



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL

**Valoración *in vitro* del efecto de polvos ricos en compuestos
bioactivos procedentes de subproductos de frutas sobre la
microbiota intestinal de adultos.**

Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología

Alumna: Cristina Andrés Mora
Tutora: Noelia Betoret Valls
Cotutora: María José Gosalbes Soler

Curso: 2018/2019
Valencia, Julio 2019

RESUMEN

Valencia, Julio 2019

Valoración *in vitro* del efecto de polvos ricos en compuestos bioactivos procedentes de subproductos de frutas sobre la microbiota intestinal de adultos.

La sostenibilidad de los procesos agroindustriales exige la reutilización de los residuos generados con el fin de reducir su impacto y aprovechar y respetar al máximo los recursos naturales. En este sentido, la transformación de residuos de bajo valor en nutrientes o ingredientes para la fabricación de productos de alto valor añadido supone un reto y una oportunidad para la industria alimentaria. Los subproductos resultados de la industrialización de frutas son ricos en compuestos bioactivos (fitoquímicos y fibra), que tienen un impacto positivo sobre la salud. El presente trabajo tiene como objetivo determinar el contenido en componentes bioactivos de polvos alimenticios obtenidos por diferentes métodos de deshidratación de residuos de caqui y arándano, analizar el efecto de las diferentes etapas de digestión sobre estos componentes y determinar *in vitro* el efecto sobre la microbiota intestinal de adultos.

El trabajo se incluye dentro de una acción preparatoria de proyectos que se realiza en colaboración con FISABIO.

Palabras clave: polvos de arándano, polvos de caqui, digestión *in vitro*, fermentación colónica, antioxidantes, bioaccesibilidad.

Autora: Cristina Andrés Mora

Tutora académica: Noelia Betoret Valls

ABSTRACT

Valencia, July 2019

***In vitro* evaluation of the effect of powders rich in bioactive compounds derived from fruit by-products on the intestinal microbiota of adults.**

The sustainability of agroindustrial processes requires the reusage of the generated waste to allow the reduction of its impact and, at the same time, benefit and respect the natural resources to its maximum. In this sense, the transformation of low value waste into nutrients or ingredients that will be used to produce high value products, entails a challenge and an opportunity for the food industry. The by-products obtained in fruits' industrialization are rich in bioactive compounds (phytochemicals and fiber) that are beneficial to our health. The objectives of this project are to determine the content of bioactive components in food powders derived from different dehydration methods from persimmon and blueberry, analyze the effect of the different digestion stages over these components and determine *in vitro* the effect over the adult intestinal microbiota.

The project is included within a group of preparatory projects carried out in collaboration with FISABIO.

Key words: blueberry powder, persimmon powder, *in vitro* digestion, colonic fermentation, antioxidants, bioaccessibility.

Author: Cristina Andrés Mora

Academic tutor: Noelia Betoret Valls

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a mi familia por su apoyo incondicional y por todos los consejos recibidos durante estos cuatro años, y en especial a mi abuela y a mis padres, por enseñarme el valor de la formación académica que me ha permitido apreciar cuanto he aprendido durante la etapa universitaria.

A mis tutoras Noelia y Pepa por su implicación y profesionalidad, ya que mi esfuerzo sin vuestro apoyo y conocimiento no habrían dado el mismo fruto.

A Jaime, por comprender mi humor y estrés estos últimos meses. Aunque no viera el final del túnel tu me has animado a seguir adelante.

Agradecer también a Sergio por el día a día y por amenizar todas las largas tardes de estudio.

Y por último, a todos aquellos que con su cariño, dedicación y esfuerzo me han permitido crecer y convertirme en la persona que soy ahora.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. El aprovechamiento de subproductos de industrialización de frutas y hortalizas	1
1.1.1. Arándano	2
1.1.2. Caqui	3
1.2. El proceso de digestión	5
1.2.1. Simulación de la digestión	6
1.2.2. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad	6
1.3. La microbiota intestinal	7
2. Objetivo y Plan de Trabajo	9
3. Material y Métodos	10
3.1. Materia prima	10
3.2. Deterinaciones analíticas	10
3.2.1. Propiedades fisicoquímicas y antioxidantes	10
3.2.2. Carotenoides y antocianinas	14
3.3. Metodología de los procesos de digestión	15
3.3.1. Simulación etapa oral	15
3.3.2. Simulación etapa gástrica y etapa intestinal	16
3.3.3. Simulación etapa colónica	17
3.4. Extracción y cuantificación del DNA	18
3.4.1. Extracción	18
3.4.2. Cuantificación	18
3.5. Secuenciación e identificación de especies	18
4. Resultados y discusión	20
4.1. Propiedade fisicoquímicas y antioxidantes de los polvos	20
4.1.1. x_w , a_w , x_{ss} y solubilidad	20
4.1.2. Tamaño de partícula	20
4.1.3. Contenido en fibra	23
4.1.4. Propiedades antioxidantes	24
4.1.5. Contenido en carotenoides	26
4.1.6. Contenido en antocianinas	26
4.2. Efecto de la digestión: etapa gástrica e intestinal	27
4.2.1. Efecto sobre las propiedades antioxidantes	27
4.2.2. Efecto sobre el contenido en carotenoide del caqui	30
4.2.3. Efecto sobre el contenido en antocianinas del arándano	31
4.3. Etapa colónica	33
4.3.1. Efecto sobre el DNA bacteriano	33
4.3.2. Secuenciación	34
5. Conclusiones	36
6. Bibliografía	37
7. Anexos	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los órganos que intervienen en el proceso digestivo y sus características (Andrés, 2019).....	6
Tabla 2. Concentración de las sales en las disoluciones utilizadas para la preparación de las SFG y SIF (Minekus <i>et al.</i> , 2014).....	16
Tabla 3. Volumen (mL) de sales que se deben añadir para obtener las fases SGF y SIF (Minekus <i>et al.</i> , 2014).	16
Tabla 4. Composición del medio de fermentación empleado en la fase fermentativa de la etapa colónica Olano-Martin <i>et al.</i> , (2000).	17
Tabla 5. Valores de la humedad (X_w (g _w /g)), actividad del agua (a_w), fracción másica de sólidos solubles (X_{ss} (g _{ss} /g)) y solubilidad (%) de los polvos de caqui y arándano, liofilizados (LIO) y secados por aire caliente (SAC). Media \pm desviación estándar.	20
Tabla 6. Valores de D [4,3], D [3,2], d_{10} , d_{50} y d_{90} de los polvos de caqui y arándano, liofilizados y deshidratados, por vía seca. Media \pm desviación estándar.	21
Tabla 7. Valores de D [4,3], D [3,2], d_{10} , d_{50} y d_{90} de los polvos de caqui y arándano, liofilizados y deshidratados, por vía húmeda. Media \pm desviación estándar. Media \pm desviación estándar. .	21
Tabla 8. Contenido en hemicelulosa o fibra dietética soluble, celulosa y lignina junto a los valores de fibra total y fibra insoluble de los diferentes polvos. Porcentaje en base seca. Media \pm desviación estándar.	23
Tabla 9. Contenido en fenoles (mg EAG/g materia seca), flavonoides (mg EQ/g materia seca) y actividad antioxidante por el método ABTS (mg TE/g materia seca) y por el método DPPH (mg TE/g materia seca) de los polvos. Los valores entre paréntesis están referidos a los mg EAG, EQ y TE/g. Media \pm desviación estándar.	24
Tabla 10. Contenido en β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno del polvo de caqui expresados en μ g/g muestra seca. Media \pm desviación estándar.	26
Tabla 11. Contenido en cianidina, delphinidina y malvidina del polvo de arándano expresados en μ g/g muestra seca. Media \pm desviación estándar.	27
Tabla 12. Porcentaje de bioaccesibilidad de las muestras de polvos tras la simulación de las etapas gástrica e intestinal, por los métodos de determinación de capacidad antioxidante ABTS y DPPH. Media \pm desviación estándar.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contenido antioxidante total de distintas frutas expresado en micromol equivalente de Trolox en 100 g de peso fresco (Harasym y Oledzki, 2014).	3
Figura 2. Evolución de la producción y rendimiento del caqui en España durante los últimos años (FAOSTAT, 2016).	4
Figura 3. Diagrama de la simulación de la digestión y fermentación in vitro	15
Figura 4. Diagrama de la amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S del RNA ribosomal (Illumina: 16S metagenomic sequencing library preparation protocol, 2019).	19
Figura 5. Distribución del tamaño de partícula obtenida por vía seca para los cuatro tipos de polvo.....	22
Figura 6. Distribución del tamaño de partícula obtenida por vía húmeda para los cuatro tipos de polvo.....	22
Figura 7. Contenido en fenoles (mg EAG/g), flavonoides (mg EQ/g) y capacidad antioxidante (mg TE/g) de los polvos de caqui SAC y LIO antes de la simulación de la digestión, tras la etapa gástrica y tras la etapa intestinal.....	28
Figura 8. Contenido en fenoles (mg EAG/g), flavonoides (mg EQ/g) y capacidad antioxidante (mg TE/g) de los polvos de arándano SAC y LIO antes de la simulación de la digestión, tras la etapa gástrica y tras la etapa intestinal.	29
Figura 9. Contenido en β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno de los polvos de caqui SAC y LIO, tras la etapa de simulación gástrica y tras la etapa de simulación intestinal, expresados en μ g/g materia seca.	31
Figura 10. Contenido en cianidina, delfinidina y malvidina de los polvos de arándano SAC y LIO frescos, tras la etapa de simulación gástrica y tras la etapa de simulación intestinal, expresados en μ g/g materia seca.	32
Figura 11. Incremento relativo de la concentración de DNA bacteriano de distintos donantes, antes y después de la fermentación in vitro. Como sustrato se emplean los polvos digeridos de caqui (C) y arándano (A), obtenidos tanto por liofilización (LIO) como secado por aire caliente (SAC), así como un control positivo de inulina para cada polvo (ctrl).	33
Figura 12. Número de géneros de bacterias colónicas presentes en los ocho individuos, antes y después de la fermentación de los sustratos de polvo de arándano LIO (A.LIO), arándano SAC (A.SAC), caqui LIO (C.LIO) y caqui SAC (C.SAC).....	34
Figura 13. Composición a nivel de género bacteriano del sustrato sin fermentar, el sustrato fermentado y el control positivo fermentado, de cada muestra de polvo digerida.	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El aprovechamiento de subproductos de la industrialización de frutas y hortalizas

La excesiva industrialización que existe actualmente genera una enorme cantidad de subproductos y residuos que afectan negativamente tanto al medio ambiente como a la economía, aumentando la huella ecológica generada por los distintos países (Zumelzu-Scheel, 2017). Estos residuos son comúnmente empleados como alimento para los animales y fertilizantes para el campo. Sin embargo, en esta reutilización son considerados como productos de escaso valor. El almacenamiento de estos residuos en vertederos no parece una opción sostenible, por ello surge la necesidad de su aprovechamiento con la finalidad de otorgarles una segunda vida útil, reintroduciéndolos en el ciclo económico y de producción (Piedra y Wensley, 2009). Esta actividad de reciclaje y reutilización de subproductos de la industria agroalimentaria, y en particular de los componentes activos presentes en los mismos, es el principal pilar sobre el que se sostiene el término de economía circular (Kalmykova *et al.*, 2018).

Los residuos alimentarios se producen durante todo el ciclo de vida del alimento, desde la plantación hasta el consumo, pasando por su procesamiento industrial o fabricación y comercio. De toda esta cadena, un 39% de los residuos son generados en la industria de fabricación del alimento (Mirabella *et al.*, 2014). Por este motivo, existe un gran interés en el empleo de subproductos y en el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan darles un valor añadido. Además, la revalorización de estos subproductos genera nuevas fuentes de riqueza así como un aumento de la rentabilidad industrial (Giroto *et al.*, 2015).

Hoy en día, la alimentación ya no tiene como única finalidad la nutrición, sino que pretende aportar efectos beneficiosos sobre la salud humana mediante la incorporación de alimentos funcionales con ingredientes activos en la dieta (Grossi *et al.*, 2015). Hay estudios que revelan que los subproductos desperdiciados en los procesos de industrialización, como son las cortezas, pieles, semillas y pulpas de frutas y hortalizas, poseen igual o mayor cantidad de compuestos bioactivos que el propio producto final. De esta forma, podemos encontrar en estos residuos altos contenidos de antioxidantes, compuestos antimicrobianos, colorantes y aromatizantes (Ayala-Zavala *et al.*, 2011), por lo que su empleo resulta muy interesante como aditivos alimentarios naturales. Una de las formas más comunes de transformación de subproductos de fruta es en forma de polvo, obtenido tras las etapas de secado y triturado (Neacsu *et al.*, 2015).

Actualmente, la transformación de residuos de frutas y hortalizas en polvos es uno de los procesos dentro de la industria agroalimentaria que se encuentra en pleno auge. Esto se debe a que este formato presenta características de gran interés, pues permite mantener las propiedades funcionales y antioxidantes de las frutas y hortalizas de forma concentrada, y se pueden emplear de manera sencilla y rápida, por ejemplo, como aditivo, aliño o en la formulación de alimentos sólidos o líquidos (Ramachandraiah y Chin, 2015). Los productos en polvo son fisicoquímica y microbiológicamente estables y presentan numerosas ventajas para la conservación, almacenamiento, transporte y dosificación (Janevska *et al.*, 2010).

1.1.1. Arándano

El arándano (*Vaccinium* sp.) es una baya de origen norteamericano perteneciente al género *Vaccinium* de la familia de las *Ericáceas*. Dentro de este género podemos encontrar numerosas especies entre las que destacan *V. corimbosum* L, *V. ashei* Reade, *V. angustifolium* Aiton y algunos híbridos de *V. angustifolium* x *V. corymbosum*. Se trata de una de las frutas de domesticación más reciente (siglo XX) que posee una pulpa jugosa ligeramente ácida y aromática (García, 2005).

Durante los últimos años ha aumentado mucho el cultivo de este fruto; en 1990 sólo se cultivó comercialmente esta fruta en 10 países, mientras que en 2011 se hizo en 27 países (Michalska y Lysiak, 2015). Estados Unidos es el país con mayor producción mundial de arándanos comercializados, seguido de Chile y Canadá; en Europa, el principal país productor es Polonia, seguido de Alemania y España (García *et al.*, 2010). En 2014, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), existían 203 plantaciones de arándano en España, con una producción de 5.000 toneladas. En España, Andalucía es la comunidad que mayor producción de arándano genera, concretamente Huelva, donde en el año 2017 se cultivaron 2.983 hectáreas con una producción de 34.077 toneladas, lo que supone un 96,54% de la producción total española (Ministerio de agricultura y pesca, 2017).

El creciente interés por esta fruta está asociado a las propiedades antioxidantes que posee, así como a su bajo contenido calórico (60 Kcal/100 g) y su alto contenido en vitamina C, potasio, hierro, calcio y fibra, componentes que producen numerosos beneficios sobre la salud. La fibra ayuda a combatir el estreñimiento y la atonía intestinal y los compuestos con actividad antioxidante neutralizan la acción de los radicales libres perjudiciales para el organismo (Potter *et al.*, 2007). Según Ballesteros *et al.*, (2017), el consumo de alimentos ricos en fibra de forma continuada disminuye el gasto sanitario asociado a enfermedades tales como diabetes, cáncer de colon, colesterol y problemas cardiovasculares. Además, numerosos estudios afirman que el arándano posee efectos antiinflamatorios, antibacterianos y protectores cardiovasculares, y está asociado a la disminución del riesgo de padecer aterosclerosis, así como de enfermedades coronarias (Routray y Orsat, 2011). También se ha estudiado su relación con la prevención de trastornos neurodegenerativos y se usa, popularmente, para el tratamiento de enfermedades urinarias ya que el arándano contiene ácido hipúrico y proantocianidina, que evitan la adhesión al epitelio de la vejiga urinaria de la bacteria *E.coli*, principal causante de las infecciones urinarias (De León-Jaén *et al.*, 2009).

Según un estudio realizado por Harasym y Oledzki en 2014, sobre el efecto de los antioxidantes de diversos frutos, el arándano es el que mayor contenido antioxidante posee.

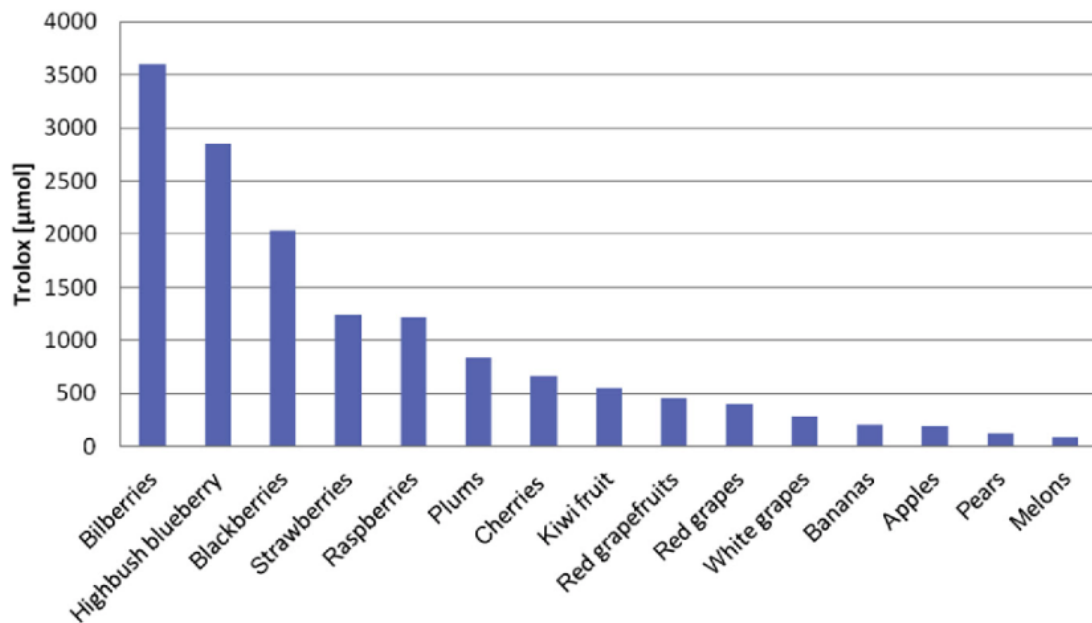


Figura 1. Contenido antioxidante total de distintas frutas expresado en micromol equivalente de Trolox en 100 g de peso fresco (Harasym y Oledzki, 2014).

El arándano se puede consumir como fruta fresca o procesada, por ejemplo, mediante la transformación industrial en zumos, mermeladas, snacks o licores entre otros. Entre estas actividades, es la industria de elaboración de zumos y mermeladas la que más desechos produce, generando como residuos piel de arándano con restos de pulpa, lo que supone un desperdicio del alto valor nutricional presente en estos (Vijayaraghavan *et al.*, 2007). Estos subproductos generados en la industria del arándano podrían emplearse como ingredientes funcionales aprovechando sus beneficiosas propiedades. Concretamente, el bagazo de arándano es una fuente de fibra y compuestos antioxidantes como fenoles, flavonoides y polifenoles (Mirabella *et al.*, 2014). La fibra, por ejemplo, se puede incorporar tanto de forma soluble como insoluble para otorgar funcionalidad a los alimentos, característica cada vez más demandada.

1.1.2. Caqui

El caqui (*Diospyros kaki L. f.*) es una especie frutal perteneciente al género *Diospyros*, de la familia de *Ebenaceae*. Aunque su origen no está del todo claro, hay estudios que afirman que surgió en China varios siglos antes de Cristo. Este género contiene más de 400 especies distribuidas tanto en áreas tropicales como templadas, siendo la especie más cultivada y de mayor relevancia económica *Diospyros kaki* (Martínez- Calvo *et al.*, 2012). Desde el punto de vista comercial, las variedades de caqui pueden dividirse en astringentes (Rojo Brillante, Triumph, etc.) y no-astringentes (Fuyu, Hana-Fuyu, etc.). La astringencia se encuentra ligada al contenido y forma de los taninos, un tipo de polifenoles. En el caqui no-astringente los taninos se encuentran insolubilizados permitiendo el consumo de la fruta sin realizar ningún tratamiento postcosecha, mientras que en el astringente aparecen solubilizados en elevada cantidad (Martínez, 2017).

