



**Efectos de la digestión gastrointestinal *in vitro* en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de dos matrices alimentarias de origen vegetal**

**Autor:** Agustín Tarruella

**Director:** Ing. Miguel José Morón Rivera

**Co-directora:** Lic. Mariana Dalponte

## **Agradecimientos**

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia, quienes me han apoyado y bancado en todo este proceso.*

*A mis tutores de tesis, agradezco profundamente su orientación, paciencia, dedicación, consejos y atención permanente. Gracias a todos los integrantes del laboratorio 3 de investigación por haberme echo sentir uno más de ustedes.*

*A mis amigos y uniamigos, gracias por estar siempre a mi lado, por compartir risas y momentos de desahogo, y por motivarme a seguir adelante cuando más lo necesite. Su amistad ha sido un pilar fundamental en este viaje.*

*Por último, quiero reconocer a mis profesores y a la universidad. Su enseñanza y compromiso con nuestra formación han dejado una marca indeleble en mi vida. Cada uno de ustedes ha contribuido a mi crecimiento personal y académico, y por ello, les estoy eternamente agradecido.*

## Resumen

Los polifenoles son metabolitos secundarios con propiedades bioactivas, entre ellas la actividad antioxidante. Su disponibilidad tras la digestión gastrointestinal es clave para su funcionalidad, ya que solo los fenoles liberados pueden ser potencialmente aprovechados. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la digestión gastrointestinal *in vitro* en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de dos matrices alimentarias de origen vegetal: polvo de orujo de uva (POU) y harina de amaranto (HA). El contenido total de polifenoles (CTP) varió significativamente ( $p < 0,05$ ) a lo largo del proceso, aumentando progresivamente (oral < gástrica < intestinal) en ambas muestras. En la etapa intestinal de POU se obtuvo una recuperación 2,5 veces superior a la reportada en orujo de uva blanca, mientras que para HA se identificó una posible sobreestimación del CTP, ya que los valores de esta fase resultaron ser 3,2 veces mayores a los obtenidos en el control. En cuanto a la bioaccesibilidad, POU presentó una recuperación comparable a la de arándanos frescos (15%), a diferencia de la HA, donde incrementó considerablemente (>300%), posiblemente debido a la interacción de otros componentes con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante (AA), mostró una fuerte correlación con el CTP en POU, en contraste con la HA cuya relación fue negativa, lo que sugiere la participación de otros compuestos en la AA. Estos hallazgos destacan la importancia de considerar la bioaccesibilidad de polifenoles de distintas matrices vegetales para comprender su potencial impacto en la salud y su aplicación en alimentos funcionales.

**Palabras claves:** Polvo de orujo de uva, harina de amaranto, alimentos funcionales.

## Abstract

Polyphenols are secondary metabolites with bioactive properties, including antioxidant activity. Their availability after gastrointestinal digestion is crucial for their functionality, as only released phenols can be potentially utilized. This study aimed to evaluate the effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity in two plant-based food matrices: grape pomace powder (POU) and amaranth flour (HA). The total polyphenol content (TPC) varied significantly ( $p < 0.05$ ) throughout the process, progressively increasing (oral < gastric < intestinal) in both samples. In the intestinal phase of POU, recovery was 2.5 times higher than previously reported for white grape pomace, whereas in HA, a possible overestimation of TPC was identified, as values in this phase were 3.2 times higher than those obtained in the control. Regarding bioaccessibility, POU exhibited a recovery comparable to that of fresh blueberries (15%), whereas in HA, it increased significantly (>300%), possibly due to the interaction of other components with the Folin-Ciocalteu reagent. Antioxidant activity (AA) showed a strong correlation with TPC in POU, in contrast to HA, where the relationship was negative, suggesting the involvement of other compounds in AA. These findings highlight the importance of considering the bioaccessibility of polyphenols from different plant matrices to understand their potential health impact and application in functional foods.

**Keywords:** Grape pomace powder, amaranth flour, functional foods.

## Índice general

Introducción .....	8
Objetivo general .....	10
Objetivos específicos.....	10
Hipótesis .....	10
Marco teórico .....	11
Antecedentes.....	12
Bases teóricas .....	14
Aspectos generales del orujo de uva.....	14
Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	17
Polifenoles: características principales y métodos de extracción.....	18
Determinación del contenido total de polifenoles a través del método de Folin-Ciocalteu	20
Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> a través del método ABTS <sup>•+</sup> .....	21
Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> a través del método DPPH• .....	22
Coeficiente de correlación de Pearson .....	22
Investigación experimental .....	25
Técnicas de recolección y procesamiento de datos.....	25
Material vegetal y extracción de compuestos fenólicos .....	25
Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> : .....	25
Cuantificación de polifenoles totales y cálculo de la tasa de recuperación .....	26
Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> : .....	26
ABTS <sup>•+</sup> :.....	26
DPPH• .....	27
Análisis estadístico.....	27
Resultados y discusión .....	28
Contenido total de polifenoles antes y durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	29

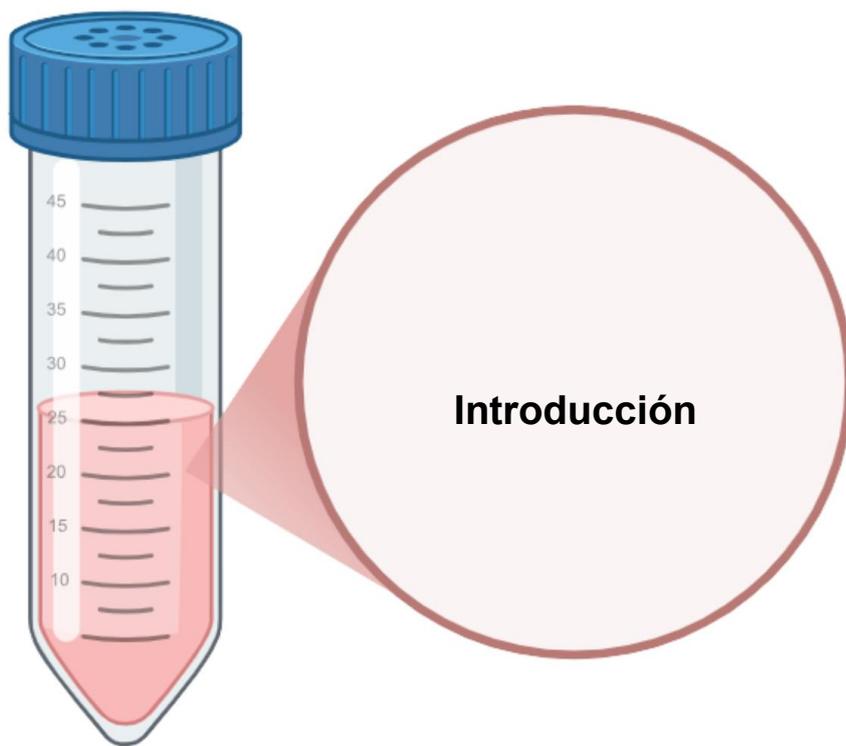
Tasa de recuperación y bioaccesibilidad.....	30
Actividad antioxidante antes y durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> y su correlación con el contenido total de polifenoles .....	31
Conclusiones .....	34
Recomendaciones .....	36
Referencias.....	38

## Índice de figuras

Figura 1. Distribución de los principales componentes del orujo de uva en relación a las diferentes fracciones de este subproducto (piel con resto de pulpa, semillas y raspones. ..	15
Figura 2. Características de las inflorescencias (panojas) de distintas especies/variedades de amarantos.....	16
Figura 3. Tasa de recuperación de compuestos fenólicos en las matrices vegetales durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	31

## Índice de tablas

Tabla 1. Enfoque convencional para interpretar el coeficiente de correlación de Pearson...	23
Tabla 2. Contenido total de polifenoles (g GAE/100 g PF) de las matrices vegetales antes y durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	30
Tabla 3. Actividad antioxidante del POU medida por ABTS•+ y DPPH• (mmol TE/100 g PF) y su correlación con el contenido total de polifenoles antes y durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> . ....	32
Tabla 4. Actividad antioxidante de la HA medida por ABTS•+ y DPPH• (mmol TE/100 g PF) y su correlación con el contenido total de polifenoles antes y durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> . ....	33



Los compuestos fenólicos son un grupo variado de metabolitos secundarios de las plantas, caracterizados por la presencia de al menos un anillo aromático (grupo fenol) unido a uno o más grupos hidroxilo (-OH) (Poti et al., 2019). Se encuentran de manera natural en las matrices alimentarias de origen vegetal, y su concentración varía según el tipo de alimento, en el cual pueden presentarse libres, esterificados (glicósidos) constituyendo la fracción soluble, y/o unidos a macromoléculas (carbohidratos y proteínas estructurales) formando parte de la fracción insoluble (Acosta-Estrada et al., 2014; Shahidi y Yeo, 2016). Estos fitoquímicos han sido objeto de amplia investigación en los últimos años debido a su potencial beneficio para la salud humana, con evidencia creciente de que su ingesta moderada puede tener efectos positivos (Fraga et al., 2019). Dentro de la amplia gama de funciones que se les atribuye, destaca su actividad antioxidante, actuando como captadores de radicales libres y quelantes de metales (Creus, 2004). La funcionalidad de los polifenoles depende en principio de la bioaccesibilidad del compuesto, la cual está determinada por el proceso de digestión y puede variar según la cantidad/fracción liberada o la estabilidad frente a diversos factores bioquímicos/fisicoquímicos como enzimas, sales biliares, pH, fuerza iónica y/o temperatura (Seczyk et al., 2021). Es imprescindible considerar que solo los fenoles liberados y asimilados son potencialmente biodisponibles (Gunathilake et al., 2018). Los métodos utilizados para predecir el comportamiento gastrointestinal y evaluar la bioaccesibilidad de los componentes de un ingrediente o producto final pueden ser *in vitro* (digestión simulada), *in situ* (perfusión intestinal animal), *ex vivo* (evaluación en laboratorio de órganos gastrointestinales) e *in vivo* (animales y humanos). A partir de los conocimientos de fisiología humana sobre el funcionamiento del aparato digestivo, los procedimientos de digestión *in vitro* han sido descritos como un enfoque útil, ya que permiten un mayor control de las variables experimentales y tienen la ventaja de ser rápidos, de bajo costo, seguros y sin las restricciones éticas que se aplican a los modelos *in vivo* (Alegría et al., 2015; Brodkorb et al., 2019).

