

## UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA



### **EVALUACIÓN IN VITRO DE LOS CAMBIOS EXPERIMENTADOS POR LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL FRUTO, HOJAS Y FIBRA DE CAQUI DURANTE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL**

### **MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS**

**Realizado por:**  
Alicia Pinazo Momparler

**Directores:**  
Ana Andrés Grau  
Ana Belén Heredia Gutiérrez  
Ruth Martínez Las Heras

## **EVALUACIÓN IN VITRO DE LOS CAMBIOS EXPERIMENTADOS POR LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL FRUTO, HOJAS Y FIBRA DE CAQUI DURANTE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL**

Alicia Pinazo Momparler, Ruth Martínez Las Heras, Ana Heredia, Ana Andrés

### **RESUMEN:**

El objetivo de este estudio fue analizar los cambios experimentados por los polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante total del caqui, el extracto acuoso de hoja de caqui y fibras de caqui (procedentes de la piel y la pulpa y estabilizadas por secado por aire caliente o liofilización) a lo largo de la digestión gastrointestinal y determinar la bioaccesibilidad de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante. Para ello, se simuló in vitro la digestión a 37 °C y en las condiciones específicas (pH, enzimas, agitación y duración) de las fases involucradas: boca, estómago e intestino delgado. El efecto intrínseco del pH de la digestión también se analizó llevando a cabo, en paralelo, la simulación en ausencia de enzimas digestivos.

Los resultados evidenciaron que el extracto acuoso de hoja de caqui presenta mayor contenido en antioxidantes que el fruto o las fibras extraídas de la piel o pulpa del mismo, siendo estos por lo general más sensibles (mayores pérdidas) al ambiente digestivo que aquellos procedentes del fruto o las fibras. Por otro lado y en general, la fase oral fue la que más afectó a todos los compuestos evaluados, con independencia del tipo de matriz alimento, con un marcado descenso de los mismos. El pH ácido y la presencia de pepsina propios del entorno gástrico no promovieron pérdidas adicionales, mientras que las condiciones intestinales indujeron un aumento de la fracción soluble de polifenoles y flavonoides durante la digestión de algunas matrices como consecuencia de la liberación de compuestos anteriormente ligados o insolubilizados en interacción con la matriz. Así y al final de la digestión, los compuestos bioactivos de la fruta de caqui y de la fibra extraída de la pulpa, y especialmente la liofilizada, resultaron ser más bioaccesibles que los procedentes de la infusión de hoja de caqui. Concretamente, la bioaccesibilidad de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante del fruto fue hasta 3.8, 1.0 y 1.4 veces superior a los de la hoja de caqui al final de la digestión en presencia de enzimas. Por último y en cuanto al papel de los enzimas digestivos, su presencia en el medio ayudó a la preservación de todos los compuestos bioactivos a lo largo de la digestión, repercutiendo positivamente en consecuencia sobre su bioaccesibilidad.

**PALABRAS CLAVE:** Caqui; fibra de caqui; hojas de caqui; compuestos antioxidantes; digestión gastrointestinal; bioaccesibilidad

## ABSTRACT:

The aim of this study was to analyse the changes in polyphenols, flavonoids and total antioxidant activity of persimmon fruit, aqueous persimmon leaf extract and persimmon fibres (from the peel and pulp stabilized by hot air drying or lyophilisation) throughout the gastrointestinal digestion and determine the bioaccessibility of these bioactive compounds. For that, a gastrointestinal in vitro digestion was simulated at 37°C and under specific conditions of the steps involved in the digestion: mouth, stomach and small intestine (pH, enzymes, stirring and duration). The intrinsic effect of the pH on the digestion was also analysed by simulating digestion in absence of digestive enzymes.

The results showed that the aqueous extract of persimmon leaves had higher content of antioxidants than the fruit or the extracted fibres from the peel, although it was more sensitive (higher losses) to the digestive environment. All antioxidant compounds were greater affected in the oral phase, regardless of the tested food. Acidic pH and the presence of pepsin on the stomach phase did not promote additional losses; whereas the intestinal conditions induced an increase of the soluble fraction of polyphenols and flavonoids of some matrices as a consequence of the release of the previously linked or insolubilized phenolic compounds. Thus, and at the end of the digestion, the bioactive compounds from persimmon fruit and pulp fibre, specially the lyophilized one, were more bioaccessible than those obtained from the infusion of persimmon leaf. Concretely, the bioaccessibility of polyphenols, flavonoids and antioxidant activity of the fruit was up to 1.4, 1.0 and 3.8 times the persimmon leaf at the end of digestion in presence enzymes. Finally, the digestive enzymes contributed to the preservation of all bioactive compounds throughout digestion and consequently they enhanced their bioaccessibility.

**KEY WORDS:** Persimmon; Persimmon fiber; Persimmon leaves; Antioxidant compounds; Gastro-intestinal digestion; Bioaccessibility.

## RESUM:

L'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar els canvis experimentats pels polifenols, flavonoids i activitat antioxidant total del caqui, l'extracte aquós de fulla de caqui i fibres de caqui (procedents de la pell i la polpa i estabilitzades per assecat per aire calent o liofilització) al llarg la digestió gastrointestinal i determinar la bioaccessibilitat dels polifenols, flavonoids i activitat antioxidant. Per açò, es va simular la digestió in vitro a 37 °C i en les condicions específiques (pH, enzims, agitació i durada) de les fases involucrades: boca, estómac i intestí prim. L'efecte intrínsec del pH de la digestió també es va analitzar duent a terme, en paral·lel, la simulació en absència d'enzims digestius.

Els resultats van evidenciar que l'extracte aquós de fulla de caqui presenta major contingut en antioxidants que el fruit o les fibres extretes de la pell o polpa del mateix, sent aquests en general més sensibles (majors pèrdues) a l'ambient digestiu que aquells procedents del fruit o les fibres. D'altra banda i en

general, la fase oral va ser la que més va afectar a tots els compostos avaluats, amb independència del tipus de matriu aliment, amb un marcat descens dels mateixos. El pH àcid i la presència de pepsina propis de l'entorn gàstric no van promoure pèrdues addicionals; mentre que les condicions intestinals van induir un augment de la fracció soluble de polifenols i flavonoids durant la digestió d'algunes matrius com a conseqüència de l'alliberament de compostos anteriorment lligats o insolubilitzats en interacció amb la matriu. Així i al final de la digestió, els compostos bioactius de la fruita de caqui i de la fibra extreta de la polpa, i especialment la liofilitzada, van resultar ser més bioaccessibles que els procedents de la infusió de fulla de caqui. Concretament, la bioaccessibilitat de polifenols, flavonoids i activitat actioxidant del fruit va ser fins 1.4, 1.0 i 3.8 vegades superior als de la fulla de caqui al final de la digestió en presència d'enzims.

Per últim i pel que fa al paper dels enzims digestius, la seva presència en el medi va ajudar a la preservació de tots els compostos bioactius al llarg de la digestió, repercutint positivament en conseqüència sobre la seva bioaccessibilitat.

**PARAULES CLAU:** Caqui, fibra de caqui, fulles de caqui; compostos antioxidants; digestió gastrointestinal; bioaccessibilitat.

## INTRODUCCIÓN

Debido a que la prevención de enfermedades crónicas constituye una mejor estrategia que su tratamiento, reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares o cáncer se ha convertido en una de las prioridades de los autoridades sanitarias, de científicos y también de la industria alimentaria (Liu, 2003). En este sentido, el consumo de alimentos ricos en antioxidantes, así como de matrices alimentarias a las que se les ha adicionado ingredientes naturales ricos en estos compuestos, contribuiría a reducir el riesgo de padecer enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

Entre las fuentes habituales de antioxidantes de la dieta, las frutas son ricas en compuestos fenólicos, los cuales se caracterizan por su actividad anticarcinogénica, antiinflamatoria, antiaterogénica, antimicrobiana y antioxidante (Robards et al., 1999; Moure et al., 2001). Además, estos compuestos permanecen en productos procesados de frutas tales como zumos, mermeladas, jaleas, etc. (Heinonen et al., 1998; Häkkinen et al., 2000; Zafrilla et al., 2001). Por esta razón, el uso de las frutas como ingredientes podría ser una buena estrategia para la obtención de alimentos funcionales ricos en compuestos fenólicos y capaces de aportar beneficios a la salud del consumidor. Entre las frutas ricas en antioxidantes se encuentra el caqui (Gorinstein et al., (1998). El cultivo del caqui es originario de Asia, comenzando algunos siglos antes de Cristo, de ahí pasó a Japón (s.VII) y Corea (s.XIV). Este es un fruto que proviene de un árbol frutal originario de China y que pertenece al género Ebenales, la familia Ebanaceae y género Diospyros que cuenta con más de 2000 especies de las cuales sólo cinco son de importancia

comercial, entre las que se encuentran Diospyros kaki L.f en España (Hernández, 1999). Los caquis se dividen en astringentes (var. Rojo Brillante, Triumph y Tomatero, entre otras) y no-astringentes (var. Fuyu, Hana-Fuyu o Jiro, entre otras). La astringencia está ligada a la forma de los taninos. Las variedades no-astringentes los tienen insolubilizados permitiendo que no se hayan de realizar tratamientos poscosecha y las variedades astringentes contienen los taninos solubles que interaccionan con las proteínas de la saliva dando una sensación de aspereza, estos disminuyen a medida que alcanzan la madurez (Hernández, 1999). El Rojo Brillante es la variedad con mayor importancia comercial por su buena productividad en la Comunidad Valenciana, además de tener denominación de origen. Esta variedad es cultivada en zonas como El Alto Palancia y la Ribera Alta del Xúquer. Según los datos del Ministerio de Agricultura, el terreno dedicado al caqui ha sufrido una evolución espectacular (sólo en el último año ha aumentado un 20% más), según estadísticas oficiales (Alòs, A., 2014). Esto se debe a que se han implementado nuevas tecnologías para la eliminación de la astringencia mediante métodos con altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Arnal y Del Rio, 2005).

Debido a épocas de superproducción o materia prima que no pasa el cribado del mercado, se están buscando y desarrollando productos y aplicaciones del fruto para obtener mayor rendimiento económico. Entre estas estrategias se encontraría el aprovechamiento de sus hojas para consumo directo como infusión o para incorporar los extractos a matrices alimentarias por su alto contenido en antioxidantes (Martínez-Las Heras et al., 2014), la extracción de fibra de la piel y la pulpa para su uso como aditivo, etc. En la industria alimentaria la adición de fibra alimentaria conlleva una mejora de la textura, viscosidad y alargamiento de la vida útil del producto. En la actualidad se utiliza en multitud de alimentos tales como yogures, panadería, etc. (Thebaudin et al., 1997). El consumo de fibra está asociado con la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades como el cáncer de colon, enfermedades coronarias, el constipado, diabetes (Sorensen et al., 2014). Adicionalmente, contribuye a una mejora del tránsito intestinal y disminución del nivel de colesterol en sangre (Guevara-Cruz, 2013).