A lo largo de los siglos esta planta se fue introduciendo en distintos países, como Japón en el siglo VII o Corea en el siglo XIV. En Europa no aparece hasta el siglo XVII y su primer uso fue como árbol ornamental debido a la buena calidad de su madera. Posteriormente comenzó

a emplearse como árbol frutal coexistiendo con cítricos, higueras u olivos (Llácer y Badenes, 2002).

En los últimos años el cultivo de caqui ha experimentado un gran aumento en todo el mundo tanto a nivel de producción, como a nivel de superficie cultivada. Según datos proporcionados por la FAOSTAT (2016), la producción mundial de caqui hace 20 años era de 1,5 millones de toneladas, y se destinaban 350.000 ha para su cultivo. Actualmente esta producción se sitúa alrededor de 5,5 millones de toneladas en 1.000.000 ha cultivadas, siendo China su principal productor con 4,2 millones de toneladas. Se puede decir que España es el país que mayor aumento de producción y cultivo ha tenido a nivel mundial, situándose hoy en día por delante de la producción de Japón y Brasil, países tradicionalmente más importantes en el cultivo del caqui. Así pues, España ha pasado de producir una cantidad de 15.000 toneladas empleando para ello una superficie de cultivo de 1.000 ha, a producir más de 300.000 toneladas con una superficie cultivada de 15.000 ha.

En la siguiente gráfica se muestra la evolución de la producción y superficie cultivada de caqui en España (FAOSTAT, 2016).

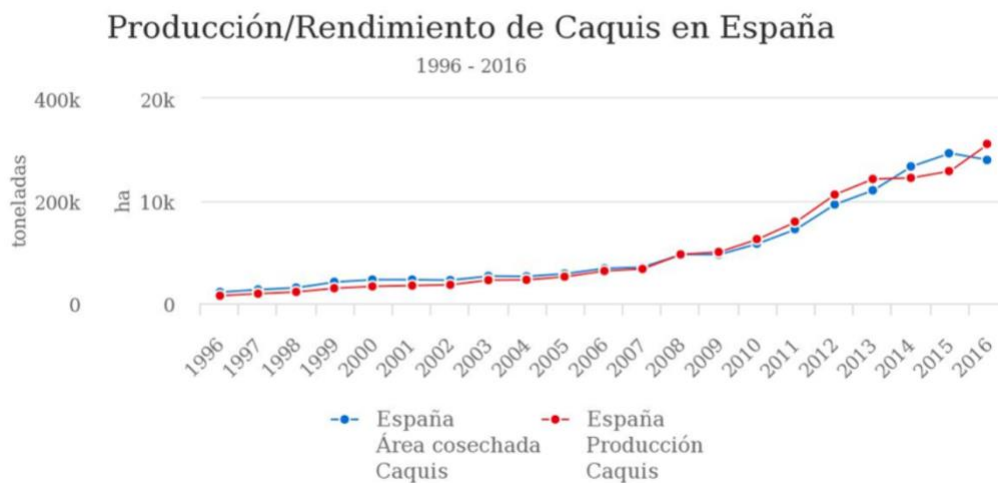


Figura 2. Evolución de la producción y rendimiento del caqui en España durante los últimos años (FAOSTAT, 2016).

En la Comunidad Valenciana, las zonas del Alto Palancia y la Ribera Alta del Xúquer son las principales productoras de caqui (Hernández, 1999).

El consumo de caqui tiene un gran interés ya que, al igual que otras muchas frutas y hortalizas, posee un bajo aporte energético (70 Kcal/100 g) y contiene fibras, minerales, vitaminas y compuestos con actividad antioxidante, como los fenoles, flavonoides o polifenoles, compuestos empleados tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades como la tos, parálisis, disnea, hipertensión, congelación, quemaduras y sangrado (Matsuo & Ito, 1977; Mowat, 1990). Además, el caqui es rico en carotenoides, pigmentos orgánicos amarillo-anaranjados, responsables del color de esta fruta. Pueden dividirse en dos clases: carotenos, hidrocarburos que no contienen oxígeno en sus anillos terminales, como la β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno; y las xantofilas que si los tienen, como el licopeno, luteína y zeaxantina (Sánchez *et al.*, 1999). Los carotenoides son unos antioxidantes naturales estudiados por su papel en la protección de diversas enfermedades del corazón, varios tipos de cáncer y degeneración macular asociada a la edad (Carranco *et al.*, 2011).

El cultivo de caqui genera una gran cantidad de residuos, alrededor del 15-20% de la producción, además de los residuos generados por el mercado. Pero estos residuos presentan

un alto valor funcional que podría ser aprovechado una vez estabilizados, por ejemplo, como ingredientes nutricionales (antioxidantes, prebióticos, etc). (Thebaudin *et al.*, 1997).

1.2. El proceso de digestión

La digestión humana es un proceso complejo que tiene como finalidad transformar los alimentos ingeridos en sustancias más pequeñas asimilables por el organismo. El aparato digestivo humano, formado por el tracto digestivo, el hígado y el páncreas, es el conjunto de órganos del cuerpo que se encargan de transformar los alimentos y absorber los nutrientes (Rivas, 2014).

En la digestión se pueden distinguir dos procesos consecutivos, uno de transformación mecánica y otro de transformación enzimática. La transformación mecánica tiene lugar en la boca y estómago, y se encarga de la trituración y desintegración del alimento, respectivamente, para reducir su tamaño. La transformación enzimática ocurre en el intestino delgado y grueso, y se encarga de hidrolizar las macromoléculas, dando lugar a moléculas más sencillas accesibles para el organismo, que serán absorbidas por el torrente sanguíneo (Guerra *et al.*, 2012).

El proceso digestivo comienza en la boca, donde se mastican y trituran los alimentos ingeridos y se mezclan con la saliva. La saliva es un fluido compuesto mayoritariamente por agua (99%) que contiene diferentes compuestos antimicrobianos como defensinas o inmunoglobulina A (IgA) así como enzimas como lisozima y amilasas. La saliva tiene diferentes funciones como la lubricación, el mantenimiento del pH o la protección inmunitaria (Dawes *et al.*, 2015).

Tras la masticación del alimento, el bolo alimenticio llega hasta el estómago a través del esófago, gracias a los movimientos peristálticos. Este proceso se conoce como deglución. Una vez en el estómago, los jugos gástricos procesan mecánica y enzimáticamente el bolo alimenticio. Estos jugos gástricos están compuestos por pepsinas y lipasas, enzimas encargadas de la digestión de proteínas y lípidos, y ácido clorhídrico, que provoca la disminución del pH desde 5-6 hasta 2-3, provocando la hidrólisis de proteínas. Además, en el estómago también son de importancia los movimientos peristálticos, los cuales mezclan bien el bolo alimenticio con el jugo gástrico conformando la mezcla alimenticia conocida como quimo.

El duodeno es la primera sección del intestino delgado que recoge el quimo ácido procedente del estómago. El intestino delgado fragmenta las moléculas en otras más pequeñas, mezclando el quimo con bicarbonato, secreciones biliares y pancreáticas. El bicarbonato neutraliza el pH del quimo, adecuándolo al pH óptimo de las enzimas; las sales biliares emulsionan moléculas de grasa en moléculas más pequeñas para que puedan ser degradadas por las lipasas pancreáticas; las enzimas pancreáticas son una mezcla de proteasas, amilasas y lipasas. Además, en el intestino delgado se realiza la absorción de nutrientes y agua a nivel de los enterocitos.

Todo lo que no ha sido absorbido por el intestino delgado, pasa al intestino grueso donde se absorbe agua y los electrolitos del quimo, se fermentan polisacáridos y proteínas, se reabsorben las sales biliares, y se forman, almacenan y eliminan las heces (Boticario y Angosto, 2012).

Tabla 1. Resumen de los órganos que intervienen en el proceso digestivo y sus características (Andrés, 2019).

Órgano	Acción	Tiempo	pH	Jugos y enzimas
Boca	Masticar y mezclar saliva	10 segundos-1 minuto	5-7	Enzimas salivares: amilasa y lipasa lingual
Estómago	Procesado enzimático y mecánico del bolo alimenticio	15 minutos-3 horas	1-5	Ácido clorhídrico, pepsina y lipasa gástrica
Intestino delgado	Fragmentación de macromoléculas y absorción de nutrientes	2-5 horas	6-7,5	Bicarbonato sódico, jugo pancreático y jugo biliar
Intestino grueso	Fermentación microbiana y reabsorción de agua y electrolitos del quimo	12-24 horas	5-7,5	Microbiota

1.2.1. Simulación de la digestión

El proceso gastrointestinal humano se lleva estudiando desde hace centenares de años. Realizar simulaciones de este proceso nos permite comprender su funcionamiento y obtener información útil acerca del mismo, por ejemplo, sobre como ocurre la digestión de los alimentos, la liberación y absorción de nutrientes o el punto de liberación de un ingrediente (Bornhorst y Singh, 2014).

Los experimentos *in vivo* se realizan con seres vivos, tanto humanos como animales. Este tipo de experimentos proporcionan información muy detallada y exacta, sin embargo, requieren una gran cantidad de tiempo, así como un coste económico importante (Boisen y Eggum, 1991). Hay que tener en cuenta que, al realizarse con seres vivos, se trata de experimentos muy complejos en los cuales intervienen muchas variables, por lo que son difíciles de estandarizar. Además, se suma el problema ético que ha adquirido relevancia durante estos últimos años, sobre la experimentación con seres vivos, pues cada vez son más personas las que se oponen a este tipo de práctica. Es por ello que, en los últimos años, los grupos de investigación se están centrando más en la realización de experimentos *in vitro*, que nos permitan simular procesos biológicos. Se trata de técnicas de ensayo realizadas en un laboratorio, bajo un entorno y condiciones ambientales controladas, fuera del organismo vivo (Rivas, 2014). Las digestiones *in vitro*, aunque no son tan precisas como las digestiones *in vivo*, nos permiten reproducir lo más fielmente posible las condiciones fisiológicas, empleando menos tiempo y con menor gasto económico (Coles *et al.*, 2005).

1.2.2. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad

Una de las principales aplicaciones de los simuladores gastrointestinales es la determinación de la **bioaccesibilidad** de macronutrientes, micronutrientes y componentes bioactivos de los alimentos. Hay diferentes definiciones del concepto de bioaccesibilidad como la cantidad de un nutriente ingerido que está disponible para ser absorbido en el intestino tras la digestión (Hedrén *et al.*, 2002); capacidad de un compuesto para ser extraído de la matriz

alimentaria y posteriormente ser absorbido por las células intestinales (Dinnella *et al.*, 2007); cantidad de un componente alimentario que está presente en el intestino, como consecuencia de la liberación de la matriz alimentaria, y que es susceptible de atravesar la barrera intestinal (Saura-Calixto *et al.*, 2007); o fracción máxima que puede liberarse de la matriz del alimento en el tracto gastrointestinal (Pedroza, 2013). De forma general para realizar el cálculo de bioaccesibilidad de un componente, se establece la siguiente relación (Galán *et al.*, 2013):

$$\%Bioaccesibilidad = \frac{A}{B} \cdot 100 \quad (1)$$

Siendo A el contenido del componente presente en la fracción soluble del alimento tras la etapa de digestión intestinal y B el contenido del componente total (componente presente en el sobrenadante y precipitado tras la simulación de la etapa intestinal).

Otro término estrechamente relacionado con la bioaccesibilidad es la **biodisponibilidad**, definida también en numerosos estudios. Algunas de sus definiciones son: fracción de componente ingerido que se encuentra disponible para su utilización en las funciones fisiológicas normales (Guerra *et al.*, 2012); fracción de una sustancia que alcanza la circulación sistémica a partir del tracto gastrointestinal y que está disponible para promover su acción dentro del organismo (Pedroza, 2013); proporción del nutriente ingerido que puede ser digerido, absorbido y metabolizado o utilizado por el organismo para los fines que le son propios (Pita, 2015); o grado de absorción a través del tracto gastrointestinal definido por las características del alimento ingerido (Beresford *et al.*, 2000). El porcentaje de biodisponibilidad de un nutriente ingerido se establece, según Avila y Bovi (2018), aplicando la siguiente ecuación:

$$\% Biodisponibilidad = \frac{x_f}{x_0} \cdot 100 \quad (2)$$

Siendo x_f el contenido del componente tras el proceso de digestión gastrointestinal simulado, y x_0 el contenido del componente cuantificado antes el proceso.

Ambos conceptos están afectados por el tipo de alimento y su composición, las condiciones del tracto gastrointestinal, y las condiciones fisiológicas de la persona que ingiere el alimento (Pedroza, 2013).

1.3. La microbiota intestinal

El intestino adulto alberga una gran cantidad de especies bacterianas que residen, principalmente, en el intestino grueso manteniendo una simbiosis con el hábitat humano (Salem *et al.*, 2018). La microbiota es la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado. La microbiota intestinal es una de las comunidades más compleja, superando la microbiota presente en el suelo, subsuelo y océanos (Ruiz *et al.*, 2010). Solamente en el intestino grueso de los mamíferos la cifra de microorganismos se eleva a 10^{12} - 10^{14} (Whitman *et al.*, 1998). Esta microbiota es indispensable para el correcto funcionamiento corporal, nutrición y desarrollo de la inmunidad. No debe confundirse con el término microbioma, conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos, así como el ambiente y las interacciones que se establecen entre ellos. (Icaza-Chávez, 2013).

Tanto factores intrínsecos (factores genéticos y edad) como extrínsecos (dieta, estilo de vida o estado de salud) determinan la composición de la microbiota, estableciendo el predominio de unos microorganismos sobre otros. Sin embargo, la dieta es el factor que mayor efecto tiene sobre la microbiota siendo por tanto distinta en omnívoros, carnívoros y herbívoros

(Ley *et al.*, 2008). Por ello, la abundancia o escasez de un alimento podría determinar la presencia o ausencia de especies bacterianas en el organismo (Duncan *et al.*, 2008).

Las principales funciones de la microbiota intestinal incluyen actividades metabólicas, como degradación de fibras alimenticias y otros compuestos complejos, almacenamiento de energía, y protección del huésped frente a la invasión por microorganismos extraños (Devaraj *et al.*, 2013). Las bacterias intestinales desempeñan un papel esencial en el desarrollo y homeostasis del sistema inmunitario, influyendo de forma directa sobre la respuesta inmunitaria de los seres humanos (Guarner, 2007). Ya en 1989, Strachan dijo que el aumento de las condiciones higiénicas de los países desarrollados conduce a una disminución de la carga microbiana de los organismos, pudiendo así aumentar el número de enfermedades autoinmunes. Además, la microbiota ejerce de barrera protectora en el intestino, impidiendo el crecimiento de bacterias oportunistas. Este efecto barrera se debe a la capacidad de ciertas bacterias para segregar sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) (Brook, 1999). También, diversos estudios muestran influencias de la microbiota intestinal sobre enfermedades cardiovasculares (Kitai y Tang, 2017), gastrointestinales (Allué, 2015), así como obesidad y enfermedades del metabolismo (Sanz *et al.*, 2009).

2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado consiste en determinar el efecto que produce el proceso digestivo *in vitro* sobre la actividad antioxidante, y en particular sobre el contenido en carotenoides y antocianinas, de polvos alimentarios obtenidos por dos métodos de deshidratación diferentes a partir de residuos de la industrialización de frutas, concretamente de bagazo de arándano y de caqui no astringente. Así mismo, se realizará una valoración preliminar sobre los cambios producidos en la composición de la microbiota intestinal de individuos adultos sanos.

El plan de trabajo realizado para cumplir los objetivos es el siguiente:

1. Obtención del polvo alimentario de bagazo de arándano y de caqui. Se llevó a cabo en dos etapas; una etapa de deshidratación y una posterior de molienda. La deshidratación se realizó por secado por aire caliente (SAC), el caqui a una temperatura de 60 °C y el arándano a 70 °C, y por liofilización (LIO). En la etapa de molienda se trituró a granulometría fina los residuos de la etapa previa.
2. Análisis de los polvos obtenidos. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas tales como la actividad del agua, humedad, sólidos solubles, solubilidad, tamaño de partícula y fibra, así como las propiedades antioxidantes. Además se analizaron los carotenoides en los dos polvos de caqui y las antocianinas en los polvos de arándano.
3. Digestiones *in vitro*. Se realizó una simulación de la etapa oral, etapa gástrica y etapa intestinal. Se midieron las propiedades antioxidantes, carotenoides y antocianinas tras las dos últimas etapas.
4. Simulación etapa colónica. Se realizó la fermentación del producto obtenido en la etapa intestinal por parte de las bacterias intestinales. Estas bacterias se obtienen de muestras de heces de 8 individuos (adultos sanos). Como control positivo se realiza también la fermentación colónica con inulina como sustrato, sustancia glucídica de la que se sabe que estimula de forma eficaz el crecimiento de la microbiota intestinal.
5. Extracción del DNA: se extrae el DNA de las bacterias mediante un extractor automático y se cuantifica.
6. Secuenciación e identificación de especies.

Los tres primeros puntos se llevaron a cabo en el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD) y los tres últimos en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valencina (FISABIO).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materia prima

La materia prima que hemos empleado en este proyecto son polvos de arándano y polvos de caqui. Para la obtención de los polvos se utilizaron arándanos de producción ecológica de la variedad “Duke” suministrados por la empresa Samanes S.L (Navarra, España) y caquis frescos de la variedad “Rojo Brillante” sometidos a tratamiento de desastringencia y facilitados por la Cooperativa de Benaguasil (La Rural Sant Vicent Ferrer de Benaguasil, Coop. V.). A partir del bagazo de arándano congelado obtuvimos dos tipos de polvos de arándano: uno secado por aire caliente (SAC) a 70 °C y otro liofilizado (LIO), ambos de granulometría fina. Para los polvos de caqui, partimos de la piel de caqui congelada y obtuvimos también dos tipos de polvo: uno secado por aire caliente (SAC) a 60 °C y otro liofilizado (LIO), ambos también de granulometría fina.

Las temperaturas empleadas en el SAC y las condiciones de triturado, tanto para arándano como para caqui, se establecieron en estudios anteriores realizados en el mismo laboratorio (Melchor, 2018 y Pomar, 2018) teniendo en cuenta el efecto de las dos operaciones sobre la actividad antioxidante total, contenido en fenoles y contenido en flavonoides.

Por otro lado, como inóculo bacteriano para la realización de la fermentación colónica, se emplearon muestras de heces de 8 individuos adultos sanos diferentes. Para ello, se resuspendieron y homogeneizaron las muestras fecales en una proporción del 10% (peso/volumen) en tampón fosfato 0,1 M a pH 7 que contenía cisteína (0,4 g/L) como agente reductor y glicerol (14%) como agente crioprotector.

3.2. Determinaciones analíticas

3.2.1. Propiedades fisicoquímicas y antioxidantes

Se determinaron propiedades fisicoquímicas de los 4 tipos de polvos obtenidos: arándano SAC, arándano LIO, caqui SAC y caqui LIO. Concretamente se determinó la humedad, la actividad del agua, los sólidos solubles, el porcentaje de solubilidad, el tamaño de partícula y el contenido en fibra. Se eligieron el tamaño de partícula y la solubilidad por la influencia que podrían tener en los resultados del proceso de digestión.

Por otro lado, se midieron las propiedades antioxidantes, carotenoides específicos en caqui y antocianinas específicas en arándano, tanto del polvo seco inicial como del producto obtenido tras la simulación de la etapa gástrica y de la etapa intestinal. Esto nos permite observar la variación de la disponibilidad de los componentes activos tras la digestión.

Humedad (x_w)

Se determinó la humedad de las muestras de polvo mediante una balanza de infrarrojos (Kern, MLS 50-3D). Se introdujeron 5 g de muestra y se analizaron a una temperatura de 95 °C transcurridos 45 minutos, que fue el tiempo necesario para que se alcanzase un peso constante. Se realizaron 2 repeticiones para cada muestra.

Actividad del agua (a_w)

La actividad de agua se determinó con un higrómetro de punto de rocío (Aqualab 4TE; Decagon devices Inc., Pullman WA, USA) con una precisión de $\pm 0,003$ y a una temperatura de 25 °C. Se realizaron 3 repeticiones para cada muestra.

