



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Nutrición Humana y Dietética

Digestión estática *in vitro* de residuos de manzana de sidra y posterior caracterización

Autor: Hugo Rodríguez Domínguez

Tutoras: Irma Caro Canales y Rebeca Pérez Fernández

ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
CaCl ₂	Cloruro de calcio
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio o sosa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
ABTS	Ácido 2,2'azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
TROLOX	Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
rpm	Revoluciones por minuto
ml	mililitro
mg	miligramo
N	Normalidad o concentración equivalente
°C	Grados centígrados
pH	Potencial de hidrógeno

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Listado de figuras

Figura 1: Esquema simplificado que representa el modo de acción de las lipasas

Figura 2: Esquema simplificado que representa el modo de acción de las proteasas

Figura 3: Esquema simplificado que representa el modo de acción de las amilasas

Figura 4: Esquema de la fermentación bacteriana en el colon

Figura 5: Esquema simplificado que representa el proceso de digestión estática in vitro según el protocolo INFOGEST

Figura 6: Control del pH en las diferentes etapas en el proceso de digestión usando un modelo estático in vitro

Figura 7: Capacidad antioxidante equivalente en Trolox, expresada en $\mu\text{mol/g}$ de fibra alimentaria usando el método DPPH, obtenida mediante diversos métodos de extracción

Figura 8: Capacidad antioxidante equivalente en Trolox, expresada en $\mu\text{mol/g}$ de fibra alimentaria usando el método ABTS, obtenida mediante diversos métodos de extracción

Listado de tablas

Tabla 1: Tipos de fibra alimentaria, clasificación y descripción

Tabla 2: Propiedades funcionales y efectos de la fibra dietética

Tabla 3: Enzimas utilizadas en el proceso de digestión

Tabla 4: Cantidad total de oligosacáridos encontrados en cada fase de la digestión estática in vitro utilizados diversos métodos de extracción de fibra

RESUMEN

En este estudio se ha realizado una digestión *in vitro* estática sobre la fibra de bagazo de manzana de sidra extraída de tres formas diferentes: decantación etílica, extracción por membrana y extracción por membrana y posterior liofilización. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de oligosacáridos mediante HPLC en cada tipo de fibra. También, se determinó la capacidad antioxidante a través de los métodos DPPH y ABTS de las muestras iniciales y después de la fase intestinal. Por un lado, se observó que las muestras de fibra obtenidas mediante decantación etílica presentaron un mayor contenido de oligosacáridos (0,315 g de oligosacáridos/g de fibra) y una mayor capacidad antioxidante (356 μ mol equivalente en trolox/g de fibra). Por otro lado, las muestras de fibra obtenidas mediante extracción por membrana y posterior liofilización fueron las presentaron menor cantidad de oligosacáridos (0,151 g de oligosacáridos/g de fibra) y tuvieron menor capacidad antioxidante (143 μ mol equivalente en trolox/g de fibra). Además, se observó una mayor capacidad antioxidante de las muestras de fibra digeridas en comparación a las muestras de fibra sin digerir, independientemente de su forma de extracción.

El bagazo de manzana podría usarse para elaborar ingredientes bioactivos, reduciendo el impacto medio ambiental, ya que se impulsaría la economía circular.

Palabras clave: Bagazo de manzana de sidra, capacidad antioxidante, digestión *in vitro*, fibra alimentaria, oligosacáridos

ABSTRACT

In this study, a static in vitro digestion was performed on apple pomace fiber extracted in three different ways: ethyl decantation, membrane extraction, and membrane extraction followed by lyophilization. Subsequently, the amount of oligosaccharides was quantified using HPLC for each type of fiber. Additionally, the antioxidant capacity was determined through DPPH and ABTS methods for the initial samples and after the intestinal phase. On one hand, it was observed that the fiber samples obtained via ethyl decantation exhibited a higher oligosaccharide content (0.315 g of oligosaccharides per g of fiber) and a greater antioxidant capacity (356 μmol Trolox equivalents per g of fiber). On the other hand, the fiber samples obtained through membrane extraction and subsequent lyophilization showed the lowest oligosaccharide content (0.151 g of oligosaccharides per g of fiber) and had a lower antioxidant capacity (143 μmol Trolox equivalents per g of fiber). Furthermore, a higher antioxidant capacity was observed in the digested fiber samples compared to the undigested fiber samples, regardless of their extraction method.

Apple pomace could be used to develop bioactive ingredients, reducing environmental impact by promoting a circular economy.

Keywords: Cider apple pomace, antioxidant capacity, in vitro digestion, dietary fiber, oligosaccharides

Índice

1.	Introducción.....	7
1.1.	Digestión humana.....	7
1.2.	Enzimas digestivas.....	8
1.3.	Fibra alimentaria.....	11
1.4.	Microbiota intestinal.....	15
1.5.	Aprovechamiento de residuos, economía circular.....	16
2.	Justificación.....	17
3.	Objetivos.....	18
4.	Materiales y métodos.....	19
4.1.	Materiales.....	19
4.1.1.	Fibras.....	19
4.1.2.	Enzimas.....	20
4.2.	Métodos.....	21
4.2.1.	Digestión.....	21
4.2.2.	Determinación de oligosacáridos.....	22
4.2.3.	Capacidad antioxidante.....	23
4.2.4.	Análisis estadístico.....	24
5.	Resultados y discusión.....	24
5.1.	Proceso de digestión.....	24
5.2.	Control del pH.....	25
5.3.	Contenido de oligosacáridos.....	26
5.4.	Capacidad antioxidante.....	28
5.4.1.	Capacidad antioxidante mediante el método DPPH	
5.4.2.	Capacidad antioxidante mediante el método ABTS	
6.	Conclusiones.....	31
7.	Bibliografía.....	32

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los alimentos ingeridos en el sistema digestivo humano es un área de investigación interesante porque relaciona la nutrición y la salud. Los alimentos contienen componentes que pueden provocar efectos beneficiosos o adversos en la salud humana. Los alimentos son combinaciones de diversas fases y estructuras moleculares. La estructura de un alimento depende de su origen, formulación y proceso de producción, estos procesos determinarán las etapas que requiere el alimento antes de ser deglutido y las reacciones bioquímicas que sufrirá a través del aparato digestivo.

1.1 DIGESTIÓN HUMANA

La digestión gastrointestinal es un proceso que transforma los alimentos que ingerimos en formas químicas más sencillas que son absorbidas y permiten mantener un correcto estado de salud. La digestión se divide en tres etapas: oral, gástrica e intestinal; en cada una de esas etapas intervienen distintos mecanismos físicos y agentes químicos. Entre los mecanismos físicos encontramos la mordida, que tritura y divide los alimentos para facilitar su digestión o los movimientos peristálticos, que mezclan los alimentos con los jugos digestivos y permiten el avance del contenido intestinal. Entre los principales agentes químicos encontramos: los jugos digestivos, que modifican el pH para mejorar la hidrólisis, las enzimas digestivas, que realizan la hidrólisis, y las sales biliares, que ayudan a emulsionar y digerir las grasas.

El estudio de los cambios físicos-químicos que sufren los alimentos durante el proceso de digestión es fundamental para establecer ingestas diarias o para diseñar alimentos funcionales; para ello se realizan ensayos *in vivo* o *in vitro*. Los ensayos *in vivo* tienen restricciones éticas, además de ser largos y costosos; por ello, el método de simulación de la digestión gastrointestinal más utilizado es la digestión *in vitro*. Los ensayos de digestión *in vitro* reproducen la fase oral, gástrica e intestinal, pero en ocasiones, se puede realizar también una fermentación bacteriana (Pérez & Mar, 2018). Para cada fase de la digestión *in vitro* se crean fluidos simulados que contienen una concentración salina y un pH, similares a las condiciones fisiológicas humanas que, además, son las condiciones óptimas de hidrólisis de las enzimas humanas. Así mismo, en cada fase intestinal, se debe también controlar la temperatura, el tiempo de incubación y la agitación mecánica. También, puede ser necesario añadir algún cofactor para activar las enzimas, como el caso de la lipasa

pancreática, que requiere de calcio y sales biliares (Rosas-García, 2008). Cualquier cambio en alguno de estos parámetros puede provocar la disminución de la actividad catalítica de las enzimas e incluso inactivarlas.

Hay dos tipos de digestiones *in vitro*: la digestión *in vitro* estática y la digestión *in vitro* dinámica, además, hay diferentes modelos de digestión *in vitro* según el número y tipo de fases, la composición de los fluidos simulados y las tensiones mecánicas y flujos empleados.