Si bien es cierto que la presencia de compuestos bioactivos en la dieta está relacionada con los beneficios anteriormente descritos, su repercusión sobre la salud depende del estado bioquímico en el que llegan al torrente sanguíneo, y por ende a los tejidos. El proceso de digestión en sí mismo conlleva una serie de cambios en los macro y micronutrientes condicionando así, su biodisponibilidad final, definiéndose como la cantidad de compuesto que es capaz de ser liberado por la matriz alimentaria tras ser transformado en el proceso digestivo en una forma más soluble (bioaccesibilidad) y atravesar la barrera intestinal (bioabsorción) para ser aprovechado posteriormente por el organismo (Parada y Aguilera, 2007).

La mejor forma de determinar los beneficios derivados de la ingesta de un alimento, y por tanto su biodisponibilidad, consiste en someter al mismo al propio proceso digestivo "in vivo", evaluando los cambios que experimenta a lo largo de cada una de las etapas involucradas. Sin embargo, los ensayos in vivo son costosos y requieren de largos tiempos de estudio, en especial en muestras humanas, además de conllevar implicaciones médicas y éticas. Por

ello, resulta de gran interés la sustitución de éstos por estudios “in vitro” dado que los resultados obtenidos son más reproducibles además permiten mecanizar estudios con varios parámetros bajo control. Existen evidencias científicas que avalan positivamente la alternativa de emplear métodos enzimáticos que reproduzcan las condiciones metabólicas óptimas de digestión estomacal y posterior absorción en el intestino, frente a ensayos in vivo (Ramos, 1995; During y Harrison, 2005). En este contexto, el objetivo de este estudio fue determinar los cambios experimentados por los polifenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante total de hojas del árbol de caqui, del fruto de caqui y de fibra de caqui extraída de la pulpa y piel del fruto, y estabilizada por secado por aire caliente y liofilización, durante las diferentes etapas implicadas en la digestión, así como determinar la bioaccesibilidad de estas familias de antioxidantes por medio de una simulación in vitro gastrointestinal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima

Como materia prima se utilizaron hojas del árbol de caqui, caqui y fibra de caqui extraída de la piel y pulpa del fruto.

Las hojas de caqui (D. kaki, Rojo Brillante var.) fueron recogidas en un campo en Alginet, Valencia (España), fueron lavadas y escaldadas durante 1 minuto (a 100°C) y posteriormente secadas a 100°C en un horno por convección (durante 30 minutos). Una vez deshidratadas, éstas fueron molidas hasta un tamaño de partícula inferior a 1 mm en un molinillo SEVERN. El polvo resultante fue utilizado finalmente para preparar infusiones mediante la adición de 1.5 gramos de polvo de hoja a 110 mL de agua destilada hirviendo y se filtró con papel de filtro Whatman (retención de partícula: 20-25 µm) tras 5 minutos.

Los caquis utilizados (Diospyros kaki Thumb. cv. Rojo Brillante) fueron cosechados en Alginet (España). Tras su recolección se mantuvieron en condiciones ambientales, aproximadamente 24 horas, periodo tras el que se sometieron a un tratamiento de desastringencia durante 24 horas más a 20 °C en contenedores cerrados y atmósfera modificada de 95% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa. Tras el proceso de desastringencia, los caquis fueron lavados y pelados, separando la pulpa y piel para su posterior homogenización con ultraturrax. Cada una de estas fracciones (piel o pulpa) se mezcló con etanol en ebullición (96% v/v) en una proporción de 1:2 (w/v) y la mezcla se agitó (600 rpm) durante 15 minutos. Finalmente, el etanol se separó de la fibra por medio de un tamiz y la fracción sólida resultante se dividió en dos mitades, una de ellas se deshidrató por aire caliente a 40 °C hasta peso constante (aproximadamente 7 h) y la otra se congeló a -40°C durante 24 h y posteriormente se liofilizó (presión de vacío de 10<sup>-1</sup> mbar durante 24 horas). La nomenclatura utilizada para identificar cada una de las fracciones fue: PULPA-A o PULPA-L para las fracciones obtenidas a partir de pulpa secada por aire o liofilizada respectivamente, y PIEL-A o PIEL-L para las fracciones obtenidas a partir de la piel secada con aire y liofilizada, respectivamente.



## Simulación in vitro de la digestión gastrointestinal (GI)

La simulación in vitro gastrointestinal de infusión de hojas de caqui se realizó siguiendo el protocolo experimental publicado por Choi et al. (2007) y Gião et al. (2012), y tal y como se describe a continuación. Para simular la digestión en boca se adicionaron 0.006 mL de fluido salival simulado (FSS), consistente en una solución de  $\alpha$ -amilasa de 100 U/mL preparada en suero fisiológico al 0.9 (p/v), por mL de infusión y se incubó a 37 °C y 200 rpm durante 1 minuto previa comprobación de que el pH de la muestra se encontraba entre 5.6 y 6.9. Tras la digestión en boca, se separó una alícuota del digerido salival para los análisis pertinentes y el resto se llevó a pH de 2 con HCl (1N), se le adicionó fluido gástrico simulado (FGS) consistente en una disolución de pepsina (25 mg/mL) en suero fisiológico al 0.9 (p/v) en una relación FGS: digerido salival de 0.05:1 (v/v), y se incubó a 37 °C y 130 rpm durante 60 minutos para simular la etapa gástrica. Se tomaron alícuotas tras 10, 30 y 60 minutos de digestión gástrica. Finalmente y para simular las condiciones de la etapa intestinal, el digerido gástrico se ajustó a pH 6.0 con  $\text{NaHCO}_3$  (1M) y se adicionó fluido intestinal simulado (FIS) consistente en una disolución de pancreatina (2g/L) y de sales biliares (12 g/L) disueltas en  $\text{NaHCO}_3$  (0.1M) en una relación FIS: digerido gástrico de 0.25:1 (v/v) y se incubó a 37 °C y 45 rpm durante un tiempo total de 120 minutos. Se tomaron alícuotas al cabo de 30, 60, 90 y 120 minutos.

Adicionalmente y para estudiar el efecto intrínseco del pH de cada una de las etapas simuladas se llevó a cabo paralelamente toda la simulación en ausencia de enzimas.

Todo se realizó por duplicado (dos series de experimentos) y se extrajeron tres alícuotas para cada uno de los tiempos especificados anteriormente y para cada serie de experimentos.

### *Caqui y fibras procedentes del caqui*

La simulación in vitro gastrointestinal del fruto de caqui y de las fibras de pulpa y piel estabilizadas por liofilización o secado por aire caliente se llevó a cabo siguiendo el protocolo experimental publicado por Luten et al. (1996). Dicho protocolo presenta similitudes y diferencias (se han subrayado) con respecto al seguido para la digestión de las hojas de caqui. En este caso, y para simular la digestión en boca se adicionan a una mezcla consistente en 10 g de muestra con 50 mL de NaCl (0.9%), 0.006 mL de fluido salival simulado (FSS), consistente en una solución de  $\alpha$ -amilasa de 100 U/mL preparada en suero fisiológico al 0.9% (p/v), por mL de disolución y se incubó a 37 °C y 200 rpm durante 1 minuto previa comprobación de que el pH de la muestra se encontraba entre 5.6 y 6.9. Tras la digestión en boca, se separó una alícuota del digerido salival para los análisis pertinentes y al resto se llevó a pH a 2 con 8 mL HCl (0,1M), y se adicionó fluido gástrico simulado (FGS) consistente en una disolución de pepsina (40 mg/mL) en suero fisiológico al 0.9 (p/v) en una relación FGS: digerido salival de 0.05:1 (v/v) y se incubó a 37 °C y 100 rpm durante 60 minutos, se volvió a ajustar el pH a 2. Se tomó muestra tras 10, 30 y 60 minutos de digestión gástrica. Finalmente y para simular las condiciones de

la etapa intestinal, se llevó el digerido gástrico a pH 6.5 con  $\text{NaHCO}_3$  (1M) y se adicionó fluido intestinal simulado (FIS) consistente en una disolución de pancreatina (2g/L) y de sales biliares (12 g/L) disueltas en  $\text{NaHCO}_3$  (0.1M) en una relación FIS: digerido gástrico de 0.18:1 (v/v) y se incubó a 37 °C y 45 rpm durante un tiempo total de 120 minutos. Se tomaron alícuotas a 30, 60, 90 y 120 minutos.

Adicionalmente y para estudiar el efecto intrínseco del pH de cada una de las etapas simuladas se llevó a cabo paralelamente toda la simulación en ausencia de enzimas.

Todas las simulaciones se realizaron por duplicado y se extrajeron tres alícuotas para cada uno de los tiempos especificados anteriormente y por ensayo.

### Análisis de la actividad antioxidante, polifenoles totales y flavonoides

La actividad antioxidante (AA) de las muestras se midió en base a la actividad de los radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo según el método descrito por Shahidi et al., (2006) con algunas modificaciones. Según este método, la intensidad de color púrpura de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo disolución (DPPH) se disminuye en presencia de un antioxidante, y este cambio de absorbancia se mide espectrofotométricamente a 515 nm. Para ello, se diluyeron 3 g de muestra en 5 mL de metanol y el conjunto se sometió a agitación durante 5 minutos. Posteriormente los tubos de ensayo con la mezcla de muestra-metanol se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos (Medifriger BL-S, P-Selecta). 0.1 mL del sobrenadante se añadió a 3.9 mL de una disolución metanólica de DPPH (80:20; metanol: agua) (0.025 mg / mL). La disolución se agitó y tras 30 min se midió la absorbancia de la muestra a 515 nm usando metanol como blanco. La actividad antioxidante (%) de las muestras se calculó según la ecuación I:

$$AA (\%) = \frac{A_{t=0} - A_{t=30}}{A_{t=0}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación I})$$

Donde  $A_{t=0}$  es la absorbancia inicial del DPPH (sin muestra) y  $A_{t=30}$  es la absorbancia de la muestra tras 30 min (con muestra). La medida se comparó con una curva estándar de una disolución de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) y la actividad antioxidante se expresó como mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca.

