Aplicación de la técnica de gelación iónica asistida por electropulverización como estrategia para mejorar la bioaccesibilidad in vitro de los compuestos bioactivos presentes en un extracto de uchuva y gulupa

Ana María Naranjo Durán

Tesis doctoral presentada para optar al título de Doctora en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Tutora
Gelmy Luz Ciro Gómez, Doctora (PhD) en Ingeniería
Cotutor
Julián Quintero Quiroz, Doctor (PhD) en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias
Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias
Medellín, Antioquia, Colombia
2024

Cita	(Naranjo-Durán, 2024)
Referencia **Estilo APA 7 (2020)**	Naranjo-Durán, AM (2024). *Aplicación de la técnica de gelación iónica asistida por electropulverización como estrategia para mejorar la bioaccesibilidad in vitro de los compuestos bioactivos presentes en un extracto de uchuva y gulupa* [Tesis doctoral]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

creative commons CC BY NC SA

Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Cohorte XX.

Grupo de Investigación Toxinología, Alternativas Terapéuticas y Alimentarias.

Centro de Innovación e Investigación Farmacéutica y Alimentaria (CENQFAL).

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
Vicerrectoría de Docencia

Sistema de Bibliotecas

Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: http://bibliotecadigital.udea.edu.co

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mis Padres, hermana y esposo por ser parte de mí y por el amor que siempre está ahí, y a mi abuela Rocío que, aunque hoy no está con nosotros, tenía claro que quería estar aquí el día que finalizara este gran viaje académico.

Agradecimientos

A mis tutores, la Dra. Gelmy Ciro y el Dr. Julián Quintero por darme la oportunidad, la confianza y por ser mi guía en este camino académico durante tantos años.

A la Dra. Catalina Marín, por brindarme y guiarme con sus conocimientos, a la Ingeniera de Alimentos Valeria Ángel y al Microbiólogo y bioanalista Juan Manuel Patiño que hicieron parte del proyecto como estudiantes en formación, y hoy en día son profesionales egresados de la Universidad de Antioquia.

A los Profesores, Dra. Amparo Alegría y Dr. Antonio Cilla y al estudiante de doctorado Diego Miedes del grupo de investigación Bionutest de la universidad de Valencia, por haber compartido su conocimiento conmigo durante mi estancia de investigación predoctoral.

A la Universidad de Antioquia por ser mi casa tantos años y a la que le debo mi formación tanto académica como personal.

Tabla de contenido

Tabla de contenido 4

1. Resumen 12

Abstract 13

2. Introducción 14

3. Planteamiento del problema 16

3.1. Antecedentes 19

Consumo de frutas y su relación con las ECNT. 19

Uchuva (Physalis peruviana l) 22

Gulupa (Passiflora edulis f. edulis sims) 23

Extracción de compuestos bioactivos. 24

Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos 26

Encapsulación por gelación iónica de compuestos bioactivos 28

4. Justificación 32

7. Marco teórico 36

Estrés oxidativo y ECNT. 36

Frutas exóticas colombianas 36

Uchuva (Physalis peruviana l) 37

Gulupa (Passiflora edulis f. edulis sims) 37

Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos presentes en frutas 38

Gelación iónica asistida por electropulverización 41

Alginato de sodio 43

Goma arábiga 44

Hidroxipropilmetilcelulosa 44

8. Metodología 46

8.1. Selección de las frutas 46

Acidez Titulable 48

Grados ° Brix 49

Índice de madurez 49

8.2. Obtención y caracterización de los extractos de las frutas 49

Obtención del extracto de gulupa 50

Obtención del extracto de uchuva 50

Caracterización fisicoquímica de los extractos 50

Proteína 51

Grasa total 51

Cenizas totales 52

Humedad 52

8.3. Identificación de los CBs presentes en la uchuva y la gulupa por HPLC-MS. 52

Identificación de carotenoides 52

Identificación de polifenoles 53

8.4. Cuantificación de los CBs y la actividad antioxidante 53

Polifenoles totales 53

Carotenoides totales mediante HPLC-DAD 53

Evaluación de la capacidad de las muestras para reducir el hierro férrico (FRAP) 54

Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical ABTS 54

Determinación de la capacidad de las muestras para atrapar el radical libre DPPH (2,2'-Difenil-1-Picrilhidrazilo) 55

