



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

## **UNIVERSIDAD POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

# **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.

Curso académico: 2018-2019

Valencia, febrero 2019

**Autora:** Andrés Andrés, Alicia

**Tutora:** García Segovia, Purificación

**Segunda tutora:** García Martínez, Eva

**Directora Experimental:** Uribe Wandurraga, Zaida Natalia



# DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DIGESTIÓN *IN VITRO* PARA LA DETERMINACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE COMPONENTES BIOACTIVOS.

Valencia, febrero de 2019.

## Resumen

Las frutas, y en general los alimentos de origen vegetal, juegan un papel fundamental en la dieta puesto que, además de suministrar nutrientes, contienen sustancias no nutritivas, también denominados compuestos bioactivos, los cuales pueden tener efectos fisiológicos beneficiosos, al modular funciones corporales específicas. A raíz de los estudios que vinculan estos compuestos directamente con la salud, la industria alimentaria desarrolla nuevos alimentos que incorporan compuestos bioactivos en su formulación. No obstante, para que los compuestos bioactivos incorporados ejerzan su actividad biológica, no solo deben ser incorporados, sino que, además, deben ser susceptibles de atravesar la barrera intestinal, es decir, ser bioaccesibles para el organismo. La medida de la bioaccesibilidad de un compuesto puede obtenerse con digestiones *in vitro* e *in vivo*. Estas últimas se realizan con seres vivos y requieren estudios epidemiológicos complejos, sin embargo, las digestiones *in vitro*, a pesar de ser menos exactas, reproducen las condiciones fisiológicas bajo las que tiene lugar la digestión humana, de un modo flexible y reproducible. Con todo esto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema de digestión *in vitro* que permita medir la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos, concretamente en alimentos líquidos. El protocolo de digestión *in vitro* se desarrolló con zumo de naranja y con una suspensión de microalga, para los que se estudió la evolución de los compuestos fenólicos totales y de la actividad antioxidante en cada una de las etapas de la digestión, y se determinó su bioaccesibilidad. Debido al estado físico de los alimentos, la digestión comenzó directamente con la fase gástrica. Tanto en la fase gástrica como en la intestinal, se adecuaron las condiciones de pH y temperatura a las óptimas de las enzimas correspondientes, pepsina y bilis-pancreatina, respectivamente. La absorción de nutrientes en la fase intestinal se simuló a través de una membrana de diálisis. Los resultados obtenidos para ambas muestras mostraron que los compuestos fenólicos disminuyeron significativamente un 20% durante la etapa de digestión gástrica. La fase intestinal afectó de distinta manera a dichos compuestos dependiendo de la muestra. Así se observó una pérdida significativa de fenoles totales del 47% en el zumo de naranja y un aumento del 34% en la suspensión de microalga, respecto al contenido inicial. En la fracción dializada se observó un contenido en fenoles totales de  $13,32 \pm 0,26$  mg ácido gálico/ 100 mL en el zumo y de  $478,56 \pm 78,75$  mg ácido gálico/100 g en la microalga, lo que supuso una bioaccesibilidad de un 21% y 40%, respectivamente. La evolución de la actividad antioxidante en el zumo de naranja a lo largo de la digestión *in vitro* fue similar a la observada en los fenoles totales, sin embargo, la disminución observada en la actividad antioxidante de la suspensión de microalga, hace suponer que otros compuestos fitoquímicos presentes en la microalga no estudiados en este trabajo, como son los carotenoides, pueden estar afectando a la misma.

## Palabras clave

Digestión *in vitro*, bioaccesibilidad, fenoles totales, actividad antioxidante, naranja, microalga.

**Autora:** Andrés Andrés, Alicia

**Tutora:** García Segovia, Purificación

**Cotutora:** García Martínez, Eva

**Directora Experimental:** Uribe Wandurraga, Zaida Natalia

# DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA DE DIGESTIÓ *IN VITRO* PER A LA DETERMINACIÓ DE LA BIOACCESSIBILITAT DE COMPONENTS BIOACTIUS.

València, febrer de 2019.

## Resum

Les fruites, i en general els aliments d'origen vegetal, juguen un paper fonamental en la dieta ja que, a més de subministrar nutrients, contenen substàncies no nutritives, també denominades compostos bioactius, els quals poden tindre efectes fisiològics beneficiosos, al modular funcions corporals específiques. Arran dels estudis que vinculen aquest compostos directament amb la salut, la indústria alimentària desenvolupa nous aliments que incorporen compostos bioactius en la seua formulació. No obstant això, perquè els compostos bioactius incorporats exercisquen la seua activitat biològica, no sols han de ser incorporats, sinó que, a més, han de ser susceptibles de travessar la barrera intestinal, és a dir, ser bioaccessibles per a l'organisme. La mesura de la bioaccessibilitat d'un compost pot obtindre's amb digestions *in vitro* i *in vivo*. Estes últimes es realitzen amb éssers vius i requerixen estudis epidemiològics complexos, no obstant això, les digestions *in vitro*, a pesar de ser menys exactes, reproduïxen les condicions fisiològiques sota les que té lloc la digestió humana, d'una manera flexible i reproduïble. Amb tot açò, l'objectiu d'este treball va ser desenvolupar un sistema de digestió *in vitro* que permeta mesurar la bioaccessibilitat de compostos bioactius, concretament en aliments líquids. El protocol de digestió *in vitro* es va desenvolupar amb suc de taronja i amb una suspensió de microalga, per als que es va estudiar l'evolució dels compostos fenòlics totals i de l'activitat antioxidant en cada una de les etapes de la digestió, i es va determinar la seua bioaccessibilitat. A causa de l'estat físic dels aliments, la digestió va començar directament amb la fase gàstrica. Tant en la fase gàstrica com en la intestinal, es van adequar les condicions de pH i temperatura a les òptimes dels enzims corresponents, pepsina i bilis-pancreatina, respectivament. L'absorció de nutrients en la fase intestinal es va simular a través d'una membrana de diàlisi. Els resultats obtinguts per a ambdues mostres van mostrar que els compostos fenòlics van disminuir significativament un 20% durant l'etapa de digestió gàstrica. La fase intestinal va afectar de distinta manera al compostos citats depenent de la mostra. Així, es va observar una pèrdua significativa de fenols totals del 47% en el suc de taronja i un augment del 34% en la suspensió de microalga, respecte al contingut inicial. A la fracció dialitzada es va observar un contingut en fenols totals de  $13,32 \pm 0,26$  mg àcid gàl·lic/ 100 mL en el suc i de  $478,56 \pm 78,75$  mg àcid gàl·lic/100 g en la microalga, la qual cosa va suposar una bioaccessibilitat d'un 21% i 40%, respectivament. L'evolució de l'activitat antioxidant en el suc de taronja al llarg de la digestió *in vitro* va ser semblant a l'observada en els fenols totals, no obstant això, la disminució observada en l'activitat antioxidant de la suspensió de microalga, fa suposar que altres compostos fitoquímics presents en la microalga no estudiats en aquest treball, com són els carotenoides, poden estar afectant a la mateixa.

## Paraules clau

Digestió *in vitro*, bioaccessibilitat, fenols totals, activitat antioxidant, taronja, microalga.

**Autora:** Andrés Andrés, Alicia

**Tutora:** García Segovia, Purificación

**Cotutora:** García Martínez, Eva

**Directora Experimental:** Uribe Wandurraga, Zaida Natalia

# DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* DIGESTION SYSTEM TO DETERMINE THE BIOACCESSIBILITY OF BIOACTIVE COMPONENTS.

Valencia, February 2019

## Abstract

Fruits, and in general foods of plant origin, play a fundamental role in the diet since, in addition to supplying nutrients, they contain non-nutritive substances, also called bioactive compounds, which can have beneficial physiological effects, by modulating specific bodily functions. As a result of the studies that link these compounds directly with health, the food industry develops new foods that incorporate bioactive compounds in their formulation. However, in order for the incorporated bioactive compounds to exert their biological activity, not only must they be incorporated, but they also must be able to pass through the intestinal barrier, that is, be bioaccessible for the organism. The measurement of the bioaccessibility of a compound can be obtained with digestions *in vitro* and *in vivo*. The latter are carried out with living beings and require complex epidemiological studies; however, the *in vitro* digestions, although being less exact, reproduce the physiological conditions under which human digestion takes place, in a flexible and reproducible way. With all this, the aim of this work was to develop an *in vitro* digestion system that allows to measure the bioaccessibility of bioactive compounds, specifically in liquid foods. The *in vitro* digestion protocol was developed with orange juice and with a suspension of microalgae, for which the evolution of the total phenolic compounds and the antioxidant activity in each one of the stages of the digestion was studied, and its bioaccessibility. Due to the physical state of the food, digestion started directly with the gastric phase. In both the gastric and intestinal phases, the pH and temperature conditions were adjusted to the optimum levels of the corresponding enzymes, pepsin and bile-pancreatin, respectively. Nutrient's absorption in the intestinal phase was simulated through a dialysis membrane. The results obtained for both samples showed that the phenolic compounds decreased significantly by 20% during the gastric digestion stage. The intestinal phase affected these compounds differently depending on the sample. Thus, a significant loss of total phenols of 47% in the orange juice and a 34% increase in the suspension of microalga was observed with regard to the initial content. In the dialyzed fraction, a total phenol content of  $13,32 \pm 0,26$  mg gallic acid / 100 mL was observed in the juice and  $478,56 \pm 78,75$  mg gallic acid / 100 g in the microalga, which meant a bioaccessibility of 21% and 40%, respectively. The evolution of the antioxidant activity in the orange juice during the *in vitro* digestion was similar to that observed in the total phenols, however, the decrease observed in the antioxidant activity of the microalga suspension, suggests that other phytochemicals compounds present in the microalga not studied in this work, such as carotenoids, may be affecting it.

## Key words:

*In vitro* digestion, bioaccessibility, total phenolic compounds, antioxidant activity, orange, microalga.

**Author:** Andrés Andrés, Alicia

**Tutora** García Segovia, Purificación

**Cotutora:** García Martínez, Eva

**Experimental Director:** Uribe Wandurraga, Zaida Natalia

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a Zaida, mi directora experimental por ayudarme todas y cada una de las veces que lo he necesitado, y siempre con una sonrisa; ha sido una suerte. A mis tutoras, Eva y Puri, por su implicación y profesionalidad.

A mi familia y amigos por estar conmigo en todo momento, gracias.

Al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, por la financiación concedida a través del Proyecto AGL 2017-89251-R (AEI/FEDER-UE).

# ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Digestión gastrointestinal.....	1
1.2.- Bioaccesibilidad.....	5
1.3.- Compuestos bioactivos.....	7
1.4.- Frutas y microalgas.....	9
2.- OBJETIVOS. ....	11
3.- MATERIAL Y MÉTODOS. ....	12
3.1.- Propuesta de sistema de digestión <i>in vitro</i> .....	12
3.2.- Ensayo en blanco y digestión de ácido gálico.....	14
3.3.- Determinaciones analíticas.....	15
3.4.- Cálculo de la bioaccesibilidad.....	16
3.5.- Análisis estadístico.....	16
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	17
4.1.- Protocolo desarrollado de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	17
4.2.-Influencia de los parámetros de la digestión <i>in vitro</i> .....	21
4.3.- Resultados del análisis de compuestos bioactivos.....	23
5.- CONCLUSIONES. ....	28
6.- LIMITACIONES. ....	29
7.- BIBLIOGRAFÍA. ....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Aparato digestivo humano.....	2
<b>Figura 2.</b> Fracciones bioaccesible y biodisponible de los distintos componentes.....	7
<b>Figura 3:</b> Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles. ....	8
<b>Figura 4.</b> Digestión gástrica del zumo de naranja. ....	17
<b>Figura 5.</b> Membrana de diálisis llena de bicarbonato sódico. ....	18
<b>Figura 6.</b> Digestión intestinal de zumo de naranja. ....	18
<b>Figura 7.</b> Muestras resultantes de fase intestinal de la digestión del zumo naranja: en la parte superior la fracción dializada y en la inferior el digesto intestinal.....	18
<b>Figura 8.</b> Membrana que contiene el dializado correspondiente a la digestión de la microalga.....	19
<b>Figura 9.</b> Diagrama de flujo del protocolo para la digestión <i>in vitro</i> de zumo de naranja y suspensión de microalga. ....	20
<b>Figura 10.</b> Evolución del pH durante el transcurso de la fase intestinal para la suspensión de microalga. ....	21
<b>Figura 11.</b> Evolución del pH durante el transcurso de la fase intestinal del zumo de naranja.....	22
<b>Figura 12.</b> Evolución del contenido en fenoles totales (expresado en mg ácido gálico/1000 mL) a lo largo de la digestión <i>in vitro</i> de la disolución de ácido gálico Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ).....	23
<b>Figura 13.</b> Evolución del contenido en fenoles totales (expresado en mg ácido gálico/100mL) a lo largo de la digestión <i>in vitro</i> de zumo de naranja. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ).....	24
<b>Figura 14.</b> Evolución del contenido en fenoles totales (expresado en mg ácido gálico/100g) a lo largo de la digestión <i>in vitro</i> de la suspensión de microalga. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ). ....	25
<b>Figura 15.</b> Evolución de la actividad antioxidante (expresada en $\mu\text{m Trolox /10mL}$ ) a lo largo de la digestión <i>in vitro</i> de zumo de naranja. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ).....	26
<b>Figura 16.</b> Evolución de la actividad antioxidante (expresada en $\mu\text{m Trolox /100g}$ ) a lo largo de la digestión <i>in vitro</i> de suspensión de microalga Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ).....	27

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de los órganos y características del tracto digestivo humano.....	3
<b>Tabla 2:</b> Clasificación de las enzimas en función de las moléculas que digieren.....	4

# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1.- Digestión gastrointestinal

El proceso de digestión gastrointestinal se lleva estudiando desde hace más de 300 años (Bornhorst & Singh, 2014). La simulación de dicho proceso permite obtener información diversa a la vez que útil: la digestibilidad de alimentos, la liberación de nutrientes, evaluar la absorción de un alimento, el punto de liberación de un ingrediente encapsulado o la efectividad de un fármaco tras la modificación por la acción de jugos gastrointestinales, entre otros.