El contenido de fenoles totales (TPC) de las distintas muestras se determinó espectrofotométricamente con el método de Folin-Ciocalteu modificado (Sakanaka et al., 2005). Este método se basa en una extracción con metanol (3 g de muestra/ 5 mL de metanol) en condiciones de agitación a 200 rpm durante una hora (COMECTA agitador horizontal WY-100). Posteriormente se centrifuga durante 10 minutos a 10.000 rpm (Medifriger BL-S, P-Selecta). A continuación se añaden 0.125 mL del sobrenadante del extracto a una cubeta, se adicionan 0.5 mL de agua destilada y 0.125 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejándolo reposar durante 6 minutos. Transcurrido este tiempo, se



añaden 1.25 mL de una disolución de carbonato sódico al 7% y 1 mL de agua destilada. La muestra preparada se deja reposar durante 90 min antes de medir la absorbancia a 760 nm usando un espectrofotómetro (JASCO V-630). La absorbancia respuesta se comparó con una curva estándar de una disolución de ácido gálico y el contenido en polifenoles totales se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg de AG/ g de materia seca). El blanco se preparó de la misma manera.

El contenido total en flavonoides fue medido de acuerdo con el método colorimétrico (Zhishen et al., 1999). En el análisis de flavonoides se tomaron 3 gramos de muestra y se mezclaron con 3 mL de agua. Posteriormente la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 10.000 rpm. (Medifriger BL-S, P-Selecta). A continuación se tomaron 0.25 mL de extracto en el cual se añadieron 1mL de agua destilada y posteriormente 0.075 mL de una disolución de nitrito de sodio al 5%. Tras 6 minutos en reposo se adicionaron 0.15 mL de una disolución de cloruro de aluminio al 10%, más tarde pasados 5 minutos se añadió a la mezcla 0.5 mL de hidróxido de sodio (1M) y 2 mL de agua destilada. Inmediatamente se tomaron los valores de absorbancia para cada muestra a una longitud de onda de 510 nm. El método se realizó por triplicado para cada muestra. El contenido total en flavonoides para el caqui fue expresado en mg de catequina equivalentes por g de materia seca. El blanco se preparó de la misma manera.

### Evaluación de la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes

Para evaluar la bioaccesibilidad de los diferentes compuestos antioxidantes, se llevó a cabo una separación por decantación del sobrenadante tras un reposo de las muestras de un total de 24 horas a temperatura ambiente (Granado-Lorencio et al., 2008). Únicamente se llevó a cabo con las muestras recogidas al final de la simulación (último tiempo de toma de muestras de la etapa intestinal). De esta forma fue posible evaluar la proporción de compuesto que tras superar el proceso digestivo se encuentra en forma soluble y por tanto es susceptible de atravesar la barrera intestinal.

La bioaccesibilidad (%) se obtendrá aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = (a/b) \cdot 100 \quad (\text{Ecuación II})$$

Siendo a = contenido antioxidante en sobrenadante (mg antioxidante/ g alimento); b = contenido antioxidante en alimento (mg antioxidante/ g alimento).

### Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) (Statgraphics Plus 5.1), para estimar el efecto significativamente estadístico de los diferentes factores sobre las variables estudiadas. Para ello, se llevó a cabo mediante un test de comparación múltiple, LSD test, con un nivel de significación del 95% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Propiedades antioxidantes de las matrices alimentarias previamente a su digestión simulada*

Las hojas de caqui se toman infusionadas en Japón y China tradicionalmente por sus propiedades curativas (ictus, angina, quemaduras, hemorragias internas, hipertensión, arteriosclerosis y algunas enfermedades infecciosas) (Xie et al., 2015). Sus principales componentes son fenoles, taninos, ácidos orgánicos, flavonoides, clorofila, vitamina C y cafeína (Matsuo et al., 1978; Jo et al., 2003). Por otro lado, el caqui es una fruta rica en fibra dietética, minerales, vitamina C, y compuestos fenólicos.

Con el fin de comparar las propiedades antioxidantes de las matrices alimento de estudio previamente a su ingesta, la Tabla 1 muestra los valores promedios del contenido en actividad antioxidante, fenoles y flavonoides de todas ellas por gramo de materia seca. A la vista de los resultados, es posible afirmar que las hojas de caqui presentan contenidos en fenoles y flavonoides, y actividad antioxidante muy superiores a las fibras de caqui y al propio fruto. Al comparar los contenidos de las hojas con las de otras matrices vegetales, éstas se sitúan por delante del té rojo y por detrás del té verde y negro como fuente natural de antioxidantes (Anesini et al., 2008). A su vez, las fibras, y en especial la extraída a partir de la piel y estabilizada por liofilización, contienen más antioxidantes que el fruto de caqui. En un estudio previo llevado a cabo por este grupo (Landines, 2014) y en el que se compararon las propiedades antioxidantes, emulsionantes y rehidratantes de las fibras de caqui aquí analizadas con las de otras fibras comerciales, se pudo constatar que la fibra procedente de la piel de caqui liofilizada presentaba un contenido superior en antioxidantes que las procedentes de naranja, melocotón o limón, pudiendo ser considerado por tanto como un ingrediente funcional de interés para la formulación de alimentos ricos en fibra.

Finalmente y para hacerse una idea más real de los beneficios antioxidantes que la ingesta de una ración de cada uno de estos productos implicaría, se ha estimado el aporte en antioxidantes de una infusión de hoja de caqui (1.5 g de hojas en 110 mL de agua) siendo éste de 183 mg eq. de Trólox (antioxidantes totales), 129 mg eq. de ácido gálico (polifenoles), 34.3 mg eq. de catequina (flavonoides). Un fruto de caqui, de peso medio 200 g, aportaría un total de 129.6 mg eq. de Trólox, 74.4 mg eq. de ácido gálico, 11.2 mg de catequina. En consumo, en cambio, de 100 g de un producto rico en fibra al 5% considerando como única fuente de antioxidantes la fibra de caqui contribuiría a la salud con 31 mg eq. de Trólox, 20.5 mg eq. de ácido gálico y 29 mg eq. de catequina. En este último caso se ha realizado el cálculo con los datos de la fibra de mayor contenido en antioxidantes, es decir la Fibra-PIEL-L.

**TABLA 1.** Contenido en actividad antioxidante (mg trólox/g m. seca), fenoles totales (mg ácido gálico (AG)/g m. seca) y flavonoides (mg catequina/g m. seca) de las hojas de caqui, fruto del caqui y las fibras de caqui extraídas de la piel y pulpa y estabilizadas por liofilización o secado por aire caliente, previamente a su digestión *in vitro*.

Matrices alimento	AA (mg trólox/ g materia seca)	Fenoles (mg AG/g materia seca)	Flavonoides (mg catequina/ g materia seca)
Hoja de caqui	122(3) <sup>a</sup>	86(2) <sup>a</sup>	22.9(0.7) <sup>a</sup>
Caqui	3.24(0.12) <sup>c</sup>	1.86(0.03) <sup>c</sup>	0.70(0.05) <sup>e</sup>
Fibra PIEL-L	6.2(0.2) <sup>b</sup>	4.10(0.14) <sup>b</sup>	5.8(0.5) <sup>b</sup>
Fibra PULPA-L	3.78(0.2) <sup>bc</sup>	2.17(0.05) <sup>c</sup>	2.95(0.14) <sup>d</sup>
Fibra PIEL-A	3.11(0.06) <sup>c</sup>	2.02(0.12) <sup>c</sup>	2.7(0.3) <sup>d</sup>
Fibra PULPA-A	3.78(0.08) <sup>bc</sup>	2.94(0.18) <sup>bc</sup>	4.6(0.3) <sup>c</sup>

<sup>abcd</sup> indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos homogéneos a un nivel de significación del 95% (p-valor  $\leq 0.05$ )

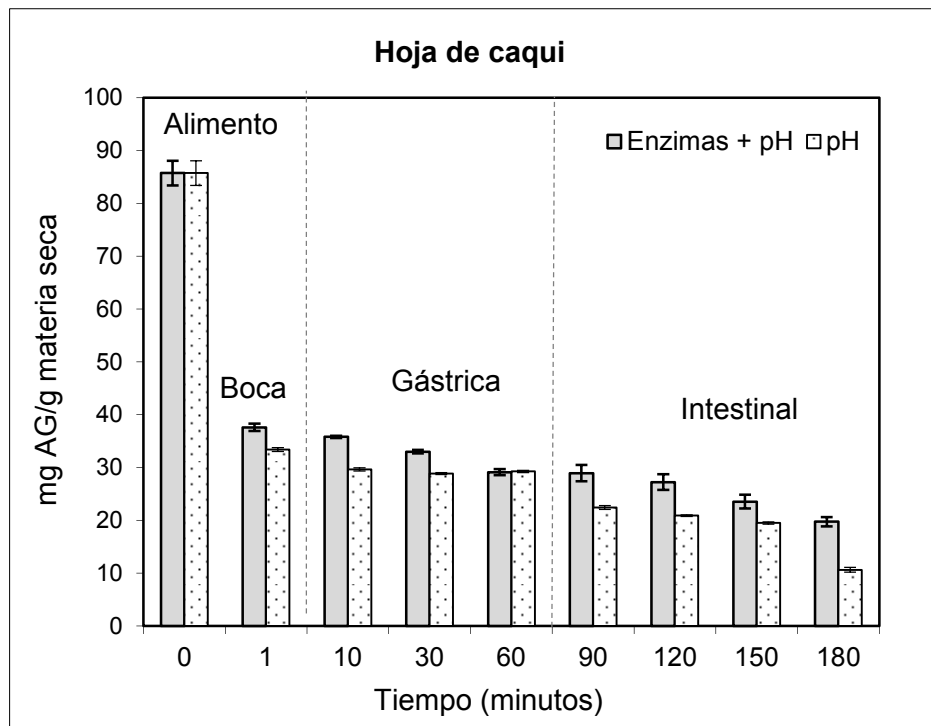
### *Evaluación de los cambios experimentados por los compuestos fenólicos en su paso por el tránsito gastrointestinal*