Inhibición de la peroxidación lipídica de la yema de huevo (TBARS) 55
Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno ORAC: 55
8.5. Diseño de las partículas de hidrogel con la mezcla de frutas 56
Diseño de la mezcla de frutas 56
Optimización del proceso de gelación iónica asistida por electropulverización 57
Diseño experimental 58
Formulación del material de pared de las partículas de hidrogel 60
Bioaccesibilidad de los CBs de las partículas de hidrogel: 61
Eficiencia de encapsulación y carga 61
Morfología de las partículas de hidrogel 62
Optimización de los diseños experimentales 62
8.6. Actividad anti-proliferativa en células de carcinoma colorrectal humano 62
Citotoxicidad celular por MTT 63
Apoptosis 64
Progresión del ciclo celular 64
Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) 64
Glutatión Reducido Intracelular (GSH) 65
8.7. Análisis estadístico 65
9. Resultados 66
9.1. Obtención y caracterización de los extractos de las frutas 66
Efecto del estado de madurez sobre la actividad antioxidante de las frutas. 66
Efecto de la extracción asistida por ultrasonido sobre la concentración de compuestos bioactivos en la uchuva 69
Caracterización fisicoquímica de los extractos de uchuva y de gulupa 71

CBs en los extractos de uchuva y gulupa identificados por HLPC-MS gulupa 72

Actividad antioxidante de los extractos liofilizados 74

9.2. Formulación de la mezcla de frutas 75

Optimización del proceso de gelación iónica asistida por electropulverización 78

Selección de la carga de las partículas de hidrogel 81

Formulación del material de pared de las partículas de hidrogel 82

Actividad antioxidante para la mezcla de frutas, las partículas de hidrogel y sus fracciones bioaccesibles 86

9.3. Efecto anti-proliferativo de las partículas de hidrogel sobre las células del carcinoma colorrectal humano. 87

Citotoxicidad por MTT 87

Apoptosis 89

Distribución del estado de las células en el ciclo celular 90

Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y glutatión reducido intracelular (GSH) 91

10. Discusión 93

10.1. Obtención y caracterización de los extractos de las frutas 93

10.2. Formulación de la mezcla de frutas 97

10.3. Optimización del proceso de gelación iónica asistida por electropulverización: 99

10.4. Formulación de las partículas de hidrogel: 102

10.5. Actividad antioxidante para la mezcla de frutas, las partículas de hidrogel y sus fracciones bioaccesibles: 107

10.6. Efecto anti-proliferativo de las partículas de hidrogel sobre las células del carcinoma colorrectal humano 109

11. Conclusiones 114

12. Recomendaciones 115

12. Referencias 117

Lista de tablas

Tabla 1. Estado de madurez de las frutas para la uchuva y la gulupa 48

Tabla 2. *Diseño experimental de mezcla para optimizar la mezcla de frutas* 56

Tabla 3. Diseño experimental de superficie de respuesta para la optimización del proceso de gelificación iónica mediante atomización por electropulverización 59

Tabla 4. Diseño de mezcla reticular simplex para la formulación de partículas de hidrogel. 60

Tabla 5. Estado de madurez de la uchuva y la gulupa 66

Tabla 6. Carotenoides presentes en los extractos de uchuva y gulupa 72

Tabla 7. Polifenoles presentes en los extractos de uchuva y gulupa 73

Tabla 8. Diseño experimental para la mezcla de frutas 76

Tabla 9. ANNOVA para el diseño experimental de superficie de respuesta para la optimización del proceso de gelificación iónica asistido por electropulverización. 78

Tabla 10. Resultaos de la evaluación de las diferentes cargas 82

Tabla 11. Resultados del diseño experimental de mezclas para la formulación del material de pared de las partículas de hidrogel 83

Tabla 12. Actividad antioxidante para la mezcla de frutas, las partículas de hidrogel con mezcla de frutas y las partículas de hidrogel en blanco y sus fracciones bioaccesibles. 87

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo del método de digestión INFOGEST, muestra las etapas de la digestión in vitro para alimentos 39

Figura 2. Esquematización del prototipo de electropulverización, utilizando gelación iónica externa 42

Figura 3. Esquematización del proceso de gelación iónica entre el alginato de sodio y el ion polivalente Ca2+ 43

Figura 4. Tabla de color para frutos de uchuva durante 6 estados de maduración, desde totalmente verde (0) hasta sobre maduro (6). 47

Figura 5. Tabla de color para frutos de gulupa durante 6 estados de maduración, desde totalmente verde (0) hasta sobre maduro (6). 48