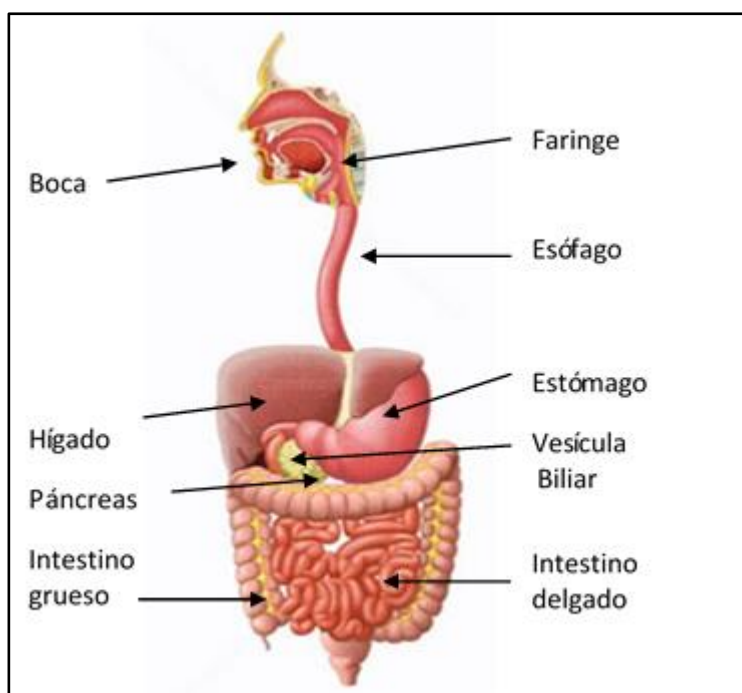
Los experimentos de simulación *in vivo* se realizan sobre seres vivos, bien con pacientes o con animales. Este tipo de pruebas requieren gran cantidad de tiempo, y por tanto elevada dotación económica, pero aportan información muy exacta del proceso de digestión (Boisen & Eggum, 1991). Hay que tener en cuenta que se trata de una técnica muy compleja, puesto que al estar tratando con seres vivos intervienen muchas variables; y es por tanto difícil de estandarizar. Tanto es así, que no siempre es posible llevarlo a cabo. También cabe destacar la componente que en estos últimos años está adquiriendo relevancia: la ética de la experimentación con seres vivos. Es por ello que, en los últimos años, muchos grupos de investigación se han centrado en el desarrollo de modelos de digestión *in vitro*. Este concepto se refiere de forma genérica a técnicas de ensayo realizadas en un laboratorio, bajo un entorno y condiciones de ambiente controlado, fuera del organismo vivo (Rivas, 2014). Estos sistemas deben ser capaces de reproducir las condiciones fisiológicas bajo las que tienen lugar la digestión humana, de un modo flexible, exacto y reproducible (Guerra *et al.*, 2012). La digestión *in vitro*, pese a sus limitaciones es capaz de aportar resultados precisos en poco tiempo y de un modo más económico (Coles *et al.*, 2005).

Revisando la literatura existente referente a digestiones *in vitro*, se observan diferencias importantes que dependen principalmente: del componente concreto a analizar, la naturaleza de la matriz alimentaria y la sofisticación del modelo de digestión *in vitro* empleado. Pero a pesar de ello, en líneas generales, simulan las condiciones de las distintas etapas del proceso de digestión, poniendo en contacto el alimento en cuestión con una serie de fluidos gastrointestinales simulados. Paralelamente se controlan otras variables como: la temperatura corporal, los movimientos peristálticos, la adición de enzimas o la absorción de nutrientes. (Hur, 2011).

### 1.1.1.-Fundamentos fisiológicos del sistema digestivo humano (Guerra *et al.*, 2012)

La digestión humana es un proceso complejo y esencial para la salud. Mediante éste, los alimentos ingeridos son transformados en sustancias químicamente más pequeñas y sencillas. Este proceso metabólico facilita la asimilación de nutrientes para su posterior función energética, plástica o reguladora. El tracto digestivo es el conjunto de órganos huecos que forman un largo y tortuoso tubo que va de la boca al ano (Rivas, 2014). El aparato digestivo humano, mostrado en la Figura 1, es el conjunto de órganos que ayudan al cuerpo a transformar y absorber los alimentos; incluye el tracto digestivo, así como el hígado y el páncreas.





**Figura 1:** Aparato digestivo humano. Fuente: Modificado de Centralx, 2019.

Durante el transcurso de la digestión se distinguen dos procesos que ocurren de manera simultánea: la transformación mecánica, que reduce el tamaño de partícula y las transformaciones enzimáticas, que provocan la hidrólisis de macromoléculas en moléculas más pequeñas, que serán absorbidas en el torrente sanguíneo. La desintegración de los alimentos se lleva a cabo principalmente en la boca y estómago, mientras que la digestión enzimática y la posterior absorción tienen lugar en el intestino grueso y delgado.

La digestión comienza con la masticación o trituración del alimento recién ingerido en la boca. El alimento se mezcla con la saliva, que está compuesta en un 99% de agua y cuya función es la lubricación y protección de la superficie del resto del tubo digestivo. En comparación, este proceso dura muy poco tiempo.

Cuando finaliza la masticación comienza la deglución, es decir, el paso del bolo alimenticio a través del esófago hacia el estómago por peristalsis. Al llegar al estómago se pone en contacto con los jugos gástricos, compuestos por pepsina y lipasas, enzimas encargadas de la digestión de proteínas y lípidos; y con el ácido clorhídrico, capaz de bajar el pH desde 6-5 hasta 2, lo que provoca la hidrólisis proteica.

En el estómago cabe destacar la importancia de los movimientos peristálticos, ya que contribuyen a romper las partículas de mayor tamaño, así como a mezclar correctamente el bolo alimenticio junto con los jugos gástricos. Cuando el estómago va a verter su contenido hacia el duodeno, se generan contracciones más intensas.

El duodeno es la primera porción del intestino delgado, y es el tramo donde entra en contacto el quimo ácido junto con el bicarbonato, que neutraliza su pH hasta adecuarlo al óptimo de las enzimas. También se mezcla con las secreciones biliar y pancreática. Las sales biliares son las encargadas de emulsionar las moléculas de grasa en otras más pequeñas para que puedan ser

transformadas por las lipasas pancreáticas; mientras que las enzimas pancreáticas son una mezcla compleja de proteasas, amilasas y lipasas.

En el intestino delgado, además de fragmentar las moléculas en otras más pequeñas, también se produce la absorción de nutrientes y agua en los enterocitos, por difusión simple, facilitada y transporte activo. Así mismo también hay actividad peristáltica.

Todo aquello que no se ha absorbido pasa al intestino grueso, donde se absorbe agua y electrolitos del quimo, se fermentan los polisacáridos y las proteínas, se reabsorbe las sales biliares y se forman, almacenan y eliminan las heces.

Cabe destacar la importancia del sistema hormonal y nervioso en la regulación del vaciado gástrico, el tránsito intestinal, así como en la secreción de los diferentes fluidos.

La Tabla 1 muestra de un modo esquemático las acciones que tienen lugar en cada órgano, el tiempo de residencia de los alimentos en dichos órganos, además de los jugos y enzimas que actúan y al pH que lo hacen.

**Tabla 1.** Resumen de los órganos y características del tracto digestivo humano.

<b>ÓRGANO</b>	<b>ACCIÓN</b>	<b>TIEMPO DE RESIDENCIA</b>	<b>pH</b>	<b>JUGOS Y ENZIMAS</b>
<b>Boca</b>	Masticar y mezclar con la saliva	10 segundos – 1,5 minutos	5-7	Enzimas salivares: amilasa (ptialina) y lipasa lingual.
<b>Estómago</b>	Procesado enzimático y mecánico del bolo alimenticio	15 minutos – 3 horas	1-5	Ácido clorhídrico, pepsina, y lipasa gástrica.
<b>Intestino delgado</b>	Fragmentación de macromoléculas y absorción de nutrientes.	2-5 horas	6-7,5	Bicarbonato sódico y jugos pancreático y biliar.
<b>Intestino Grueso</b>	Fermentación microbiana y reabsorción de agua y electrolitos del quimo	12-24 horas	5-7,5	Microbiota.

### 1.1.2. Simulación de la digestión

Para diseñar un modelo de digestión *in vitro* que se adapte a las necesidades del estudio y se adecue a las posibilidades técnicas, se ha hecho una revisión previa de los distintos modelos existentes. Las diferencias entre ellos dependen principalmente de: el componente/s a analizar, la naturaleza de la matriz alimentaria, así como la sofisticación del modelo empleado (Hur *et al.*, 2011). Dichas diferencias se hacen presentes en: el número de fases incluidas en la digestión (*boca, estómago, intestino delgado, intestino grueso*), la composición de los fluidos empleados en cada etapa (*enzimas, sales, soluciones tampón, etc.*) y los parámetros mecánicos (simulación de movimientos peristálticos, trituración, agitación, homogenización, etc.)

#### i. Elección de las enzimas

Las enzimas más utilizadas son: pepsina, pancreatina, tripsina, quimiotripsina, peptidasas,  $\alpha$ -amilasas, lipasas, y sales biliares. En la Tabla 2 se muestran las enzimas más utilizadas y su actividad. En cada estudio se escogen aquellas que más se adecuan a la digestión de los componentes principales del alimento; por ejemplo, si un alimento es rico en almidón, pero con un contenido nulo en lípidos, habrá que emplear  $\alpha$ -amilasa y se podrá prescindir de la lipasa. Las enzimas empleadas generalmente provienen de animales.

**Tabla 2.** Clasificación de las enzimas en función de las moléculas que digieren:

Moléculas que digieren	Proteínas y/o péptidos	Lípidos	Almidón
Enzimas	Pepsina Tripsina Peptidasas Pancreatina	Sales biliares Lipasas Quimitripsina Pancreatina	Amilasas Pancreatina

En lo referente a la concentración de las enzimas empleadas, existe una gran variedad, pero cabe destacar que elevadas concentraciones enzimáticas se corresponden con una mayor velocidad de digestión de los componentes alimentarios.

Por último, mencionar que no se añaden todas a la vez, si no de manera secuenciada, simulando así las diferentes etapas de la digestión (Hur *et al.*, 2011). Esto también garantiza que cada enzima pueda trabajar en sus condiciones óptimas.

### ii. Temperatura y tiempo

En cuanto a la temperatura de digestión no hay variación entre los distintos modelos, se incuba a 37°C (Gil-Izquierdo *et al.*, 2001; Benlloch-Tinoco *et al.*, 2015). En cambio, la duración de la digestión si presenta pequeñas variaciones, y estas dependen esencialmente de la naturaleza de las muestras, en concreto, del tamaño de las moléculas. En la digestión humana, las moléculas más grandes permanecen más tiempo en el estómago, puesto que deben reducir su tamaño (hasta <1 mm) antes de acceder al intestino delgado (Hur *et al.*, 2011).

### iii. Equipos (Guerra *et al.*, 2012)

En función de la complejidad del equipo empleado, se distinguen, desde sistemas monocompartmentados estáticos hasta sistemas dinámicos y multicompartmentados. Por lo general aquellos más complejos técnicamente, imitan mejor las condiciones de la digestión humana; pero en función del tipo de alimento, así como del objetivo del estudio habrá que elegir un sistema u otro.

- Sistemas monocompartmentados estáticos: La fase gástrica y la intestinal ocurren en el mismo biorreactor. La digestión comienza a nivel gástrico con el alimento homogenizado, las enzimas requeridas y las condiciones de esta fase fijadas (pH 1-2 y 37°C) y esto se incuba durante un periodo de tiempo que suele oscilar entre 1-3 horas. Para pasar a la fase intestinal, simplemente se ajusta el pH y se añaden las enzimas de esta nueva fase. Entre los usos de este sistema destaca: la medida de la digestibilidad de proteínas y almidón; y la bioaccesibilidad de los bioactivos y contaminantes. Como ventaja destaca su alto rendimiento, así como su precio, ya que son los más económicos. A pesar de ello, estos sistemas no reproducen algunos de los procesos clave de la digestión, como los continuos cambios de pH o las variaciones en la secreción de fluidos.
- Sistemas monocompartmentados dinámicos: Estos sistemas solventan algunos de los inconvenientes planteados en los modelos estáticos, pero a su vez, son más caros y más complejos a nivel técnico. Algunas de las funciones que pueden llevar a cabo son: acidificación progresiva del alimento (mediante adición secuenciada de ácido clorhídrico), flujo progresivo de enzimas o la regulación del vaciado gástrico. Hay algunos equipos que distinguen entre las distintas partes del estómago e intestino. A pesar de ser más exactos que los modelos estáticos, tampoco reproducen los

movimientos peristálticos. Los sistemas monocompartimentados dinámicos son adecuados para el estudio de la fase gástrica de la digestión.

