

**Estudio de la biodisponibilidad de los antioxidantes hidrosolubles tipo flavonoides para su
utilización en la industria de las bebidas.**

Claudia Yaneth Zapata Giraldo

Marbe Alexandra Cardona

Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Alimentación y Nutrición

Asesor

Mauricio Restrepo

MSc Nutrición y Alimentos

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ingenierías

Especialización en Alimentación y Nutrición

Caldas Antioquia

2014

Contenido

Resumen	5
Abstract	6
Generalidades	9
Actividad antioxidante (Técnicas analíticas)	14
Aplicaciones de las técnicas en alimentos	18
Biodisponibilidad	20
Técnicas <i>in vitro</i>	23
Técnicas <i>in vivo</i>	25
Aplicaciones	29
Formulación de bebidas	35
Beneficios de las bebidas con antioxidantes	38
Conclusiones	40
Bibliografía	41

Lista de ilustraciones

Ilustración 1	Clasificación de los polifenoles	13
----------------------	---	-----------

Lista de tablas

Tabla 1 Métodos para determinar total de capacidad antioxidante.....	19
--	----

Resumen

Para llegar a impactar en un mercado tan competitivo y cambiante es de esperarse que la industria alimentaria busque el lanzamiento de productos más innovadores en el área de las bebidas, sin embargo para lograr esto es necesario hacer alianza con la ciencia. Mediante investigaciones científicas y estudios clínicos se ha intentado formular bebidas tales como jugos, infusiones y bebidas energéticas que tengan un impacto no sólo mayor sino verificable en la salud del consumidor. Por consiguiente el propósito de esta monografía, es adentrar un poco más en lo que se ha alcanzado en materia de las aplicaciones de los antioxidantes hidrosolubles tipo flavonoides en la industria de las bebidas y su valor agregado. Para realizar este estudio se recopilaron más de cincuenta artículos, entre revistas científicas y patentes. Esto permitió tener la retroalimentación necesaria para abarcar el tema de forma verificable y coherente. La información recopilada fue estudiada y analizada para luego organizarse dentro de cuatro capítulos así: generalidades (capítulo 1), actividad antioxidante (técnicas antioxidantes; capítulo 2), Biodisponibilidad (capítulo 3) y Aplicaciones en la industria (capítulo 4). Mediante este estudio se logra concluir que el campo de los antioxidantes de tipo hidrosoluble todavía es un tema que puede seguir siendo explorado ya que a través de bebidas saludables con impacto en la salud se convierte en un reto más que multidisciplinario muy desafiante para cualquier investigador al interactuar en la industria.

Palabras clave

Antioxidante, flavonoides, técnicas *in vivo*, técnicas *in vitro*, biodisponibilidad, bebidas.

Abstract

In reaching impact in such a competitive and changing market, it is expected that the food industry looking to launch more innovative products in the area of drinks. However to achieve this it is necessary to make an alliance with science. Through scientific research and clinical studies have attempted to formulate beverages such as juices, teas up and energy drinks that impact not only greater but verifiable in consumer health. Therefore, the purpose of this paper is to delve a little deeper into what has been achieved in the field of applications of water-soluble antioxidants in the beverage industry and its value added. To make this study more than fifty articles were collected between scientific journals and patents. This allowed the necessary feedback to cover the topic in a verifiable and consistent way. The information collected was studied and analyzed and then organized into four chapters as follows: an overview (Chapter 1), antioxidant activity (antioxidant techniques, Chapter 2), bioavailability (Chapter 3) and Applications in industry (Chapter 4). Through this study were able to complete the field of water-soluble antioxidants such it is still an issue that may remain as explored through health y beverages impact on health becomes a more challenging multidisciplinary challenge for any researcher to interacting in the industry.

Keywords

Antioxidant, flavonoids, *in vitro* trials, *in vivo* trials, bioavailability, beverages

Debido a la importancia de una alimentación sana y a los estilos de vida actuales que exigen largos períodos laborales deteriorando la calidad de vida, el hombre se encuentra en la búsqueda de un equilibrio, el consumidor continuamente está explorando alimentos que posean un valor agregado o productos con ingredientes funcionales. Dentro de una gran gama de productos presentes en el mercado y susceptibles a innovación están las bebidas, teniendo en cuenta que este campo es tan amplio y con mucho por explorar se viene intentando cada día formular mejores tipos de bebidas de diversas matrices tales como: frutas, infusiones de té y sustancias fitoquímicas que tengan impacto clínico desde el punto de vista de la salud (Lima, De Dea Lindner, Soccol, Parada, & Soccol, 2012) (Rocha Guzmán et al., 2012) (Zucca, Sanjust, Trogu, Sollai, & Rescigno, 2010) (Shipp, 2010) (Blasa, Gennari, Angelino, & Ninfali, 2010). Normalmente estas matrices son mezcla de ingredientes funcionales entre los cuales se cuentan antioxidantes con una estructura química y concentración determinada. Un antioxidante es una sustancia que disminuye la generación de productos oxidados en un sistema de reacciones de radicales libres. El concepto se originó en la química orgánica, introducido por Moureau hace más de setenta años, para describir el efecto de los polifenoles en la polimerización de la acroleína. Los polifenoles antioxidantes fueron luego extensamente utilizados en la síntesis industrial de polímeros por reacciones de radicales libres en cadena en los procesos de fabricación de caucho sintético y otros polímeros similares. El concepto y el uso de los antioxidantes pasaron, en las décadas del 40 y del 50, a la química de los productos alimenticios industrializados donde su uso constituye una práctica actual muy difundida.

En las últimas dos décadas la palabra antioxidante ha adquirido un nuevo significado, en este caso biomédico, constituyéndose en la descripción de un tipo de medicamento o de nutracéutico, caracterizados por producir una disminución de la velocidad de las reacciones de radicales libres

en el organismo humano. El efecto biológico ocurre en los organismos vivos en general, incluyendo animales, vegetales y bacterias, pero el uso cotidiano y mediático se refiere a su uso por las personas (Rathore, Suthar, Pareek, & Gupta, 2011). El uso de los antioxidantes ya se ha extendido además a la cosmética y productos de aseo. Por eso se hace necesario demostrar la importancia que tiene el grado de biodisponibilidad de un antioxidante tipo flavonoide hidrosoluble en el momento de seleccionarlo para aplicarlo en la industria de las bebidas (Carlsen et al., 2010) (Tabart, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommès, 2010) (Blasa et al., 2010).

Para cumplir con este propósito, esta monografía se compone de cuatro capítulos: Capítulo 1: generalidades, capítulo 2: actividad antioxidantes (técnicas analíticas), capítulo 3: biodisponibilidad y capítulo 4: aplicación en la industria de las bebidas. En el primer capítulo se define el concepto de antioxidante, sus tipos y características. En el segundo capítulo se tratan las técnicas empleadas para determinar la actividad antioxidante. El tercer capítulo se aborda acerca de la biodisponibilidad, con énfasis en flavonoides hidrosolubles. En el cuarto capítulo se resaltan las aplicaciones y condiciones de estos antioxidantes en la industria de las bebidas. Se finaliza con las conclusiones pertinentes al escrito.

Generalidades

Los antioxidantes son un grupo de sustancias químicas que tienen la capacidad de retardar el proceso oxidativo bioquímico dentro del organismo, pues son ellos quienes soportan el ataque proveniente de los radicales libres, los cuales son moléculas o fragmentos de ellas que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Este electrón desapareado confiere un grado considerable de reactividad al radical libre logrando además que pueda existir de forma independiente por cortos períodos de tiempo. En la actualidad varios estudios científicos han determinado que el consumo de antioxidantes contenidos en frutas y verduras como en sus subproductos puede tener un efecto benéfico en la salud. Varios autores están de acuerdo en que los antioxidantes pueden reducir el estrés oxidativo, (aumento en los agentes oxidantes, principalmente Especies Reactivas del Oxígeno-EROs, y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de ellas.) limitar la velocidad de propagación y terminación de las reacciones en cadena de radicales libres, mediante el aumento de la defensa natural de las células o el barrido de radicales libres y prevenir la oxidación de biomoléculas, y así evitar que se generen enfermedades coronarias y cáncer. (Kutaiba Ibrahim & Mohamed Abdalkarim, 2012)(Carlsen et al., 2010)

Debido a esto, los antioxidantes han llegado a convertirse en el principio activo de una cantidad de productos innovadores de la industria alimentaria así como de numerosas aplicaciones en el campo farmacéutico, cosmético y nutracéutico. Pero es en el medio de la medicina donde estas sustancias se han convertido en el punto de partida y tema de investigaciones para combatir diversas enfermedades relacionadas con el proceso oxidativo biológico. Se considera que cualquier sistema biológico tiene que conservar un balance entre la formación de las especies reactivas del oxígeno y las especies reactivas del nitrógeno, (ROS y

