



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**BIODISPONIBILIDAD Y BIOACCESIBILIDAD DE POLIFENOLES Y
FLAVONOIDES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN TECNOLOGÍA
MÉDICA**

**AUTORAS: ISABEL CRISTINA BARRIOS SILVA
JAVIERA IVANNA BRAVO MUÑOZ
PROFESORA GUÍA: TM. Mg. Cs. ROXANA ISABEL ORREGO CASTILLO**

**TALCA – CHILE
2020**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

Dedicado a nuestras familias y amigos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a nuestras familias por el constante apoyo entregado en estos años de formación profesional. Especialmente a Eliana Silva Jaña, Nelson Barrios Arce, Jessica Barrios Silva, María Angélica Muñoz Ruiz, Luis Bravo Ponce, Carlos Muñoz Vilches y María Ruiz Montecino.

Nuestros más sinceros y cálidos agradecimientos a la profesora Roxana Orrego Castillo, quien confió en nuestras capacidades y nos brindó su apoyo a lo largo de la elaboración, investigación y realización de esta revisión bibliográfica.

Agradecemos también a nuestros amigos dentro y fuera de la vida universitaria por brindarnos su apoyo, alegría y cariño todos estos años, especialmente a Diego Arratia Rojas, Hedison Fuentes Garrido, María Ignacia Baeza Bravo, Javiera Villalobos Contreras, Omar Castillo Castillo, Bruno Orrego Andrade, Camila Castro Cancino y Vanessa Castillo Mueña.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo general	8
3.2 Objetivos específicos	8
4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA	9
5. MARCO TEÓRICO	10
5.1 ANTIOXIDANTES	11
5.1.1. Antioxidantes endógenos enzimáticos	13
5.1.2. Antioxidantes endógenos no enzimáticos	15
5.1.3. Antioxidantes exógenos no enzimáticos	17
5.2 POLIFENOLES	23
5.2.1. Clasificación de los polifenoles	23
5.3 FLAVONOIDES	30
5.3.1. Clasificación de los flavonoides	31
5.4 BIOACCESIBILIDAD	37
5.4.1. Concepto de Bioaccesibilidad	37
5.4.2. Bioaccesibilidad de polifenoles y flavonoides	38
5.4.3. Factores que afectan la bioaccesibilidad	38
A. Matriz alimentaria	39
B. Influencia del procesamiento de alimentos e interacciones con otros alimentos	41
5.4.4. Digestión y relación con biodisponibilidad	42
5.5 BIODISPONIBILIDAD	45
5.5.1. Concepto de biodisponibilidad	45
5.5.2. Biodisponibilidad de polifenoles	45
A. Absorción intestinal	46
5.5.3. Biodisponibilidad de flavonoides	47
5.5.4. Factores que afectan la biodisponibilidad	48

5.6 EVALUACIÓN DE BIOACCESIBILIDAD DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES	51
5.6.1. Modelos estáticos	52
A. Solubilidad	55
B. Dializabilidad	56
C. Modelo digestivo estático propuesto por InfoGest	58
5.6.2. Modelos dinámicos	61
A. Modelo TIM	62
B. Modelo SHIME	65
5.7 EVALUACIÓN DE BIODISPONIBILIDAD POLIFENOLES Y FLAVONOIDES	67
5.7.1. Uso de modelos con líneas celulares	68
A. Modelo <i>in vitro</i> de células digestivas CACO-2	70
B. Modelo celular HT-29	73
6. CONCLUSIONES	75
7. REFERENCIAS	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales antioxidantes sintéticos y sus usos	21
Tabla 2: Clasificación de polifenoles en función de la estructura química por Harborne	25
Tabla 3: Factores que pueden afectar la biodisponibilidad de compuestos fenólicos en la dieta	49
Tabla 4: Clasificación de los grado de diferenciación de las líneas celulares	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de los antioxidantes respecto a su origen y funcionalidad	12
Figura 2: Clasificación de los polifenoles y ejemplos respectivos en función de su estructura química	24
Figura 3: Estructura química modelo de los ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico y ácido hidroxicinámico	26
Figura 4: Estructura química de un ejemplo de lignano: Secoisolariciresinol Diglucósido	27
Figura 5: Estructura química de un ejemplo de estilbeno: Resveratrol	28
Figura 6: Estructura química básica de los flavonoides	30
Figura 7: Estructuras químicas de los flavonoides: Flavonoles, Flavonas, Antocianidinas, Flavanoles, Flavanonas, Isoflavonas	34
Figura 8: Características de matriz alimentaria que afectan en la bioaccesibilidad de los polifenoles	40
Figura 9: Etapas del proceso digestivo asociado a polifenoles, bioaccesibilidad y Biodisponibilidad	43
Figura 10: Características fases del proceso digestivo utilizadas en modelos Estáticos	53
Figura 11: Métodos estáticos de medición de bioaccesibilidad	54
Figura 12: Esquema proceso determinación de bioaccesibilidad mediante Solubilidad	56
Figura 13: Esquema modelo de digestión estático <i>in vitro</i> basado en Dializabilidad	58
Figura 14: Diagrama de flujo método de digestión InfoGest que involucra líquido salival simulado (SSF), líquido gástrico simulado (SGF) y líquido intestinal simulado (SIF)	59
Figura 15: Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método dinámico de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> (TIM-1)	64
Figura 16: Modelo gastrointestinal <i>in vitro</i> SHIME (<i>Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem</i>)	65
Figura 17: Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método dinámico gastrointestinal <i>in vitro</i> SHIME	66
Figura 18: Modelo <i>in vivo</i> para determinación de biodisponibilidad con células CACO-2	72

1. RESUMEN

Los polifenoles son compuestos orgánicos presentes en gran cantidad de alimentos vegetales, frutas, hierbas, algunas especias, entre otros. Los cuales corresponden a los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta y cuya estructura química está compuesta por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, siendo estas estructuras simples y complejas. Presentan propiedades antioxidantes, cuyos efectos beneficiosos han tomado relevancia en los últimos años, como la protección contra efectos del estrés oxidativo en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, metabólicas, cáncer, entre otras.

Gran parte de las investigaciones demostrativas de los efectos protectores de estos compuestos se llevan a cabo usando concentraciones mucho más altas de las consumidas en la dieta. Por este motivo es crucial comprender los factores involucrados en la digestión de los polifenoles junto con los conceptos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad. El primer término se describe como la fracción de un compuesto que se libera de su matriz alimentaria dentro del tracto gastrointestinal, por lo tanto, se vuelve disponible para la absorción intestinal; el segundo estrechamente relacionado, corresponde a la fracción del componente ingerido disponible en el sitio de acción para su utilización en funciones fisiológicas, en este caso, los efectos antioxidantes.

La bioaccesibilidad es establecida a partir de procedimientos *in vitro*, donde se pueden utilizar modelos estáticos como la Solubilidad y Dializabilidad o en modelos dinámicos, mayormente empleados, tales como el modelo gastrointestinal completo SHIME y el modelo gastrointestinal TIM. Respecto a la biodisponibilidad, esta es determinada mediante ensayos *in vivo* utilizando modelos celulares, donde se destaca el uso de la línea celular CACO-2 derivada de carcinoma de colon y otras líneas como HT29 (adenocarcinoma de colon).

Palabras claves: bioaccesibilidad, biodisponibilidad, polifenoles, flavonoides, antioxidantes

2. INTRODUCCIÓN

La evidencia científica existente durante los últimos años indica que el consumo de una dieta balanceada es un importante factor en la prevención de enfermedades ya sean estas de tipo cardiovasculares, el cáncer, las asociadas a la mineralización ósea como osteoporosis, entre otras. Hábitos nutricionales, como los basados en el alto consumo de frutas y verduras se han asociado estrechamente con un tiempo más prolongado de esperanza de vida y en la disminución significativa de la incidencia y prevalencia de estas enfermedades.

Los antioxidantes, como los polifenoles, abundantes en frutas y verduras, se han asociado con propiedades protectoras a nivel del organismo. Los desequilibrios entre la producción de radicales libres (estrés oxidativo) y los niveles de antioxidantes en el cuerpo constituyen uno de los precursores importantes que se han relacionado estrechamente con la patogénesis de diversas enfermedades. Los compuestos fenólicos juegan un papel clave en la protección de las macromoléculas del daño inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), mejorando el estado antioxidante, el perfil lipídico y la función vascular/endotelial.(1)

Los compuestos fenólicos son estructuras químicas formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (2) Comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como los taninos condensados. Cada una de las familias agrupa un número de compuestos más o menos variado, siendo la familia de los flavonoides, con cerca de 4000 estructuras diferentes, una de las más estudiadas.

La protección otorgada por el consumo de frutas y verduras contra enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer se debe a la presencia de estos compuestos fenólicos, lo que es una buena razón para investigar como estos compuestos acceden o llegan a su sitio blanco, vale decir, la bioaccesibilidad y posterior biodisponibilidad de estos compuestos en el organismo humano.

Las mediciones de biodisponibilidad y bioaccesibilidad se usan con mayor frecuencia para evaluar la fracción absorbible de una matriz alimentaria después de ser consumida por el ser humano. La biodisponibilidad se interpreta como la fracción de una sustancia que en realidad se absorbe del tracto gastrointestinal y alcanza la circulación sistémica. En contraste, la bioaccesibilidad se ilustra como la fracción máxima de una sustancia que se puede disolver y liberar en el tracto gastrointestinal desde su matriz alimenticia original, y se vuelve bioaccesible para una mayor absorción intestinal. (3) Ambos procesos se ven afectados por muchos factores, como la composición y la propiedad de los alimentos, así como algunos elementos fisiológicos, incluido el pH en el ambiente gastrointestinal, la temperatura, la actividad de ciertas enzimas y la microbiota existente a este nivel. La digestión gastrointestinal que requiere la cooperación del estómago y el intestino incluye una serie de procesos enzimáticos en diferentes niveles de pH, donde los nutrientes y contaminantes se liberan y luego se absorben en el sistema circulatorio o se eliminan del cuerpo. (4) Tanto las evaluaciones de biodisponibilidad como de bioaccesibilidad tienen el mismo propósito el cual es proporcionar una evaluación de riesgos para la salud más realista al medir la porción de una determinada sustancia liberada de los alimentos a través de la digestión. Aunque la biodisponibilidad es más precisa al describir la absorción real de la fracción después de ser tomada por vía oral a través del sistema digestivo, sus mediciones directas requieren un procedimiento *in vivo* basado en modelos animales y, por lo tanto, son más desafiantes.

La presente revisión tiene como propósito ayudar a la comprensión del mecanismo de acción de un tipo de antioxidantes y aumentar la información existente respecto a la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de polifenoles y flavonoides, prestando énfasis en ambos conceptos y su estudio a nivel del laboratorio.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

Explicar la importancia de la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de sustancias como los polifenoles y flavonoides para evaluar la real efectividad de dichas moléculas.

3.2. Objetivos específicos:

1. Caracterizar moléculas antioxidantes y su asociación con el estrés oxidativo.
2. Explicar los conceptos de biodisponibilidad y bioaccesibilidad asociado a polifenoles y flavonoides.
3. Describir técnicas de laboratorio *in vivo* e *in vitro* asociadas al estudio de la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de polifenoles y flavonoides.

4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA

Se realizó una revisión bibliográfica con la información disponible sobre “bioaccesibilidad y biodisponibilidad de polifenoles y flavonoides”, asociada a las características de los compuestos fenólicos, la descripción de los conceptos y las metodologías de determinación *in vitro* e *in vivo*.

Para esta búsqueda, se consultó en revistas indexadas de tal forma de asegurar que estos artículos han cumplido con criterios de calidad, los cuales les han permitido ingresar a bases de datos internacionales y/o nacionales. Las bases de datos consultadas fueron: PubMed, Scopus, Scielo y Web of Science, con el propósito de revisar trabajos publicados relacionados con el tema investigado, durante los últimos 10 años. Las palabras claves utilizadas corresponden a Bioaccesibilidad, Biodisponibilidad, Antioxidantes, Polifenoles, Solubilidad, Dializabilidad, entre otras y fueron ingresadas en inglés. Además, se utilizó algunos libros asociados al tema y tesis doctorales relacionadas.

5. MARCO TEÓRICO

El estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre las sustancias pro-oxidantes (especies de radicales libres) y los antioxidantes.(5) En cuanto a las primeras, incluyendo especies reactivas del oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno, son moléculas de carácter inestable y altamente reactivas. Se unen a estructuras celulares como es el caso de los ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y carbohidratos, lo que provoca una serie de daños y enfermedades celulares. (6) Las células poseen una amplia gama de sistemas antioxidantes que eliminan y desactivan los radicales libres excesivos en un intento por prevenir el daño celular. (7)

El estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en el envejecimiento, la obesidad, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la depresión y la neurodegeneración a nivel cerebral. (8-11) Gran cantidad de enfermedades crónicas son provocadas por el aumento desequilibrado de especies de radicales libres. Los niveles basales de las especies ROS son esenciales para procesos básicos, sin embargo, la producción excesiva de estas especies genera un daño oxidativo en los tejidos. El daño induce disfunción mitocondrial, problemas a nivel del retículo endoplásmico y un estado de inflamación. (12)

El mantenimiento de la homeostasis intracelular depende de un sistema antioxidante eficiente. En la actualidad no se ha establecido un tratamiento totalmente efectivo para las enfermedades crónicas causadas por el estrés oxidativo, pero la evidencia creciente ha demostrado efectos antioxidantes de carácter específico en una serie de compuestos denominados polifenoles presentes en los alimentos, especialmente en las plantas. Estos compuestos contribuyen en la regulación del estado redox y la respuesta inmune mediante la eliminación de radicales libres (estabilización), modulando la función mitocondrial y promoviendo la actividad de SOD (Superóxido dismutasa), GSH (glutación), GPx (glutación peroxidasa) y GST (glutación S-transferasas).(12)

5.1. ANTIOXIDANTES

Las sustancias oxidantes producidas por el metabolismo celular son contrarrestadas en base a numerosos sistemas antioxidantes. Un antioxidante es una molécula capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas. En los organismos vivos, las moléculas y sistemas antioxidantes fisiológicos limitan el efecto nocivo de los oxidantes, pero no bloquean las reacciones redox requeridas para el metabolismo, la producción de energía, la señalización y otras funciones celulares.(13) Como características podemos destacar que son compuestos que reaccionan rápidamente con radicales libres u oxidantes para formar derivados estables o radicales libres relativamente estables. Esta propiedad les permite eliminar oxidantes, protegiendo así otras moléculas de la oxidación. (14)

Los antioxidantes pueden actuar disminuyendo la producción de ROS (especies reactivas del oxígeno), eliminando o degradando ROS u otros oxidantes. El sistema de defensa proporcionado por los antioxidantes se encuentra en dos niveles: el primario de carácter endógeno con un componente enzimático y otro no asociado a la actividad de enzimas; y el secundario exógeno sin componente enzimático donde se incluyen antioxidantes naturales y sintéticos (Figura 1). (14, 15)

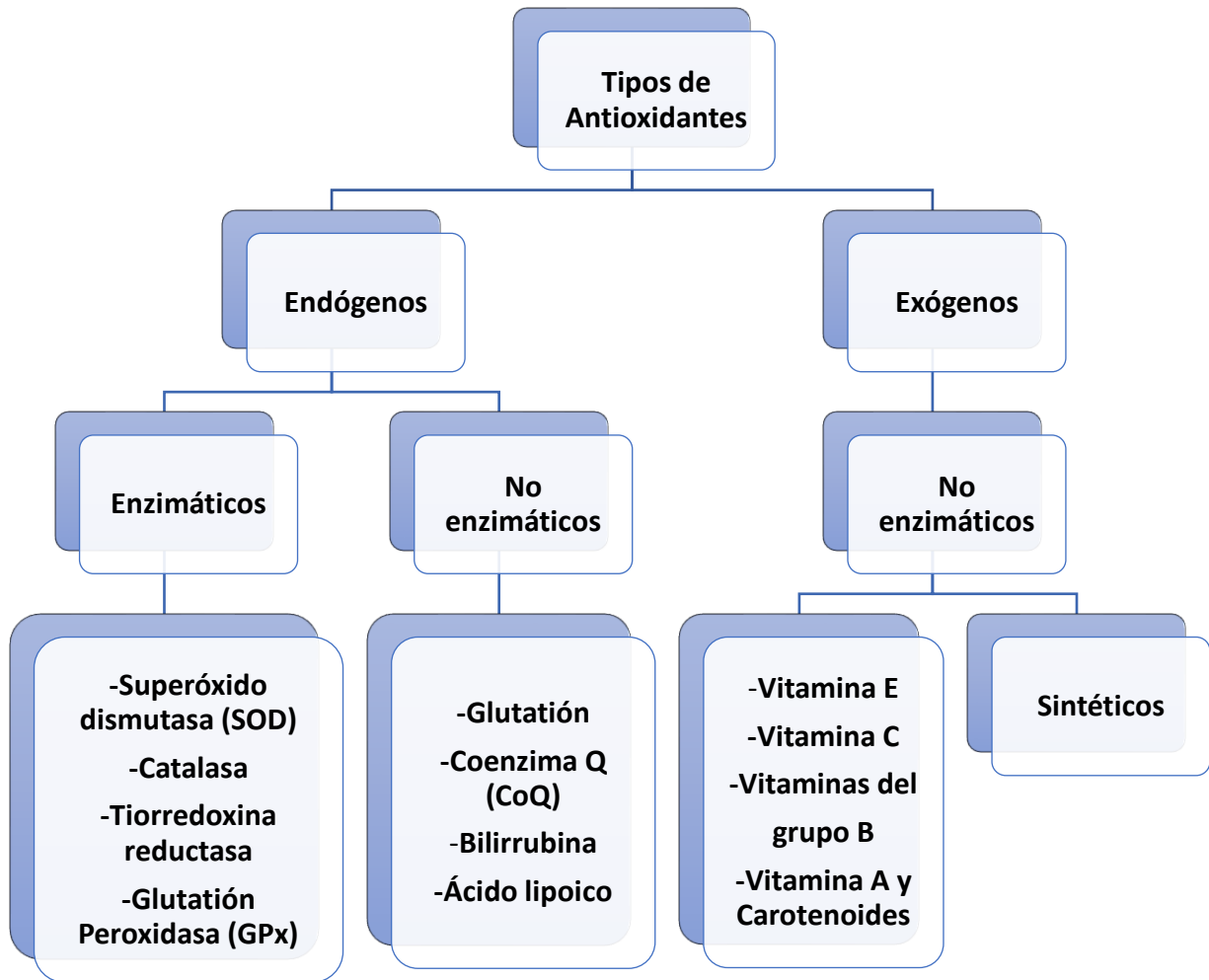


Figura 1: Clasificación de los antioxidantes respecto a su origen y funcionalidad.