- Sistemas bi- y multicompartimentados dinámicos: Simulan de un modo mucho más exacto la digestión humana. Son capaces de reproducir y monitorizar la temperatura, los cambios de pH, la adición de las enzimas, así como la absorción. Por lo general simulan el estómago y las tres partes del intestino delgado. Son los más estandarizados y validados para aplicaciones específicas como el estudio de la actividad de productos antiácidos o la supervivencia de probióticos. Se han empleado para numerosos estudios nutricionales, toxicológicos, farmacéuticos y microbiológicos.

#### iv. Absorción

El método empleado para simular el proceso de absorción depende fundamentalmente del objetivo final del estudio. Entre los distintos métodos destacan: diálisis, decantación y centrifugación.

El proceso de diálisis consiste en introducir dentro de una membrana con un determinado tamaño de poro (*14000 daltons*), la cantidad necesaria de disolución de  $\text{NaHCO}_3$  para alcanzar en el exterior un pH de 7,5; e introducir esta membrana dentro un recipiente que contenga el digesto gástrico. Este recipiente se incuba a  $37^\circ\text{C}$  durante un tiempo determinado y cuando alcanza pH 5 se adiciona la disolución enzimática. Tras el tiempo de incubación fijado, el fluido contenido en la membrana incluirá los compuestos bioactivos bioaccesibles (Gil-Izquierdo *et al.*, 2001). La diálisis es el método que mejor se aproxima a la absorción real, puesto que simula la capilaridad que ocurre en el intestino delgado (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013).

Otros autores emplean la centrifugación como método para obtener la fracción bioaccesible. Tras realizar la digestión gastrointestinal, centrifugan el digesto y consideran que el sobrenadante recoge los compuestos que son bioaccesibles en el intestino delgado y los compuestos recogidos en el residuo, pertenecen a la fracción que llega al intestino grueso. Algunos autores complementan la centrifugación con la filtración del sobrenadante (Dinnella *et al.*, 2007).

## 1.2.- Bioaccesibilidad

### 1.2.1- Alimentos funcionales

El término alimento funcional surge en Japón a principios de los años 80, y hace referencia a aquellos alimentos que protegen la salud de los consumidores y contribuyen así, a la reducción de los costes sanitarios derivados de tener una amplia población con elevada esperanza de vida. (Arai, 1996). Para que un alimento pueda ser considerado como funcional debe haber demostrado afectar de manera beneficiosa al organismo, además de por su perfil nutricional, por presentarse de un modo que contribuya realmente a la mejora del estado de salud del organismo (Plaza *et al.*, 2009).

### 1.2.2.- Bioaccesibilidad

Tal y como se ha mencionado anteriormente, una de las principales aplicaciones de la utilización de simuladores gastrointestinales es la determinación de la bioaccesibilidad de los distintos macronutrientes, micronutrientes y componentes bioactivos de los alimentos. Para comprender el significado de **bioaccesibilidad** y no confundirlo con otros términos, se presenta a continuación una revisión de las distintas definiciones encontradas en bibliografía.

- Cantidad de nutriente disponible para absorberse en una forma fisiológicamente útil (Van Campen & Glahn, 1999).

- Cantidad de un nutriente ingerido que está disponible para ser absorbido por el intestino tras la digestión. (Hedrén *et al.*, 2002).
- Tendencia del compuesto a ser extraído de la matriz alimentaria, para 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).
- Fracción de alimento ingerido que ha sido liberado de la matriz alimentaria y que está disponible para la absorción intestinal (Guerra *et al.*, 2012).

En adelante, comprenderemos **bioaccesibilidad** como la 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).

### 1.2.3.- Bioactividad

Por otro lado, la **bioactividad** es la capacidad de un compuesto activo de generar una respuesta fisiológica determinada (Parada & Aguilera, 2007). Es decir, la actividad biológica (por ejemplo, actividad antioxidante) que posee o poseen los compuestos activos al llegar a la célula diana. Algunos de los compuestos bioactivos más estudiados son los polifenoles y las vitaminas.

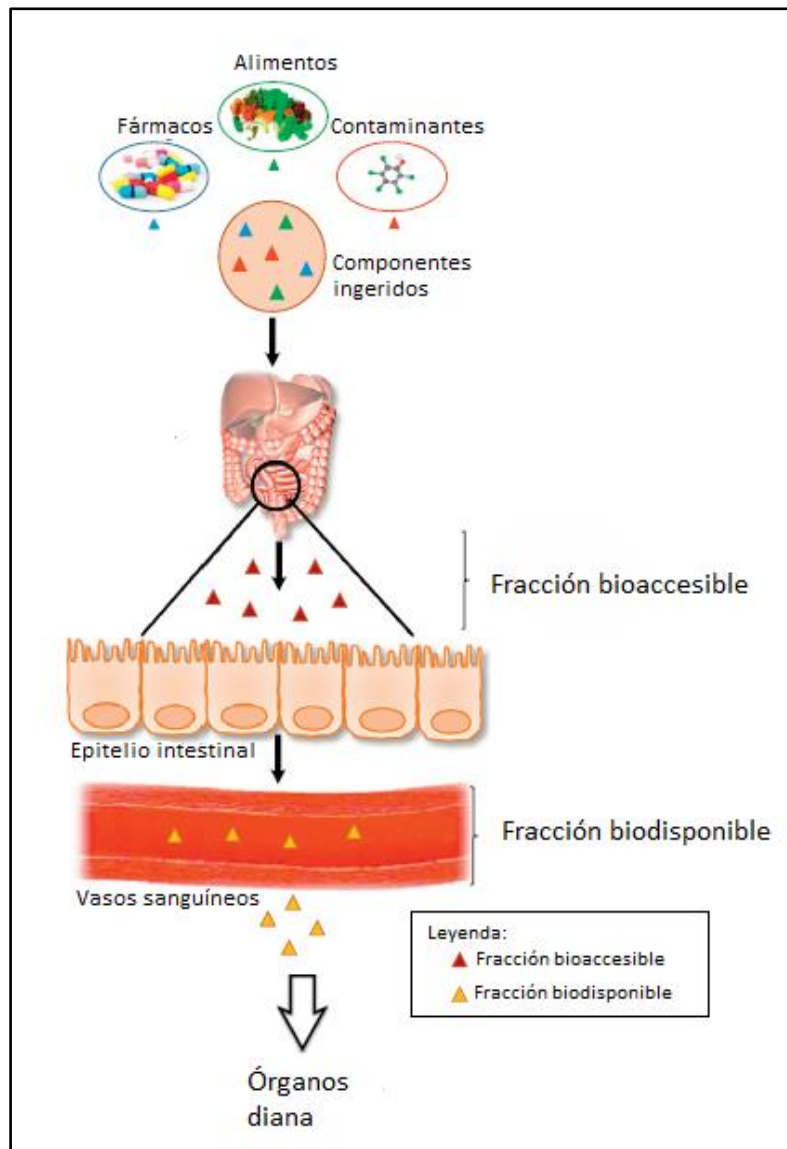
Un ejemplo que pone de manifiesto y aclara las diferencias entre estos conceptos es la fibra soluble. Según las definiciones anteriores la fibra no sería biodisponible puesto que no se absorbe, pero sin embargo es bioactiva pues tiene una clara actividad biológica sobre el microbioma intestinal.

### 1.2.4.- Biodisponibilidad

Por último, cabe destacar la existencia de otro término muy relacionado con la bioaccesibilidad y la bioactividad, es la **biodisponibilidad**. Su significado está estrechamente vinculado con los anteriores y, además, en ocasiones, puede confundirse con **bioaccesibilidad**. La **biodisponibilidad** se define como la fracción de componente ingerido que se encuentra disponible para su utilización en las funciones fisiológicas normales. Normalmente la biodisponibilidad se determina a través de los ensayos *in vivo* (Guerra *et al.*, 2012).

La biodisponibilidad de los macronutrientes dada su importancia en las funciones en el organismo (energética y plástica) suele ser elevada, llegando a superar el 90% de la ingesta. Sin embargo, en el caso de micronutrientes (vitaminas y minerales) y otros componentes activos o funcionales (carotenoides, flavonoides) hay grandes diferencias entre las proporciones que se absorben y las que se utilizan (Holst & Williamson, 2008).

La Figura 2 pone de manifiesto de un modo esquemático la diferencia entre los términos bioaccesible y biodisponible.



**Figura 2:** Fracciones bioaccesible y biodisponible de los distintos componentes (Guerra *et al.*, 2012).

### 1.3.- Compuestos bioactivos

#### 1.3.1.- Sustancias antioxidantes

Los compuestos con capacidad antioxidante son todos aquellos capaces de inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas, inhabilitando la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres en el cuerpo humano. A su vez, los radicales libres, son todas aquellas especies químicas capaces de existir de forma independiente y que contienen uno o más electrones desapareados en su estructura, lo que les proporciona una alta reactividad (Leos-Rivas *et al.*, 2016).

Cuando los radicales libres están presentes en el organismo humano, son capaces de secuestrar electrones de las macromoléculas biológicas (lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN). Esto provoca que los radicales libres participen en los mecanismos fisiopatológicos de algunas enfermedades como: patologías cardiovasculares, procesos neurodegenerativos,

cáncer, diabetes, etc. Además, también están implicados en otros procesos como el envejecimiento (Leos-Rivas *et al.*, 2016).

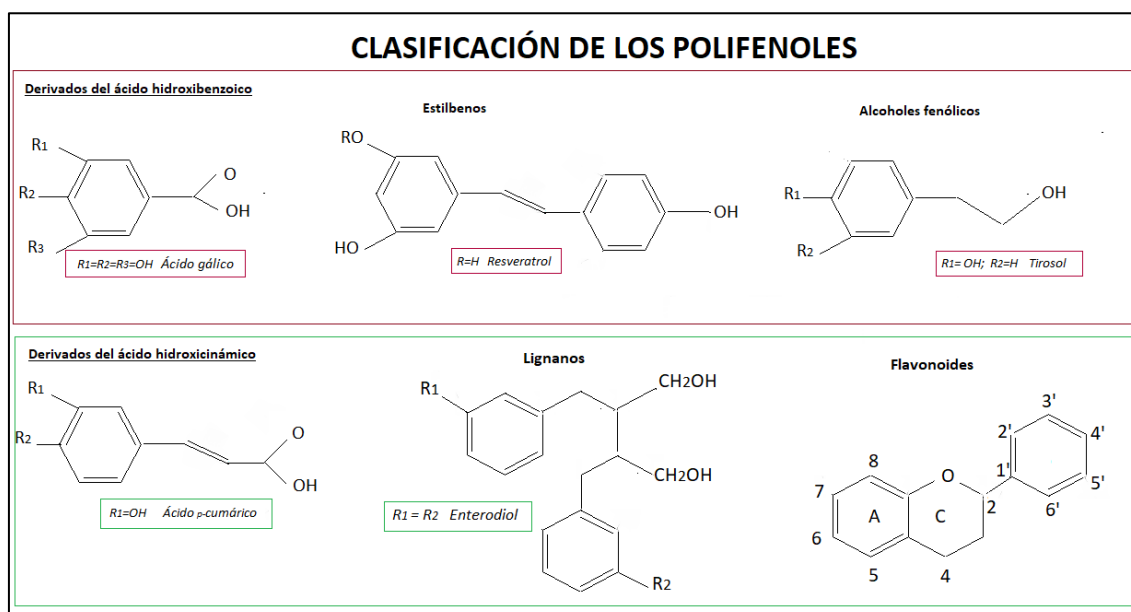
Puesto que los antioxidantes actúan neutralizando en mayor o menor medida la actividad de los radicales libres, han demostrado efecto beneficioso sobre todas las patologías generadas por estas moléculas. Y como consecuencia de esto, ha crecido el interés entre los consumidores por aumentar la ingesta dietética de antioxidantes, bien a través de alimentos que los contienen de forma inherente, o de alimentos que incorporan en su formulación estas sustancias.

### 1.3.2.- Polifenoles

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal (Quiñones *et al.*, 2012). Recientemente, numerosos estudios han demostrado que una dieta rica en polifenoles puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Saura-Calixto *et al.*, 2007). Estos y otros de los efectos beneficiosos de los polifenoles son debidos principalmente a sus propiedades antioxidantes (Quiñones *et al.*, 2012). Las características fisicoquímicas de estos compuestos les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción (actividad antioxidante).

#### i. Origen, estructura y clasificación de los polifenoles

Los polifenoles son todos aquellos compuestos presentes en la naturaleza que tienen como característica principal la presencia de uno o varios anillos fenólicos en su estructura. Son sintetizados en grandes cantidades por las plantas, como producto de su metabolismo secundario. Estos se clasifican en función del número de anillos fenólicos y los elementos estructurales de los mismos. Los grandes grupos de polifenoles son: estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones *et al.*, 2012). En la Figura 3 se muestra la clasificación de los polifenoles, señalando los sustituyentes que corresponden a la estructura concreta de algunos compuestos y numerando los átomos de carbono del núcleo estructural de los flavonoides.