Sólidos solubles

Se midieron los sólidos solubles totales (SST) mediante la determinación de los grados Brix empleando un refractómetro (ABBE ATAGO 3-T, Japón). Para ello preparamos disoluciones acuosas 1:10 (m/v) de cada uno de los polvos, y se realizaron mediciones por triplicado. A partir de los grados Brix de cada una de las disoluciones se calculó la fracción másica de sólidos solubles de cada uno de los polvos (x_{ss}) aplicando la siguiente relación:

$$^{\circ}\text{Brix} = \frac{x_{ss}}{x_{ss} + x_w} \cdot 100 \quad (3)$$

Siendo:

$$x_w = x_w \text{ experimental} + m_w \text{ añadida} \quad (4)$$

donde $x_w \text{ experimental}$ corresponde a la fracción másica de agua o humedad del polvo considerado, y $m_w \text{ añadida}$ corresponde a la masa de agua añadida en la preparación de las disoluciones.

Solubilidad

La solubilidad se determinó mediante el método descrito por Mimouni *et al.*, (2009), entendiendo la fracción másica de los sólidos disueltos (SD) en la muestra hidratada, como el cociente entre los sólidos solubles (SS) y los sólidos totales (ST).

Para obtener los ST se disolvió 1 g de muestra en 50 mL de agua destilada, y se mantuvo en agitación hasta su completa disolución. Se introdujeron 20 g de esta disolución en una estufa a 60 °C durante 24 h (Conterm, P-SELECTA); seguidamente, las muestras se trasvasaron a una estufa de vacío a 60 °C (Vaciotem, P-SELECTA) durante 48 h.

Los SS se obtuvieron tomando 20 g de la misma disolución y se sometió a centrifugación en refrigeración (4 °C) a 10000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se filtró a vacío con filtros Whatman Nº 1 y se secó siguiendo el mismo proceso que el descrito para los ST. Tras el secado en la estufa de vacío, las muestras se pesaron para obtener los ST y los SS, cuya relación define la solubilidad de la muestra.

Tamaño de partícula

Se determinó el tamaño de partícula con un equipo de difracción láser Malvern Mastersizer modelo 2000 (Malvern Instruments Kimited Worcestershire, Reino Unido), tanto por vía seca como por vía húmeda. Este equipo es capaz de medir un rango de tamaño de partículas comprendido entre 0,2 y 200 μm . El índice de refracción empleado fue de 1,53 para la muestra y 1,35 para la fase dispersa. Para la determinación del tamaño de partícula del polvo

por vía seca se empleó aire seco como agente dispersante, a una presión de 2,5 bares y un 60% de agitación; por vía húmeda se empleó como agente dispersante agua desionizada. Se empleó un índice de absorción de 0,1

Los parámetros empleados para la determinación del tamaño de partícula son D [4,3], D [3,2], d_{10} , d_{50} y d_{90} . D [4,3] representa el tamaño de partícula teniendo en cuenta el diámetro medio del área superficial, así como el peso por unidad; D [3,2] representa el tamaño medio de una superficie por unidad de volumen; d_{10} , d_{50} y d_{90} representan los tamaños de partícula por debajo de los cuales se encuentran el 10%, 50% y 90% de la distribución, respectivamente. Se realizaron 6 repeticiones de las medidas para cada tipo de polvo.

$$D [4,3] = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3} \quad (5)$$

$$D [3,2] = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2} \quad (6)$$

Contenido en fibra

El contenido en fibra fue analizado por el Instituto de Ciencia Animal según el método descrito por Mertens (2002), obteniéndose los valores de FND (Fibra Neutro-Detergente), FAD (Fibra Ácido-Detergente) y FDL (Lignina con Detergente Ácido); a partir de los cuales se calculó la cantidad de hemicelulosa (fibra soluble), de celulosa y lignina (fibra insoluble), y de fibra dietética total. El contenido de cada fracción se expresó en porcentaje en base seca.

Propiedades antioxidantes

Se midió la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS, así como los fenoles y flavonoides totales, tanto de los polvos como de las muestras obtenidas tras la digestión gástrica e intestinal, por triplicado. Las muestras digeridas fueron centrifugadas y se realizaron las mediciones tanto en el sobrenadante como en el precipitado.

En todos los casos se preparó un extracto con 2 g de muestra y 20 mL de CH_3OH y agua en una relación 80:20. La mezcla se mantuvo media hora en agitación y posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. Las propiedades antioxidantes se determinaron en el extracto obtenido.

Para cada tipo de muestra y cada determinación se realizaron las diluciones necesarias.

Fenoles

Para la determinación de los fenoles totales se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteu, basado en la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con los compuestos fenólicos de productos vegetales. Se mide la intensidad de color azul que produce esta reacción midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm (Sakanaka *et al.*, 2005).

Para ello se dejaron reaccionar 0,125 mL del extracto previamente preparado, 0,125 mL de reactivo Folin y 0,5 mL de agua bidestilada durante 6 minutos en ausencia de luz. Se preparó una disolución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7%, mezclando 7 g de Na_2CO_3 con 100 mL de agua bidestilada, y se añadieron 1,25 mL a la mezcla con el reactivo junto con 1 mL de agua

bidestilada. Se midió la absorbancia a 760 nm transcurridos 90 minutos de reacción. Se preparó un blanco en el que se sustituyó el extracto por 0,125 mL de agua bidestilada.

Para la medición de los fenoles totales en los polvos se realizaron diluciones 1:200 para el arándano y 1:30 para el caqui. Para las muestras digeridas se prepararon diluciones 1:10 para el caqui LIO y para el precipitado del caqui SAC, y 1:1 para el sobrenadante del caqui SAC; para el arándano digerido las diluciones fueron de 1:10 para el sobrenadante y 1:100 para el precipitado.

Se tomó como referencia una curva patrón de ácido gálico con un rango de concentración entre 0 y 500 mg/L. El contenido de fenoles totales se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de muestra (mg EAG/g).

Flavonoides

Para la determinación de los flavonoides, capaces de eliminar los radicales libres directamente mediante la donación de átomos de hidrógeno, se realizó el método calorimétrico del cloruro de aluminio (AlCl_3) descrito por Luximon- Ramma *et al.*, (2002). Para ello se tomaron 1,5 mL del extracto y se mezclaron con 1,5 mL de disolución de AlCl_3 al 2% en metanol (CH_3OH). Se dejaron reaccionar en ausencia de luz y transcurridos 10 minutos se midió la absorbancia a 368 nm. Al igual que en la medición de los fenoles totales, se preparó un blanco en el que se añadieron 1,5 mL de agua bidestilada en lugar del extracto.

Se prepararon diluciones de 1:200 para el polvo de arándano y 1:30 para el polvo de caqui. Para las muestras de caqui digeridas las diluciones fueron de 1:10; en las muestras de arándano digeridas, se realizaron diluciones 1:100 para el precipitado, 1:20 para el sobrenadante de la etapa gástrica y 1:10 para el sobrenadante de la etapa intestinal.

Se preparó una curva de calibrado de quercetina con un rango de concentraciones de 0 a 350 mg/L como referencia estándar. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina (EQ) por gramo de muestra (mg EQ/g).

Método ABTS

Este método nos permite medir la capacidad antioxidante basándose en la decoloración del catión ABTS^+ . Este catión es de color azul, absorbe a 734 nm y cuando reacciona con compuestos antioxidantes se convierte de nuevo a su forma incolora. El catión ABTS^+ se obtiene al reaccionar ABTS con persulfato potásico, según la metodología propuesta por Re *et al.*, (1999).

En primer lugar, se preparó una disolución 7 mM de ABTS con tampón fosfato y 2,45 mM de persulfato potásico. Esto se disolvió en 50 mL de agua destilada. A continuación, para liberar el radical, se dejó incubar en ausencia de luz entre 12 y 16 horas a temperatura ambiente.

Tras dejar pasar las horas correspondientes, se añadieron en una cubeta 2,9 mL de la disolución de ABTS y 0,1 mL de extracto, y se midió la absorbancia a 734 nm a los 0,3 y 7 minutos de reacción.

Se prepararon diluciones 1:2000 para el polvo de arándano y 1:100 para el polvo de caqui. Para las muestras digeridas de caqui se realizaron diluciones 1:10 para el sobrenadante y 1:30 para el precipitado; para las muestras digeridas de arándano se prepararon diluciones 1:100 para el sobrenadante y 1:400 para el precipitado, excepto para el precipitado de la etapa gástrica del arándano SAC, que la dilución fue de 1:600.

Los resultados obtenidos se compararon con una curva patrón de trólox (C₁₄H₁₈O₄), con una concentración comprendida entre 0 y 500 mg/L y una pureza mayor o igual al 97%. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de trólox (TE) por gramo de muestra (mg TE/g).

Método DPPH

El método DPPH se basa en la capacidad de reducción del radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) por los antioxidantes presentes en la muestra. El radical DPPH presenta un color morado que absorbe a 515 nm en metanol, y al producirse la reducción de DPPH a DPPH₂ el color morado cambia a color amarillo pálido. Para esta determinación se empleó la metodología descrita por Stratil *et al.*, (2008)

En primer lugar, se preparó una disolución CH₃OH- DPPH en la que se añadieron 1,2 mg de DPPH en 50 mL de CH₃OH.

A continuación, se añadieron en una cubeta 2 mL de la disolución CH₃OH- DPPH, 0,9 mL de CH₃OH y 0,1 mL de nuestro extracto previamente preparado, y se midió la absorbancia a 517 nm a los 0,30 y 60 minutos de reacción. También se preparó un blanco en el que se añadieron 0,1 mL de agua destilada en sustitución de los 0,1 mL de extracto.

Para los polvos se prepararon diluciones 1:200 para el arándano y 1:100 para el caqui. Para las digestiones del caqui las diluciones fueron de 1:10 para el sobrenadante y de 1:30 para el precipitado; para las digestiones del arándano, se realizaron diluciones 1:400 para los precipitados, 1:20 para el sobrenadante de la etapa gástrica del arándano LIO, 1:10 para el sobrenadante de la etapa intestinal del arándano LIO y 1:100 para los sobrenadantes del arándano SAC.

Se empleó como referencia una curva de calibrado de trólox (C₁₄H₁₈O₄), con una pureza mayor o igual al 97% y un rango de concentración entre 0 y 500 mg/L. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de trólox (TE) por gramo de muestra (mg TE/ g), partiendo de una recta de calibrado con este compuesto y del porcentaje de inhibición, calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$I (\%) = \frac{AB-AM}{AB} \cdot 100 \quad (7)$$

Siendo:

I (%): porcentaje de inhibición del DPPH

AB: Absorbancia del blanco

AM: Absorbancia de la dilución de la muestra

3.2.2. Carotenoides y antocianinas

La determinación de carotenoides en los polvos de caqui y antocianinas en los polvos de arándano fue realizada por el laboratorio de análisis del Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. En el apartado de resultados se presentan los resultados correspondientes a las muestras de polvo de caqui y arándano secados por aire caliente y liofilizados, así como a las muestras obtenidas después de la etapa de digestión gástrica y después de la etapa de digestión intestinal.

Para la extracción y análisis de carotenoides se siguió la metodología propuesta por Bunea *et al.*, (2008). Este método realiza en primer lugar una extracción de carotenoides, seguido de un proceso de saponificación para eliminar la parte lipófila y finalmente el análisis y la cuantificación por HPLC. Para la determinación de antocianinas se llevó a cabo el protocolo propuesto por Cătunescu *et al.*, (2019), con algunas modificaciones, en el que se realiza la extracción de las antocianinas y posteriormente se cuantifican por HPLC.

Se adjuntan los protocolos realizados en el anexo.

3.3. Metodología de los procesos de digestión

Para realizar la simulación de la etapa oral, etapa gástrica y etapa intestinal se siguió la metodología propuesta por Minekus *et al.*, (2014) para realizar un método estandarizado de digestión estática. Según el protocolo es necesario mantener en una relación 1:1 (v/v) las fases que se mezclan en las etapas consecutivas. En nuestro caso, se añadió 1 g de polvo, 1 mL de fase de la etapa oral (SSF), 2 mL de fase de la etapa gástrica (SGF) y 4 mL de fase de la etapa intestinal (SIF). Se realizaron paralelamente digestiones con inulina, como control, en las que se usaron 2 g de inulina, 2 mL de SSF, 4 mL de SGF y 8 mL de SIF. Se hicieron 9 repeticiones de cada tipo de polvo así como de la inulina, en 9 tubos diferentes, para la posterior simulación de la etapa colónica con muestras de heces de 8 individuos adultos sanos y un control.

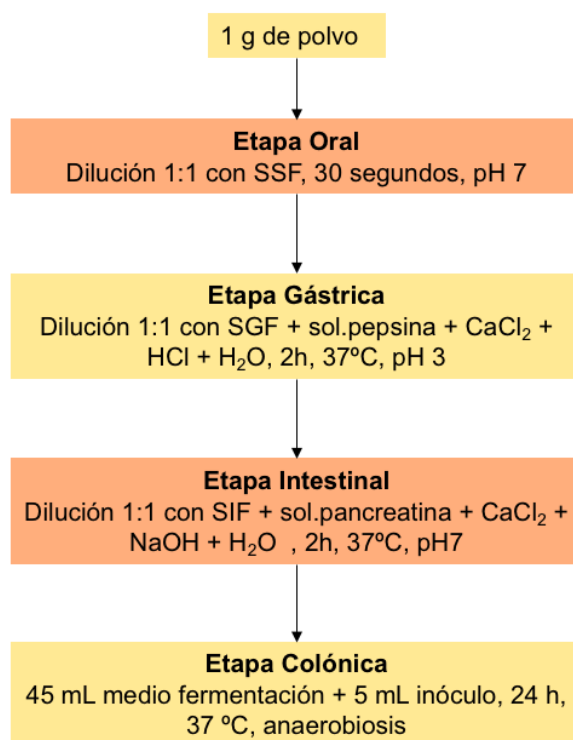


Figura 3. Diagrama de la simulación de la digestión y fermentación *in vitro*

3.3.1. Simulación etapa oral

Con la finalidad de simular esta etapa en las condiciones lo más parecidas posible a las reales, se empleó saliva humana (SSF). Se añadió en un tubo Falcon de 50 mL, 1 g de polvo o 2 g

en el caso de la inulina, y 1 g, o 2 g para inulina, de saliva y se agitó con un vórtex durante 30 segundos.

3.3.2. Simulación etapa gástrica y etapa intestinal

En primer lugar, se prepararon 50 mL de disoluciones stock de diferentes sales, que se utilizarán para la formulación de la SGF y SIF.

Tabla 2. Concentración de las sales en las disoluciones utilizadas para la preparación de las SFG y SIF (Minekus *et al.*, 2014).

SAL	g/L
KCl	37,3
KH ₂ PO ₄	68
NaHCO ₃ (filtrar con filtro de 0,22µm)	84
NaCl	117
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5
(NH ₄) ₂ CO ₃	48
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44,1

Se preparó 1L de SGF y SIF combinando las disoluciones stock en las cantidades que se indican en la tabla 2 y añadiendo las disoluciones enzimáticas correspondientes. Se corrigieron los pH de las fases SGF y SIF, a pH 3 y pH 7 respectivamente, empleando disoluciones de NaOH 1 M y HCl 1 M.

Tabla 3. Volumen (mL) de sales que se deben añadir para obtener las fases SGF y SIF (Minekus *et al.*, 2014).

SAL	SGF	SIF
KCl	13,8	13,6
KH ₂ PO ₄	1,8	1,6
NaHCO ₃	25	85
NaCl	23,6	19,2
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,8	2,2
(NH ₄) ₂ CO ₃	1	
HCl (6 M)	2,6	1,4

La preparación de las disoluciones enzimáticas se realizó como se indica a continuación.

Para la mezcla gástrica:

1. Se preparó una disolución de pepsina, a la que se añadieron 100 mg de pepsina en un matraz aforado de 10 mL, y se enrasó con SGF.
2. A continuación se preparó la mezcla gástrica añadiendo 45 mL de fase SGF, 9.6 mL de la disolución de pepsina, 30 μ L de CaCl_2 (0.3 M), 1.2 mL de HCl (1 M) y 4.16 μ L de agua. La mezcla gástrica se llevó a pH 3.

Seguidamente para llevar a cabo la etapa de digestión gástrica se añadieron 2 mL de la disolución de la mezcla gástrica al producto obtenido después de la etapa de digestión oral de los polvos, y 4 mL al producto obtenido después de la etapa de digestión oral de la inulina. Las mezclas se introdujeron en un robot de simulación gástrica a 37 °C en agitación durante 2 horas.

Para la mezcla intestinal:

1. Se preparó una disolución de pancreatina a la que se añadieron 80 mg de pancreatina en un matraz aforado de 20 mL y se enrasó con la fase SIF previamente preparada.
2. Después se preparó la mezcla intestinal añadiendo 81 mL de fase SIF, 30 mL de la disolución de pancreatina, 240 μ L de CaCl_2 (0.3 M), 0.9 mL de NaOH y 7.86 mL de agua.

Tras la obtención de la mezcla, se añadieron 4 mL de la mezcla intestinal al producto resultante de la etapa de digestión gástrica del polvo y 8 mL al producto resultante de la digestión gástrica de la inulina. La mezcla se introdujo en un robot de simulación intestinal a 37 °C en agitación durante otras 2 horas.

3.3.3. Simulación etapa colónica

Para realizar la simulación de la última etapa del proceso digestivo, se empleó el método descrito por Olano-Martin *et al.*, (2000), el cual consta de tres partes: recogida de la muestra, preparación de la muestra y fermentación.

- Recogida de la muestra: se recogieron muestras de heces de 8 individuos adultos sanos.
- Preparación de la muestra (inóculo): En primer lugar se prepararon 500 mL de tampón fosfato 0,1 M a pH 7 en el que se añadieron 70 mL de glicerol (concentración final 14%) y 20 mL de cisteína 10 g/L (concentración final 0,4 g/L). Se mezclaron 5 g de cada una de las muestras de heces con 50 mL del tampón (10% peso/volumen). La mezcla se homogeneizó y se prepararon alícuotas de 5 mL en tubos estériles. Las muestras se conservaron en congelación a -80 °C hasta la realización del proceso de fermentación.
- Fermentación: Se añadió a cada uno de los tubos con los sustratos digeridos en las etapas anteriores, 45 mL de medio de fermentación (composición tabla 3) y 5 mL de inóculo previamente descongelado. Las mezclas se incubaron en jarras de anaerobiosis a 37 °C durante 24 horas. Las fermentaciones resultantes se congelaron a -80 °C hasta la extracción del DNA.

Tabla 4. Composición del medio de fermentación empleado en la fase fermentativa de la etapa colónica (Olano-Martin *et al.*, 2000).

Compuestos	g/L
Agua peptonada	2
Extracto de levadura	2

NaCl	0,1
K ₂ HPO ₄	0,04
KH ₂ PO ₄	0,04
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
NaHCO ₃	2
Cisteína HCl	0,5
Sales biliares	0,5

Se añadieron también al medio de fermentación los siguientes compuestos (mL/L): polisorbato 80 (Tween 80) 2; filoquinona (vitamina K1) 10; disolución de hierro ferroso 1.

3.4. Extracción y cuantificación del DNA

3.4.1. Extracción

Las fermentaciones colónicas se procesaron para eliminar los residuos sólidos y se realizó la extracción del DNA empleando un extractor automático (MagNA Pure 24 System, Roche Life Science) con los reactivos necesarios (MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi), Roche Diagnostics, Germany) (Loeffler *et al.*, 2002).

En primer lugar, se separaron 5 mL de las muestras fermentadas, previamente homogeneizadas. Tras centrifugar durante 1 minuto a 4 °C y 2000 rpm, se conservó el sobrenadante en tubos Falcon de 15 mL y se distribuyó en microtubos de 2 mL añadiendo 1,5 mL por tubo. Seguidamente se preparó la suspensión celular añadiendo 500 µL de las muestras en tubos Eppendorfs y se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a la máxima revolución. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado el cual contiene las células bacterianas. Se realizó una lisis externa del precipitado, resuspendiendo el pellet con 207 µL de buffer de lisis del kit del robot y añadiendo 23 µL de lisozima (1µg/µL) para provocar la ruptura de la pared celular. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se resuspendió con 1,2 mL de proteinasa K del kit del robot. Se incubó 10 minutos a 65 °C, seguido de 10 minutos a 95°C y se dio un pulso de centrifuga. Por último, se introdujeron las muestras en el robot para la extracción del DNA.