Fuente: Elaboración propia de Barrios.I, Bravo.J. (2020)

5.1.1 Antioxidantes endógenos enzimáticos

A. Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa neutraliza el superóxido, evitando así la formación de peroxinitrito y la reducción de iones de metales de transición. Esta enzima cataliza la reacción del radical anión superóxido para producir H_2O_2 y O_2 . Existen en los mamíferos 3 tipos de esta enzima, los cuales se ubican en lugares específicos, dos se encuentran dentro de la célula y uno extracelular. (16) La primera enzima es una SOD que tiene en su centro catalítico cobre y zinc, se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas, y en la membrana externa mitocondrial. La segunda enzima está ubicada cerca de la membrana interna mitocondrial y es una enzima que tiene manganeso en su centro catalítico. (17) Por último, la tercera se localiza fuera de la célula y está asociada a la matriz extracelular; al igual que la primera tiene asociado cobre y zinc en su sitio catalítico. Si bien las tres realizan la misma actividad catalítica, guardan grandes diferencias en cuanto a su estructura y organización. (18)

B. Catalasa

Esta enzima trabaja en estrecha relación con la SOD, se encuentra en los peroxisomas y cataliza la conversión del H_2O_2 en H_2O . Es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios. Es importante destacar que existen dos grupos de catalasas, algunas tienen subunidades pequeñas y otras grandes. Entre estos dos tipos de catalasas existen diferencias estructurales importantes. Las catalasas pequeñas son menos resistentes a la desnaturalización, unen NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), tienen hemo B (grupo prostético más abundante que forma parte de la hemoglobina) y se inhiben e inactivan por sustrato. En cambio, las catalasas grandes tienen un dominio extra en el C-terminal que es semejante a la flavodoxina, son muy resistentes a la desnaturalización, tienen hemo D (derivado del grupo Hemo B, baja frecuencia), presentan enlaces covalentes inusuales cercanos al sitio activo y son resistentes a concentraciones molares de H_2O_2 . (19)

C. Glutación Peroxidasa (GPx)

La glutación peroxidasa es una de las enzimas que participan en las transformaciones de especies reactivas del oxígeno. Es una enzima selenio (Se) dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o del lipoperóxido (L-OOH), utilizando como agente reductor el glutación reducido (GSH). Se conoce que los L-OOH son tóxicos en los tejidos animales y que dan lugar a especies reactivas del oxígeno como los radicales que son compuestos indeseables para los organismos vivos. La GPx, como parte del mecanismo de defensa antioxidante, evita la oxidación de los L-OOH, reduciéndolos en presencia de GSH. Esta reacción produce hidróxidos que son elementos potencialmente dañinos y que al oxidarse se convierten en radicales alcohólicos, para los que no se conoce enzima que los metabolice. (20)

Existen al menos 3 formas de GPx selenio dependientes: una forma intracelular o celular, una extracelular o plasmática y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos que por lo general está asociada a la membrana y aunque su actividad es la misma, poseen diferencias estructurales. (21, 22)

D. Tiorredoxina reductasa

La tiorredoxina (Trx) es una proteína oxidorreductora, su principal característica consiste en la presencia de un sitio activo invariante constituido por los residuos Trp-Cys-(Gly/Ala)-Pro-Cys. (23) Las Trx en su conformación reducida funcionan como reductores de puentes disulfuro en otras proteínas y presentan un elevado poder reductor en comparación con otros agentes reductores fisiológicos como el glutación reducido (GSH) y sintéticos como el ditiotreitól. (13)

El mecanismo de acción de la tiorreductasa surge de la regulación redox en la señalización y la supervivencia celular, aumentando la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) y disminuyendo el estrés oxidativo y cualquier lesión resultante. (13)

5.1.2 Antioxidantes endógenos no enzimáticos

A. Glutación

El glutación es un importante antioxidante tripéptido de bajo peso molecular, soluble en agua pequeño presente en las células, siendo este un cofactor de enzimas antioxidantes, como la GPx. Se sintetiza *in vivo* por la acción consecutiva de dos enzimas que utilizan ATP. La γ -glutamyl-cisteína sintetasa (GCS) utiliza glutamato y cisteína para formar el dipéptido γ -glutamyl-cisteína que al final se combina con glicina en una reacción catalizada por la glutación sintetasa. (13)

Este compuesto presenta una gran variedad de funciones incluyendo participación en procesos de división y señalización celular, reparación del ADN, además se encuentra implicado en la reducción de diversos antioxidantes a su estructura original como, por ejemplo, las vitaminas E y C. La concentración más elevada de glutación se encuentra a nivel de hígado, mismo lugar de su síntesis, mientras que en los pulmones, riñones y corazón esta se reduce a cerca de la mitad. (24)

B. Coenzima Q (CoQ)

La coenzima Q está presente en las membranas celulares. Es un antioxidante lipofílico con propiedades antiinflamatorias, siendo esta la forma principal en que la encontramos en los seres humanos. La CoQ inhibe la oxidación de lípidos y proteínas y reduce la conversión del radical α -tocoferoxilo a vitamina E. Es capaz de eliminar radicales peroxilo mejorando así la función endotelial. (25)

C. Bilirrubina

Las acciones claves de la bilirrubina como antioxidante son a través de la eliminación de oxidantes, inhibiendo la oxidación de proteínas, atenuando la disfunción endotelial. Una vez formada la bilirrubina puede interactuar con radicales libres de oxígeno, produciéndose la oxidación de esta y convirtiéndose nuevamente en biliverdina detoxificando el exceso de oxidantes. Como es soluble en lípidos, puede proteger las células contra la peroxidación lipídica y los oxidantes solubles serán neutralizados o detoxificados por el glutatión mediante un ciclo que requiere dos enzimas: la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa. (26)

D. Ácido lipoico

El ácido lipoico es sintetizado por las mitocondrias. Es un cofactor de las deshidrogenasas α -cetoácidas mitocondriales (p. ej., complejo de piruvato deshidrogenasa) e inhibe el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. También es un eliminador de los radicales ONOO⁻ (peroxinitrito), HOCl (ácido hipocloroso) y ROO[•] (peroxilo). Otras acciones clave del ácido lipoico comprenden una atenuación de la disfunción endotelial, una disminución de los marcadores inflamatorios y un aumento de la actividad endotelial de la óxido nítrico sintasa (eNOS). (13)

5.1.3 Antioxidantes exógenos no enzimáticos

En este grupo se tienen los denominados antioxidantes naturales, que corresponden a compuestos presentes en alimentos como frutas y verduras; en conjunto de antioxidantes sintéticos generados en la industria farmacológica para el apoyo en la reducción de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.(14)

A. Vitamina E

La vitamina E es el antioxidante soluble en lípidos más ampliamente estudiado en humanos. Se compone de ocho compuestos isoméricos (α -, β -, γ - y δ - tocoferol; y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol). Es un compuesto bioactivo importante en la dieta humana. La mayor parte de la investigación sobre la vitamina E se ha centrado principalmente en el α -tocoferol, porque es la forma predominante en los tejidos. Numerosos estudios han demostrado los beneficios para la salud de los tocoferoles como efectos neuro protectores, cardioprotectores y antiinflamatorios. (27)

B. Vitamina C

Identificada químicamente como ácido ascórbico y desprotonada como ascorbato a pH fisiológico, es un compuesto de seis átomos de carbono similar a la glucosa que contiene dos grupos ionizantes ácidos. Corresponde a un micronutriente esencial, soluble en agua requerido en más de 60 reacciones enzimáticas, como por ejemplo siendo cofactor en la síntesis de colágeno, adrenalina (y noradrenalina), carnitina, en la hidroxilación de la prolina y biomoléculas similares (28, 29). También se encuentra involucrada en la absorción de hierro, la aminación peptídica, el metabolismo de tirosina, algunos esteroides y la hidroxilación llevada a cabo por el citocromo P450 de fármacos aromáticos y carcinógenos.

Debido a su estructura, la vitamina C funciona como un poderoso agente reductor en solución acuosa, experimentando fácilmente la oxidación reversible al ácido deshidroascórbico, que a su vez se puede descomponer de manera irreversible a ácido dicetogulónico. Como antioxidante, el ácido ascórbico es considerado como el más importante y fundamentalmente necesario en las reacciones de desintoxicación y la defensa contra algunas infecciones de carácter bacteriano. (30, 31)

C. Vitaminas del grupo B

Este grupo se encuentra compuesto por 8 vitaminas de carácter hidrosoluble: B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantoténico), B6 (piridoxina), B7 (biotina), conocida también como vitamina H, B9 (ácido fólico) y B12 (cobalamina).(32) Presentan un papel fundamental en el metabolismo de los aminoácidos esenciales, con influencia sobre la homocisteína y el glutatión. Otras actividades significativas de las vitaminas B implican la eliminación de radicales hidroxilo y peroxilo lipídico, mejorando la función endotelial y mejorando el acoplamiento de la NO sintasa endotelial a través del cofactor esencial, tetrahidrobiopterina. (13)

D. Vitamina A y Carotenoides

La vitamina A corresponde a un compuesto liposoluble, esencial para una gran cantidad de procesos fisiológicos como el metabolismo celular, reproducción, desarrollo embrionario, inmunidad y metabolismo óseo, en todos los animales vertebrados. La mayoría de los mamíferos no pueden sintetizar la vitamina A *de novo*, por lo cual es de suma importancia la ingestión de esta en estadios de maduración como retinol o provitamina A.(33) Existen dos tipos diferentes de vitamina A. El primer tipo, la vitamina A preformada, se encuentra en la carne vacuna, carne de ave, pescado y productos lácteos. El segundo tipo, la provitamina A,

se encuentra en frutas, verduras y otros productos de origen vegetal. El tipo más común de provitamina A presente en los alimentos y los suplementos dietéticos es el β -caroteno. (34)

Los carotenoides son un gran grupo de sustancias solubles en lípidos coloreadas (amarillo, naranja y rojo) como α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y licopeno que se encuentran ampliamente en frutas y verduras. (34) Eliminan los radicales libres y previenen la peroxidación de LDL (lipoproteínas de baja densidad). El β -caroteno puede disminuir los niveles de colesterol en plasma al inhibir la HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa). Además, son capaces de aumentar la actividad del receptor de LDL de los macrófagos y reducir la LDL circulante, la inflamación, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial. (35, 36)

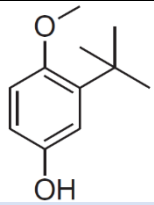
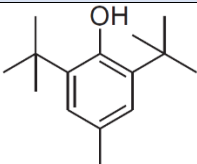
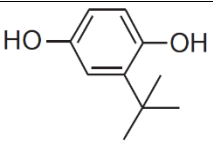
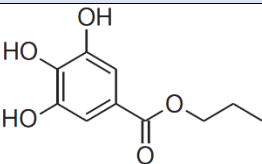
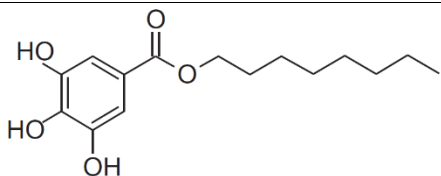
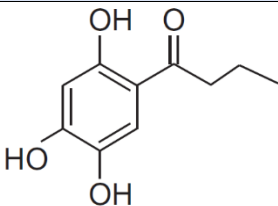
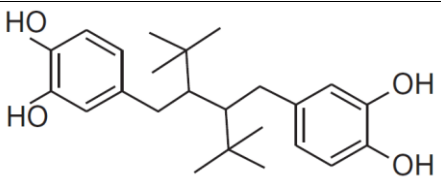
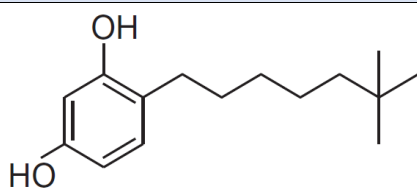
E. Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son compuestos generados a nivel industrial que presentan estructuras químicas iguales o similares a los compuestos de origen natural como las vitaminas. Estos fueron creados con el fin de medir la capacidad antioxidante de los compuestos de forma estandarizada para poder compararla entre sí y con los antioxidantes de origen natural.

Estos compuestos son agregados a diversos alimentos para que puedan soportar tratamientos y condiciones extremas, junto con prolongar su vida útil. La tabla N° 1 muestra los antioxidantes sintéticos más importantes y ampliamente distribuidos a nivel mundial, junto con los usos, mostrando que el objetivo principal que presentan estos antioxidantes corresponde a la prevención de la oxidación de los alimentos, específicamente los ácidos grasos. (37)

Dentro de los antioxidantes sintéticos, el BHT (butilhidroxitolueno) y el BHA (butilhidroxianisol) corresponden a los más utilizados, teniendo en cuenta que su presencia en los alimentos es regulada por las autoridades de seguridad alimentaria respecto a la cantidad de ingesta diaria aceptada. El TBHQ (TerButilHidroquinona), corresponde a un compuesto que estabiliza y preserva la frescura de los alimentos para animales, junto con su valor nutritivo, sabor y color. El galato de octilo es un compuesto que no representa amenaza para la salud humana y se hidroliza posterior a su consumo en ácido gálico y octanol, este último compuesto se encuentra en muchas plantas, lo cual explica el bajo riesgo de consumir este antioxidante. El NDGA (ácido nordihidroguaiarético) es un antioxidante bastante reconocido del cual existen estudios que lo identifican como el agente causal de enfermedades quísticas a nivel del riñón en roedores. (37, 38)

Tabla 1: Principales antioxidantes sintéticos y sus usos. Tomado y adaptado de Carocho, M. 2013 (37)

Antioxidante	Estructura química	Uso
Butilhidroxianisol (BHA)		Antioxidante alimentario
Butilhidroxitolueno (BHT)		Antioxidante alimentario
TerButilHidroquinona (TBHQ)		Antioxidante alimentario en comidas de animales
Galato de propilo (GP)		Antioxidante alimentario
Galato de octilo (OP)		Antioxidante alimentario y cosmético Propiedades antifúngicas
2, 4, 5 –trihidroxi–butirofenona		Antioxidante alimentario
Ácido nordihidroguaiarético (NDGA)		Antioxidante alimentario
4-hexilresorcinol		Prevención del denominado <i>food browning</i> .

F. Polifenoles

Los polifenoles se definen como compuestos que poseen un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo, y su estructura puede variar de molécula simple a polímero complejo con alto peso molecular. Existe discordancia con respecto a la forma de clasificarlos. La clasificación más adoptada implica la subdivisión de los compuestos fenólicos en dos grupos principales: flavonoides y polifenoles no flavonoides. Existe una gran cantidad de estudios que respaldan el rol importante de los polifenoles en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo (por ejemplo: especies reactivas del oxígeno y nitrógeno). (39)

Teniendo en cuenta la importancia de estos compuestos es que se abarcará el tema de forma más completa y extensa en el capítulo siguiente.

5.2. POLIFENOLES

Los polifenoles son estructuras químicas formadas por múltiples grupos fenólicos, es decir por estructuras compuestas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, considerando los derivados funcionales (éster, metil éster, glicósidos, etc.).(2) Normalmente se generan como resultado de derivados glicosilados en plantas. Estos constituyen la mayoría de los metabolitos secundarios de las plantas y también de los antioxidantes dietéticos, se componen de más de 8.000 sustancias identificadas, y pueden dividirse en grupos, según su estructura química, tales como ácido fenólico, cumarinas, ligninas y flavonoides. Su estructura posee uno o más anillos aromáticos, con uno o más grupos hidroxilo. (40)

5.2.1. Clasificación de los polifenoles

Se tiene conocimiento de más de 8000 compuestos polifenólicos, los cuales presentan una estructura química muy variada. De esta forma, se dificulta enormemente la clasificación de los compuestos. (40)

De acuerdo con el número de anillos fenólicos y la forma en que estos se unen, se presenta la clasificación de los polifenoles de la figura N°2, en la cual se incluyen: flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos. (41) Es importante destacar, que algunos autores como Zamora-Ros y col. (2014) clasifican en 4 categorías a los polifenoles debido a que los taninos corresponden a polímeros de flavonoides y ácidos fenólicos. (42)

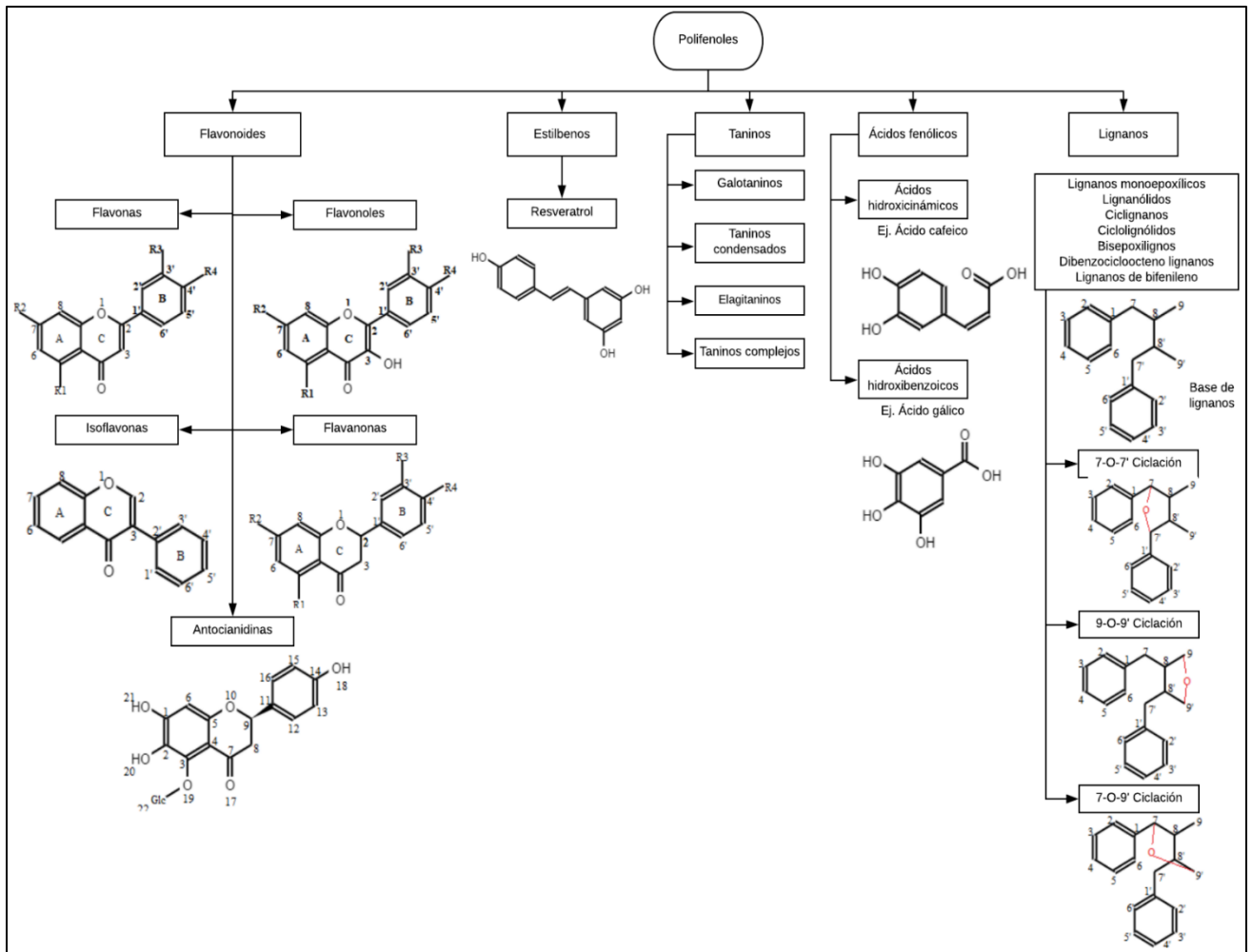


Figura 2: Clasificación de los polifenoles y ejemplos respectivos en función de su estructura química. Tomado y adaptado de Chen, L. 2019(41)

Otros autores clasifican a los polifenoles en una mayor cantidad de grupos, en base a la cantidad de átomos de carbono presentes en la estructura química, como es el caso de Harbone (2) cuya clasificación data de 1989 y presenta 10 subgrupos como por ejemplo: fenoles simples, flavonoides, ácidos fenólicos, xantonas, ligninas, entre otros. (Tabla 2)

Tabla 2: Clasificación de polifenoles en función de la estructura química por Harborne (1989). Tomada de Kaur, C. 2001 (2)

Nº de átomos de Carbono	Esqueleto	Clase
6	C ₆	Fenoles simples, Benzoquinonas
7	C ₆ – C ₁	Ácidos fenólicos
8	C ₆ – C ₂	Acetofenona, ácido fenilacético
9	C ₆ – C ₃	Acidohidroxicinámico, cromonas, cumarinas, isocumarinas, polipropenos
10	C ₆ – C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ – C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ – C ₂ -C ₆	Estilbenos, antraquinonas
15	C ₆ – C ₃ -C ₆	Flavonoides, isoflavonoides
18	(C ₆ – C ₃) ₂	Lignanós, neolignanós
30	(C ₆ – C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides
N	(C ₆ – C ₃) _n (C ₆) _n (C ₆ – C ₃ -C ₆) _n	Lignanós Catecolmelanina Taninos condensados

Dentro de los polifenoles, los ácidos fenólicos y los flavonoides corresponden a los compuestos más abundantes en los alimentos, siendo los últimos los más estudiados a nivel mundial.(41)

A. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son los más comunes polifenoles en la dieta humana. Son un grupo de compuestos derivados del ácido benzoico y ácido hidroxicinámico con uno o más sustituyentes del OH en el anillo aromático (Figura 3). Dentro de estos se encuentran los denominados fenoles simples, que son aquellos cuyo esqueleto está formado por 6 átomos de carbono en su estructura (por ejemplo, fenol, cresol y timol), mientras que otros grupos

están formados por una estructura de carbono C6-C1 (por ejemplo, ácido gálico, vainílico y siringo) y aldehídos (por ejemplo, vainillina), una estructura C6-C2 (por ejemplo, ácido fenilacético y acetofenonas) o una estructura C6-C3 (como derivados fenilpropanoide), representados principalmente por ácidos hidroxicinámicos, tales como ácidos p-cumarico, ferúlico y cafeico. (43, 44)

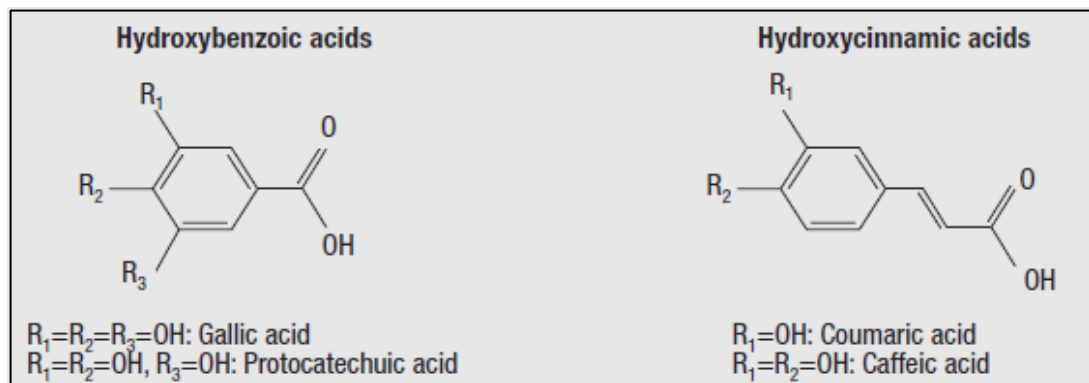


Figura 3: Estructura química modelo de los ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico (izquierda) y ácido hidroxicinámico (derecha). Tomado y adaptado de D' Archivio, M. (2007) (45)

B. Lignanos

Los lignanos se producen por dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano (Figura 4); en su mayoría están presentes en la naturaleza en forma libre, mientras que sus derivados de glucósidos son solo una forma menor. Estos compuestos se originan en el metabolismo de la L- fenilalanina. (46)

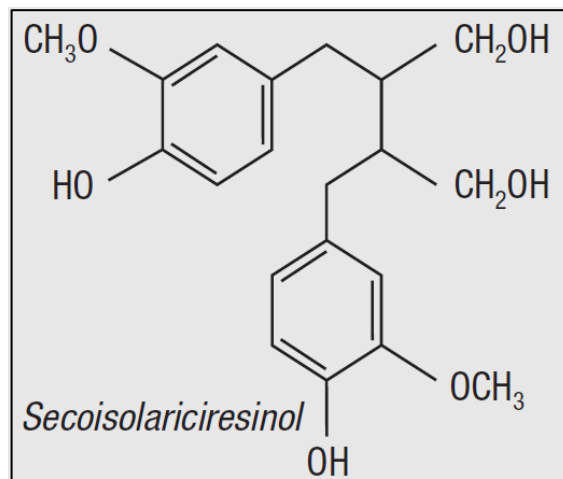


Figura 4: Estructura química de un ejemplo de lignano: Secoisolariciresinol diglucósido. Tomado y adaptado de D' Archivio, M. (2007) (45)

La linaza representa la principal fuente dietética, la microflora intestinal metaboliza los lignanos a enterodiol y enterolactona. Las bajas cantidades de lignanos normalmente contenidos en la dieta humana no tienen en cuenta las concentraciones de los metabolitos enterodiol y enterolactona medidos en plasma y orina. Por lo tanto, hay otros lignanos de origen vegetal, precursores de enterodiol y enterolactona, que aún no se han identificado (47, 48).

El interés en los lignanos y sus derivados sintéticos está creciendo debido a las posibles aplicaciones en la quimioterapia contra el cáncer y varios otros efectos farmacológicos (45). Los compuestos que contienen dos monómeros fenilpropanoides unidos por un enlace entre los carbonos C8 y C8 'se denominan "lignanos". Si falta dicho enlace y se reemplaza por cualquier otro tipo de conexión, incluido el enlace etéreo de oxígeno, los compuestos se denominan "neolignanos". (46)

C. Estilbenos

Los estilbenos son un grupo de fitoalexinas formadas por un esqueleto de carbono C6 – C2 – C6. Dentro de este grupo, el resveratrol representa el principal estilbeno dietético, con sus isómeros *cis* y *trans*, junto con sus derivados conjugados (Figura 5) (1)

Las cantidades de estilbenos presentes en la dieta humana son bajas. En el caso del resveratrol, es un compuesto producido por las plantas en respuesta a la infección por patógenos o a una variedad de condiciones de estrés (49, 50). Se ha detectado en más de 70 especies de plantas, incluidas uvas, bayas y maní. La piel fresca de las uvas rojas es particularmente rica en resveratrol (50-100 g/kg de peso neto) que contribuye a una concentración relativamente alta de resveratrol en vino tinto y jugo de uva (hasta 7 mg de agliconas/L y 15 mg glucósidos/L en vino tinto). (49)

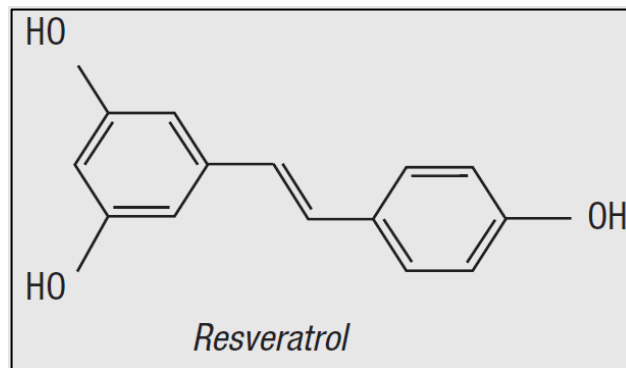


Figura 5: Estructura química de un ejemplo de estilbeno: Resveratrol. Tomado y adaptado de D' Archivio, M. (2007) (45)

D. Taninos

Los taninos hidrolizables se dividen en dos subclases: galotaninos y elagitaninos. El núcleo de la molécula de tanino hidrolizable está formado por un carbohidrato, generalmente D-glucosa, donde sus grupos hidroxilo están parcial o totalmente esterificados por un ácido fenólico, como el ácido gálico o el ácido elágico. (40)

En los galotaninos, el ácido gálico es el ácido fenólico predominante, mientras que los elagitaninos son diferentes combinaciones de ácido gálico y ácido hexahidroxidifenico con glucosa, lo que resulta en una amplia gama de estructuras tales como monómeros y oligómeros. (44)

E. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. (51)

5.3. FLAVONOIDES

Los flavonoides en la dieta representan una amplia gama de compuestos polifenólicos que están presentes en muchas frutas, verduras, granos, hierbas y bebidas que se consumen comúnmente. (51)

Estos compuestos se caracterizan estructuralmente por un esqueleto de carbonos común de difenilpropanos, dos anillos de benceno (A y B) unidos por un puente lineal constituido por tres carbonos (C6-C3-C6). La cadena central de 3 carbonos puede formar un anillo pirano (C) cerrado con uno de los anillos de benceno. (Fig.6) (1, 45)

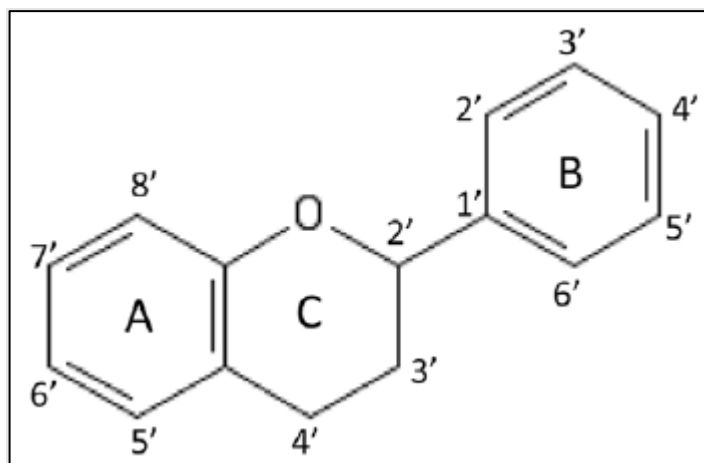


Figura 6: Estructura química básica de los flavonoides. Tomado y adaptado de Santhakumar, A. (2018) (1)

En la mayoría de los casos, el esqueleto del flavonoide básico puede presentar tres o más grupos hidroxilos (OH) vinculados a su estructura principal. Los flavonoides pueden aparecer como agliconas o como conjugados con azúcares y/o ácidos orgánicos. Los flavonoides derivados de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina son compuestos

por 15 carbonos dispuestos en tres anillos (C6-C3-C6); el grado y el patrón de las reacciones de hidroxilación, lipidación, alcalinización o glucosilación modifican la estructura primaria de la molécula. La sustitución de grupos químicos en las estructuras flavonoides se correlaciona con las propiedades biológicas y/o químicas correspondientes y su biodisponibilidad y bioaccesibilidad. (1, 39, 45)

Una amplia gama de actividades farmacológicas, que incluyen efectos antioxidantes, antibacterianos, hepatoprotectores, antiinflamatorios y antihiperlipidémicos, se atribuyen a los flavonoides. (39)

5.3.1 Clasificación de los flavonoides

Los flavonoides se dividen en 6 subclases, dependiendo del estado de oxidación de la central anillo pirano. Estas corresponden a flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas) (45). Más de 4000 flavonoides han sido identificados en plantas, y la lista es en constante crecimiento (52). Esto se debe a la ocurrencia de numerosos patrones de sustitución en los que los sustituyentes primarios (como grupo hidroxilo) pueden estar sustituidos (es decir, adicionalmente glicosilado o acilado, produciendo estructuras altamente complejas.(45)

A. Flavonoles

Los flavonoles son una clase de flavonoides caracterizados por un esqueleto de 2-fenil-1-benzopirano-4-ona. Se caracterizan estructuralmente por una insaturación (presencia de doble enlace) entre los carbonos C2 y C3 del anillo C, un grupo cetona en C4 y un grupo OH en la posición 3 del anillo (Figura 7). Representan los flavonoides más ubicuos en los alimentos, con la quercetina como el compuesto más representativo. Además, se tiene como

representantes de este grupo a kaempferol, isorhamnetina y miricetina, que típicamente se identifican como glucósidos con conjugaciones que pueden ocurrir en las posiciones 5, 7, 3', 4 'y 5' (Figura 6). (1, 45)

Las principales fuentes de flavonoles son las cebollas (hasta 1,2 g/kg de peso fresco), la col rizada, el puerro, el brócoli y los arándanos. El té y el vino tinto también contienen hasta 45 mg y 30 mg de flavonoles/L, respectivamente. Es importante tener en cuenta que la biosíntesis de flavonoles es estimulada por la luz, por lo que se acumulan en el tejido externo y aéreo de las frutas. Curiosamente, pueden existir diferencias en la concentración entre frutas en el mismo árbol e incluso entre diferentes lados de una sola pieza de fruta, dependiendo de la exposición a la luz solar.(53-55)

B. Flavonas

Las flavonas se caracterizan por la presencia de un doble enlace entre C2 y C3, y la unión del anillo B a C2 (Figura 6 y 7). Las principales flavonas dietéticas incluyen apigenina, luteolina y crisina. Además, se ha informado una amplia gama de sustituciones en este grupo de compuestos, en base a reacciones como hidroxilaciones, metilaciones, glicosilaciones y alquilaciones. (44)

Algunos compuestos, como la crisina, la acacetina, la hispidulina y la tricina se detectan en el apio, el perejil y algunas otras hierbas. Otras hierbas contienen pequeñas cantidades de vitexina, isovitexina, orientina, entre otras flavonas. Comparativamente, las flavonas reemplazadas por polimetoxilación (flavonas metoxiladas) a menudo se encuentran en las cáscaras de cítricos, como la nobiletina y la tangeretina.(45, 55)

C. Antocianidinas

Las antocianinas o antocianidinas son glucósidos de antocianidina, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, conocida como la aglicona unida a un azúcar a través de un enlace glucosídico. Están compuestas por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una cadena de 3 carbonos (Figura 6 y 7). (56) Las antocianinas más importantes son pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina y nacen por modificaciones estructurales a nivel del anillo B de la estructura primaria. La combinación de estos con diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. Los carbohidratos que se unen principalmente a estas agliconas son glucosa y ramnosa, seguidos de galactosa, xilosa y arabinosa, ocasionalmente la gentiobiosa, rutinosa y soforosa. (44, 57, 58).

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua en las plantas que contribuyen a los colores brillantes de azul, rojo y malva en las flores, frutos y hojas. (59) El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo (grupo metilo unido a oxígeno) de la molécula. La naturaleza iónica de las antocianinas permite cambios en la estructura molecular de acuerdo con el pH predominante, lo que resulta en diferentes colores y matices. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. El malonil-COA y el p-coumaroil-COA son necesarios para la síntesis de antocianinas. El color rojo de la fruta de frambuesa está relacionado con su composición de antocianinas. (55, 56)

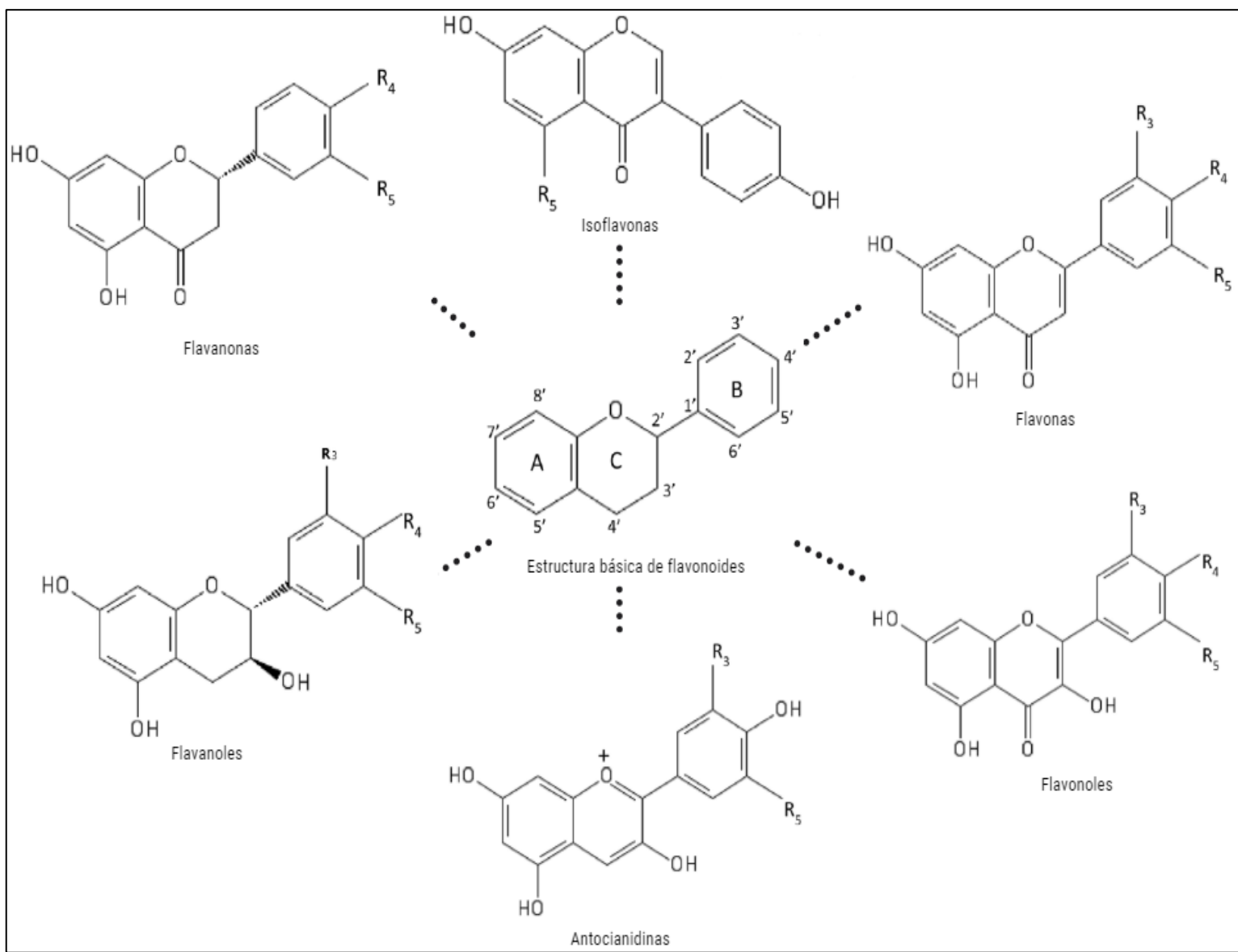


Figura 7: Estructuras químicas de los flavonoides: Flavonoles, Flavonas, Antocianidinas, Flavanoles, Flavanonas, Isoflavonas. Tomado y adaptado de Santhakumar, A. (2018) (1)

D. Flavanoles

Los flavanoles o también denominados Flavan-3-oles no existen en plantas naturales como glucósidos, pero son la subclase más compleja de flavonoides, que van desde los monómeros simples hasta los taninos condensados de las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas. Forman un grupo heterogéneo de flavonoides donde se incluyen catequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina, proantocianidinas, teaflavinas y tearubiginas.(1, 44, 55, 60, 61)

Se ha informado ampliamente que estos compuestos exhiben muchos efectos beneficiosos para la salud al actuar como agentes antioxidantes, quimiopreventivos e inmunorreguladores (62, 63). Los dos átomos de carbono quirales de C2 y C3 de flavan-3-ol monomérico (Figura 7) tienen cuatro isómeros para cada nivel de hidroxilación unida en el anillo B, como epicatequina y catequina que tienen una amplia distribución en la naturaleza, mientras que otros son de limitada distribución. Los pares de enantiómeros se pueden resolver mediante cromatografía quiral, pero no son sensibles a la HPLC inversa, que en consecuencia se ignoran fácilmente.(55)

E. Flavanonas

Las flavanonas consisten en una amplia gama de compuestos caracterizados por un centro quiral en la posición C-2 y la ausencia de doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (Figura 7). En las plantas, se encuentran principalmente como enantiómeros donde el anillo C está unido al anillo B en la posición C-2 (44, 45, 64).

Generalmente las flavanonas se encuentran como una forma glucosilada con un disacárido en la posición C-7 para dar glucósidos de flavanona, aunque también se presentan como

derivados hidroxilos o metilados. Estos compuestos se encuentran en una alta concentración en los cítricos. El glucósido de flavanona más común es la hesperetina-7-O-rutinósido (hesperidina). Algunos glucósidos de flavanona como los 7-rutinósidos son insípidos, en contraste con la neohesperidina, naringina y la hesperetina que tienen un intenso sabor amargo aislado de naranjas amargas y toronja (65). Hasta hace unos años, después del consumo, las flavanonas en la dieta, se consideraban mal utilizadas por el cuerpo humano, y solo cantidades relativamente pequeñas de la dosis ingerida ingresaban a la circulación sistémica. (55)

F. Isoflavonas

Las isoflavonas difieren de las flavonas en la ubicación del grupo fenilo. Tienen el anillo B unido en C-3 en lugar de en la posición C-2 como las flavonas (Figura 7). (44) Se encuentran casi exclusivamente en plantas leguminosas con cantidades de daidzeína y genisteína presentes en la soya, como glucósidos con cantidades más bajas de los correspondientes. Durante el procesamiento de productos como manufacturas de leche de soya y tofu, el contenido de isoflavonas puede reducirse ya que se transforman principalmente en glucósidos de isoflavona. (66) Los productos de soya fermentados pueden ser ricos en algiconas como resultado de la hidrólisis de los glucósidos, mientras que los productos cuya fabricación implica calentamiento, como la leche de soya y el tofu, contienen cantidades reducidas de isoflavonas, principalmente en forma de daidzeína y glucósidos de genisteína. (67) En las plantas de leguminosas, la enzima 2-hidroxiisoflavanona sintasa introduce la vía biosintética de isoflavona. (55)

Debido a su similitud estructural con el estrógeno, las isoflavonas se clasifican como fitoestrógenos, al igual que los lignanos no flavonoides, que son un grupo diverso de compuestos que se encuentran en altas concentraciones, principalmente en los cereales y pueden actuar como agonistas y antagonistas de estrógenos que compiten por el estradiol en el complejo del receptor (68).