**Figura 3:** Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles. Fuente: Quiñones *et al.*, 2012.

## ii. Metabolización de los polifenoles

La gran mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos de distintas formas que no pueden ser absorbidas, como ésteres, glucósidos o polímeros. Es por ello que, durante la absorción de los mismos, sufren modificaciones muy diversas. El metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones común para todos ellos, que es similar a la detoxificación metabólica que sufren muchos xenobióticos para reducir su potencial efecto citotóxico: incrementar su hidrofobicidad y facilitar su eliminación urinaria o biliar (Quiñones *et al.*, 2012). Como consecuencia de estos procesos, las formas que se encuentran en el plasma y en los tejidos son muy distintas de las que están presentes en los alimentos, lo que dificulta la identificación de sus metabolitos y la evaluación de su actividad biológica (Day & Williamson, 2001).

## iii. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los polifenoles

Como se ha visto anteriormente los polifenoles tienen una serie de efectos beneficiosos para la salud, pero para ejercer su actividad, deben encontrarse disponibles en los tejidos requeridos. Por este motivo, las propiedades biológicas de los polifenoles de un alimento dependen de la absorción de estos a nivel gastrointestinal y de su posterior biodisponibilidad (Saura-Calixto *et al.*, 2007). Es decir, es posible que algunos alimentos tengan una elevada concentración de polifenoles, pero éstos tengan una baja bioaccesibilidad y por tanto una baja biodisponibilidad. Consecuentemente, es de especial relevancia conocer la cantidad total de polifenoles presente en un alimento o ingrediente.

### 1.4.- Frutas y microalgas.

Cada vez son más las evidencias científicas que muestran como el consumo, prolongado en el tiempo, de alimentos ricos en compuestos bioactivos bien sea de manera natural o añadidos durante su formulación, contribuye a la prevención de numerosas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Pinazo *et al.*, 2015).

Entre las fuentes habituales de antioxidantes de la dieta, destacan los alimentos de origen vegetal, desde las frutas y hortalizas hasta los alimentos más novedosos como las microalgas.

#### 1.4.1.- Naranja y Zumo de Naranja

Según el “Informe del consumo de alimentación en España 2017 “en los hogares españoles en 2017 se consumieron 419.684 miles de litros de zumos y néctares; lo que supone un consumo per cápita de 9,2 litros. En lo referente al consumo de fruta fresca cada español/a consumió una media de 92 kilos de fruta fresca siendo la más consumida la naranja (19,3%), seguida del plátano (12,5%) y la manzana (10,6%) (MAPA, 2018).

Las naranjas (*Citrus x sinensis*) y sus derivados son una fuente de compuestos bioactivos, entre los que destacan: los carotenoides, como luteína y zeaxantina; los flavonoides, como hesperidina, diosmina y narirutina; y vitamina C (Aschoff *et al.*, 2015). Gran parte de las propiedades beneficiosas del consumo de naranja son atribuidas a su contenido en estos bioactivos. La realización de experimentos con animales, cultivos celulares y ensayos *in vitro* ha permitido atribuir a los flavonoides cítricos actividad antiinflamatoria, antitumoral, antimutagénica, y diurética (Gil-Izquierdo *et al.*, 2001). Además, la ingesta de zumo de naranja en individuos con hipercolesterolemia mejora su perfil lipídico en sangre (Aschoff *et al.*, 2015). Por otra parte, también existen estudios epidemiológicos que corroboran que el consumo habitual de naranja, así como otros vegetales contribuyen a la reducción del riesgo de padecer cáncer (



#### 1.4.2.- Microalga: *Chlorella vulgaris* (Plaza *et al.*, 2009).

Actualmente se emplea una amplia variedad de compuestos bioactivos como polifenoles, fitoesteroles, ácidos grasos poliinsaturados, etc. para formular alimentos funcionales. Tradicionalmente estos compuestos se obtenían de: las plantas, el vino o los productos del mar. Recientemente se han realizado diversos estudios científicos que defienden el potencial de las microalgas en la aportación de compuestos bioactivos.

Para la microalga *Chlorella vulgaris* ha sido probado su contenido en componentes bioactivos entre los que destacan: las sustancias antioxidantes (luteína,  $\alpha$  y  $\beta$ - carotenos), ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferoles y otras moléculas con capacidad de neutralizar radicales libres. Respecto a la composición lipídica destacan los ácidos oleico, palmítico y linolénico. En lo referente a polisacáridos, destaca la presencia de fibra insoluble. Además, hay diversos autores que han probado la capacidad de proteger el ADN y de prevenir del daño celular causado por los radicales hidroxilo, que tienen los péptidos de *Chlorella vulgaris*.

Este conjunto de compuestos bioactivos proporciona a *Chlorella vulgaris* una serie de propiedades como: efecto antitumoral, propiedades hepatoprotectoras y antioxidantes, efecto antibacteriano, actividad inmunoestimulante, y prevención de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como la arterosclerosis, el cáncer o los problemas coronarios, entre otras.

Un aspecto clave en la composición química de las microalgas, son los parámetros de cultivo, es decir, la composición de estos microorganismos varía considerablemente en función de los factores ambientales de su cultivo: salinidad, temperatura del agua, luz, y nutrientes disponibles. Muchos de estos factores a su vez, varían en función de la estación del año; y estos cambios provocan la inhibición o estimulación de la biosíntesis de los distintos bioactivos. Este aspecto posibilita el uso de las microalgas como bioreactores de compuestos bioactivos.

Por todo esto, distintas empresas agroalimentarias están apostando por el uso de las microalgas como ingredientes. Según un informe publicado por Credence Research (2016), se espera que el mercado de las microalgas crezca a un ritmo del 5% entre 2016 y 2023, año en que alcanzará una cuota de mercado de 44,7 billones de dólares. Dicho mercado será dominado por los productos nutraceuticos, seguido de alimentación humana y animal (Batista *et al.*, 2017).

## 2.- OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objetivo principal el desarrollo de un protocolo de digestión *in vitro* para alimentos líquidos, que permita fundamentalmente el análisis de la bioaccesibilidad de diferentes compuestos bioactivos.

Como objetivos secundarios, una vez puesto a punto el método se estudiará la evolución de los compuestos fenólicos totales y de la actividad antioxidante en las diferentes etapas de la digestión y se establecerá la bioaccesibilidad de estos compuestos para las muestras de estudio: zumo de naranja y suspensión de microalga.

## 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.- Propuesta de sistema de digestión *in vitro*

#### 3.1.1.-Consideraciones previas

A la hora de poner a punto un método que permitiera llevar a cabo la simulación de la digestión gastrointestinal hay que tener en cuenta una serie de puntualizaciones.

La puesta a punto del método se ha realizado empleando, siempre que ha sido posible, los materiales y equipos ya disponibles en el laboratorio, puesto que el presupuesto para el proyecto está limitado. Por otro lado, es importante tener presente que se han desarrollado dos protocolos para alimentos (zumo de naranja y suspensión de microalga) muy distintos entre ellos, en cuanto a composición se refiere: concentración de azúcares, presencia y tipos de ácidos, pero que comparten el estado líquido.

La revisión exhaustiva de la bibliografía existente sobre los diferentes sistemas de simulación de la digestión, descrita en la introducción, pone de manifiesto que la selección correcta del método a emplear debe tener en cuenta la naturaleza de los alimentos o matrices alimentarias que vayan a ser estudiadas, los compuestos que van a ser evaluados y la actividad que quiere medirse tras la digestión. Teniendo en cuenta estas consideraciones se decidió poner a punto el método descrito por Rodríguez-Roque *et al.*, (2013), al cual se realizaron las modificaciones necesarias para ajustar las condiciones en función de las características del alimento.

Existen tres parámetros cuyo control resulta indispensable, y estos son: la temperatura, el pH y la agitación de la muestra. Se debe mantener y garantizar que durante toda la digestión la temperatura de la muestra sea de 37°C; de no ser así, las enzimas podrían bloquear su actividad. En segundo lugar, es necesario el control y adecuación del pH de la muestra a la fase de digestión en la que se encuentre. Y por último cabe destacar que la muestra debe estar en constante agitación, con el objetivo de garantizar el óptimo rendimiento de las enzimas.

#### 3.1.2.-Protocolo de digestión

Para escoger el diseño físico que mejor se adapta al objetivo final de la digestión *in vitro* (cálculo de bioaccesibilidad), es preciso fijar primero las etapas que se van a simular:

- **Fase oral:** Puesto que ambos alimentos se encuentran en estado líquido se ha obviado esta etapa a nivel mecánico. Así mismo, teniendo en cuenta que la saliva está compuesta principalmente por amilasa, y que los alimentos a estudiar no tiene un contenido destacado en hidratos de carbono complejos, también se ha prescindido de esta fase a nivel enzimático.
- **Fase gástrica:** El protocolo de digestión para ambos productos (zumo y suspensión de microalgas) comienza en esta fase. Tras adicionar las enzimas elegidas, se acondiciona el pH con ayuda de ácido clorhídrico. En lo referente a la simulación de los movimientos peristálticos de esa fase, es importante resaltar que no se requiere una rotura mecánica del alimento, puesto que se trata de líquidos, por tanto, el único objetivo de esta simulación es asegurar el correcto mezclado del alimento junto con el fluido gástrico simulado (ácido clorhídrico y enzimas)
- **Fase intestinal** (intestino delgado): Durante esta fase ocurre, tal y como se ha detallado anteriormente, por un lado, tras la adecuación de nuevo del pH, la digestión enzimática; y, por otro lado, la absorción de nutrientes. Por ello se dividirá esta fase en dos tramos: la digestión enzimática y la absorción intestinal. Esta última se simula por

diálisis, empleando una membrana con un tamaño de poro de 14000 daltons, (Sigma-Aldrich, Alemania).

Dado que el objetivo es el cálculo de la bioaccesibilidad y esta se obtiene con la fracción de digesto intestinal que atraviesa la membrana; la simulación de lo que ocurre en el intestino grueso no se considera para el presente estudio.

### 3.1.3.- Materiales

#### i. Muestras

Para la realización del estudio se emplearon dos matrices alimentarias distintas:

- Zumo de naranja: El zumo fue adquirido en un supermercado de la ciudad de Valencia que comercializa zumo recién exprimido de naranja (*Citrus x sienensis*, var. Navelina). Desde que se adquirió en el supermercado hasta su análisis, el zumo se almacenó a una temperatura controlada de 4°C, no más de 12 horas.
- Suspensión de *Chlorella vulgaris*: partiendo de un preparado de alga liofilizada (AlgaEnergy, España) se preparó una suspensión acuosa al 1,5% (p/v).

Para garantizar la homogeneidad de las muestras, se les midió su pH (Consort, Bélgica) y al zumo se le midió también los ° Brix (Atago, Japón).

Las primeras digestiones se realizaron con un volumen de muestra 150 mL, que tras la optimización del método se pudo reducir a 100 mL lo cual supone una optimización también en el gasto de reactivos y enzimas. De este modo, es posible reservar 40 mL como digesto gástrico para el estudio de la evolución de la fase gástrica y hacer tres repeticiones de 20 mL para la fase intestinal.

#### ii. Biorreactores

Para la simulación de la fase gástrica se emplearon vasos de fondo plano con camisa termostática, de una capacidad de 250 mL (Vidrafoc, Valencia, España).

La absorción intestinal se realizó evaluando la permeabilidad a través de una membrana diálisis (Sigma-Aldrich, Alemania). Para garantizar que la diálisis se lleva a cabo de forma óptima, se requiere de un recipiente que garantice la máxima superficie de contacto entre la disolución intestinal y la membrana; se optó por el uso de probetas de PTE de 50 mL.

#### iii. Ajuste de pH

Se realiza mediante ajuste manual con una pipeta usando un pHmetro (Consort, Bélgica). Este método permite una acidificación progresiva de la muestra.

#### iv. Elección de las concentraciones de reactivos y de enzimas

En lo referente al ácido que debe ajustar el pH de la muestra a 2, existe en la literatura una gran variedad en cuanto a su concentración: desde valores de 12 M (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013), 6 M (Briones-Labarsca *et al.*, 2011) hasta 1 M (Minekus *et al.*, 2014; Rivas, 2014). Puesto que en el presente protocolo la acidificación de la muestra se realiza manualmente, es preciso encontrar una concentración de HCl (Sigma Aldrich, Alemania) lo suficientemente baja para que permita ir ajustando paulatinamente el pH a 2. Tras realizar acidificaciones con distintas concentraciones de clorhídrico se fijó 2 M como concentración del ácido para las dos muestras.

Respecto a la concentración NaHCO<sub>3</sub> (Scharlab SL, España) utilizado para subir el pH en la siguiente etapa de la digestión, existe muy poca bibliografía, debido a que su concentración depende directamente de la muestra, más concretamente de su composición en ácidos. Hay

que tener en consideración que este compuesto estará contenido en la membrana de diálisis, y será el encargado de ir aumentando el pH paulatinamente desde 2 (*pH final de la fase gástrica*) hasta 5 (*cuando se adiciona la disolución enzimática*); y desde 5 hasta 7,5; teniendo en cuenta que este último intervalo debe durar como mínimo unas dos horas. Es por ello que, para conocer la concentración de NaHCO<sub>3</sub> fueron necesarios ensayos previos hasta encontrar la concentración que cumpliera estos requisitos.