3.4.2. Cuantificación

Para la cuantificación del DNA se empleó un fluorómetro (Qubit 4 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific) y un kit de reactivos (Qubit™ dsDNA HS Assay). Primero, se preparó un mix con 199 µL de tampón y 1 µL de fluoróforo del kit por muestra, y se agitó 10 segundos en un vórtex. A continuación, se añadieron 198 µL del mix preparado y 2 µL de las muestras de DNA en microtubos y se midió la concentración de DNA en el fluorómetro expresada en µg/µL.

3.5. Secuenciación e identificación de especies.

Para la secuenciación se prepararon librerías del gen 16S rRNA, el cual contiene unas regiones muy conservadas y otras regiones variables. En este proyecto se secuenciaron las regiones variables V3 y V4.

Primero, se realizó la amplificación de la región variable V3 y V4 mediante PCR con primers específicos. A continuación, se añadieron los índices que nos permiten identificar las muestras y los adaptadores de secuenciación de Illumina utilizando el kit de preparación de librerías Nextera XT. Tras cada una de las PCR se realizó un lavado (PCR-Clean up). Seguidamente se normalizaron las librerías (Klindworth *et al.*, 2013) y se juntaron para su secuenciación pareada. Para la secuenciación con MiSeq se utilizó el kit V3 (2 x 300 ciclos) el cual genera, en una carrera de 65 horas, lecturas de 300 pb comenzando por cada extremo del amplicón. El hecho de que se realice la secuenciación por los dos extremos permite un solapamiento de las secuencias durante el procesado de las mismas, obteniéndose de esta forma la secuencia completa de nuestro amplicón (450 pb).

El procesado de las secuencias brutas y análisis posteriores lo llevó a cabo el departamento de bioinformática del área de Genómica y Salud de FISABIO utilizando el paquete informático DADA2 (ref). En un primer paso, se filtraron las secuencias brutas por calidad y por longitud. Así mismo, se eliminaron las secuencias que podrían corresponder a humano. A continuación, se llevó a cabo la unión de las lecturas de cada amplicón para obtener las secuencias definitivas. Finalmente, se realizó una clasificación taxonómica utilizando la base de datos Silva obteniendo las clasificaciones a nivel de género o de especie (Callahan *et al.*, 2016)

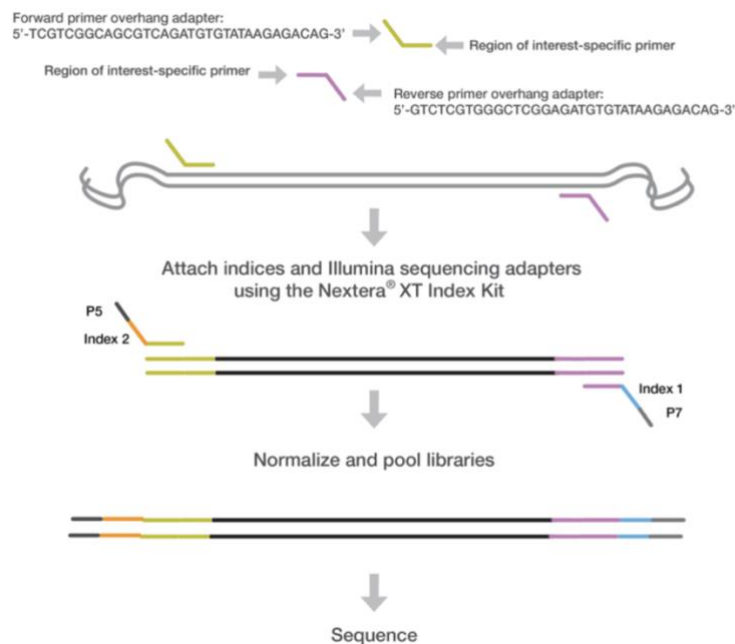


Figura 4. Diagrama de la amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S del RNA ribosomal (Illumina: 16S metagenomic sequencing library preparation protocol, 2019).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de los polvos

4.1.1. x_w , a_w , x_{ss} y solubilidad

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para el contenido en humedad, actividad del agua, sólidos solubles y solubilidad de los polvos de caqui obtenidos por liofilización y secado a 60 °C, así como de los polvos de arándano obtenidos por liofilización y secado a 70 °C.

Tabla 5. Valores de la humedad (X_w (g_w/g)), actividad del agua (a_w), fracción másica de sólidos solubles (X_{ss} (g_{ss}/g)) y solubilidad (%) de los polvos de caqui y arándano, liofilizados (LIO) y secados por aire caliente (SAC). Media \pm desviación estándar.

	Caqui		Arándano	
	SAC	LIO	SAC	LIO
X_w (g _w / g)	0,052 \pm 0,003 ^{bc}	0,056 \pm 0,005 ^c	0,0367 \pm 0,0003 ^a	0,046 \pm 0,002 ^b
a_w	0,302 \pm 0,003 ^c	0,235 \pm 0,003 ^b	0,190 \pm 0,012 ^a	0,208 \pm 0,006 ^{ab}
X_{ss} (g _{ss} / g)	0,657 \pm 0,013 ^c	0,772 \pm 0,007 ^d	0,332 \pm 0,011 ^a	0,430 \pm 0,011 ^b
Solubilidad (%)	65,5 \pm 1,8 ^c	35 \pm 6 ^a	75 \pm 6 ^c	39 \pm 3 ^b

Letras distintas indican diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (p-valor<0,05).

Los procesos tanto de liofilización como de secado se prolongaron el tiempo necesario para que los valores de actividad del agua y humedad fuesen lo suficientemente bajos. Diferentes estudios han demostrados que los productos en polvo con un valor de actividad de agua inferior a 0,3 presentan una mayor estabilidad, así como una menor posibilidad de crecimiento microbiano y menor velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas. Se pueden observar diferencias entre el contenido en sólidos solubles de las muestras deshidratadas por aire caliente y las liofilizadas, debido fundamentalmente a las diferencias de humedad que hay entre las muestras y al menor tamaño de partícula y mayor efecto de rotura estructural que la operación de liofilización ejerce sobre las moléculas de fibra. Cabe destacar el marcado efecto significativo que el tratamiento de secado ejerce sobre la solubilidad de los polvos, tanto para el caso del caqui como para el caso del arándano.

4.1.2. Tamaño de partícula

En las tablas 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos para los distintos parámetros analizados del tamaño de partícula de las diferentes muestras de polvo. En la tabla 6 se representan los datos obtenidos para el tamaño de partícula por vía seca, mientras que en la tabla 7 se representan los resultados obtenidos por vía húmeda.

La distribución del tamaño de partícula se basa en el volumen, de forma que para un rango determinado de tamaño de partícula se obtiene el volumen medio de partículas que poseen un tamaño dentro de dicho rango, con respecto al volumen total de partículas.

Dependiendo de la utilidad que se le pretenda dar a los polvos, resultará mas interesante el análisis del tamaño de partícula por vía seca o por vía húmeda. Si se desea incorporar los polvos en alimentos sólidos, resultará más conveniente el análisis realizado por vía seca. Pero si lo que se pretende realizar es la aplicación de polvos en productos líquidos, como bien puede ser en zumos o refrescos, se considerarán entonces los resultados obtenidos mediante vía húmeda.

Además, el tamaño de partícula va a influir sobre otras propiedades de los polvos, como su interacción con el agua o su superficie específica. Un menor tamaño de partícula supone una mayor superficie específica, por lo que favorece las propiedades que se basan en fenómenos de absorción superficial (Raghavendra *et al.*, 2006).

Tabla 6. Valores de D [4,3], D [3,2], d_{10} , d_{50} y d_{90} de los polvos de caqui y arándano, liofilizados y deshidratados, por vía seca. Media \pm desviación estándar.

	Vía Seca				
	D [4, 3]	D [3, 2]	d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)
Arándano LIOF	156 \pm 7 ^a	51 \pm 1 ^a	21,0 \pm 0,4 ^a	89 \pm 2 ^a	399 \pm 16 ^a
Arándano SAC	234 \pm 9 ^b	106 \pm 2 ^d	51,0 \pm 0,8 ^d	199 \pm 7 ^b	470 \pm 19 ^b
Caqui LIOF	293 \pm 52 ^c	78 \pm 9 ^b	33 \pm 3 ^b	198 \pm 58 ^b	198 \pm 58 ^c
Caqui SAC	408 \pm 12 ^d	88 \pm 3 ^c	41 \pm 2 ^c	354 \pm 11 ^c	866 \pm 27 ^d

Letras distintas indican diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (p-valor<0,05).

Tabla 7. Valores de D [4,3], D [3,2], d_{10} , d_{50} y d_{90} de los polvos de caqui y arándano, liofilizados y deshidratados, por vía húmeda. Media \pm desviación estándar. Media \pm desviación estándar.

	Vía Húmeda				
	D [4, 3]	D [3, 2]	d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)
Arándano LIOF	94 \pm 5 ^b	37 \pm 2 ^b	19 \pm 1,3 ^b	76,1 \pm 1,8 ^b	190 \pm 12 ^b
Arándano SAC	198 \pm 10 ^c	78 \pm 4 ^d	46,0 \pm 1,8 ^d	157 \pm 9 ^c	417 \pm 21 ^d
Caqui LIOF	191 \pm 3 ^c	72,40 \pm 1,18 ^c	39,653 \pm 1,103 ^c	160,4 \pm 1,2 ^c	386 \pm 6 ^c
Caqui SAC	29,0 \pm 0,3 ^a	15,18 \pm 0,08 ^a	6,38 \pm 0,04 ^a	26,43 \pm 0,19 ^a	54,6 \pm 0,9 ^a

Letras distintas indican diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (p-valor<0,05).

Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de polvos para cada uno de los parámetros. Los valores del polvo liofilizado son menores que los valores del polvo secado por aire caliente, excepto en el polvo de caqui por vía húmeda. Por esa razón, las diferencias encontradas en los parámetros analizados para el tamaño de partícula las podemos atribuir tanto al tipo de tratamiento de secado aplicado como a la heterogeneidad de la etapa de molienda.

En las figuras 5 y 6 se han representado las curvas de distribución del tamaño de partícula de los polvos de arándano y caqui, por vía seca y por vía húmeda.

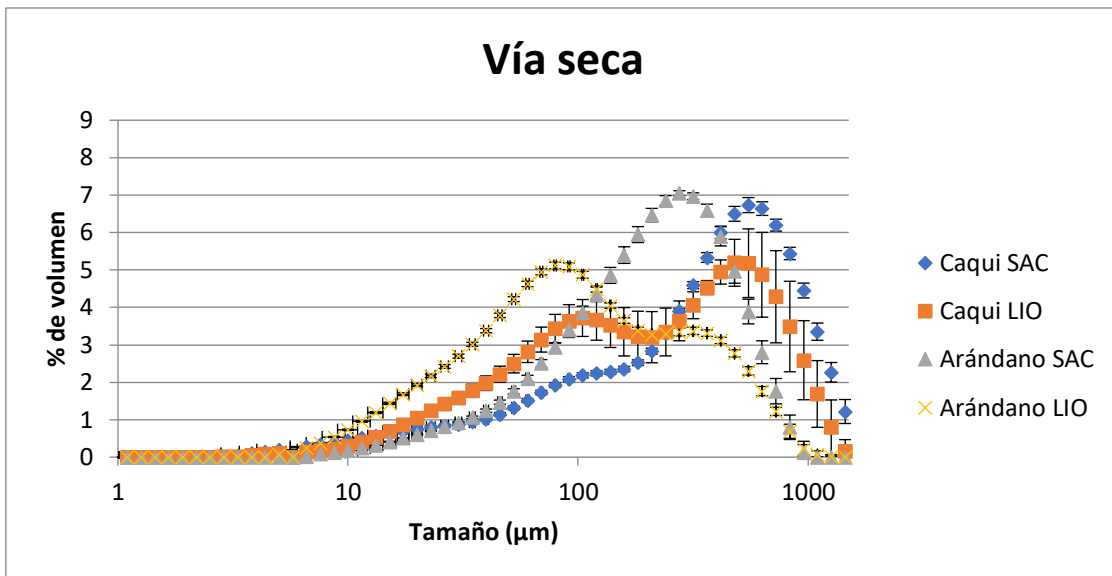


Figura 5. Distribución del tamaño de partícula obtenida por vía seca para los cuatro tipos de polvo.

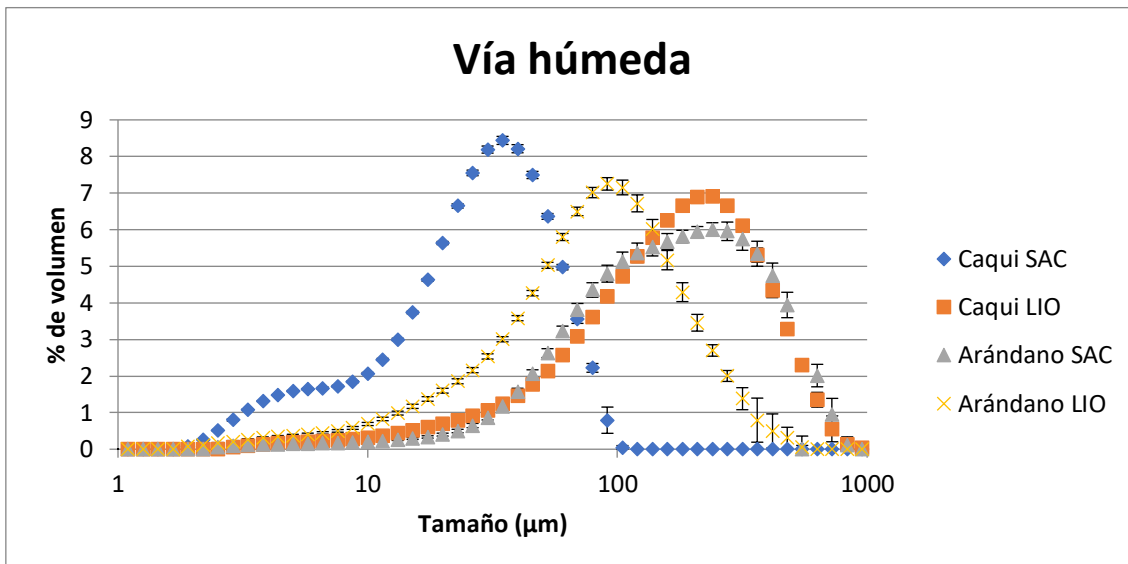


Figura 6. Distribución del tamaño de partícula obtenida por vía húmeda para los cuatro tipos de polvo.

Las gráficas obtenidas corroboran los aspectos comentados sobre las tablas 3 y 4, pues no existe una tendencia única determinada por el tipo de tratamiento o el tipo de materia prima. Sin embargo, sí que se observan diferencias en las distribuciones de las curvas del tamaño de partícula entre la vía seca y la vía húmeda. En la gráfica obtenida por vía seca se muestra una distribución bimodal para las curvas de los cuatro tipos de polvo, mientras que en la gráfica obtenida por vía húmeda observamos una distribución monomodal. Este cambio puede ser debido a la solubilización de parte de los sólidos solubles en las determinaciones por vía húmeda. Además, observamos que los cambios son más acusados en el caqui SAC, diferencias que podrían explicarse por las variaciones en la composición y los cambios en la configuración de algunos componentes debido al efecto de la temperatura.

Todos los tipos de polvo presentan un tamaño de partícula, tanto por vía seca como por vía húmeda, comprendido entre 100 y 2000 μm , valores entre los que se encuentran los datos

obtenidos por otros autores en estudios similares, por ejemplo, en el polvo de piel deshidratada de caqui (Pomar, 2018) o en el polvo de piel seca de mandarina (Sánchez, 2016).

4.1.3. Contenido en fibra

En la tabla 8 se muestran los porcentajes en base seca del contenido en hemicelulosa (fibra soluble), celulosa, lignina, fibra insoluble y fibra total de los distintos tipos de polvo.

Tabla 8. Contenido en hemicelulosa o fibra dietética soluble, celulosa y lignina junto a los valores de fibra total y fibra insoluble de los diferentes polvos. Porcentaje en base seca. Media \pm desviación estándar.

	Hemicelulosa o fibra dietética soluble (%ms)	Celulosa (%ms)	Lignina (%ms)	Fibra dietética insoluble (%ms)	Fibra total (%ms)
Arándano SAC	9,10 \pm 0,06 ^c	13,57 \pm 0,06 ^b	6,6 \pm 0,2 ^c	20,2 \pm 0,18 ^b	29,290 \pm 0,113 ^c
Arándano LIO	9,12 \pm 0,04 ^c	13,8 \pm 0,6 ^b	7,2 \pm 0,4 ^c	21 \pm 1 ^b	30,10 \pm 1,02 ^c
Caqui SAC	7,24 \pm 0,09 ^b	6,56 \pm 0,09 ^a	3,280 \pm 0,003 ^b	9,83 \pm 0,10 ^a	17,07 \pm 0,19 ^b
Caqui LIO	6,7 \pm 0,2 ^a	5,867 \pm 0,014 ^a	2,594 \pm 0,105 ^a	8,46 \pm 0,12 ^a	15,2 \pm 0,3 ^a

Letras distintas indican diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (p-valor<0,05).

Se observa que el contenido total de fibra, así como el de las diferentes fracciones de hemicelulosa, celulosa y lignina, son significativamente mayores para el arándano.

Al comparar los resultados obtenidos con otros estudios previos, vemos que el contenido total de fibra del polvo de caqui es considerablemente menor que los polvos procedentes del bagazo de otras frutas. Por ejemplo, el polvo procedente de naranja contiene un 64,3% de fibra (Figuerola et al., 2005) y el polvo de piel de mandarina alrededor de un 32% (Sáez, 2017). En el estudio realizado por Pomar (2018) se obtuvo un contenido en fibra para el polvo de caqui liofilizado y secado a 60 °C, del 11% y 12% respectivamente, valores ligeramente menores a los obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, el contenido en fibra del polvo de arándano se asemeja a los resultados obtenidos por Roig (2017), donde en su estudio reflejó un contenido en fibra del 35% para los polvos de arándanos.

En esta tabla, también se puede observar como el tipo de secado no produce ningún efecto sobre el contenido en fibra de los polvos, pues los porcentajes resultantes, principalmente de polvo de arándano, son prácticamente iguales para los obtenidos por el proceso de liofilización y los obtenidos por secado por aire caliente.

En el caso del caqui se corroboran los datos comentados para su tamaño de partícula por vía seca. El caqui liofilizado posee un menor tamaño de partícula por vía seca que el secado por aire caliente, lo que implica la rotura de cadenas largas de carbohidratos y una pequeña reducción del contenido en fibra. Efectivamente, comprobamos que para el caso del caqui se cumple este efecto, encontrando una ligera disminución del contenido de fibra total en el liofilizado.

El contenido en fibra de los distintos polvos va a influir en su interacción con otros componentes, como bien son el agua o la grasa, y afectará también a las características organolépticas de los alimentos en los que se pretendan incorporar.

La fibra insoluble aporta al polvo una menor densidad y viscosidad, así como una mayor porosidad y capacidad de retención de agua, propiedades que aceleran el tránsito intestinal. Sin embargo, la fibra soluble posee mayor viscosidad, lo que favorece la formación de geles y la

actividad emulsionante, haciendo así más fácil la incorporación de los polvos en los productos deseados. Además, disminuye los niveles de colesterol en sangre y favorece el crecimiento de la mucosa intestinal. Estas características ralentizan el tránsito intestinal, facilitando así la absorción de macronutrientes (Elleuch *et al.*, 2011).

4.1.4. Propiedades antioxidantes

En la tabla 9 se muestran los resultados para los cuatro tipos de polvo del contenido en fenoles y flavonoides expresado en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) y mg equivalentes de quercetina (EQ) por gramo de muestra seca, respectivamente, y actividad antioxidante por el método ABTS y por el método DPPH, expresado en mg equivalentes de trólox (TE), por gramo de muestra seca.

Tabla 9. Contenido en fenoles (mg EAG/g materia seca), flavonoides (mg EQ/g materia seca) y actividad antioxidante por el método ABTS (mg TE/g materia seca) y por el método DPPH (mg TE/g materia seca) de los polvos. Los valores entre paréntesis están referidos a los mg EAG, EQ y TE/g. Media \pm desviación estándar.

