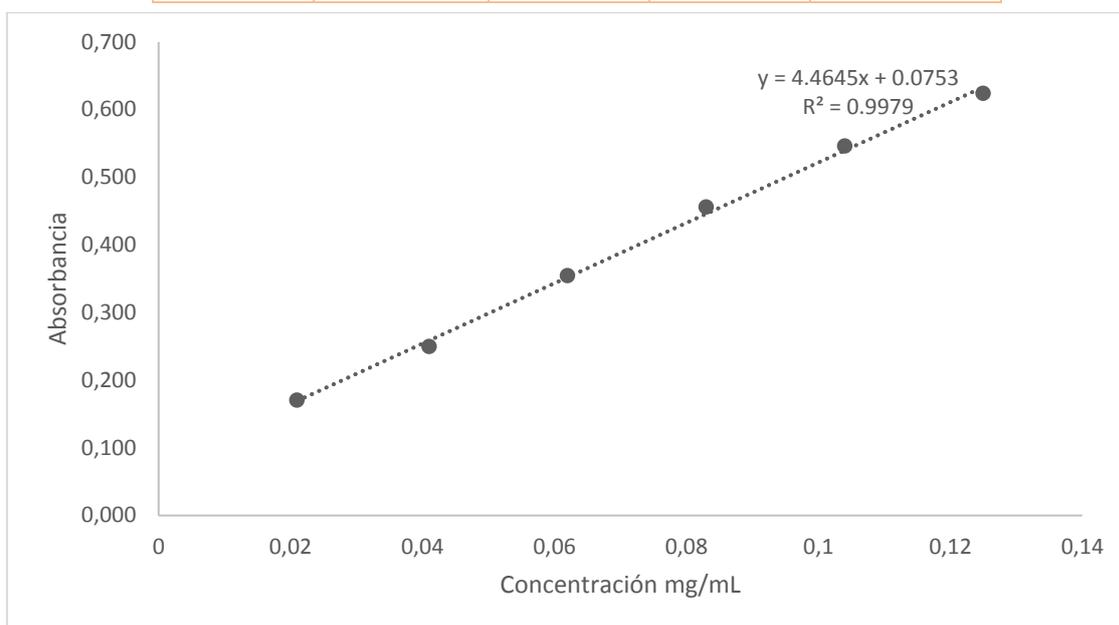
X= 2.65 g 50 mL

Anexo 6. Cuantificación de fenoles totales

1. Curva de calibración y preparación de estándares (ST) con Acido Gálico

W (g) Ácido Gálico	Aforo (mL)	Concentración (mg/mL)
0.0251	100	0.2435

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Co (mg/mL)	Absorbancia
ST 1	1	10	0.02	0.170
ST 2	2	10	0.04	0.249
ST 3	3	10	0.06	0.354
ST 4	4	10	0.08	0.471
ST 5	5	10	0.1	0.546
ST 6	6	10	0.12	0.624



Pendiente	4.48
Intersección	0.07
R	0.99

Cálculo concentración de solución estándar:

$$Co\ SEAG = \frac{m\ (g)}{v\ (mL)}$$

$$Co\ SEAG = \frac{0.0251\ g * 1000}{100\ mL}$$

$$Co\ SEAG = 0.251\ mg/mL$$

Cálculo de concentración de estándares.

$$Co\ SEAG * Vaforo = Co\ ST * VST$$

$$Co\ ST = \frac{Co\ SEAG * VST}{Vaforo}$$

$$Co\ ST = \frac{0.251\ \frac{mg}{mL} * 1\ mL}{10\ mL}$$

$$Co\ ST = 0.02\ mg/mL$$

Cálculo de cuantificación de fenoles totales en jugo comercial

$$Concentración = \frac{Absorbancia - Intersección}{Pendiente}$$

$$Concentración = \frac{0.290 - 0.0763}{4.4853}$$

$$Concentración = 0.048\ mg/mL$$

$$0,048\ mg \quad \rightarrow \quad 1\ mL$$

$$X \quad \leftarrow \quad 5\ mL$$

$$X = 0.24\ mg$$

$$\begin{array}{l} 0.24 \text{ mg} \quad \rightarrow \quad 0.5 \text{ mL} \\ X \quad \leftarrow \quad 20 \text{ mL} \\ X = 9.526 \text{ mg} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 9.526 \text{ mg} \quad \rightarrow \quad 20 \text{ mL} \\ X \quad \leftarrow \quad 1000 \text{ mL} \\ X = 476 \text{ mg / L} \end{array}$$