Actualmente, la demanda creciente de alimentos potencialmente funcionales ha impulsado el desarrollo de productos destinados a la prevención y coterapia de trastornos relacionados

con el estrés oxidativo (Pinto et al., 2023a; Pinto et al., 2023b). En este contexto, el uso de ingredientes obtenidos a partir de materias primas no convencionales, como subproductos y pseudocereales, emerge como una estrategia innovadora, ya que estas fuentes alternativas no solo contienen una amplia variedad de nutrientes y compuestos bioactivos, sino que también representan una forma sostenible de aprovechar recursos subutilizados. Algunas investigaciones ya han destacado el valor nutricional del orujo de uva y el amaranto como ingredientes para el desarrollo de alimentos saludables (Malgor et al., 2020; Iuga y Mironeasa, 2020; Manassero et al., 2020; Troilo et al., 2022; Olt et al., 2023). Sin embargo, sólo unos pocos estudios han proporcionado una evaluación integral del proceso digestivo en la bioaccesibilidad y bioactividad de compuestos fenólicos, información que es relevante para poder atribuir el efecto beneficioso de un producto a determinado ingrediente o a la sinergia entre varias materias primas utilizadas en la formulación.

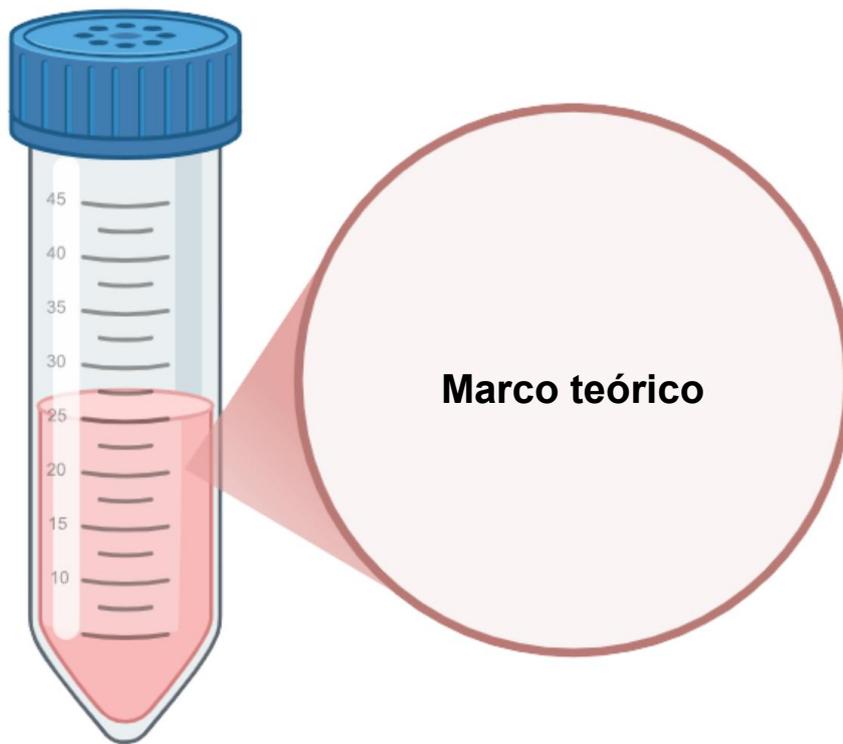
**Objetivo general:** Evaluar los efectos de la digestión gastrointestinal *in vitro* en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de dos matrices alimentarias de origen vegetal.

#### **Objetivos específicos**

- Efectuar la digestión gastrointestinal *in vitro* de las matrices alimentarias.
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos de las matrices alimentarias y de los digeridos obtenidos.
- Describir la actividad antioxidante *in vitro* de las matrices alimentarias antes y durante la digestión gastrointestinal simulada.

#### **Hipótesis**

La digestión gastrointestinal *in vitro* aumenta la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de las matrices evaluadas, lo cual respalda la promoción de estos productos como ingredientes potencialmente funcionales.



## Antecedentes

Según Del Pino García et al. (2016), en su trabajo titulado "Capacidad antioxidante total de nuevos condimentos naturales en polvo después de la digestión gastrointestinal y colónica", en donde se evaluó el impacto de la digestión en las capacidades reductoras y antirradicalarias de matrices obtenidas a partir de orujo de vino tinto y sus fracciones. Los autores indicaron que la digestión gastrointestinal enzimática incrementó la actividad antioxidante determinada a través del método ABTS<sup>••</sup>. En particular, consideraron factores de bioaccesibilidad para proporcionar una visión más precisa sobre el potencial de estos condimentos y sus posibles beneficios en la prevención del daño oxidativo a lo largo del tracto gastrointestinal. Concluyendo que la digestión y la fermentación colónica provocan un marcado incremento en la capacidad de eliminación de radicales libres, principalmente debido a la contribución de los compuestos solubilizados durante la fermentación colónica.

Por su parte Jara Palacios et al. (2018), desarrollaron un estudio titulado "Efectos de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de diferentes extractos de subproductos de la vinificación blanca". Mediante UHPLC, identificaron catorce compuestos fenólicos individuales, y la actividad antioxidante se determinó a través de los ensayos DPPH<sup>•</sup> y ORAC. Los resultados mostraron variaciones en el perfil fenólico y en la capacidad antioxidante según la fase de digestión, el tipo de subproducto y el método de evaluación utilizado. En términos generales, la digestión redujo el contenido fenólico total y la actividad antioxidante. Los hallazgos sugirieron que los extractos de subproductos de de vino blanco son una fuente bioaccesible de compuestos antioxidantes con potencial para ser utilizados como ingredientes en alimentos funcionales.

Caponio et al. (2022), en su investigación titulada "Efectos de los polifenoles del orujo de uva y de la digestión gastrointestinal *in vitro* en la actividad antimicrobiana: Recuperación de compuestos bioactivos", realizaron una caracterización detallada de la composición fenólica y evaluaron la actividad antioxidante de extractos de orujo de uva sometidos a una simulación *in vitro* del proceso digestivo. Los compuestos fenólicos fueron extraídos del orujo de uva mediante dos disolventes: agua (extracción acuosa) y etanol-agua (extracción

hidroalcohólica). La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante los ensayos ABTS<sup>+</sup> y DPPH•. Los hallazgos mostraron que los extractos hidroalcohólicos tienen mayor actividad antioxidante que los extractos acuosos, esto se debe a las mayores concentraciones de antocianinas, ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos. En cuanto al proceso de simulación *in vitro*, la actividad antioxidante de los extractos acuosos aumentó después de la digestión intestinal, mientras que la relativa a los extractos hidroalcohólicos disminuyó drásticamente.

En su trabajo titulado “Evaluación de harina de amaranto como ingrediente antioxidante para la preparación de matrices alimentarias funcionales”, Rodríguez (2022) analizó la harina de amaranto en productos bebibles y panificados, estableciendo su capacidad antioxidante antes y después de la simulación de la digestión gastrointestinal. Para el análisis de compuestos fenólicos, utilizó diversos protocolos de extracción, determinando el contenido total de polifenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu y la composición de los extractos a través de RP-HPLC/espectros UV. Además, realizaron ensayos *in vitro*, como el ABTS<sup>+</sup>, para caracterizar la bioactividad de los compuestos fenólicos y péptidos, evaluando su efecto sobre el equilibrio redox intestinal. Los resultados revelaron que la harina de amaranto es una fuente de polifenoles y péptidos con posibles beneficios para la salud intestinal, lo que sugiere que los productos desarrollados podrían considerarse alimentos funcionales antioxidantes.

Vollmannová et al. (2013) llevaron a cabo un estudio titulado “Influencia de las variedades en el contenido total de polifenoles y rutina y en la capacidad antioxidante total de las semillas de trigo sarraceno, amaranto y quinua”, cuyo objetivo fue comparar el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante en diferentes cultivares de estos pseudocereales, para determinar cómo el mismo influye en los parámetros evaluados. El contenido total de polifenoles se determinó mediante un método espectrofotométrico utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, mientras que la capacidad antioxidante total se evaluó mediante el ensayo DPPH•. Los resultados indicaron una influencia estadísticamente significativa del cultivar en ambos parámetros, siendo el trigo sarraceno el que presentó los valores más altos, seguido de amaranto y quinua.

## **Bases teóricas**

### **Aspectos generales del orujo de uva**

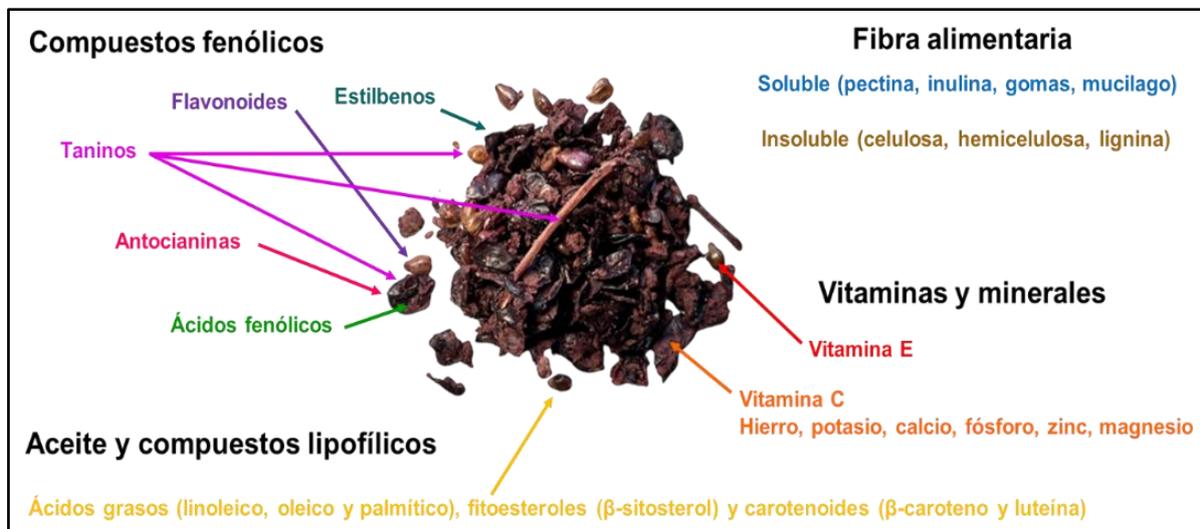
El orujo de uva es el principal subproducto del proceso de vinificación, formado por semillas, hollejos, raspones y restos de pulpa. Resulta del prensado de la uva en el caso de la elaboración del vino blanco o tras la etapa de fermentación en el vino tinto. Su valorización está fuertemente relacionada a su uso como fuente potencial para la obtención de compuestos bioactivos, los cuales brindan múltiples beneficios a la salud humana. Durante el proceso de elaboración del vino se generan diversas y grandes cantidades de residuos, dentro de ellos el orujo representa hasta un 30% del peso total de las uvas producidas en los viñedos (Moro et al., 2021). Se estima que por cada 6 litros de vino elaborado se obtiene 1 kilogramo de orujo de uva (Spinei y Oroian, 2021).