Los modelos de digestión *in vitro* estáticos son los más utilizados debido a su menor coste y sencillez. En estos modelos se le va añadiendo de forma manual las soluciones simuladas de cada fase después de cada periodo de agitación y posterior corrección del pH de los fluidos. La gran variabilidad de las condiciones que se aplican en cada método de digestión *in vitro* impide la comparación de resultados entre distintos grupos de investigación, debido a esto, el consorcio COST INFOGEST propuso en 2014 un protocolo consensuado de digestión *in vitro* estático con el objetivo de estandarizar el método. Sin embargo, este protocolo presenta varias limitaciones, por ejemplo, estos modelos no pueden reproducir los movimientos peristálticos del tubo digestivo, el vaciado gástrico, las continuas variaciones de pH o la velocidad de flujo de la secreción.

Estas limitaciones han sido optimizadas en el modelo de digestión *in vitro* dinámica. Existen dos modelos de digestión *in vitro* dinámica: el mono-compartimentado y el bi y multi-compartimentado. Dentro del modelo mono, encontramos el modelo gástrico dinámico (MGD) y el simulador gástrico humano (SGH), ambos modelos solo simulan la fase gástrica de la digestión, además, no son capaces de simular el tránsito real ni el vaciado gástrico, solo el modelo SGH es capaz de reproducir los movimientos peristálticos del estómago. Estas limitaciones se solucionan con los modelos bi y multi-compartimentado, ofreciendo mejores alternativas en cuanto a reproducir un mayor número de procesos digestivos, sin embargo, no son capaces de simular las interacciones entre cuerpo y nutriente. Finalmente, el modelo TNO gastro-intestinal modelo 1 (TIM-1), que es un modelo multi-compartimental dinámico controlado por ordenador simula las fases gástrica e intestinal de la digestión, este es el modelo más realista de la digestión *in vitro*, pero el coste del equipo, su mantenimiento y los ensayos experimentales son altos (González, 2017).

1.2 ENZIMAS DIGESTIVAS

Las enzimas son proteínas que actúan sobre sustratos moleculares y disminuyen la energía de activación necesaria para llevar a cabo reacciones químicas estabilizando el estado de transición. Las enzimas digestivas ayudan a hidrolizar los alimentos en componentes más pequeños para que puedan ser absorbidos y utilizados por el cuerpo. Estas proteínas realizan billones de reacciones químicas para que se produzcan los procesos metabólicos esenciales en el cuerpo humano (Sensoy, 2021). Hay seis categorías principales de enzimas; oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Lewis y Stone, 2023). Sin embargo, en este trabajo se revisarán los tres principales tipos de enzimas que podrían intervenir en la digestión *in vitro* de la fibra dietética:

- Lipasas: las lipasas son sintetizadas en el páncreas y poseen la función de disociar los enlaces covalentes entre lípidos complejos, forman mono y di-glicerol, así como ácidos grasos simples, que son absorbidos por el organismo. Estas enzimas podrían degradar ceras como la cutina y la subirina que protegen a la célula vegetal de la desecación y la pérdida de agua

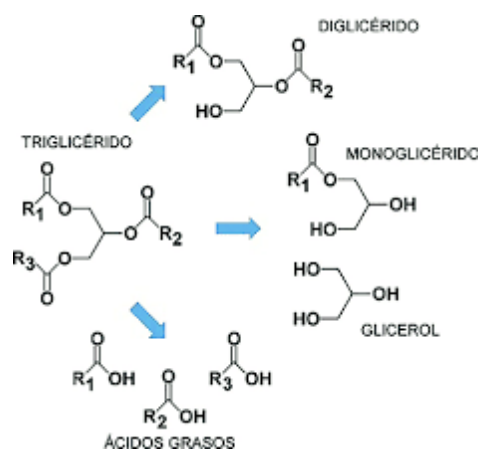


Figura 1. Esquema simplificado que representa el modo de acción de las lipasas

Fuente: Sepúlveda-Arias, 2020

- Peptidasas: las peptidasas se originan en el estómago y en el páncreas, actúan sobre los enlaces peptídicos de las macromoléculas proteicas reduciéndolas a sus monómeros, los aminoácidos. Estas enzimas hidrolizan las glicoproteínas presentes en la pared de las células vegetales y puede representar hasta un 10%.

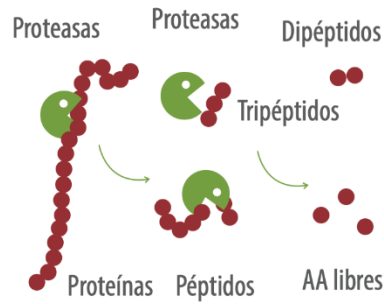


Figura 2. Esquema simplificado que representa el modo de acción de las proteasas

Fuente: Cabrera, 2024

- Amilasas: las amilasas tienen la función de hidrolizar los enlaces glucosídicos 1-4 entre monosacáridos, formando maltosas, maltotriosas y α -dextrinas, que posteriormente serán hidrolizadas a glucosa por las enzimas del borde en cepillo, para poder ser absorbidas. Hay tres tipos de amilasas dependiendo de su lugar de origen:
 - o La amilasa salival
 - o La amilasa pancreática
 - o La amilasa intestinal

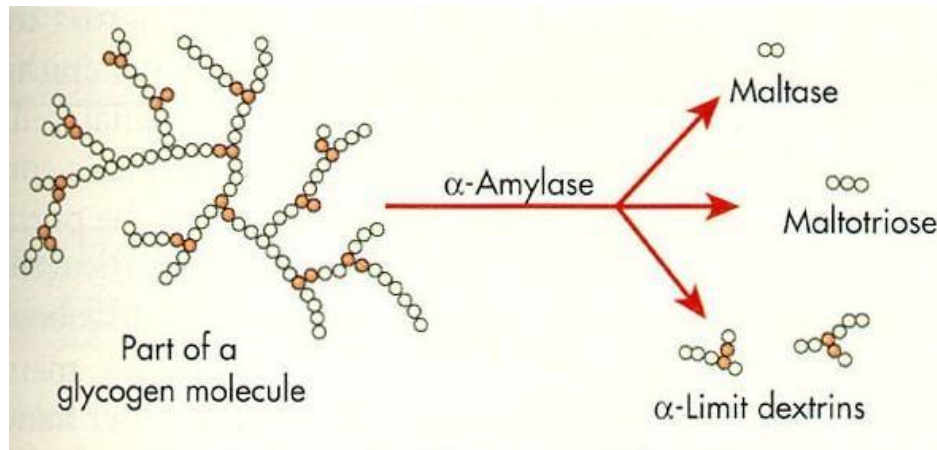


Figura 3. Esquema simplificado que representa el modo de acción de las amilasas

Fuente: Hernalsteens & Pereira, 2019

1.3 FIBRA ALIMENTARIA

Según (Stribling & Ibrahim, 2023), se entiende por fibra alimentaria cualquier parte comestible de la planta o carbohidratos análogos (extraídos/sintéticos) que es resistente a la digestión en el intestino delgado y es fermentada en el intestino grueso. Estos autores clasifican la fibra alimentaria en fibra soluble e insoluble (ver Tabla 1).

La fibra soluble retiene o atrapa el agua a través de puentes de hidrógeno y forma un gel viscoso en el intestino delgado que hace más lenta la digestión de los nutrientes. Los espacios formados por este gel atrapan sustancias como, proteínas, glúcidos, grasas, sales biliares, vitaminas, minerales, colesterol entre otros; a través de enlaces covalentes. Esta retención disminuye la absorción de los nutrientes antes mencionados; así mismo, se produce una interacción iónica entre las células del colón y los minerales de la fibra liberados durante la fermentación. Entre los principales tipos de fibra solubles encontramos: las pectinas, glucanos, gomas, inulina y almidón resistente (Prasad et al 2019).

La fibra insoluble, no es capaz de retener agua a través de los puentes de hidrógeno entre sus polímeros, pero, puede retener agua, carcinógenos, mutágenos y otras sustancias químicas, entre sus espacios intersticiales, lo que permite su posterior eliminación a través de las heces (Prasad et al., 2019). Además, este tipo de fibra ayuda al movimiento del quimo a través del sistema digestivo, aportando consistencia a las heces, provocando un efecto laxativo (Li et al., 2025). Entre los principales tipos de fibras insolubles encontramos: lignina, celulosa y hemicelulosa.