5.4. BIOACCESIBILIDAD

5.4.1 Concepto de Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad según Shim y col. (2009) se define como la cantidad de una sustancia química que es liberada de los alimentos al fluido del tracto gastrointestinal después de una digestión simulada y, como resultado, está disponible para su absorción por la mucosa intestinal. (69) El término según Galanakis (2016) incluye transformaciones digestivas de los alimentos en materiales listos para la asimilación, la absorción o asimilación en las células del epitelio intestinal, así como el metabolismo presistémico, intestinal y hepático. (70)

Las sustancias deben ser bioaccesibles antes de que puedan convertirse en biodisponibles para las personas. La bioaccesibilidad es un aspecto importante que se ha de considerar en relación con las partículas de los alimentos, dado que las presentes en su interior pueden nunca llegar a ser bioaccesibles. Las especies elementales que son bioaccesibles sobre la superficie de las partículas o en solución pueden estar disponibles si existen mecanismos para su absorción por células vivas. La velocidad de su absorción por las células suele estar en relación con la concentración externa de iones libres con propiedades adecuadas o bien con especies inorgánicas lábiles. Sin embargo, en determinadas circunstancias los complejos orgánicos de un elemento pueden facilitar su absorción. Además, el lugar en el que las partículas tienen un contacto prolongado con los tejidos, como el epitelio alveolar de los pulmones, se puede convertir en un foco de exposición y toxicidad crónica. (71)

Los sistemas de absorción nunca son totalmente específicos de un solo elemento y en ellos se produce a menudo competencia entre especies químicas semejantes de elementos diferentes, con el resultado de la inhibición de la absorción de elementos esenciales y la absorción de elementos competidores potencialmente tóxicos. Debido a estas interacciones

competitivas, las proporciones de iones controlan con frecuencia la absorción celular de elementos tóxicos y nutrientes. (71)

5.4.2 Bioaccesibilidad de polifenoles y flavonoides

Un parámetro esencial que limita la actividad biológica de los polifenoles es su bioaccesibilidad, que determina la proporción de polifenoles liberados de la matriz alimentaria durante la digestión.(72) Los polifenoles se solubilizan en los líquidos digestivos y posteriormente pueden ser absorbidos y metabolizados. Por lo anterior, la bioaccesibilidad de los polifenoles es un factor clave para la expresión de sus características protectoras de la salud. La importancia de la interacción entre la matriz alimentaria y los polifenoles (incluidos los flavonoides) durante la digestión ha sido bien estudiada y documentada ampliamente en los últimos años. (73) Se considera que la mayoría de los polifenoles (con algunas excepciones) son moderada o altamente solubles en agua. Esta propiedad indica que su bioaccesibilidad no depende de la micelización, sino más bien de la liberación de la matriz y su solubilización en la fase acuosa, porque ciertos polifenoles pueden estar formando complejos con minerales y/o proteínas o enzimas alimentarias. (72)

5.4.3 Factores que afectan la bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad de los polifenoles está influenciada por muchos factores, como el estado químico del compuesto, la matriz alimentaria, las interacciones con otros componentes o la presencia de supresores o cofactores, etc. Solo sustancias liberadas de la matriz alimentaria en el intestino delgado y grueso son digeridas. Los compuestos fenólicos se encuentran en los alimentos principalmente como ésteres, glucósidos y polímeros que no pueden ser absorbidos en estas formas nativas. (74)

A. Matriz alimentaria

La matriz alimentaria puede presentarse en diversos estados, tal como puede ser líquida, sólida o una espuma, presentarse como una emulsión, una suspensión o un gel, entre otras formas. Además, logra interactuar con múltiples componentes, pudiendo ser de forma fuerte o débil con los compuestos bioactivos de interés y verse afectada por el procesamiento de los alimentos.(75)

En los últimos años, se ha dado mucha importancia a la influencia de los componentes o características de la matriz en la bioaccesibilidad de los polifenoles y flavonoides. Comenzando con la ingestión y la digestión de un alimento, la matriz alimenticia puede influir en la bioaccesibilidad de los polifenoles porque la cantidad que se libera dentro de la matriz influirá en la fracción que está disponible para la absorción intestinal. (76)

La matriz alimentaria se caracteriza por varios componentes, que incluyen composición, pH, procesamiento, estructura, y viscosidad. (77) Estos componentes afectan en la bioaccesibilidad de los polifenoles. En la figura 8 se ilustran las características de la matriz alimentaria que presentan un efecto, ya sea positivo (un aumento) o negativo (una disminución) en la bioaccesibilidad. El tipo de matriz alimenticia (sólida o líquida) influye significativamente, ya que se ha informado que la absorción intestinal de los compuestos bioactivos de los jugos de frutas es incluso mejor que la que proviene directamente de las frutas sólidas. (78) Por otro lado, el procesamiento como el tratamiento térmico y la fermentación de los alimentos podrían influir en la bioaccesibilidad de los compuestos a través del cambio en la matriz natural de ellos (es decir, pH, viscosidad, etc.) o en su microestructura (es decir, la ruptura de la pared celular , liberación de compuestos delimitados, cambios en su solubilización, etc.). (77)

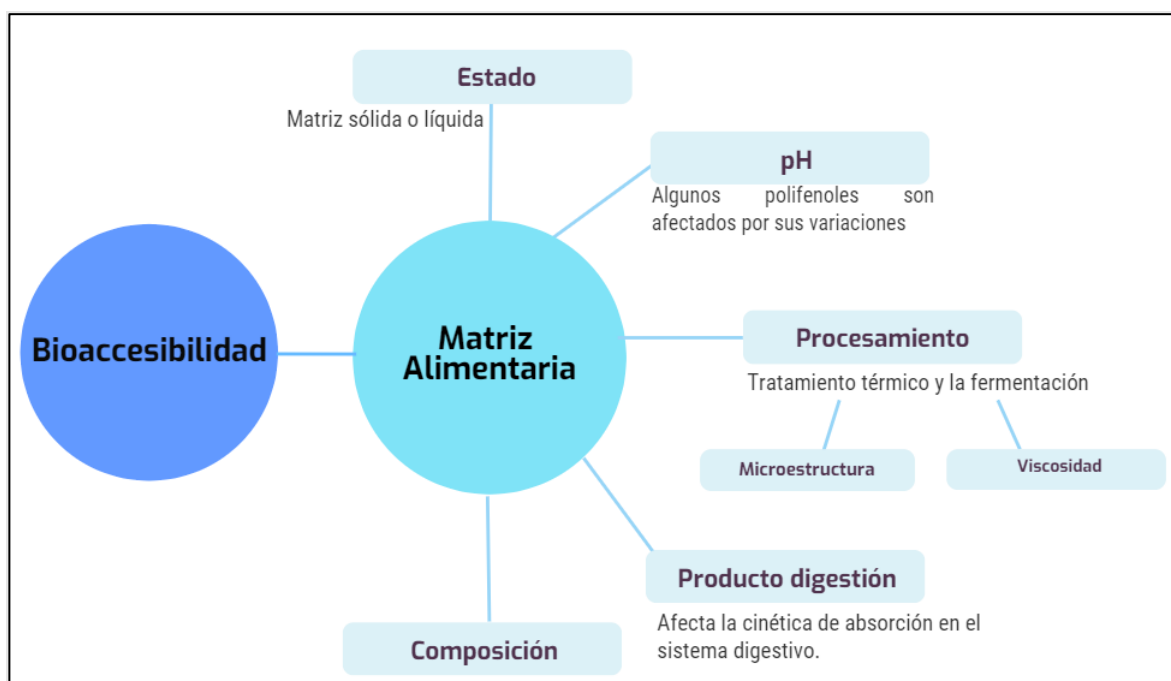


Figura 8: Características de matriz alimentaria que afectan en la bioaccesibilidad de los polifenoles. Fuente: Elaboración propia Barrios, I. Bravo, J. (2020)

En el caso de una matriz alimentaria vegetal, es importante indicar que las paredes celulares de las plantas actúan como una barrera para la digestión. Cuando una célula vegetal se rompe (por masticación o trituración), los compuestos fenólicos pueden asociarse con fibras dietéticas, lo que conduce a una modulación de sus bioaccesibilidades relativas. Las fibras dietéticas son los principales portadores de compuestos fenólicos y, por lo tanto, influyen en su bioaccesibilidad, ya que los polifenoles atrapados en fibra son poco extraíbles y apenas solubles en los fluidos gastrointestinales. Las proantocianidinas de alto peso molecular y los taninos hidrolizables pueden unirse fuertemente a las fibras dietéticas, lo que restringe su bioaccesibilidad. Es de destacar que los polisacáridos solubles e insolubles pueden unirse a compuestos fenólicos y limitar su difusión, junto con el contacto sustrato-enzima durante la digestión gastrointestinal, al tiempo que aumenta la viscosidad del medio.

(74)

B. Influencia del procesamiento de alimentos e interacciones con otros alimentos

La cantidad de compuestos fenólicos de la matriz alimentaria puede alterarse según la composición de los alimentos, la forma en que se procesa y la interacción con otros componentes en la alimentación. El tratamiento térmico puede mejorar la bioaccesibilidad de los polifenoles, pero con un efecto negativo en la concentración de estos, debido a que por un lado genera la interrupción del tejido vegetal y la desnaturalización de los complejos de polifenoles y polisacáridos, pero, por otro lado, puede causar la degradación térmica de los compuestos. (74)

En cuanto a la interacción de los compuestos fenólicos con otros componentes alimentarios, esta puede modificar su bioaccesibilidad. Estudios han demostrado que la capacidad de extracción de ácidos fenólicos, flavonoides y proantocianidinas parece mejorar en presencia de grasa, aumentando 1,5 a 3 veces la cantidad extraída para el licor de cacao, cuyo contenido de grasa corresponde a un 50%, en comparación con el polvo de cacao que presenta un 15% de grasa. (79) Otro ejemplo del efecto de las interacciones entre los polifenoles y componentes alimentarios a la bioaccesibilidad, corresponde a la unión de proteínas de la leche y huevo con estructuras fenólicas. Es importante destacar que la capacidad de unión entre proteínas y polifenoles se ve afectada por características de ambos compuestos, así algunos polifenoles se pueden asociar a las caseínas de la leche en lugar de la β -lactoglobulina, generando un complejo de relativa estabilidad en etapas gástricas e intestinales simuladas. (80)

Otro proceso que afecta la bioaccesibilidad consiste en la oxidación. Según estudios gran parte los flavanoles de té verde son muy propensos a la oxidación, desapareciendo en la fase intestinal durante la digestión in vitro. Junto a lo anterior, se observa con la adición de ácido ascórbico puro y/o proteínas como las presentes en leche de bovino, arroz y soya un efecto protector frente a la oxidación del procesamiento digestivo, el cual puede ser revertido

parcialmente al aumentar el contenido de enzimas digestivas, lo que sugiere interacciones no covalentes entre las proteínas y los flavanoles de té.(74)

5.4.4 Digestión y relación con biodisponibilidad

En general, la digestión puede describirse como un proceso complejo en el que los nutrientes de los alimentos están sujetos a procesos que conducen a su uso para la energía, el crecimiento y la reparación celular. Los procesos tienen lugar en el tracto digestivo, que puede describirse como un tubo largo y retorcido que comienza en la boca y termina en el ano. Este se puede dividir en varias partes, cada una de las cuales es necesaria para una digestión adecuada, incluyendo la boca, el esófago, el estómago, el intestino (grueso y delgado) y el ano. (81) Además de las partes mencionadas anteriormente, los órganos accesorios, como las glándulas salivales, el hígado, páncreas y la vesícula biliar desempeñan papeles indispensables en el proceso de digestión en el que las proteínas se descomponen en aminoácidos, las grasas se reducen a ácidos grasos y el glicerol o los carbohidratos se convierten en azúcares simples, mientras que las moléculas restantes (p. ej., metabolitos secundarios como los polifenoles y flavonoides), dependiendo de la estructura y el carácter químico, se transforman en otras moléculas que pueden ingresar a circulación sistémica. (74)

La Figura 9 describe el proceso de digestión relacionado a los polifenoles e indica el límite entre los conceptos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Las primeras etapas de la digestión (masticación y gástrica) corresponden a procesos asociados a bioaccesibilidad, ya que determinan la fracción máxima de polifenoles y flavonoides que pueden ingresar a circulación y la etapa intestinal donde ocurre la absorción y posterior paso a sangre se asocia al concepto de biodisponibilidad porque se determina la real cantidad de polifenoles y flavonoides que se absorbieron a nivel gastrointestinal. (72, 74)

En la boca ocurre el primer evento de asimilación de los compuestos fenólicos a través de la masticación. A este nivel los alimentos están sujetos a numerosos procesos químicos, bioquímicos y mecánicos, pudiendo sufrir cambios en pH, fuerza iónica, temperatura, interacciones con biopolímeros en la saliva (mucina), con receptores sensoriales de la lengua y la boca; más la acción de varias enzimas digestivas (especialmente lipasa lingual, amilasa, proteasa) y la reducción del tamaño de partícula en el bolo alimenticio. El efecto del sabor astringente, el nivel de glicosilación y la interacción con las enzimas de la saliva ayudan a la liberación de los compuestos fenólicos. El rompimiento de los restos glucosídicos de los compuestos fenólicos comienza en la boca con la acción de la β -glucosidasa bacteriana (74, 82).

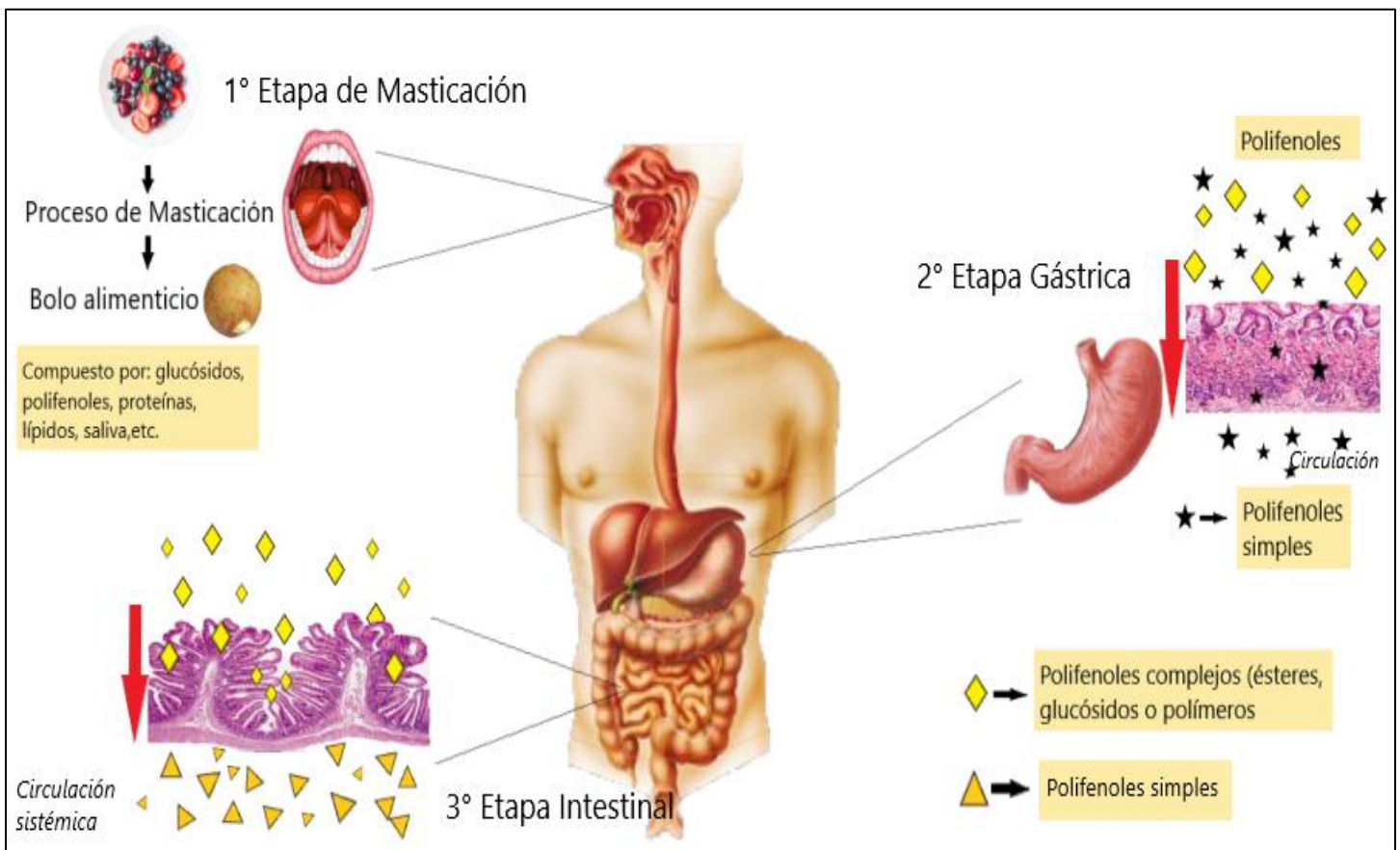


Figura 9: Etapas del proceso digestivo asociado a polifenoles, bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Fuente: Elaboración propia Barrios, I. Bravo, J. (2020).

Posteriormente los compuestos fenólicos dentro del bolo alimenticio pasan al estómago, iniciándose la etapa gástrica. A este nivel algunos elementos de estructuras más simples pueden ser liberados y se encuentran disponibles para una absorción a nivel gástrico. (82) Esta etapa de digestión es un proceso complejo que incluye acciones mecánicas y la actividad de los fluidos gástricos. La tasa de secreción de jugo gástrico varía en condiciones de ayuno y después de la ingesta de alimentos, este jugo contiene ácido clorhídrico, pepsinógenos, lipasa, moco, electrolitos y agua. Las ondas peristálticas que se originan en el estómago participan en la reducción del tamaño de los alimentos sólidos hasta un diámetro de 1 a 2 mm. El vaciado del estómago es un paso crítico en el proceso de digestión. El pH gástrico en ayuno está en el rango de 1,3 a 2,5. (74) La ingesta de una comida generalmente aumenta el pH a más de 4,5 dependiendo de la capacidad de amortiguación de los alimentos. La mayoría de los lípidos de la dieta están presentes como gotas emulsionadas indicándose que la lipólisis gástrica puede ayudar a aumentar la emulsificación en el estómago, lo que mejoraría la bioaccesibilidad. En esta etapa se genera una absorción de algunos polifenoles, los que pueden ingresar a circulación y posteriormente generar un efecto protector antioxidante, pero el ingreso de una mayor cantidad de los polifenoles es llevado a cabo en la etapa final del proceso de digestión, denominada etapa intestinal. (55)

La etapa intestinal, tal como se indicó anteriormente corresponde al proceso de absorción que presenta gran relevancia en la biodisponibilidad de polifenoles y flavonoides. Al pasar al intestino delgado, algunos compuestos fenólicos se vuelven inestables por causa del pH intestinal (alcalino), por lo que puede disminuir su biodisponibilidad (por ejemplo, antocianinas, flavonoles, etc.) (83). Los compuestos fenólicos pasan del lumen intestinal al citosol de los enterocitos a través de diferentes mecanismos: difusión pasiva, transporte activo, transporte paracelular y difusión facilitada. (82)

Es importante destacar que la mayor parte de los polifenoles se presentan en los alimentos en formas que no pueden ser absorbidas directamente, por lo que previo a su absorción, estos compuestos deben ser hidrolizados por las enzimas intestinales o por la microbiota colónica. (45)

5.5. BIODISPONIBILIDAD

5.5.1. Concepto de biodisponibilidad

Al recomendar el consumo de algún alimento con una elevada concentración de antioxidantes es importante evaluar la real proporción de antioxidantes que llegarán a circulación sistémica y podrán tener su efecto protector, es decir, su biodisponibilidad.(84)

El concepto de biodisponibilidad puede ser definido de diferentes formas. Una de las definiciones más aceptadas corresponde a la proporción del nutriente que se digiere, se absorbe y es metabolizado a través de vías normales. (45) Es por esto, que los componentes más abundantes en polifenoles y flavonoides, no siempre son los más activos en el organismo, ya sea porque tienen una menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente.(85)

En consecuencia, no solo es importante saber la cantidad total del nutriente que se encuentra presente en un alimento, ingrediente alimentario o suplemento dietético, sino aún más importante es saber la cantidad que está biodisponible de este. (86)

5.5.2. Biodisponibilidad de polifenoles

Durante los últimos años se ha conocido de forma más completa el metabolismo de los polifenoles. Algunos pueden ser absorbidos por el intestino delgado; sin embargo, la mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos en forma de ésteres, glucósidos o polímeros que no pueden ser absorbidos en la forma nativa. (45)

A. Absorción intestinal

Antes de la absorción, los polifenoles deben ser hidrolizados por enzimas intestinales o por la microbiota colónica. Durante el curso de la absorción intestinal, estos compuestos sufren extensas modificaciones; de hecho, se conjugan en las células intestinales y luego en el hígado por metilación, sulfatación y/o glucoronización. Como consecuencia, los compuestos derivados que alcanzan la sangre y los tejidos son diferentes de los presentes en los alimentos y es muy difícil identificar todos los metabolitos y evaluar su actividad biológica (87).