La velocidad de la digestión depende de la concentración de enzimas, como ya se ha mencionado en la introducción. Las tres enzimas usadas son de Sigma-Aldrich (Alemania). La elección de la concentración de las enzimas se hizo en base a la metodología descrita por Rodríguez-Roque *et al.*, (2013): para la fase gástrica se empleó pepsina de origen porcino con una concentración 1mg/mL de muestra fresca. Para la fase intestinal se emplearon Bilis porcina y Pancreatina porcina. Cuando el pH del digesto intestinal alcanzó el valor de 5, se añadieron estas enzimas en forma de 5 mL de disolución con unas concentraciones de 4 mg/mL de pancreatina y 25 mg/mL de bilis.

#### v. Ajuste y control de la temperatura

En el transcurso de la fase gástrica se ajustó la temperatura de la muestra a 37°C conectando el vaso con camisa termostática a un baño térmico de agua (Heidolph, Alemania). Para el control de la temperatura en la fase intestinal se empleó una cámara de temperatura controlada (Velp Científica, Italia). El control de la temperatura de la muestra permite programar tanto el baño térmico de agua como la cámara de temperatura controlada. Tanto en la fase gástrica como en la intestinal, dicho control se realizó con una sonda de temperatura (Testo, Alemania).

#### vi. Duración de la digestión

La gran mayoría de digestiones *in vitro* de alimentos vegetales y derivados emplean 2 horas tanto para la gástrica como para la intestinal. En el caso de digestiones de otros alimentos como cereales o productos marinos, las digestiones son más largas. Es por ello que, siguiendo nuevamente la metodología descrita por Rodríguez-Roque *et al.*, (2013) se estableció como tiempo para cada fase de la digestión (gástrica e intestinal) 2 horas.

#### vii. Digestión mecánica

Tal y como se ha detallado anteriormente, el objetivo de la agitación es únicamente el correcto mezclado del alimento tanto con las enzimas como con el ácido clorhídrico y el bicarbonato de sodio. En la fase gástrica se consiguió la homogenización mediante un agitador magnético a 90 rpm (Velp Científica, Italia). En la simulación de la absorción en fase intestinal, se empleó un agitador orbital (Ovan, España), dentro de una cámara de temperatura controlada.

### 3.2.- Ensayo en blanco y digestión de ácido gálico

#### 3.2.1.-Ensayo en blanco

Puesto que los análisis que se van a utilizar para determinar los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante son análisis espectrofotométricos, es necesario evaluar si los reactivos empleados interfieren en dicha medida. Para ello, se realizó una digestión sin muestra, empleando únicamente agua.

#### 3.2.2.-Digestión de ácido gálico

Con el objetivo de evaluar el protocolo de digestión diseñado y eliminar el posible efecto de la matriz alimentaria, se procedió a la digestión de ácido gálico, que es el reactivo que se empleó

como patrón en el análisis de los compuestos fenólicos. Se partió de 100 mL de una disolución de 2000 ppm de ácido gálico (Sigma Aldrich, Alemania) para llevar a cabo la digestión mediante el sistema *in vitro* diseñado.

### 3.3.- Determinaciones analíticas

Las muestras de zumo de naranja, la suspensión de microalga, así como los respectivos digestos gástricos, intestinales y la fracción dializada se analizaron en cuanto al contenido en compuestos fenólicos totales y su actividad antioxidante, tal y como se describe a continuación. Previo a las determinaciones analíticas de los digestos, las muestras se centrifugaron (Selecta Medifriger-BL, España) a 4°C y 7000 rpm durante 10 minutos, consiguiendo así la precipitación y separación de las enzimas, para que no interfirieran en los análisis. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de nylon de 0,45 µm.

#### 3.3.1.- Análisis de compuestos fenólicos totales

La extracción de compuestos fenólicos se realizó mezclando 1 g de la muestra con 9 mL de una disolución de metanol: agua (70:30, v/v). Este disolvente mostró los mejores resultados en estudios previos para la extracción de estos compuestos (Farinha, 2014; Spaggiari, 2014). La mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 30 minutos, en oscuridad, y después se centrifugó a 4°C y 7000 rpm durante 10 minutos (Grupo Selecta, España) y se recogió el sobrenadante. Para la microalga se realizaron dos extracciones, una hidrofílica con agua y otra lipofílica con hexano, en la misma proporción muestra: disolvente y siguiendo el mismo procedimiento que en el zumo, según recomendaciones de otros autores (Li et al., 2007). En este caso el resultado se expresó como la suma del contenido en fenoles de las dos fracciones obtenidas, hidrofílica y lipofílica. El análisis de fenoles totales de los diferentes digestos se realizó directamente, sin etapa de extracción.

La determinación de los fenoles totales presentes en las muestras se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu, según Benzie y Strain (1999). Para llevar a cabo el ensayo, se utilizaron 250 µL del extracto fenólico o del digesto, se le añadieron 15 mL de agua bidestilada y 1,25 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Alemania) y se dejó reaccionar la mezcla en oscuridad durante 8 minutos. Seguidamente, se añadieron 3,75 mL de carbonato sódico al 7,5% (p/v) y agua bidestilada hasta completar 25 mL. Tras 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Thermo Electron Corporation, USA). El resultado se expresó como mg ácido gálico/100 mL de zumo de naranja y mg ácido gálico/ 100 g de microalga.

#### 3.3.3.- Análisis de actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las muestras fue determinada por el método del DPPH. Este método se basa en la capacidad de las sustancias antioxidantes para captar radicales libres (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2003). Para realizarlo, se colocaron en una cubeta espectrofotométrica 3 mL de reactivo DPPH y 30 µL del extracto fenólico o del digesto. Se midió la absorbancia a 515 nm (Thermo Electron Corporation, USA) a tiempo cero ( $A_0$ ) y a los 15 minutos ( $A_{15}$ ), cuando la reacción se estabilizó. El porcentaje de DPPH fue calculado según la ecuación 1. Se utilizaron diferentes disoluciones de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) para construir la recta patrón. Los resultados finales fueron expresados como µmol Trolox equivalente /100 mL de zumo de naranja y µmol Trolox equivalente/ 100 g de microalga.

$$\%DPPH = \frac{A_0 - A_{15}}{A_0} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

### 3.4.- Cálculo de la bioaccesibilidad

Para el cálculo de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos, tanto del zumo de naranja como de la suspensión de microalga, se empleó la ecuación 2 (Briones-Labarsca *et al.*, 2011; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Stinco *et al.*, 2013).

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{\text{Concentración de bioactivos del dializado}}{\text{Concentración de bioactivos de la muestra fresca}} \quad (\text{Ec.2})$$

### 3.5.- Análisis estadístico

Para conocer si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando para ello el software Statgraphics Centurion (versión 17.2.04) disponible bajo licencia de la Universitat Politècnica de València.

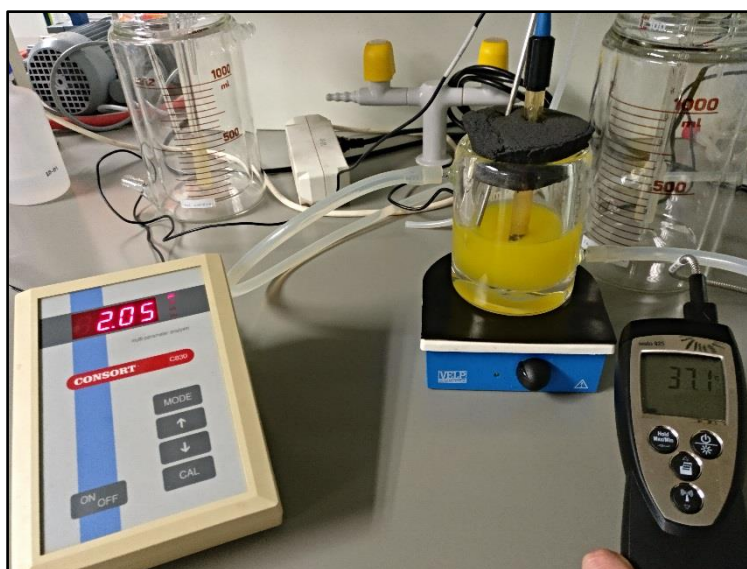
## 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.- Protocolo desarrollado de digestión gastrointestinal *in vitro*

#### 4.1.1.- Fase gástrica

Tal y cómo se ha detallado anteriormente, justo antes de dar comienzo a la digestión, se midieron el pH de ambas muestras (zumo de naranja y suspensión de microalga) y los ° Brix del zumo de naranja.

La fase gástrica se llevó a cabo en agitación a 90 rpm y a temperatura controlada, mediante un baño termostático, a 37°C. Se añadió la enzima responsable de esta etapa: pepsina. A continuación, se ajustó el pH a 2 con ácido clorhídrico 2 M. Cuando la muestra se encontró a una temperatura constante de 37°C dio comienzo las 2 horas de digestión gástrica. La figura 4 muestra el zumo de naranja contenido en el biorreactor, y este sobre el agitador magnético, conectado al baño térmico.



**Figura 4:** Digestión gástrica del zumo de naranja.

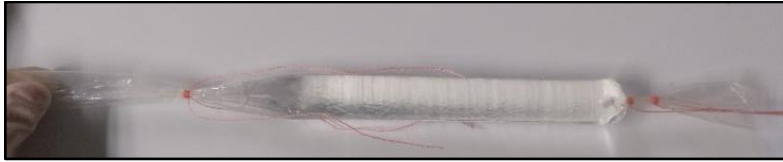
Trascurridas 2 horas de digestión, se procedió a colocar 20 mL de digesto gástrico en cada probeta de 50mL, esta operación se realizó por triplicado. El digesto sobrante (40mL aproximadamente) se almacenó en congelación (-18°C) hasta su análisis.

#### 4.1.2.-Fase intestinal

Como paso previo a esta fase, se activaron segmentos de membrana, siguiendo las instrucciones del fabricante.

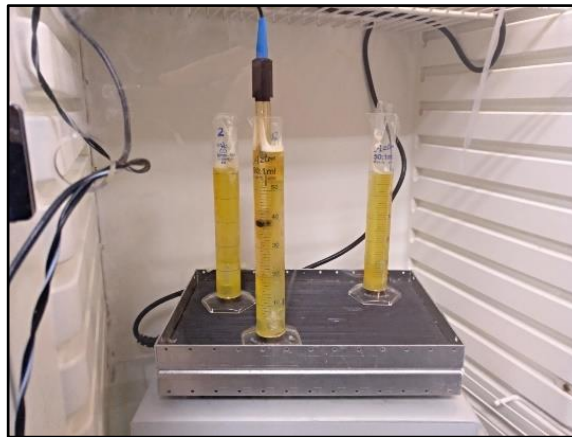
Se rellenaron las tres membranas con bicarbonato sódico 0,1 M para la digestión de microalga y 0,5 M para el zumo de naranja. Es importante cerrar las membranas siempre a la misma altura (19cm). Una vez cerradas, es imprescindible verificar que el cierre se ha hecho correctamente y que no tiene pérdidas. La figura 5 muestra una membrana activada, preparada con bicarbonato sódico.





**Figura 5:** Membrana de diálisis llena de bicarbonato sódico.

Las membranas se introdujeron en las probetas, junto con el digesto gástrico. Tal y cómo muestra la figura 6, las probetas se colocaron en el agitador orbital dentro de la cámara de temperatura controlada y se registró constantemente el pH y la temperatura. Cuando se alcanzó pH 5, se adicionaron 5 mL de la disolución enzimática intestinal previamente preparada, que contenía bilis y pancreatina disueltas en bicarbonato sódico 0,1M.



**Figura 6:** Digestión intestinal de zumo de naranja.

En el momento que se adicionaron las enzimas y tras haber verificado que el interior de las probetas se encontraba a 37°C, dio comienzo el tiempo de fase intestinal. Se dio por finalizada esta fase cuando el digesto alcanzó un pH de 7,5 o transcurrieron 2 horas.

Una vez finalizada esta parte, se congeló (-18°C) tanto los digestos intestinales como el contenido del interior de la membrana. En la figura 7 se aprecian las muestras recogidas tras la digestión intestinal, se puede observar como el digesto intestinal tiene un color naranja-marrón debido en parte a las sales biliares; y el color ligeramente amarillo del dializado. Por otro lado, la figura 8 muestra el color de la membrana de la digestión de la microalga.