La estructura y enlaces que presentan los distintos polímeros de las fibras, principalmente enlaces β y α (1–6) (ver Tabla 1), evitan que éstas sean inaccesibles a las enzimas intestinales, pero, accesibles a las enzimas de numerosos microorganismos que expresan actividades β -glucosidasa, α -glucosidasa entre otras (Herreros et al., 2003). Por ello, las fibras dietéticas solubles son fermentadas por las bacterias del colón y su crecimiento permite la formación de metabolitos beneficiosos, como los ácidos grasos de cadena corta, que pueden ser usados por las células intestinales como nutrientes (ácido butírico) o para regular otros mecanismos en el cuerpo humano (Li et al., 2025).

Tabla 1. Tipos de fibra alimentaria, clasificación y descripción

Tipo de fibra	Clasificación	Descripción
Celulosa	Insoluble	Compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β (1–4)-glucosídicos en un homopolímero lineal que puede alcanzar hasta 10.000 unidades de longitud.
Hemicelulosa	Insoluble	Ramificado con cadenas laterales de grupo acetilo y una estructura principal compuesta por monómeros: xilosa, arabinosa, galactosa, manosa o glucosa.
Lignina	Insoluble	No es un polisacárido, sino que está compuesto principalmente de alcoholes (p-cumarilo, coniferilo y sinapilo), que se conocen como unidades fenilpropanoides.
Gomas	Soluble	Son exudados vegetales que presentan estructuras y propiedades fisicoquímicas variables.
Betaglucanos	Soluble	Es un polisacárido no amiláceo que puede ser ramificado o no ramificado y está compuesto por unidades monoméricas de β -D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos en β (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) y/o (1 $\rightarrow$ 6). Existen numerosos grupos hidroxilo a lo largo de la cadena de β -glucano que crean una molécula hidrófila.
Almidones resistentes	Insoluble	Los almidones resistentes se componen de almidones cuyos enlaces α -1,4-glicosídicos no son hidrolizados por las α -amilasas salivales y pancreáticas, que pasan sin ser absorbidas al intestino grueso, donde pueden fermentar. Existen cinco tipos de almidón resistente: RS 1, que es un almidón físicamente inaccesible debido a que está encerrado en la estructura del alimento; RS 2, un gránulo de almidón nativo que se puede encontrar en plátanos verdes y papas crudas; RS 3, un almidón retrógrado; RS 4, un almidón modificado químicamente para resistir la digestión, como un almidón con grupos octenil succínicos; RS 5, que se produce cuando la amilosa forma complejos con lípidos o ácidos grasos durante la cocción, lo que resulta en que el almidón quede atrapado en un complejo amilosa-lípido.
Oligosacáridos no digeribles	Soluble	Carbohidratos de bajo peso molecular con entre 3 y 10 unidades monoméricas que son resistentes a la digestión por enzimas salivales e intestinales.

Fuente: obtenida y adaptada a partir de los descrito por Opperman et al. (2025)

Además de las interacciones con los nutrientes explicados anteriormente, la fibra también interacciona con las enzimas digestivas como las amilasas y las lipasas (Sharma et al., 2025); esta interacción fibra alimentaria-enzimas reduce la hidrólisis de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos, disminuyendo su biodisponibilidad y, por lo tanto, la absorción de moléculas más sencillas como la glucosa, colesterol y triglicéridos.

Las mencionadas interacciones tienen efectos favorables sobre la salud (ver Tabla 2), por ejemplo: disminuyen los picos de glucosa en sangre, los niveles de triglicéridos y colesterol, especialmente el LDL colesterol, y el pH del colon que evita la formación de pólipos colónicos y, por último, incrementa la proliferación de la microbiota intestinal, en especial las bifidobacterias y los lactobacilos (Prasad et al., 2019; Opperman et al. 2025).

Tabla 2. Propiedades funcionales y efectos de la fibra dietética

Propiedades	Efectos
Capacidad de retención de agua	Disminuye la ingesta de alimentos, el volumen de las heces y la regularidad
Capacidad de absorción de glucosa	Unión fibra-glucosa, reduciendo su absorción
Capacidad de unión de ácidos biliares	Captura de ácidos biliares, reduciendo su absorción
Viscosidad	Retrasar el vaciamiento gástrico, atrapamiento de glucosa y de ácidos biliares disminuye su absorción
Capacidad de unión del colesterol	Atrapa colesterol, reduciendo su absorción
Actividad antitumoral	Formación de compuestos provocan apoptosis celular
Fermentabilidad	Producción de metabolitos y modulación de la microbiota
Actividad inmunomoduladora	Regulación de la respuesta inmunitaria por la formación de polisacáridos entre otros compuestos
Aumento de volumen de las heces	Afecta la regularidad y el volumen de las heces.
Tamaño de partículas	Afecta la capacidad de unión y la fermentación de la fibra.
Formación de geles	Aumento de la saciedad
Atrapamiento de compuestos tóxicos	Unión de elementos tóxicos
Potencial zeta	Estabilidad de la matriz, unión iónica y plegamiento

Fuente: (Opperman et al. 2025)

Según Peris et al. (2007), para que las propiedades beneficiosas de la fibra alimentaria muestren su efecto, hay que ingerir diariamente 14 g de fibra alimentaria por cada 1000 kcal en la dieta, que equivale aproximadamente a 25 g diarios de fibra alimentaria para mujeres adultas y 38 g para hombres adultos. La falta de fibra alimentaria está relacionada con el estreñimiento y con el cáncer de colon y recto (Stollman & Raskin, 2004); y aunque la fibra alimentaria de forma aislada no protege del cáncer de colon y recto, algunos autores sugieren que una dieta rica en fibra ayuda a reducir la incidencia de este tipo de cánceres en la población (Casimiro, 2002). Como se muestra en la Tabla 2, la fibra alimentaria es capaz de captar elementos tóxicos y cancerígenos que se forman durante la digestión, impidiendo que ocurra la interacción de estos elementos con las paredes del colon.

Otros efectos beneficiosos de la fibra pueden ser: prevenir la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y la hipercolesterolemia al reducir la absorción de glucosa, triglicéridos y colesterol. Una dieta pobre en fibra altera la flora intestinal, lo que provoca una mayor predisposición a infecciones, alergias y dermatitis atópicas. Así mismo la fibra afecta a la movilidad digestiva, una baja cantidad de este nutriente puede provocar estreñimiento, diarreas, malas digestiones (Stollman et al., 2004).

Prebióticos

Uno de los componentes principales de la fibra alimentaria son los prebióticos (compuestos de bajo peso molecular entre 2-10 moléculas, excepto la inulina) que se pueden definir como un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del hospedador, mejorando la salud del huésped (Roberfroid, 2007; Gibson et al., 2017). Los prebióticos se encuentran en los alimentos de origen vegetal; frutas, verduras, legumbres, etc; y, se liberan después de una hidrólisis enzimática tanto en el intestino como en los procesos industriales.

Los principales prebióticos son: la inulina, los fructo-oligosacáridos (FOS) y los galacto-oligosacáridos (GOS), ciertos tipos de almidones resistentes y los oligosacáridos de la leche humana (HMO). Los FOS y la inulina se encuentran en los alimentos como las cebollas, los ajos, las alcachofas y los plátanos; mientras que los GOS se encuentran principalmente en las legumbres y la leche de vaca; los almidones resistentes se encuentran en alimentos como la patata y la pasta, que han sido cocinadas y posteriormente enfriadas; por su parte, los HMO se encuentran en la leche materna, estos prebióticos son esenciales en la creación de la microbiota de

los bebés, ya que en combinación con las bacterias presentes en la leche materna modulan la microbiota intestinal.

Los prebióticos son usados por la flora intestinal como sustratos que permiten su crecimiento, formando compuestos como polisacáridos bacterianos, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos libres entre otros, que mejoran la función digestiva, la regularidad intestinal, refuerzan el sistema inmunitario, mejoran la absorción de minerales; y, además, ayudan a regular el apetito, el equilibrio energético y el metabolismo de la glucosa. Cabe destacar que los prebióticos tienen un impacto positivo en la composición y la actividad de la microbiota intestinal, aumentando los niveles de bacterias beneficiosas, así como las moléculas de señalización que son importantes para la salud (ISAPP, 2025).

Actualmente, no hay recomendaciones dietéticas sobre la ingesta diaria de prebióticos sin embargo, la Asociación Internacional de Científicos para Probióticos y Prebióticos indican que una dosis oral de entre 3-5 g de prebióticos por día podrían mejorar la salud del consumidor (ISAPP, 2025).