RNS, respectivamente). Estas especies se forman regularmente como resultado de las funciones habituales del organismo o como resultado de un excesivo estrés oxidativo. Especies reactivas tales como el superóxido O_2^- , el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxil ($HO\cdot$), el óxido de nitrógeno ($NO\cdot$), el peroxinitrito ($ONOO\cdot$) y el ácido hipocloroso ($HOCl$) son todos productos normales que se generan de las rutas metabólicas del organismo humano, pero que en exceso pueden generar sustancias nocivas. (Rathore et al., 2011)(Ndhlala, Moyo, & Van Staden, 2010)(Rui et al., 2012)(Almeida et al., 2011)(Wootton-Beard & Ryan, 2011) (Londoño, J. L., 2013)

Los diferentes antioxidantes pueden categorizarse ya sea por su peso molecular, sus características fisicoquímicas y sus mecanismos de acción. Dentro de los antioxidantes que presentan alto peso molecular se encuentran las enzimas cuyas estructuras son en su mayoría de carácter proteico. Entre ellas se destacan la peróxido dismutasa, la catalasa y la peroxidasa glutatión, las cuales atenúan el efecto de la proliferación de ROS y RNS removiendo oxidantes potenciales o transformándolos a especies más estables. Entre las proteínas de alto peso molecular se tiene la albumina, la ceruloplasmina, la transferrina y la haptoglobulina, las cuales están todas presentes en el plasma. Estos se enlazan a metales redox activo, los cuales ganan electrones, a través del enlace compartido y limitan la producción de radicales libres. En el grupo de los antioxidantes de bajo peso molecular se encuentran los liposolubles como α -tocoferol, carotenoides, quinonas, bilirrubina y algunos polifenoles. Los principales antioxidantes solubles en agua y de bajo peso molecular que se encuentran en el plasma son la vitamina C y el ácido úrico y algunos polifenoles. Se ha encontrado que las frutas y las verduras son fuente de antioxidantes de alto y bajo peso molecular como las vitaminas, los carotenoides, los minerales y los polifenoles. (Almeida et al., 2011)(Rathore et al., 2011)

Vale la pena profundizar un poco en la vitamina C, también conocida como ácido ascórbico, es un agente reductor fuerte, fácilmente oxidable al ácido dehidroascórbico. El carácter ácido del ácido ascórbico se debe a la instalación del grupo-OH, unido a C2 para liberar un protón, ya que el ion mono dehidroascórbico que se forma se estabiliza por resonancia. Se considera vitamina esencial ya que el cuerpo no es capaz de sintetizarla, se toma proveniente por lo general de verduras y frutas frescas. La vitamina C mejora la respuesta inmune y favorece la eliminación de xenobióticos y radicales. De hecho, reacciona directamente con los aniones superóxido, radicales hidroxilo, y varios hidroperóxidos de lípidos (Blasa et al., 2010)

Los polifenoles 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, estilbenos, cumarinas, ligninas y flavonoides. Su estructura posee uno o más anillos aromáticos, con uno o más grupos hidroxilo. La eliminación de radicales (ver reacción 1) consiste en la capacidad para inactivar directamente el ROS mediante iones de metales prooxidantes que se unen por medio de grupo -OH (Ferretti, Bacchetti, Belleggia, & Neri, 2010)(Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011)(Almeida et al., 2011)(Palafox-Carlos, Ayala-Zavala, & González-Aguilar, 2011)

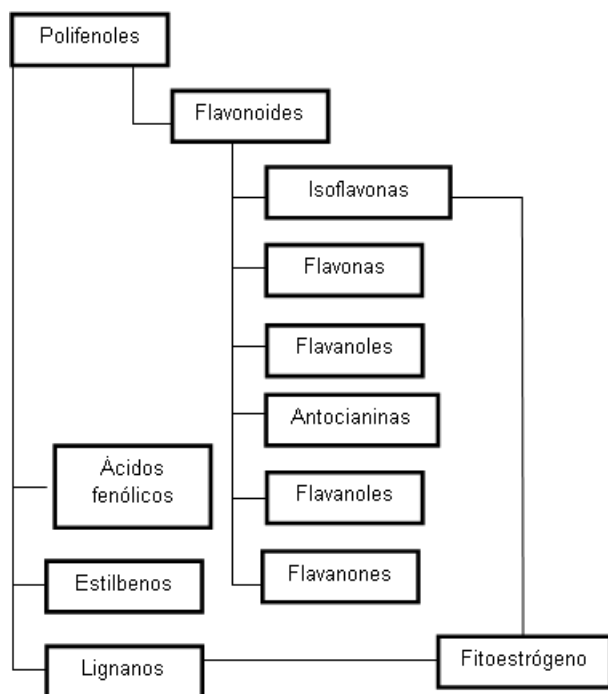


El radical fenoxilo ($\text{ArO}\cdot$) formado en esta reacción es relativamente estable y reacciona lentamente con otros sustratos, lo que interrumpe la cadena de reacciones oxidativas. A altas concentraciones, el polifenol puede actuar como un pro-oxidante, ya que la cantidad de radicales fenoxilos formados son capaz de desencadenar reacciones oxidativas. (Blasa et al., 2010). Los ácidos fenólicos comprenden dos subgrupos principales: ácido benzoico y ácidos cinámicos; en

general se producen en las frutas y verduras, ya sea en forma libre o conjugada, por lo general como ésteres o amidas. (Blasa et al., 2010). Los estilbenos son compuestos fenólicos que contienen dos anillos bencénicos unidos por un puente etano o eteno. Están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, en calidad de fitoalexinas y reguladores del crecimiento. (Blasa et al., 2010). Los lignanos son dímeros del alcohol cinámico, que se cicla en diferentes formas, la generación de una amplia gama de moléculas, se encuentran en los tejidos leñosos, cereales y verduras como las zanahorias, el brócoli y las bayas. (Blasa et al., 2010) Los lignanos y las isoflavonas son conocidos como fitoestrógenos, que son los factores de protección de los sistemas cardiovascular e inmunológico.

Los flavonoides constan de dos anillos aromáticos, A y B, unidas por un anillo heterocíclico oxigenado C. Basado en la estructura del anillo C, así como en su estado de oxidación y grupos funcionales, los flavonoides se clasifican como: isoflavonas, flavonas, flavonoles, antocianinas, flavanoles, flavanonas (ver ilustración1) Los flavonoides se encuentran ampliamente en frutas y verduras, los cuales se presentan con frecuencia como glucósidos. En estas estructuras el proceso de glicosilación hace que las moléculas sean menos reactivas, pero más solubles. Los flavonoides actúan en las plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, repelentes y protectores de la luz. Muchos estudios han demostrado que los flavonoides exhiben actividad biológica y farmacológica, incluyendo antioxidante, citotóxica, anticancerígena, antiviral, antibacterial, cardioprotectora, hepatoprotectora, neuroprotectora, antimalaria, antiesmanial, antitripanosomal y antiamebial. (Blasa et al., 2010)(Grünz et al., 2012)(Kutaiba Ibrahim & Mohamed Abdalkarim, 2012)(Shipp, 2010), en la ilustración 1 se resume la clasificación de los polifenoles.

Ilustración 1 Clasificación de los polifenoles



Fuente:(Blasa et al., 2010)

Actividad antioxidante (Técnicas analíticas)

Diferentes ensayos bioquímicos se han desarrollado y modificado continuamente con el fin de que se pueda medir con mayor precisión la capacidad antioxidante total (TAC por sus siglas en inglés), entendida esta como la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo la peroxidación lipídica) (Londoño, J. L., 2013). Para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia, existen diversas técnicas; aunque en la actualidad se siguen buscando nuevas metodologías para innovar en esta área pues hay mucho por recorrer aún (Blasa, Angelino, Gennari, & Ninfali, 2011); los métodos más ampliamente utilizados y aceptados de estos ensayos son: ORAC (capacidad de absorción del oxígeno radical), ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico (Bouayed et al., 2011)), FRAP (potencial antioxidante reductor férrico), TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a trolox), DPPH (Difenilpicrilhidrazilo) (Wootton-Beard, Moran, & Ryan, 2011)

El ensayo de la capacidad oxidante del radical oxígeno inicial (ORAC), utiliza la fluoresceína β -ficoeritrina (B-PE) como sustrato de una proteína oxidable y la 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) para generar radicales peroxil. Pero debido a fallas fue adaptado para utilizarse un sustrato no proteico, la fluoresceína. (Breiter et al., 2011) Este ensayo utiliza un sistema de multicanales acoplado a un lector de placas de fluorescencia. Los antioxidantes agregados compiten con el sustrato por los radicales peroxil, inhibiendo y retardando la oxidación de la fluoresceína. En esta técnica la fluorescencia se mide cada minuto por 35 minutos bajo condiciones ambientales (pH 7,4; 37°C) a 525 nm con excitación a 485 nm, la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes presentes. (Wootton-Beard et al., 2011)(Ndhlala et al., 2010). El ensayo ORAC también puede medir la capacidad antioxidante de cadenas hidrofílicas y lipofílicas. (Ndhlala et al., 2010)