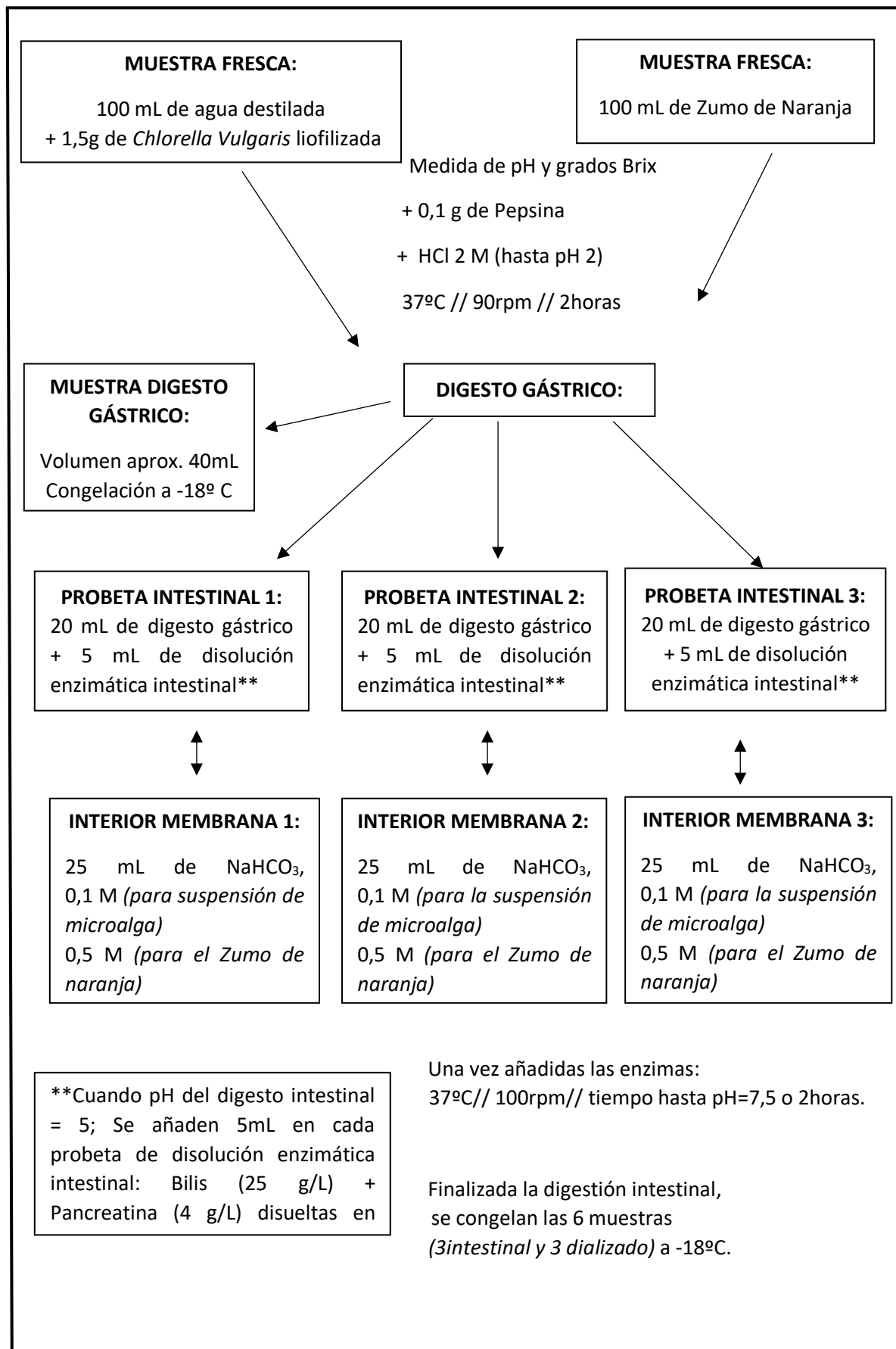


**Figura 7:** Muestras resultantes de fase intestinal de la digestión del zumo naranja: en la parte superior la fracción dializada y en la inferior el digesto intestinal.



**Figura 8:** Membrana que contiene el dializado correspondiente a la digestión de la microalga.

La figura 9 muestra el diagrama de flujo del protocolo desarrollado en este trabajo para la digestión *in vitro* de zumo de naranja y microalga.



**Figura 9:** Diagrama de flujo del protocolo para la digestión *in vitro* de zumo de naranja y suspensión de microalga.

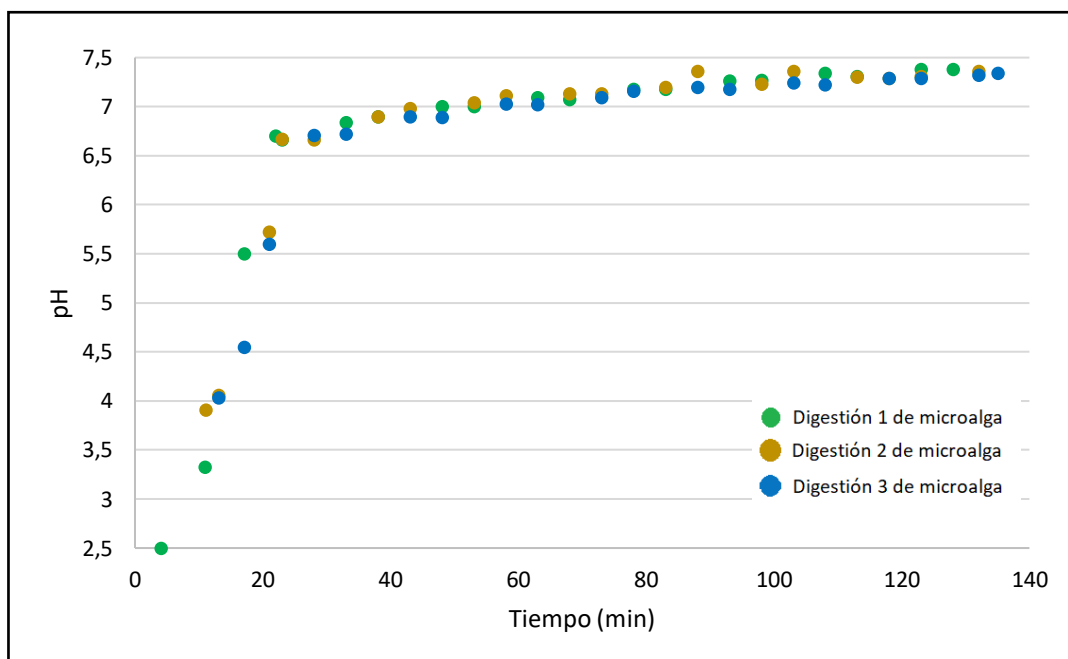
Se realizaron 3 digestiones *in vitro* de cada muestra (zumo de naranja y suspensión de microalga), obteniendo de cada una de ellas: 1 muestra de gástrico, 3 muestras de intestinal y 3 fracciones dializadas.

## 4.2.- Influencia de los parámetros de la digestión *in vitro*.

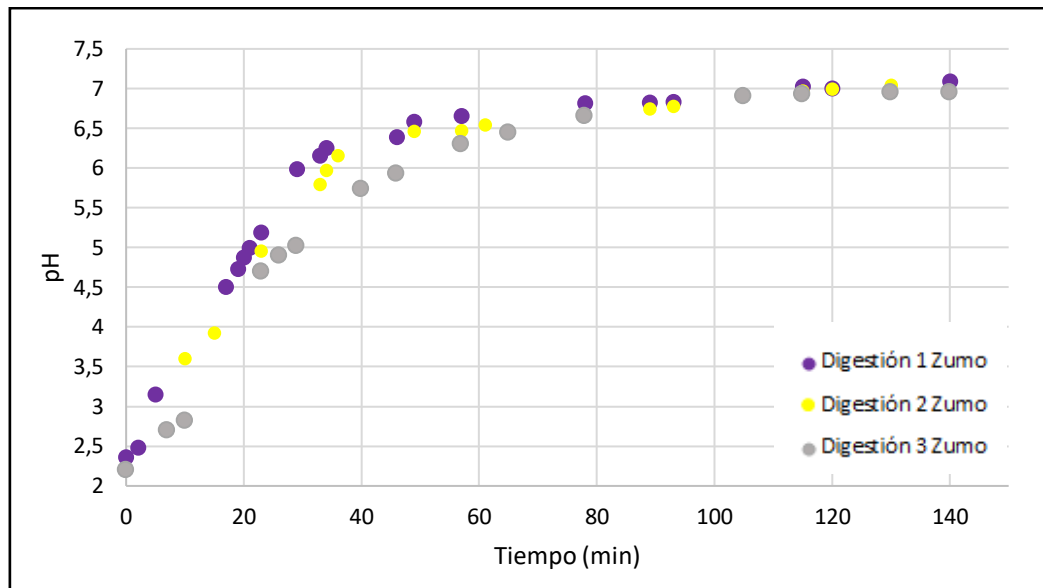
### 4.2.1.- Concentración de bicarbonato sódico

Tal y cómo se ha mencionado anteriormente, tanto la digestión gástrica como la intestinal duraron 2 horas cada una. En el transcurso de ambas se mantuvieron las condiciones requeridas por las enzimas: 37°C para ambas fases, pH 2 para el caso de la pepsina y pH 5-7,5 para el caso de las enzimas intestinales. El ajuste de pH de la fase intestinal tiene lugar gracias al intercambio que hay entre el contenido de la membrana (bicarbonato sódico) y el exterior de esta (el digesto gástrico); por tanto, la velocidad de variación del pH dependerá de varios factores: la concentración y tipología (fuertes o débiles) de ácidos presentes en la muestra, la cantidad de ácido clorhídrico proveniente de la digestión gástrica, entre otros.

Tal y cómo muestran las figuras 10 y 11, al poner en contacto el digesto gástrico con la membrana que contenía bicarbonato sódico 0,1 M (*para el caso de la suspensión de microalga*) y 0.5 M (*para el caso del zumo de naranja*), el digesto tardó 20 minutos aproximadamente en alcanzar pH 5, momento en el que se añadieron las enzimas y dio comienzo la digestión intestinal. Durante las 2 horas que duró la digestión intestinal, se mantuvo el rango pH requerido por las enzimas de esta fase: 5-7,5; para ambas digestiones.



**Figura 10:** Evolución del pH durante el transcurso de la fase intestinal para la suspensión de microalga.



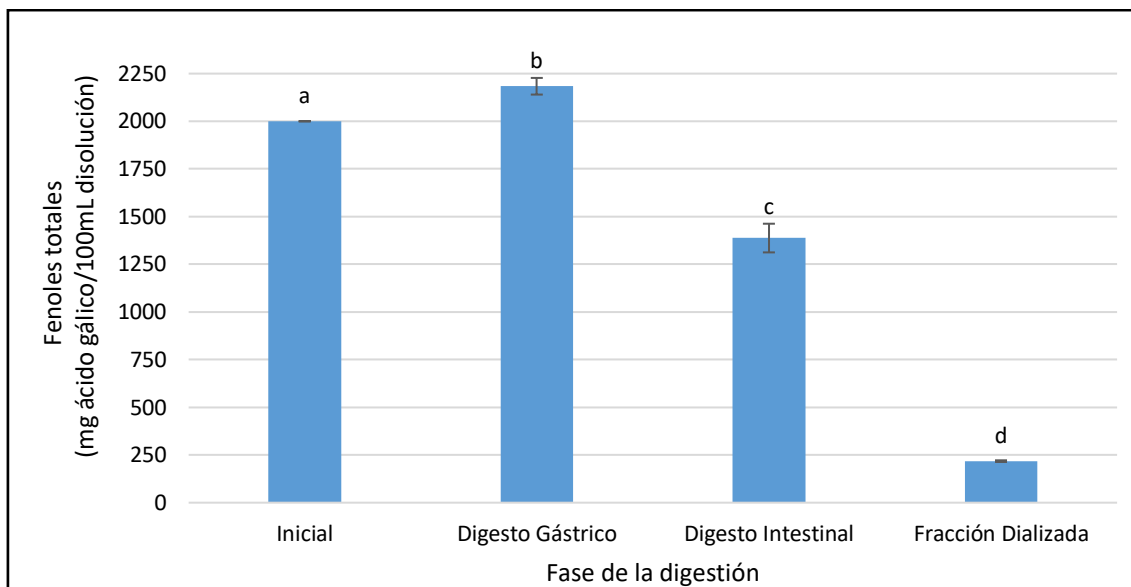
**Figura 11:** Evolución del pH durante el transcurso de la fase intestinal del zumo de naranja

#### 4.2.2.-Ensayo en blanco

Como ya se ha comentado, se realizó una digestión con agua para comprobar si los distintos reactivos empleados provocaron interferencias en el análisis de fenoles y de actividad antioxidante. Se observó que los tres digestos (gástrico, intestinal y dializado) mostraron ausencia de fenoles y de actividad antioxidante, por lo que se puede considerar que no hubo interferencia por reactivos en los análisis realizados a los digestos.

#### 4.2.3.-Digestión con ácido gálico

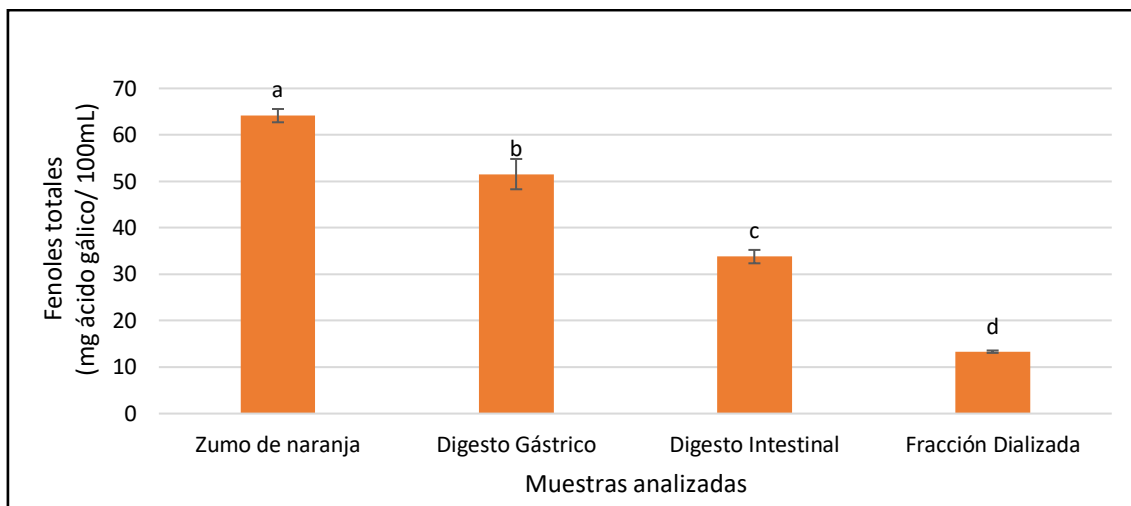
La Figura 12 muestra la evolución de la concentración de ácido gálico durante la digestión gastrointestinal. Se partió de una disolución de 2000mg de ácido gálico/1000mL, las condiciones de la fase gástrica provocaron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de un 9 % de este contenido, mientras que en la fase intestinal se produjo una pérdida significativa ( $p < 0,05$ ) del 31% con respecto a la disolución inicial, y 36% respecto a la gástrica. Finalmente, tras la diálisis se obtuvo una concentración de  $217,81 \pm 4,35$  mg de ácido gálico/1000mL, que se traduce en un 11% de bioaccesibilidad. Esta evolución se corresponde a la obtenida en estudios similares con otros patrones de compuestos fenólicos. Así, Rodríguez-Roque *et al.* (2013) observaron diferentes estabildades en la fase gástrica, determinadas por el tipo de fenol y la matriz alimentaria; un descenso general en la fase intestinal, y una bioaccesibilidad que comprende valores desde 11% (ácido cafeico) hasta 28,9% (quercetina).