1.4 MICROBIOTA INTESTINAL

Según el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (INIGH, 2025), el microbioma es la comunidad de microorganismos (incluidas bacterias, mohos, y virus) que se encuentran en un ambiente concreto, aunque algunos autores indican que debe incluir, plásmidos y elementos genéticos móviles (Berg et al., 2020). La microbiota es definida como una comunidad de organismos vivos presentes en un ambiente definido (Marchesi et al., 2025).

Por lo tanto, podríamos definir a la microbiota intestinal como las comunidades microbianas que habitan el intestino de animales, incluyendo el ser humano (Álvarez et al., 2021). La microbiota intestinal juega un papel importante en la salud y en la enfermedad y está influenciada por diversos factores biológicos, ambientales, así como por el estilo de vida, entre éstos últimos cabe mencionar la alimentación, el ejercicio o el consumo de fármacos entre otros (Álvarez et al., 2021).

El 90% de las bacterias intestinales de un adulto humano pertenecen principalmente a dos filos de bacterias: Bacteroides y Firmicutes y el 10 % restante pertenece a otras bacterias como Proteobacterias, Actinobacterias, Fusobacterias y Verrucomicrobia y algunas especies de arqueas, levaduras y virus (Arumugam et al., 2011).

La concentración de bacterias es diferente según la parte del sistema digestivo; en el estómago, debido a su pH ácido, hay alrededor de 1.000 bacterias/mL. En el intestino delgado esta concentración aumenta, desde 10^4 bacterias/mL en el duodeno hasta 10^7 bacterias/mL en el íleon. En el colón, la concentración microbiana puede alcanzar entre 10^{11} a 10^{12} bacterias/mL, con un peso variable de 300-600 g que, corresponde al 95% de la microbiota del huésped (Guarner & Malagelada, 2003).

La flora intestinal defiende al huésped frente a bacterias o virus, asegurando el correcto funcionamiento de nuestro sistema digestivo y colaborando en la producción de vitaminas y la correcta absorción de minerales (Turpin et al., 2016).

Para fortalecer la flora intestinal, se pueden utilizar probióticos, que son microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que pueden tener efectos beneficiosos para la salud, cuando se consumen en cantidades adecuadas aproximadamente alrededor de 108 ufc/mL (ISAPP, 2020). También, ayudan a mantener un equilibrio saludable de la microbiota intestinal favoreciendo la digestión y fortaleciendo el sistema inmunológico, lo que puede ser especialmente útil después del uso de antibióticos o en casos de problemas digestivos, como el síndrome de intestino irritable o la diarrea.

1.5 APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS, ECONOMÍA CIRCULAR

En España, se desperdiciaron más de 4 millones de toneladas de alimentos en el año 2020, siendo las frutas y verduras los principales alimentos desperdiciados. En el procesamiento de la manzana de sidra, el bagazo de la misma está compuesto por: cáscara, pulpa, semillas y tallos, representando entre un 25 y un 30% del peso original de la fruta (Rabetafika et al., 2014). La industria de la sidra a nivel mundial genera unos 3,3 millones de toneladas anuales de bagazo de manzana (Trías et al., 2020). Tradicionalmente, el 70% de este bagazo termina como relleno de suelos o en vertederos, causando serios problemas ambientales, por lo tanto, resulta de vital importancia la reutilización de este subproducto para mejorar la economía de los procesos (Trías et al., 2020) y evitar problemas ambientales. Ya que el bagazo de manzana generado en la industria de la sidra contiene importantes cantidades de nutrientes y componentes bioactivos, podría ser una importante fuente de fibra dietética teniendo en cuenta que, aproximadamente el 40% de su peso es fibra (Alongui, et al., 2019).

La economía circular es un modelo industrial restaurativo que permite mejorar y optimizar los sistemas de producción, a través de la reintroducción de residuos

generados en los procesos alimentarios. En este sentido, el Grupo de Investigación de Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos del Instituto de Procesos Sostenibles (ISP) de la Universidad de Valladolid está trabajando para obtener fibra dietética procedente del bagazo de manzana. Sin embargo, es la primera vez que se utiliza un modelo de digestión intestinal para explorar la formación de compuestos bioactivos, como los oligosacáridos.

2. JUSTIFICACIÓN

La creciente preocupación por la sostenibilidad y la búsqueda de alternativas alimentarias saludables han impulsado el interés en el aprovechamiento de residuos agrícolas y alimentarios como recursos valiosos. En este contexto, el bagazo de manzana puede ser usado como una fuente de fibra dietética, específicamente de fibra dietética soluble, que puede ser aprovechada en la elaboración de productos alimenticios funcionales y suplementos dietéticos.

Este Trabajo de Fin de Grado pretende estudiar la formación de compuestos bioactivos derivados, de la digestión de la fibra alimentaria extraída del bagazo de manzana de sidra. Así mismo, determinar la capacidad antioxidante de los compuestos derivados de la digestión intestinal. Finalmente, esta investigación contribuirá a ampliar el conocimiento sobre el valor nutricional y funcional de este residuo agrícola, promoviendo su uso como ingrediente en alimentos enriquecidos en fibra, fomentando su reintroducción en la cadena alimentaria, mejorando prácticas más sostenibles en la industria alimentaria.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar los compuestos funcionales formados durante el proceso de digestión de la fibra del bagazo de manzana.

Los objetivos específicos son:

1. Analizar la cantidad de oligosacáridos presentes en las muestras después de la digestión mediante análisis por HPLC.
2. Comparar la capacidad antioxidante de las muestras iniciales de fibra y de las muestras de fibra después de la digestión empleando dos métodos distintos (DPPH y ABTS).
3. Determinar el mejor método de extracción para la obtención de una fibra dietética con las mejores propiedades funcionales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 FIBRAS

Las fibras utilizadas para este experimento provienen del bagazo de manzana de sidra, el procesamiento se ha realizado en el Instituto de Procesos Sostenibles (ISP) de la Universidad de Valladolid (UVa) gracias a la colaboración del grupo de Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos.

El primer paso para extraer la fibra alimentaria fue el prensado de las manzanas. Se molió este prensado en una licuadora eléctrica hasta obtener un tamaño de partícula uniforme. A continuación, se preparó una mezcla de 5.45 g de manzana en 50 ml de agua destilada; la mezcla se sometió a un proceso de extracción en un horno de microondas (Multiwave PRO de ANTON PAAR). Se realizó un calentamiento, incrementado 6°C por minuto, hasta alcanzar una temperatura de 139 ° C. Esta mezcla fue filtrada, con ayuda de un embudo Büchner, mediante una bomba de vacío de diafragma (ME 2 NT de VACUUBRAND). El residuo líquido se sometió a dos tipos de procesos de extracción:

a) Precipitación etílica

Para llevar a cabo la extracción de la fibra, se mezclaron dos partes de etanol por una parte del residuo líquido. La mezcla se agita durante 1h a 25° C, y se mantiene a 4° C overnight. Al día siguiente la mezcla se centrifuga, al pellet de la centrifugación se le añade otra vez etanol y se vuelve a centrifugar. El pellet final se introduce en una estufa a 60° C durante 48h. El sólido resultante se muele y se usa en el experimento. Esta muestra se denomina EI.

b) Extracción por membrana

Para realizar la extracción utilizando extracción por membrana, se mezclaron dos partes de agua por una de residuo líquido. Esta mezcla se pasa por diferentes filtros finalizando con un filtro de 0.22 µM. Por último, el residuo líquido se pasa por una membrana (Cytiva Minimate de Cytiva OAPMPUNV) hasta concentrarlo 4 veces. El filtrado obtenido de este proceso se llamó muestra líquida de membrana (MI).

c) Extracción por membrana más liofilización

Se procede igual que en el apartado anterior b), ahora a la muestra líquida de membrana (MI) se la somete a un proceso de liofilización; el MI se mantuvo 48 h a -20°C y después se introdujo en un liofilizador durante tres días, la muestra obtenida se denominó MILF.

4.1.2 ENZIMAS

Las enzimas utilizadas en el proceso de digestión in vitro mediante un modelo de digestión estático se encuentran recogidas en la Tabla 3, así como las fases digestivas en las que se utilizan y el pH de cada fase.