La estructura química de los polifenoles, más que la concentración en los alimentos determina la velocidad, el grado de absorción y la naturaleza de los metabolitos que circularán en el plasma. Los polifenoles más comunes en nuestra dieta no son necesariamente los que conducen a las concentraciones más altas de metabolitos activos en los tejidos blanco; en consecuencia, las propiedades biológicas difieren mucho entre los compuestos.(45)

La evidencia de la absorción de los polifenoles a través de la barrera intestinal está dada de forma indirecta por el aumento en la capacidad antioxidante del plasma después del consumo de alimentos ricos en polifenoles (88, 89). Se ha obtenido evidencia más directa sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos midiendo su concentración en plasma y orina después de la ingestión de compuestos puros o alimentos con contenido conocido de los compuestos de interés.(45)

5.5.3 Biodisponibilidad de flavonoides

En los alimentos, todos los flavonoides, excepto los flavanoles, existen en formas glicosiladas. El destino de los glucósidos en el estómago aún no está claro. La mayoría de los glucósidos probablemente resisten la hidrólisis ácida en el estómago y, por lo tanto, llegan intactos al intestino donde solo se pueden absorber las agliconas y pocos glucósidos. (45)

Tal como se mencionó anteriormente la mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, que no pueden ser absorbidos en la forma nativa. Por lo tanto, estas sustancias deben ser hidrolizadas por enzimas intestinales, como las β -glucosidasas u otras enzimas o por la microbiota colónica, antes de que puedan ser absorbidas (90).

La glicosilación influye en la absorción, pero generalmente no influye en la naturaleza de los metabolitos circulantes. Los glucósidos intactos de algunos flavonoides no se recuperan en plasma u orina después de su ingestión como compuestos puros o de alimentos complejos. Las antocianinas representan una excepción, de hecho, los glucósidos intactos son las formas circulantes más representativas. La explicación de esto puede estar en la inestabilidad de las formas de aglicona o en mecanismos específicos de absorción o metabolismo de las antocianinas. (45)

En el caso de la quercetina, un flavonol, la glicosilación facilita su absorción; aumentando la eficiencia de absorción de glucósidos de quercetina frente a las agliconas de este flavonoide. Se sugiere que los glucósidos podrían ser transportados a los enterocitos por el transportador de glucosa dependiente de sodio SGLT1, y luego hidrolizados por una β -glucosidasa citosólica (90, 91).

En el caso de las isoflavonas, el efecto de la glucosilación en la absorción es menos claro. En cuanto a las antocianidinas, se tiene que difieren de la mayoría de los polifenoles en su naturaleza polimérica y alto peso molecular, siendo estas características las que limitan su absorción intestinal. (45)

Algunos flavonoides al igual que los ácidos hidroxicinámicos (ácidos fenólicos), cuando son ingeridos en forma libre, son rápidamente absorbidos por el intestino delgado y se conjugan. Sin embargo, estos compuestos están esterificados de forma natural en productos vegetales, lo que dificulta su absorción porque la mucosa intestinal, el hígado y el plasma no poseen esterasas capaces de hidrolizar siendo posible la hidrólisis solo por parte de la microbiota colónica.(90)

Los polifenoles que no se absorben en el intestino delgado llegan al colon, donde la microflora hidroliza los glucósidos en agliconas y metaboliza ampliamente las agliconas en varios ácidos aromáticos. Se sabe que la microbiota intestinal afecta el metabolismo de los glucósidos de isoflavonas, ya que se hidrolizan a agliconas o se transforman en metabolitos activos.(45)

5.5.4 Factores que afectan la biodisponibilidad.

La biodisponibilidad de los polifenoles se puede ver afectada por una gran cantidad de factores, como la estructura química del compuesto, la interacción con otros compuestos, el procesamiento de los alimentos, la interacción entre los alimentos, el metabolismo y absorción de los individuos, además de los cambios en la dieta en cada país y cada temporada.(92)

Tabla 3: Factores que pueden afectar la biodisponibilidad de compuestos fenólicos en la dieta. Tomado y adaptado de Gutiérrez, E. 2016 (92)

Factores relacionados con los compuestos fenólicos	Estructura química	El grado de solubilidad, las estructuras químicas, los enlaces con azúcares (glucósidos), grupos metilos, etc.
	Interacción con otros compuestos	Los enlaces con proteínas (albúmina) o con polifenoles con mecanismos de absorción similar.
Factores relacionados con la comida.	Procesamiento de alimentos	Tratamientos térmicos, liofilización, cocción y métodos de preparación culinaria, además del almacenamiento.
	Interacción alimentaria	Presencia de matriz alimentaria, la absorción, los factores pueden actuar de forma positiva o negativa (grasa, fibra, etc.)
Factores relacionados con el individuo.	La ingesta dietética	Existen diferencias entre países y estaciones del año, cantidad y frecuencia de la exposición al compuesto, además de la dosis (dosis única o de múltiples)
	Absorción y metabolismo	Factores intestinales (actividad enzimática intestinal, tiempo de tránsito, microflora colónica) Factores sistémicos (género y edad, trastornos y/o patologías genéticas, condiciones fisiológicas)
Otros factores.	Distribución y contenido alimenticio	Exclusivos de algunos alimentos (isoflavonas de la soya, flavanonas en cítricos, etc.) Ubicuidad
	Factores externos	Factores ambientales (diferentes condiciones de estrés, distinto grado de madurez , etc.)

Otros aspectos que también afectan la biodisponibilidad de los antioxidantes en el organismo son de tipo endógeno como la cantidad de mucosa, el pH, tiempo de tránsito intestinal, la tasa de vaciado gástrico, el metabolismo y la extensión de la conjugación, en la sangre y los tejidos unidos a proteínas; y factores exógenos como la interacción de estos con otros compuesto ingeridos de la dieta, su estructura química, preparación de alimentos o método de procesamiento, la competencia / interacción con otros antioxidantes y la ingesta de otros componentes de los alimentos implicando que la liberación de estos se de en porciones diferentes del sistema digestivo.(93)

La Tabla 3 hace referencia a los factores que afectan la biodisponibilidad, siendo uno de ellos el grado de solubilidad, los compuestos fenólicos se pueden clasificar en fenoles extraíbles y no extraíbles; los extraíbles tiene un peso molecular bajo y son solubles en agua, metanol, acetona acuosa, etc., en cambio los no extraíbles son de alto peso molecular y se unen a fibra dietética o proteínas permaneciendo insoluble en el disolvente habitual, por lo que requiere un paso adicional de hidrólisis para hacerlos solubles. Otro factor es el procesamiento de alimentos pudiendo aumentar o disminuir el contenido fenólico, todo depende del proceso al cual es sometido, un ejemplo de esto es el proceso de molienda que aumenta el contenido fenólico extraíble con solvente, provocando un aumento en la superficie específica de la partícula; otro ejemplo es el proceso de cocción de los alimentos que provoca la descomposición de los compuesto fenólicos lábiles al calor, por ende tiende a disminuir la cantidad de contenido fenólico en los alimentos. Por otro lado, un factor muy importante es la ingesta dietética del individuo, esto debido a que cada país posee una disponibilidad de distintos alimentos que se ve influido por las distintas estaciones del año, también influye la cantidad y la frecuencia de exposición al compuesto fenólico, por lo que la dieta de cada persona es diversa, por lo que cada persona responde de distinta forma. Por último, se encuentran los factores externos relacionados con la producción de polifenoles en las plantas, tal como las condiciones ambientales, la exposición a la luz ultravioleta, el ataque de insectos y patógenos, entre otros; un ejemplo de esto es la respuesta de las plantas a la exposición de luz ultravioleta, donde la radiación ultravioleta ligera produce un mayor contenido de compuestos fenólicos (taninos hidrolizables, flavonol, compuestos de antocianina).(92)

5.6 EVALUACIÓN DE BIOACCESIBILIDAD DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES

La bioaccesibilidad puede evaluarse *in vitro* mediante la simulación de la digestión gástrica y del intestino delgado. Los métodos *in vitro* son formas rápidas y económicas de estimar la bioaccesibilidad de un compuesto bioactivo, incluidos los cambios resultantes de las variaciones en la matriz y el procesamiento de alimentos. Sin embargo, estos métodos no pueden medir completamente la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos, ya que esto requiere metodologías *in vivo*. (76)

Se han desarrollado varios métodos *in vitro* para investigar el efecto de la matriz alimentaria y de diferentes técnicas de procesamiento sobre la capacidad de los nutrientes o compuestos bioactivos, como los polifenoles, para estar disponibles para la absorción. Estos métodos intentan imitar la digestión *in vivo* simulando las fases oral, gástrica y del intestino delgado y, ocasionalmente, la fermentación del intestino grueso.(76)

Las aproximaciones *in vitro* son útiles para evaluar distintos aspectos propios del proceso o de la matriz alimentaria, ya que permiten llevar a cabo un gran número de ensayos, en un corto período de tiempo y no tienen connotaciones éticas. Los sistemas *in vitro* para estudiar la bioaccesibilidad se pueden clasificar en dos grandes categorías, los dinámicos y los estáticos.(76, 94)

5.6.1 Modelos estáticos

Los modelos *in vitro* estáticos son los más empleados debido a su sencillez, disponibilidad y fácil manejo. En estos modelos, las etapas gástrica e intestinal se llevan a cabo en condiciones fijas de pH, concentraciones de enzimas y sales biliares, y tiempo de residencia. Los movimientos peristálticos se emulan por simple agitación. Aunque es una aproximación simplista, estos sistemas muestran para determinados compuestos una buena correlación con los resultados obtenidos *in vivo*. (95) El principal inconveniente de este tipo de metodología es la falta de consenso en las condiciones de digestión utilizadas por los distintos grupos de investigación, hecho que ha dificultado el establecimiento de un método universal. Por otro lado, su aplicación requiere que para cada binomio alimento-compuesto se lleve a cabo una validación, que para ser más idónea debería conllevar la comparación con estudios *in vivo*. (94)

Los métodos estáticos pueden diferir en el tiempo de incubación y las características de los jugos digestivos mediante la adición de enzimas específicas a soluciones inorgánicas y orgánicas. También se pueden ajustar para el pH en función del compartimento intestinal específico, ya que los métodos estáticos presentan múltiples fases, incluyendo oral, gástrica e intestinal, cada una de las cuales puede variar ligeramente en diferentes estudios. (76)

Las características de cada fase en los modelos estáticos según Angelino, D (2017) se muestran en la figura 10. En fase oral, el tiempo de incubación de la muestra de prueba puede variar entre 2 y 30 minutos utilizándose soluciones como saliva humana tamponada con fosfato o solución salina, solución de α -amilasa o solución de saliva preparada con diferentes sales con la adición de α -amilasa, ácido úrico y mucina. Estas soluciones son añadidas con el fin de simular las condiciones de la primera etapa del proceso digestivo. Algunos estudios omiten la fase oral, porque no se espera una contribución significativa al proceso digestivo en esta etapa debido al corto tiempo durante el cual los alimentos están en contacto con la saliva en condiciones *in vivo*. En la fase gástrica, normalmente se usa una solución de pepsina

a concentración variable y el tiempo de incubación puede variar entre 1 y 2 horas. También se ha reportado de la adición de mucina. Además, el ácido clorhídrico (HCl) se usa comúnmente para simular con mayor precisión las condiciones gástricas *in vivo*, con un pH muy bajo (ácido). En la fase intestinal, se establece la neutralización y la incubación con enzimas pancreáticas. Las enzimas utilizadas en la mayoría de los estudios incluyen pancreatina, una solución de bilis/pancreatina o un jugo duodenal que incluye pancreatina, lipasa y bilis. El tiempo de incubación puede variar de 2 a más de 24 horas. (76)

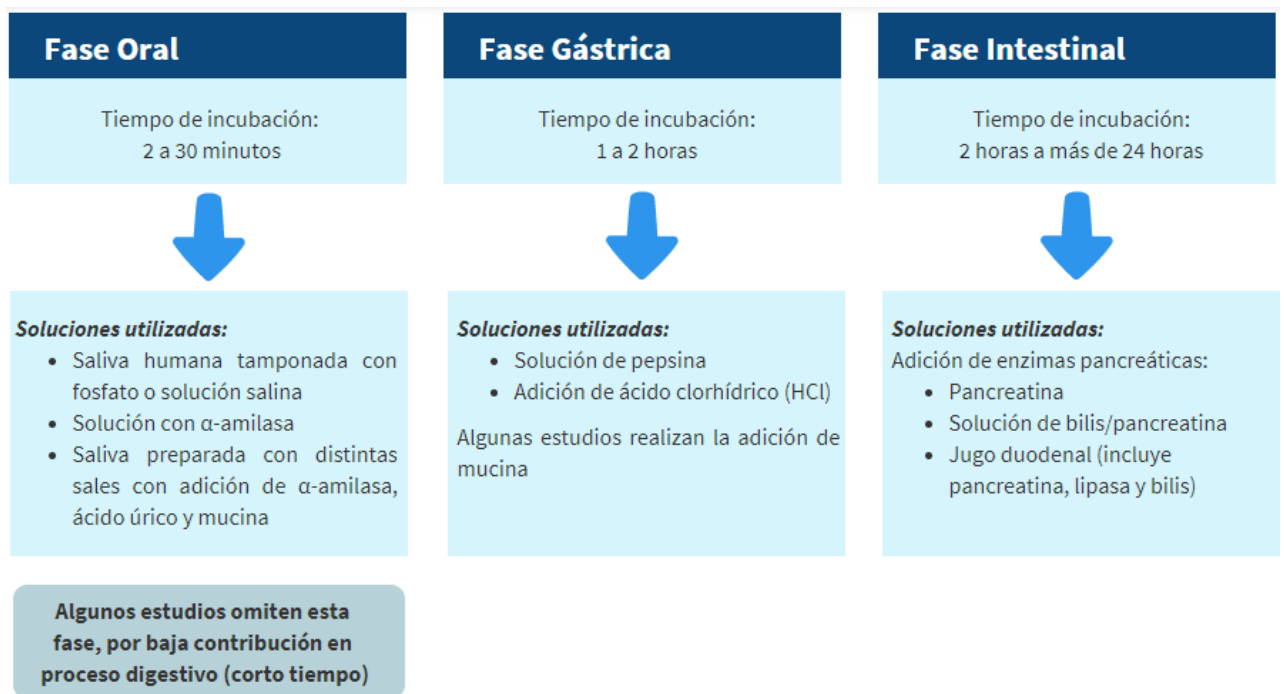


Figura 10: Características fases del proceso digestivo utilizadas en modelos estáticos. Fuente: Elaboración propia Barrios, I. Bravo, J. (2020)

Después de la simulación de digestión gastrointestinal, se lleva a cabo la determinación de la bioaccesibilidad de forma variable; en la figura 11, se muestran las opciones mayormente utilizadas. Un método es centrifugar o filtrar la mezcla de muestra obtenida para medirla en función de los niveles de polifenoles presentes en el sobrenadante (Solubilidad). Una alternativa incluye el uso de membranas de diálisis, que permiten la discriminación entre componentes de alto y bajo peso molecular, proceso denominado Dializabilidad. La etapa en

la que se usan las membranas puede variar, ya que en algunos trabajos se usa inmediatamente después de la fase gástrica, mientras que en otros después de la fase de digestión intestinal. (96)

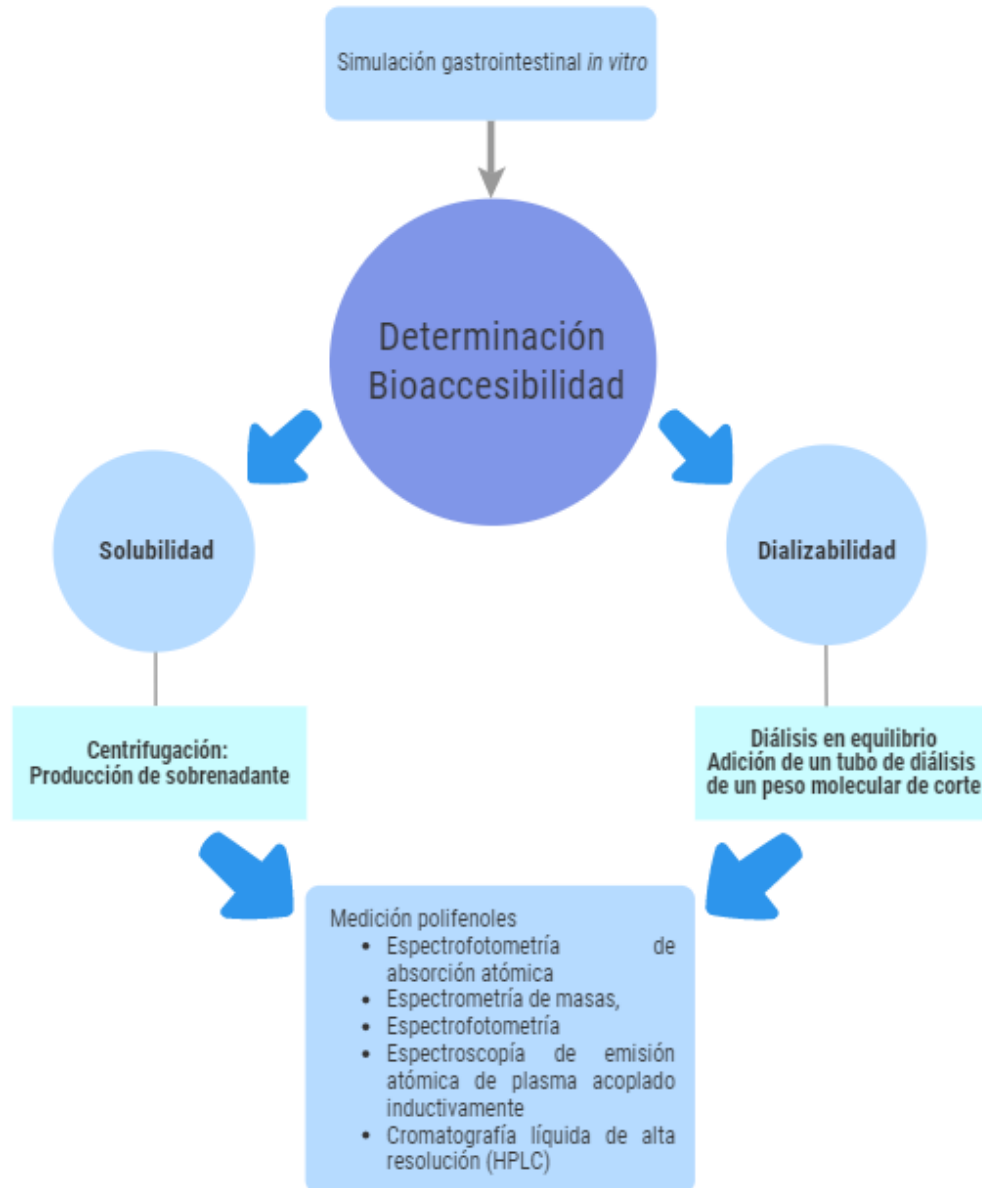


Figura 11: Métodos estáticos de medición de bioaccesibilidad. Fuente: Elaboración propia Barrios, I. Bravo, J. (2020)