El método FRAP utiliza el complejo férrico Fe-TPTZ como una sonda, que se transforma a una forma ferrosa de color cuando reacciona con los antioxidantes (Wootton-Beard et al., 2011). Se basa en la hipótesis de que la reacción redox se desarrolla en 4 minutos, pero esto no siempre es cierto ya que algunos compuestos fenólicos reaccionan más lentamente y requieren tiempos más largos. El principio de las reacciones es la transferencia electrónica en la cual la sal de hierro férrico, es decir el ferricianuro de potasio es utilizado como un antioxidante. Este método también ha sido susceptible a modificaciones dadas por notables investigadores quienes los han resaltado en sus resultados. La mayor ventaja del ensayo FRAP es su simplicidad, rapidez y robustez, es principalmente utilizado para determinar la capacidad antioxidante en extractos botánicos (Ndhlala et al., 2010)

El ensayo Folin-Ciocalteu fue diseñado para analizar compuestos fenólicos. El mecanismo básico de este se da por una reacción redox, la cual se utiliza comúnmente para cuantificar los compuestos fenólicos solubles totales en productos naturales utilizando ácido gálico como estándar. Esta reacción envuelve la reducción de los fenoles mediante el reactivo ácido tungstico fosfomolibdico. Los compuestos fenólicos se van oxidando en medio básico resultando en la formación del óxido superóxido, el cual reacciona con el molibdato para formar el óxido de molibdeno MoO_4^{2-} . El óxido de molibdeno tiene una absorbancia muy intensa 725 nm y los compuestos fenólicos totales se estiman por la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu. La reacción está compuesta por la muestra, agua destilada, reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio 2-40%, se incuban a temperatura ambiente durante 40 minutos. La absorbancia se mide a 725 nm. La concentración de los compuestos fenólicos se calcula basada en los equivalentes de ácido gálico (GAE). (Ndhlala et al., 2010) (Wootton-Beard et al., 2011)

El ensayo DPPH conocido también como 1,1-difenil-2-picrilhidrazil es ampliamente utilizado en plantas para evaluar la capacidad antioxidante de los radicales libres, en muestras previamente preparadas (Demirtas, Erenler, Elmastas, & Goktasoglu, 2013). El radical nitrógeno orgánico enlazado a DPPH es muy estable, reacciona con compuestos que pueden donar átomos de hidrógeno y el cual tiene una absorbancia máxima UV-vis a 515 nm. El principio del poder antioxidante del DPPH se observa cuando al reducirse este reactivo se decolora pasando a violeta púrpura en solución metanólica. Simultáneamente, la capacidad reductora puede ser determinada por la resonancia del spin del electrón. Son indicios de una significativa capacidad antioxidante cuando observa una decoloración, una baja absorbancia de la mezcla de la reacción. La fórmula para calcular estas modificaciones es:

$$\% \text{ RSA} = 100 \times (1 - \text{AE}/\text{AD})$$

Donde AE es la absorbancia de la reacción de la mezcla que contiene el extracto o el estándar de antioxidante y AD es la absorbancia de la solución de DPPH. Esta técnica es válida para cuantificar muestras con antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

El ensayo TEAC capacidad antioxidante equivalente a trolox involucra el uso de un preformado radical ABTS (2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), el cual es utilizado para medir la capacidad antioxidante total. El principio del ensayo se da mediante la decoloración del ABTS por los compuestos antioxidantes. Esto refleja la cantidad de radicales ABTS, que son oxidados dentro de un periodo de tiempo determinado (6 min) en relación con la de la 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (trolox). La capacidad antioxidante total es calculada por la relación de disminución de la absorbancia en relación a la del trolox y es expresada en términos de la capacidad antioxidante del equivalente a trolox del extracto (TEAC/mg).(Ndhlala et al., 2010)

El ensayo decolorante de ácido linolénico β -caroteno mide la inhibición de la producción de compuestos orgánicos volátiles y la formación de dienos conjugados hidroperoxidados debido a la oxidación del ácido linoleico y la decoloración del β -caroteno en la emulsión. El mecanismo de reacción involucra la decoloración de los carotenos por la vía de la oxidación inducida por calentamiento y la resultante decoloración que va siendo inhibida o disminuida por los antioxidantes que donan átomos de hidrógeno que aplacan o atacan a los radicales. La autooxidación del β -caroteno se lleva a cabo mediante incubación en un baño de agua a 50°C haciendo del control de temperatura, un parámetro crítico. La absorbancia del β -caroteno se mide a 470 nm. La mayor ventaja del método de coloración de carotenoides es su aplicación en ambos ambientes tanto lipofílico como hidrofílico. Otra ventaja es que el ensayo de decoloración de carotenoides puede detectar la acción antioxidante, así como la pro-antioxidante de un compuesto en investigación. (Ndhlala et al., 2010)

También existen técnicas basadas en la inhibición de la peroxidación lipídica usando modelos que involucran la oxidación de los sustratos. La evaluación de estos modelos se basa en la medición de los cambios en la concentración de los compuestos que están siendo oxidados, la reducción del oxígeno o la formación de productos oxidados. La cuantificación de la pérdida de reactivos, la producción de radicales y la generación de productos de oxidación primarios y secundarios. Además es generalmente utilizado como un marcador para peroxidación lipídica, dependiendo de la etapa de oxidación. La oxidación lipídica involucra la formación concomitante y la degradación de varios productos.

El ensayo de la capacidad oxidante del anión superóxido es una técnica los radicales superóxido se producen utilizando un sistema generador como el que presenta la hipoxantina xantina oxidasa acoplado a la reducción con tetrazolionitroazul (NBT). Los radicales del

superóxido se generan en una reacción que contiene $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ buffer (50 mM, pH 7.4), solución Na_2EDTA en buffer (15 mM), solución NBT en buffer (0.6 mM), xantina oxidasa en buffer (1 unidad por 100 mL buffer) y una muestra (buffer $1.0\mu\text{g}/25\ \mu\text{L}$). La absorbancia se mide a 540 nm durante 2.5 min después de agregar la xantina oxidasa utilizando un plato microlector. (Ndhkala et al., 2010)

Aplicaciones de las técnicas en alimentos

Los antioxidantes de mayor consumo en la dieta son los polifenoles y el punto de referencia sigue siendo HPLC, este es un método estándar para la medición de los polifenoles individuales y totales "conocidos" en una muestra a través de adición. En algunas situaciones, especialmente cuando se analizan muestras digeridas o fluidos humanos puede ser ventajoso utilizar un método con menos selectividad de los compuestos que se incluyen en la medición tales como el método de reactivo de Folin Ciocalteu (FC). Sin embargo, ha habido un número de críticas al método de FC como medida de polifenoles totales, como se puede dar lugar a una sobreestimación de los contenidos de polifenoles debido a la interferencia de las sustancias no - fenólicas solubles en agua tales como vitamina C, que también puede reducir el complejo de Folin-Ciocalteu. (Wootton-Beard et al., 2011)(Rathore et al., 2011)

Se ha encontrado que en bebidas a base de té de mate la técnica más señalada es la DPPH. (Lima, De Dea Lindner, Soccol, Parada, & Soccol, 2012b) Para el caso de infusiones botánicas (Rocha Guzmán et al., 2012) se han evaluado a través de técnicas tales como Folin-Ciocalteu, TFC, TEAC y ORAC. Todo esto para abarcar ampliamente las estructuras fenólicas. (Tabart et al., 2010)(El shobaki, Kassem, & Kader, 2011)(Helmy, 2012). En bebidas comerciales a base de frutas se han determinado técnicas como (Tabart et al., 2010) Folin-Ciocalteu, DPPH,

TEAC, FRAP, ORAC donde se ha encontrado que comparando con bebidas a base de té, estas primeras presentan mayor actividad antioxidante debido a la presencia de aditivos.

Diferentes estudios han comparado los datos obtenidos con los ensayos comunes de capacidad antioxidante, en algunas ocasiones se ha encontrado correlación significativa entre los datos otras veces no. La importancia de la capacidad antioxidante y el enorme número de moléculas y productos a ser evaluados han generado una serie de datos, la utilización de los cuales no es fácil debido a la falta de normalización en los métodos. Sin embargo, con frecuencia se ha observado una tendencia similar entre los valores (Blasa et al., 2010), en la tabla 1 se comparan los diferentes métodos.