Tabla 3. Enzimas utilizadas en el proceso de digestión

Enzima	Marca	Referencia	Fase donde intervienen	pH
α -amilasa salival humana	Sigma-Aldrich	A1031-1KU	Fase Oral	pH 7
pepsina gástrica porcina	Sigma-Aldrich	P7012-1G	Fase Gástrica	pH 3
pancreatina porcina	Sigma-Aldrich	P7545-100G	Fase Intestinal	pH 7
Bilis bovina	Sigma-Aldrich	B3883-100G	Fase Intestinal	pH 7

La actividad enzimática utilizadas en este experimento fue calculada siguiendo las recomendaciones de Minekus et al. (2014). Una vez establecida la actividad enzimática de la enzima en cada ensayo, la cantidad utilizada se ajustó según lo indicado por Brodkorb et al. (2019)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 DIGESTIÓN

La digestión in vitro se llevó a cabo usando un modelo de digestión in vitro estático y siguiendo las recomendaciones de INFOGEST (Brodkorb et al. 2019; Minekus et al., 2014) con algunas modificaciones que se indican en los siguientes párrafos.

4.2.1.1 Preparación de la muestra

En este ensayo se utilizaron las muestras de fibra alimentaria provenientes del bagazo de manzana usada para la fabricación de sidra, obtenidas según lo descrito en el párrafo (3.1.1). Para las muestras sólidas (EI y MILF), se utilizaron 0,25 g fibra alimentaria, que fueron disueltos en 5 mL de buffer fosfato (0,2074 g de $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$ + 0,1691 g de NaH_2PO_4 , 0,0392 g de NaCl diluidos en 100 mL de agua destilada a un pH de 6.9). Para la muestra líquida (MI) se añaden 5 mL a la fase oral.

4.2.1.2. Fases del proceso de digestión

Fase oral

Las muestras fueron diluidas en proporción 1:1 con la solución salival de trabajo. Para ello, 5 mL de la muestra se añaden en 3,5 mL de solución salival, posteriormente se agregaron 0,025 mL de CaCl_2 (0,3 M), 75 u/mL de amilasa humana (Brodkorb et al. 2019), el volumen de la mezcla se ajustó con agua hasta alcanzar 10 mL. La mezcla fue realizada en un frasco con tapón de rosca de 25 mL. Una vez realizada la mezcla, se agitó y se midió el pH (modelo de potenciómetro). Posteriormente, los frascos se introdujeron en baño de agua caliente (TBA-21 de SBS) a 37°C y 55 rpm de agitación durante 2 min. Una vez pasados los dos minutos, se detuvo la reacción metiendo los frascos en hielo.

Fase gástrica

Después de la fase oral se agregó la solución gástrica en proporción 1:1 v/v (Brodkorb et al. 2019). Para ello, se agregaron 7,5 mL de la solución gástrica, 5 μL de CaCl_2 (0,3 M), se agregó la cantidad necesaria de pepsina para obtener una concentración (20000 U/mL) Posteriormente se ajustó el pH a 3 añadiendo HCl (1N) y se enrasó a 20 mL con agua milli-Q. La mezcla fue agitada e introducida en un baño caliente a 37°C y 55 rpm durante 2 h. Tras 2 horas de incubación, la mezcla fue retirada, se midió el pH para controlar las posibles variaciones del este parámetro.

Fase intestinal

Después de la fase gástrica se adicionó la solución intestinal en proporción 1:1 v/v (Brodkorb et al. 2019). Para ello se agregaron 5,5 mL de solución intestinal, 200 μL CaCl_2 (0,3 M), 2,5 mL de una solución de pancreatina que contenía (se añaden 8 mg/mL), 1,25 mL de sales biliares, se ajustó el pH de la disolución a 7 (NaOH 0,1N), se enrasó a un volumen de 20 mL con agua milli-Q. Finalmente, la mezcla se agitó y se introdujo en un baño agua a 37°C y 55 rpm durante 2h. Tras de 2 horas incubación, las muestras se enfriaron en un baño con hielo picado para detener la digestión y se midió el pH. Las muestras fueron conservadas a -20°C.

El proceso de digestión se realizó por triplicado.

4.2.1.3 Control del pH

El control de pH se realizó tanto en las muestras como en todas las fases de la digestión. Antes de llevar a cabo la digestión se midió el pH tanto en las muestras sólidas como en la muestra líquida, ambas disueltas en buffer fosfato. Así mismo, este parámetro fue controlado al finalizar cada fase digestiva, una vez parada la reacción se mide el pH en las muestras a 20°C, especialmente, en los procesos de digestión previos al ensayo final. También, para asegurar el control del pH se realizó un blanco en cada experimento de digestión.

4.2.2 DETERMINACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS

El contenido total de oligosacáridos se calculó según la siguiente formula:

$$\text{Oligosacáridos totales} = \text{azúcares de hidrólisis ácida} - \text{azúcares de muestra digerida} *$$

*muestra digerida después de las fase intestinal o gástrica

4.2.2.1 Preparación de la muestra

Para obtener los azúcares de la hidrólisis ácida: una vez finalizada la digestión estática in vitro, por un lado, se realizó una hidrólisis ácida de las muestras obtenidas recogidas en la fase gástrica y fase intestinal. Para ello, 6 mL de la fase gástrica o intestinal fueron hidrolizados con 172.8 μL de H_2SO_4 (1N). Una vez realizada la mezcla, se agitó y se calentó a 121°C durante 30 min. Posteriormente, la mezcla fue enfriada y centrifugada a 4000 rpm durante 5 min (ST 16R de SORVALL). Seguidamente, el sobrenadante fue filtrado con la ayuda de un filtro nailon de 0,22 μm (Filtros de Jeringa de Nylon de 0,22 μm de SCI SOLS). Finalmente, la muestra fue conservada a -20°C hasta su análisis por HPLC.

Para obtener los azúcares de la muestra digerida: 1 mL de la muestra obtenida en la fase gástrica y en la intestinal fue centrifugada y filtrada a 4000 rpm durante 5 min (ST 16R de SORVALL), el sobrenadante fue filtrado con la ayuda de un filtro nailon de 0,22 µm. Finalmente, la muestra fue conservada a -20°C hasta su análisis hasta su análisis por HPLC.

4.2.2.2 Análisis por HPLC

La concentración de azúcares simple se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de índice de refracción (Waters 2414, EE. UU), utilizando una columna Aminex HPX-87 H (Waters) a 60 °C. La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 0,01 N con un caudal de 0,6 ml/min y el volumen de inyección fue de 20 µL. Este análisis se realizó en el Instituto de Procesos Sostenibles (ISP) de la Universidad de Valladolid

4.2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante determinó en las muestras iniciales y después de la fase intestinal. Esta capacidad se evaluó mediante dos métodos que atrapan radicales libres: el DPPH y el ABTS. Estos métodos utilizan una solución de Trolox (Sigma-Aldrich) como estándar de referencia, ambos métodos miden la absorbancia con la ayuda de un espectrofotómetro UV-VIS, (THERMO SPECTRONIC Helios Alpha 9423). Los resultados se expresaron como µmol equivalentes de Trolox por gramo de fibra.

El ensayo de DPPH se realizó siguiendo las indicaciones Brand-Williams et al. (1995). Brevemente, 20 µL de la muestra inicial y de la muestra después de la fase intestinal fueron agregados a una solución de DPPH (Sigma-Aldrich) 0,1 mM en metanol al 80%, la mezcla fue agitada y mantenida en oscuridad durante 10 minutos, pasado este tiempo se midió la absorbancia a 515 nm.

El ensayo de ABTS se realizó según Re et al. (1999), brevemente, 20 µL de la muestra inicial y de la muestra después de la fase intestinal fueron agregados a una solución de ABTS (Sigma-Aldrich) (7 mM en 20 mM PBS, pH 7.4), la mezcla fue mantenida en oscuridad 6 minutos, pasado este tiempo se midió la absorbancia a 734 nm.

4.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el programa Excel para realizar medias y desviación estándar. La comparación de medias se realizó con ayuda del programa *SPSS Statistics* versión 26.0.0.1 (IBM®).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PROCESO DE DIGESTIÓN

Las principales fases de la digestión usando un modelo *in vitro* estático se encuentran recogidas en la Figura 5. El modelo utilizado fue una adaptación al protocolo de digestión de INFOGEST (Brodkorb et al., 2019), se realizaron diversos cambios durante el proceso entre los que cabe mencionar el pH (ver apartado 6.2), la cantidad de muestra, el volumen de la fase gástrica y el volumen de la fase intestinal.