La composición química de este subproducto es compleja, la cual no solo está influenciada por la variedad de la uva, los factores ambientales, las prácticas vitivinícolas y el proceso de vinificación (Bordiga et al., 2019), sino también por la proporción de piel con restos de pulpa, semillas y raspones presentes. Actualmente dicha matriz se considera fuente de compuestos fenólicos y nutrientes como fibra alimentaria, ácidos grasos, fitoesteroles, carotenoides, vitaminas y minerales (Figura 1).

Con respecto al orujo de uva como fuente de polifenoles, se estima que alrededor de un 70% de los compuestos fenólicos presentes en la uva permanecen en el subproducto después del proceso de elaboración del vino (Moro et al., 2021). También se han registrado grandes diferencias en cuanto a la cantidad y calidad de estas moléculas, ya que aproximadamente el 60-70% se encuentra en las semillas, el 30-35% en el hollejo y una pequeña fracción en la pulpa (Castellanos-Gallo et al., 2022). Se estima que el contenido de polifenoles totales se encuentra entre el 4,8 y 5,4% en la materia seca (Yu y Ahmedna, 2013), siendo mayor en uvas tintas que en uvas blancas. Estos fitoquímicos son los responsables del amargor, color y sabor de algunas frutas y verduras (Alara et al., 2021). Aunque no son considerados nutrientes, su ingesta por medio del consumo de vegetales se relaciona altamente con beneficios a la salud, como efectos antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos,

antitrombóticos, anticancerígenos, cardioprotectores y sobre todo antioxidantes (Albuquerque et al., 2021).

**Figura 1.** Distribución de los principales componentes del orujo de uva en relación a las diferentes fracciones de este subproducto (piel con resto de pulpa, semillas y raspones).

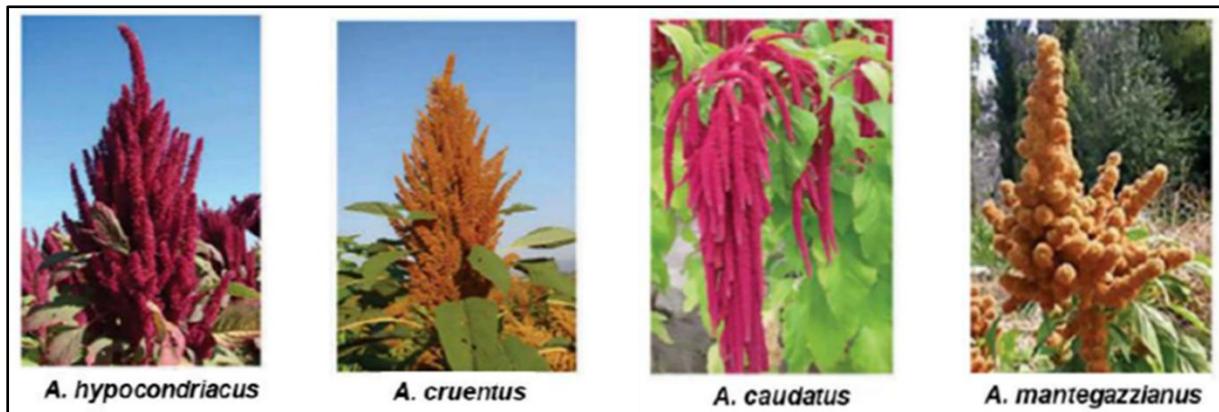


Fuente: Morón et al. (2024).

### Consideraciones fundamentales sobre el amaranto

Los amarantos son plantas monoicas, dioicas o polígamas con grandes inflorescencias muy vistosas llamadas panojas, pudiendo ser terminales o axilares, erectas o decumbentes. Las inflorescencias son de tamaños variables y colores diversos desde el verde al morado, presentándose también tonalidades intermedias como amarillo, naranja, café, rojo, rosado, hasta el púrpura (Figura 2), la cual dependerá de la especie/variedad (Roa-Acosta et al., 2017). Este pseudocereal pertenece a la familia Amaranthaceae y al género *Amaranthus*, y se caracteriza por su gran capacidad de adaptación a regiones andinas y costeras, debido a su resistencia a cambios bruscos de temperatura. Existen cerca de 70 especies, de las cuales 40 se encuentran en el continente americano (Luis et al., 2018). El área potencial de cultivo en Argentina incluye las provincias de Jujuy, Santiago del Estero, Córdoba, el este de La Pampa y el oeste de Buenos Aires. Además, se han impulsado proyectos para fomentar su producción en el norte de la Patagonia, bajo condiciones de riego (Ministerio de Agroindustria, 2016).

**Figura 2.** Características de las inflorescencias (panojas) de distintas especies/variedades de amarantos.



Fuente: Adaptado de Rodríguez (2022).

Desde una perspectiva química y nutricional, el amaranto se distingue por su alto contenido de proteína cruda, grasas y cenizas, superando a los cereales tradicionales. Su perfil de aminoácidos azufrados (2,6–5,5%) y lisina (3,2–6,4%) se acerca al óptimo recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) (Silva Sánchez, 2007; Luis et al., 2018). Además, aporta compuestos fenólicos en cantidades variables, cuya concentración y calidad están influenciadas por factores como la variedad genética, las condiciones edafoclimáticas, el grado de maduración y el entorno ambiental (Venskutonis y Kraujalis, 2013).

El procesamiento de alimentos puede alterar significativamente la composición química y la cantidad de compuestos bioactivos, afectando sus propiedades funcionales. En el caso del amaranto, aunque los estudios sobre el impacto del procesamiento en su contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante son aún limitados, la evidencia disponible sugiere que, dependiendo del método empleado, pueden producirse variaciones en la concentración de compuestos fenólicos totales y en la actividad antioxidante del producto final (Coelho et al., 2018). Además de las transformaciones provocadas por el procesamiento, la variabilidad en los resultados reportados en la literatura también se debe a las diferencias en las técnicas de extracción y cuantificación analítica.

## **Digestión gastrointestinal *in vitro***

La digestión gastrointestinal *in vitro*, es un ensayo de simulación en donde se pretende imitar las condiciones fisiológicas y los distintos eventos que van ocurriendo en el tracto gastrointestinal. Dicho método puede ser estático o dinámico, y en comparación con los ensayos *in vivo* resulta ser más ventajoso, ya que es rápido, económico y no presenta restricciones éticas. Con el modelo estático se han estudiado desde hace décadas temas relacionados con la nutrición, la toxicología o la microbiología, como, por ejemplo: el porcentaje de almidón digerido (Zhang et al., 1996), la disponibilidad del hierro en cereales de arroz (Kitabatake et al., 1998) la bioaccesibilidad de aminas heterocíclicas (Glahn et al., 1999) o la supervivencia de *Escherichia coli* en salchichas (Kulp et al., 2003). Este tipo de ensayo es ideal para estudios mecanicistas y de construcción de hipótesis (Minekus et al., 2014). En condiciones ideales ofrece la posibilidad de un muestreo rápido y representativo en cualquier momento y una evaluación completa de la matriz alimentaria (Wickham et al., 2009). Sin embargo, también presenta una serie de desventajas. No se puede evaluar la captación o absorción, ni la cinética de transporte, ni medir la competencia de nutrientes o compuestos bioactivos en el sitio de absorción, como si es posible en ensayos *in vivo*. En este modelo de simulación *in vitro* no se puede imitar la compleja barrera de la mucosa con todos sus procesos de regulación, sobre todo el hormonal y el nervioso, los mecanismos de retroalimentación, la actividad celular, la afectación del sistema inmunológico local, los efectos en la microbiota intestinal y el metabolismo hepático. Además, en él, no se consideran otros factores que influyen en la biodisponibilidad de compuestos, como el estado nutricional, la edad, el genotipo y el estado fisiológico como puede ser un embarazo (Etcheverry et al., 2012).

En el método estático se simulan parámetros digestivos como el pH, tipo y concentración de enzimas, tipo y concentración de sales, también otros componentes como la bilis, moco, etc, y no se replican procesos físicos como cizallamiento, mezcla, hidratación y peristaltismo (Dupont et al., 2018). Este ensayo puede llevarse a cabo a distinta escala, desde pequeños tubos hasta biorreactores de diversas capacidades, siempre controlando la temperatura y

agitación en cada fase. La simulación gastrointestinal *in vitro* estática se realiza para estudiar digestiones de alimentos simples y componentes de alimentos aislados o purificados. Estos estudios además de contribuir a mejorar la calidad e inocuidad del producto, también aportan datos que producen evidencia referida a posibles declaraciones nutricionales y saludables, ya que se debe demostrar que la matriz es digerida y disponible para poder ser utilizada por el organismo (Fernández-García et al., 2009).