	Fenoles mg EAG/g ms	Flavonoides mg EQ/g ms	ABTS mg TE/g ms	DPPH mg TE/g ms
Caqui LIO	2,86 \pm 0,14 ^a (2,70 \pm 0,13 ^a)	1,10 \pm 0,12 ^a (1,037 \pm 0,113 ^a)	31,8 \pm 0,4 ^a (30,0 \pm 0,4 ^a)	9,8 \pm 0,2 ^a (9,3 \pm 9,3)/0,2 ^a)
Caqui SAC	3,48 \pm 0,08 ^a (3,30 \pm 0,07 ^a)	1,16 \pm 0,05 ^a (1,10 \pm 0,05 ^a)	33,0 \pm 1,2 ^a (31,29 \pm 1,14 ^a)	9,5 \pm 0,3 ^a (9,0 \pm 0,2 ^a)
Arándano LIO	53,8 \pm 0,9 ^c (51,3 \pm 0,8 ^c)	27,7 \pm 0,7 ^c (26,4 \pm 0,7 ^c)	685 \pm 11 ^c (654 \pm 11 ^c)	70,0 \pm 0,7 ^b (66,8 \pm 0,7 ^b)
Arándano SAC	37 \pm 3 ^b (35 \pm 2 ^b)	19,0 \pm 0,8 ^b (18,3 \pm 0,8 ^b)	59,8 \pm 0,2 ^b (57,6 \pm 0,2 ^b)	69,3 \pm 0,8 ^b (66,8 \pm 0,8 ^b)

Letras distintas indican diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (p-valor<0,05).

Se puede observar como el contenido en fenoles y flavonoides, así como la capacidad antioxidante total, son significativamente mayores para los polvos de arándano. Por otro lado, se observa que el método de secado empleado en los polvos de caqui no afecta significativamente a la actividad antioxidante ni al contenido en fenoles y flavonoides. Sin embargo, esto es distinto en el caso de los polvos de arándano, donde dependiendo del tipo de secado se obtienen valores significativamente distintos para el contenido en fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.

El proceso de triturado, necesario para la obtención de polvo, provoca la desestructuración de la matriz celular aumentando así la posibilidad de extracción de fenoles (Elleuch *et al.*, 2011). Este fenómeno explicaría el aumento del contenido en fenoles tras la etapa de secado, ya que el contenido en compuestos fenólicos totales de la fruta de arándano es de 12,56 mg EAG/g ms (Ceja y López, 2009).

El contenido en fenoles totales de los polvos de caqui es prácticamente el mismo en ambos tipos de secado, siendo ligeramente mayor el polvo obtenido por secado por aire caliente. En los polvos de arándano se observa como hay un mayor contenido de fenoles totales en el obtenido por liofilización. Esto podría deberse a que el proceso de sublimación del agua durante la liofilización daña la microestructura celular, facilitando el proceso de extracción de los fenoles (Elleuch *et al.*, 2011).

Al comparar con otros estudios se comprueba que los valores obtenidos para los fenoles totales, tanto de los polvos de caqui como de los de arándano, son superiores a los fenoles

presentes en otras frutas frescas, como pueden ser la fresa que contiene alrededor de 2,5 mg EAG/g ms o el mango y maracuyá que no alcanzan 1 mg EAG/g m. En cambio, también hay frutas que poseen un contenido en fenoles mayor a estos polvos, como es el caso del albaricoque que posee 4,4 mg EAG/g ms, superando al contenido en fenoles del polvo de caqui (Vasco *et al.*, 2008).

Los valores del contenido en flavonoides son similares a los obtenidos por otros autores. Según Pomar (2018), el polvo de caqui liofilizado contiene alrededor de 2,7 mg EQ/g ms de flavonoides, y el polvo de caqui secado a 60 °C posee 0,90 mg EQ/g ms. Además, como bien es sabido, algunas frutas tienen mayor presencia de compuestos antioxidantes en la piel, es por eso por lo que los polvos obtenidos a partir de este residuo presentan un contenido en flavonoides totales superior incluso al de la propia fruta que en el caso del caqui Persimon se sitúa alrededor de 0,7 mg EQ/g ms (Martínez-Las Heras *et al.*, 2017) y en el arándano sobre 3,42 mg EQ/g ms (Agostini, 2004).

En cuanto a la capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH, se observan valores casi idénticos para cada tipo de polvo, independientemente del método de secado empleado. Sin embargo, encontramos una gran diferencia en la capacidad antioxidante total por el método ABTS para el arándano, que se ha visto afectada por el tipo de secado, siendo mucho mayor el contenido del polvo de arándano liofilizado.

Al comparar con los resultados de otros estudios, se observa que la capacidad antioxidante para el polvo de caqui que hemos obtenido es significativamente inferior a la obtenida por otros autores que atribuyen 117,2 mg TE/g ms por el método ABTS, y 37,8 mg TE/g ms por el método DPPH para el liofilizado. El contenido para el polvo de caqui secado por aire caliente también es superior en otros estudios, con valores de 57,8 mg TE/g ms por ABTS y 31,3 mg TE/g ms (Pomar, 2018).

Sin embargo, para el polvo de arándano ocurre lo contrario, ya que se han obtenido unos valores de capacidad antioxidante significativamente mayores a los mostrados en otros estudios. Según Melchor (2018) el polvo de arándano secado a 70 °C posee una capacidad antioxidante por el método ABTS de 60 mg TE/100 g ms, y de 101,1 mg TE/100 g ms por el método DPPH.

Los cuatro tipos de polvo poseen mayor contenido en fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante que otras frutas y verduras de uso común. Los polvos de caqui, por ejemplo, presentan un mayor contenido en fenoles que la piña, que tiene 31,76 mg EAG/100 g ms (Ravimannan y Nisansala, 2017), y un mayor contenido en flavonoides que la espinaca, la cual posee 108,7 mg EQ/ 100 g ms. Los polvos de arándano muestran un mayor contenido en fenoles que, por ejemplo, la piel de granada con 1639,7 mg EAG/100 g ms, y un mayor contenido en flavonoides que el plátano, el cual posee 715 mg EAG/100g ms (Singh *et al.*, 2016). Además, tanto el polvo de arándano como de caqui presentan mayor capacidad antioxidante que otras frutas, como la sandía, que tiene 14,6 mg TE/100 g, o como la naranja, con 37,5 mg TE/100 g (Ruiz-Torralba *et al.*, 2018).

Como conclusión, se puede afirmar que tanto los polvos de caqui como de arándano poseen buenas propiedades antioxidantes, por lo que pueden aportar beneficios sobre la salud humana si se incorporan como ingredientes en alimentos que formen parte de la dieta diaria.

4.1.5. Contenido en carotenoides

En la tabla 10 se muestra el contenido en carotenoides, concretamente en los carotenos β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno, de los polvos de caqui obtenidos por liofilización y secado a 60 °C.

Tabla 10. Contenido en β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno del polvo de caqui expresados en $\mu\text{g/g}$ muestra seca. Media \pm desviación estándar.

	β -criptoxantina	α -caroteno	β -caroteno
Caqui LIO	43 \pm 2 ^b	2,88 \pm 0,14 ^a	18,1 \pm 0,7 ^b
Caqui SAC	38 \pm 6 ^a	3,16 \pm 0,08 ^b	17,0 \pm 0,3 ^a

Letras distintas indica diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (p-valor<0,05).

De los casi 50 tipos de carotenoides disponibles en la dieta humana que pueden ser absorbidos y metabolizados, solo seis representan más del 95% de los carotenoides presentes en nuestra sangre. De estos seis tipos, tres son carotenos con actividad provitamínica A (β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno) y la otra mitad son xantofilas que no presentan esta capacidad (licopeno, luteína y zeaxantina) (Beltrán *et al.*, 2012).

Puede observarse que los polvos obtenidos por liofilización tienen un contenido superior de β -criptoxantina y β -caroteno, y los obtenidos por secado por aire caliente superan ligeramente a los liofilizados en el contenido en α -carotenos. El análisis estadístico pone de manifiesto que estas diferencias son significativas en todos los casos, por lo que podemos afirmar que el tipo de secado influye de forma diferente sobre cada uno de los carotenoides analizados.

En otros estudios consultados se exponía un contenido en carotenoides en el caqui fresco de 253 $\mu\text{g}/100$ g de muestra de β -caroteno y 1.447 $\mu\text{g}/100$ g de muestra de β -criptoxantina (Beltrán *et al.*, 2012). En ambos casos el contenido en carotenoides es mayor en nuestro polvo procedente del residuo que en la pulpa de fruta.

La inestabilidad de los carotenoides se debe a que son compuestos altamente insaturados, por lo que se degradan fácilmente por procesos oxidativos. Sin embargo, también existen otros factores, como la temperatura, que producen cambios cualitativos en estos compuestos debido a reacciones de isomerización.

La temperatura ejerce un claro efecto sobre el contenido en carotenoides de los alimentos. Los carotenoides con mayor actividad biológica son aquellos que poseen todos sus dobles enlaces en la forma isomérica *trans*. Los tratamientos térmicos transforman estos dobles enlaces en su forma *cis*, disminuyendo así la actividad de los carotenoides. Estos fenómenos de termoisomerización son más acusados en α -caroteno que en β -caroteno (Aguilar-Espinosa *et al.*, 2017). Además, autores como Howard *et al.*, (1996) que estudió el efecto de diferentes temperaturas sobre el contenido total en carotenoides de las zanahorias, afirman que, a menor tiempo y temperatura, mayor retención de carotenoides.

4.1.6. Contenido en antocianinas

En la tabla 11 se muestra el contenido en antocianinas, concretamente en la cianidina, delphinidina y malvidina de los polvos de arándano obtenidos por liofilización y secado a 70 °C.

Tabla 11. Contenido en cianidina, delphinidina y malvidina del polvo de arándano expresados en $\mu\text{g/g}$ muestra seca. Media \pm desviación estándar.

	Cianidina	Delphinidina	Malvidina
Arándano LIO	740 \pm 94 ^a	1220 \pm 88 ^a	676 \pm 3 ^a
Arándano SAC	668 \pm 21 ^a	899 \pm 13 ^b	516 \pm 9 ^b

Letras distintas indica diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (p-valor<0,05).

Se observa que el contenido en cianidina es ligeramente superior para el polvo de arándano liofilizado. El contenido en delphinidina y malvinidina es significativamente superior en el polvo obtenido por liofilización. Según el análisis estadístico, con un nivel de confianza del 95%, estas diferencias son significativas, con lo que se puede afirmar que el tipo de secado afecta al contenido en antocianinas de los polvos de arándano analizados. Esto puede explicarse teniendo en cuenta el efecto que ejerce la temperatura sobre las antocianinas en el proceso de secado por aire caliente, ya que el tratamiento térmico provoca que las antocianinas y sus azúcares conjugados se rompan en pequeñas cadenas de aldehídos y derivados del ácido benzoico (Zorić *et al.*, 2014).

En otros estudios realizados sobre polvos de arándano, se obtuvo un contenido en cianidina alrededor de 980 $\mu\text{g/g}$ ms, valor ligeramente superior al obtenido en este trabajo. Asimismo, se obtuvo un contenido en cianidina del bagazo fresco de arándano de 1500 $\mu\text{g/g}$ ms (Roig, 2017), valor significativamente superior al contenido en cianidina de los polvos, lo que puede deberse a la exposición al oxígeno durante el proceso de triturado, así como la variedad y las condiciones de cultivo.

No obstante, al comparar con otros estudios sobre polvos de frutas y sus subproductos, se observa que el polvo de arándano, tanto el obtenido por liofilización como el obtenido por secado por aire caliente, posee un mayor contenido total en antocianinas que polvos procedentes de otras frutas. Por ejemplo, según el estudio realizado por Michalska *et al.*, (2016) el contenido total en antocianinas del polvo de ciruela es de 59 $\mu\text{g/g}$ ms.

4.2. Efecto de la digestión: etapa gástrica e intestinal

4.2.1. Efecto sobre las propiedades antioxidantes

Caqui

En la figura 7 se muestra el contenido en fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH, expresados en mg EAG, mg EQ y mg TE por gramo de polvo digerido, respectivamente, del polvo de caqui liofilizado y secado por aire caliente, antes de la digestión, tras la simulación de la etapa gástrica y tras la simulación de la etapa intestinal.

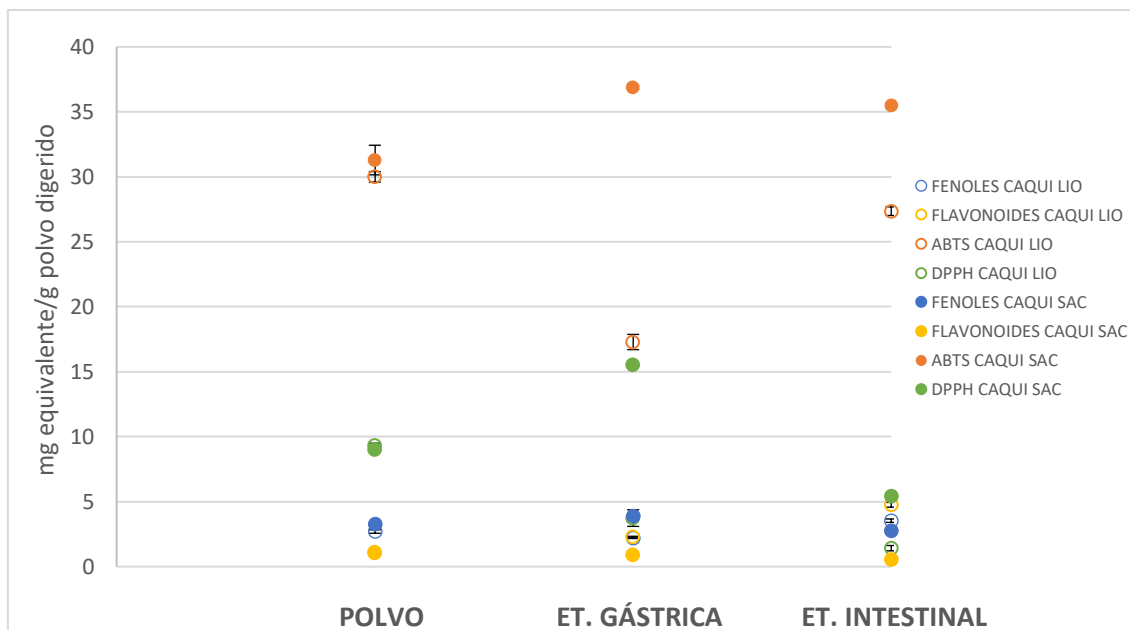


Figura 7. Contenido en fenoles (mg EAG/g), flavonoides (mg EQ/g) y capacidad antioxidante (mg TE/g) de los polvos de caqui SAC y LIO antes de la simulación de la digestión, tras la etapa gástrica y tras la etapa intestinal.

Se observa que el proceso de digestión no afecta de forma significativa a las propiedades antioxidantes del polvo de caqui. La capacidad antioxidante ABTS y DPPH presentan cierta variabilidad tras la simulación de ambas etapas de la digestión. La capacidad antioxidante por el método DPPH presenta un ligero aumento tras la etapa gástrica, que vuelve a disminuir tras la etapa intestinal siendo, al final, el contenido menor que el del propio polvo. En la capacidad antioxidante determinada por el método ABTS se observa un aumento del polvo de caqui SAC y una disminución en el polvo del caqui LIO tras la simulación de ambas etapas. Sin embargo, el contenido en fenoles y flavonoides se mantiene muy estable a lo largo del proceso.

El contenido en fenoles, flavonoides y DPPH no se ve afectado por el método de deshidratación, sin embargo, este fenómeno si que afecta a la capacidad antioxidante medida por el método ABTS, siendo mayor en el polvo de caqui SAC. Esta diferencia entre el polvo de caqui SAC y LIO se atenúa considerablemente tras las etapas gástrica e intestinal, siendo significativamente mayor tras la etapa gástrica.

El contenido total de fenoles y flavonoides tras la etapa intestinal es mayor en los polvos de caqui obtenidos por liofilización, pero la capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH, es mayor en los polvos de caqui secados por aire caliente, tanto antes como después de la simulación digestiva.

Arándano

En la figura 8 aparece representado el contenido el contenido en fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante determinada por los métodos de ABTS y DPPH, de los polvos de arándano liofilizados y secados por aire caliente, antes de la digestión, tras la etapa gástrica y tras la etapa intestinal. El contenido en fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante está expresado, respectivamente, en mg EAG, mg EQ y mg TE por gramo de polvo digerido.

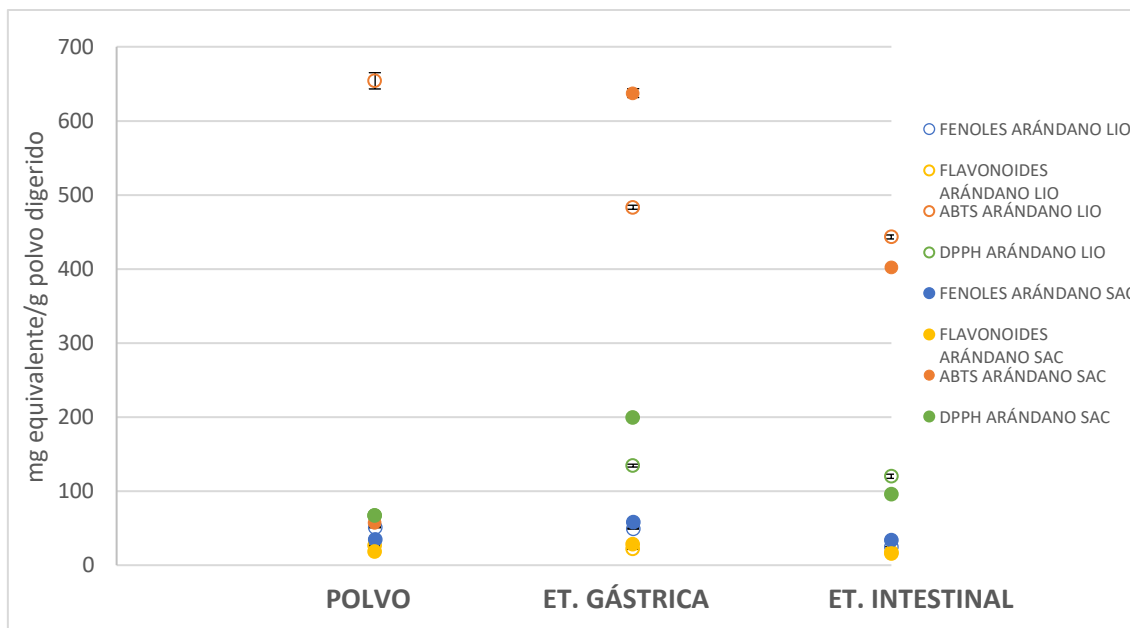


Figura 8. Contenido en fenoles (mg EAG/g), flavonoides (mg EQ/g) y capacidad antioxidante (mg TE/g) de los polvos de arándano SAC y LIO antes de la simulación de la digestión, tras la etapa gástrica y tras la etapa intestinal.

Se observa en la gráfica cierta similitud con los resultados obtenidos en la figura 8 para las propiedades antioxidantes del polvo de caqui.

El contenido en fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante DPPH, no se ve afectado por el proceso digestivo. El contenido en fenoles y flavonoides se mantiene prácticamente igual a lo largo del proceso, sin embargo, la capacidad antioxidante obtenida por el método DPPH experimenta un ligero aumento al final de la etapa intestinal en comparación con el contenido de los polvos sin digerir. No obstante, la simulación de la digestión sí que influye en la capacidad antioxidante medida por ABTS, pues se observa un significativo aumento de su contenido en el polvo secado por aire caliente tras la etapa gástrica; en el polvo liofilizado se observa una progresiva disminución a lo largo de la digestión.

En cuanto al método de deshidratación, podemos decir que los fenoles y flavonoides no se ven afectados por este, pero la capacidad antioxidante medida por DPPH, es ligeramente mayor, tras la etapa intestinal, en el polvo liofilizado. La capacidad antioxidante medida por ABTS es significativamente mayor en los polvos obtenidos por liofilización, aunque el proceso digestivo disminuye esta gran diferencia.

Bioaccesibilidad

En la tabla 12 se representan los porcentajes de bioaccesibilidad de los compuestos con capacidad antioxidante, medida por los métodos ABTS y DPPH, de los distintos tipos de polvo, tras la simulación de etapa gástrica y la etapa intestinal.

Tabla 12. Porcentaje de bioaccesibilidad de las muestras de polvos tras la simulación de las etapas gástrica e intestinal, por los métodos de determinación de capacidad antioxidante ABTS y DPPH. Media \pm desviación estándar.