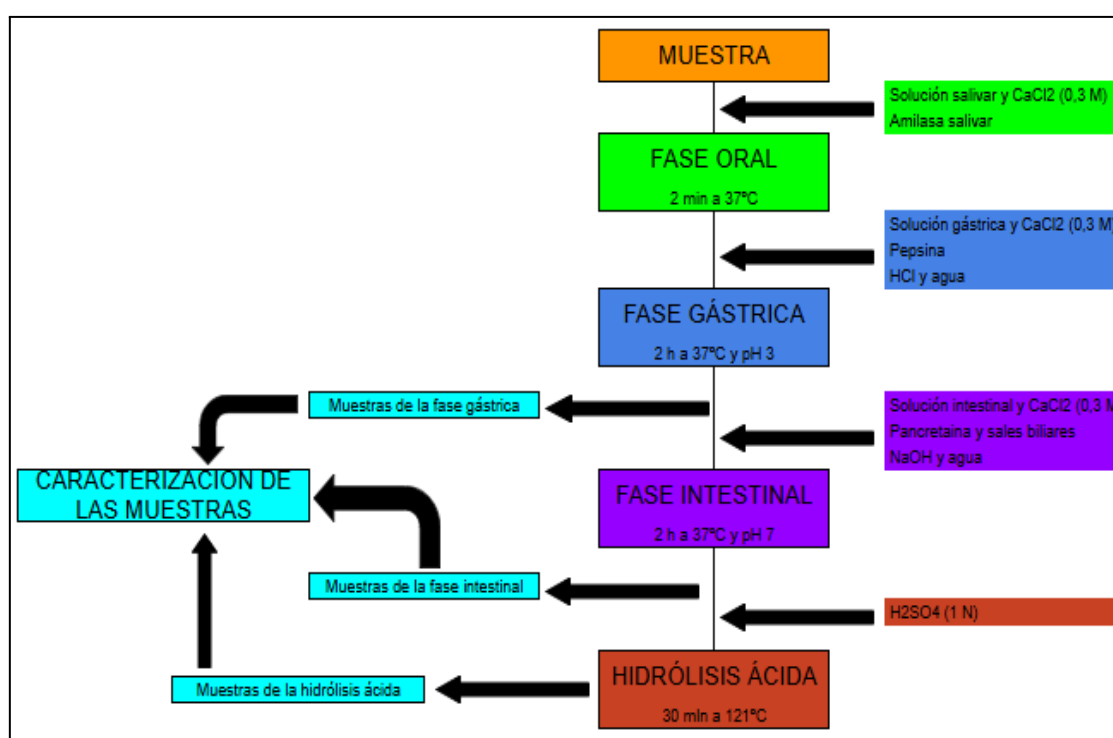


Figura 5. Esquema simplificado que representa el proceso de digestión estática *in vitro* según el protocolo INFOGEST.

El protocolo de INFOGEST utiliza 5 g de alimento, en este estudio se ha utilizado 0.25 g de fibra, que equivaldría a 3g de fibra en una ración de alimento de aproximadamente 125 ml. Para realizar este cambio se ha tenido en cuenta que la Asociación Internacional de Científicos para Probióticos y Prebióticos indican que una

dosis oral de entre 3-5 g de prebióticos por día podrían mejorar la salud del consumidor, aunque actualmente no hay recomendaciones dietéticas para este tipo de nutriente (ISAPP, 2025).

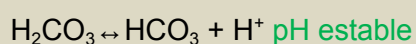
En cuanto a la variación en los volúmenes de las fases gástricas e intestinal se ha debido a las limitaciones de la cantidad de las muestras de fibra analizadas.

5.2 CONTROL DEL pH

Otro de los factores que hay que tener muy en cuenta durante el proceso de la digestión es el pH; aunque este parámetro fue ajustado según el método descrito por Minekus et al. 2014, se produjeron cambios bruscos de pH durante la fase gástrica. Además, los pH de las fibras alimentarias tenían un rango de entre 3,3 y 5,37, lo que provocó que se tuviera que ajustar el pH de la fibra para poder iniciar el proceso de digestión intestinal. Hay que tener en cuenta que el pH establecido por INFOGEST en la fase gástrica de la digestión es 3,0 mientras que en la fase intestinal es 7,0.

En los primeros ensayos que se realizaron se produjo un incremento de hasta 2,5 unidades de pH (datos no mostrados); esto puede ser debido a la formación de CO₂. Este CO₂ que ha provocado el incremento del pH se ha podido producir debido a que para realizar la digestión se necesita utilizar sales carbonatadas como el NaHCO₃ en las diferentes fases que requieren el uso de recipientes sellados con espacio de cabeza limitado (Brodkorb et al., 2019). En este estudio un volumen de espacio de cabeza de 30 mL fue suficiente para que se pudiera formar CO₂ y el pH se incrementará hasta 5,5 (ver ecuación 2). Este incremento produce desviaciones en el proceso de digestión, por ello se cambiaron el tipo de recipientes utilizados para el ensayo con un menor volumen de espacio de cabeza.

Ecuación 2



En la Figura 6, se recoge el control del pH a lo largo de la digestión in vitro de las diferentes fibras alimentarias, una vez ajustados el espacio de cabeza, y como se puede ver el pH durante la fase gástrica se mantiene en 3.0, ya no hay esos aumentos hasta 5.5 de los ensayos previos, y durante la fase intestinal se mantiene en 7.0

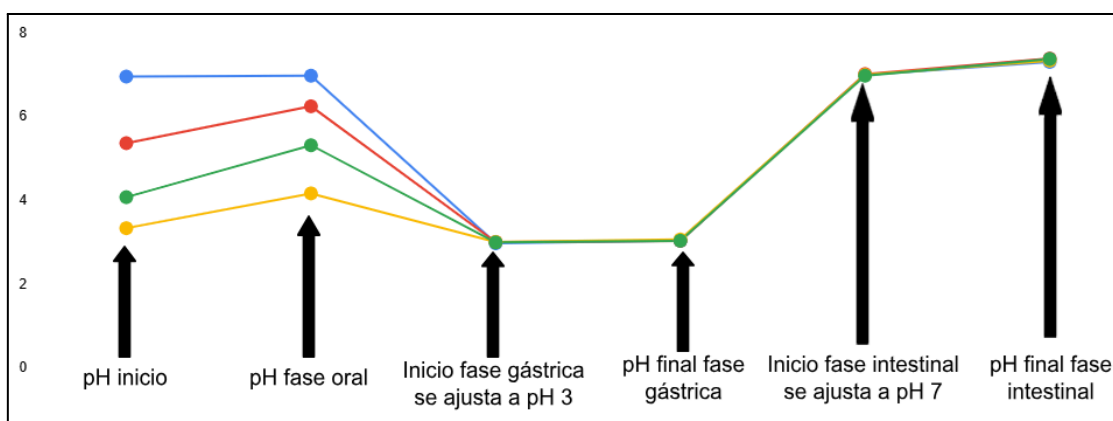


Figura 6: Figura 6: Control del pH en las diferentes etapas en el proceso de digestión usando un modelo estático in vitro.

Blanco (■); Etanol (■); Membrana (■); Liofilizada (■)

5.3 CONTENIDO DE OLIGOSACÁRIDOS

Estudios previos del grupo de Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos del ISP (Amo-Mateos et al., 2024) ya cuantificaron los oligosacáridos presentes en este tipo de fibra alimentaria, pero se han realizado nuevos procesos de extracción de fibra y se necesita conocer cuál es el tratamiento con el que se obtiene una mayor cantidad de oligosacáridos.

La cantidad de fibra utilizada para cada experimento fue ajustada a 0,025g/mL para las muestras sólidas (EI y MILF) y la muestra líquida (MI).

La cantidad de oligosacáridos fue determinada según se indica en el apartado 3.2. En la Tabla 4, se recoge la cantidad de oligosacáridos formados durante la digestión de las fibras alimentarias obtenidas del bagazo de sidra de manzana, según el tratamiento utilizado para su extracción, tanto en la fase gástrica como en la intestinal utilizando un modelo estático de digestión in vitro. La fibra obtenida mediante precipitación con etanol fue más susceptible a la hidrólisis enzimática y formó significativamente ($p < 0,05$) más cantidad de oligosacáridos ($0,468 \pm 0,164$ g oligosacáridos/g fibra) en comparación con la fibra obtenida mediante filtración de membrana ($0,194 \pm 0,022$ g oligosacáridos/g fibra) o la obtenida tras un proceso de secado por liofilización ($0,045 \pm 0,007$ g oligosacáridos/g fibra). Sin embargo, en la fase intestinal no se observaron diferencias significativas en el contenido de oligosacáridos entre las fibras obtenidas por distintos tratamientos de extracción. Por lo tanto, los mejores resultados en cuanto a contenido de oligosacáridos se dan

durante el tratamiento con precipitación con etanol, por lo tanto, sería el tratamiento sobre el que se debería trabajar en su mejora para aumentar aún más el rendimiento de producción.