Con el correr de los años se han aplicado varios protocolos diferentes de digestión gastrointestinal simulada estática, los cuales incluyen dos o tres etapas, oral-gástrica u oral-gástrica-intestinal, y arrojan una enorme diversidad de resultados difíciles de comparar. La acción de la red internacional sobre digestión de los alimentos (INFOGEST) para homogeneizar los resultados propuso un protocolo de consenso basado en condiciones fisiológicas que incluyen fase oral, gástrica e intestinal que contiene soluciones completas de electrolitos, enzimas específicas y sales biliares en la fase intestinal, el cual considera la digestión de todos los componentes de los alimentos y se puede aplicar a diversas matrices (Brodkorb et al., 2019).

### **Polifenoles: características principales y métodos de extracción**

Los compuestos fenólicos son un grupo muy heterogéneo de fitoquímicos que resultan del metabolismo secundario de las plantas. La mayoría son pigmentos que le dan el color a flores y frutos, teniendo un rol fundamental en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o animales que van a usar los frutos como fuente de alimentos. Otros tienen la función de protección frente a predadores, alejándose, dándole sabores amargos a la planta, haciendo que sean venenosas o indigestas (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

Como estructura general los polifenoles poseen al menos, un anillo benceno y como mínimo un grupo hidroxilo unido a él. Estos se pueden clasificar en diferentes grupos según el número de anillos de fenol en la molécula o los grupos de sustitución de los anillos de fenol. Los polifenoles se dividen principalmente en dos familias: flavonoides y no flavonoides. Entre los no flavonoides más comunes presentes en la dieta se encuentran los ácidos fenólicos (hidroxibenzoico e hidroxicinámico), sus derivados conjugados y los estilbenos. Por su parte,

los compuestos fenólicos que pertenecen a la familia de los flavonoides poseen un grupo flavanico característico de ellos (C6-C3-C6), son los principales y más abundantes dentro del reino vegetal. Esta familia se subdivide según el número de oxidación del anillo pirano central en: flavonoles, flavonas, flavonoides, flavonoles (catequinas), antocianinas, isoflavonoides y chalconas (Zhao et al., 2015).

Los polifenoles pueden encontrarse como moléculas libres (agliconas), conjugados usualmente con azúcares (glicósidos) o unidos a polímeros como proteínas mediante enlaces covalentes o no covalentes (Vacek et al., 2010). Esta diversidad de estructuras hace que durante el pasaje por el tracto gastrointestinal los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción se dificulten (Quirós-Sauceda., 2014).

Entre los principales factores que influyen negativamente en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de polifenoles se encuentran la interacción con componentes de la matriz, como por ejemplo la fibra dietética y proteínas (Quirós-Sauceda et al., 2014; Jakobek et al., 2015). Muchos estudios han demostrado que las interacciones con la fibra limitan la absorción de los compuestos fenólicos en el intestino delgado siendo arrastrados hasta el colon, en donde pueden ser metabolizados y contribuir no solo a la salud intestinal sino también a la sistémica (Valderrain-Rodríguez et al., 2014). Por su parte, las interacciones entre proteínas y polifenoles pueden influir tanto positiva como negativamente en la bioaccesibilidad de ambos compuestos. Dichas interacciones afectan principalmente la digestibilidad y el valor nutricional de las proteínas al modificar la estructura de los aminoácidos esenciales. No obstante, también se han identificado efectos beneficiosos asociados a las propiedades funcionales (Zhang et al., 2024).

Es importante destacar que solo una parte de los compuestos fenólicos ingeridos terminan siendo biodisponibles después de la administración oral, ya sea, por un tiempo de residencia insuficiente bajo condiciones gástricas; baja solubilidad y/o permeabilidad en intestino; baja estabilidad durante el proceso de procesamiento de alimentos (como exposición a la temperatura, oxígeno y luz); cambios que se dan durante la digestión (por pH y enzimas);

interacción con otros componentes alimentarios e inestabilidad química (Pérez Gregorio et al., 2020).

Las técnicas de extracción empleadas para la recuperación de compuestos fenólicos en materiales vegetales se dividen en métodos convencionales y no convencionales. Los métodos de extracción convencionales se caracterizan principalmente por el uso de grandes volúmenes de disolventes de extracción y procedimientos manuales que dependen en gran medida del investigador y requieren mucha mano de obra; por lo tanto, estas técnicas no son del todo consistentes (Alara et al., 2018). Entre los métodos más utilizados en esta categoría se encuentran la extracción sólido-líquido o la extracción líquido-líquido, ambas implican el uso de un disolvente orgánico con una proporción determinada de material de partida. Entre los disolventes más utilizados para la extracción de polifenoles se encuentran metanol, agua, cloroformo, n-hexano, etanol, propanol, acetato de etilo y acetona (Zhang, 2018). Estos disolventes varían en su polaridad, lo que influye en su capacidad de extracción de fitoquímicos. Dado que los disolventes orgánicos pueden mezclarse fácilmente, se consideran una opción viable cuando el objetivo es mejorar el rendimiento de extracción.

Los polifenoles se extraen principalmente con disolventes orgánicos y sus formulaciones acuosas; sin embargo, aún existe incertidumbre sobre cuál es el disolvente más adecuado. Según Metrouh-Amir et al (2015) los solventes acuosos y orgánicos logran una mejor eficiencia de extracción en comparación con los disolventes orgánicos puros.

#### **Determinación del contenido total de polifenoles a través del método de Folin-Ciocalteu**

El ensayo de Folin-Ciocalteu fue inicialmente desarrollado para la cuantificación de tirosina en proteínas (Singleton y Rossi, 1965), sin embargo, con el tiempo se modificó para analizar compuestos polifenólicos en diversos extractos vegetales. El reactivo principal del ensayo es una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo, comúnmente denominado "reactivo de FC". A partir de esta mezcla, se generan iones de molibdato y tungsteno, de los cuales se ha determinado que los iones de molibdato están presentes en mayor cantidad y funcionan mejor como agentes reductores.

La reacción ocurre en condiciones básicas (pH 10) para favorecer la formación de un ion fenolato, el cual reduce al reactivo de FC mediante una reacción de óxido-reducción. Como resultado, se genera un complejo de Mo(V) de color azul, cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 765 nm (Margraf et al., 2015).

Los extractos de productos vegetales, ya sean acuosos u orgánicos, contienen una gran variedad de biomoléculas. Se ha estudiado que algunas de estas moléculas no polifenólicas pueden interactuar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, lo que puede generar una sobreestimación en la cuantificación de compuestos fenólicos. Entre los principales compuestos que pueden interferir se encuentran los azúcares reductores, como la fructosa y la glucosa, así como aminoácidos (lisina y triptófano) y ácido ascórbico (Shanmugavelan et al., 2013; Granato et al., 2016).

Las interferencias pueden clasificarse en tres tipos: inhibitorias (reducen la respuesta del reactivo, subestimando el contenido de polifenoles), aditivas (provocan una respuesta del reactivo similar a la de los polifenoles, dando lugar a una sobreestimación del contenido) y potenciadoras o aumentativas (incrementan la señal del reactivo más allá de la contribución real de los polifenoles, generando una sobreestimación de su concentración).

#### **Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* a través del método ABTS<sup>•+</sup>**

El ensayo ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) es un método ampliamente utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de diferentes compuestos y matrices alimentarias. Fue desarrollado originalmente por Miller et al. (1993) y se basa en la generación del catión radical ABTS<sup>•+</sup>, que presenta una intensa coloración azul-verde y máxima absorbancia a 734 nm (Re et al., 1999). El catión radical ABTS<sup>•+</sup> se forma mediante la oxidación del ABTS<sup>•+</sup> con agentes oxidantes como persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) o radicales generados enzimáticamente. La presencia de antioxidantes en la muestra reduce este radical, provocando una disminución de la absorbancia, lo que se traduce en una mayor capacidad antioxidante del compuesto analizado (Huang et al., 2005).

Este método es ampliamente utilizado debido a su versatilidad, ya que permite la medición de compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos (Floegel et al., 2011). No obstante, algunos

estudios han señalado que la reactividad del ABTS\*\* puede variar en función de las condiciones experimentales, como el pH y la temperatura, lo que puede influir en los resultados obtenidos (Shalaby y Shanab, 2013).

#### **Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* a través del método DPPH•**

El ensayo DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es uno de los métodos más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos bioactivos. Su popularidad se debe a su simplicidad, rapidez y alta reproducibilidad en la determinación de la actividad antioxidante de extractos vegetales, alimentos y compuestos puros. El principio del método se basa en la reducción del radical libre DPPH•, que en su estado oxidado presenta una intensa coloración violeta con un máximo de absorbancia a 517 nm. Al reaccionar con antioxidantes, el DPPH• se reduce a DPPH-H, lo que provoca una disminución de la absorbancia y un cambio de color de violeta a amarillo pálido. La magnitud de esta disminución es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra evaluada (Sharma y Bhat, 2009).

Este método tiene la ventaja de ser simple y no requerir condiciones extremas de pH o temperatura. Sin embargo, presenta algunas limitaciones, como su selectividad hacia antioxidantes hidrofóbicos, lo que puede afectar la evaluación de sistemas complejos que contienen tanto compuestos hidrofílicos como lipofílicos (Huang et al., 2005).

#### **Coefficiente de correlación de Pearson**

Según Schober et al. (2018), la correlación, en el sentido más amplio, es una medida de la asociación entre variables. En datos correlacionados, el cambio en la magnitud de una variable está asociado con un cambio en la magnitud de otra variable, ya sea en la misma dirección (correlación positiva) o en la dirección opuesta (correlación negativa). Con mayor frecuencia, el término correlación se utiliza en el contexto de una relación lineal entre dos variables continuas y se expresa mediante la correlación producto-momento de Pearson. El coeficiente de correlación de Pearson se usa típicamente para datos que siguen una distribución normal bivariada (es decir, datos distribuidos normalmente en conjunto).