En general, los métodos estáticos son rápidos, rentables y pueden utilizarse para evaluar los efectos sobre varios nutrientes y compuestos bioactivos resultantes de los cambios realizados en la matriz alimentaria, cambiando las materias primas o las técnicas de procesamiento utilizadas, en comparación con el material de referencia o la matriz alimenticia original. Las principales limitaciones estos métodos son que no proporcionan la simulación más precisa de los complejos procesos fisiológicos dinámicos que ocurren durante condiciones *in vivo*.(76)

A. Solubilidad

En un primer paso, se aplica una digestión gastrointestinal simulada a alimentos homogeneizados o compuestos aislados en un sistema cerrado, seguido de la determinación de la cantidad de compuesto soluble presente en el sobrenadante obtenido por centrifugación o filtración. (97) Los nutrientes o compuestos presentes en el sobrenadante representan los componentes solubles y se miden mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS), espectrometría de masas, espectrofotometría, espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Figura 11). El porcentaje de solubilidad se calcula como la cantidad de compuesto soluble en relación con la cantidad total de compuesto en la muestra de prueba.(96)

En la figura 12 se muestra la determinación de accesibilidad mediante Solubilidad. En primera instancia se realiza la simulación del sistema digestivo humano a través de una digestión de dos pasos (a veces de tres pasos) que incluye una digestión gástrica e intestinal. Para la digestión gástrica, se agrega pepsina antes de la acidificación de las muestras a pH ácido con ácido clorhídrico (para simular el pH gástrico). Este proceso (acidificación) es muy importante porque la pepsina comienza a desnaturalizarse, por lo que perderá su actividad a $\text{pH} \geq 5,0$. (96)

Antes del inicio de la digestión intestinal, las muestras se neutralizan a pH 5,5 – 6,0 previo a la adición de pancreatina y sales biliares. Finalmente se reajusta la mezcla a un pH 6,5-7,0, llevándose a cabo la etapa intestinal. Finalizada esta etapa se procede a centrifugar o filtrar la mezcla obteniéndose en el sobrenadante la fracción bioaccesible para su medición y el residuo. (76, 96)



Figura 12: Esquema proceso determinación de bioaccesibilidad mediante Solubilidad. Fuente: Elaboración propia Barrios, I. Bravo, J. (2020)

B. Dializabilidad

Los ensayos de dializabilidad fueron introducidos en 1981 por Miller y col.(98) como medio para estimar la bioaccesibilidad del hierro en los alimentos. El modelo se basa en una diálisis de equilibrio. Implica la adición de un tubo o membrana de diálisis de un cierto peso molecular de corte (siglas en inglés MWCO), después de la digestión gástrica o intestinal.(96)

La proporción del elemento que difunde a través de una membrana semipermeable durante la digestión gástrica o intestinal, después de un período que permitiría llegar al equilibrio, representa su dializabilidad y es usado como un estimador de la proporción del elemento disponible para la absorción. (99) El tubo o la bolsa de diálisis contiene una solución tampón, como bicarbonato de sodio, que se difunde lentamente fuera de la bolsa y neutraliza la digestión péptica. Después de la incubación, se añade una solución de pancreatina/bilis y la mezcla se somete otra incubación, pudiéndose determinar la bioaccesibilidad total del compuesto de interés, en este caso de los polifenoles presentes en el dializado. Estos métodos se basan en la premisa de que los compuestos dializables estarán disponibles para su absorción en el intestino delgado. (96)

Un estudio de Domínguez y col. (2010), muestra un ejemplo de la implementación del método de Dializabilidad, representado en la figura 13. El modelo utilizado en la investigación es coincidente con otros autores donde se implementa la etapa gástrica e intestinal. La digestión *in vitro* es llevada a cabo en triplicado en matraces Erlenmeyer, pudiendo el compuesto (generalmente alimento) ser sólido o líquido. Los recipientes son incubados a temperatura ambiente por 15 minutos, a continuación, se les añade una solución gástrica de pepsina disuelta en ácido clorhídrico (HCl), se tapan e incuban a 37° C en agitación durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, se detiene la actividad enzimática introduciendo los matraces en agua frío o en hielo. Posteriormente se añade la solución intestinal compuesta por la enzima pancreatina y bilis (sales biliares), disueltas en bicarbonato de sodio. En esta etapa se puede realizar la adición del proceso de diálisis, al igual que al finalizar la etapa intestinal. En el proceso se introducen membranas de diálisis de cierto peso molecular, variable acorde al fin de la investigación. Los autores realizan la evaluación de dializabilidad mientras se simula la etapa intestinal a 37° C en agitación por 2 horas. Finalizado el tiempo se procede a detener nuevamente la actividad enzimática con la aplicación de frío, enjuagar la membrana de diálisis, obteniendo en su interior la fracción dializable y en el matraz como residuo la fracción no dializable. Ambas fracciones pueden ser almacenadas para su posterior medición o ser analizadas apenas son obtenidas, para la evaluación de la bioaccesibilidad de los compuestos. (100)

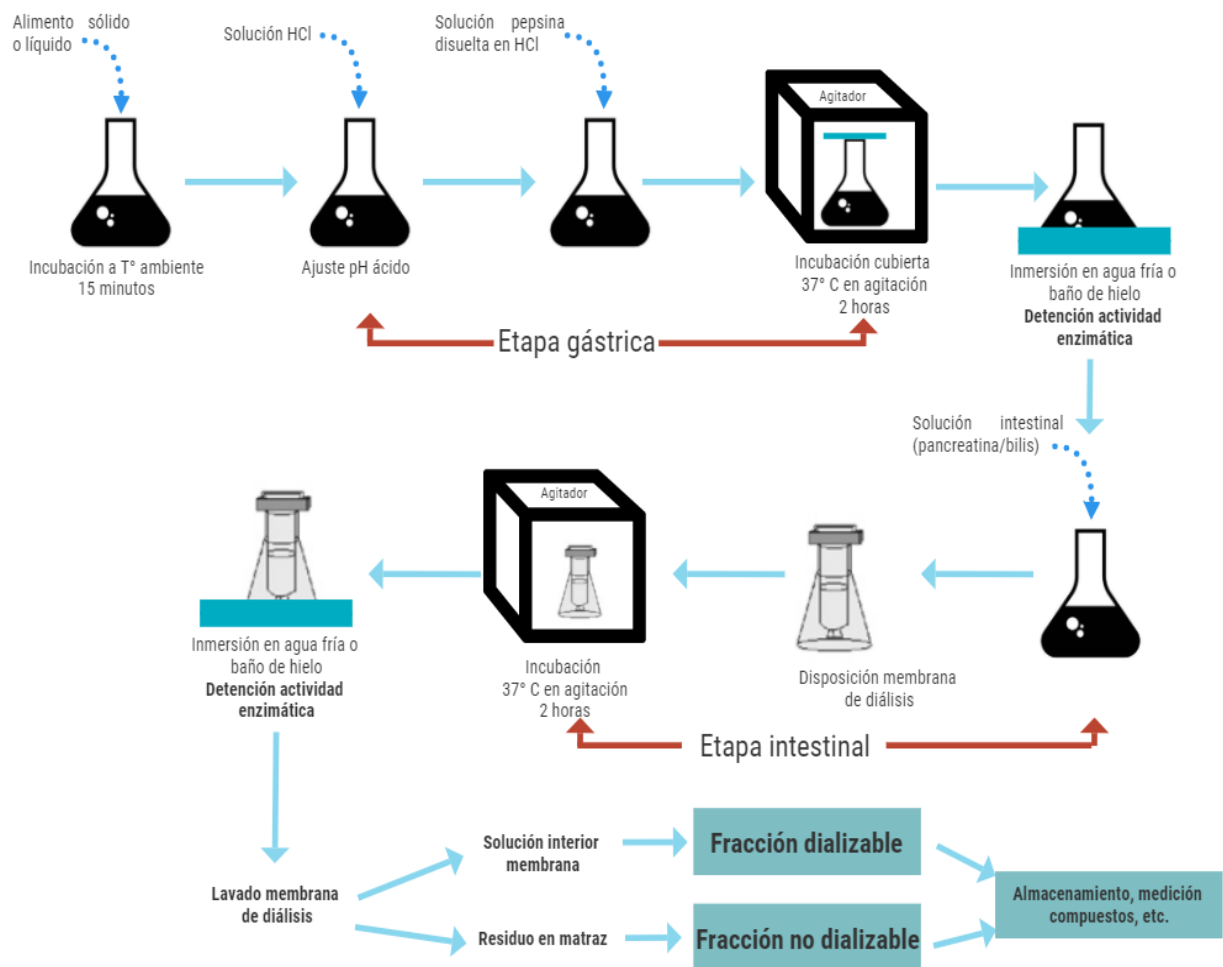


Figura 13: Esquema modelo de digestión estática *in vitro* basado en Dializabilidad. Fuente: Elaboración propia Barrios, I. Bravo, J. (2020)

C. Modelo digestivo estático propuesto por Infogest

Este modelo fue publicado el año 2014 con el fin de presentar una posibilidad de modelo a estandarizar a nivel mundial. La recomendación de consenso final es relativamente simple, se basa en parámetros fisiológicos que se han citado y está ampliamente respaldada por quienes realizan digestiones *in vitro*, especialmente en la investigación alimentaria. Utiliza valores de pH, tensioactivos endógenos de composición iónica y enzimas determinadas al inicio del experimento (etapa de preparación). El método comprende hasta tres etapas que imitan las fases oral, gástrica y del intestino delgado de la digestión *in vivo*. En cada etapa se

describen la duración, las características del entorno físico y bioquímico simulado con las razones de su selección.(97)

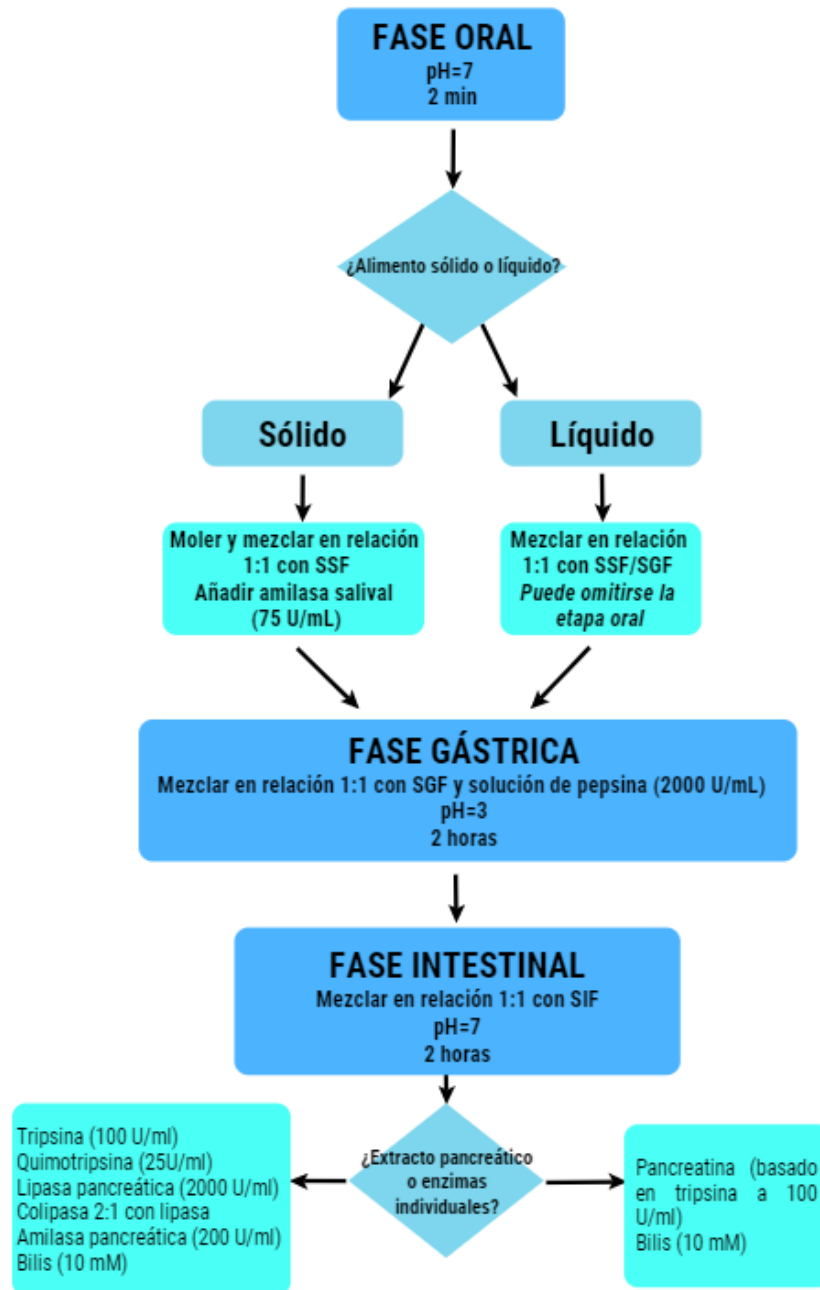


Figura 14: Diagrama de flujo método de digestión InfoGest que involucra líquido salival simulado (SSF), líquido gástrico simulado (SGF) y líquido intestinal simulado (SIF). Tomado y adaptado de Verhoeckx, K. y col. (2015). (97)

En la figura 14 se muestra el método de digestión publicado por InfoGest, la digestión simulada implica la exposición del alimento a las tres fases digestivas: oral, gástrica e intestinal. Las condiciones de cada etapa son estables; la primera (fase oral) implica la masticación simulada en caso de ser sólido y la dilución del alimento en relación 1:1 (peso/peso) con líquido salival simulado (SSF) con o sin amilasa salival. En el caso de utilizarse alimentos líquidos puede omitirse esta etapa y añadir líquido gástrico simulado (SGF) iniciando el método desde la etapa gástrica. Se recomienda incluir en todos los procedimientos de digestión simulada la fase oral, independientemente del estado del alimento (líquido o sólido) para proporcionar consistencia de dilución. Esta etapa es de corta duración (2 minutos) en un medio con pH de 7,0. (101)

Considerándose realizada la fase oral, se procede a la fase gástrica donde se diluye el bolo oral en relación 1: 1 con líquido gástrico simulado y enzimas gástricas (pepsina y/o lipasa gástrica). Esta mezcla se incuba en agitación a pH 3 durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, se diluye el quimo gástrico en relación 1:1 con líquido intestinal simulado (SIF), sales biliares y enzimas pancreáticas (pancreatina basada en la actividad de la tripsina o enzimas individuales) y se incuba a pH 7,0 durante 2 horas más. (97, 101)

Finalizada la simulación gastrointestinal, se tiene el último paso del procedimiento que implica el muestreo, el tratamiento de la muestra, el almacenamiento en caso de ser analizadas en un futuro y el análisis de las muestras. (101)

5.6.2 Modelos dinámicos

Los modelos de digestión dinámica, como los modelos estáticos, se construyen con el fin de imitar el entorno bioquímico de los compartimentos del tracto gastrointestinal. A diferencia de los primeros, las condiciones exactas dentro de los diferentes compartimentos de un modelo dinámico cambiarán con el tiempo para simular los procesos de digestión *in vivo*. Generalmente tienen varias secreciones digestivas diferentes que se agregan a los compartimentos del modelo a lo largo del tiempo. Esta adición puede seguir una tasa de secreción constante o puede seguir un patrón pre-programado que permite que la tasa cambie con el tiempo, también se puede programar para que la secreción cambie en respuesta a otros parámetros, como el volumen de llenado del modelo. El pH a menudo se monitorea en tiempo real dentro de modelos dinámicos y se usa para controlar la tasa de adición de ácido clorhídrico, permitiendo que la acidificación de la comida dentro del compartimento gástrico siga una curva predeterminada. En modelos dinámicos que incorporan un paso duodenal, en esta etapa se neutraliza el pH del quimo mediante la adición controlada de solución de bicarbonato de sodio, y se agregan secreciones de bilis y enzimas pancreáticas (o pancreatina).(97)

Una de las desventajas de estos modelos, es que los equipos son de difícil adquisición desde el punto de vista económico, además requieren instalación por personal técnico especializado, al igual que personal entrenado en el uso del equipo e interpretación de los resultados.(76)

A. Modelo TIM

Corresponde a un modelo multicompartimental que se desarrolló a principios de la década de 1990 ampliamente divulgado y reconocido. Integra parámetros clave de la digestión humana: temperatura, cinética del pH gástrico e intestinal, tiempo de tránsito, mezcla y transporte peristáltico, adición secuencial de secreciones digestivas y absorción pasiva de agua y moléculas pequeñas a través de un sistema de diálisis. Consta de varios reactores controlados por ordenador que simulan las condiciones existentes en el estómago y las tres partes del intestino delgado, el duodeno, el yeyuno y el íleon. (76)

Algunas de las características del modelo TIM son la inclusión de la simulación de los movimientos peristálticos, la presión controlada, la absorción de nutrientes y agua en la cámara correspondiente al intestino delgado y la simulación de la velocidad de vaciado gástrico y tiempo de tránsito intestinal, además de simular la temperatura corporal. Asimismo, se inyectan secreciones gástricas, biliares y pancreáticas para controlar el pH. Se denomina de forma genérica TIM-1 al modelo que consta de 4 reactores y TIM-2 al modelo que consta de un reactor con el que se simula el intestino grueso. (102)

Cada compartimiento de los sistemas TIM-1 y TIM-2 se compone de reactores de vidrio con camisa interior formada por paredes flexibles donde se bombea agua. El agua se mantiene a 37 °C con el objeto de conseguir una temperatura constante en el interior de cada reactor similar a la del cuerpo humano. Los movimientos peristálticos se simulan mediante cambios en la presión de inyección de agua en la camisa. El contenido de los reactores se mantiene siempre bajo condiciones anaeróbicas mediante la introducción de nitrógeno (N₂). (97)

El esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método TIM-1 se encuentra en la figura 15. Los compartimentos están conectados por bombas de válvulas peristálticas (PVP) que permiten la transferencia de cantidades controladas de quimo. Antes de la introducción en el compartimento gástrico, la muestra (alimento generalmente) se tritura y se mezcla con saliva artificial que contiene electrolitos y α -amilasa. En la etapa gástrica se añaden secreciones gástricas (principalmente pepsina, electrolitos y una lipasa fúngica) y HCl, el pH es controlado por ordenador de acuerdo con curvas predefinidas de valores 4,5, 4,2, 2,1 y 1,7 durante 5, 20, 60 y 90 minutos respectivamente en el compartimento correspondiente. Para la etapa intestinal se añade una solución compuesta por electrolitos, bilis y secreciones pancreáticas (especialmente pancreatina). El pH se controla a valores preestablecidos para cada compartimento intestinal con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) manteniendo valores de pH de 6,5, 6,8 y 7,2, para simular duodeno, yeyuno e íleon, respectivamente. El agua y los productos digeridos son eliminados de los reactores que simulan el yeyuno e íleon mediante bombeo a 10 mL/min a través de membranas de fibra hueca. Los productos de la digestión se eliminan mediante dos sistemas diferentes. Los productos solubles en agua se eliminan mediante diálisis a través de membranas conectadas a los compartimentos del yeyuno e íleon. Los productos lipofílicos no pueden eliminarse eficazmente con estas membranas, ya que están incorporados en micelas que son demasiado grandes para pasar la membrana. Los productos lipofílicos se eliminan a través de un filtro que pasa las micelas, pero retiene las gotas de grasa.(97, 102)