La cantidad de oligosacáridos obtenidos después de la digestión sería adecuada para el crecimiento de microorganismos intestinales que podría ayudar a un buen balance de la microbiota intestinal.

Tabla 4: Cantidad total de oligosacáridos encontrados en cada fase de la digestión estática *in vitro* utilizados diversos métodos de extracción de fibra*

Tratamiento~	Gástrica	Intestinal
<i>Etanol</i>	0,468±0,164 ^a	0,315±0,174 ^a
<i>Membrana</i>	0,194±0,022 ^{ab}	0,258±0,131 ^a
<i>Membrana-Liofilizada</i>	0,045±0,007 ^b	0,151±0,032 ^a

* resultados expresados en gramos oligosacáridos*g⁻¹ de fibra

~ Tratamientos químicos (etanol) y físicos (membrana) precipitación y filtración de la fibra.

^{a,b} Superíndices con distinto tipo de letra en la columna indica diferencias significativas de las medias (p<0,05)

En cuanto a la cantidad de oligosacáridos que se esperaba obtener, esta depende del tipo y variedad de fruta, por ejemplo, el contenido de oligosacáridos fue superior en manzana de la variedad *Petrovka* en comparación con la variedad *Delicious* 0,29 g y 0,07 g por cada 100 g de fracción comestible (Jovanovic- Malinovska et al, 2014); sería interesante realizar estudios con otras variedades de manzana y ver si el contenido aumenta.

La cantidad de oligosacáridos obtenidos en nuestro estudio en el caso de las muestras iniciales de fibra fue inferior al encontrado por Amo-Mateos et al. (2024), estos autores obtuvieron valores de 0,68 g de oligosacáridos/g de fibra procedente de remolacha roja. Sin embargo, no fue posible comparar los resultados después de la digestión *in vitro* de este estudio con otros autores debido a la falta de estudios acerca de la digestión de la fibra.

5.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En este estudio, la capacidad antioxidante de las fibras alimentarias antes y después de la digestión *in vitro* mediante el modelo estático se han evaluado a través de los métodos DPPH y ABTS. Se comparará la capacidad antioxidante de las distintas fibras alimentarias antes y después de la digestión estática *in vitro*, también se comparará la capacidad antioxidante de las distintas fibras alimentarias según su método de extracción.

5.4.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO DPPH

La Figura 7 muestra la capacidad antioxidante de cada fibra alimentaria obtenidas del bagazo de sidra de manzana antes y después de someterlas a un modelo estático de digestión *in vitro* mediante el método DPPH. Se observa que la capacidad antioxidante de las fibras alimentarias aumenta tras la digestión intestinal, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras de fibra alimentaria iniciales (EI y MI) y tras su digestión (EFI y MFI), pero no se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las fibras alimentarias según su método de extracción.

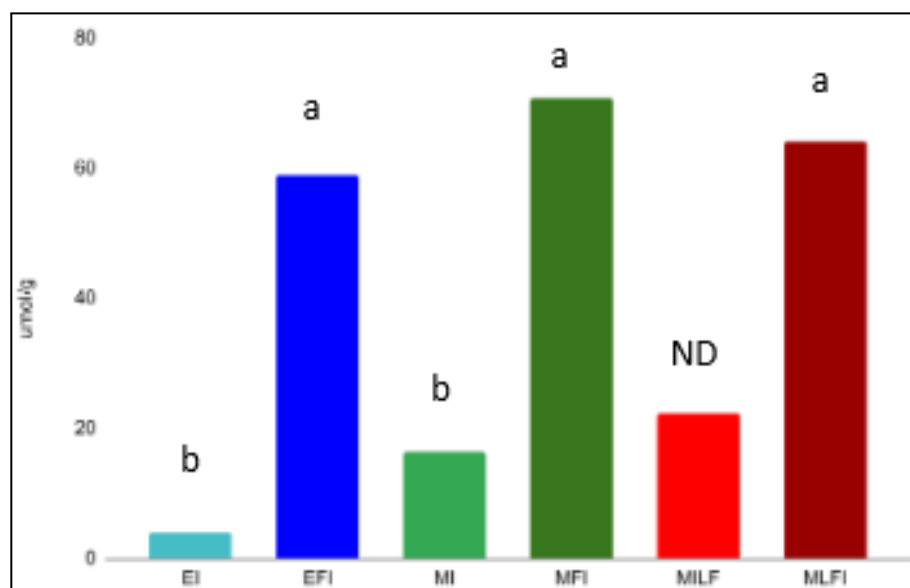


Figura 7: Capacidad antioxidante equivalente en Trolox, expresada en $\mu\text{mol/g}$ de fibra alimentaria usando el método DPPH, obtenida mediante diversos métodos de extracción.

EI: fibra sin digerir precipitada con etanol (■); EFI: Fibra precipitada con etanol y digerida en la fase intestinal (■); MI: Fibra obtenida mediante filtración de membrana sin digerir (■); MFI: Fibra obtenida por filtración con membrana digerida en la fase intestinal (■); MILF: Fibra obtenida por filtración con membrana, liofilizada y sin digerir (■); MLFI: Fibra obtenida por filtración con membrana, liofilizada y digerida en la fase intestinal (■). Superíndices con distinto tipo de letra en la columna indica diferencias significativas de las medias ($p < 0,05$).

5.4.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO ABTS

En la Figura 8, se puede observar la capacidad antioxidante de cada fibra alimentaria obtenidas del bagazo de sidra de manzana antes y después de someterlas a un modelo estático de digestión *in vitro* mediante el método ABTS. Se observa que la capacidad antioxidante de las fibras alimentarias aumenta tras la digestión intestinal, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras de fibra alimentaria iniciales (EI y MI) y tras su digestión (EFI y MFI). Por otro lado, se observa una diferencia significativa ($p < 0,05$), al contrario que ocurría con el método DPPH, en la actividad antioxidante de las fibras alimentarias digeridas según su método de extracción, siendo la fibra obtenida mediante filtración por membrana y posterior liofilización (MLFI) la que menos actividad antioxidante presenta en comparación con las fibras precipitada por etanol, (EFI) o la obtenida por membrana sin liofilizar (MFI).

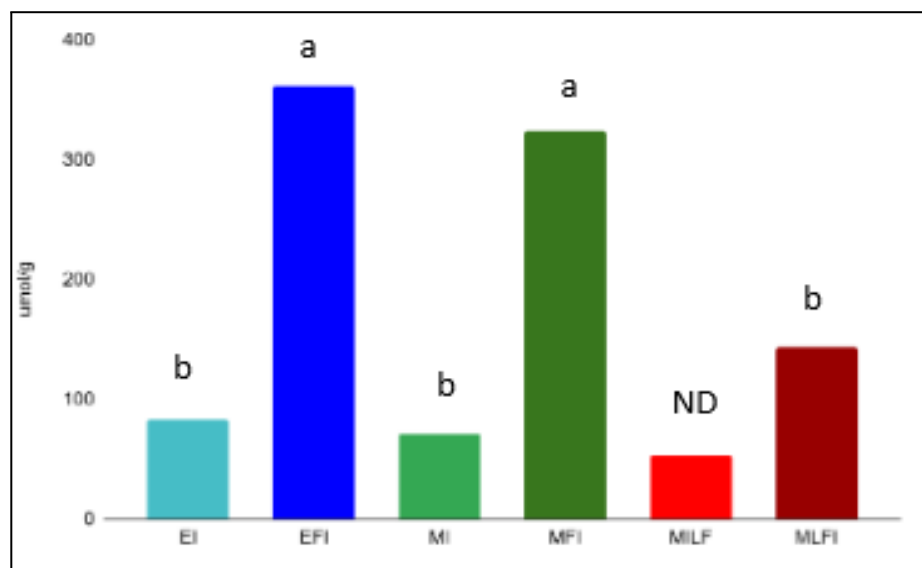


Figura 8: Capacidad antioxidante equivalente en Trolox, expresada en $\mu\text{mol/g}$ de fibra alimentaria usando el método ABTS, obtenida mediante diversos métodos de extracción

EI: fibra sin digerir precipitada con etanol (■); EFI: Fibra precipitada con etanol y digerida en la fase intestinal (■); MI: Fibra obtenida mediante filtración de membrana sin digerir (■); MFI: fibra obtenida por filtración con membrana digerida en la fase intestinal (■); MILF: Fibra obtenida por filtración con membrana, liofilizada y sin digerir (■); MLFI: Fibra obtenida por filtración con membrana, liofilizada y digerida en la fase intestinal (■). Superíndices con distinto tipo de letra en la columna indica diferencias significativas de las medias ($p < 0,05$)