2. Datos de cuantificación de fenoles totales

Muestra		Absorbancia	Co (mg/mL)	FD	Volumen (mL)	Co f (mg/L)	Promedio (mg/L)	Desviación (%)	%CV	
Jugo Comercial	Sin digestar	1	0.29	0.048	10	20	476	472	12	3
		2	0.292	0.048	10		481			
		3	0.282	0.046	10		459			
	Dig. Gastrica	1	0.441	0.081	10	23	935	904	37	4
		2	0.433	0.080	10		914			
		3	0.413	0.075	10		863			
	Sin Dializar	1	0.352	0.061	10	25,5	784	770	28	4
		2	0.354	0.062	10		789			
		3	0.336	0.058	10		738			
	Dializada	1	0.263	0.042	10	19	395	435	34	8
		2	0.292	0.048	10		457			
		3	0.29	0.048	10		453			
Enriquecido 4%	Sin digestar	1	0.357	0.063	10	20	626	626	6	1
		2	0.355	0.062	10		621			
		3	0.36	0.063	10		632			
	Dig. Gástrica	1	0.425	0.078	10	23	894	907	13	1
		2	0.43	0.079	10		907			
		3	0.435	0.080	10		920			
	Sin Dializar	1	0.316	0.053	10	32	855	880	29	3
		2	0.332	0.057	10		912			
		3	0.321	0.055	10		873			
	Dilaizada	1	0.286	0.047	10	22	514	513	4	1
		2	0.284	0.046	10		509			
		3	0.287	0.047	10		517			

Anexo 7. Cálculo de estabilidad antioxidante.

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

$$\text{Estabilidad \%} = \frac{904 * 100}{472}$$

$$\text{Estabilidad \%} = 192$$

Anexo 8. Determinación de compuestos fenólicos

PREPARACIÓN DE SOLICIONES PATRÓN				
Estándar	W (g)	Pureza (%)	Vsm aforo (ul)	Csm (mg/L)
Ácido Cumárico	0.002	98	1500	1594
Neohesperidina	0.002	90	1500	1296
Ácido Ferrúlico	0.002	99	1500	1228
Hesperidina	0.001	97	1500	711
Eriocitrina	0.001	98	1500	653
Ácido Caféico	0.002	98	1500	1307
Ácido Trans cinámico	0.002	95	1500	1298
Epicatequina	0.002	90	1500	1200
Catequina	0.002	98	1500	1392
Ácido Clorogénico	0.002	96	1500	1293
Ácido Gálico	0.002	99	1500	1419

Preparación de solución mix			
Co (ppm)	V (ml)	Vf (µL)	Af. MeOH (µL)
100	1500	94	1406
100	1500	116	1384
100	1500	122	1378
100	1500	211	1289
100	1500	230	1270
100	1500	115	1385
100	1500	116	1384
100	1500	125	1375
100	1500	108	1392
100	1500	116	1384
100	1500	106	1394

Preparación de concentraciones			
Con (ppm)	V (μL)	Vf (μL)	Af. MeOH (μL)
1	1500	15	1485
5	1500	75	1425
10	1500	150	1350
20	1000	200	800
30	1000	300	700

Se presenta como ejemplo los cálculos para el estándar de hesperidina.

1. Solución patrón

$$0.0011 \text{ g} \quad \rightarrow \quad 100 \%$$

$$X \quad \leftarrow \quad 97\%$$

$$X = 0.001 \text{ g}$$

$$C_{sm} = \frac{m}{v}$$

$$C_{sm} = \frac{0.001067 \text{ g}}{1500 \mu\text{L}}$$

$$C_{sm} = 7.113 \text{ E}^{-07} \text{ g}/\mu\text{L}$$

$$C_{sm} = 6,66667 \text{ E}^{-07} \frac{\text{g}}{\mu\text{L}} * \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$

$$C_{sm} = 711 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

2. Solución mix

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ ppm} * 1500 \mu\text{L}}{711 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 211 \mu\text{L}$$

Se presenta como ejemplo la concentración del estándar de 5ppm.