**Figura 12:** Evolución del contenido en fenoles totales (expresado en mg ácido gálico/1000 mL) a lo largo de la digestión *in vitro* de la disolución de ácido gálico. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ).

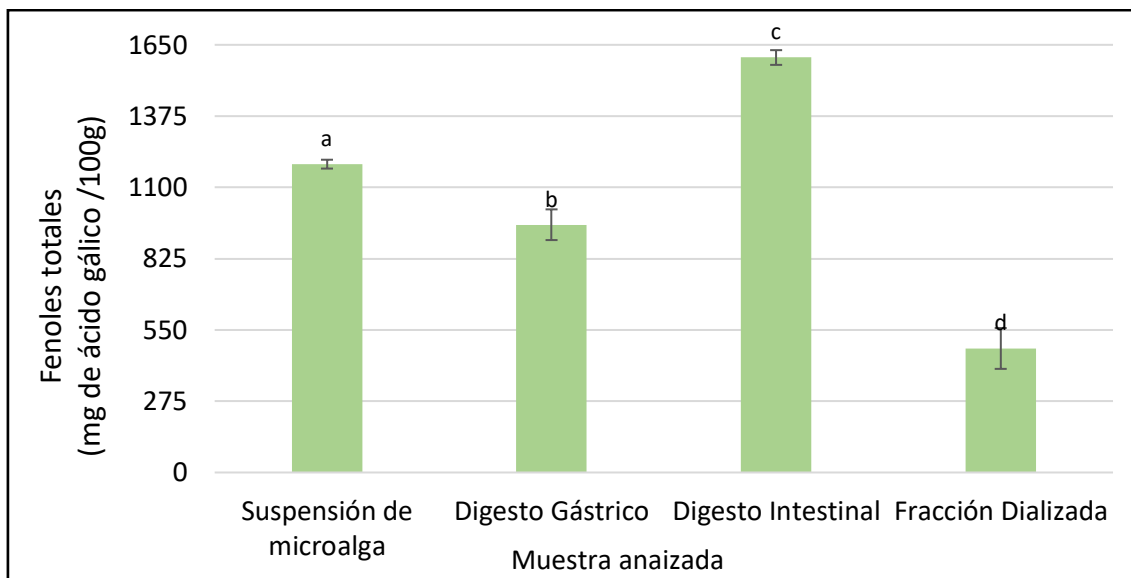
#### 4.3.- Resultados del análisis de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante

La Figura 13 muestra el contenido en fenoles totales del zumo de naranja expresado en mg ácido gálico/ 100 mL muestra. El zumo de partida presentó  $64,14 \pm 1,43$  mg ácido gálico/100 mL, del orden del contenido obtenido en otros estudios para naranja (Klimczak *et al.*, 2007; Mennah-Govela y Bornhorst, 2017) y para otras frutas cítricas (Toh *et al.*, 2013; Igual *et al.*, 2016). Como se puede observar, existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los compuestos fenólicos de la muestra de zumo inicial y los distintos digestos. Se observó que los fenoles totales disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) en cada etapa de la digestión. En el digesto gástrico la cantidad de fenoles se redujo ( $p < 0,05$ ) en un 20% respecto al zumo inicial. Como ya se ha comentado, las condiciones ácidas de la fase gástrica afectan de distinta manera a la estabilidad de los compuestos fenólicos, en función de su naturaleza, pudiendo favorecer su oxidación química o enzimática, o protegerlos de la misma. Así, algunos flavonoides del zumo de naranja como la hesperidina, la quercetina o la catequina disminuyen durante la digestión gástrica y otros compuestos aumentan, como la naringenina o la rutina (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013). Por otra parte, se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del contenido en fenoles en la fase intestinal del 47% respecto a la muestra fresca y de 34% respecto a la fase gástrica. Este descenso puede ser debido a las transformaciones químicas, principalmente oxidaciones y polimerizaciones, que experimentan los fenoles como consecuencia del pH alcalino del medio en esta etapa de la digestión. Además, otros compuestos de la matriz alimentaria como la fibra pueden reducir la solubilidad y disponibilidad de los compuestos fenólicos (Saura-Calixto *et al.*, 2007). En la fracción dializada se observó un contenido en fenoles totales de  $13,32 \pm 0,26$  mg ácido gálico/ 100 mL, lo que supone que la bioaccesibilidad del zumo de naranja fue de un 21%. Valores similares de bioaccesibilidad de compuestos fenólicos fueron encontrados por otros autores en zumos de frutas (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013).



**Figura 13:** Evolución del contenido en fenoles totales (expresado en mg ácido gálico/100 mL) a lo largo de la digestión *in vitro* de zumo de naranja. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ).

La Figura 14 muestra el contenido en compuestos fenólicos de la suspensión de microalga antes y durante la digestión *in vitro*. El valor de fenoles de la muestra antes de ser digerida fue de  $1189,59 \pm 17,09$  mg de ácido gálico/ 100 g de microalga; tal y como se ha descrito en Material y Métodos, este valor es la suma del contenido en compuestos fenólicos totales de la fracción hidrofílica ( $265,81 \pm 6,21$  mg ácido gálico/ 100 g microalga) y lipofílica ( $923,77 \pm 10,87$  mg ácido gálico/ 100 g microalga). Estos resultados fueron del orden de los obtenidos en otros estudios similares para *Chlorella Vulgaris* (Batista *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2007). Tal y como ocurrió en el zumo de naranja, tras la fase gástrica se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) un 20 % la concentración de fenoles respecto al contenido inicial de la suspensión de microalga. Sin embargo, el digesto intestinal aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) un 34% el contenido fenólico respecto a la suspensión de microalga sin digerir y un 67 % respecto al digesto gástrico. El diferente comportamiento observado de los compuestos fenólicos durante la digestión intestinal en el zumo de naranja y en la microalga puede explicarse teniendo en cuenta que los fenoles pueden mantener interacciones sinérgicas o antagónicas entre ellos y entre otros constituyentes, dependiendo de la matriz alimentaria, afectando a su cómputo global (Rice-Evans *et al.*, 1997). En la fracción dializada se obtuvo un contenido en fenoles de  $478,56 \pm 78,75$  mg ácido gálico/100 g de microalga, en este caso la bioaccesibilidad fue de un 40%.

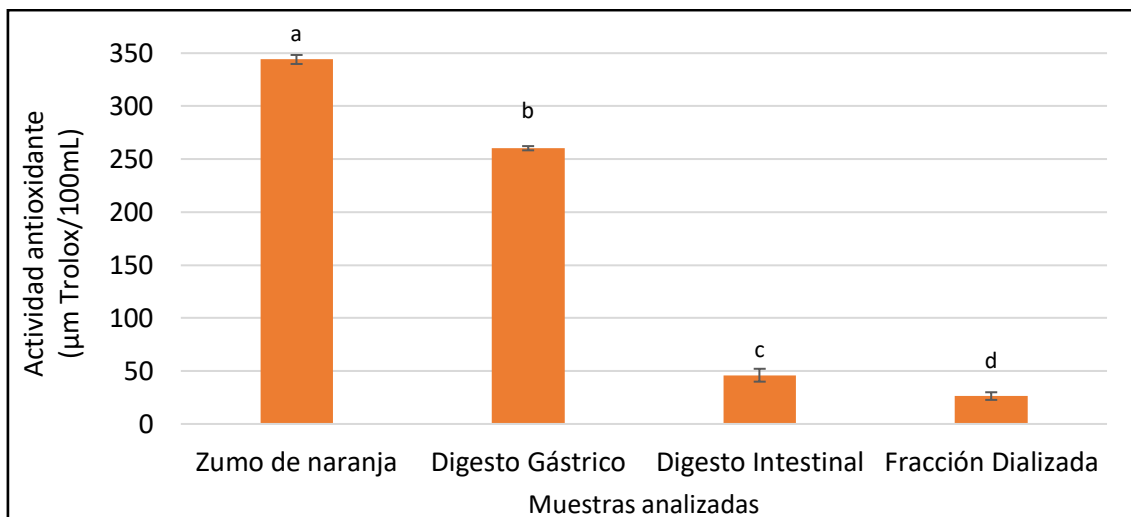


**Figura 14:** Evolución del contenido en fenoles totales (expresado en mg ácido gálico/100 g) a lo largo de la digestión *in vitro* de la suspensión de microalga. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Las Figura 15 muestra el resultado del análisis de la actividad antioxidante del zumo de naranja sin digerir, de los digestos gástrico e intestinal y de la fracción dializada. Inicialmente el zumo de naranja mostró una actividad antioxidante de  $64,14 \pm 1,42 \mu\text{m Trolox} /100\text{mL}$ , valores similares a los descritos por Mennah-Govela & Bornhorst (2017). Se observaron pérdidas significativas ( $p < 0,05$ ) de actividad antioxidante durante la digestión respecto al zumo sin digerir. Así, se produjeron pérdidas de un 24% en la fase gástrica y de un 87% en la fase intestinal respecto al zumo de naranja inicial. La fracción dializada mostró una actividad antioxidante de  $13,32 \pm 0,32 \mu\text{m Trolox} /100\text{mL}$ , lo que supone un 8% de la actividad antioxidante de la muestra fresca.

La evolución de la actividad antioxidante a lo largo de la digestión *in vitro* fue similar a la observada en los fenoles totales, esto es debido a que, en la naranja, los fenoles son los mayores responsables de dicha actividad (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). En este sentido, existe cierta controversia en cuanto a qué compuestos fitoquímicos aportan mayor actividad antioxidante. Hay autores que apuntan que la mayor actividad antioxidante de los cítricos es proporcionada por la vitamina C (Xu *et al.*, 2008), mientras que otros estudios afirman que es consecuencia de los fenoles (Bahorun *et al.*, 2004). En cualquier caso, la actividad antioxidante viene determinada por interacciones antagonistas o sinérgicas entre las diferentes sustancias que muestran esta actividad dentro del alimento (Gil y Rojano, 2009).

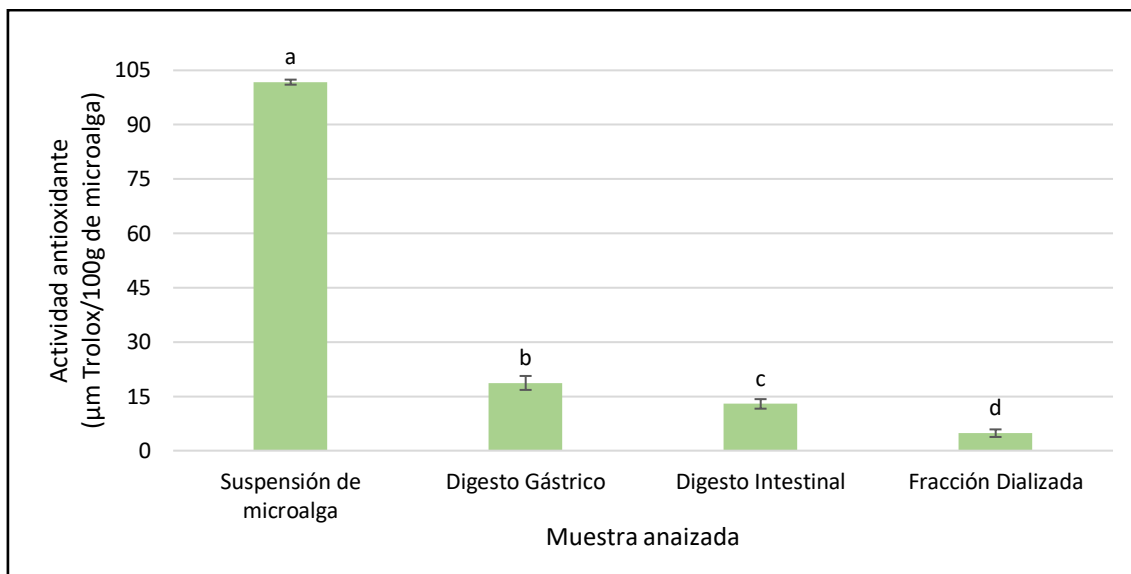




**Figura 15:** Evolución de la actividad antioxidante (expresada en  $\mu\text{m Trolox} /100 \text{ mL}$ ) a lo largo de la digestión *in vitro* de zumo de naranja. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ).