En este estudio se han utilizado los métodos del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH y del radical mono-cación

preformado con persulfato de potasio 2,2'-azinobis-(3-etil-benzo-tiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS•+). Ambos métodos expresan la capacidad antioxidante de los alimentos en trolox equivalente (TEAC), y al tener un radical libre, tienen la capacidad de aceptar un electrón (Ozgen et al., 2006). En este trabajo se ha cuantificado la capacidad antioxidante de la fibra de bagazo de manzana compuesta principalmente por pectina, a través de los dos métodos antes mencionados (ver Figuras 6 y 7). En estas figuras se puede observar que la capacidad antioxidante estimada con el método DPPH fue inferior en comparación con la estimada por el método ABTS, especialmente en el caso de las muestras después de la digestión intestinal (EI y MFI). Esta diferencia se puede explicar debido a que el método DPPH requiere un ambiente hidrofóbico (DPPH se disuelve en metanol); lo que puede ocurrir es que al final de la digestión intestinal lo que se forma son pecto-oligosacáridos ácidos que son moléculas hidrofílicas. Sin embargo, en el método ABTS el radical ABTS se preforma en persulfato de sodio que puede reaccionar con los grupos hidroxilo tanto en ambiente hidrofílicos como hidrofóbicos. Los grupos ácidos de los pecto-oligosacáridos podrían ser los responsables de una subestimación de la capacidad antioxidante observada en el método DPPH.

Sería interesante, al igual que se indicó en el apartado 6.3, realizar estudios de capacidad antioxidante con fibras dietéticas obtenidas de otros tipos de residuos de manzana, por ejemplo, manzana de zumo; y si es posible con otros residuos provenientes de otras frutas y verduras.

6- CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas de este estudio son:

1. El protocolo del modelo de digestión in vitro INFOGEST adaptado en este estudio, permitió conocer algunas propiedades funcionales de la fibra obtenida del bagazo de manzana como la cantidad de oligosacáridos y la actividad antioxidantes de los compuestos formados durante la digestión.
2. El contenido de oligosacáridos fue superior en las muestras de fibra, extraídas del bagazo de manzana, tras la digestión estática in vitro, obteniendo concentraciones entre 0,151 y 0,315 g de oligosacáridos/g de fibra.
3. Los ensayos de la capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y ATBS muestra que el método ABTS estima adecuadamente la capacidad antioxidante de los compuestos formados durante la digestión in vitro. Se observó una mayor capacidad antioxidante en la fibra extraída por decantación etílica de 356,4 μmol equivalentes en trolox/g de fibra.
4. Teniendo en consideración los resultados anteriores, el método por decantación etílica proporciona la fibra dietética con mejores propiedades funcionales; cantidad de oligosacáridos y capacidad antioxidantes. Por lo tanto, es factible elaborar ingredientes bioactivos a partir de bagazo de manzana reduciendo el impacto medio ambiental

7- BIBLIOGRAFÍA

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

Calero, V., Rodrigues, P. M., Dias, T., Ainla, A., Vilaça, A., Pastrana, L., Xavier, M., & Gonçalves, C. (2024). A miniaturised semi-dynamic in-vitro model of human digestion. *Scientific Reports*, 14(1), 11923. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54612-w>

Centeno, T. (2020, November 3). (ES) Residuos de manzana: Una fuente sostenible de materiales de carbono y compuestos valiosos. Cemowas2. <http://cemowas2.com/2020/11/03/es-residuos-de-manzana-una-fuente-sostenible-de-materiales-de-carbono-y-compuestos-valiosos/>

del Amo-Mateos, E., Fernández-Delgado, M., Lucas, S., López-Linares, J. C., García-Cubero, M. T., & Coca, M. (2023). Valorization of discarded red beetroot through the recovery of bioactive compounds and the production of pectin by surfactant-assisted microwave extraction. *Journal of Cleaner Production*, 389(135995), 135995. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.135995>

Gao, J., Lin, S., Jin, X., Wang, Y., Ying, J., Dong, Z., & Zhou, W. (2019). In vitro digestion of bread: How is it influenced by the bolus characteristics? *Journal of Texture Studies*, 50(3), 257–268. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12391>

González, R. (2017). Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro. *Revista Doctorado UMH*, 2(2), 5. doi:10.21134/DOCTUMH.V2I2.1278

Grau, A., Lerma, C., Gutiérrez, H., & Grau, A. (n.d.). SIMULACIÓN IN VITRO DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL DE ALIMENTOS. Upv.Es. Retrieved July 4, 2025, from <https://riunet.upv.es/server/api/core/bitstreams/93c4e0e2-310e-45a7-9382-ffb4781cd0eb/content>

Guarner, F., & Malagelada, J. (2003). La flora bacteriana del tracto digestivo. *Gastroenterología y Hepatología*, 26, 1–5. doi:10.1157/13043240

Gudeman, E. (1905). ARTIFICIAL DIGESTION EXPERIMENTS.1. *Journal of the American Chemical Society*, 27(11), 1436–1442. <https://doi.org/10.1021/ja01989a006>

Hu, J.-L., Nie, S.-P., Min, F.-F., & Xie, M.-Y. (2013). Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L.

- Carbohydrate Polymers, 92(2), 1143–1150.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.072>
- Lett, L. A. (2014). Revista Argentina de microbiología, 46(1), 1–2.
[https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70039-2](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70039-2)
- Lewis, T., & Stone, W. L. (2025). Biochemistry, proteins enzymes. In StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- López, P. (2015). Determinación de la capacidad antioxidante de Sambucus ebulus L. utilizando el método ORAC. Trabajo de Fin de Grado, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense from
<https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/b1f1e2ed-f7d1-4329-92c4-71868df7eba8/content>
- López, S. (2019). Determinación de la capacidad antioxidante de infusiones. Trabajo Fin de Grado, Facultad de Química de la Universidad de Valladolid. Retrieved July 4, 2025, from
<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/38139/TFG-G3572.pdf?sequence=1>
- Lou, M., Ritzoulis, C., Liu, J., Zhang, X., Han, J., & Liu, W. (2022). In vitro digestion of tofu with different textures using an artificial gastric digestive system. Food Research International (Ottawa, Ont.), 157(111458), 111458.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111458>
- Martellet, M. C., Majolo, F., Ducati, R. G., Volken de Souza, C. F., & Goettert, M. I. (2022). Probiotic applications associated with Psyllium fiber as prebiotics geared to a healthy intestinal microbiota: A review. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 103–104(111772), 111772. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111772>
- Meneses-Peralta, J. (2022). Valorización biotecnológica a partir de residuos del proceso de elaboración de Sidra de manzana (Malus domestica). REVISTA DE INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA PRODUCTIVA, 2(2), e005.
<https://doi.org/10.54353/ritp.v2i2.e005>
- Pérez, F., & Mar., M. (2018). Diseño de un protocolo de conservación de microbiota intestinal humana para uso en ensayos de fermentación colónica. Retrieved from
<https://riunet.upv.es/handle/10251/109146>
- Prasad, K. N., & Bondy, S. C. (2018). Dietary fibers and their fermented short-chain fatty acids in prevention of human diseases. Mechanisms of Ageing and Development. doi:10.1016/j.mad.2018.10.003
- Opperman, C., Majzoobi, M., Farahnaky, A., Shah, R., Van, T. T. H., Ratanpaul, V., ... Eri, R. (2025). Beyond soluble and insoluble: A comprehensive framework for classifying dietary fibre's health effects. Food Research International (Ottawa, Ont.), 206(115843), 115843. doi:10.1016/j.foodres.2025.115843
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization

assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Rosas-García, N. (2008). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 49–63. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/776/77617786013.pdf>

Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137(3 Suppl 2), 830S–7S. doi:10.1093/jn/137.3.830S

Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Current Research in Food Science*, 4, 308–319. doi: 10.1016/j.crfs.2021.04.004

Sharma, V., Devkota, L., Kishore, N., & Dhital, S. (2025). Understanding the interplay between dietary fiber, polyphenols, and digestive enzymes. *Food Hydrocolloids*, 166(111310), 111310. doi: 10.1016/j.foodhyd.2025.111310

Stollman, N., & Raskin, J. B. (2004). Diverticular disease of the colon. *Lancet*, 363(9409), 631–639. doi:10.1016/s0140-6736(04)15597-9

Williams Turpin et al. (noviembre de 2016). «Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort». *Nature Genetics*, Vol. 48, Número 11, 1413-1417