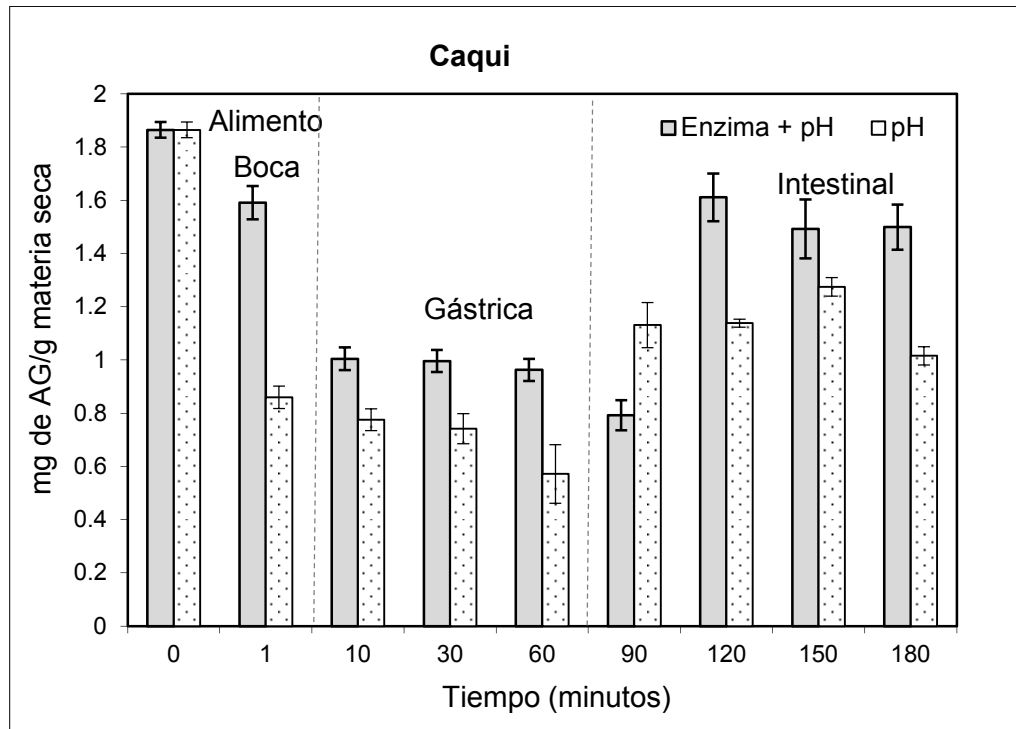
Las Figuras 1 y 2 muestran la evolución de los compuestos fenólicos a lo largo de la simulación *in vitro* del proceso digestivo, en presencia y ausencia de enzimas digestivas. Tal y como se puede observar, la presencia de  $\alpha$ -amilasa y el pH salival degradó los compuestos fenólicos presentes en todas las matrices, siendo los de la hoja de caqui más vulnerables a las condiciones de esta etapa que los del fruto o fibras. El efecto de las condiciones gástricas sobre estos compuestos resultó ser menos acusado que el de la etapa oral, con un ligero descenso adicional, no estadísticamente significativo, al entrar en contacto con las condiciones estomacales en todos los sistemas de estudio. Una vez acondicionados los compuestos fenólicos a las condiciones gástricas, su contenido se mantuvo y su degradación apenas progreso a lo largo de esta etapa. Por tanto, el tiempo de residencia en el estómago no resultó, en general, influir de forma estadísticamente significativa su estabilidad. Por último y bajo condiciones propias del intestino, pH 6.5 y presencia de pancreatina y jugos biliares, los resultados evidenciaron un aumento en el contenido en compuestos fenólicos procedentes del fruto de caqui y de las fibras alimentarias, siendo este hecho más acusado en las fibras extraídas de la piel, y concretamente liofilizadas (PIEL-L), que de pulpa (PULPA-L o PULPA-A). Este hecho podría ser consecuencia de un aumento en la solubilidad de ciertos compuestos fenólicos, antes ligados o presentes en forma reducida bajo las condiciones propias de esta etapa (Gião et al., 2012), lo que vendría a explicar el porqué en el extracto acuoso de hoja de caqui no se observa dicho fenómeno. Concretamente y al final de la simulación, la disminución de estos compuestos, con respecto al contenido en el alimento no digerido, fue del 66, 58, 22, 69, 55 y 9 % (valores residuales calculados con los valores obtenidos en presencia de enzimas) para la infusión de hoja de caqui, caqui y las fibras PIEL-A, PIEL-L, PULPA-A y PULPA-L, respectivamente.

La evolución de los compuestos fenólicos durante el proceso digestivo ha sido estudiada en diferentes matrices tales como zumo de granada (Pérez-Vicente et al., 2002), manzana (McDougall et al., 2007), cerezas (Fazzari et al., 2008) o col lombarda (Bouayed et al., 2012). En todos los casos, las pérdidas de compuestos fenólicos al final de la digestión fueron del orden del 70-75%. Mientras que en ciertos casos, se observó un efecto favorable de la digestión sobre la liberación de estos compuestos, o aumento de su fracción soluble, en alimentos tales como brócoli, vino, zumos y anacardos (Vallejo et al., 2004;

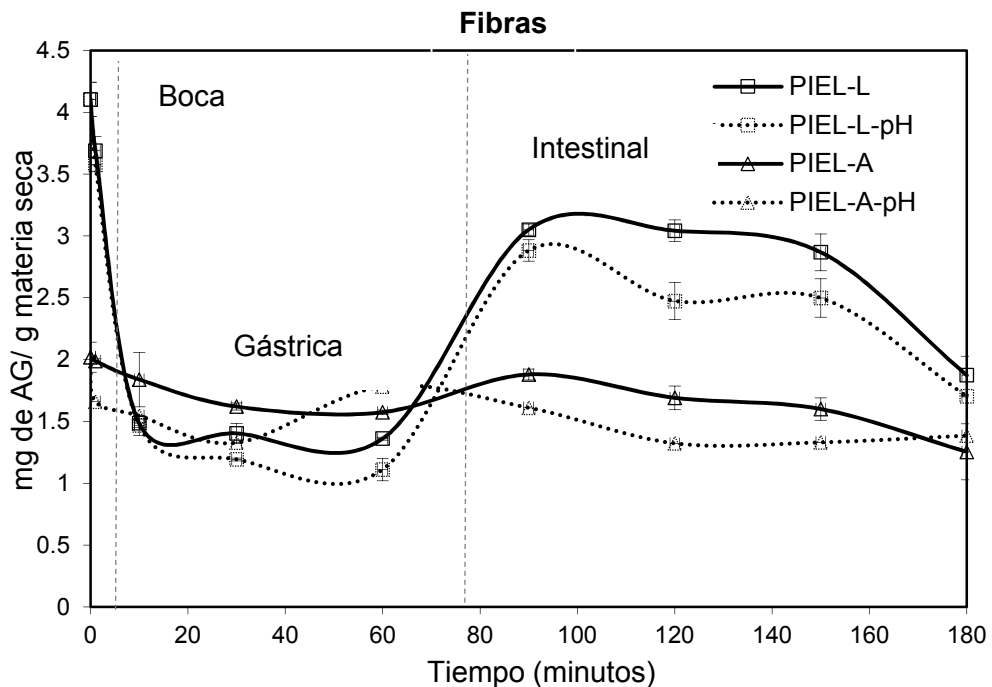
Noguer et al., 2008; Wootton-Beard et al., 2011; Chandrasekara & Shahidi, 2012).

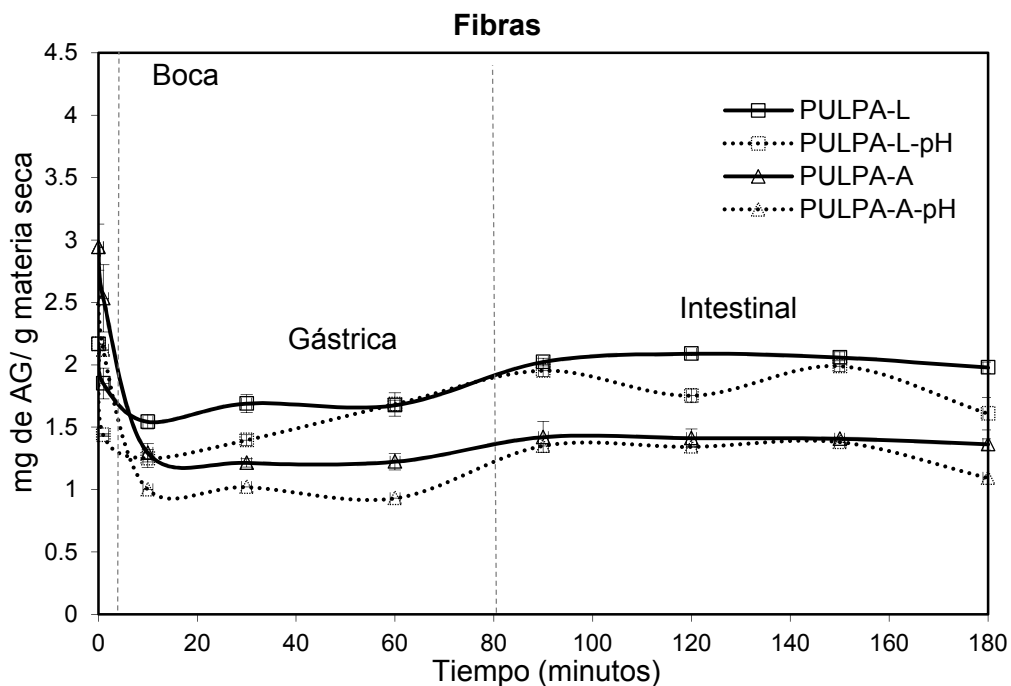
En cuanto a la influencia del pH intrínseco, los resultados sugieren un efecto protector de las enzimas digestivas sobre los compuestos fenólicos a lo largo la digestión y/o sinérgico, junto con el factor pH, en cuanto a favorecer la extracción/solubilidad de estos compuestos antioxidantes. Esto último hecho resulta más evidente en el caso de los compuestos fenólicos del fruto de caqui y en la etapa intestinal. La influencia del pH resultó ser estadísticamente significativa en casi todos los casos de estudio, y en especial en el caso del fruto de caqui.





**FIGURA 1.** Evolución del contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/ g materia seca) a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* de extractos acuosos de hoja de caqui y del fruto de caqui. Nota: diferentes máximos en el eje y para una mejor visibilidad de los resultados.





**FIGURA 2.** Evolución del contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/ g materia seca) a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* de fibras de caqui PIEL Y PULPA de caqui. Nota: diferentes máximos en el eje y para una mejor visibilidad de los resultados.