Figura 6. Prototipo de electropulverizador 58

Figura 7. Gráficas de medias de la prueba LSD de Fisher para actividad antioxidante cuantificada por ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c) y el contenido de polifenoles totales (d) con respecto al estado de madurez de la uchuva. 68

Figura 8. Gráficas de medias de la prueba LSD de Fisher para actividad antioxidante cuantificada por ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c) y el contenido de polifenoles totales (d) con respecto al estado de madurez de la gulupa 69

Figura 9. Gráficas de medias de la prueba LSD de Fisher para el efecto del método de extracción para la uchuva sobre la actividad antioxidante cuantificada por ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c) y el contenido de polifenoles totales (d). 70

Figura 10. Carotenoides totales (a) y polifenoles totales (b) para ambas frutas. 72

Figura 11. Actividad antioxidante de extractos liofilizados cuantificada mediante a) ABTS. DPPH, FRAP y ORAC y b) T-BARS 75

Figura 12. Gráfico de traza para la mezcla de referencia (0,5-0,5) para ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c) y ORAC (d). 77

Figura 13. Gráficos de superficie de respuesta para: a) Tamaño de partícula, b) Rendimiento de procesos, c) Esfericidad y d) Razón de aspecto. 79

Figura 14. Histogramas de frecuencia de la distribución del TP en el proceso de gelación iónica asistida por electropulverización. a) y b) Efecto de la altura sobre la distribución del TP; c) y d)

efecto del voltaje sobre la distribución del TP y e) efecto del caudal sobre la distribución del TP. 80

Figura 15. Efecto del porcentaje de sólidos de fruta en la formulación de partículas de hidrogel sobre a) La carga de las partículas. b) La bioaccesibilidad de los polifenoles y c) La eficiencia de encapsulación de los polifenoles. 82

Figura 16. Gráficos de trazas para a) bioaccesibilidad de polifenoles, b) bioaccesibilidad de carotenoides, c) EE de polifenoles, d) Tamaño de partícula e) Esfericidad.....84

Figura 17. Microfotografías SEM a, b y c) para partículas de hidrogel en blanco (sin frutas) y d, e y f) para partículas de hidrogel con mezcla de frutas 85

Figura 18. Efecto de fracciones bioaccesibles de muestras (diluidas 1:15 v/v con DMEM) (mezcla de frutas (F), partículas de hidrogel con frutas (PHF) y partículas de hidrogel en blanco (PHB)) sobre la viabilidad celular de las líneas celulares Caco-2. no diferenciado como modelo tumoral (a) y diferenciado como modelo no tumoral de tipo epitelial intestinal (b). 88

Figura 19. Efecto de fracciones bioaccesibles de muestras (diluidas 1:15 v/v con DMEM) (mezcla de frutas (F), partículas de hidrogel de frutas (PHF) y partículas de hidrogel en blanco (PHB)) sobre la distribución del estado de muerte celular del modelo tumoral Caco-2.....90

Figura 20. Efecto de fracciones bioaccesibles de muestras (diluidas 1:15 v/v con DMEM) (mezcla de frutas (F), partículas de hidrogel con frutas (FHB) y partículas de hidrogel en blanco (PHB)) sobre las diferentes fases del ciclo celular de Caco- Línea modelo tumoral.....91

Figura 21. Efecto de fracciones bioaccesibles de muestras (diluidas 1:15 v/v con DMEM) (F, HFB y HB) sobre los niveles intracelulares de ROS (A) y GSH (B) de la línea modelo tumoral de células Caco-2. 92

Siglas, acrónimos y abreviaturas

ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
CBs	Compuesto bioactivos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
OMS	Organización mundial de la salud
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
IL-6	Interluquina-6
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
FB	Fracción bioaccesible
TGI	Tracto gastrointestinal
AS	Alginato de Sodio
GA	Goma arábiga
HPMC	Hidroxipropil-metilcelulosa
TP	Tamaño de partícula E
E	Esfericidad
RP	Razón de aspecto
RP	Rendimiento del proceso
EE	Eficiencia de encapsulación
FSS	Fluido salival simulado
GFS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
5-flu	5-fluorouracilo
F	Mezcla de frutas
PHF	Partículas de hidrogel con frutas
PHB	Partículas de hidrogel en blanco
MDA	Malondialdehido
GSH	Glutatión reducido intracelular