	% Bioaccesibilidad			
	ABTS		DPPH	
	Etapa gástrica	Etapa intestinal	Etapa gástrica	Etapa intestinal
Caqui LIO	52,14 \pm 0,03 ^d	75,529 \pm 0,014 ^d	127,1 \pm 0,8 ^b	111,4 \pm 0,3 ^c
Caqui SAC	42,088 \pm 0,006 ^c	60,077 \pm 0,007 ^c	5,2736 \pm 0,0017 ^a	69,55 \pm 0,02 ^b
Arándano LIO	17,464 \pm 0,003 ^b	23,297 \pm 0,005 ^a	5,400 \pm 0,003 ^a	19,440 \pm 0,009 ^a
Arándano SAC	12,464 \pm 0,003 ^a	31,106 \pm 0,002 ^b	47,47 \pm 0,03 ^a	20,317 \pm 0,004 ^a

Letras distintas indica diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (p-valor<0,05).

A partir de esta tabla, se observa que los porcentajes de bioaccesibilidad tras la simulación de ambas etapas son mayores en los polvos de caqui. El arándano SAC determinado por el método DPPH sería una excepción, ya que posee un porcentaje significativamente superior al presentado por el caqui SAC.

En los porcentajes de bioaccesibilidad de los polvos de caqui, se pueden apreciar diferencias significativas entre los obtenidos por liofilización y los obtenidos por secado por aire caliente. En este caso, el tipo de secado si que influye sobre la bioaccesibilidad de los polvos, siendo más bioaccesibles aquellos obtenidos por procesos de liofilización. Cabe destacar la drástica disminución que se produce en los polvos de caqui SAC medidos por DPPH tras la etapa gástrica. Esto podría deberse a que la temperatura de procesado tiene un claro efecto en la capacidad antioxidante determinada mediante el método del DPPH. Un estudio realizado por Zorić *et al.*, (2017) demostró que la capacidad antioxidante de los polvos de cereza determinada mediante el método del DPPH disminuye al aumentar la temperatura de almacenamiento. Por lo que, en este caso, puede que se hayan degradado los compuestos con actividad antioxidante a causa de las altas temperaturas.

Sin embargo, en el caso de los polvos de arándano, aparentemente no se observa ninguna relación entre la bioaccesibilidad y el método de secado mediante el que han sido obtenidos. En la tabla, se muestra también un descenso importante en la bioaccesibilidad del polvo de arándano LIO determinado por el método del DPPH tras la etapa gástrica.

4.2.2. Efecto sobre el contenido en carotenoides del caqui

En la figura 9 se muestra el contenido en carotenoides, concretamente el contenido en β -criptoxantina, como del α -caroteno y β -caroteno de los dos polvos de caqui sin digerir y tras cada una de las etapas de gestión. Los resultados están expresados en $\mu\text{g/g}$ materia seca.

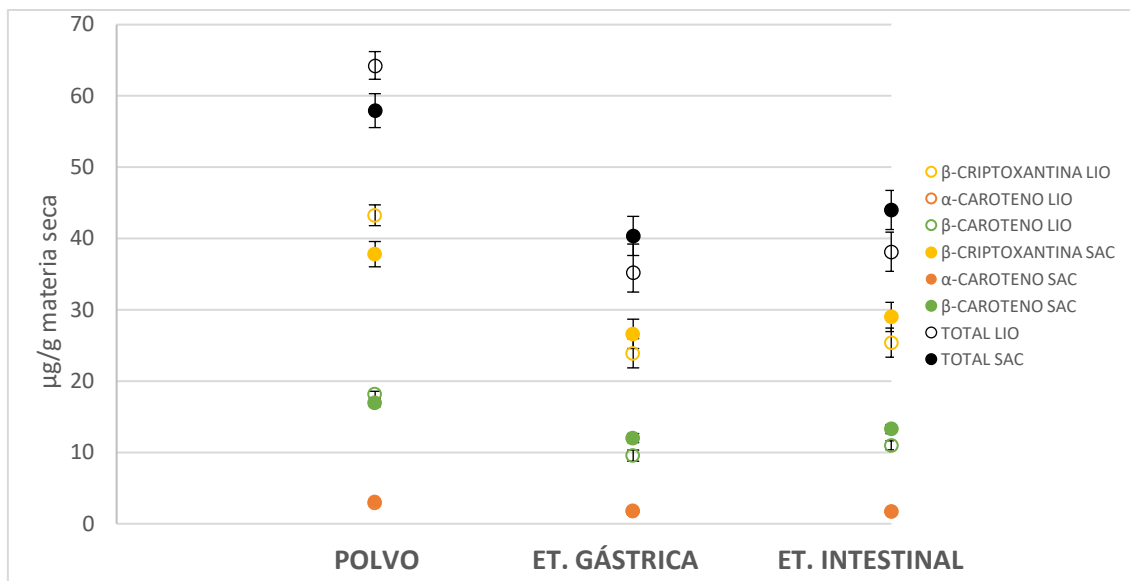


Figura 9. Contenido en β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno de los polvos de caqui SAC y LIO, tras la etapa de simulación gástrica y tras la etapa de simulación intestinal, expresados en $\mu\text{g/g}$ materia seca.

El análisis estadístico revela, con un nivel de confianza del 95%, que el proceso de digestión afecta de forma significativa al contenido de los tres carotenoides analizados. Además, este efecto es significativamente mayor en los polvos que han sido obtenidos por liofilización.

Mientras que el contenido en α y β caroteno en los polvos sin digerir se ve afectado ligeramente por el tratamiento de deshidratación, el contenido de β -criptoxantina si que es significativamente mayor en los polvos obtenidos por liofilización. Sin embargo, el mayor efecto de degradación que el proceso digestivo ejerce sobre los polvos obtenidos por liofilización, hace que al final de la etapa intestinal el contenido total de los tres carotenoides sea mayor en los polvos que han sido obtenidos mediante el procedimiento de secado por aire caliente.

El mayor contenido de carotenoides en los polvos liofilizados puede explicarse teniendo en cuenta las condiciones de operación. La ausencia de oxígeno y la baja temperatura del proceso de liofilización, evitan el deterioro provocado por estos dos agentes en el proceso de secado por aire caliente. Por otro lado, la mayor degradación que el proceso digestivo provoca sobre los carotenoides en el polvo liofilizado, puede atribuirse a una mayor facilidad de acceso de los ácidos presentes en los jugos gástricos, debido al mayor daño estructural que se produce en el tratamiento de liofilización (Boon *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2012).

4.2.3. Efecto sobre el contenido en antocianinas del arándano

En la figura 10 se muestra el contenido en antocianinas, concretamente en cianidina, delphinidina y malvidina, de las muestras de polvo de arándano secado por aire caliente y liofilizado, y tras la simulación de las etapas gástrica e intestinal. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/g}$ materia seca.

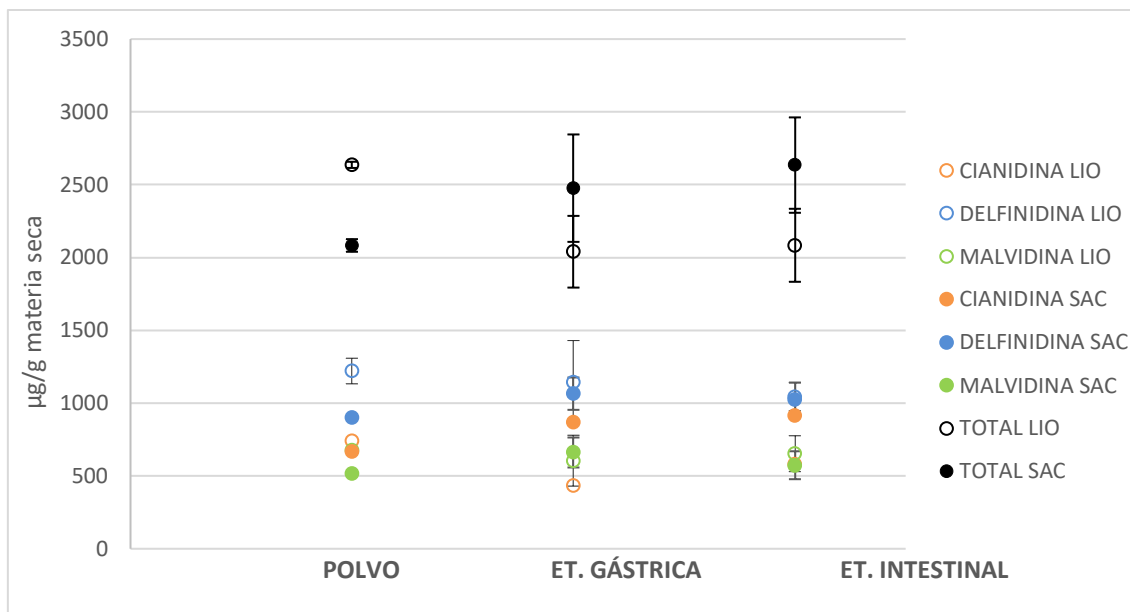


Figura 10. Contenido en cianidina, delphinidina y malvidina de los polvos de arándano SAC y LIO frescos, tras la etapa de simulación gástrica y tras la etapa de simulación intestinal, expresados en µg/g materia seca.

Con un nivel de confianza del 95%, el análisis estadístico revela que el proceso digestivo afecta significativamente al contenido en antocianinas de los polvos de arándano.

Respecto al contenido en cianidina se observa que aunque el tratamiento de secado no ejerce un efecto significativo, sí que lo ejerce el proceso de digestión así como la interacción entre ambos factores. La forma en que el proceso de digestión afecta al contenido en cianidina depende del tratamiento de secado por el que se hayan obtenido las muestras. Aunque el polvo liofilizado antes de la digestión posee un mayor contenido en cianidina, se observa que tras la digestión, el polvo que ha sido secado por aire caliente conserva un mayor contenido en esta antocianina.

Existen diferencias significativas para el contenido en delphinidina del polvo obtenido por liofilización y el obtenido por secado por aire caliente. No obstante, el proceso de digestión afecta a cada uno de ellos de forma distinta, de manera que tras las dos etapas de digestión, el contenido que queda de delphinidina es igual en ambos polvos.

El contenido en malvidina presenta una evolución similar al contenido de la delphinidina. En el polvo sin digerir se observan diferencias significativas entre el liofilizado y el secado por aire caliente, pero como consecuencia del proceso digestivo, tras las dos etapas de digestión el contenido de malvidina es el mismo para ambos.

Los polvos liofilizados tienen un mayor contenido en antocianinas que los secados por aire caliente. Esto puede ser debido a que las antocianinas son compuestos muy sensibles a la oxidación y, por tanto, durante el tratamiento de las muestras pueden degradarse estos compuestos. El proceso de secado por aire caliente emplea altas temperaturas en presencia de oxígeno produciendo una mayor pérdida del contenido en antocianinas que el proceso de liofilización (Zapata, 2014).

Sin embargo, al igual que los carotenoides, el proceso digestivo provoca una mayor degradación de antocianinas en los polvos liofilizados. Este hecho podría deberse al mayor daño estructural que causa el proceso de liofilización, haciendo la estructura celular más accesible para los ácidos presentes en el estómago.

4.3. Etapa colónica

Los resultados de la secuenciación que se presentan en esta memoria son preliminares ya que en el momento de la redacción aún no habían finalizado.

4.3.1. Efecto sobre el DNA bacteriano

En la figura 11 se muestran las variaciones de la concentración de DNA bacteriano de los ocho individuos, representados con distintas letras (A,B,C...), antes y después de la fermentación *in vitro* de los cuatro tipos de polvo digeridos, así como de las muestras digeridas de inulina como control positivo.

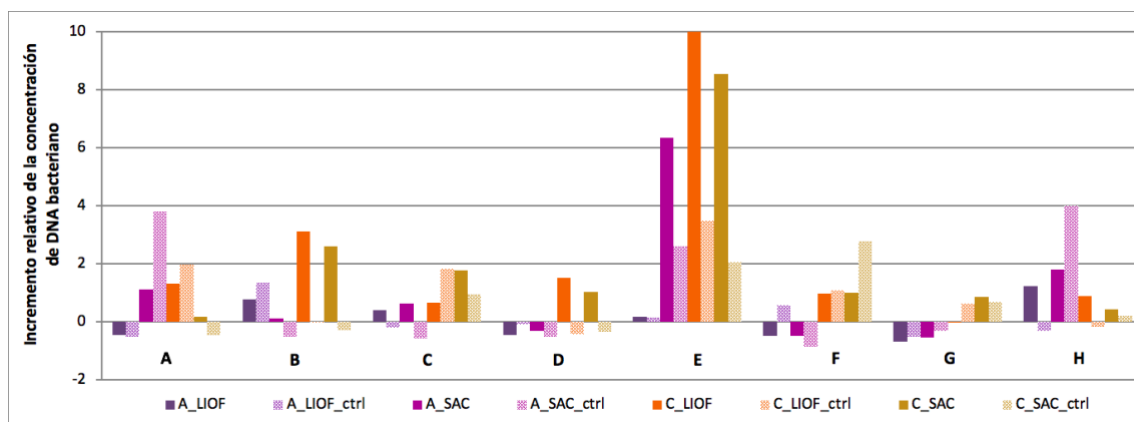


Figura 11. Incremento relativo de la concentración de DNA bacteriano de distintos donantes, antes y después de la fermentación *in vitro*. Como sustrato se emplean los polvos digeridos de caqui (C) y arándano (A), obtenidos tanto por liofilización (LIO) como secado por aire caliente (SAC), así como un control positivo de inulina para cada polvo (ctrl).

La inulina es un carbohidrato de almacenamiento presente en muchas plantas, vegetales, frutas y cereales, considerado como alimento prebiótico (Madrigal y Sangronis, 2007). El concepto de alimento prebiótico ha sido definido por numerosos autores e instituciones, por ejemplo, la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP), que lo define como: *“ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo”*. Otras organizaciones como la World Gastroenterology Organisation (WGO), define los prebióticos como: *“sustancias de la dieta que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas”*.

En la figura se puede observar que la variación en la cantidad de DNA bacteriano que produce la fermentación de cada tipo de polvo, depende del individuo, pues aparecen diferencias muy variables entre los distintos voluntarios.

A pesar de la elevada variabilidad observada de unos individuos a otros, el análisis estadístico puso de manifiesto, con un nivel de confianza del 95%, que el polvo de caqui provoca un incremento en el contenido en DNA significativamente distinto al del polvo de arándano. El polvo de arándano induce un efecto muy variable, obteniéndose en algunos casos variaciones

negativas. Sin embargo, para los polvos de caqui se observa una respuesta positiva por parte de la microbiota intestinal en los ocho individuos, observándose una mejor respuesta incluso que en el caso de la inulina empleada como control. Por otro lado, el tipo de secado no tuvo un efecto significativo en ningún caso.

4.3.2. Secuenciación

En la figura 12 se indica el número de géneros bacterianos detectados en los ocho individuos, representados con letras (A, B, C...), antes y después de la fermentación colónica de los cuatro sustratos.

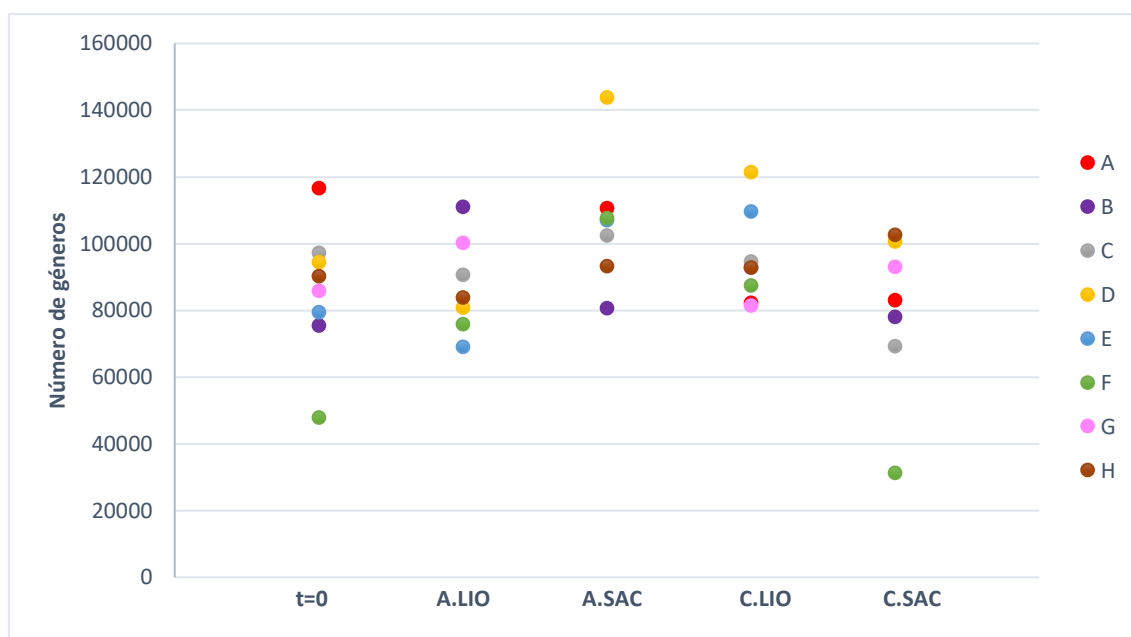


Figura 12. Número de géneros de bacterias colónicas presentes en los ocho individuos, antes y después de la fermentación de los sustratos de polvo de arándano LIO (A.LIO), arándano SAC (A.SAC), caqui LIO (C.LIO) y caqui SAC (C.SAC).

Se observa que el número de géneros bacterianos detectados en todos los donantes se encuentran dentro de un determinado intervalo, tanto antes como después de las fermentaciones colónicas. Dependiendo del individuo y del tipo de sustrato, varía la cantidad de géneros detectados. No se aprecian diferencias significativas asociadas al tipo de polvo ni al método de secado de los sustratos.

En la figura 13 se representan, con diferentes tonalidades, los distintos tipos de géneros detectados antes y después de la fermentación colónica de cada muestra previamente digerida. En la primera columna se muestran los distintos géneros presentes antes de la fermentación, en la segunda, los presentes tras la fermentación de la muestra digerida de polvo y en la tercera se representan los diferentes géneros tras la fermentación del control positivo de inulina.

Para facilitar una mejor visualización, se adjuntan las figuras con mayor tamaño y con la leyenda correspondiente a los distintos tipos de género en el anexo.

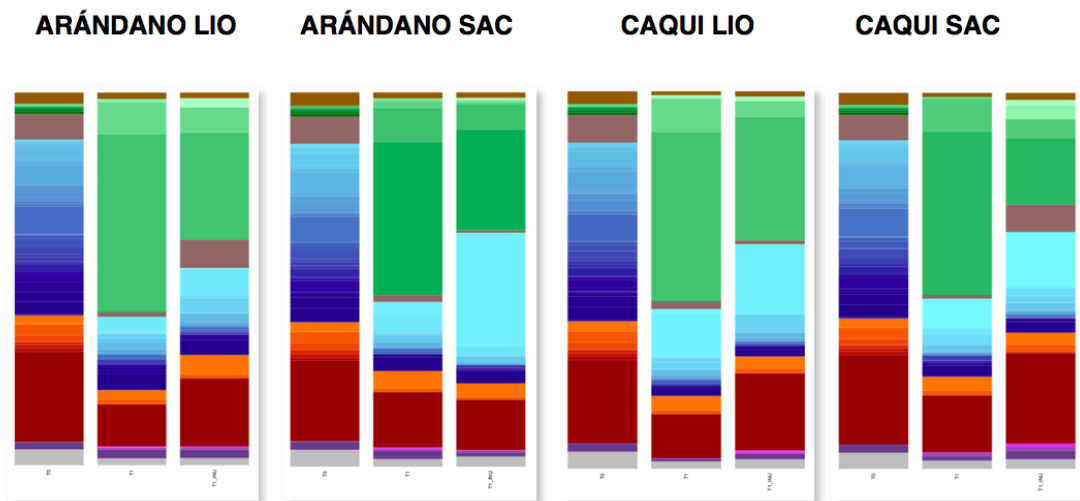


Figura 13. Composición a nivel de género bacteriano del sustrato sin fermentar, el sustrato fermentado y el control positivo fermentado, de cada muestra de polvo digerida.

Se observa que la composición a nivel de género es completamente diferente tras la simulación de la fermentación. Se aprecia también una disminución de la diversidad de los géneros, hecho que podría deberse a la presión selectiva que se está ejerciendo sobre la microbiota inicial, ya que crecen aquellas bacterias que pueden metabolizar correctamente el sustrato.