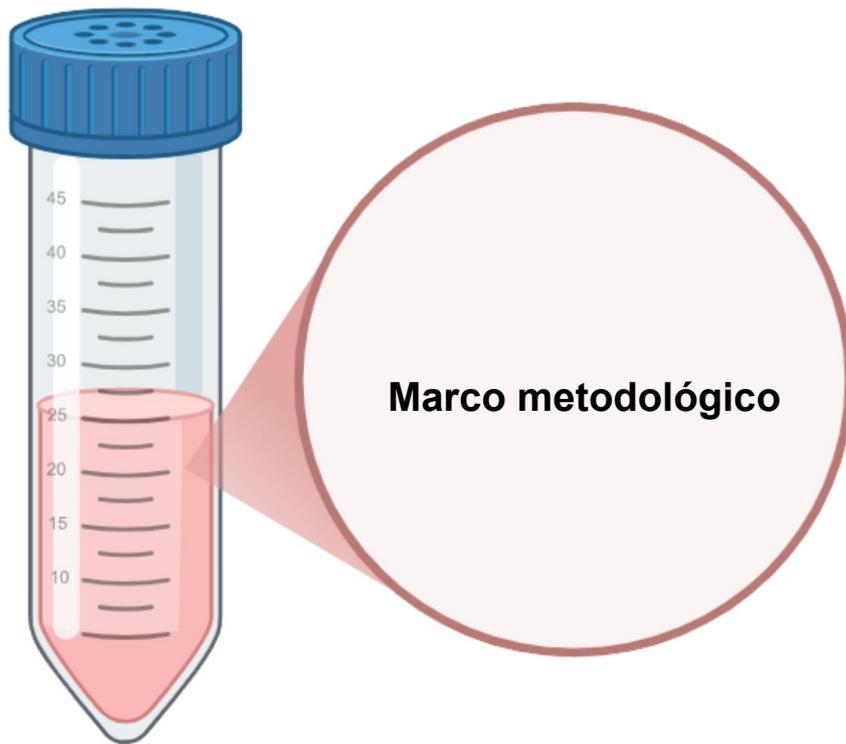
Dicho coeficiente de correlación está escalado en un rango de -1 a +1, donde 0 indica que no hay asociación lineal o monótona. Se han propuesto varios enfoques para traducir el

coeficiente de correlación en descriptores como “débil,” “moderado” o “fuerte” (Tabla 1). Sin embargo, estos puntos de corte son arbitrarios e inconsistentes y deben usarse con cautela.

**Tabla 1.** Enfoque convencional para interpretar el coeficiente de correlación de Pearson.

<b>Magnitud absoluta del coeficiente de correlación observado</b>	<b>Interpretación</b>
0,00-0,10	Correlación insignificante
0,10-0,39	Correlación débil
0,40-0,69	Correlación moderada
0,70-0,89	Correlación fuerte
0,90-1,00	Correlación muy fuerte

*Nota.* Información adaptada de Schober et al. (2018).



Conforme a la situación planteada, el trabajo se ubicó dentro del siguiente tipo de investigación:

**Investigación experimental:** Según Arias (2016), se trata de un proceso en el que un objeto o grupo de individuos es expuesto a determinadas condiciones, estímulos o tratamientos (variable independiente) con el fin de analizar los efectos o reacciones que se generan (variable dependiente). Este tipo de investigación es netamente explicativa, ya que busca entender el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto a través de la prueba de hipótesis. Los resultados y conclusiones obtenidos, representan el nivel más profundo del conocimiento.

### **Técnicas de recolección y procesamiento de datos**

**Material vegetal y extracción de compuestos fenólicos:** Se emplearon dos matrices alimentarias: Polvo de orujo de uva (*Vitis vinífera* L.) variedad Pinot Noir y harina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) variedad Antorcha, las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de Tecnología de Alimentos y Biotecnología de la Universidad Nacional de Río Negro (Río Negro, Argentina) y denominadas como POU y HA, respectivamente. La extracción de compuestos fenólicos se realizó aplicando una relación 1:10 p/v (etanol al 70%). Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min en agitación, se centrifugaron a 10000 g durante 10 min y por último se extrajo el solvente del sobrenadante con rotavapor a 75°C. El extracto obtenido sirvió de control y se conservó a -80°C hasta su análisis posterior.

**Digestión gastrointestinal *in vitro*:** La digestión gastrointestinal simulada se efectuó según la metodología descrita por Brodkorb et al. (2019), con ligeras modificaciones. La fase oral se llevó a cabo a partir de una solución 10% p/v de las matrices vegetales con agua destilada. A continuación, se añadió fluido salival simulado en una proporción de 1:1 (v/v), el cual contenía amilasa salival (75 U/mL) a pH 7, posteriormente, las muestras se incubaron a 37°C durante 2 minutos con agitación. La fase gástrica se realizó agregando fluido gástrico simulado en una proporción de 1:1 (v/v) que contenía pepsina (2000 U/mL) a pH 3, seguidamente se incubó a 37°C durante 2 horas con agitación. La fase intestinal se efectuó agregando fluido intestinal simulado en una proporción de 1:1 (v/v) que contenía pancreatina

(100 U/mL) y bilis (10 mM) a pH 7, seguido de una incubación a 37°C durante 2 horas con agitación. Al final de cada fase de digestión, se detuvo la hidrólisis enzimática aplicando un baño de agua fría durante 15 min. Los digeridos se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante y este se conservó a -80°C hasta su análisis posterior.

**Cuantificación de polifenoles totales y cálculo de la tasa de recuperación:** El contenido total de polifenoles (CTP) se evaluó mediante la metodología colorimétrica propuesta por Singleton y Rossi (1965), en donde se añadieron 50 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu a los sobrenadantes obtenidos, mezclando con 2,3 mL de agua destilada y dejando reaccionar por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 100 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% en NaOH 0,1 N en cada muestra y se incubaron en oscuridad por 90 minutos. La absorbancia se midió a 765 nm usando un espectrofotómetro UV/visible. Los resultados se expresaron en g equivalentes de ácido gálico (GAE) por cada 100 g de peso fresco (g GAE/100 g PF).

La tasa de recuperación de compuestos fenólicos se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Recuperación (\%)} = (\text{CTP}_{\text{MD}}/\text{CTP}_{\text{MA}}) \times 100$$

Donde, CTP<sub>MD</sub> se refiere al contenido total de polifenoles de la muestra digerida en cada fase y CTP<sub>MA</sub> se refiere al contenido total de polifenoles de la matriz alimentaria (control). El índice de recuperación en la fase intestinal corresponde al porcentaje de bioaccesibilidad (Pinto et al., 2023c).

**Determinación de la actividad antioxidante in vitro:** La actividad antioxidante (AA) de los sobrenadantes obtenidos se determinó mediante los siguientes métodos colorimétricos:

**ABTS•+:** La capacidad de eliminación del radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) se realizó según lo descrito por Re et al. (1999). La solución de ABTS•+ se diluyó con etanol al 20% hasta alcanzar una absorbancia de 0,700 ± 0,005 a 734 nm. El Trolox se utilizó como estándar en concentraciones de 0-1 mM, y las muestras se incubaron durante 6 minutos a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron como mmol equivalentes de Trolox por cada 100 g de peso fresco (mmol TE/100 g PF).

**DPPH•:** La capacidad de eliminación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo se realizó siguiendo el método descrito por Mensor et al. (2001), con ligeras modificaciones. Específicamente, se mezclaron 32  $\mu$ L del extracto diluido 1/50 con 1 mL de DPPH• disuelto en metanol, y la mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro a 517 nm. Los resultados se expresaron como mmol equivalentes de Trolox por cada 100 g de peso fresco (mmol TE/100 g PF).

**Análisis estadístico:** Las determinaciones se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar diferencias significativas, considerando la prueba de Tukey y empleando un intervalo de confianza del 95%. Los valores obtenidos se analizaron a través del software InfoStat®. Se utilizó el Coeficiente de Correlación de Pearson para evaluar el comportamiento entre el CTP y la AA. Para el análisis de correlación, se empleó como referencia los rangos establecidos por Schober et al. (2018).



### **Contenido total de polifenoles antes y durante la digestión gastrointestinal *in vitro***

El contenido total de polifenoles (CTP) de las matrices vegetales evaluadas y sus respectivos digeridos se presentan en la Tabla 2. En el caso del POU el CTP fue mayor antes de la digestión gastrointestinal *in vitro* (control) en comparación con el contenido total de polifenoles durante el modelo de simulación, esto podría atribuirse al uso de etanol acuoso en la extracción, lo que permite liberar fitoquímicos de manera eficiente en comparación con otros disolventes (Alara et al., 2021). La evolución del CTP a lo largo de las fases del proceso mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), aumentando gradualmente en el siguiente orden: fase oral < fase gástrica < fase intestinal, dicho incremento podría deberse no solo al tiempo de simulación de cada etapa, a la acción de las enzimas digestivas y a los cambios del pH, sino también a la solubilidad de los compuestos fenólicos en el medio, los cuales presentan una mayor solubilidad en el medio de digestión intestinal y una menor en el medio oral (Sęczyk et al., 2021; Pinto et al., 2023c). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en investigaciones recientes, donde se ha demostrado un aumento del CTP durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de diversas frutas, con una mejor recuperación de compuestos fenólicos después de la fase intestinal (Corona-Leo et al., 2021; Durán-Catañeda et al., 2023; Muñoz-Fariña., 2023). Adicionalmente, el valor registrado en la fase intestinal fue 2,5 veces superior al informado para orujo de uva blanca (Jara-Palacios et al., 2018), diferencia que podría estar relacionada con el tipo de uva, ya que el contenido de polifenoles en las variedades de uvas blancas es menor que en las tintas (Franco-Bañuelos et al., 2017). En cuanto a la HA, el CTP antes de la digestión gastrointestinal *in vitro* (control) presentó valores superiores a lo reportado por Vollmannová et al. (2013) en diferentes cultivares de amaranto (0,123-0,287 g GAE/100 g PF), los cuales utilizaron 80% metanol/agua a 25°C para la recuperación de estos fitoquímicos. Durante el modelo de simulación, el contenido total de polifenoles aumentó gradualmente, mostrando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en cada fase. Estos resultados sugieren una mayor liberación de polifenoles en todo el proceso, sin embargo, no puede descartarse una posible sobreestimación del CTP debido a la solubilización de otras sustancias que están presentes en concentraciones considerables en

los digeridos de amaranto, y que pueden reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, como, por ejemplo: monosacáridos, aminoácidos y péptidos (Rodríguez, 2022). Dicha sobreestimación se evidencia al analizar los valores del control, que resultaron ser 3,2 veces menores que los obtenidos en la fase intestinal.