1. Resumen

Introducción: Las frutas ricas en compuestos bioactivos (CBs) pueden prevenir el estrés oxidativo, sin embargo, su baja bioaccesibilidad limita su acción, siendo la encapsulación una potencial solución. **Objetivo:** Diseñar un ingrediente encapsulado, mediante gelación iónica-electropulverización, a partir de extractos de frutas (uchuva y gulupa) para incrementar la bioaccesibilidad in vitro de sus CBs. **Metodología**: Se cuantificó polifenoles, carotenoides y actividad antioxidante (AA) a los extractos de estas frutas. Se aplicó un diseño experimental (DE) tipo mezclas: uchuva-gulupa, con variable respuesta AA. Se realizó un DE, evaluando los efectos de caudal, altura y voltaje sobre: tamaño de partícula (TP), esfericidad (ES), razón de aspecto (RA) y rendimiento del proceso (RP) para optimizar la gelación iónica-electropulverización. El material encapsulante se formuló por DE tipo mezclas: alginato de sodio (AS)-hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)-goma arábiga (GA), con variables respuesta: bioaccesibilidad de CBs, eficiencia de encapsulación (EE) de polifenoles, AA, TP y ES. Se evaluó la actividad anti-proliferativa en células Caco-2. **Resultados:** La uchuva presentó mayor AA y la gulupa mayor contenido de CBs, la mezcla óptima de uchuva-gulupa (0,83:0,17) maximizó la AA. En ambas frutas se identificaron luteína, β-caroteno, rutina y ácido clorogénico. Se minimizó TP y maximizó RP, ES y RA en el proceso de encapsulación bajo condiciones óptimas: caudal=4,33ml/min, altura=11,59cm y voltaje=12,56 kV. La formulación de AS-GA (0,75:0,25) maximizó: la bioaccesibilidad de los polifenoles (213,17±19,57%), la EE (89,46±6,64%), la AA (ABTS= 68,38±0,00% y FRAP =95,62±11,81%), además redujo el TP (1194,48±167,34µm). Las partículas de hidrogel lograron reducir la viabilidad celular al 83,99 %. **Conclusión:** La mezcla de uchuva-gulupa (0,83:0,17) logró maximizar su AA por un efecto sinérgico entre sus CB. El proceso de gelación iónica-electropulverización se optimizó y con material de pared AS-GA (0,75:0,25) se logró una bioaccesibilidad de polifenoles del 213,17±19,57%, finalmente, la mezcla de frutas encapsulada y sin encapsular tiene potencial efecto anti-proliferativo.

Palabras clave: gelación iónica, bioaccesibilidad, polifenoles, uchuva, gulupa, actividad antioxidante

Abstract

Introduction: Fruits rich in bioactive compounds (BCs) can help prevent oxidative stress, but their low bioaccessibility often limits their effectiveness. Encapsulation methods could improve this. **Objective:** The aim was to design an encapsulated ingredient from fruit extracts (goldenberry and purple passion fruit) using the ionic gelation-electrospray method to enhance the in vitro bioaccessibility of their BCs. **Methodology:** Extracts from both fruits were analyzed for polyphenols, carotenoids, and antioxidant activity (AA). A mixture-type experimental design (ED) assessed the goldenberry-purple passion fruit blend, focusing on AA as the response variable. To optimize the ionic gelation-electrospray method, effects of flow rate, height, and voltage on particle size (PS), sphericity (S), aspect ratio (AR), and process yield (PY) were studied. For encapsulation, sodium alginate (SA), hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), and arabic gum (AG) were used, with mixture-type ED evaluating BCs bioaccessibility, encapsulation efficiency (EE) of polyphenols, AA, PS, and S. Anti-proliferative activity in Caco-2 cells was also evaluated. **Results:** Goldenberry exhibited higher AA, while purple passion fruit had a greater BCs content. The optimal mixture of goldenberry and purple passion fruit (0.83:0.17) achieved the highest AA. Both fruits contained lutein, β-carotene, rutin, and chlorogenic acid. Optimal conditions for the ionic gelation-electrospray process were flow rate = 4.33 ml/min, height = 11.59 cm, and voltage = 12.56 kV, which minimized PS and maximized PY, S, and AR. The SA-AG formulation (0.75:0.25) optimized polyphenol bioaccessibility (213.17±19.57%), EE (89.46±6.64%), AA (ABTS = 68.38±0.00% and FRAP = 95.62±11.81%), and reduced PS (1194.48±167.34 μm). The optimal hydrogel beads reduced cell viability to 83.99%. **Conclusion:** The goldenberry-purple passion fruit mixture (0.83:0.17) enhanced AA through synergistic effects of BCs. The ionic gelation-electrospray process, optimized with SA-AG (0.75:0.25), achieved high polyphenol bioaccessibility and showed potential anti-proliferative effects.