Tabla 1 Métodos para determinar la capacidad antioxidante total

Método	ORAC	FRAP	TEAC	Folin-Ciocalteu	DPPH
Reactivo	AAPH, TROLOX, fluoresceína	TPTZ, FeCl ₃ , R-ficoeritrina	TROLOX, K ₂ SO ₄ , ABTS	ácido tungsticofosfomolibdico, ácido gálico	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
Instrumento	Espectrómetro Lector de placas de fluorescencia	Espectrómetro Lector de placas de fluorescencia	Espectrofotómetro	Espectrofotómetro	Espectrofotómetro UV
Temperatura (°C)	37	37	37	Ambiente	
Absorbancia (nm)	Excitación 485, Emisión. 520	Excitación 495, Emisión. 575	415 a 734 nm	725 nm	515nm
pH	7.4	7.4	7.4		
Calculo de los resultados	Área de fluorescencia bajo la curva	Duración de la fase de latencia	Disminución de la absorbancia en presencia de la muestra	Equivalente ácido gálico	Absorbancia máxima
Antioxidantes	Lipofílico en presencia de ciclodextrina	Lipofílico en presencia de ciclodextrina	lipofílico	Lipofílico e hidrofílico	Lipofílico e hidrofílico

Fuente:(Wootton-Beard et al., 2011) (Ndhlala et al., 2010)

Biodisponibilidad

La biodisponibilidad es un elemento relevante cuando se estudia el efecto de los antioxidantes en la salud humana. El interés en este tema está aumentando a medida que las compañías de alimentos invierten continuamente en el desarrollo e innovación de nuevos productos, que se definen como "funcionales" con la presencia de antioxidantes o fitoquímicos específicos (Kamiloglu, Boyacioglu, & Capanoglu, 2013); es importante resaltar que la industria de alimentos no sólo debe conocer la cantidad del nutriente que está presente en el alimento, sino la cantidad del mismo biodisponible en la producción de un alimento funcional o natural (Muñoz et al., 2010) (Kesic, Hodzic, Crnkic, Saletovic, & Catovic, 2010). El término "biodisponibilidad" fue originalmente utilizado en farmacología para definir el "ritmo y la medida en que un fármaco llega a su lugar de acción". Aunque también se ha definido como la mayor parte de la fracción de un nutriente ingerido o compuesto que alcanza la circulación sistémica y los sitios concretos en que pueda ejercer su acción biológica.(Shipp, 2010) En otras palabras, la cantidad ingerida del nutriente que es capaz de ejercer sus efectos beneficiosos en los tejidos diana.(Kamiloglu et al., 2013) También varios autores definen la biodisponibilidad a la fracción del nutriente ingerido que se convierte en disponible para la utilización de funciones fisiológicas normales o para su almacenamiento en el cuerpo humano.(Rodriguez-Amaya, 2010) La Oficina para la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) define como biodisponibilidad "la velocidad y el grado al cual se absorbe la fracción terapéutica y se convierte en disponible para el sitio de acción del fármaco,(Holst & Williamson, 2008) para concluir la definición farmacológica "clásica" de biodisponibilidad, vincula e integra procesos en concreto como: liberación, absorción,

distribución, metabolismo y excreción (Holst & Williamson, 2008)(Jin, Alimbetov, George, Gordon, & Lovegrove, 2011)

Muchos factores diferentes pueden influir en la biodisponibilidad de un compuesto. El concepto de biodisponibilidad incorpora: bioaccesibilidad, absorción, distribución tisular y bioactividad. El primer factor es la bioaccesibilidad o disponibilidad para la absorción en el tracto gastrointestinal(Mateo Anson, van den Berg, Havenaar, Bast, & Haenen, 2009)

Para ejercer su actividad biológica, los antioxidantes tienen primero que ser bioaccesibles es decir se define como la cantidad que es potencialmente absorbible desde el lumen, donde se da la liberación de la matriz del alimento y solubilización (Bouayed et al., 2011) (Holst & Williamson, 2008).

Existen diferentes etapas por la vía metabólica donde se dan los cambios en la biodisponibilidad de los nutrientes y estos son:

- La liberación del nutriente de la matriz alimentaria físico-química, lo cual busca que este pueda lograr la conversión a una forma química que pueda unirse e introducirse a las células del intestino delgado donde ocurre la absorción.
- Los efectos de las enzimas digestivas en el intestino
- La unión y utilización por parte de la mucosa intestinal
- El paso por la pared intestinal (pasando a través de las células, entre ellas o de las dos formas) a la sangre o la circulación linfática
- La distribución sistémica
- La deposición sistémica
- El uso metabólico y funcional

- La excreción (por vía urinaria o fecal) (Kamiloglu et al., 2013)

En consideración a lo anterior, los antioxidantes son por naturaleza y función, sujetos a la oxidación, lo que limita su estabilidad en el producto durante el almacenamiento, procesamiento de alimentos y la digestión, y por tanto su bioaccesibilidad (Holst & Williamson, 2008)(Benzie & Wachtel-Galor, 2012)(Benzie & Wachtel-Galor, 2012)

La biodisponibilidad se mide normalmente mediante ensayos in vivo (por ejemplo, en el plasma sanguíneo de los seres humanos), por lo que factores tales como la variabilidad individual, estado fisiológico, las dosis y la presencia de otros componentes de la comida juegan un papel importante.(Erejuwa, Sulaiman, & Ab Wahab, 2012) La biodisponibilidad de antioxidantes depende de muchos factores, existen cuatro principales tales como: los relacionados con el antioxidante (estructura química, tipo de enlace, entre otros), la matriz del alimento (preparación, características, procesamiento, entre otros), los relacionados con el organismo (actividad de la enzima, la genética, entre otros) y los externos (alimentos, disponibilidad, diferentes condiciones ambientales tales como el sol, la lluvia, entre otros). Respecto a la estructura química, es de señalar que la biodisponibilidad está influenciada particularmente por unas estructuras químicas denominadas agliconas y por su tipo de glucósido, generando derivados que pueden ser más polares, hidrosolubles y fácilmente excretables. (Kamiloglu et al., 2013)

Otros aspectos que también afectan la biodisponibilidad de los antioxidantes en el organismo, son de tipo endógeno como la masa de la 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 da en porciones diferentes del sistema digestivo. (Fu et al., 2011)(Rodríguez-Amaya, 2010)(Holst & Williamson, 2008)(Grant & Guest, 2012). Por ejemplo es de señalar que los compuestos fitoquímicos son procesados por el cuerpo como xenobióticos ya que no distingue entre beneficioso, neutral o tóxico.(Holst & Williamson, 2008)

Los métodos para determinar la biodisponibilidad o la bioaccesibilidad de antioxidantes implican simulación de experimentos realizados en un laboratorio (*in vitro*) o modelos en humanos (*in vivo*). Los métodos *in vivo* proporcionan datos directos de la biodisponibilidad y han sido utilizados para una gran variedad de nutrientes. (Kamiloglu et al., 2013)

Técnicas *in vitro*

Entre las técnicas *in vitro* esta la dialización muy eficaz para conocer la solubilidad de ciertos complejos de cationes como, el cobre, el molibdeno, el zinc y su relación con la biodisponibilidad. Los métodos *in vitro* se han diseñado para simular el proceso digestivo en los seres humanos, pero estos métodos están limitados porque no permiten medir las interacciones entre la comida y el sistema digestivo, modificando la absorción del alimento en las diferentes partes del tracto gastrointestinal y de la respectiva composición de las secreciones digestivas que dependen de lo ingerido y de la flora intestinal. La digestibilidad *in vitro* con diálisis es una técnica que tiene en cuenta la solubilidad de los productos digeridos de los no digeridos para un análisis posterior. Por ejemplo este método permite la separación de los productos proteolíticos de una mezcla durante la digestión mediante el reemplazo continuo del tampón al usar una bomba peristáltica, lo que permite su selección y aislamiento para análisis posteriores, a la vez

que también permite seguir la cinética de la digestión y reducir la posibilidad de que se produzca una inhibición de la reacción por acumulación de los productos. El fundamento es sencillo; el experimento se realiza en un recipiente separado en dos partes iguales por una membrana, que permite el paso de sustancias en función del peso molecular. Antes de realizar el experimento de unión, es preciso establecer si existe unión entre el fármaco o analito problema del estudio y alguno de los componentes del sistema, especialmente la membrana. Si esta unión existe, el fármaco quedará retenido en la membrana y, entonces, obtendremos un grado de unión mucho más elevada de lo que realmente es. Las membranas de diálisis se caracterizan por el tamaño del poro; es decir, el tamaño molecular por debajo del cual las moléculas difunden libremente. El grado de permeabilidad de la membrana tiene una estrecha relación con el tiempo que el sistema tarda en alcanzar el equilibrio. Sin embargo, los métodos *in vitro* son una atractiva alternativa para estimar estos metales antes de la evaluación *in vivo*. Además, pueden ser sencillos, más rápidos y de bajo costo. (Complex, 2012)(Mikstacka, Rimando, & Ignatowicz, 2010) (Singhal, Jain, Singhal, Elias, & Showkat, 2011).

El modelo *in vitro* de células digestivas (Caco-2) fue adaptada por Glahn, Lee, Yeung, de Goldman y Miller en 1998 para evaluar la biodisponibilidad de hierro en alimentos mediante el uso de la formación de ferritina por las células Caco-2 como un indicador de la captación de hierro. Las células Caco-2 son de origen humano, normalmente utiliza las provenientes del carcinoma del colón. Estas se siembran de tal manera que crecen y forman una monocapa, que luego se diferencian de forma espontánea para crear muchos componentes estructurales y funcionales de las células intestinales. Estos componentes contienen microvellosidades, uniones estrechas entre las células y enzimas del borde en cepillo, lo que significa que la línea celular Caco - 2 se puede utilizar para estudiar la captación activa y pasiva y el transporte de nutrientes.

El principal problema con la línea celular Caco - 2 es que la captación celular de nutrientes varía entre los experimentos en función de la condición general y el paso número de las células. Por lo tanto, los resultados sólo se pueden comparar dentro de los mismos experimentos. (Kamiloglu et al., 2013)

Las propiedades *in vitro* de antioxidantes naturales o sintéticos generalmente se miden en forma de actividad antirradical utilizando técnicas como el 1,1- difenil - 2 - picrilhidrazilo o DPPH , por capacidad de absorción del oxígeno radical (ORAC) o a través del ensayo FRAP tal como se describió en la sección de técnicas analíticas (Erejuwa et al., 2012).