**Tabla 2.** Contenido total de polifenoles (g GAE/100 g PF) de las matrices vegetales antes y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Muestra	Control	Fase oral	Fase gástrica	Fase intestinal
POU	19,42 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,02 <sup>d</sup>	1,08 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,95 ± 0,20 <sup>b</sup>
HA	0,42 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,35 ± 0,03 <sup>a</sup>

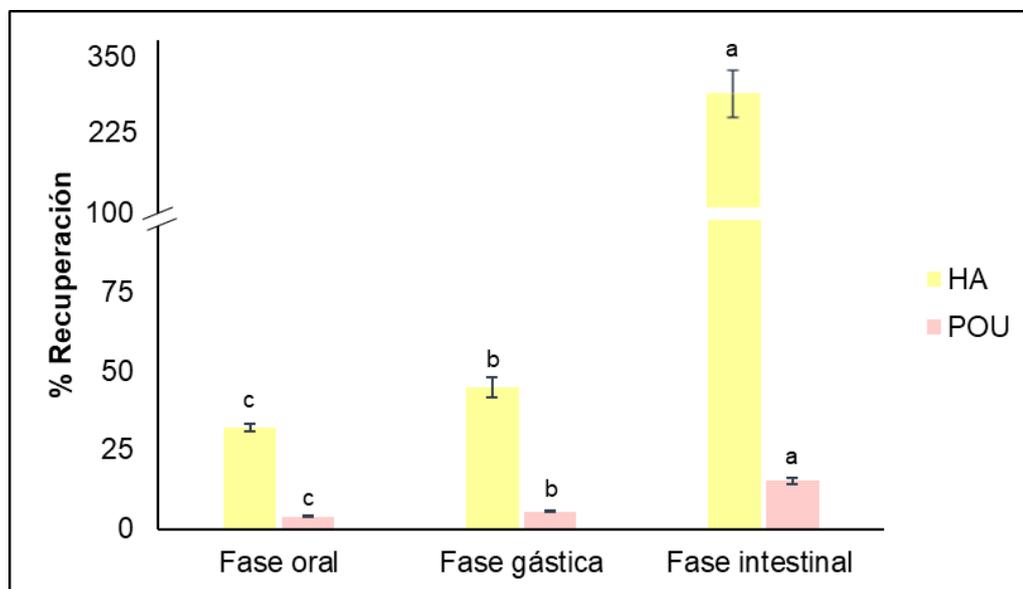
Los valores son la media ± desviación estándar. Medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### Tasa de recuperación y bioaccesibilidad

La recuperación de compuestos fenólicos en las matrices vegetales analizadas presentó variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) a lo largo del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* (Figura 3). En la fase oral, ambas muestras exhibieron los valores más bajos, aumentado durante la fase gástrica en aproximadamente un 42% para POU y un 40% para HA, esto indica que las condiciones ácidas y la acción de enzimas digestivas favorecen la descomposición de estructuras complejas, facilitando así la liberación de ciertos polifenoles. En la fase intestinal, la bioaccesibilidad mostró comportamientos contrastantes entre las muestras. Para POU, la recuperación alcanzó un valor similar al reportado por Muñoz-Fariña et al. (2023) para arándanos frescos (15%). En contraste, la HA registró un incremento considerable en dicha etapa ( $>300\%$ ), el cual puede estar asociado a una mayor concentración de aminoácidos, péptidos y/o monosacáridos, sustancias que están presentes en cantidades relevantes en los digeridos de amaranto (Rodríguez, 2022), y que podrían reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu provocando una sobreestimación del CTP.

Las diferencias obtenidas en los índices de recuperación y bioaccesibilidad en las muestras podrían atribuirse no solo al CTP, sino también a la diversidad de compuestos fenólicos presentes en ellas, los cuales varían desde moléculas simples hasta estructuras altamente polimerizadas (Alminger et al., 2014).

**Figura 3.** Tasa de recuperación de compuestos fenólicos en las matrices vegetales durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



### Actividad antioxidante antes y durante la digestión gastrointestinal *in vitro* y su correlación con el contenido total de polifenoles

La actividad antioxidante (AA) del POU, evaluada mediante los métodos ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup> antes y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, se muestran en la Tabla 3. La capacidad de eliminación de ambos radicales estuvo en concordancia con el CTP, observándose un mayor poder reductor en el control, seguido por los extractos de la fase intestinal, gástrica y oral. Durante la simulación del proceso, los valores aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) tras la fase intestinal, registrando incrementos aproximados de 2,9 veces para ABTS<sup>•+</sup> y 1,6 veces para DPPH<sup>•</sup> en comparación con la fase gástrica. Dicho efecto podría estar relacionado con la transición de un ambiente ácido a uno alcalino, lo que facilita la liberación (bioaccesibilidad) de compuestos fenólicos y, al mismo tiempo, mejora su actividad antioxidante al provocar la desprotonación de los grupos hidroxilo presentes en sus anillos aromáticos (Bouayed et al., 2011). Estos resultados coinciden con los reportados por Del Pino-García et al. (2016), quienes encontraron un aumento en la capacidad antioxidante tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de condimentos obtenidos a partir de orujo de vino tinto.

En relación al análisis de correlación de Pearson ( $r$ ), los resultados mostraron asociaciones muy fuertes y positivas ( $0,90 \leq r \leq 1,00$ ) entre el CTP y la AA (Tabla 3), lo que indica una relación directa entre ambas variables. Es decir, el incremento en la actividad antioxidante estuvo estrechamente vinculado con la liberación de compuestos fenólicos. Dicho fenómeno puede atribuirse a la descomposición de estructuras complejas bajo condiciones digestivas, lo que mejora la recuperación de estos compuestos y, en consecuencia, su capacidad de eliminación de radicales libres.

**Tabla 3.** Actividad antioxidante del POU medida por ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup> (mmol TE/100 g PF) y su correlación con el contenido total de polifenoles antes y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

	ABTS <sup>•+</sup>	DPPH <sup>•</sup>	Coeficiente de correlación	
			ABTS <sup>•+</sup>	DPPH <sup>•</sup>
Control	507,38 ± 4,43 <sup>a</sup>	925,59 ± 7,62 <sup>a</sup>	0,98	0,99*
Fase oral	1,99 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,53 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,93	0,94
Fase gástrica	3,70 ± 0,03 <sup>c</sup>	3,59 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,97	0,99*
Fase intestinal	10,99 ± 0,18 <sup>b</sup>	5,84 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,97	0,99*

Los valores de la actividad antioxidante son la media ± desviación estándar. Medias con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las correlaciones significativas se muestran como: \* $p < 0,05$ .

Con respecto a la HA, los valores presentados en la Tabla 4 evidencian cambios considerables en la actividad antioxidante antes y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las distintas fases del proceso. En la fase oral, la AA no pudo ser cuantificada, posiblemente porque los valores estaban por debajo del límite de detección de la curva de calibración de Trolox, lo que sugiere una menor disponibilidad de compuestos antioxidantes en dicha etapa. En la fase intestinal, se observó un incremento notable de la AA en comparación con la fase gástrica, con un aumento de aproximadamente 32 veces para ABTS<sup>•+</sup> y el doble de su valor para DPPH<sup>•</sup>. Esta diferencia en las mediciones puede atribuirse a las particularidades químicas de cada método. Diversos estudios han señalado que el DPPH<sup>•</sup> presenta limitaciones debido a su mayor estabilidad y menor reactividad, así como a su afinidad por medios orgánicos, lo que lo hace más adecuado para evaluar compuestos hidrofóbicos. En contraste, el radical ABTS<sup>•+</sup> muestra una reactividad más elevada y es compatible tanto con medios acuosos como orgánicos, lo que lo convierte

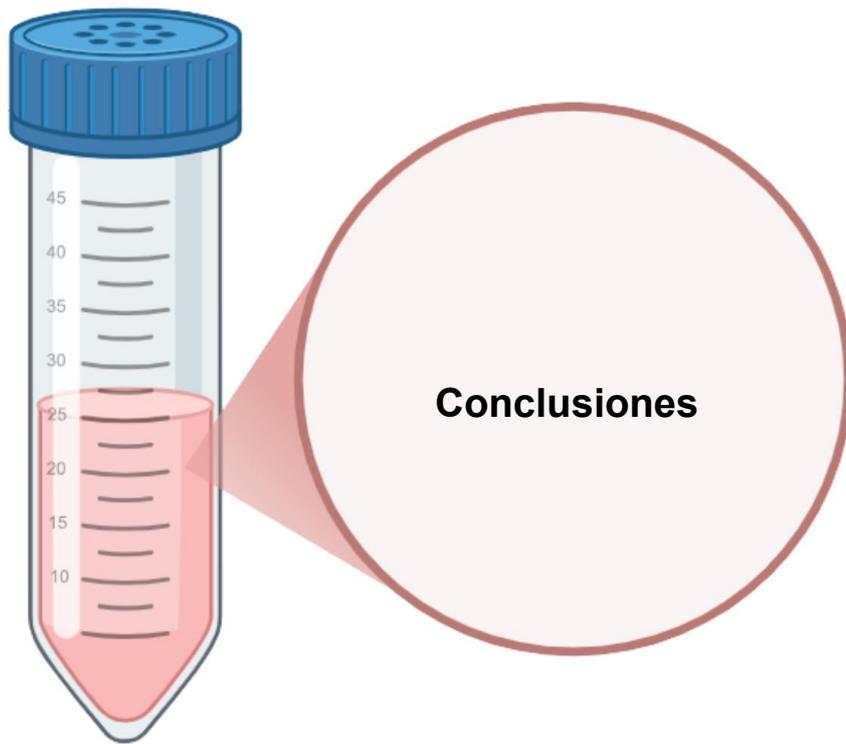
en una herramienta más versátil para la determinación de la actividad antioxidante en compuestos hidrofílicos y lipofílicos presentes en diferentes matrices alimentarias (Floegel et al., 2011; Mareček et al., 2017).