### *Evaluación de los cambios experimentados por los flavonoides en su paso por el tránsito gastrointestinal*

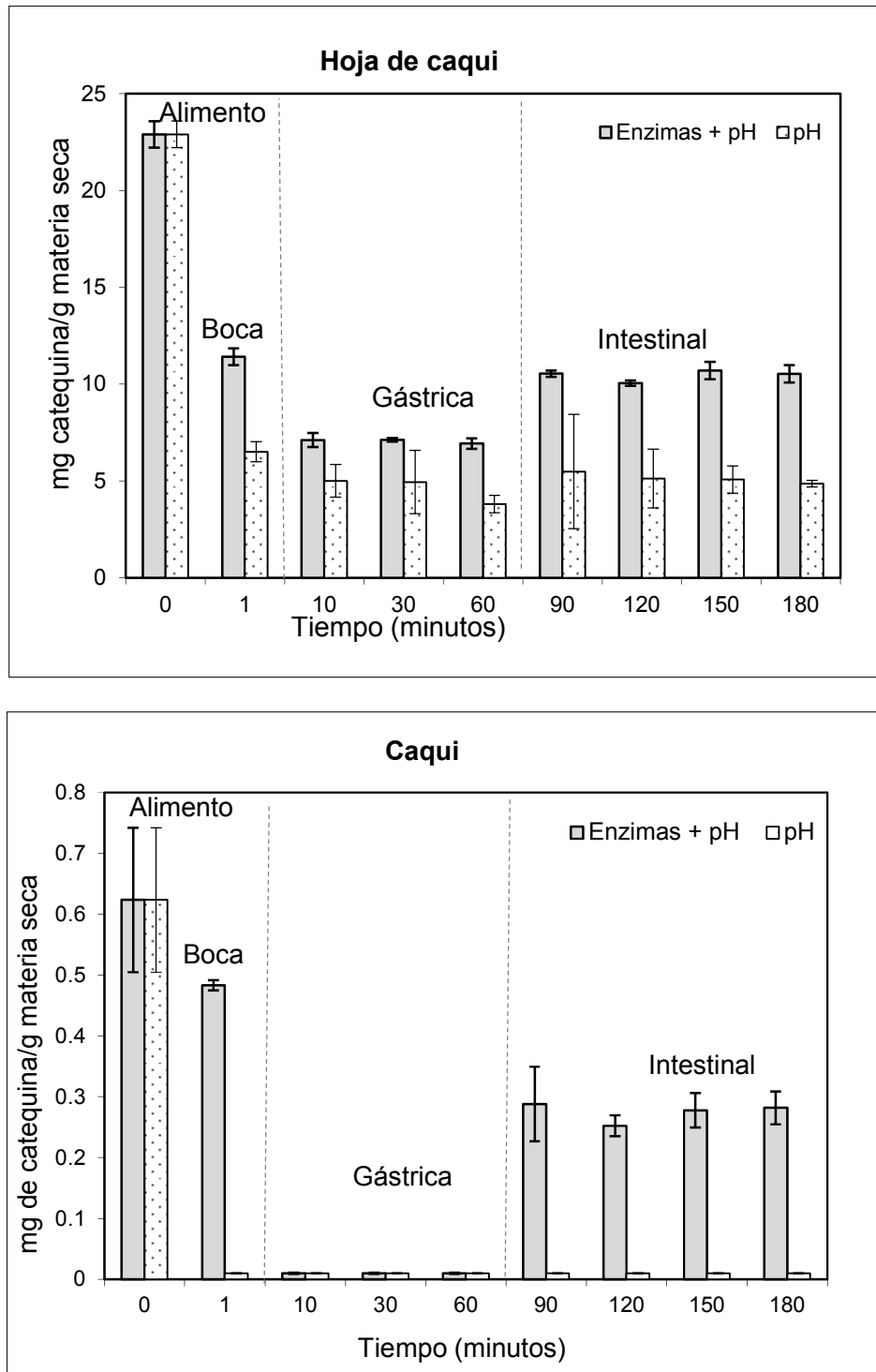
Con respecto a la estabilidad de los flavonoides durante la digestión *in vitro*, los resultados obtenidos ponen de manifiesto una disminución media de estos compuestos al final de la digestión, con respecto al contenido inicial cada matriz alimento, del 54, 51, 25, 57, 39 y 47 % (valores calculados con los valores obtenidos en presencia de enzimas) para la infusión de la hoja de caqui, caqui y las fibras PIEL-A, PIEL-L, PULPA-A y PULPA-L, respectivamente. De forma más concreta, en las Figuras 3 y 4 se muestra la evolución de estos compuestos a lo largo de la simulación gastrointestinal *in vitro* de los sistemas de estudio, en presencia y ausencia de enzimas digestivas. Así, la infusión de hoja de caqui, el fruto y la fibra de PIEL-L presentaron una mayor pérdida de flavonoides que el resto de matrices estudiadas, mientras que la fibra de PIEL-A fue la que presentó la menor. Tal y como ocurría en el caso de los compuestos fenólicos, los flavonoides se ven fuertemente afectados por la composición y pH de la saliva dando lugar a una disminución en su contenido en todos los casos. Los flavonoides procedentes de las hojas de caqui parecen ser más vulnerables a estas condiciones bioquímicas que los de fruto o algunas fibras. En cuanto al efecto de las condiciones propias del estómago, se observa un ligero descenso adicional de estos compuestos al pasar de la etapa oral a estomacal en el caso de la digestión de las hojas de caqui, siendo esta disminución mayor en ausencia de enzimas. En el caso del fruto, el pH ácido estomacal, resultó en un descenso



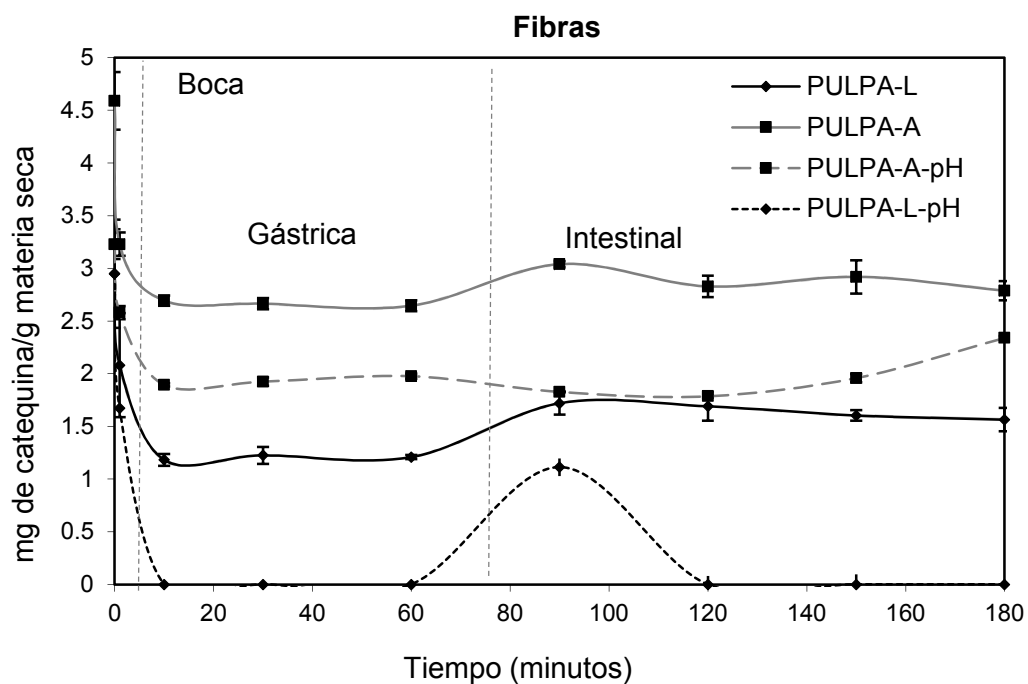
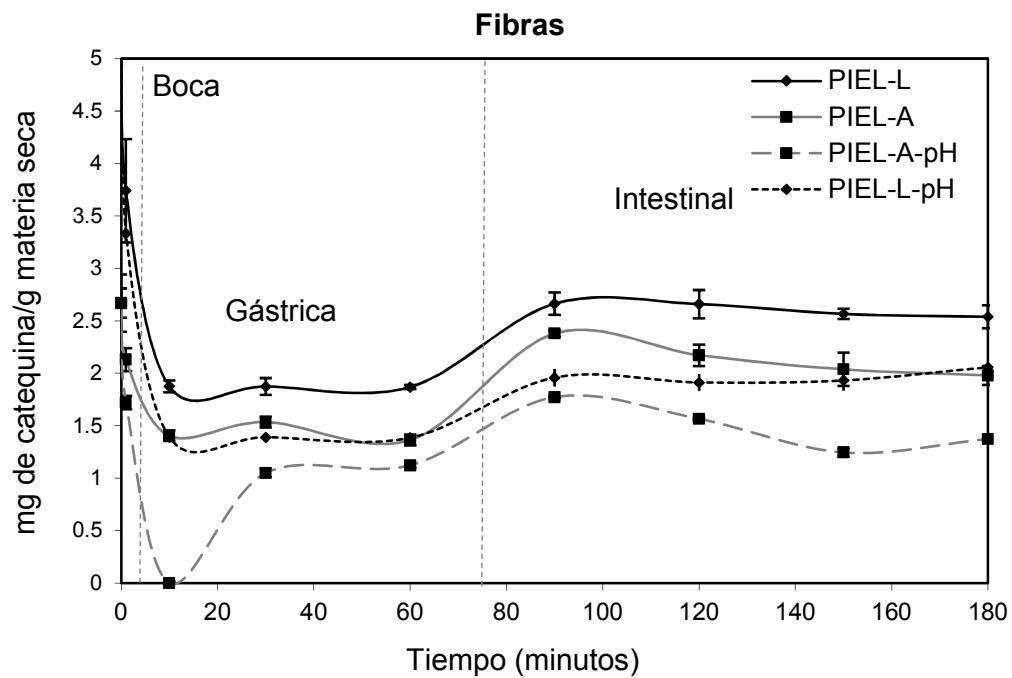
drástico del contenido en flavonoides medido. La digestión de fibras muestra que salvo en el caso de las fibras de piel (PIEL-L) y pulpa (PULPA-L) liofilizadas y sometidas a una digestión en ausencia de enzimas en las que se registra un intenso efecto del shock bioquímico propio del inicio de la residencia en el estómago (pH ácido y presencia de pepsina), en el resto de los casos, no se produjo una pérdida adicional de estos compuestos al pasar de boca a estómago. Por último, se observó un aumento del contenido en flavonoides en el caso de los extractos de hoja de caqui y del fruto durante la etapa intestinal (no en el caso en ausencia de pancreatina y sales biliares). Este hecho podría estar relacionado con un aumento en la solubilidad de ciertos flavonoides, antes probablemente quelados, o en forma reducida (Gião et al., 2012), bajo las condiciones de pH 6.5 y presencia de pancreatina y sales biliares. Este aumento no se observa prácticamente durante la digestión de las fibras, con apenas variaciones e impacto de la fase intestinal sobre estos compuestos.