Debido a las limitaciones para analizar el sistema digestivo *in vivo*, ya que es un proceso lento, caro y complejo, lo que limita su uso a unas pocas muestras de alimentos; un buen método para proyectar la biodisponibilidad de nutrientes puede ser la simulación del sistema digestivo o modelo *in vitro*, ya que estos datos pueden ser correlacionados entre ambos sistemas. (Rodriguez-Amaya, 2010). El tracto GI puede ser considerado como un extractor eficiente, donde parte de los fitoquímicos contenidos en las matrices alimentarias se extrae y se convierte en disponible para la absorción en el intestino (Bouayed et al., 2011). De acuerdo a un estudio simulando el sistema digestivo en la fase gástrica e intestinal, se encontró que la mayoría de los polifenoles y flavonoides se encuentran disponibles en la fase gástrica; sin embargo sugiere que no todos los polifenoles detectados se encuentran disponibles para la absorción en la fase intestinal (Bouayed et al., 2011).

Técnicas *in vivo*

Los estudios en animales permiten correlacionar datos y más aún proporcionan información acerca de la biodisponibilidad, como por ejemplo existe un estudio realizado en

gusanos con compuestos antioxidantes, que suministró información acerca de la transformación metabólica y de las características estructurales distintivas que son necesarias para extender la vida útil en una bebida con la planta *C. elegans*. (Grünz et al., 2012)

Realizar ensayos con modelos animales o en voluntarios humanos es, obviamente, un vehículo importante para la obtención de nuevos conocimientos sobre biodisponibilidad de compuestos. (Fernandes, Faria, Calhau, de Freitas, & Mateus, 2013) ya que los efectos in vivo en el caso de los polifenoles, dependerá no sólo de su concentración en alimentos de origen vegetal, sino también en su biodisponibilidad después de la ingestión; existe mucha información que durante los últimos años se ha centrado en la biodisponibilidad de estos compuestos (Pérez-Jiménez et al., 2009).

Por lo general las mediciones in vivo se realizan en sangre para observar factores como capacidad antioxidante total del plasma, ya que se debe a la suma de los antioxidantes endógenos y exógenos presentes en el mismo, así como a los efectos sinérgicos que tienen lugar entre ellos. (Pérez-Jiménez et al., 2009)

Un estudio en cerdos mostró que aunque no detectaron antioxidantes (antocianinas) en plasma ni orina, encontraron acumulación en el hígado, ojo, corteza, y el cerebelo; en comparación con otro artículo, los resultados fueron similares ya que se alimentaron ratas con antioxidantes (antocianina en mora) y este se detectó en vejiga, próstata, testículos y corazón.(Fernandes et al., 2013). En relación con los flavonoides la absorción, el metabolismo y la excreción son un proceso complejo que implica diversas modificaciones en su estructura. La determinación de la biodisponibilidad de los flavonoides es fundamental para la comprensión de sus efectos como agentes quimiopreventivos. Estos compuestos antioxidantes son absorbidos predominantemente en el intestino delgado, con apenas pequeñas cantidades que se transportan a

través de la mucosa gástrica. El estado de glicosilación de los flavonoides afecta en gran medida su mecanismo de absorción. La mayoría de estas estructuras existen en la naturaleza como glucósidos. La hidrólisis de flavonoides glicósidos también se ha demostrado que se puede llevar a cabo en la cavidad oral. Las agliconas generadas por la hidrólisis son más lipófilicas, y por lo tanto se absorben más fácilmente en el intestino mediante difusión pasiva. Los flavonoides que entran en el colon se someten a una hidrólisis similar por la acción bacteriana de las glucosidasas. Los que llegan al colon se transforman en compuestos fenólicos simples, esto explica el bajo nivel de absorción de estos en el colon. La biotransformación de flavonoides continúa en los enterocitos siendo este el sitio más importante de su metabolismo. Por último los flavonoides entran en la circulación luego de someterse a la desintoxicación en el hígado. (Kutaiba Ibrahim & Mohamed Abdalkarim, 2012)(Gordon, 2012)

Varios autores concluyen que antioxidantes tales como las antocianinas presentan altas concentraciones en el estómago, pero el posible mecanismo de la cantidad absorbida por la vía gástrica es desconocido. La fracción de antocianinas no absorbidas en el estómago llega hasta el intestino delgado. Las no absorbidas en intestino delgado, llegan al colon donde sufren modificaciones estructurales sustanciales. Además, estas son rápidamente metabolizadas y reaparecen en la circulación o también finalmente se excretan en la bilis y en la orina. Algunos estudios previos han sugerido que esto es probablemente debido a la degradación espontánea bajo condiciones fisiológicas (Fernandes et al., 2013)(Shipp, 2010)

Al igual que con otros compuestos ingeridos, la variabilidad interindividual es otro factor importante que representa las propiedades farmacocinéticas de los flavonoides en los seres humanos. La preparación de los alimentos tiene efectos variables sobre la biodisponibilidad de los flavonoides en la dieta(Muñoz et al., 2010). Actividades como pelar las frutas o los vegetales,

por ejemplo, reduce en gran medida el contenido de flavonoides; ya que en la cáscara de estas contiene una gran proporción de flavonoides y al igual que el efecto de la cocción. (Kutaiba Ibrahim & Mohamed Abdalkarim, 2012)

Aplicaciones

Desde el punto de vista científico, y hasta lo encontrado en la literatura sobresalen varios estudios realizados en bebidas a base de té, extractos botánicos y mezclas de frutas. Entre las formulaciones para preparar una bebida nutracéutica (Lima et al., 2012b) con un extracto de mate, se ha observado a partir de los datos obtenidos de los análisis de su Actividad Antioxidante que el consumo de hierba mate contribuyó significativamente a la ingesta total de antioxidantes con efectos biológicos potencialmente beneficiosos para la salud humana. Estas aplicaciones terapéuticas son típicas de este extracto. (*I. Paraguariensi*) ya que ha demostrado que contienen alta actividad antioxidante lo que se correlaciona positivamente con la concentración de sus derivados de compuestos antioxidantes del café, lo cual hace que tenga una capacidad antioxidante muy superior a la del té verde; en comparación a la del té verde con el vino tinto. La capacidad para neutralizar las especies reactivas de oxígeno (responsables por los daños en la estructura celular después del estrés oxidativo ambiental) lo cual hace que se presente actividad similar a la peroxidasa, que se relaciona con la concentración de polifenoles en el extracto de hierba mate.

En la actualidad, se ha despertado un considerable interés en encontrar antioxidantes naturales a partir de materiales fitoquímicos, la botánica ofrece un sin número de oportunidades prácticamente interminables para encontrar ingredientes funcionales para bebidas. Estas bebidas aparecen con su respectivo claim y mercado dentro de un determinado "estilo de vida", y son productos que se posicionan para impactar en la estimulación, la relajación, o la promoción de la salud. Las nuevas bebidas funcionales, como el agua fortificada y el té, han aumentado su conveniencia, su novedad y su imagen, pero mantienen la condición de bebidas saludables. La colocación de nuevos productos en el mercado requiere algunas medidas a seguir por ejemplo: si

los productos son del agrado o no del consumidor. Los investigadores han desarrollado instrumentos para medir aspectos relacionados con las actitudes alimentarias para entender mejor cómo la salud y los componentes no saludables se relacionan con los factores que influyen en los hábitos dietéticos. Algunos autores han introducido una medida multidimensional de los motivos relacionados con la elección alimentaria, incluyendo: etiquetas sociales, la salud, el atractivo sensorial, el estado de ánimo, la conveniencia, el contenido natural, el precio, el control de peso, la familiaridad, y el componente ético. Las pruebas de aceptación son un componente valioso y necesario dentro del proceso investigativo y del desarrollo de nuevos productos alimenticios. En un estudio realizado con plantas botánicas tales como las hojas de Quercus, se observó que las infusiones de las hojas de Quercus resinosa presentan una elevada actividad antioxidante, contenido fenólico, actividad anticancerígena, y potencial cardioprotector. (Rocha Guzmán et al., 2012)

De la información obtenida del estudio se concluyó que aunque las infusiones de Quercus Resinosa poseían mayor contenido antioxidante con un valor de 1371.22 mg/100g; respecto al té verde con 809.45 mg/100 g. El efecto en los consumidores fue negativo respecto a la aceptación ya que el aspecto sensorial marcó la diferencia entre los diversos tipos de bebidas de hojas de Quercus, es decir; que las que poseían menor contenido de polifenoles a nivel sensorial fueron las más aceptadas por el consumidor en la encuesta. El aspecto sensorial es de vital importancia a nivel de mercadeo para poder atrapar un cliente.