*Keywords***:** ionic gelation, bioaccessibility, polyphenols, cape gooseberry, gulupa, antioxidant activity, antiproliferative activity.

2. Introducción

El consumo adecuado de frutas puede prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) que representan la mayor causa de muerte en el mundo (Afshin et al., 2019), sin embargo, del consumo de frutas y verduras recomendado por la OMS, solo se consume dos tercios de lo recomendado a nivel mundial (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 2020). Esta gran problemática global, ha llevado a un interés creciente por consumir alimentos con ingredientes naturales, haciendo que se investigue cada vez más la composición funcional de los alimentos, la obtención de nuevos productos con compuestos bioactivos (CBs) y su efecto sobre la salud humana. Las frutas exóticas colombianas uchuva (*Physalis peruviana L.*) y gulupa (*Passiflora edulis f. edulis Sims*), son ricas en compuestos antioxidantes capaces de prevenir la oxidación causante del desarrollo de muchas ECNT, adicionalmente tienen una importancia económica muy relevante en el país; es así como en entre enero y junio de 2024, las exportaciones de gulupa registraron US$28,3 millones, con un aumento de 20,4% frente al mismo lapso de 2023, mientras que la uchuva en el primer semestre de 2024 tuvo un aumento del 13,3% con respecto al mismo lapso de 2023 pasando de 21,4 millones de dólares en a 23,7 millones de dólares en 2024 (Asociación Nacional de Comercio Exterior, 2024). Dentro de los CBs presentes en estas frutas se encuentran los carotenoides y los polifenoles. Los carotenoides son un grupo de fitoquímicos esenciales, dado que son precursores del retinol, tienen una función foto-protectora y una reconocida actividad antioxidante (Edge R., 2010); los polifenoles, por su parte, juegan un papel clave en la protección de macromoléculas del daño inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), mejorando el estado antioxidante, el perfil lipídico y la función vascular/endotelial (Santhakumar et al., 2018). Sin embargo, estos CBs deben resistir factores extremos como la alta temperatura durante el procesamiento de los alimentos, y el procesos de digestión, en el que se involucran diversos factores fisicoquímicos como la temperatura, el pH y la fuerza iónica, y factores bioquímicos como la presencia de sales biliares y enzimas, todos estos factores, afectan la estabilidad de los polifenoles, y por ende, la cantidad de CB después de la digestión puede variar considerablemente de la cantidad original consumida en los alimentos (Sęczyk et al., 2021). La efectividad en el cuerpo humano de los CBs depende de su biodisponibilidad y bioaccesibilidad,

La bioaccesibilidad como primer paso a la biodisponibilidad se define como la fracción de un compuesto que se libera desde la matriz alimentaria en el lumen gastrointestinal (Rein et al., 2013) y está influenciada por la composición de la matriz, las sinergias y antagonismos entre sus diferentes componentes, por sus propiedades fisicoquímicas y la interacción con los principales factores necesarios para la digestión (pH, enzimas digestivas, microbiota intestinal, sales biliares, entre otros) (Castenmiller y West, 1998; Martin y Appel, 2009). Los CBs son muy diversos, pueden ser moléculas lipófilas e hidrófilas con estructuras químicas complejas y mecanismos de absorción diferentes; incluso, solo la absorción de los polifenoles presenta diferencias significativas entre ellos mismos. Por otra parte, los carotenoides y otros compuestos liposolubles necesitan que las enzimas digestivas liberen en el intestino ácidos grasos y monoacilglicerol para formar micelas y que puedan absorberse a través de la barrera de agua y en los enterocitos intestinales (Rein et al., 2013).