La correlación entre el CTP y la AA en la fase intestinal de la HA fue negativa tanto para ABTS<sup>•+</sup> como DPPH<sup>•</sup> (Tabla 4), con asociaciones muy fuertes ( $0,90 \leq r \leq 1,00$ ) y fuertes ( $0,70 \geq r \leq 0,89$ ), respectivamente. Estos resultados podrían indicar que otros compuestos bioactivos, además de los polifenoles, están contribuyendo a la capacidad antioxidante observada, ya que las variables tienen una relación inversa. En este sentido, estudios previos han sugerido que péptidos bioactivos generados por la hidrólisis de proteínas de amaranto durante la digestión gastrointestinal *in vitro* pueden neutralizar radicales libres, lo que influiría en la dinámica observada (Delgado et al., 2016).

**Tabla 4.** Actividad antioxidante de la HA medida por ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup> (mmol TE/100 g PF) y su correlación con el contenido total de polifenoles antes y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

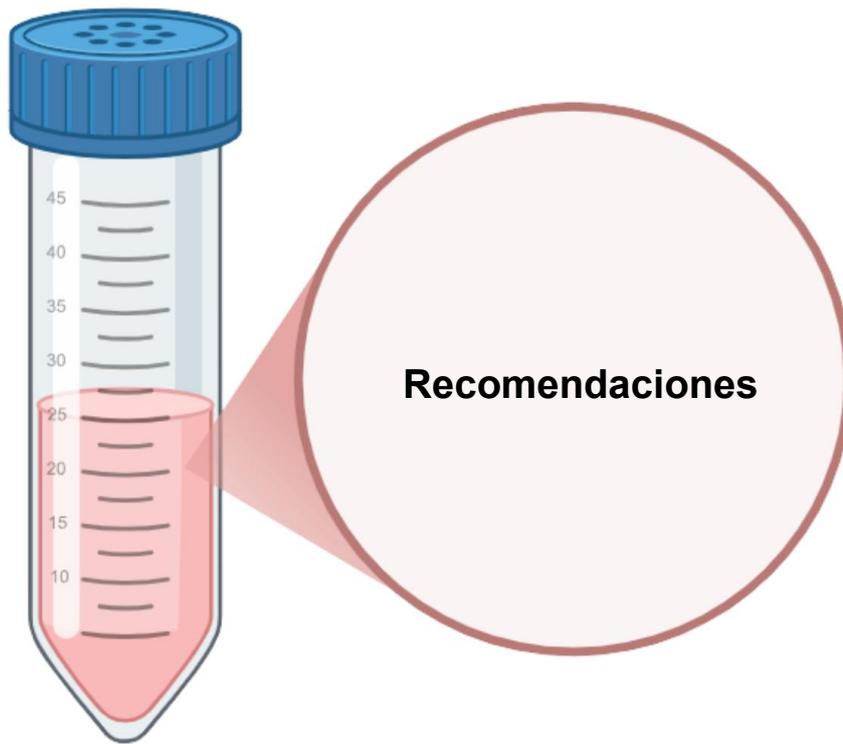
	ABTS <sup>•+</sup>	DPPH <sup>•</sup>	Coeficiente de correlación	
			ABTS <sup>•+</sup>	DPPH <sup>•</sup>
Control	0,78 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,99*	-0,36
Fase oral	NC	NC		
Fase gástrica	0,23 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,16 ± 0,03 <sup>c</sup>	-0,87	-0,59
Fase intestinal	7,41 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>b</sup>	-0,99	-0,71

Los valores de la actividad antioxidante son la media ± desviación estándar. Medias con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las correlaciones significativas se muestran como: \* $p < 0,05$ . NC: No cuantificado.



A partir del análisis de los resultados se infiere que:

- La digestión gastrointestinal *in vitro* se llevó a cabo con éxito, permitiendo evaluar las variaciones en el contenido total de polifenoles y su actividad antioxidante a lo largo de las distintas fases del proceso.
- El contenido de compuestos fenólicos tanto en las muestras como en los digeridos presentó variaciones significativas a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro*, cambios que estuvieron influenciados por las condiciones de cada fase.
- La actividad antioxidante aumentó tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, correlacionándose positivamente con el contenido total de polifenoles en el POU, mientras que en la HA se identificó una posible contribución de otros compuestos bioactivos.
- La digestión gastrointestinal *in vitro* incrementó la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante, evidenciando que las matrices evaluadas tienen potencial como ingredientes funcionales en la industria alimentaria.



Con base en los resultados obtenidos y las conclusiones expuestas, se proponen las siguientes recomendaciones con el objetivo de orientar futuras investigaciones y posibles aplicaciones prácticas:

- Cuantificar el contenido de proteínas y azúcares para evaluar su posible interferencia en la determinación de polifenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu y en las mediciones de actividad antioxidante *in vitro*.
- Realizar estudios sobre la sinergia de compuestos bioactivos, considerando la posible participación de péptidos bioactivos en la actividad antioxidante de la HA.
- Identificar compuestos fenólicos mediante técnicas cromatográficas para determinar cuáles son más bioaccesibles tras la digestión gastrointestinal *in vitro* y su impacto en la actividad antioxidante.
- Validar los resultados con estudios *in vivo*.

## Referencias

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J.A., & Serna-Saldívar S.O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Alara, O. R., Abdurahman, N.H., & Ukaegbu, C.I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2021.03.011>
- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., & Ukaegbu, C.I. (2018). Soxhlet extraction of phenolic compounds from Vernonia cinerea leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.07.003>
- Albuquerque, B.R., Heleno, S. A., Oliveira, B., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R. (2021). Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12(1), 14–29. <https://doi.org/10.1039/D0FO02324H>
- Alegria, A., Garcia-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static Digestion Models: General Introduction. In K, Verhoeckx (Eds.) et. al. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. (pp. 3–12). Springer.
- Alminger, M., Aura, A.M., Bohn, T., Dufour, C., El, S.N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M.C., McDougall, G.J., Requena, T., Santos, C.N. (2014). *In Vitro* Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 413-436. <https://doi:10.1111/1541-4337.12081>.
- Arias, F. (2016). *El proyecto de investigación: Introducción a la metodología científica* (7<sup>a</sup> ed.). Episteme.
- Ávalos García., A., y Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2(3),119-145. <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/26b94db5-92de-4aaf-8822-8f063c180904/content>

- Bordiga, M., Travaglia, F., & Locatelli, M. (2019). Valorisation of grape pomace: An approach that is increasingly reaching its maturity – A review. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(4), 933–942. <https://doi.org/10.1111/IJFS.14118>
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, *128*(1), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Caponio, G. R., Noviello, M., Calabrese, F. M., Gambacorta, G., Giannelli, G., & De Angelis, M. (2022). Effects of grape pomace polyphenols and *in vitro* gastrointestinal digestion on antimicrobial activity: Recovery of bioactive compounds. *Antioxidants*, *11*(3), 567. <https://doi.org/10.3390/antiox11030567>
- Castellanos-Gallo, L., Ballinas-Casarrubias, L., Espinoza-Hicks, J.C., Hernández-Ochoa, L.R., Muñoz-Castellanos, L.N., Zermeño-Ortega, M.R., Borrego-Loya, A., & Salas, E. (2022). Grape Pomace Valorization by Extraction of Phenolic Polymeric Pigments: A Review. *Processes*, *10*, 469. <https://doi.org/10.3390/pr10030469>
- Coelho, L. M., Silva, P. M., Martins, J. T., Pinheiro, A. C., & Vicente, A. A. (2018). Emerging opportunities in exploring the nutritional/functional value of amaranth. *Food & Function*, *9*(11), 5499–5512. <https://doi.org/10.1039/C8FO01422A>
- Corona-Leo, L. S., Meza-Márquez, O. G., & Hernández-Martínez, D. M. (2021). Efecto de la digestión *in vitro* sobre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de

- diferentes variedades de manzana (*Malus domestica*) cosechadas en México. *Journal of Food Science and Technology*, 58(12), 4824–4834. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05023-5>
- Creus, G.E. (2004). Compuestos fenólicos: un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm: farmacia y sociedad*, 23(6), 80-84. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5325169>
- Del Pino-García, R., González-SanJosé, M. L., Rivero-Pérez, M. D., García-Lomillo, J., & Muñoz, P. (2016). Total antioxidant capacity of new natural powdered seasonings after gastrointestinal and colonic digestion. *Food Chemistry*, 211, 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.127>
- Delgado, O., Añón, M.C., & Tironi, V. A. (2016). Péptidos antioxidantes derivados de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto: Una primera aproximación a la evaluación de su absorción intestinal y posterior actividad. *Revista de Investigaciones Científicas*, 30(1), 45-55. <https://www.redalyc.org/journal/6061/606163573007/html/>
- Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., Denis, S., Ferrua, M., Havenaar, R., Lelieveld, J., Mackie, A. R., Marzorati, M., Menard, O., Minekus, M., Miralles, B., Recio, I., & Van den Abbeele, P. (2018). Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1546-1562. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.142190>
- Durán-Castañeda, A. C., Cardenas-Castro, A. P., Pérez-Jiménez, J., Pérez-Carvajal, A. M., Sánchez-Burgos, J. A., Mateos, R., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2023). Bioaccessibility of phenolic compounds in *Psidium guajava* L. varieties and *P. friedrichsthalianum* Nied. after gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 400, 134046. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134046>
- Etcheverry, P., Grusak, M. A. & Fleige, L. E. (2012). Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>

- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751-760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>
- Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I., & Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Fraga, C.G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A., (2019). Los efectos de los polifenoles y otros bioactivos en la salud humana. *Alimentación y función*, 10(2), 514–528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>
- Franco-Bañuelos, A., Contreras-Martínez, C.S., Carranza-Téllez, J., & Carranza-Concha, J. (2017). Total phenolic content and antioxidant capacity of non-native wine grapes grown in Zacatecas, Mexico. *Agrociencia*, 51(6), 661-671. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952017000600661&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000600661&lng=es&tlng=en).
- Glahn, R.P., Lee, O.A., & Miller, D.D. (1999). *In vitro* digestion/Caco-2 cell culture model to determine optimal ascorbic acid to Fe ratio in rice cereal. *Journal of Food Science*, 64(5), 925–928. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15942.x>
- Granato, D., Santos, J. S., Maciel, L. G., & Nunes, D. S. (2016). Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 80, 266–279. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.010>
- Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. *Food Chemistry*, 245, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.086>

- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Iuga, M., & Mironeasa, S. (2020). Potential of grape byproducts as functional ingredients in baked goods and pasta. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2473–2505. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12597>
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>
- Jara-Palacios, M. J., Gonçalves, S., Hernanz, D., Heredia, F. J., & Romano, A. (2018). Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. *Food Research International*, 109, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.053>
- Kitabatake, N., & Kinekawa, Y.I. (1998). Digestibility of bovine milk whey protein and  $\beta$ -lactoglobulin *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12): 4917–4923. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf9710903>
- Kulp, K. S., Fortson, S. L., Knize, M. G., & Felton, J. S. (2003). An *in vitro* model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12), 1701–1710. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00197-2)
- Luis, G.M., Hernández Hernández, B.R., Peña Caballero, V., Torres López, N.G., Espinoza Martínez, V.A., & Ramirez Pacheco, L. (2018). Usos actuales y potenciales del Amaranto (*Amaranthus* spp.). *Journal of Negative and No Positive Results*, 6, 423-436. <https://doi.org/10.19230/jonnpr.2410>
- Malgor, M., Sabbione, A. C., & Scilingo, A. A. (2020). Amaranth lemon sorbet, elaboration of a potential functional food. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(3), 404–412. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00818-y>

- Manassero, C. A., Añón, M. C., & Speroni, F. (2020). Development of a high protein beverage based on amaranth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(4), 599–607. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00853-9>
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, 73, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004>
- Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., & Granato, D. (2015). Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. *Journal of Food Science*, 80(12), C2397–C2403. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13077>
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Dos Santos, T.C., Coube, C.S., & Leitão, S.G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(2), 127–30. <https://doi.org/10.1002/ptr.687>
- Metrouh-Amir, H., Duarte, C. M. M., & Maiza, F. (2015). Influence of solvent on total phenolic content, antioxidant capacity, and antibacterial activity of *Matricaria pubescens*. *Industrial Crops and Products*, 67, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.049>
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702>
- Ministerio de Agroindustria. (2016). *Amaranto, una pequeña gran semilla (Ficha N° 58)*. Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas, Secretaría de Agregado de Valor.

Recuperado de [https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/seguridad-alimentaria-y-nutricion/fichaspdf/Ficha\\_58\\_Amaranto.pdf](https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/seguridad-alimentaria-y-nutricion/fichaspdf/Ficha_58_Amaranto.pdf)

- Moro, K.I.B., Bender, A.B.B., da Silva, L. P., & Penna, N.G. (2021). Green extraction methods and microencapsulation technologies of phenolic compounds from grape pomace: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 14(8), 1407–1431. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02665-4>
- Morón Rivera, M.J., Boeri, P.A., y Piñuel, L. (2024). Caracterización de harinas de orujos de uvas tintas de la Patagonia Atlántica: un producto innovador rico en macronutrientes. *I Congreso Iberoamericano de Alimentos 4.0: Aplicaciones en Gastronomía y Agroindustria*. <http://rid.unrn.edu.ar/handle/20.500.12049/12312>
- Muñoz-Fariña, O., López-Casanova, V., García-Figueroa, O., Roman-Benn, A., Ah-Hen, K., Bastías-Montes, J. M., Quevedo-León, R., & Ravanal-Espinosa, M.C. (2023). Bioaccessibility of phenolic compounds in fresh and dehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry Advances*, 2, 100171. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.10017>
- Olt, V., Báez, J., Curbelo, R., Boido, E., Amarillo, M., Gámbaro, A., Alborés, S., Gerez García, N., Cesio, M. V., Heinzen, H., Dellacassa, E., Fernández-Fernández, A. M., & Medrano, A. (2023). Tannat grape pomace as an ingredient for potential functional biscuits: Bioactive compound identification, in vitro bioactivity, food safety, and sensory evaluation. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1241105>
- Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2020). Bioactive peptides and dietary polyphenols: Two sides of the same coin. *Molecules*, 25(15), 3443. <https://doi.org/10.3390/molecules25153443>
- Pinto, D., Moreira, M.M., Švarc-Gajić, J., Vallverdú-Queralt, A., Brezo-Borjan, T., Delerue-Matos, C. & Rodrigues, F. (2023a). *In vitro* gastrointestinal digestion of functional cookies enriched with chestnut shells extract: Effects on phenolic composition, bioaccessibility, bioactivity, and -amylase inhibition. *Food Bioscience*, 53, 102766. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102766>

- Pinto, D., Moreira, M.M., Vieira, E.F., Švarc-Gajić, J., Vallverdú-Queralt, A., Brezo-Borjan, T., Delerue-Matos, C. & Rodrigues, F. (2023b). Development and characterization of functional cookies enriched with chestnut shells extract as source of bioactive phenolic compounds. *Foods*, *12*, 640. <https://doi.org/10.3390/foods12030640>
- Pinto, D., Moreira, M.M., Vieira, E.F., Švarc-Gajić, J., Vallverdú-Queralt, A., Brezo-Borjan, T., Delerue-Matos, C. & Rodrigues, F. (2023c). Exploring the impact of in vitro gastrointestinal digestion in the bioaccessibility of phenolic-rich chestnut shells: A preliminary study. *Separations*, *10*, 471. <https://doi.org/10.3390/separations10090471>
- Potì, F., Santi, D., Spaggiari, G., Zimetti, F., & Zanotti, I. (2019). Polyphenol Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders: A Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(2), 351. <https://doi.org/10.3390/ijms20020351>
- Quirós-Sauceda, A.E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S.G., Ayala-Zavala, J.F., Bello-Perez, L.A., Alvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L.A., González-Córdova, A.F., & González-Aguilar, G.A. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & Function*, *5*(6), 1063-72. <https://doi:10.1039/c4fo00073k>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9-10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Roa-Acosta, D., González-Callejas, C., & Calderón-Yonda, Y. (2017). Seguimiento de la molienda abrasiva del grano de amaranto para la obtención de dos fracciones con potencial industrial. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y 63 Agroindustrial*, *15*, 59-66. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(EdiciónEspecial\)59-66](https://doi.org/10.18684/BSAA(EdiciónEspecial)59-66)
- Rodríguez, M. (2022). *Evaluación de harina de amaranto como ingrediente antioxidante para la preparación de matrices alimentarias funcionales* [Tesis doctoral, Universidad

Nacional de La Plata]. Repositorio Institucional de la UNLP.  
<https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/162211>

Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L.A. (2018). Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia Analgesia*, 126(5), 1763-1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>

Seczyk, Ł., Sugier, D., Świeca, M., & Gawlik-Dziki, U. (2021). The effect of *in vitro* digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds. *Food Chemistry*, 344, 128581. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128581>

Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, 21(9), 1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>

Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10), 528–539. <https://doi.org/10.5897/AJPP2013.3474>

Shanmugavelan, P., Kim, S. Y., Kim, J. B., Kim, H. W., Cho, S. M., Kim, S. N., Kim, S. Y., Cho, Y. S., & Kim, H. R. (2013). Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed Korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by HPLC-ELSD. *Carbohydrate Research*, 380, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.06.024>

Sharma, O.P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>

Silva Sánchez, C. (2007). *Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (Amaranthus hypochondriacus) cultivado en San Luis Potosí* [Tesis de maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.]. IPICYT <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/767/3/TDIPICYTS5C32007.pdf>

Singleton, V., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

- Spinei, M., & Oroian, M. (2021). The potential of grape pomace varieties as a dietary source of pectic substances. *Foods*, *10*(4), 867. <https://doi.org/10.3390/FOODS10040867>
- Troilo, M., Difonzo, G., Paradiso, V. M., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2022). Grape pomace as innovative flour for the formulation of functional muffins: How particle size affects the nutritional, textural and sensory properties. *Foods*, *11*(12), 1799. <https://doi.org/10.3390/foods11121799>
- Vacek, J., Ulrichová, J., Klejdus, B., & Simánek, V. (2010). Analytical methods and strategies in the study of plant polyphenolics in clinical samples. *Analytical Methods*, *2*, 604–61. <https://doi:10.1039/c0ay00042f>
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. Y., Robles-Sánchez, M., Astiazaran-García, H., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & function*, *5*(2), 189–197. <https://doi.org/10.1039/c3fo60361j>
- Venskutonis, P. R., & Kraujalis, P. (2013). Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: A review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(4), 381–412. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12021>
- Vollmannová, A., Margitanová, E., Tóth, T., Timoracká, M., Urminská, D., Bojňanská, T., & Čičová, I. (2013). Cultivar influence on total polyphenol and rutin contents and total antioxidant capacity in buckwheat, amaranth, and quinoa seeds. *Czech Journal of Food Sciences*, *31*(6), 589-595. <https://doi.org/10.17221/452/2012-CJFS>
- Wickham, M., Faulks, R., & Mills, C. (2009). *In vitro* digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*(8), 952–958. <https://doi: 10.1002/mnfr.200800193>
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, *48*(2), 221-237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

- Zhang, K., Huang, J., Wang, D., Wan, X., & Wang, Y. (2024). Covalent polyphenols-proteins interactions in food processing: Formation mechanisms, quantification methods, bioactive effects, and applications. *Frontiers in Nutrition*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1371401>
- Zhang, Q., Abe, T., Takahashi, T., & Sasahara, T. (1996). Variations in *in vitro* starch digestion of glutinous rice flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9): 2672–2674. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf9508110>
- Zhang, Q., Lin, L., & Ye, W. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(20). <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhao, Y., Y. Wu, & M. Wang. (2015). Bioactive substances of plant origin. In Cheung, P.C.K and Mehta, B. M. (Eds.) *Handbook of food chemistry* (pp.967–1008). Springer.