Los resultados de este estudio muestran que, en promedio, las bebidas a base de fruta tuvieron mayor poder antioxidante que los tés verdes. La importancia de los aditivos se ha esbozado, porque pueden mejorar notablemente el poder antioxidante total. Los Jugos de frutas simples que tenían un antioxidante con menor contenido (lo que justifica el precio típico más alto

de bebidas antioxidantes declaradas), pero esta diferencia no siempre fue significativa. En consecuencia, los consumidores deben ejercer extrema precaución con la elección de las bebidas, ya que sólo se especifican los aditivos seleccionados (como los polifenoles y las catequinas) en cantidades no despreciables que pueden mejorar significativamente el contenido de los antioxidante en las bebidas cuando se comparan los zumos de frutas tradicionales o los extractos de té.

Se recomienda mantener una concentración razonable de compuestos polifenólicos en el plasma de los humanos que pueda actuar contra los radicales libres y proteger de varios trastornos de la salud. Para ello es necesario el consumo de grandes cantidades de frutas y verduras, que sean la principal fuente de estos compuestos. Una bebida rica en estos compuestos y lograda a partir de frutas y verduras sin duda contribuirá en mantener el poder antioxidante en plasma y aportará beneficios en la salud y se manifestará en la lucha contra las enfermedades crónicas. En un estudio, se utilizaron 4 residuos de frutas y verduras compuestos por cáscaras de granada y naranjas y; hojas de alcachofa y guayaba para preparar una bebida formada a partir de la mezcla de 2 de estos elementos, mezclados en diferentes proporciones para obtener una forma aceptable por los consumidores. El extracto de agua de estos residuos de vegetales y frutas se demostró que poseía un gran poder antioxidante. Esto se evidencia a partir de los valores obtenidos de los dos parámetros utilizados para medir el poder antioxidante, a saber, polifenol ácido tánico y como isoflavonas la catequina. La diferencia en la secuencia puede ser atribuible al tipo de polifenol y pasante de su actividad biológica. Sin embargo, esto no aplica típicamente cuando la comparación se realizó basándose en el otro parámetro a saber isoflavonas como la catequina. En este caso, la granadilla tiene la mayor capacidad antioxidante, a pesar de no tener la mayor concentración de compuestos de polifenoles totales. Sin embargo, se puede observar,

que la granadilla contiene una cantidad apreciable de catequinas (1918mg / 100 g). Los estudios han reportado una alta correlación entre capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles, sin embargo, esto parece estar condicionada por el método de evaluación. Se hicieron varios estudios que demostró la presencia de antioxidante, incluyendo compuestos fenólicos en desechos de frutas y verduras. Entre estos estudios, se determinó que el extracto de cascara de *Punicagrunatum* (Granada) se encuentra entre los tres primeros con notablemente alto poder de captación de radicales libres. En breve todos estos hallazgos y los resultados de la capacidad antioxidante junto con la aparición de compuestos de polifenol en los residuos de los principales 4 puntos investigados en este estudio demuestran que estos residuos de alimentos pueden tener valor para la salud. La presencia de estos polifenoles se ha correlacionado con varios beneficios para la salud .Entre estos beneficios, que pueden tener efectos antiinflamatorios, anti- ateroscleróticas, Anti- cancerígeno entre otras contribuciones a la salud.(El shobaki et al., 2011)

En otro ensayo el té verde orgánico fue probado y se combinó con los concentrados de brócoli para un posible uso industrial en el desarrollo de nuevas bebidas, utilizando subproductos de brócoli como fuente de compuestos bioactivos. El uso de un bajo porcentaje de concentrados de brócoli (menos de 50 %) dio resultados prometedores en las altas concentraciones de glucosinolatos y compuestos fenólicos (principalmente alifáticos) (ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y catequinas) y en el efecto positivo sobre la capacidad antioxidante. Los datos indican que existe una reacción molecular potencial entre los compuestos bioactivos presentes en el té verde orgánico y los del brócoli concentrado, que combina los compuestos de ambos productos alimenticios. El alto nivel de glucosinolatos en las nuevas infusiones merece nuevos estudios sobre la estabilidad, formación de isotiocianatos, y las propiedades que promueven la

salud de las mismas nuevas bebidas. Por lo tanto, los ensayos de biodisponibilidad y de seguridad también se deben llevar a cabo. El uso industrial de los subproductos de brócoli como un ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales novedosos puede ayudar a agregar valor a la gran cantidad de residuos vegetales que quedan disponibles. (Dominguez Perles, Moreno, Carvajal, & Garcia Viguera, 2011).

El tiempo y las condiciones de almacenamiento son críticas en el contenido del antioxidante como es el caso de diferentes jugos de limón y granada que contienen flavanonas, que después de 7 días de almacenamientos mostraron 70% de pérdida (González Molina, Moreno, & García Viguera, 2009), incluso la temperatura influye y se sugiere no mantener frutas o bebidas por largos periodos de tiempo; incluso en condiciones de refrigeración. (Patthamakanokporn, Puwastien, Nitithamyong, & Sirichakwal, 2008)

Se observa que durante el almacenamiento hay pérdidas de compuestos totales fenólicos entre 15% y 20% en jugos de limón y granada en diferentes concentraciones, a excepción del jugo de limón, que aumento más del 35%, posiblemente debido a la precipitación de las flavanonas (González Molina et al., 2009)

Diferentes factores pueden afectar los niveles de actividad antioxidante y compuestos fenólicos totales en las frutas, como son la especie, el tamaño y la textura, la forma de preparación y las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, tiempo, temperatura). Estudios preliminares sobre el efecto del almacenamiento en los distintos tipos de frutas son sugeridos antes de hacer un plan de muestreo para el análisis sistemático de su actividad antioxidante (Patthamakanokporn et al., 2008)

El tiempo y la temperatura afectan de manera diferente cada fruta y por ende el contenido de compuestos de sus jugos (Patthamakanokporn et al., 2008). Para el caso de la guayaba y de

la fruta maloud también conocida como *Elaeagnusiatifolia* en el medio científico, así mismo con la fruta Lin reconocida por su gran parecido con el tomate ambas nativas de Tailandia fueron almacenadas a -20°C durante 2 semanas disminuyendo significativamente su actividad antioxidante. Sin embargo otra fruta, la makiang; fruta también oriunda de Tailandia cuyo nombre científico es *Cleistocalyx nervosum varpaniala*, se mantuvo constante, Esto es probablemente debido a los diferentes tipos y cantidades de antioxidantes presentes en las frutas, que son responsables de la actividad antioxidante medida. Los compuestos fenólicos totales para la guayaba disminuyeron continuamente mientras que las otras dos frutas se mantuvieron; debido a los diferentes compuestos fenólicos presentes en las frutas que genera resultados diferentes bajo las mismas condiciones (Patthamakanokporn et al., 2008)

Otro artículo manifiesta el beneficio del tiempo en las bebidas preparadas a base de frutas ya que a mayor tiempo se observó fuertes propiedades antioxidantes en las bebidas almacenadas en frío a un tiempo de 135 días (Estupiñan, Schwartz, & Garzón, 2011). Este aumento en la actividad antioxidante puede ser explicado por la fuerte tendencia del polifenol a sufrir reacciones de polimerización, lo que hace que los oligómeros resultantes posean áreas más grandes disponibles para la deslocalización de la carga. Cuando el grado de polimerización excede un valor crítico, el aumento de la complejidad molecular y el impedimento estérico a reducir la disponibilidad de grupos hidroxilo provocan una disminución resultante en la capacidad antirradical(Cilla et al., 2011).

Para jugos como el de naranja, el almacenamiento durante 6 meses a 18°C conduce a variaciones en polifenoles totales y la actividad antioxidante, la cual puede estar relacionada con un menor contenido de compuestos fenólicos y de vitamina C, por otro lado un posible incremento en la actividad antioxidante por lo general se atribuye a productos de reacción de

Maillard los cuales después de formados durante el almacenamiento prolongado poseen fuertes propiedades antioxidantes. (Cilla et al., 2011)

Formulación de bebidas

Añadir ácido ascórbico a las bebidas a base de frutas que son pasteurizadas puede ser una opción para garantizar el contenido de vitamina C declarado, aunque no se puede atribuir este contenido solo al ácido ascórbico adicionado, sino que también se debe considerar la presencia de derivados de cítricos de polifenoles que tienen ascorbatos ahorradores lo que genera un efecto protector en su ácido ascórbico a partir de la oxidación, ya que tienen potenciales de óxido-reducción más altos. (Cilla et al., 2011)

La suplementación de las bebidas de frutas con leche o minerales (Fe, Zn) no modifica la capacidad antioxidante durante el almacenamiento en frío (2-4 8C). Además, en la digestión in vitro la fase digestiva gastrointestinal no disminuye la capacidad antioxidante total, a pesar del hecho de que el método de digestión simulada in vitro utilizado no puede imitar el proceso in vivo, que puede proporcionar datos sobre la estabilidad en condiciones gastrointestinales y bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes. (Cilla et al., 2011)

Nuevas bebidas diseñadas a partir de jugo de limón y maqui, que es una baya roja o púrpura nativa de Chile; en jugo que demostraron interacciones entre los fitoquímicos bioactivos de protección y una buena estabilidad en el tiempo. Los altos niveles iniciales de capacidad antioxidante y el contenido total de compuestos fenólicos a partir de las mezclas permanecieron bastante estables en el tiempo, excepto para el zumo de limón. Nuevas bebidas ricas en fitoquímicos bioactivos, mostraron una alta actividad antioxidante in vitro, así como

también un atractivo color bien conservado que se observó durante el período de estudio. (Gironés Vilaplana, Mena, García Viguera, & Moreno, 2012)