La actividad antioxidante de *Chlorella vulgaris* fue de  $101,74 \pm 0,69 \mu\text{m Trolox}/100 \text{ g}$ , valor similar al obtenido en otros estudios de microalgas (Li *et al.*, 2007). La Figura 16 muestra cómo la microalga va perdiendo su actividad antioxidante a lo largo de la digestión *in vitro*: la fase gástrica provocó una pérdida significativa ( $p < 0,05$ ) del 89% y, la intestinal del 93% ( $p < 0,05$ ) respecto a la suspensión de microalga sin digerir. La fracción dializada mantuvo un 3% de la actividad antioxidante inicial, con una actividad antioxidante de  $4,83 \pm 1,83 \mu\text{m Trolox}/100 \text{ g}$ .

Como ya se ha comentado, la evolución de la actividad antioxidante en un alimento durante su digestión es función de la cantidad de compuestos que presenten dicha actividad, y de cuál sea la estabilidad de estos compuestos frente a las distintas fases de la digestión. El diferente comportamiento observado en los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante durante la digestión de microalga puede deberse a que entre los fitoquímicos que otorgan actividad antioxidante a *Chlorella Vulgaris* destacan, además de los fenoles, los carotenoides (Li *et al.*, 2001). En este caso, es conocida la inestabilidad de los compuestos carotenoides, siendo susceptibles de sufrir reacciones de oxidación debido a sus numerosos dobles enlaces de su estructura química. Otros factores de la digestión, como la temperatura, los cambios de pH pueden también favorecer su oxidación (Belitz y Grosch, 2012). En nuestro caso, las posibles pérdidas de compuestos carotenoides en la microalga durante la digestión *in vitro* pueden estar afectando a la disminución de su actividad antioxidante observada. Así, en trabajos de otros autores con otros alimentos, se observaron pérdidas de  $\beta$ -caroteno del 50% en la fase intestinal de la digestión de espinaca (Rich *et al.*, 2003), mientras que Rodríguez-Roque *et al.*, (2013) no detectaron carotenoides en la fracción dializada de la digestión de zumos de frutas.



**Figura 16:** Evolución de la actividad antioxidante (expresada en  $\mu\text{m Trolox} /100\text{g}$ ) a lo largo de la digestión *in vitro* de suspensión de microalga. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras establecidas por el ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## 5.- CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo fin de grado ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- Se ha puesto a punto un sistema que permite la digestión *in vitro* de alimentos líquidos de un modo sencillo y fiable.
- El sistema desarrollado ha sido probado para zumo de naranja y para una suspensión de microalga y los resultados obtenidos se consideran satisfactorios, comparando con otros estudios bibliográficos.
- Se ha estudiado la evolución de los compuestos fenólicos y de la actividad antioxidante a lo largo de la digestión de ambas muestras y se ha calculado la bioaccesibilidad de los polifenoles. En este sentido, se ha observado que:
  - La estabilidad de los compuestos fenólicos a lo largo de la digestión *in vitro* y su bioaccesibilidad dependen tanto de su naturaleza química como de la matriz alimentaria de donde provengan. Así, en el zumo de naranja la bioaccesibilidad de los mismos fue menor que en la suspensión de microalga.
  - La actividad antioxidante de un alimento es debida a la interacción de distintos compuestos bioactivos que pueden evolucionar de distinta manera a lo largo de la digestión. Evaluada en su conjunto, tanto en el zumo como en la suspensión de microalga, la actividad antioxidante se vió disminuida tras la digestión *in vitro*.
- El protocolo supone el punto de partida para determinar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos en fórmulas vegetales y/o matrices líquidas que incorporen microalgas.

## 6.- LIMITACIONES

En primer lugar, cabe destacar que el sistema de digestión *in vitro* ha sido desarrollado para alimentos en estado líquido. Únicamente se ha probado su correcto funcionamiento para dos alimentos: zumo de naranja y suspensión de microalga. Para poder emplear este sistema en otros alimentos habría que realizar las modificaciones necesarias.

Por otro lado, en lo referente a los métodos de análisis utilizados para la determinación de fenoles totales y de actividad antioxidante, cabe destacar que en la actualidad existen métodos más sensibles que los empleados, como la cromatografía líquida de alta resolución. Se decidió emplear los métodos espectrofotométricos descritos anteriormente, pese a ser menos sensibles, puesto que el objetivo del presente trabajo no fue la caracterización de los compuestos bioactivos, sino el desarrollo del sistema de digestión *in vitro* a partir del estudio de compuestos mayoritarios. Para futuras investigaciones se recomienda estudiar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos más concretos (vitamina C, flavonoides, etc.) empleando técnicas cromatográficas.

Por último, tras una revisión de la literatura científica sobre digestiones *in vitro* de microalgas no se ha encontrado apenas acerca de suspensiones de microalgas puras, únicamente de alimentos que las incorporan en su composición. Esto ha dificultado la comparación y discusión de los resultados obtenidos.

## 7.- BIBLIOGRAFIA

ARAI, S. (1996). Studies on Functional Foods in Japan—State of the Art. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(1), 9-15.

ASCHOFF, J., KAUFMANN, S., KALKAN, O., NEIDHART, S., CARLE, R., & SCHWEIGGERT, R. (2015). In Vitro Bioaccessibility of Carotenoids, Flavonoids, and Vitamin C from Differently Processed Oranges and Orange Juices [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 578-587.

BAHORUN, T., LUXIMON-RAMMA, A., CROZIER, A. & ARUOMA, O., (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 8, 1553-1561.

BATISTA, A., NICCOLAI, A., FRADINHO, P., FRAGOSO, S., BURSIC, I., AND RODOLFI, L., BIONDI, N., TREDICI, M. R., SOUSA, I. & RAYMUNDO, A. (2017). Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Research*, 26, 161-171.

BELITZ, H.D. Y GROSCH. W. (2012). Química de los alimentos. 3 edición. Ed Acribia. Zaragoza.

BENLLOCH-TINOCO, M., KAULMANN, A., CORTE-REAL, J., RODRIGO, D., MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. & BOHN, T. (2015). Chlorophylls and carotenoids of kiwifruit puree are affected similarly or less by microwave than by conventional heat processing and storage. *Food Chemistry*, 187, 254-262.

BENZIE, I. F. & STRAIN, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*, 299, 15-27.

BOISEN, S. & EGGUM, B. O. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141–162.

BORNHORST, G. & 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(1), 111-132.

BRIONES-LABARCA, V., VENEGAS-CUBILLOS, G., ORTIZ-PORTILLA, S., CHACANA-OJEDA, M. & MAUREIRA, H. (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith Apple. *Food Chemistry*. 128: 520-529.

CENTRALX. 2019. Disponible en: <http://www.centralx.es/p/imagen/sistema-digestivo/>  
Último acceso 22 de enero de 2019

COLES, L., MOUGHAN, P. & DARRAGH, A. (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*, 123-124, 421-444.

CREDENCE RESEARCH (2016) Algae Products Market by Application (Nutraceuticals, Food & Feed Supplements, Pharmaceuticals, Paints & Colorants, Pollution Control, Others) - Growth, Future Prospects, Competitive Analysis, and Forecast 2016–2023, (<http://www.credenceresearch.com/report/algae-products-market> ).

DAY, A. & WILLIAMSON, G. (2001). Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *British Journal of Nutrition*, 86(51), 105-110.

DINNELLA, C., MINICHINO, P., D'ANDREA, A. & 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.

FARINHA, P., (2014). Efeito da liofilização e da adição de goma arábica no potencial bioativo de extratos de morango e kiwi. Tesina Final de Master. Instituto Politécnico de Castelo Branco (Portugal).

GIL-IZQUIERDO, A., GIL, M., FERRERES, F. & TOMÁS-BARBERÁN, F. (2001). In Vitro Availability of Flavonoids and Other Phenolics in Orange Juice. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 49(2), 1035-1041.

GIL, J. H. y ROJANO, B. A., (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388-395.

GOBIERNO DE ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2018). *Informe del consumo de alimentación en España 2017* (125-127, 196-200). Madrid: Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Visto el 3 de septiembre [https://www.mapa.gob.es/images/es/informeanualdeconsumoalimentario2017\\_tcm30-456186.pdf](https://www.mapa.gob.es/images/es/informeanualdeconsumoalimentario2017_tcm30-456186.pdf)

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.

HEDRÉN, 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), 425-430.

HOLST, B. & WILLIAMSON, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion In Biotechnology*, 19(2), 73-82.

HUR, S., LIM, B., DECKER, E. & MCCLEMENTS, D. (2011) In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12.

IGUAL, M., GARCÍA-MARTÍNEZ, E., CAMACHO, M.M., & MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2016). Stability of micronutrients and phytochemicals of grapefruit jam as affected by the obtention process. *Food Science and Technology International*, 22, 203–212.

KLIMCZAK, I., MAŁECKA, M., SZLACHTA, M., & GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 20(3-4), 313-322.

LEOS-RIVAS, C., RIVAS-MORALES, C., y GARCÍA-HERNÁNDEZ, D. (2016). Actividad antioxidante y toxicidad, en: *Investigación en plantas de importancia médica*, 1ª Ed. OmniaScience. Barcelona, España: 41-76.

LI, H. B., CHENG, K., WONG, C., FAN, K., CHEN, F., & JIANG, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771-776.

LI, H. B., & CHEN, F. (2001). Preparative isolation and purification of astaxanthin from the microalga *Chlorococum* sp. by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 925, 133–137.

MENNAH-GOVELA, Y. & BORNHORST, G. (2017). Fresh-Squeezed Orange Juice Properties Before and During In Vitro Digestion as Influenced by Orange Variety and Processing Method. *Journal Of Food Science*, 82(10), 2438-2447.

MINEKUS, M., ALMINGER, 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. J., MÉNARD, O., RECIO, I., SANTOS, C. N., SINGH, R. P., VEGARUD, G. E., WICKHAM, M. S. J., WEITSCHIES, W. & BRODKORB, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113-1124.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., TABERNERO, M., DÍAZ-RUBIO, M. E., SERRANO, J., GOÑI, I. & SAURA-CALIXTO, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285.

PARADA, J. & AGUILERA, J. (2007). Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal Of Food Science*, 72(2), 21-32.

PLAZA, M., HERRERO, M., CIFUENTES, A. & IBÁÑEZ, E. (2009). Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7159-7170.

PINAZO, A., ANDRÉS, A., HEREDIA, A. y MARTÍNEZ, R. (2015). *Evaluación in vitro de los cambios experimentados por las propiedades antioxidantes del fruto, hojas y fibra de caqui durante la digestión gastrointestinal*. Máster. Universidad Politècnica de València.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R., HÄKKINEN, S. T., AARNI, M., SUORTTI, T., LAMPI, A. M., EUROLA, M., PIIRONEN, V., NUUTILA, A & OKSMAN-CALDENTEY, K. M. (2003). Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(14), 1389-1402.

QUIÑONES, M., MIGUEL, M., y ALEIXANDRE, A. (2012). Los polifenoles, compuesto de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 2012;27(1), 76-89.

- RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J. & PAGANGA, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, 2, 152–159.
- RICH, G. T., BAILEY, A. L., FAULKS, R. M., PARKER, M. L., WICKHAM, M. S. J. & FILLERY-TRAVIS, A. (2003). Solubilization of carotenoids from carrot juice and spinach in lipid phases: I. Modeling the gastric lumen. *Lipids* 38, 933–945.
- RIVAS, E. (2014). *Desarrollo de un prototipo simulador del tracto gastrointestinal mediante reactores químicos automatizados*. Tesis Doctoral en Química Avanzada Universidad de Málaga. 231pp.
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M., ROJAS-GRAÜ, M., ELEZ-MARTÍNEZ, P. & MARTÍN-BELLOSO, O. (2013). Changes in Vitamin C, Phenolic, and Carotenoid Profiles Throughout in Vitro Gastrointestinal Digestion of a Blended Fruit Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1859-1867.
- SAURA-CALIXTO, F., SERRANO, J., & GOÑI, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- STINCO, C., FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, R., HEREDIA, F., MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A., & VICARIO, I. (2013). Bioaccessibility, antioxidant activity and colour of carotenoids in ultrafrozen orange juices: Influence of thawing conditions. *LWT - Food Science And Technology*, 53(2), 458-463.
- SPAGGIARI, M. (2014). Ottimizzazione del proceso di estrazione di composti bioattivi di Actinidia spp. Fragaria ananassa, Morus nigra e Humulus lupulus, per la formulazione di prodotti nutraceutici ad alta capacità antiossidante. *Trabajo Final de Carrera. Università degli Studi di Parma (Italia)*.
- TOH, J.J., KHOO, H.E., & AZRINA, A. (2013). Comparison of antioxidant properties of pomelo [Citrus Grandis (L) Osbeck] varieties. *International Food Research Journal*, 20, 1661–1668.
- VAN CAMPEN, D., & GLAHN, R. (1999). Micronutrient bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations. *Field Crops Research*, 60(1-2), 93-113.
- XU, G., LIU, D., CHEN, J., YE, X., MA, Y. & SHI, J., (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106, 545-551.