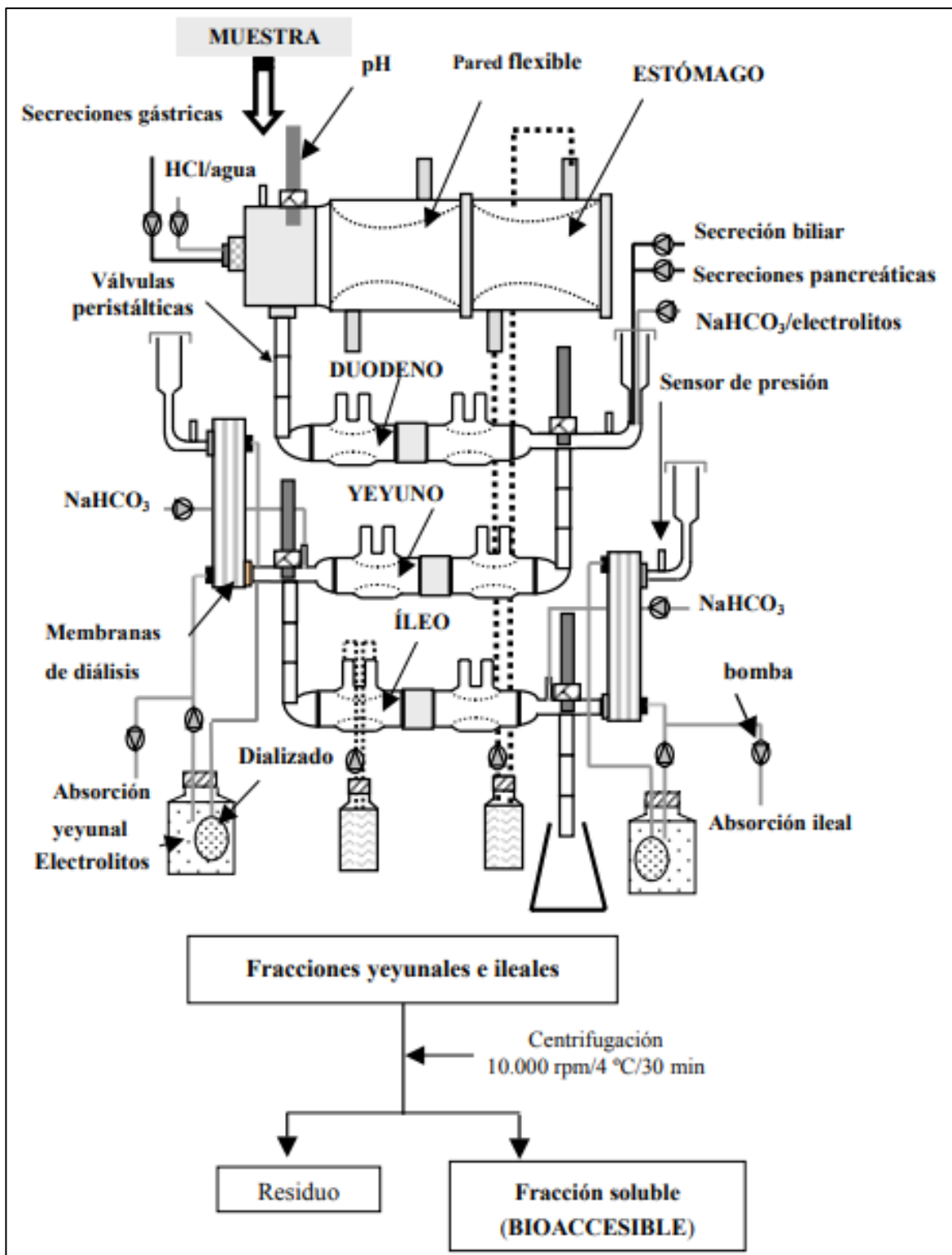


Figura 15: Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método dinámico de digestión gastrointestinal *in vitro* (TIM-1). Tomado de Torres, S. (2011) (103)

Otra variante de este sistema corresponde al TIM-2, el cual es un modelo validado que simula el colon proximal. Imita la temperatura corporal, el pH de la luz y los movimientos peristálticos. Contiene una membrana de diálisis que simula la captación de metabolitos microbianos por parte del organismo evitando la acumulación de estos en el sistema. Generalmente es utilizado en la evaluación de la microbiota en ámbitos de bioaccesibilidad de compuestos. (97)

B. Modelo SHIME

El término SHIME es el acrónimo de *Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem*. Este simulador fue desarrollado en el año 1993 en Bélgica. Se trata del primer modelo *in vitro* multietapa que apareció en la literatura científica. Inicialmente se componía de cinco reactores multicámara controlados por computadora que simulaban las condiciones del duodeno/yeyuno, íleon, intestino ciego/colon ascendente, colon transverso y colon descendente, donde se estudiaban las interacciones de la población microbiana en el colon. Posteriormente se añadió un sexto reactor con objeto de simular el tránsito estomacal. Se considera como un modelo de bajo costo de implementación en comparación a otras metodologías *in vitro* e *in vivo*. En la figura 16 se muestra un modelo real. (102)



Figura 16: Modelo gastrointestinal *in vitro* SHIME (*Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem*). Tomado de Capoano, E. (2015) (104)

Todos los reactores se mantienen en condiciones anaeróbicas mediante la inyección de nitrógeno (N_2) dos veces al día durante 15 minutos. El pH del sistema se controla mediante soluciones de ácido clorhídrico (HCl) y/o hidróxido de sodio (NaOH), la temperatura es regulada a $37^\circ C$ mediante un termostato. Los primeros dos reactores simulan la ingesta y la digestión de alimentos en el estómago y duodeno/yeyuno en tiempos de 2 a 4 horas. En el segundo reactor se simula la segregación de jugo pancreático suplementado con bilis durante una hora, con objeto de neutralizar la acidez estomacal. La bilis se compone de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) y pancreatina. El tercer reactor (íleon) posee un tiempo de 4 horas en un pH entre 6,5 y 7,0. Finalmente, los tres reactores finales están diseñados para simular la microbiota colónica, estos son inoculados con suspensión fecal preparada en una solución tampón y agitados en forma continua. En estos reactores finales los tiempos aumentan desde 20 a 32 horas aproximadamente cada uno. (Figura 17) (102, 104)

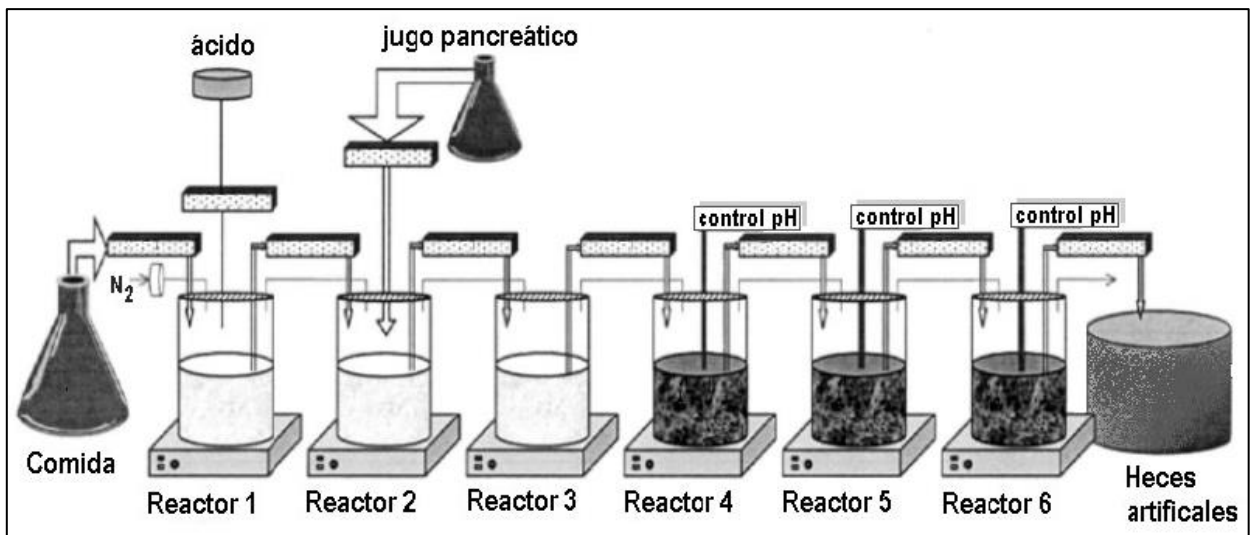


Figura 17: Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método dinámico gastrointestinal *in vitro* SHIME. Tomado de Rivas, E. (2014) (102)

5.7 EVALUACIÓN DE BIODISPONIBILIDAD POLIFENOLES Y FLAVONOIDES

El objetivo principal de los estudios de biodisponibilidad es determinar cuáles son los polifenoles mejor absorbidos, cuáles son los metabolitos activos, qué polifenoles conducen a la formación de los metabolitos activos y caracterizar la actividad biológica de estos metabolitos.(45)

La disponibilidad biológica sólo puede determinarse conociendo la cantidad del compuesto alimentario de interés que circula en la sangre, y para ello se requiere conocer la cinética, es decir, la velocidad con que ingresa a la sangre desde el intestino, así como la concentración máxima que alcanza y el tiempo en que esto ocurre. Para medir la biodisponibilidad se requiere de un monitoreo de las concentraciones plasmáticas del compuesto bioactivo que abarca varias horas. La cinética observada depende de las características físicas y químicas de la molécula, pero también es afectada, en gran medida, por la fisiología del sujeto sometido al ensayo: edad, sexo, hábitos alimentarios, tabaquismo, consumo de fármacos y/o suplementos alimentarios, estilo de vida, entre otros.(75)

Una forma de estudiar indirectamente la biodisponibilidad de los polifenoles es a través de la valoración del incremento en la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo de alimentos ricos en estos compuestos. Para realizar estudios directos de biodisponibilidad, se puede medir la concentración del compuesto en el plasma y en la orina tras la ingestión de alimentos con cantidades conocidas, de los polifenoles que se quieren analizar.(85)

La combinación *in vitro* de una digestión gastrointestinal simulada y de un modelo celular o tisular de epitelio intestinal para emular la absorción se ha evidenciado útil para predecir la biodisponibilidad *in vivo* de numerosos nutrientes y es la que se abordará a continuación. (105)

5.7.1 Uso de modelos con líneas celulares

Dentro de los métodos *in vivo* encontramos los procedimientos que utilizan células intestinales aisladas y cultivadas. La principal dificultad de trabajo con estas células (generalmente enterocitos) es que están altamente polarizados bioquímica, morfológica y funcionalmente, por lo que siempre que se mantenga la polaridad y se formen uniones intercelulares ajustadas, estas células serán representativas de la función de barrera que realiza el tracto intestinal. Así pues, el sistema *in vivo* consistente en una monocapa de células del epitelio intestinal, similares a las que se encuentran en el intestino delgado, con la polarización descrita, es el más adecuado para realizar estudios de transporte y metabolismo.(105)

Las líneas celulares utilizadas preferentemente para este tipo de procedimientos son las que se producen a partir de adenocarcinomas, ya que son células transformadas que tiene la capacidad de diferenciarse de manera rápida y cuentan con características similares a las del enterocito del intestino grueso. Estas pueden clasificarse a partir del grado de diferenciación, donde se pueden encontrar las líneas celulares con diferenciación espontánea o no espontánea, así como también la diferenciación en monocapa o en multicapas, tal como se muestra en la Tabla 4.(105, 106)

Tabla 4: Clasificación de los grados de diferenciación de las líneas celulares.

Fuente: Elaboración propia Barrios, I. Bravo, J. (2020)

Tipo	Grado de diferenciación	Ejemplo
Tipo 1	Células que se diferencian espontáneamente bajo condiciones normales de cultivo. En ellas se observa una polarización de las células y un óptimo desarrollo de los bordes en cepillo apicales, con gran cantidad de hidrolasas (lactasa, sacarosa-isomaltasa)	Células CACO-2
Tipo 2	Son células que no se diferencian espontáneamente, sólo bajo determinadas condiciones. Su diferenciación se puede inducir por alteración de las condiciones de cultivo	Tres líneas pertenecen a este grupo: HT-29, HCT-EB y HCT-GEO. En el caso de HT-29 la diferenciación se puede inducir al reemplazar glucosa por galactosa.
Tipo 3	Son células organizadas en monocapas polarizadas, pero sin presentar ninguna de las características de la diferenciación enterocítica (no expresan borde en cepillo)	Ocho líneas celulares pertenecen a este grupo, de ellas se destacan HRT-18 y SW-1116
Tipo 4	Son células que crecen en multicapas, sin signos de diferenciación.	Ejemplos de estas líneas celulares son HCA7 y SW480

A. Modelo *in vitro* de células digestivas CACO-2

Las células CACO-2 son de origen humano, normalmente se utiliza las provenientes del adenocarcinoma del colón y cuando se cultivan bajo condiciones específicas se asemejan a los enterocitos del intestino delgado. Estas se siembran de tal manera que crecen y forman una monocapa de células polarizadas con un fenotipo absortivo que proporciona una barrera física y bioquímica para el paso de iones y moléculas pequeñas, que luego se diferencian de forma espontánea para crear muchos componentes estructurales y funcionales de las células intestinales. Estas expresan uniones estrechas, microvellosidades, y un número de enzimas y transportadores que son características de los enterocitos (peptidasas, esterases, glicoproteína P, transportadores de captación de aminoácidos, ácidos biliares, ácidos carboxílicos, etc.), lo que significa que la línea celular CACO-2 se puede utilizar para estudiar la captación activa, pasiva y el transporte de nutrientes, además de simular de manera muy completa la barrera bioquímica y fisicoquímica necesarias para la absorción.(106-108)

Las monocapas celulares CACO-2 son un modelo *in vivo* ampliamente reconocido para la predicción de la permeabilidad cuando los compuestos se absorben mediante difusión pasiva. Los compuestos que se absorben completamente presentan unos coeficientes altos de permeabilidad y los compuestos que presentan una absorción incompleta tienen coeficientes de permeabilidad más bajos. Estos valores de permeabilidad varían considerablemente entre los distintos laboratorios, debido a la heterogeneidad de las células CACO-2 y las diferentes condiciones de cultivo utilizadas en cada laboratorio ha dado lugar a la selección de diferentes poblaciones celulares que se conocen como tendencia fenotípica. Por lo tanto, los resultados sólo se pueden comparar dentro de los mismos experimentos.(105, 106, 108)

El estudio de la biodisponibilidad de polifenoles y flavonoides puede llevarse a cabo mediante el empleo de células CACO-2 (modelo *in vivo*) añadido a la simulación gastrointestinal *in vitro*, generalmente solubilidad y dializabilidad por su facilidad de implementación y bajo costo. Para esto se cultiva a las células con un crecimiento en soportes

sólidos para la formación de monocapas; posteriormente estas se diferencian espontáneamente adquiriendo características morfofuncionales del enterocito maduro. (109)

Para la evaluación de la biodisponibilidad, los cultivos celulares son añadidos posterior a la digestión gástrica de la muestra, agregándose en primera instancia una solución de pancreatina/bilis y posteriormente las células. En condiciones *in vivo*, la integridad celular se mantiene mediante la presencia de una capa de moco intestinal, en ensayos para la evaluación de biodisponibilidad, se deben implementar métodos para prevenir la degradación enzimática de las células. Una forma es la introducción de una membrana de diálisis asegurada con una goma de silicona a un inserto de plástico en la parte superior de la monocapa celular. (Figura 18) La digestión intestinal se coloca encima de la membrana de diálisis, evitando así que las enzimas lleguen a las células. Otro método consiste en tratar térmicamente los digeridos intestinales a 100 ° C para inhibir las enzimas añadidas durante el experimento, sin embargo, esta opción significa una deficiencia en la metodología, porque calentar la muestra desnaturará las proteínas alimentarias, lo que afectará (positiva o negativamente) la biodisponibilidad, cambiando las condiciones de los ensayos, alterando el objetivo de la simulación. (96, 97)

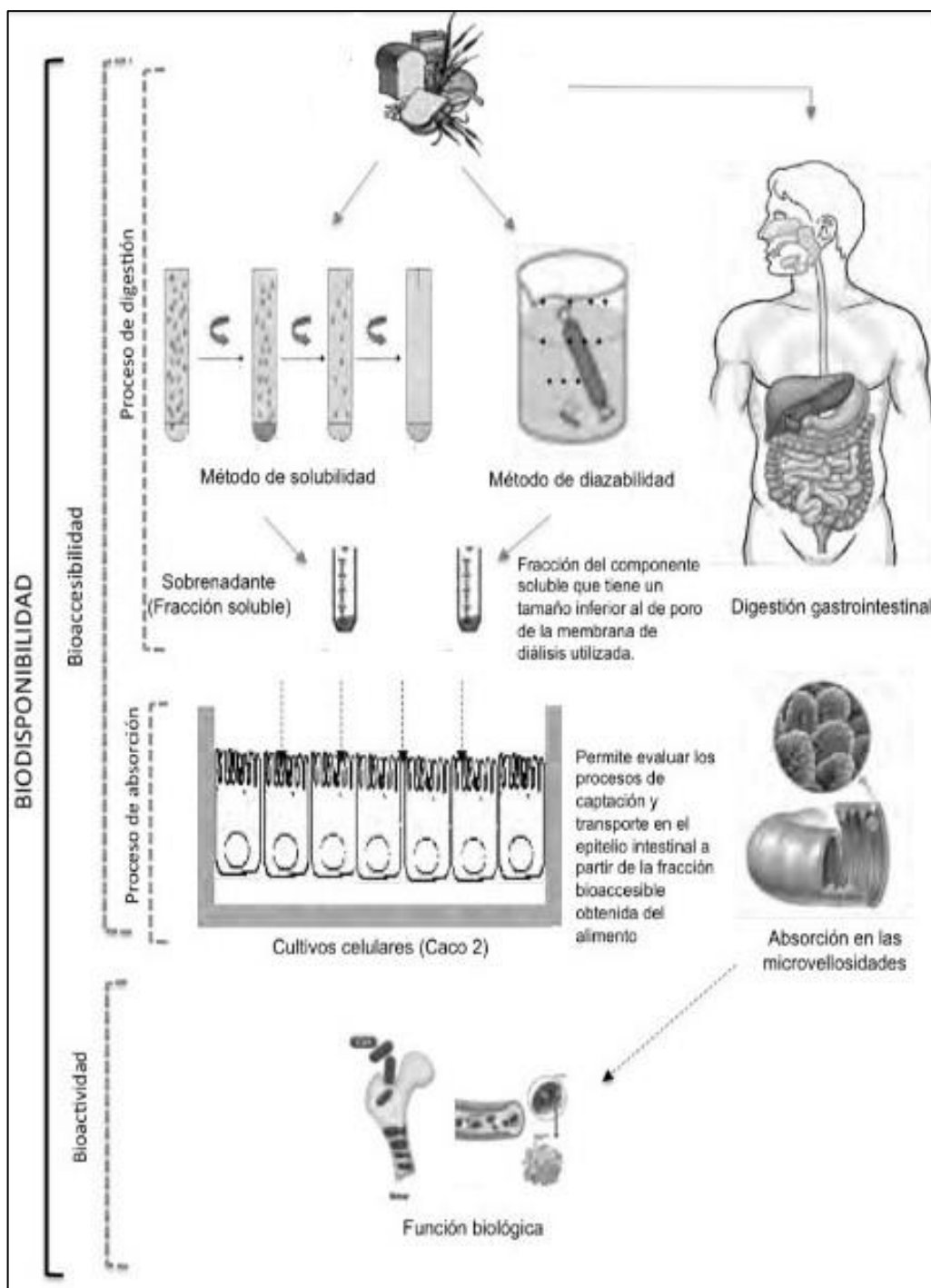


Figura 18: Modelo *in vivo* para determinación de biodisponibilidad con células Caco-2. Tomado y adaptado de Caldera, Y. (2011) (109)

B. Modelo celular HT-29

La línea celular HT-29 es derivada de células de adenocarcinoma de colon humano. A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación. Estas células poseen una alta tasa de consumo de glucosa, por lo que requieren alta concentración en el medio para diferenciarse, es por eso que en los modelos experimentales con condiciones estándar de glucosa (25 mM y suero bovino fetal al 10%) crecen con un fenotipo indiferenciado y como una multicapa de células indiferenciadas y no polarizadas, sin tener ninguna similitud con las células epiteliales intestinales. Se descubrió que alterar las condiciones de cultivo genera un cambio en la diferenciación de las líneas celulares, por lo que se realizó la sustitución de glucosa por galactosa en el medio de cultivo e indujo una diferenciación enterocítica reversible, es decir, forma una monocapa con uniones estrechas entre las células y el borde en cepillo apical típico, además de expresar hidrolasas (pero con menor actividad enzimática que las células *in vivo*). Cuando estas células se cultivan en condiciones apropiadas, se pueden modular para expresar diferentes vías de diferenciación de enterocitos. Por este motivo, HT29 se considera una línea celular intestinal pluripotente que puede utilizarse para el estudio de los eventos estructurales y moleculares implicados en la diferenciación celular.(97, 110)

En la condición de diferenciación con galactosa la línea celular HT29 es muy similar a la diferenciación de las células CACO-2, por lo que esta línea es un buen implemento para medición de biodisponibilidad *in vitro*, pero su uso en investigación no se encuentra tan generalizado debido a las condiciones necesarias para lograr su diferenciación y que la capacidad enzimática de esta es mucho menos a las células *in vivo*. Se conocen una serie de diferencias entre ambas líneas celulares, donde se tiene como una de ellas el proceso de diferenciación, siendo el de las células HT29 de 30 días y el de las células CACO-2 de 15 a 20 días, también la actividad enzimática es distinta, solo un 40-50% de las células HT29 es capaz de expresar la enzima sacarosa-isomaltasa. La principal diferencia entre estas líneas celulares es que las HT29 son capaces de producir una alta cantidad de mucina en

comparación con las células CACO-2. Debido a las diferencias expresadas, es que se utilizan co-cultivos de líneas celulares HT29 en combinación con las líneas celulares CACO-2, ya que existe un complemento y/o potenciamiento, donde se logra una absorción intestinal más acercada a la realizara *in vivo*, por la presencia de mucina producida por las células HT29, que simulan el gel protector que recubre al tejido epitelial.(111)

6. CONCLUSIONES

Los polifenoles corresponden a los antioxidantes más abundantes en frutas, vegetales, cereales, legumbres, bebidas como té, café y vino. Durante los últimos años se ha prestado real interés a los efectos protectores de estos compuestos, los cuales son altamente dependientes de su ingesta, bioaccesibilidad y biodisponibilidad. La bioaccesibilidad nos permite determinar la cantidad de polifenoles que tienen la posibilidad de ingresar a la circulación, por lo tanto, es de suma importancia conocer esta cantidad, sin olvidar, que una parte ingresará y podrá ejercer su efecto protector a nivel de órganos y tejidos blanco, es decir un compuesto puede tener una alta bioaccesibilidad, pero una baja biodisponibilidad, o también una situación contraria donde se tenga una baja bioaccesibilidad y un alto o total ingreso de los polifenoles disponibles a circulación. En este sentido, existen diversas posibilidades para los polifenoles.