Debido a todo lo anterior, existe un interés en aumentar la bioaccesibilidad de los CBs con el fin de potenciar su efecto sobre la salud y asegurar la efectividad de los alimentos funcionales formulados con CBs. Las técnicas de encapsulación se han utilizado con éxito en la industria alimentaria como una alternativa para el desarrollo de productos innovadores y que, además, representan una solución al desafío de mejorar la bioaccesibilidad de los CBs. La pared de la cápsula está compuesta por una membrana fuerte, semipermeable y esférica que protege a los CBs durante su tránsito por el tracto gastrointestinal (González et al., 2015), a través de una barrera entre las sustancias sensibles y las influencias ambientales (Laokuldilok et al., 2016). Otra de las ventajas de esta tecnología es que permite superar las incompatibilidades de solubilidad entre ingredientes. En la actualidad se encuentran múltiples técnicas, no obstante, una opción que representa una solución a este desafío es la obtención de partículas de hidrogel mediante gelación iónica asistida por electropulverización, siendo esta una tecnología emergente que ha surgido como una alternativa para la incorporación de agentes bioactivos en partículas poliméricas con aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria con propiedades terapéuticas y profilácticas. A diferencia de otras técnicas, la gelación iónica asistida por electropulverización no requiere el uso de altas temperaturas y/o el uso de solventes orgánicos, factores que pueden afectar la estabilidad de nutrientes sensibles e impedir su uso para aplicaciones alimentarias debido a

preocupaciones de toxicidad asociadas con trazas residuales de solventes. Además, por lo general presentan una alta eficiencia de encapsulación, una distribución uniforme en la matriz de los CBs y permite proteger ingredientes sensibles a la degradación, como los polifenoles, por ejemplo, por oxidación, también, pueden aumentar la biodisponibilidad de los CBs, incluida la liberación controlada de compuestos encapsulados (Massounga Bora et al., 2018). Las partículas de hidrogel logradas mediante gelación iónica han sido usadas exitosamente para encapsular diferentes CBs, con una gran capacidad de carga y una alta eficiencia de encapsulación por encima del 90 % en como partículas de hidrogel cargadas con polifenoles de extracto de té verde (Sahin et al., 2023). Las partículas de hidrogel también han logrado aumentar la bioaccesibilidad de la ficocianina con una fuerte protección de esta molécula en las condiciones ácidas del estómago y una liberación elevada en condiciones alcalinas del intestino delgado (Sahin et al., 2023). Otras ventajas de esta técnica incluyen, facilidad de operación y escalabilidad industrial, haciendo de esta una técnica muy prometedora que adicionalmente cumple con los estándares ecológicos de la industria verde (González et al., 2015; Massounga Bora et al., 2018; Nikoo et al., 2018).

3. Planteamiento del problema

A pesar de la evidencia presente en la literatura científica, que indica que un alto consumo de frutas y verduras puede retrasar, prevenir y/o reducir el riesgo de mortalidad por ECNT (Wang et al., 2014), la ingesta insuficiente de frutas y verduras aún causa alrededor del 14% de las muertes por cáncer gastrointestinal, el 11% por cardiopatías isquémicas y el 9% por accidentes cerebrovasculares (Afshin et al., 2019); además, según datos de la organización mundial de la salud (OMS), las ECNT representan cerca del 74 % de todas las muertes a nivel mundial y el 77 % de estas, ocurren en países de ingresos bajos y medianos como Colombia (WHO, 2020). La pandemia de COVID-19 tubo un fuerte impacto sobre quienes padecen ECNT; por ejemplo, en el trabajo realizado por Yang et al. 2020 en China, un meta-análisis de casos de COVID-19 indicó que la mayoría de los pacientes fatales tenían ECNT preexistentes. Demostrando una vez más la importancia de la prevención de las ECNT como cofactores de la morbilidad y la mortalidad de las enfermedades infecciosas (Hernández-Galdamez et al., 2020). La pandemia de las ECNT pone en riesgo el avance hacia la consecución de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS),

específicamente el Objetivo 3: Salud y bienestar (numeral 4), en el cual se proyecta que para el 2030 la mortalidad prematura por ECNT se reduzca en un tercio en comparación con las cifras del 2015 (Organización de las Naciones Unidas, 2020). Teniendo en cuenta que las intervenciones de gran impacto para la prevención del desarrollo de las ECNT son aquellas con énfasis en el control de los factores de riesgo modificables, como la dieta y, que solo se consume dos tercios de la porción recomendada por la OMS (400 g de frutas y verduras al día) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 2020), existe un interés público y científico en buscar estrategias terapéuticas y profilácticas que mejoren estas alteraciones con el fin de tratar y prevenir las ECNT. Adicionalmente, esta gran problemática global, ha llevado a un interés creciente de consumir alimentos saludables y con ingredientes naturales, haciendo que las investigaciones sobre la composición funcional de los alimentos, la obtención de nuevos productos con CBs, la bioaccesibilidad, la biodisponibilidad y su efecto sobre la salud humana sean de mayor relevancia.