También se puede ver que se produce un aumento de Enterobacterias, representadas de color verde, tanto en la fermentación con sustrato como en la fermentación con inulina. Esto se debe a que las Enterobacterias se encuentran presentes en baja cantidad en las heces y son de crecimiento rápido, empleando para ello restos de compuestos presentes en las mismas heces (Joo *et al.*, 2018; Woerther *et al.*, 2013). Excepto en la fermentación del sustrato de polvo del caqui LIO, hay un aumento del filo Actinobacterias, representadas de color morado. Estas bacterias están implicadas en la degradación de compuestos de fibra (Escudero *et al.*, 2012), componentes presentes tanto en el polvo de caqui como de arándano.

5. CONCLUSIONES

Se ha comprobado que, tanto para los polvos procedentes de subproductos de caqui como para los de bagazo de arándano, el tipo de secado determina las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de los mismos. En este sentido, la operación de liofilización proporciona mayor contenido de componentes bioactivos específicos en los dos tipos de polvos.

La determinación de las propiedades antioxidantes de los polvos por los métodos DPPH Y ABTS resulta muy inespecífica y no proporciona información clara sobre el efecto que produce la digestión gastrointestinal *in vitro*. Sin embargo, el análisis de componentes específicos (carotenoides en el polvo de caqui y antocianinas en el polvo de arándano) muestra, en términos generales, una menor degradación de los mismos tras la simulación *in vitro* del proceso digestivo de los polvos obtenidos mediante secado por aire caliente.

La composición a nivel de género es completamente diferente tras la simulación de la fermentación *in vitro* de los diferentes sustratos, produciéndose un crecimiento de Actinobacterias, filo descrito como comensal de la microbiota con posibles efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, hay un aumento de Enterobacterias posiblemente procedentes de las heces.

Como conclusión general podemos decir que los polvos procedentes de subproductos de caqui y bagazo de arándano analizados en este trabajo, presentan propiedades funcionales que los hacen interesantes para ser utilizados como ingredientes alimentarios que permitan aumentar la cantidad de componentes bioactivos presentes en los alimentos, y contribuir al concepto de economía circular en la industria agroalimentaria.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agostini, L. R., Morón Jiménez, M. J., Ramón, A. N. & Ayala Gómez, A. (2004). Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 54(1), 89-92.
- Aguilar-Espinosa, M., Alcalde, M. J., Alonso, G. L., Álvarez, R., Angaman, D. M., Arhazem, O., Bonet, M. L. et al., 2017. Carotenoides en agroalimentación y salud.
- Allué, I. P. (2015). Microbiota y enfermedades gastrointestinales. *Anales de Pediatría*, 83(6), 443.
- Andrés, A. (2019). Desarrollo de un Sistema de digestión in vitro para la determinación de la bioaccesibilidad de componentes bioactivos. Trabajo fin de grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Avila Carreras, N. M. E. & Bovi Mitre, M. G. (2018). Bioaccesibilidad de arsénico y cálculos de ingestas en dietas consumidas por una población endémica de Taco Pozo. Comparación entre las ingestas infantiles y adultas. *Toxicología*, 35, 11-17.
- Ayala-Zavala, J., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Aviña, J.E. & González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874.
- Ballesteros, V., Costa, O., Iniguez, C., Fletcher, T., Ballester, F. & Lopez-Espinosa, M. J. (2017). Exposure to perfluoroalkyl substances and thyroid function in pregnant women and children: a systematic review of epidemiologic studies. *Environment international*, 99, 15-28.
- Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S. & Olmedilla Alonso, B. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A: utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutrición hospitalaria*, 27(4), 1334-1343.
- Beresford, N. A., Mayes, R. W., Cooke, A. I., Barnett, C. L., Howard, B. J., Lamb, C. S. & Naylor, G. P. L. (2000). The importance of source-dependent bioavailability in determining the transfer of ingested radionuclides to ruminant-derived food products. *Environmental science & technology*, 34(21), 4455-4462.
- Boisen, S. & Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition research reviews*, 4(1), 141-162.
- Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J. & Decker, E. A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(6), 515-532.
- Bornhorst, G. M. & Paul Singh, R. (2014). Gastric digestion in vivo and in vitro: how the structural aspects of food influence the digestion process. *Annual review of food science and technology*, 5, 111-132.
- Boticario, C. B. & Angosto, M. C. (2012). Digestión y metabolismo energético de los nutrientes. UNED, Centro de Plasencia.
- Brook, I. (1999). Bacterial interference. *Critical reviews in microbiology*, 25(3), 155-172.
- Bunea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M., Verhé, R. & Van Camp, J. (2008). Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea L.*). *Food chemistry*, 108(2), 649-656.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581.
- Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M., & Pérez-Gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 61(3), 233-241.
- Cătunescu, G. M., Rotar, A. M., Pop, C. R., Diaconeasa, Z., Bunghez, F., Socaciu, M. I. & Semeniuc, C. A. (2019). Influence of extraction pre-treatments on some phytochemicals and biological activity of Transylvanian cranberries (*Vaccinium vitis-idea L.*). *LWT*, 102, 385-392.
- Ceja, Q. M. L. C. & López, O. P. Potencial nutracéutico de cultivos de arándano (*Vaccinum sp.*) Seleccionados en México. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Coles, L. T., Moughan, P. J. & Darragh, A. J. (2005). In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 421-444.
- Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., Sia, Y. W., et al., (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of oral biology*, 60(6), 863-874.
- De-León-Jaén, S. C., Ovadía-Rosenfeld, L., Vásquez-Delgado, L. R. & Fainsod-Aronowitz, T. (2009). El arándano y su aplicación en urología. *Rev Mex Urol*, 69(3), 104-107.
- Devaraj, S., Hemarajata, P. & Versalovic, J. (2013). La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 47(2), 421-434.
- Dinnella, C., Minichino, P., D'Andrea, A. M. & Monteleone, E. (2007). Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during in vitro digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8423-8429.
- Duncan, S. H., Lobley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P. & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity*, 32(11), 1720.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C. & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food chemistry*, 124(2), 411-421.
- Escudero, E. L. R., Daza, O. D. S. & Torres, J. H. (2012). Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella sp* y *Cellulosimicrobium sp*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 70-80.
- Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I. & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395-401.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) (2019). Dirección URL: < <http://www.fao.org/>>. [Consulta: 23 de Junio 2019]

- Galán, M. G., González, R. J. & Drago, S. R. (2013). Perfil nutricional y dializabilidad de minerales de alimentos de interés social. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 17(1), 3-9.
- García, J.C.; García, G.; Ciordia, M. (2010). Situación actual del cultivo del arándano en el mundo. Dirección URL: <<http://www.serida.org/pdfs/5566.pdf>>. [Consulta: 28 de Junio 2019]
- García, J.C.G.G. (2005). Orientaciones para el cultivo del arándano. *Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)*, 32.
- Giroto, F., Alibardi, L. & Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: a review. *Waste management*, 45, 32-41.
- Grossi, G. V., Ohaco, E. H. & De Michelis, A. (2015). Determinación de fibra dietética total, soluble e insoluble en hongos comestibles de cultivo *Pleurotus ostreatus*.
- Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición hospitalaria*, 22, 14-19.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S. & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, 30(11), 591-600.
- Harasym, J. & Oledzki, R. (2014). Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition*, 30(5), 511-517.
- Hedré, E., Diaz, V. & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European journal of clinical nutrition*, 56(5), 425.
- Hernández, A. (1999). El cultivo de kaki en la comunidad valenciana. Cuadernos de tecnología agraria serie fruticultura. Generalitat Valenciana conselleria de agricultura, pesca y alimentación.
- Howard, L. R., Braswell, D. D. & Aselage, J. (1996). Chemical composition and color of strained carrots as affected by processing. *Journal of Food Science*, 61(2), 327-330.
- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240-248.
- Illumina (2019). 16S metagenomic sequencing library preparation protocol: preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. Part no. 15044223 Rev B. [en línea]. Dirección URL: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>. [Consulta: 3 Jun. 2019].
- ISAPP (2008) 6th Meeting of the International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, London, Ontario. Dirección URL: <<https://isappscience.org>>. [Consulta: 7 de Julio 2019]
- Janevska, D. P., Gospavic, R., Pacholewicz, E. & Popov, V. (2010). Application of a HACCP-QMRA approach for managing the impact of climate change on food quality and safety. *Food research international*, 43(7), 1915-1924.
- Joo, E. J., Kim, S. J., Baek, M., Choi, Y., Seo, J., Yeom, J. S. & Ko, K. S. (2018). Fecal carriage of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae in healthy Korean adults. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(7), 1178-1184.
- Kalmykova, Y., Sadagopan, M. & Rosado, L. (2018). Circular economy—From review of theories and practices to development of implementation tools. *Resources, Conservation and Recycling*, 135, 190-201.
- Kitai, T. & Tang, W. H. (2017). The Role and Impact of gut microbiota in cardiovascular disease. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 70(10), 799-800.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., et al., (2008). Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*, 320, 1647–1651.
- Llácer, G. & Badenes. M. L. (2002). Situación actual de la producción de caqui en el mundo. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.
- Loeffler, J., Schmidt, K., Hebart, H., Schumacher, U. & Einsele, H. (2002). Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 2240-2243.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M. A. & Aruoma, O. I. (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5042-5047.
- Madrigal, L. & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57(4), 387-396.
- Martínez-Calvo, J., Badenes, M. L. & Llácer, G. (2012). Descripción de variedades de caqui (*Diospyros kaki Thunb.*) del Banco de Germoplasma del IVIA. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.
- Martínez-Las Heras, R., Landines, E. F., Heredia, A., Castelló, M. L. & Andrés, A. (2017). Influence of drying process and particle size of persimmon fibre on its physicochemical, antioxidant, hydration and emulsifying properties. *Journal of food science and technology*, 54(9), 2902-2912.
- Martínez, R. (2017). Valorización del cultivo del caqui. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Matsuo, T. & Ito, S. (1977). On mechanisms of removing astringency in persimmon fruits by carbon dioxide treatment I. Some properties of the two processes in the de-astringency. *Plant and Cell Physiology*, 18(1), 17-25.
- Melchor, M. (2018). Selección de la temperatura de secado más adecuada y efecto del triturado y almacenamiento sobre las propiedades físico-químicas y funcionales de un polvo de bagazo de arándano obtenido mediante secado por aire caliente. Trabajo fin de grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Mertens, D.R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 85(6), 1217-1240.
- Michalska, A. & Łysiak, G. (2015). Bioactive compounds of blueberries: post-harvest factors influencing the nutritional value of products. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 18642-18663.
- Michalska, A., Wojdyło, A., Lech, K., Łysiak, G. P. & Figiel, A. (2016). Physicochemical properties of whole fruit plum powders obtained using different drying technologies. *Food chemistry*, 207, 223-232.
- Mimouni, A., Deeth, H. C., Whittaker, A. K., Gidley, M. J. & Bhandari, B. R. (2009). Rehydration process of milk protein concentrate powder monitored by static light scattering. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1958-1965.

- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D., Ménard, O., Recio, I., Santos, C., Singh, R., Vegarud, G., Wickham, M., Weitschies, W. & Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113-1124.
- Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente. (2017). Dirección URL: <<http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anales-cultivos>>. [Consulta: 9 de Julio 2019]
- Mirabella, N., Castellani, V. & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.
- Morales, L. (2012). Estudio del efecto de las operaciones de liofilización y deshidratación osmótica sobre la viabilidad de los microorganismos y las propiedades ópticas y mecánicas de un snack de manzana (var granny smith) con un elevado contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *Salivarius*. Trabajo fin de máster en Gestión y Seguridad Alimentaria. Universidad Politécnica de Valencia.
- Mowat, A. (1990). Charting the future, proceedings of the first national non-astringent persimmon industry workshop. *Gatton College: The university of Queensland*. 56(5), 425-430.
- Neacsu, M., Vaughan, N., Raikos, V., Multari, S., Duncan, G. J., Duthie, G. G. & Russell, W. R. (2015). Phytochemical profile of commercially available food plant powders: their potential role in healthier food reformulations. *Food Chemistry*, 179, 159-169.
- Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. & Rastall, R. A. (2000). In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*, 83(3), 247-255.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2014). Dirección URL: <<http://www.nu.org.bo/agencia/organizacion-de-las-naciones-unidas-para-la-agricultura-y-la-alimentacion/>>. [Consulta: 26 de Junio 2019]
- Pedroza, R. (2013). Algunos alimentos por propiedades antioxidantes y su aplicación en productos de consumo. 6ª edición Food Technology Summit & Expo, México. Universidad iberoamericana.
- Piedra, O. & Wensley, J. (2009). Análisis situacional de la gestión de residuos sólidos urbanos casos: Catalunya (España) y Loja (Ecuador).
- Pita, M. L. (2015). Biodisponibilidad de nutrientes en alimentos. Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Universidad de Buenos Aires.
- Pomar, D. (2018). Estudio de la deshidratación de subproductos de caqui para la obtención de productos en polvo. Propuesta de diseño de un secador continuo. Trabajo fin de máster en Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Valencia.
- Potter, R. M., Dougherty, M. P., Halteman, W. A. & Camire, M. E. (2007). Characteristics of wild blueberry–soy beverages. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5), 807-814.
- Raghavendra, S. N., Swamy, S. R., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Kumar, S. & Tharanathan, R. N. (2006). Grinding characteristics and hydration properties of coconut residue: A source of dietary fiber. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 281-286.
- Ramachandriah, K. & Chin, K. B. (2016). Evaluation of ball-milling time on the physicochemical and antioxidant properties of persimmon by-products powder. *Innovative food science & emerging technologies*, 37, 115-124.
- Ravimannan, N. & Nisansala, A. (2017). Study on antioxidant activity in fruits and vegetables – A Review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(3), 93-101.
- 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.
- Rivas Montoya, E. (2014). Desarrollo de un prototipo simulador del tracto gastrointestinal mediante reactores químicos automatizados. Tesis doctoral. Universidad de Málaga.
- Roig, S. (2017). Caracterización del polvo obtenido a partir de residuo de arándano y su uso como ingrediente funcional en la formulación de galletas. Trabajo fin de grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Routray, W. & Orsat, V. (2011). Blueberries and their anthocyanins: factors affecting biosynthesis and properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(6), 303-320.
- Ruiz Álvarez, V., Puig Peña, Y. & Rodríguez Acosta, M. (2010). Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 29(3), 364-397.
- Ruiz-Torrallba, A., Guerra-Hernández, E. J. & García-Villanova, B. (2018). Antioxidant capacity, polyphenol content and contribution to dietary intake of 52 fruits sold in Spain. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 1131-1138.
- Sáez, R. (2017). Caracterización de polvos de piel de mandarina para su uso como ingrediente funcional en alimentos. Trabajo fin de máster en Ingeniería agronómica. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y. & Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food chemistry*, 89(4), 569-575.
- Salem, I., Ramser, A., Isham, N. & Ghannoum, M. A. (2018). The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Sánchez, A. (2016). Estudio del proceso de deshidratación para la obtención de productos funcionales a partir de piel de mandarina. Trabajo fin de máster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sánchez, A., Flores-Cotera, L. B., Langley, E., Martin, R., Maldonado, G. & Sanchez, S. (1999). Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. *Revista latinoamericana de microbiología México*, 41(3), 175-192.
- Sanz, Y., Santacruz, A. & Dalmau, J. (2009). Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad y las alteraciones del metabolismo. *Acta Pediatr Esp*, 67(9), 437-442.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J. & Goni, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ: British Medical Journal*, 299(6710), 1259.
- Stratil, P., Kuban, V. & Fojtova, J. (2008). Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(4), 242-253.
- Thebaudin, J. Y., Lefebvre, A. C., Harrington, M. & Bourgeois, C. M. (1997). Dietary fibres: nutritional and technological interest. *Trends in Food Science & Technology*, 8(2), 41-48.

- Vasco, C., Ruales, J. & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food chemistry*, 111(4), 816-823.
- Vijayaraghavan, K., Ahmad, D. & Soning, C. (2007). Bio-hydrogen generation from mixed fruit peel waste using anaerobic contact filter. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(18), 4754-4760.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Woerther, P. L., Burdet, C., Chachaty, E. & Andremon, A. (2013). Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 744-758.
- World Gastroenterology Organisation (WGO) (2011). En: Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. Dirección URL: <<http://www.worldgastroenterology.org>>. [Consulta: 7 de Julio 2019]
- Zapata, L. (2014). Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Kurtanjek, Ž. & Elez Garofulić, I. (2014). Kinetics of the degradation of anthocyanins, phenolic acids and flavonols during heat treatments of freeze-dried sour cherry Marasca paste. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1), 101-108.
- Zorić, Z., Pelaić, Z., Pedisić, S., Garofulić, I. E., Kovačević, D. B. & Dragović-Uzelac, V. (2017). Effect of storage conditions on phenolic content and antioxidant capacity of spray dried sour cherry powder. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 251-259.
- Zumelzu-Scheel, A. (2017). Forma urbana y sostenibilidad: pasado, presente y desafíos. Una revisión. AUS [Arquitectura/Urbanismo/Sustentabilidad], (20), 77-85.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de cuantificación de carotenoides (Bunea *et al.*, 2008)

En la extracción de los carotenoides se trabajó con 1 g de las muestras de polvo seco y liofilizado y se añadieron 25 mL del disolvente de extracción, en este caso constituido por la mezcla CH₃OH /acetato de etilo/éter de petróleo (1:1:1 v/v/v). La mezcla se homogenizó en un ultraturrax a 10000 rpm durante 10 minutos a 10 °C y se repitió el proceso las veces necesarias hasta obtener un sobrenadante incoloro. Seguidamente, se separó el sobrenadante, se recogió en un embudo de decantación y se lavó un par de veces con 100 mL de disolución salina saturada (36 g NaCl en 100 g de agua) hasta la separación completa de las fases acuosa y etérea. Se añadieron 50 mL de dietil éter para lavar el embudo. Seguidamente, se trasladó la fase etérea, que es la que contiene los carotenoides, a un embudo de decantación tapado con algodón y que contenía una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄). A continuación, se evaporó a 35 °C en condiciones de vacío en un rotavapor, obteniendo un extracto seco al final del proceso.

El proceso de saponificación se llevó a cabo para eliminar los lípidos, clorofilas y ésteres no deseados presentes en la muestra, ya que pueden interferir en la columna cromatográfica y reducir la vida útil de la misma.

Para ello se añadió éter dietílico al extracto seco y se dejó 16 horas en ausencia de luz, a temperatura ambiente y añadiendo una solución al 30% de KOH metanólico. A continuación, se lavó el extracto saponificado alternando una solución salina saturada y agua destilada, con volúmenes de unos 70 mL, hasta que las fases acuosa y etérea quedaron separadas y el pH se neutralizó. La fase etérea se secó sobre sulfato de sodio anhidro y posteriormente fue evaporada en un rotavapor (T<30 °C).

Finalmente, se realiza la identificación y cuantificación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (Waters TM) acoplada a un detector de fotodiodos modelo 2998 (HPLC-PDA) y equipada con una bomba 600E.

La separación cromatográfica de los compuestos se realizó con una precolumna C30 (20 mm x 4.0 mm x 5 m) y una columna C30 (250 mm x 4.6 mm x 5 m) (YMC Europa GMBH).

La elución se llevó a cabo a temperatura ambiente con una fase móvil que consistía en mezclas de acetonitrilo: agua (9:1, v / v) con trietilamina (C₆H₁₅N) al 0,25% (disolvente A) y acetato de etilo (C₄H₈O₂) con 0,25% trietilamina (disolvente B). Este sistema de elución de gradiente empezó con un 90% de A a tiempo 0, y se fue reduciendo con el tiempo, alcanzando un porcentaje del 50% a los 10 minutos, y del 10% a los 20 minutos. Se empleó un caudal de 1 mL/min y se monitorizaron los cromatogramas a 450 nm. Los carotenoides identificados fueron β- caroteno, α- caroteno y la β- criptoxantina. La determinación se realizó por triplicado.

Anexo 2. Protocolo de cuantificación de antocianinas (Cătunescu *et al.*, 2019)

Para la extracción de antocianinas se partió de 0,1 g de muestra seca que se mezclaron con 10 mL de CH₃OH (1% HCl) y se dejó reposar toda la noche en la nevera. Posteriormente se sometió a ultra-sonidos durante 30 segundos y se centrifugó a 5000 rpm, a 4 °C, durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y seguidamente se mezclaron 5 mL de CH₃OH (+1% HCl)

con el pellet y se agitó en un vórtex durante 1 minuto. Esta etapa se repitió las veces necesarias hasta que el solvente se volvió incoloro. A continuación se filtra a través del algodón y este se lava. Se recogió todo el extracto y se evaporó a 35 °C.