Green et al. (2007) y Record y Lane (2001) publicaron pérdidas de alrededor del 80% en el contenido de distintas catequinas al final de la digestión de diferentes tipos de té, y por tanto superiores a las registradas en la infusión de hoja de caqui. De la misma forma, Cilla et al. (2009) obtuvieron pérdidas de entre un 64.5 y el 70.1% en el contenido de flavan-3-oles en zumos de uva, naranja y melocotón. En un estudio publicado por Bouayed et al. (2011) las pérdidas de flavonoides son del 56% al final de la digestión. Sus autores atribuyen esta pérdida en parte a la inestabilidad de ciertas antocianinas bajo las condiciones alcalinas propias del intestino. En cambio, en un estudio llevado a cabo también en esta matriz, manzanas, se produjo una evolución similar a la observada en este trabajo en la hoja de caqui, con una degradación de las catequinas en medio ácido estomacal y un posterior aumento en presencia de los jugos duodenales como consecuencia de una posible isomerización (Kahle et al., (2007 y 2011).

Por último, en un estudio publicado sobre la digestibilidad de cacao, los resultados ponen de manifiesto un aumento en los contenidos en catequina y epicatequina a lo largo de la digestión probablemente debido al papel protector de la grasa, macronutriente que favorecería la formación de estructuras micelares susceptibles de ejercer un papel protector frente a la degradación de estos compuestos y aumentar en consecuencia su bioaccesibilidad final (Ortega et al., 2009).



**FIGURA 3.** Evolución del contenido de actividad antioxidante (mg Catequina/ g materia seca) a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* de extractos acuosos de hoja de caqui y fruto de caqui. Nota: diferentes máximos en el eje y para una mejor visibilidad de los resultados.

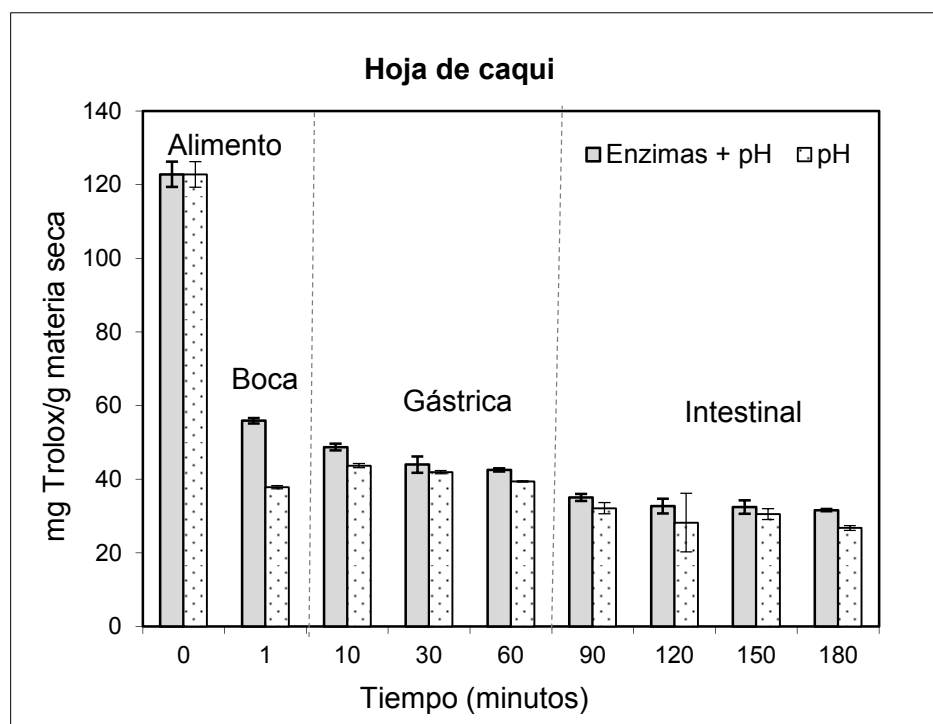


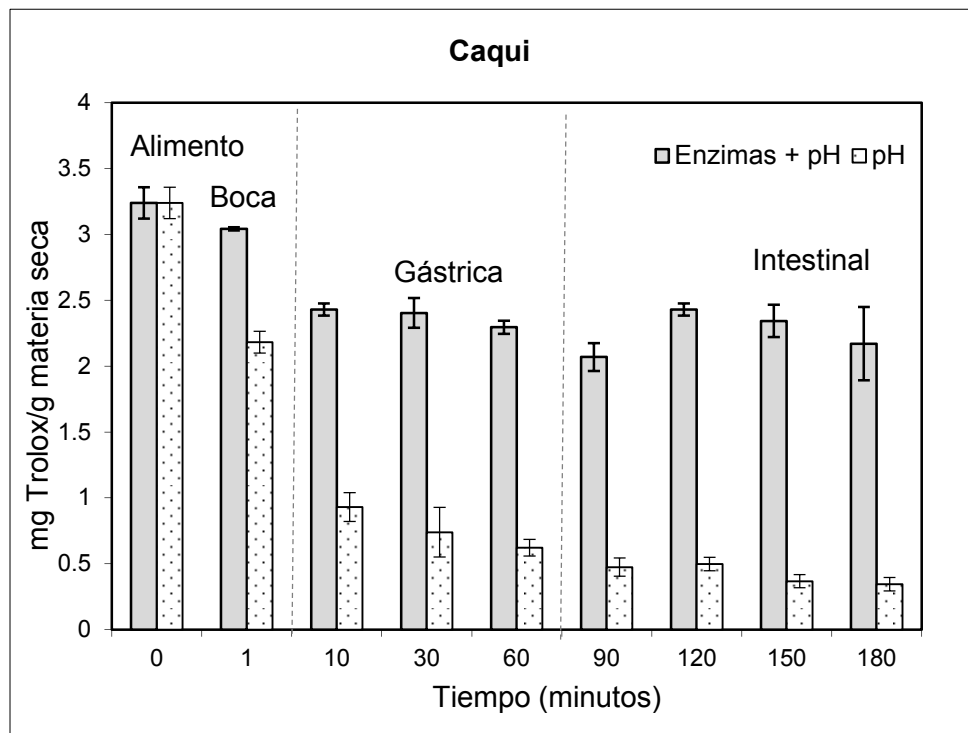
**FIGURA 4.** Evolución del contenido de actividad antioxidante (mg Catequina/ g materia seca) a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* de las fibras de PIEL Y PULPA de caqui. Nota: diferentes máximos en el eje y para una mejor visibilidad de los resultados.

## Efecto de las condiciones bioquímicas gastrointestinales sobre la actividad antioxidante

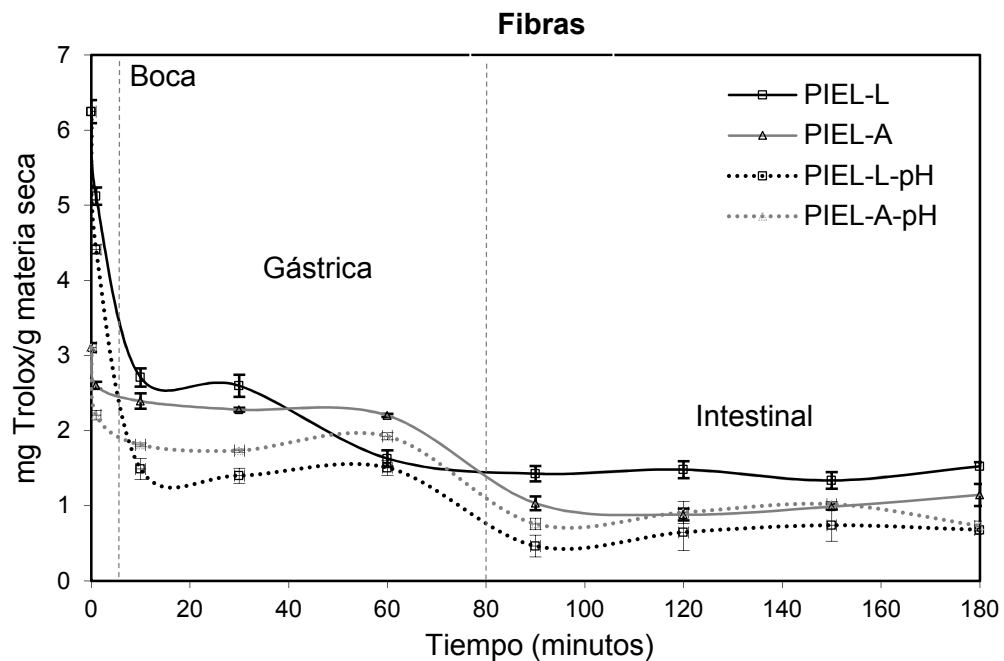
La evolución de la actividad antioxidante durante la digestión da como resultado pérdidas totales al final de la etapa intestinal de 74, 68, 63, 76, 60 y 66 % (valores calculados con los valores obtenidos en presencia de enzimas) para la infusión de hoja de caqui, caqui, PIEL-A, PIEL-L, PULPA-A, PULPA-L, respectivamente; por lo que las pérdidas se encuentran globalmente entre un 60-70 % en todos los casos. Los valores residuales de actividad antioxidante al final de la digestión son comparables a los obtenidos por otros autores en la digestión de fresa por ejemplo (Cerezo et al., 2010). Tavares et al., (2012) publicaron, sin embargo, pérdidas superiores al 84 % en la actividad antioxidante en moras y por tanto superiores a las obtenidas en este estudio; mientras que en un estudio llevado a cabo en té verde y negro por Record y Lane (2001), la pérdida de actividad antioxidante fue más moderada (alrededor del 25%). Es de destacar de nuevo el que la evolución de la actividad antioxidante durante la digestión se refleja en una aumento o pérdida global fuertemente dependiente de la matriz de estudio dado que ciertos autores han publicado estudios en los que aumenta la actividad en ciertos zumos de frutas, pan o mijo entre otros alimentos (Gawlik-Dziki et al., 2009; Cilla et al., 2011; Wootton-Beard et al., 2011; Chandrasekara & Shahidi, 2012).