Con relación a los diferentes aditivos presentes en las formulaciones estudiadas se recomienda adicionar el estabilizante y el conservante en la etapa inicial de la mezcla, sin embargo se sugiere que los productos agregados sean de celulosa preferiblemente celulosa microcristalina, respecto al edulcorante se recomienda que sea GRAS (generalmente reconocidos como seguros) donde están los productos derivados de la caña de azúcar, sucralosa, esteviósidos, combinaciones, por ejemplo xilitol, manitol, sorbitol, entre otros (T. Nagao, Hase, & Tokimitsu, 2007)

En un estudio se encontró que la incorporación de un extracto de piel de ciruelas rojas japonesas dentro de una formulación que contenía el néctar de pulpa a partir de las mismas ciruelas, no ejercía efectos perjudiciales a las características sensoriales. Las altas cantidades analizadas de este extracto añadido resultaron en un color mejorado, así como en un mayor contenido de polifenoles y de una mayor capacidad antioxidante, que también aumentaron el atractivo y la funcionalidad del néctar. El aumento del color pudo, por lo tanto, atribuirse a un aumento en los niveles de compuestos tipo antocianina y a copigmentos potenciales, tales como los flavonoles y a los ácidos neoclorogénicos.

En términos de consumo, la formulación que presentaba el contenido más alto de extracto de piel era la menos preferida respecto a las otras formulaciones, lo que indica que 240 g kg⁻¹ de la piel del extracto sería el equilibrio óptimo entre el alto contenido de polifenoles y la preferencia del consumidor. (Beer, Steyn, & Muller, 2012)

Otros desarrollos ya están incorporando la tecnología de la microencapsulación, donde se muestra como la vitamina E liposoluble se rodea de sustancia hidrosolubles y se utilizada en

bebidas, este método lo que sugiere es tener partículas muy pequeñas (liposolubles) para ser visualmente detectadas con beneficios en matrices hidrosolubles (Cook, Phillip, 2004)

La transformación de la fruta también tiene una influencia en las características de esta, esto lo muestra (Hagl et al., 2011), en un estudio que utiliza manzanas y varía la presentación en batido y zumo, estas transformaciones cambian su biodisponibilidad en el cuerpo, mostrando mejor comportamiento el batido que el zumo de manzana ya que sugiere un potencial preventivo contra enfermedades de colon crónicas; en este estudio se concluyó que esta presentación en batidos aumenta la biodisponibilidad de polifenoles de la manzana en el colón, esto se puede deber a que el batido de manzana contiene 60% de manzana que se elabora con frutas enteras y tiene menor etapas de procesamiento y el zumo de manzana contiene 40% de manzana

Sin embargo la mejor forma de obtener los antioxidantes presentes en la frutas no es en el jugo de estas, si no directamente de la fruta entera sin transformación, ya que aporta sus antioxidantes fibras y una cantidad de azúcar adecuada. (Crowe & Murray, 2013)

Sin embargo también se ha encontrado que, para tener éxito, en la innovación de por ejemplo alimentos ricos en polifenoles o bebidas; aparte de evaluar sus beneficios para la salud, su calidad sensorial también debe ser de notable importancia. En este ámbito, se realizaron análisis sensoriales y pruebas de consumo en un conjunto de bebidas en su etapa temprana de formulación y optimización, con el fin de establecer si el concepto de producto focal se podía desarrollar dentro de un concepto comercialmente viable. Los resultados arrojados fueron alentadores, y se identificó amargura como un atributo sensorial clave para enfocar los esfuerzos de optimización. En resumen, las formulaciones de la fruta de cacao y bayas fueron las de menos agrado de los consumidores. Se sugirió que la divulgación de los beneficios para la salud de las

bebidas para los consumidores puede mejorar aún más su atractivo a los consumidores. (Jaeger, Axten, Wohlers, & Sunwaterhouse, 2009) (Jaeger et al., 2009)(Sajilata, Bajaj, & Singhal, 2008)

Beneficios de las bebidas con antioxidantes

El consumo de una bebida rica en catequinas durante 12 semanas en personas con diabetes mellitus (2 DM2) mostró una disminución en la circunferencia de la cintura respecto a personas que no tomaban esta bebida, la circunferencia de la cintura es el mejor predictor global de la grasa visceral. Estos resultados sugieren que la grasa visceral pudo haber sido reducida. Por lo tanto, la ingestión de una bebida rica en catequinas puede reducir con eficacia la grasa corporal, la grasa visceral en particular, en los pacientes con DM2. Basado en estos hallazgos, el consumo de una bebida rica en catequinas podría recuperar la capacidad Insulina-secretora (T. y otros Nagao, 2008)

Un estudio que sugiere la ingestión de una bebida con extracto de té verde y alto contenido de catequinas durante 12 semanas dio lugar a una disminución significativa de la grasa corporal, los niveles de colesterol y la presión arterial en las mujeres y los hombres sin necesidad de algún cambio de estilo de vida. La ingestión de una bebida con extracto de té verde y alto contenido en catequinas podría prevenir la obesidad y disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular. Es posible que el mecanismo por el cual las catequinas reduzcan la grasa corporal pueda estar relacionado con el aumento del gasto de energía. Además, la disminución de la presión arterial y el colesterol puede ser el resultado de la reducción de la grasa corporal.(T. Nagao et al., 2007)

En otros resultados relativos a la biodisponibilidad de este tipo de matrices sugirió que las bebidas ricas en polifenoles, tales como vino tinto, jugo de uva roja, y el té verde o con

polifenoles específicos (ácido tánico y quercetina) pueden mejorar la absorción de zinc en células Caco-2. Sin embargo, hay diferencias notables en sus afinidades relativas y, por tanto, en las actividades de estimulación y absorción de zinc entre los diversos polifenoles. Esto podría ser debido a las diferentes características estructurales que poseen. En vista de la potencial importancia de los polifenoles como antioxidantes y agentes antitumorales su efecto potencial sobre la nutrición humana debe ser explorado aún más.(Beer et al., 2012)

Conclusiones

Los antioxidantes hidrosolubles son los más indicados en el área de las bebidas, pero es de vital importancia ir direccionando aquellos que generan sistemas con mayor actividad antioxidante y biodisponibilidad.

Dentro de las técnicas tanto analíticas como instrumentales están aquellas que tienen mayor tradición y se acoplan mejor a un sistema de antioxidantes que a otros como las técnicas más novedosas que diferentes autores han venido desarrollando para buscar mejorar mucho más la ejecución de estas técnicas de antaño. Sin embargo, la utilización de técnicas aun es compleja debido a la falta de normalización en los métodos; aunque existe una tendencia similar entre los valores encontrados en las técnicas

La biodisponibilidad es el principal indicativo para poder declarar que un sistema de antioxidantes en bebidas tiene no sólo alta capacidad antioxidante sino que llega a ser absorbido por el organismo y que ingresa al torrente sanguíneo, y que no sea rápidamente excretado por la orina. Resta decir que este es el parámetro que corroborará que el efecto de una bebida saludable es real.

Y por último, hay que resaltar que todavía hay mucho por explorar en este tema, sin embargo existen buenos avances. De lo estudiado se observan grandes logros corroborados a nivel clínico, lo cual hace que las investigaciones tendientes a mejorar la calidad de la salud de un paciente que padezca alguna enfermedad crónica sean minimizadas a través de esto. A nivel de mercadeo los aspectos sensoriales son de vital importancia porque de ahí depende que un consumidor pueda llegar a ser fidelizado; por esto se debe tener cuidado con los aditivos empleados ya que estos juegan un papel importante en las características de este tipo de bebidas