Preparación de concentración 5 ppm

$$C1 V1 = C2 V2$$

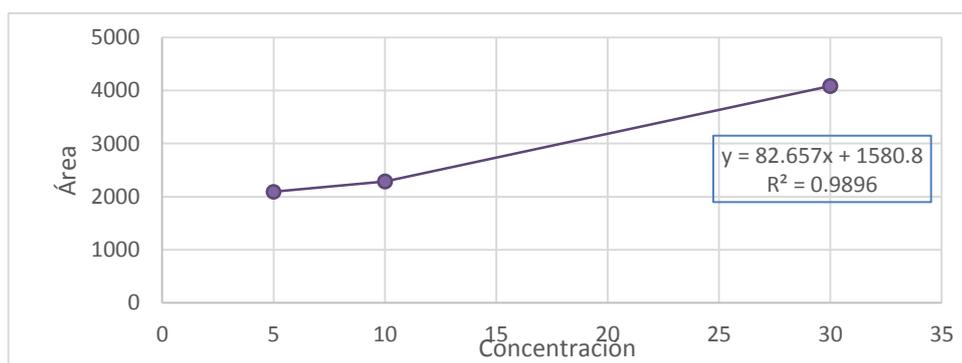
$$V2 = \frac{C1 V1}{C2}$$

$$V2 = \frac{5ppm * 1500 \mu L}{100 ppm}$$

$$V2 = 75 \mu L$$

Anexo 9. Curva de calibración hesperidina

Concentración (ppm)	Área
5	2092
10	2285
30	4085



Pendiente	82.66
Intersección	1580.81
R	0.994

Datos de cuantificación hesperidina

Muestra	Área	Co (mg/mL)	Volumen (mL)	Co f (mg/L)	
Jugo Comercial	Sin Digestar	17983	198	20	198
	D. Gástrica	15049	163	23	187
	Sin Dializar	8421	83	25.5	106
	Dializada	7318	69	19	66

Anexo 10. Resultados del diseño experimental

ANOVA unidireccional: mg AA/ 100mL vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	717.373	717.373	1229.31	0.000
Error	4	2.334	0.584		
Total	5	719.707			

S = 0.7639 R-cuad. = 99.68% R-cuad. (ajustado) = 99.59%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra	N	Media	Agrupación
Adición 4%	3	35.077	A
Jugo Comercial	3	13.208	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: % Acidez vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	0.0027780	0.0027780	344.53	0.000
Error	4	0.0000323	0.0000081		
Total	5	0.0028103			

S = 0.002840 R-cuad. = 98.85% R-cuad. (ajustado) = 98.57%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra	N	Media	Agrupación
Adición 4%	3	0.594086	A
Jugo Comercial	3	0.551051	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Inicial Fenoles vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	14.3367	14.3367	420.04	0.000
Error	4	0.1365	0.0341		
Total	5	14.4732			

S = 0.1847 R-cuad. = 99.06% R-cuad. (ajustado) = 98.82%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra	N	Media	Agrupación
JC + Adición 4%	3	12.5293	A
Jugo Comercial	3	9.4377	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Dializada Fenoles vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Muestra	1	3.695	3.695	15.51	0.017
Error	4	0.953	0.238		
Total	5	4.648			

S = 0.4880 R-cuad. = 79.50% R-cuad.(ajustado) = 74.38%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Muestra	N	Media	Agrupación
JC + Adición 4%	3	10.2670	A
Jugo Comercial	3	8.6975	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: FT JC vs. Etapas jugo comercial

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Etapas jugo comercial	3	470996	156999	180.99	0.000
Error	8	6940	867		
Total	11	477935			

S = 29.45 R-cuad. = 98.55% R-cuad.(ajustado) = 98.00%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Etapas jugo comercial	N	Media	Agrupación
Jugo Comercial - Dig. Gástrica	3	904.18	A
Jugo Comercial - Sin Dializar	3	770.31	B
Jugo Comercial - Sin Digestar	3	471.88	C
Jugo Comercial - Dializada	3	434.88	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: FT EN vs. Etapas jugo enriquecido

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Etapas jugo enriquecido	3	334035	111345	419.21	0.000
Error	8	2125	266		
Total	11	336160			

S = 16.30 R-cuad. = 99.37% R-cuad.(ajustado) = 99.13%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Etapas jugo enriquecido	N	Media	Agrupación
Enriquecido 4% - Dig. Gástrica	3	906.74	A
Enriquecido 4% - Sin Dializar	3	879.87	A
Enriquecido 4% - Sin Digestar	3	626.46	B
Enriquecido 4% - Dializada	3	513.35	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: FT JC_1 vs. Sin Dializar

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Sin Dializar	1	35841.7	35841.7	420.04	0.000
Error	4				
Total	5	36183.0			

S = 9.237 R-cuad. = 99.06% R-cuad.(ajustado) = 98.82%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Sin Dializar	N	Media	Agrupación
Enriquecido 4% - Sin Digestar	3	626.46	A
Jugo Comercial - Sin Digestar	3	471.88	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: FT EN_1 vs. Dializada

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Dializada	1	9237	9237	15.51	0.017
Error	4	2382	595		
Total	5	11619			

S = 24.40 R-cuad. = 79.50% R-cuad.(ajustado) = 74.38%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Dializada	N	Media	Agrupación
Enriquecido 4% - Dializada	3	513.35	A
Jugo Comercial - Dializada	3	434.88	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.