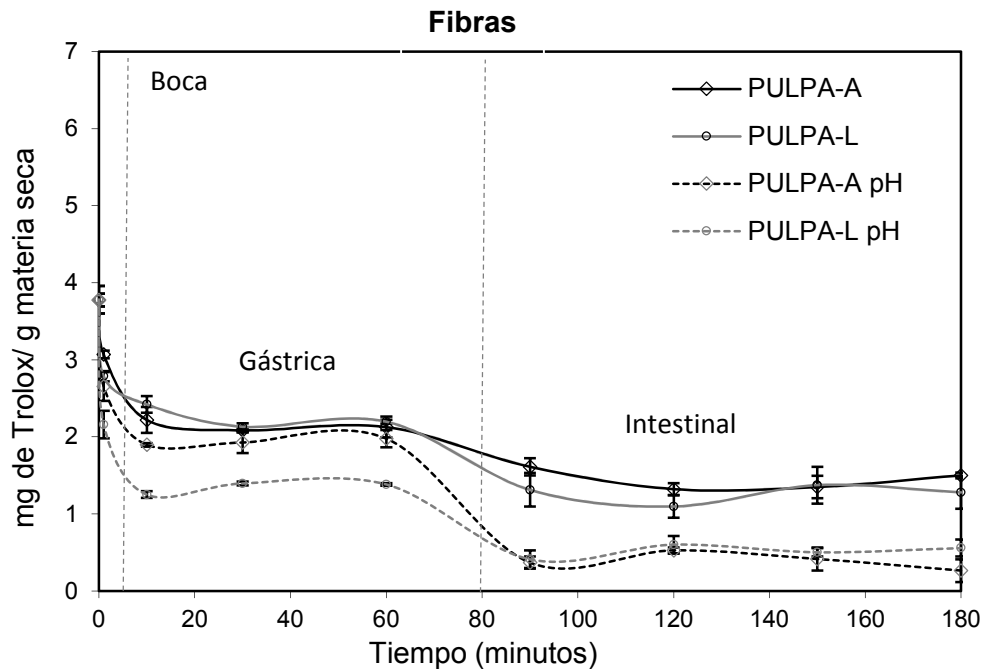
En resumen y en todas las matrices evaluadas en este trabajo, se produjo siempre una pérdida acumulativa de la actividad antioxidante total conforme progresaba la digestión gastrointestinal, si bien es de destacar que la pérdida fue significativa menos acusada en el caso del fruto y en presencia de enzimas (Figuras 5 y 6). En relación a esto último y al igual que ocurrió para el caso de la familia de polifenoles y flavonoides, la presencia de enzimas en la digestión repercutió positivamente al limitar dicha pérdida.





**FIGURA 5.** Evolución del contenido de actividad antioxidante (mg Trólox/ g materia seca) a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* de extractos acuosos de hoja de caqui y fruto de caqui. Nota: diferentes máximos en el eje y para una mejor visibilidad de los resultados.





**FIGURA 6.** Evolución del contenido de actividad antioxidante (mg Trólox/ g materia seca) a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* de fibra de PIEL Y PULPA de caqui. Nota: diferentes máximos en el eje y para una mejor visibilidad de los resultados.

#### *Estimación de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y flavonoides en los sistemas de estudio*

La Tabla 2 muestra los contenidos residuales de los compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y flavonoides en el sobrenadante tras un periodo de reposo de 24 horas y separación por decantación. Tal y como se ha expuesto anteriormente, la concentración de estos compuestos en el sobrenadante es indicativo de la bioaccesibilidad del compuesto y por tanto de la cantidad que tras llegar al intestino delgado es susceptible de atravesar las paredes intestinales (Parada y Aguilera, 2007).

Los resultados muestran, en general, una mayor bioaccesibilidad de los antioxidantes procedentes del consumo de las fibras de caqui, en segundo lugar del fruto, y en última instancia de la infusión de las hojas. En cuanto al consumo de compuestos fenólicos y flavonoides se refiere, el uso de la fibra de la pulpa liofilizada como ingrediente funcional sería más recomendable, frente a las demás fibras, al presentar una bioaccesibilidad alrededor del 90 y 70%, respectivamente. La bioaccesibilidad de la actividad antioxidante total fue por lo general inferior que la de polifenoles y flavonoides no superando en ningún caso el 40%.



**TABLA 2.** Bioaccesibilidad (%) de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante tras la digestión in vitro gastrointestinal de los sistemas de estudio: infusión de hoja de caqui, fruto del caqui, y fibra de piel y pulpa secada por aire caliente o liofilizada (PIEL-A, PIEL-L, PULPA-A y PULPA-L).

Bioaccesibilidad (%)						
MATRICES ALIMENTO	Hoja de caqui	Caqui	PIEL-A	PIEL-L	PULPA-A	PULPA-L
<b>pH + enzimas</b>						
<b>Polifenoles</b>	20.0(0.6) <sup>e</sup>	76(3) <sup>b</sup>	59(3) <sup>c</sup>	51.43(0.13) <sup>d</sup>	46(2) <sup>d</sup>	91(6) <sup>a</sup>
<b>Flavonoides</b>	47.6(0.8) <sup>d</sup>	48(3) <sup>d</sup>	60(3) <sup>b</sup>	43.0(0.4) <sup>d</sup>	53.3(0.8) <sup>c</sup>	69.4(0.5) <sup>a</sup>
<b>A. Antioxidante</b>	24.6(1.0) <sup>c</sup>	33(2) <sup>b</sup>	32(1) <sup>b</sup>	25(2) <sup>c</sup>	36(2) <sup>a</sup>	38(2) <sup>a</sup>
<b>pH</b>						
<b>Polifenoles</b>	12.1(0.4) <sup>f</sup>	55(2) <sup>c</sup>	67.5(0.9) <sup>b</sup>	42.44(0.13) <sup>d</sup>	33(2) <sup>e</sup>	74(6) <sup>a</sup>
<b>Flavonoides</b>	21(2) <sup>c</sup>	ND	35.9(0.6) <sup>b</sup>	39(2) <sup>a</sup>	21.7(0.9) <sup>c</sup>	ND
<b>A. Antioxidante</b>	21.4(0.6) <sup>b</sup>	11(2) <sup>d</sup>	28(2) <sup>a</sup>	11.7(1.0) <sup>d</sup>	8(4) <sup>d</sup>	16(3) <sup>c</sup>

<sup>abcd</sup> indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos homogéneos a un nivel de significación del 95% (p-valor  $\leq$  0.05); ND: no cuantificable

No obstante y teniendo en cuenta el aporte en antioxidantes de una ración de infusión de hoja de caqui (1.5g en 110 mL de agua), de 200g de fruto y de 100g de un alimento enriquecido con un 5% de fibra de caqui y la bioaccesibilidad de los polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante en cada matriz (Tabla 2), la ingesta de una ración de infusión de hoja de caqui y de un fruto contribuyen con un contenido total bioaccesible similar de actividad antioxidante total, el fruto 2 veces más en cuanto a polifenoles y la infusión 3 veces más en términos de flavonoides. La ingesta de 100g de un alimento rico en fibra de caqui al 5% se encontraría en cambio, muy por debajo de estos valores a pesar de la elevada bioaccesibilidad de los compuestos de esta matriz. Por último es importante destacar que la bioaccesibilidad de todos los compuestos es superior al digerir los alimentos en presencia de enzimas digestivos (pH+enzimas) que en ausencia de los mismos (pH). Este hecho evidencia la relevancia de los enzimas en cuanto a favorecer la correcta digestión de macro y micronutrientes, y en especial en presencia de los característicos de la fase intestinal (sales biliares y pancreatina). Por tanto, el efecto beneficioso derivado del consumo de alimentos funcionales ricos en compuestos bioactivos, antioxidantes entre otros, podría verse comprometido en sujetos ciertas patologías digestivas caracterizadas por un déficit en la secreción de enzimas como es el caso de la insuficiencia pancreática.

En cuanto a la información complementaria resultante de aplicar el análisis de la varianza ANOVA multifactor sobre la evolución de la actividad antioxidante total, contenido en polifenoles y flavonoides considerando como factores: la etapa del proceso digestivo y la presencia o ausencia de enzimas digestivas, cabe destacar que la presencia de enzimas fue con diferencia el factor más influyente (mayor F-rato) en la evolución de las propiedades antioxidantes, y en particular de la actividad antioxidante y del contenido en flavonoides, a lo largo de la digestión de la infusión de hoja de caqui. Mientras

que en el caso de la digestión simulada del fruto y de las fibras extraídas a partir del mismo, ambos factores presentaron una influencia significativa del mismo orden (similares valores de F-ratio de ambos factores para una misma variable de estudio). Por lo que, el papel de las enzimas digestivas pareció ser menos determinante en los cambios experimentados por los compuestos antioxidantes durante la digestión de matrices alimentarias más complejas (fruto o fibras) en las que otros constituyentes mayoritarias y las interacciones macronutriente-micronutriente existen.

## CONCLUSIONES

La simulación in vitro gastrointestinal de las diferentes matrices alimento del cultivo del caqui: hoja, fruto y fibra extraída de la piel o pulpa, pone de manifiesto la influencia de la matriz sobre los cambios experimentos por polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante, así como sobre su bioaccesibilidad final. Concretamente, los compuestos antioxidantes del extracto acuoso de hoja de caqui resultaron ser más vulnerables a las condiciones gastrointestinales características de cada etapa digestiva que los del resto de matrices evaluadas a pesar de ser la matriz más rica en antioxidantes. El patrón de cambio de los compuestos antioxidantes a lo largo de la etapa oral y gástrica fue muy similar con independencia de la matriz alimento. De forma que las condiciones propias de la etapa oral fueron las que mayores pérdidas promovieron en todos los compuestos, manteniéndose dichas pérdidas, o aumentándose ligeramente, durante la etapa gástrica. En cambio, las condiciones propias del ambiente intestinal aumentaron la fracción soluble de los polifenoles procedentes del fruto y fibra extraída de la piel y de los flavonoides presentes en todas las matrices. Asimismo y en cuanto al efecto intrínseco del pH a lo largo de la digestión, la presencia de enzimas digestivas presentó un efecto protector frente a la pérdida de compuestos.

Es posible concluir finalmente que si bien la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes resultó ser superior en el fruto de caqui o fibras extraídas del mismo que en el extracto acuoso de las hojas, la ingesta de una infusión (1.5 g en 110 mL de agua) de hoja de caqui y de un fruto de 200 g aportan al final de la digestión, la misma actividad antioxidante total bioaccesible, mientras que el fruto aportaría 2 veces más polifenoles pero 3 veces menos flavonoides que una infusión de hojas de caqui.

## REFERENCIAS

Alòs, C. (2014). La superficie cultivada de caqui crece un 20% en 2013 y se quintuplica en una década, Dirección URL: <http://www.levante-emv.com/comarcas/2014/01/10/superficie-cultivada-caqui-crece-20/1067085.html>

Anesini, C., Ferraro, G. E., & Filip, R. (2008). Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(19), 9225-9229.

Arnal Navarro, L.; Del Río Gimeno, M.A. (2005). La astringencia del caqui. *Fruticultura profesional*, 149, 14-18.