Bibliografía

- Almeida, M. M. B., de Sousa, P. H. M., Arriaga, Â. M. C., do Prado, G. M., Magalhães, C. E. D. C., Maia, G. A., & de Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, *44*(7), 2155–2159. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.051
- Beer, D. De, Steyn, N., & Muller, N. (2012). Enhancing the polyphenol content of a red-fleshed Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl .) nectar by incorporating a polyphenol-rich extract from the skins, (February), 2741–2750. doi:10.1002/jsfa.5704
- Benzie, I. F. F., & Wachtel-Galor, S. (2012). Increasing the antioxidant content of food: a personal view on whether this is possible or desirable. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63 Suppl 1*(March), 62–70. doi:10.3109/09637486.2011.621934
- Blasa, M., Angelino, D., Gennari, L., & Ninfali, P. (2011). The cellular antioxidant activity in red blood cells (CAA-RBC): A new approach to bioavailability and synergy of phytochemicals and botanical extracts. *Food Chemistry*, *125*(2), 685–691. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.065
- Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D., & Ninfali, P. (2010). *Health. Bioactive Foods in Promoting Health* (First Edit., pp. 37–58). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-374628-3.00003-7
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, *128*(1), 14–21. doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.052
- Breiter, T., Laue, C., Kressel, G., Gröll, S., Engelhardt, U. H., & Hahn, A. (2011). Bioavailability and antioxidant potential of rooibos flavonoids in humans following the consumption of different rooibos formulations. *Food Chemistry*, *128*(2), 338–347. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.029
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., ... Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, *9*, 3. doi:10.1186/1475-2891-9-3
- Cilla, A., Perales, S., Lagarda, M. J., Barberá, R., Clemente, G., & Farré, R. (2011). Influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(1), 87–94. doi:10.1016/j.jfca.2010.03.029
- Complex, P. (2012). Preparation , Characterization and Antioxidant Activities of Gallic Acid-, *2*(March), 138–148.
- Cook, Phillip, M. (2004). beverage containing water soluble-vitamine E.
- Crowe, K. M., & Murray, E. (2013). Deconstructing a fruit serving: comparing the antioxidant density of select whole fruit and 100% fruit juices. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, *113*(10), 1354–8. doi:10.1016/j.jand.2013.04.024
- Demirtas, I., Erenler, R., Elmastas, M., & Goktasoglu, A. (2013). Studies on the antioxidant potential of flavones of *Allium vineale* isolated from its water-soluble fraction. *Food Chemistry*, *136*(1), 34–40. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.086

- Dominguez Perles, R., Moreno, D. a., Carvajal, M., & Garcia Viguera, C. (2011). Composition and antioxidant capacity of a novel beverage produced with green tea and minimally-processed byproducts of broccoli. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 361–368. doi:10.1016/j.ifset.2011.04.005
- El shobaki, P. F. A., Kassem, S. S., & Kader, M. M. A. (2011). Innovative forms of beverages with health value from vegetable and fruit wastes, 3(3), 582–589.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. a., & Ab Wahab, M. S. (2012). Honey: a novel antioxidant. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(4), 4400–23. doi:10.3390/molecules17044400
- Estupiñan, D. C., Schwartz, S. J., & Garzón, G. a. (2011). Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and color stability of isotonic model beverages colored with Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin powder. *Journal of Food Science*, 76(1), S26–34. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01935.x
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2013). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 1–13. doi:10.1016/j.jff.2013.05.010
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A., & Neri, D. (2010). Cherry antioxidants: from farm to table. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(10), 6993–7005. doi:10.3390/molecules15106993
- Fu, L., Xu, B.-T., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xu, X.-R., Xia, E.-Q., & Li, H.-B. (2011). Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2112–24. doi:10.3390/ijms12042112
- Gironés Vilaplana, A., Mena, P., García Viguera, C., & Moreno, D. a. (2012). A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 279–286. doi:10.1016/j.lwt.2012.01.020
- González Molina, E., Moreno, D. a., & García Viguera, C. (2009). A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115(4), 1364–1372. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.056
- Gordon, M. H. (2012). Significance of dietary antioxidants for health. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 173–9. doi:10.3390/ijms13010173
- Grant, R., & Guest, J. (2012). Effects of dietary derived antioxidants on the central nervous system. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2(3), 185. doi:10.4103/2231-0738.99470
- Grünz, G., Haas, K., Soukup, S., Klingenspor, M., Kulling, S. E., Daniel, H., & Spanier, B. (2012). Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(1), 1–10. doi:10.1016/j.mad.2011.11.005
- Hagl, S., Deusser, H., Soyalan, B., Janzowski, C., Will, F., Dietrich, H., ... Richling, E. (2011). Colonic availability of polyphenols and D - (Å) -quinic acid after apple smoothie consumption, 368–377. doi:10.1002/mnfr.201000252
- Helmy, M. W. (2012). Nutritional Evaluation of Some Products from Ber Fruits. *Food Science and Technology Department, National Research*.
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73–82. doi:10.1016/j.copbio.2008.03.003
- Jaeger, S. R., Axten, L. G., Wohlers, M. W., & Sunwaterhouse, D. (2009). Polyphenol-rich beverages : insights from sensory and consumer science, (June), 2356–2363. doi:10.1002/jsfa.3721

- Jin, Y., Alimbetov, D., George, T., Gordon, M. H., & Lovegrove, J. a. (2011). A randomised trial to investigate the effects of acute consumption of a blackcurrant juice drink on markers of vascular reactivity and bioavailability of anthocyanins in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, *65*(7), 849–56. doi:10.1038/ejcn.2011.55
- Kamiloglu, S., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E. (2013). The effect of food processing on bioavailability of tomato antioxidants, *3*, 65–77. doi:10.3233/JBR-130051
- Kesic, A., Hodzic, Z., Crnkic, A., Saletovic, M., & Catovic, B. (2010). Bioavailability of antioxidants from tea infusions with honey addition *Bioraspoločivost antioksidanasa iz*, *4*(1), 111–116.
- Kutaiba Ibrahim, A., & Mohamed Abdalkarim, M. (2012). Flavonoids : Chemistry , Biochemistry and Antioxidant activity. *Journal of Pharmacy Research*, *5*(8), 4013–4020.
- Lima, I. F. P., De Dea Lindner, J., Soccol, V. T., Parada, J. L., & Soccol, C. R. (2012a). Development of an Innovative Nutraceutical Fermented Beverage from Herbal Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) Extract. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(1), 788–800. doi:10.3390/ijms13010788
- Lima, I. F. P., De Dea Lindner, J., Soccol, V. T., Parada, J. L., & Soccol, C. R. (2012b). Development of an Innovative Nutraceutical Fermented Beverage from Herbal Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) Extract. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(1), 788–800. doi:10.3390/ijms13010788
- Mateo Anson, N., van den Berg, R., Havenaar, R., Bast, A., & Haenen, G. R. M. M. (2009). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, *49*(2), 296–300. doi:10.1016/j.jcs.2008.12.001
- Mikstacka, R., Rimando, A. M., & Ignatowicz, E. (2010). Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, *65*(1), 57–63. doi:10.1007/s11130-010-0154-8
- Muñoz, M. E., Galan, A. I., Palacios, E., Diez, M. a, Muguera, B., Cobaleda, C., ... Jimenez, R. (2010). Effect of an antioxidant functional food beverage on exercise-induced oxidative stress: a long-term and large-scale clinical intervention study. *Toxicology*, *278*(1), 101–11. doi:10.1016/j.tox.2009.10.015
- Nagao, T., Hase, T., & Tokimitsu, I. (2007). Diet and Physical Activity A Green Tea Extract High in Catechins Reduces Body Fat and Cardiovascular Risks, *15*(6), 1473–1483.
- Nagao, T. y otros. (2008). A Catechin-rich Beverage Improves Obesity and Blood Glucose Control in Patients With Type 2 Diabetes. *Nature Publishing Group*.
- Ndhlala, A. R., Moyo, M., & Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules (Basel, Switzerland)*, *15*(10), 6905–30. doi:10.3390/molecules15106905
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. a. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, *76*(1), R6–R15. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., & Sirichakwal, P. P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(3), 241–248. doi:10.1016/j.jfca.2007.10.002
- Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Taberner, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M. E., García-Diz, L., ... Saura-Calixto, F. (2009). Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods*

- for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 64(2), 102–7. doi:10.1007/s11130-009-0110-7
- Rathore, G. S., Suthar, M., Pareek, A., & Gupta, R. N. (2011). Nutritional antioxidants : A battle for better health. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 2(1). doi:10.4103/2229-5119.78490
- Rocha Guzmán, N. E., Medina Medrano, J. R., Gallegos Infante, J. A., Gonzalez Laredo, R. F., Ramos Gómez, M., Reynoso Camacho, R., ... González Herrera, S. M. (2012). Chemical evaluation, antioxidant capacity, and consumer acceptance of several oak infusions. *Journal of Food Science*, 77(2), C162–6. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02524.x
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 726–740. doi:10.1016/j.jfca.2010.03.008
- Rui, W., Ying, L. I. U., Yang, G. A. O., Li-dong, Z., Feng-ru, Z., & Xi-ying, H. A. N. (2012). Antioxidant Activity of Water-soluble Polysaccharides Isolated from *Agaricus bisporus*, 6880, 374–377.
- Sajilata, M. G., Bajaj, P. R., & Singhal, R. S. (2008). as Nutraceuticals, 7.
- Shipp, J. (2010). Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients, 7–22.
- Singhal, A., Jain, H., Singhal, V., Elias, E. J., & Showkat, A. (2011). Colon-targeted quercetin delivery using natural polymer to enhance its bioavailability. *Pharmacognosy Research*, 3(1), 35–9. doi:10.4103/0974-8490.79113
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., & Dommès, J. (2010). Evaluation of spectrophotometric methods for antioxidant compound measurement in relation to total antioxidant capacity in beverages. *Food Chemistry*, 120(2), 607–614. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.031
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217–224. doi:10.1016/j.foodres.2010.10.033
- Wootton-Beard, P. C., & Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44(10), 3135–3148. doi:10.1016/j.foodres.2011.09.015
- Zucca, P., Sanjust, E., Trogu, E., Sollai, F., & Rescigno, A. (2010). Evaluation of antioxidant capacity of antioxidant-declared beverages marketed in Italy, 22, 313–320.