La bioaccesibilidad es determinante para la biodisponibilidad, ya que los compuestos deben ser biodisponibles para poder ser absorbidos y poder llegar a las células blanco a ejercer sus efectos protectores. Este concepto se determina a través de técnicas *in vitro* con modelos estáticos y dinámicos cuya diferencia radica en las condiciones que simulan. En los primeros destacan la Solubilidad y Dializabilidad siendo de fácil implementación y bajo costo, los segundos son más complejos en implementación (costo y manejo técnico), destacan en ese grupo el modelo TIM-1 y el modelo SHIME que brinda la posibilidad de evaluar efectos de la microbiota en temas como bioaccesibilidad.

La determinación de la biodisponibilidad representa una herramienta de gran utilidad para percatarse si los compuestos bioactivos que se encuentran en los alimentos son capaces de llegar a los sistemas de nuestro cuerpo, en los cuales a través de sus propiedades ejercen sus efectos beneficiosos. Sin embargo, es necesario tener en consideración que la biodisponibilidad se puede ver afectada por una inmensidad de factores, algunos son propios

del sujeto que consume el alimento (edad, sexo, metabolismo, consumo de cigarrillo, etc.), otros están dados por la manipulación y procesamiento a nivel industrial de estos alimentos.

Es por esto, que los métodos más apropiados de evaluación de la biodisponibilidad son metodologías *in vivo* adheridas a sistemas de simulación gastrointestinal *in vitro*, a partir de cultivos de líneas células donde se forma un reproducción del sistema intestinal (a nivel de enterocito) para así evaluar la absorción de los compuestos bioactivos alimentarios sin la influencia de factores externos alejados del metabolismo gastrointestinal, asegurando así una alta fiabilidad de los resultados de dichas técnicas

7. REFERENCIAS

1. Santhakumar AB, Battino M, Alvarez-Suarez JM. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;113:49-65.
2. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*. 2001;36(7):703-25.
3. Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*. 2010;120(2):599-606.
4. Tenore GC, Campiglia P, Ritieni A, Novellino E. In vitro bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). *Food Chemistry*. 2013;141(4):3519-24.
5. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;3:20.
6. Baboo KD, Chen ZY, Zhang XM. Role of Oxidative Stress and Antioxidant Therapies in Endometriosis. *Reproductive and Developmental Medicine*. 2019;3(3):170-6.
7. Yu BP. CELLULAR DEFENSES AGAINST DAMAGE FROM REACTIVE OXYGEN SPECIES (VOL 74, PG 139, 1994). *Physiological Reviews*. 1995;75(1):U4-U.
8. Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving Concepts in the Pathogenesis of NASH: Beyond Steatosis and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(5):8591-638.
9. Chattopadhyay M, Khemka VK, Chatterjee G, Ganguly A, Mukhopadhyay S, Chakrabarti S. Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2015;399(1-2):95-103.
10. Czarny P, Wigner P, Galecki P, Sliwinski T. The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2018;80:309-21.
11. Wadhwa R, Gupta R, Maurya PK. Oxidative Stress and Accelerated Aging in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorder. *Current Pharmaceutical Design*. 2018;24(40):4711-25.
12. Guo QP, Li FN, Duan YH, Wen CY, Wang WL, Zhang LY, et al. Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond. *Science China-Life Sciences*. 9.
13. Salvayre R, Negre-Salvayre A, Camaré C. Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie*. 2016;125:281-96.
14. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. 2006:161-72.
15. Corrales LC, Muñoz Ariza MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*. 2012;10:213-25.
16. Fujiwara T, Dohi T, Maan ZN, Rustad KC, Kwon SH, Padmanabhan J, et al. Age-associated intracellular superoxide dismutase deficiency potentiates dermal fibroblast dysfunction during wound healing. *Experimental Dermatology*. 2019;28(4):485-92.

17. Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging-Us*. 2012;4(1):3-12.
18. Malekmohammad K, Sewell RDE, Rafieian-Kopaei M. Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects. *Biomolecules*. 2019;9(8).
19. Wu QQ, Lam C, Poljak D, Van Deventer GM, Bradley CP, Combelles CMH. Characterization of the Catalase and Glutathione Peroxidase-1 Antioxidant System During Bovine Folliculogenesis. *Biology of Reproduction*. 2009:181-2.
20. Rhee SG, Lee SK. DIFFERENTIAL FUNCTION OF CATALASE, GLUTATHIONE PEROXIDASE, AND PEROXIREDOXIN IN MOUSE RED BLOOD CELLS. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;112:6-.
21. Xie XZ, Chen MN, Zhu AY. Identification and characterization of two selenium-dependent glutathione peroxidase 1 isoforms from *Larimichthys crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2017;71:411-22.
22. Yang SL, Chung KR. Glutathione peroxidase is required for oxidative stress resistance and virulence in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Phytopathology*. 2015;105(11):153-4.
23. Dreyer A, Dietz KJ. Reactive Oxygen Species and the Redox-Regulatory Network in Cold Stress Acclimation. *Antioxidants*. 2018;7(11):15.
24. Denzoin L, Soraci A, Tapia3a M. Homeostasis del glutati3n. *Acta bioqu3mica cl3nica latinoamericana*. 2013;47:11.
25. Gutierrez-Mariscal FM, Yubero-Serrano EM, Villalba JM, Lopez-Miranda J. Coenzyme Q(10): From bench to clinic in aging diseases, a translational review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59(14):2240-57.
26. Regino W, Velasco H, Sandoval H. The protective role of bilirubin in human beings. *Revista Colombiana de Gastroenterologia*. 2009;24:293-301.
27. Trela A, Szymanska R. Less widespread plant oils as a good source of vitamin E. *Food Chemistry*. 2019;296:160-6.
28. Ballaz SJ, Rebec GV. Neurobiology of vitamin C: Expanding the focus from antioxidant to endogenous neuromodulator. *Pharmacological Research*. 2019;146.
29. Barnes MJ, Kodicek E. Biological Hydroxylations and Ascorbic Acid with Special Regard to Collagen Metabolism. *Vitamins and Hormones*1972. p. 1-43.
30. Bleilevens C, Doorschodt BM, Fechter T, Grzanna T, Theißen A, Liehn EA, et al. Influence of vitamin C on antioxidant capacity of in vitro perfused porcine kidneys. *Nutrients*. 2019;11(8).
31. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: The Most Effective Antioxidant in Human Blood Plasma. In: Emerit I, Packer L, Auclair C, editors. *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*. Boston, MA: Springer US; 1990. p. 155-63.
32. Illera M, Illera J, Illera JC. *Vitaminas y minerales* 1ed. Illera M, editor. Madrid: Editorial Complutense; 2000 229 p.
33. Zhang T, Wang Z, Wang XX, Sun WL, Cui XZ, Li RD, et al. Effects of vitamin A on antioxidant functions, immune functions and production performance in male sika deer (*Cervus nippon*) during the first antler growth period. *Italian Journal of Animal Science*. 2019;18(1):98-104.
34. Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Antioxidants in Cardiovascular Therapy: Panacea or False Hope? *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2015;2:29-.

35. Fuhrman B, Elis A, Aviram M. Hypcholesterolemic Effect of Lycopene and β -Carotene Is Related to Suppression of Cholesterol Synthesis and Augmentation of LDL Receptor Activity in Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;233(3):658-62.
36. Rao AV. Lycopene, Tomatoes, and the Prevention of Coronary Heart Disease. *Experimental Biology and Medicine*. 2002;227(10):908-13.
37. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;51:15-25.
38. Radomska-Lesniewska DM, Hevelke A, Skopinski P, Balan B, Jozwiak J, Rokicki D, et al. Reactive oxygen species and synthetic antioxidants as angiogenesis modulators: Clinical implications. *Pharmacological Reports*. 2016;68(2):462-71.
39. Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA, et al. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*. 2019;33(9):2221-43.
40. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998;56(11):317-33.
41. Chen L, Teng H, Xie ZL, Cao H, Cheang WS, Skalicka-Woniak K, et al. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure-activity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58(4):513-27.
42. Zamora-Ros R, Touillaud M, Rothwell JA, Romieu I, Scalbert A. Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2014;100(1):11-26.
43. Josè MA-S, Francesca Giampieri and Maurizio B. Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2013;20(5):621-38.
44. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012;18(14):1818-92.
45. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 2007;43(4):348-61.
46. Zalesak F, Bon D, Pospisil J. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacological Research*. 2019;146:27.
47. Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*. 1997;29(2):95-120.
48. Heinonen S, Nurmi T, Liukkonen K, Poutanen K, Wahala K, Deyama T, et al. In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(7):3178-86.
49. Bavaresco L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. 2003;29(5-6):181-7.
50. Delmas D, Lancon A, Colin D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*. 2006;7(4):423-42.
51. Erdman JW, Jr., Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, et al. Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of Nutrition*. 2007;137(3):718S-37S.

52. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000;55(6):481-504.
53. Cortell JM, Kennedy JA. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(22):8510-20.
54. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002;18(1):75-81.
55. Teng H, Chen L. Polyphenols and bioavailability: an update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59(13):2040-51.
56. Garzón GA. LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS: REVISIÓN. *Acta Biológica Colombiana*. 2008;13(3):27-36.
57. Ashihara H, Crozier A, Komamine A. *Plant Metabolism and Biotechnology* 2011.
58. Ozeki Y, Matsuba Y, Abe Y, Umemoto N, Sasaki N. Pigment Biosynthesis I. Anthocyanins. 2011. p. 321-42.
59. Mazza G, Cacace JE, Kay CD. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of Aoac International*. 2004;87(1):129-45.
60. Zanotti I, Dall'Asta M, Mena P, Mele L, Bruni R, Ray S, et al. Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food & Function*. 2015;6(1):13-31.
61. Blade C, Aragonés G, Arola-Arnal A, Muguerza B, Bravo FI, Salvado MJ, et al. Proanthocyanidins in health and disease. *Biofactors*. 2016;42(1):5-12.
62. Yaqub S, Farooq U, Shafi A, Akram K, Murtaza MA, Kausar T, et al. Chemistry and Functionality of Bioactive Compounds Present in Persimmon. *Journal of Chemistry*. 2016:13.
63. Asenso J, Yang X-D, Yu J, Zhou P, Wang C, Wei Z. Plant-based Anti-inflammatory Agents: Progress From Africa and China. *Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs*. 2016;2:52-66.
64. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*. 2009;26(8):1001-43.
65. Frydman A, Liberman R, Huhman DV, Carmeli-Weissberg M, Sapir-Mir M, Ophir R, et al. The molecular and enzymatic basis of bitter/non-bitter flavor of citrus fruit: evolution of branch-forming rhamnosyltransferases under domestication. *The Plant Journal*. 2013;73(1):166-78.
66. Yonemoto-Yano H, Maebuchi M, Fukui K, Tsuzaki S, Takamatsu K, Uehara M. Malonyl Isoflavone Glucosides Are Chiefly Hydrolyzed and Absorbed in the Colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(10):2264-70.
67. Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1998;68(6):1486S-91S.
68. Shimazu T, Inoue M, Sasazuki S, Iwasaki M, Sawada N, Yamaji T, et al. Isoflavone intake and risk of lung cancer: a prospective cohort study in Japan. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010;91(3):722-8.
69. Shim SM, Ferruzzi MG, Kim YC, Janle EM, Santerre CR. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry*. 2009;112(1):46-50.
70. Galanakis CM. *Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques*: Elsevier Science; 2016.

71. Apostoli P, International Program on Chemical S, World Health O, United Nations Environment P, International Labour O, Inter-Organization Programme for the Sound Management of C. Elemental Speciation in Human Health Risk Assessment: World Health Organization; 2006.
72. Pešić MB, Milinčić DD, Kostić AŽ, Stanisavljević NS, Vukotić GN, Kojić MO, et al. In vitro digestion of meat- and cereal-based food matrix enriched with grape extracts: How are polyphenol composition, bioaccessibility and antioxidant activity affected? *Food Chemistry*. 2019;284:28-44.
73. Jakobek L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*. 2015;175:556-67.
74. Wojtunik-Kulesza K, Oniszczyk A, Oniszczyk T, Combrzyński M, Nowakowska D, Matwijczuk A. Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols-A Non-Systematic Review. *Nutrients*. 2020;12(5):1401.
75. Lutz M. Biodisponibilidad de compuestos bioactivos en alimentos. *Perspectivas en Nutrición Humana*. 2013;15(2):217-26.
76. Angelino D, Cossu M, Marti A, Zanoletti M, Chiavaroli L, Brighenti F, et al. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: a review. *Food & Function*. 2017;8(7):2368-93.
77. Sensoy I. A Review on the Relationship Between Food Structure, Processing, and Bioavailability. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2014;54:902-9.
78. Perales S, Barberá R, Lagarda MJ, Farré R. Antioxidant capacity of infant fruit beverages: influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion. *Nutrición Hospitalaria*. 2008;23:547-53.
79. Ortega N, Reguant J, Romero M-P, Macia A, Motilva M-J. Effect of Fat Content on the Digestibility and Bioaccessibility of Cocoa Polyphenol by an in Vitro Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(13):5743-9.
80. Dupas C, Baglieri AM, Ordonaud C, Tome D, Maillard MN. Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2006;50(11):1053-60.
81. Li C, Yu W, Wu P, Chen XD. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;96:114-26.
82. Cereceres-Aragón A, Rodrigo-García J, Álvarez-Parrilla E, Rodríguez-Tadeo A. Ingestión de compuestos fenólicos en población adulta mayor. *Nutrición Hospitalaria*. 2019;36(2):470-8.
83. Velderrain-Rodríguez GR, Palafox-Carlos H, Wall-Medrano A, Ayala-Zavala JF, Chen CYO, Robles-Sánchez M, et al. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & Function*. 2014;5(2):189-97.
84. Schonfeldt H, Pretorius B, Hall N. Bioavailability of Nutrients. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016.
85. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 2012;27(1):76-89.
86. Day AJ, Williamson G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *British Journal of Nutrition*. 2001;86(S1):S105-S110.

87. Williamson G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2013;57(1):48-57.
88. Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1999;69(1):87-94.
89. Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, Jenkinson AM, McPhail DB, et al. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1998;52(10):733-6.
90. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA, et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *Febs Letters*. 1998;436(1):71-5.
91. Hollman PCH, Devries JHM, Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. ABSORPTION OF DIETARY QUERCETIN GLYCOSIDES AND QUERCETIN IN HEALTHY ILEOSTOMY VOLUNTEERS. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995;62(6):1276-82.
92. Gutiérrez-Grijalva EP, Ambriz-Pérez DL, Leyva-López N, Castillo-López RI, Heredia JB. Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2016;66(2):87-100.
93. Grant R, Guest J. Efectos de los antioxidantes derivados de la dieta sobre el sistema nervioso central. *Revista Internacional de Nutrición, Farmacología, Enfermedades Neurológicas* 2012. p. 185-97.
94. Rocha R. Fluoruro en alimentos: contenidos, bioaccesibilidad y absorción por el epitelio intestinal. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2013.
95. Bruce S, Noller B, Matanitobua V, Ng J. In vitro physiologically based extraction test (PBET) and bioaccessibility of arsenic and lead from various mine waste materials. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*. 2007;70(19):1700-11.
96. Etcheverry P, Grusak MA, Fleige LE. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium polyphenols, zinc, and vitamins B-6, B-12, D, and E. *Frontiers in Physiology*. 2012;3:22.
97. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH): Springer
- Copyright 2015, The Editor(s) (if applicable) and the Author(s). 2015.
98. Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, Van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr*. 1981;34(10):2248-56.
99. Torres A, Cova A, Valera D. Efecto del proceso de germinación de granos de Cajanuscajan en la composición nutricional, ácidos grasos, antioxidantes y bioaccesibilidad mineral. *Revista chilena de nutrición*. 2018;45:323-30.
100. Domínguez-González R, Romarís-Hortas V, García-Sartal C, Moreda-Piñeiro A, Barciela-Alonso MdC, Bermejo-Barrera P. Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. *Talanta*. 2010;82(5):1668-73.
101. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assuncao R, Ballance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*. 2019;14(4):991-1014.
102. Rivas E. Desarrollo de un protocolo simulador del tracto gastrointestinal mediante reactores químicos automatizados. Málaga: Universidad de Málaga; 2014.
103. Torres S. BIOACCESIBILIDAD DE ARSÉNICO Y MERCURIO EN

ALIMENTOS CON POTENCIAL RIESGO TOXICOLÓGICO. Valencia: Universidad de Valencia; 2011.

104. Capoano E. Simulator of human intestinal microbial ecosystem (SHIME) Wageningen: Wageningen University & Research; 2015 [Unknown:]

105. Oltra D. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL DE FÁRMACOS. ESTUDIO IN VITRO E IN SITU. España, Valencia Universitat de València; 2010. p. 437.

106. Zapata C, Cardona M. Estudio de la biodisponibilidad de los antioxidantes hidrosolubles tipo flavonoides para su utilización en la industria de las bebidas. . Corporación Universitaria Lasallista 2014. p. 44

107. Gómez L. Estudio Comparativo in vitro de los Polifenoles Vegetales Flavan-3-oles, Flavanonas y Flavonas y la Relación de su Estructura Molecular con el Efecto sobre la Viabilidad Celular Murcia: Instituto Universitario de Investigación del Envejecimiento; 2016. p. 152.

108. Ruiz D, Baltazar E, Espinosa J. Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos Mexico: Rev Mex Cienc Farm; 2012.

109. Caldera Y. Biodisponibilidad *in vivo* de hierro y calcio en cereales y derivados. Valencia: Universidad de Valencia; 2011.

110. Clara Mdlc. CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR IN VITRO EN CÉLULAS HT-29 M6 DE CANCER COLORRECTAL. . Barcelona: Departament de Ciències Experimentals i de la Salut; 2004. p. 159.

111. Gómez M. Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte in vitro y de disponibilidad en humanos Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2015. p. 359.