- Bouayed, J.; Hoffman, L.; Bohn, T. (2011) Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and diálisis of apple varieties: Bioaccessibility and potencial uptake. *Food Chemistry*, 128:14-21.
- Bouayed, J.; Deußer, H.; Hoffmann, L.; Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131, 1466-1472.
- Cerezo, A.B.; Cuevas, E.; Winterhalter, P.; Garcia-Parrilla, M.C.; Troncoso, A. M. (2010). Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry*, 123(3), 574-582.
- Chandrasekara, N.; Shahidi, F. (2012). Antioxidative potential of cashew phenolics in food and biological model systems as affected by roasting. *Food Chemistry*, 129, 1388-1396.
- Choi, S.; Chung, M.J.; Lee, S.J.; Shin, J.H.; & Shung, N.J. (2007). N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. *Food Control*, 18, 485-491.
- Cilla, A.; González-Sarrías, A.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C.; Barberá, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 114, 813-820.
- Cilla, A.; Perales, S.; Lagarda, M.J.; Barberá, R.; Clemente, G.; Farré, R. (2011). Influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal of food composition and analysis*, 24, 87-94.
- During, A; Harrison E. (2005). An *in vitro* model to study the intestinal absorption of carotenoids. *Food Research International*, 38,1001-1008.
- Fazzari, M.; Fukumoto, L.; Mazza, G.; Livrea, M. A.; Tesoriere, L.; Marco, L. D. (2008). In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(10), 3561-3568.
- Gawlik-Dziki, U.; Dziki, D.; Baraniak, B.; Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 137-143.
- Guevara-Cruz, M.; Lai, C. Q.; Richardson, K.; Parnell, L. D.; Lee, Y. C.; Tovar, A. R.; Torres, N. (2013). Effect of a GFOD2 variant on responses in total and LDL cholesterol in Mexican subjects with hypercholesterolemia after soy protein and soluble fiber supplementation. *Gene*, 532, 211-215.
- Gião, M. S.; Gomes, S.; Madureira, A. R.; Faria, A.; Pestana, D.; Calhau, C.; Malcata, F. X. (2012). Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja Montana*. *Food Chemistry*, 131, 761-767.
- Granado-Lorencio, F.; Olmedilla-Alonso, B.; Herrero-Barbudo, C.; Blanco-Navarro, I.; Pérez-Sacristán, B.; Blázquez-García, S. (2008). Comparative *in Vitro* bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *Food Chemistry*, 102(3):641-648.
- Green, R. J.; MurpHy, A. S.; Schulz, B.; Watkins, B. A.; Ferruzzi, M.G. (2007). Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Molecular nutrition & Food research*, 51, 1152-1162.

- Gorinstein, S.; Bartnikowska, E.; Kulasek, G.; Zemser, M.; Trakhtenberg, S. (1998). Dietary persimmon improves lipid metabolism in rats fed diets containing cholesterol. *The Journal of nutrition*, 128, 2023-2027.
- Häkkinen, S. H.; Kärenlampi, S. O.; Mykkänen, H. M.; Törrönen, A. R. (2000). Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 2960-2965.
- Heinonen, I.M.; Lehtonen, P.J.; Hopia, A.I. (1998). Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 25-31.
- Hernández, A.; 1999. El cultivo de kaki en la comunidad valenciana. Cuadernos de tecnología agraria serie fruticultura No. 3 Generalitat Valenciana conselleria de agricultura, pesca y alimentación.
- Jo, C., Son, J. H., Shin, M. G., & Byun, M. W. (2003). Irradiation effects on color and functional properties of persimmon (*Diospyros kaki* L. folium) leaf extract and licorice (*Glycyrrhiza Uralensis* Fischer) root extract during storage. *Radiation Physics and Chemistry*, 67(2), 143-148.
- Kahle, K.; Huemmer, W.; Kempf, M.; Scheppach, W.; Erk, T.; Richling, E. (2007). Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(26), 10605-10614.
- Kahle, K.; Kempf, M.; Schreier, P.; Scheppach, W.; Schrenk, D.; Kautenburger, T.; Richling, E. (2011). Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *European journal of nutrition*, 50, 507-522.
- Landines, E.; Martínez-Las Heras, R.; Heredia, A.; Andrés, A. (2014). Trabajo final de master: Extracción y caracterización de fibra de caqui. Universidad Politécnica de Valencia.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American journal of clinical nutrition*, 78, 517-520.
- Luten, J.; Crews, H.; Flynn, A.; Van Dael, P.; Kastenmayer, P.; Hurrell, R.; et al. (1996). Interlaboratory trial on the determination of the *in Vitro* iron Dialysability from food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 415-424.
- Martínez-Las Heras, R.; Heredia, A.; Castelló, M.L.; Andrés, A. (2014). Influence of drying method and extraction variables on the antioxidant properties of persimmon leaves. *Food Bioscience*, 6, 1-8.
- Matsuo, T.; Ito, S. (1978). The chemical structure of kaki-tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki*). *Agricultural and Biological Chemistry*, 42, 1637-1643.
- McDougall, G.J.; Fyffe, S.; Dobson, P.; Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage—stability to simulated gastrointestinal digestion. *PHYtochemistry*, 68, 1285-1294.
- Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Domínguez, J.M.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Noguer, M.; Cerezo, A.B.; Rentzsch, M.; Winterhalter, P.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C. (2008). Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 8879-8884.

- Ortega, N.; Reguant, J.; Romero, M.P.; Macià, A.; Motilva, M.J. (2009). Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 5743-5749.
- Parada, J.; Aguilera, J.M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of food science*, 72, R21-R32.
- Pérez-Vicente, A.; Gil-Izquierdo, A.; García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2308-2312.
- Ramos, M. (1995). Aplicación de técnicas enzimáticas de digestión *in vitro* a la valoración nutritiva de piensos de conejos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Record, I.R.; Lane, J.M. (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chemistry*, 73, 481-486.
- Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66, 401-436.
- Sakanaka, S.; Tachibana, Y.; Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89, 569-575.
- Shahidi, F.; Liyana-Pathirana, C.M.; Wall, D.S. (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99, 478-483.
- Sorensen, M.D.; Hsi, R.S.; Chi, T.; Shara, N.; Wactawski-Wende, J.; Kahn, A. J.; Stoller, M. L. (2014). Dietary intake of fiber, fruit and vegetables decreases the risk of incident kidney stones in women: A women's health initiative report. *The Journal of urology*, 192, 1694-1699.
- Tavares, L.; Figueira, I.; Macedo, D.; McDougall, G.J.; Leitão, M.C.; Vieira, H.L.; Santos, C.N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 131, 1443-1452.
- Thebaudin, J.Y.; Lefebvre, A.C.; Harrington, M.; Bourgeois, C.M.; 1997. Dietary fibres: Nutritional and technological interest. *Trends in food science & technology*, vol 8 41-48.
- Wootton-Beard, P.C.; Moran, A.; Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44, 217-224.
- Vallejo, F.; Gil-Izquierdo, A.; Pérez-Vicente, A.; García-Viguera, C. (2004). In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 135-138.
- Xie, C.; Xie, Z.; Xinjun, X.; Yang, D. (2015). Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Zafrilla, P.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3651-3655.
- Zhishen, J.; Mengcheng, T.; & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

**ANEXO 1:** F-ratio y nivel de significación estadística obtenidos a partir del análisis estadístico ANOVA multifactor realizado sobre las variables de estudio: contenido en fenoles (mg eq. ácido gálico/ g m.seca), de flavonoides (mg eq. catequina/ g m.seca) y actividad antioxidante total (mg eq. Trólox/ g m.seca) de las matrices alimento: hojas de caqui, fruto de caqui y las diferentes fibras (PULPA-A, PULPA-L, PIEL-A, PIEL-L) y considerando como factores: etapa de digestión (A), presencia de enzimas (B) y su respectiva interacción (AB).

	F-ratio					
	Hoja de Caqui			Fruto de Caqui		
	AA	Fenoles	Flavonoides	AA	Fenoles	Flavonoides
<b>Etapa digestión (A)</b>	166.13***	54.08***	97.97***	170.19***	176.81***	-
<b>Presencia enzimas (B)</b>	1175.29***	63.17***	2156.72***	169.86***	244.81***	-
<b>Interacción AB</b>	21.85***	2.26NS	33.93***	36.18***	35.31***	-

Nivel de significación: < 95% (NS), ≥ 95% (\*), ≥ 99% (\*\*), ≥ 99.9% (\*\*\*)

	F-ratio					
	PULPA-A			PULPA-L		
	AA	Fenoles	Flavonoides	AA	Fenoles	Flavonoides
<b>Etapa digestión (A)</b>	407.03***	109.89***	27.71***	148.12***	77.64***	-
<b>Presencia enzimas (B)</b>	623.83***	57.92***	836.74***	498.02***	168.77***	-
<b>Interacción AB</b>	36.16***	3.63**	9.44***	4.11**	9.27***	-

Nivel de significación: < 95% (NS), ≥ 95% (\*), ≥ 99% (\*\*), ≥ 99.9% (\*\*\*)

	F-ratio					
	PIEL-A			PIEL-L		
	AA	Fenoles	Flavonoides	AA	Fenoles	Flavonoides
<b>Etapa digestión (A)</b>	389.28***	14.52***	25.94***	474.18***	244.41***	66.22***
<b>Presencia enzimas (B)</b>	165.58***	33.87***	131.20***	386.63***	36.72***	102.00***
<b>Interacción AB</b>	12.20***	5.78***	-	9.03***	2.32*	0.64NS

Nivel de significación: < 95% (NS), ≥ 95% (\*), ≥ 99% (\*\*), ≥ 99.9% (\*\*\*)



**ANEXO 2:** F-ratio y nivel de significación estadística obtenidos a partir del análisis estadístico ANOVA multifactor realizado sobre las variables de estudio: contenido en fenoles (mg eq. ácido gálico/ g m.seca), de flavonoides (mg eq. catequina/ g m.seca) y actividad antioxidante total (mg Trólox/ g m.seca) de las fibras en estudio: PULPA-A, PULPA-L, PIEL-A, PIEL-L) antes y al final de la digestión y considerando como factores: parte del fruto de donde se ha extraído (pulpa o piel) (A), método de secado (aire caliente o liofilización) (B) y su interacción (AB).

Fibras de Caqui						
F-Ratio	Antes digestión			Tras digestión		
Antioxidante	AA	Fenoles	Flavonoides	AA	Fenoles	Flavonoides
<b>Pulpa o Piel (A)</b>	147.37***	43.8***	6.81*	0.51NS	1.72NS	3.85NS
<b>Método secado (B)</b>	452.61***	73.13***	16.76**	1.07NS	58.01***	62.41***
<b>AB</b>	449.28***	349.05***	163.47***	15.17**	0.03NS	449.31***

Nivel de significación: < 95% (NS), ≥ 95% (\*), ≥ 99% (\*\*), ≥ 99.9% (\*\*\*)