La cuantificación e identificación de antocianinas se realiza por cromatografía líquida de alta resolución (Waters TM) acoplada a un detector de fotodiodos modelo 2998 (HPLC-PDA) y equipada con una bomba 600E.

La separación cromatográfica de los compuestos se realizó con una columna RPC 18 (DAD). Las antocianinas identificadas fueron la cianidina, delphinidina y malvidina. La determinación se realizó por triplicado.

Anexo 3. Concentración de DNA de las bacterias intestinales

Tabla 1. Concentración (ng/μl) del DNA de las bacterias intestinales, medido antes y después de la fermentación de las cuatro muestras de polvo digeridas.

Individuos	Tiempo 0	Arándano LIO	Arándano SAC	Caqui LIO	Caqui SAC
A	1,83	0,977	3,85	4,22	2,14
B	1,56	2,76	1,75	6,44	5,62
C	2,01	2,83	3,25	3,35	5,57
D	1,49	0,809	1,03	3,73	3,03
E	0,837	0,972	6,15	9,51	7,99
F	2,09	1,05	1,08	4,1	4,16
G	4,64	1,49	2,17	4,49	8,59
H	2,38	5,34	6,67	4,5	3,4

Anexo 4. Gel electroforesis de las muestras de DNA tras la fermentación intestinal *in vitro*

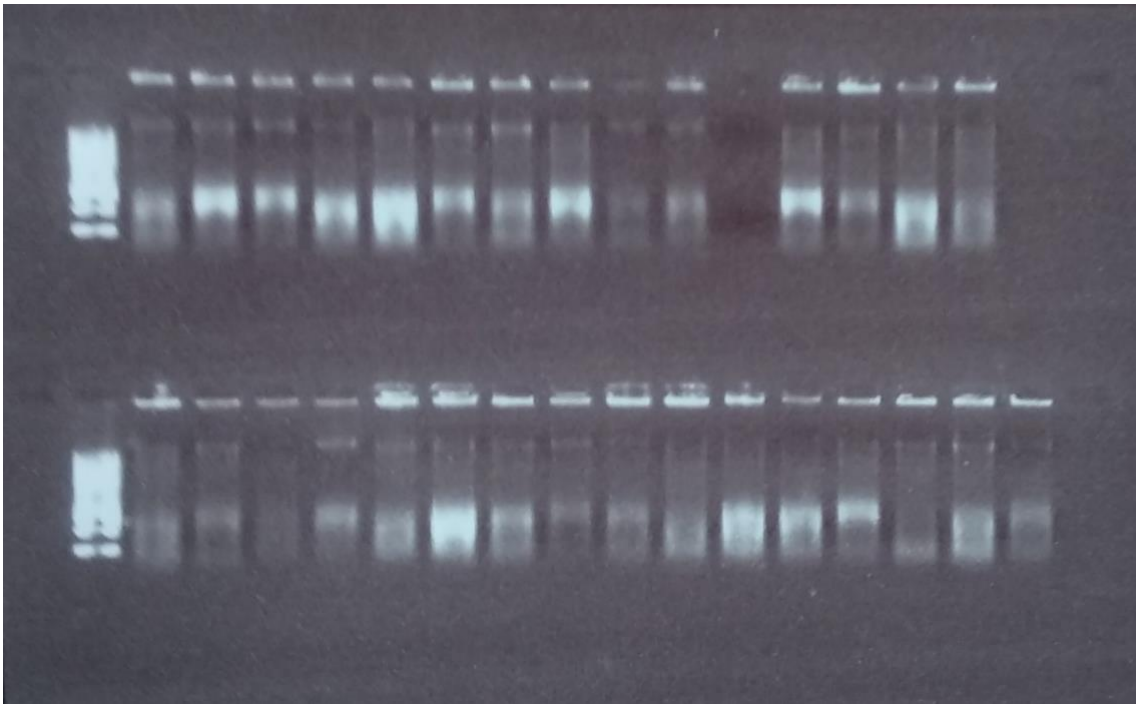


Imagen 1. Gel electroforesis de las muestras de DNA tras la fermentación del polvo de caqui LIO, el polvo de caqui SAC, y sus respectivos controles de inulina.

Anexo 5. Composición a nivel de género bacteriano del sustrato sin fermentar, el sustrato fermentado y el control positivo fermentado

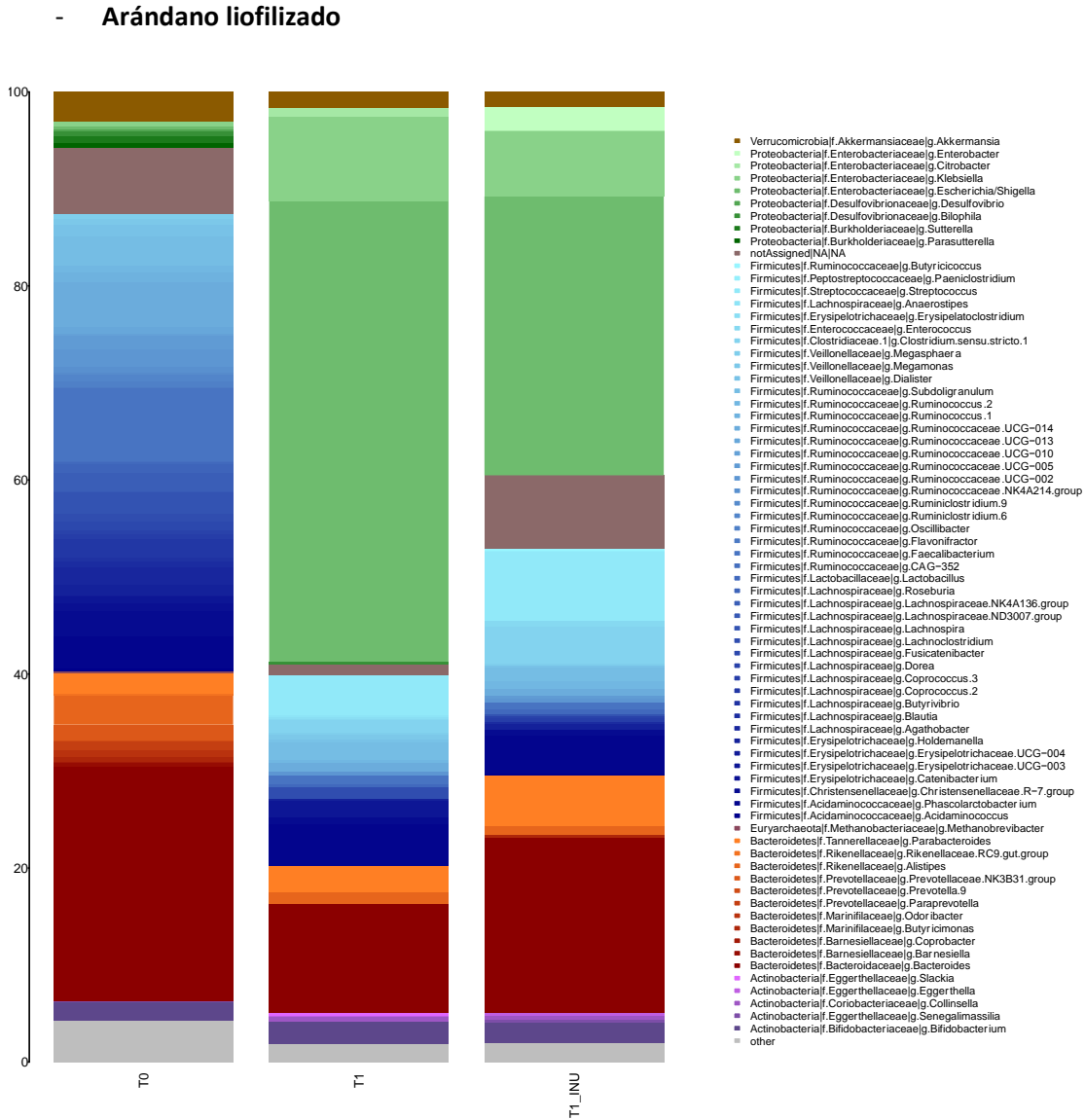


Figura 2. Composición a nivel de género bacteriano del polvo de arándano liofilizado sin fermentar, fermentado y el control positivo de inulina fermentada.

- Arándano seco por aire caliente

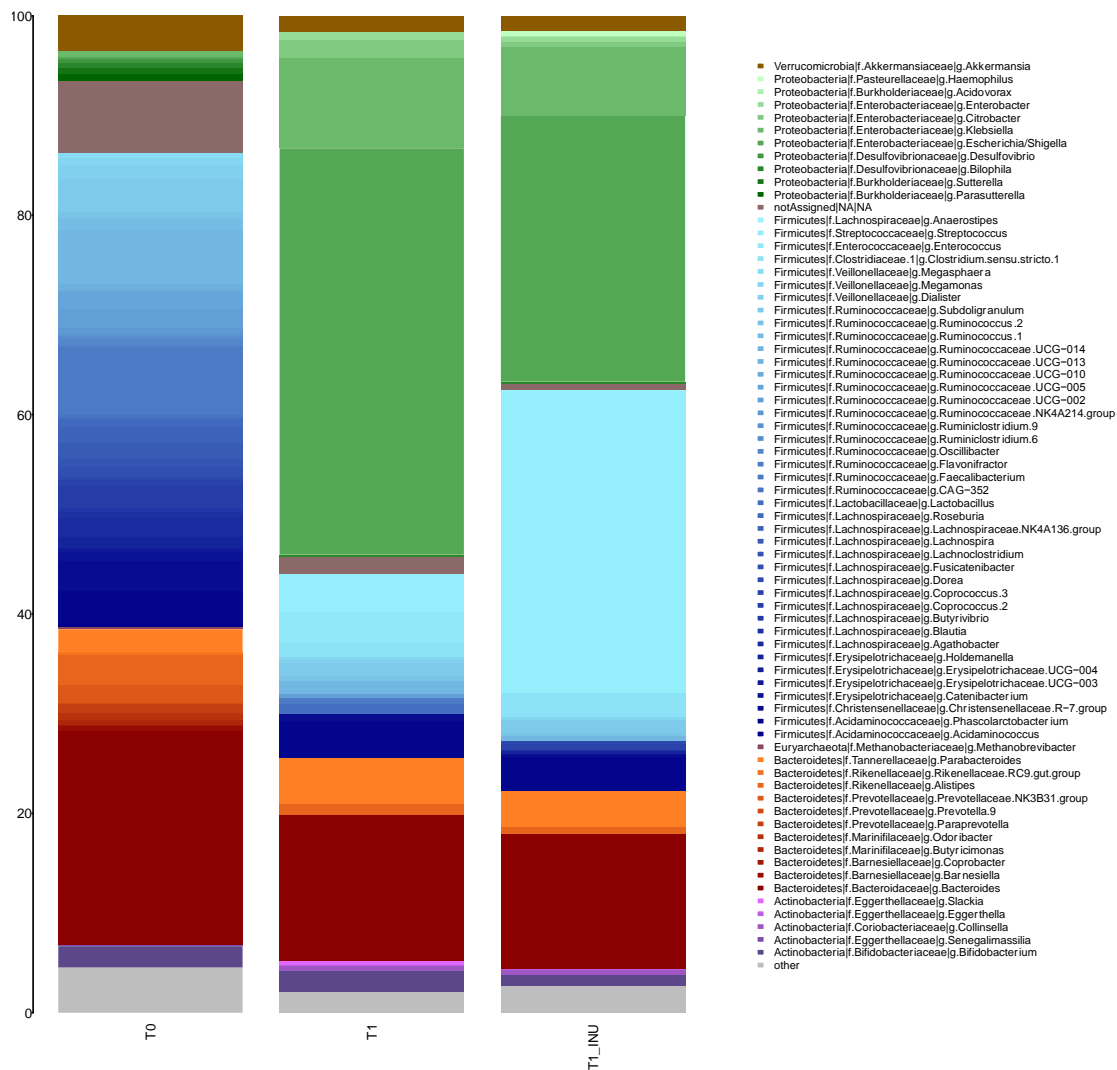


Figura 3. Composición a nivel de género bacteriano del polvo de arándano seco por aire caliente sin fermentar, fermentado y el control positivo de inulina fermentado.

- Caqui liofilizado

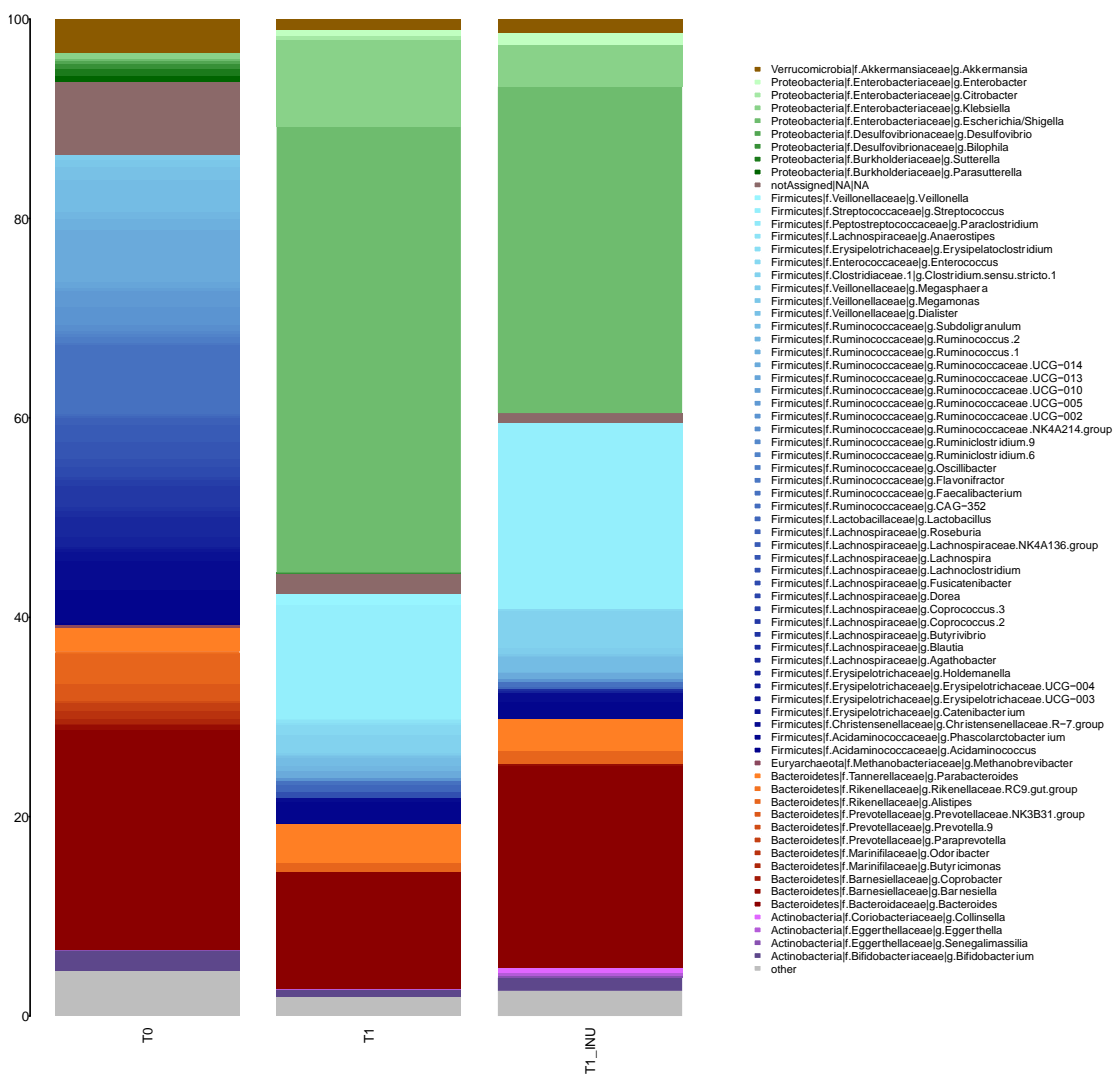


Figura 4. Composición a nivel de género bacteriano del polvo de caqui liofilizado sin fermentar, fermentado y el control positivo de inulina fermentado.

- Caqui secado por aire caliente

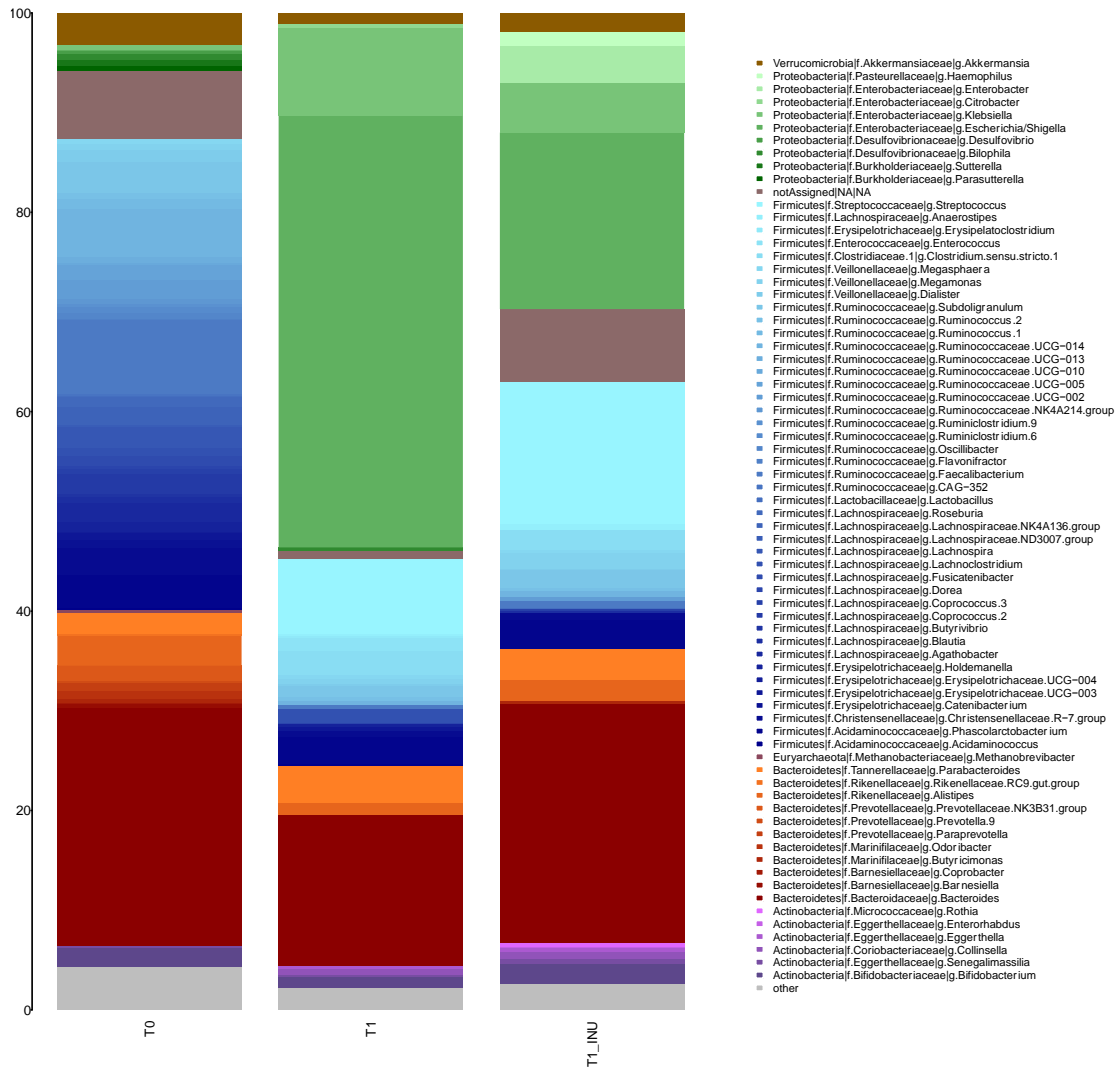


Figura 5. Composición a nivel de género bacteriano del polvo de caqui secado por aire caliente sin fermentar, fermentado y el control positivo de inulina fermentado.