Las frutas exóticas colombianas son de alta demanda en los mercados extranjeros ya que resultan altamente apetecidas por su calidad, sabor y beneficios sobre la salud, por lo que la fruticultura en Colombia es considerada como una de las actividades productivas con mayor potencial, por ser un sector de amplia expansión a nivel internacional. Además, las exportaciones son un elemento esencial que compone el producto interno bruto (PIB), una herramienta clave para alcanzar el progreso económico de un país, por lo tanto, dentro del contexto nacional el sector agrícola se ha convertido en un pilar de desarrollo económico y social (Mosquera Romero., 2020). Dos de las frutas con más relevancia económica en el país son, la gulupa, con 28,3 millones de dólares y la uchuva con 23,7 millones de dólares en exportaciones en el primer semestre del año 2024; consolidando la Unión Europea como el principal destino de estas frutas con un 94,2% de participación (Asociación Nacional de Comercio Exterior, 2024). Sin embargo, una de las problemáticas para aprovechar todo el potencial del sector agrícola es su poca infraestructura, su baja competitividad y productividad. Este sector se enfrenta a un importante registro notable de pérdidas de los productos frescos en las fases de postcosecha por ejemplo en Colombia durante el 2019 se reportaron perdidas del 8,4% durante la postcosecha de frutas en general (Restrepo Betancur y Mejía Giraldo, 2023). A esto se suma, una baja proporción de investigadores, menos

del 3%, trabajando en las temáticas de postcosecha, área de gran relevancia para obtener productos con valor agregado en el sector agropecuario colombiano. La importancia de estos dos frutos radica en la presencia de CBs como polifenoles y carotenoides en estos, dichos CBs, tienen la capacidad de actuar como antioxidantes, reduciendo las especies reactivas del oxígeno, (ROS) (Edge R., 2010); lo que ayuda a prevenir el desarrollo de muchas ECNT. Aun así, el potencial benéfico que tienen sobre la salud los CBs presentes en frutas, depende en gran medida de su bioaccesibilidad y de su biodisponibilidad. La bioaccesibilidad se refiere a la fracción de un compuesto que está disponible para la absorción y puede diferir de su concentración inicial, algunos de los factores que afectan la bioaccesibilidad son la liberación de compuestos bioactivos y su solubilización durante la digestión, algunos fitoquímicos con baja liberación y solubilidad, la fracción bioaccesible puede ser menor al 10%. En el caso de la cianidina-3-glucósido del jugo de arándano de aronia, después de la digestión pancreática *in vitro* presentó una bioaccesibilidad del 57% con respecto a la concentración inicial, en el mismo sentido para el ácido clorogénico se ha reportado una bioaccesibilidad del 66%, mientras que, para la rutina hay mucha variación ya que oscila entre 0% y 97% y por su parte, las antocianinas son muy sensibles a condiciones alcalinas durante la digestión pancreática, con una bioaccesibilidad *in vitro* que oscila entre el 20% y el 70% (Wojtunik-Kulesza et al., 2020). En el caso de los polifenoles en extractos de uchuva, la bioaccesibilidad reportada es alrededor del 40%, mejorando hasta el 50% cuando los extractos son liofilizados, sin embargo, la perdida de la actividad antioxidante cuantificada por ABTS de estos extractos después del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* es superior al 70% (Guiné et al., 2020). Algunos flavonoides como, la quercetina presente en un extracto de maracuyá reporta una bioaccesibilidad del 0%. Por otra parte, la bioaccesibilidad de los carotenoides oscila entre el 92% y 60 %, sin embargo, en la etapa de fermentación colónica, se reportaron degradaciones de los carotenoides más altas, entre el 75–96%. Todos estos valores des muestran la extensa transformación y degradación de CBs en el tracto gastrointestinal (Aguillón-Osma et al., 2019). La baja bioaccesibilidad de los CBs puede deberse a su interacción con otros nutrientes o factores digestivos, como la albúmina salival, las mucinas y proteínas ricas en prolina que pueden precipitar los taninos (Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Estas interacciones junto con la baja bioaccesibilidad limita la efectividad de los CBs sobre la salud humana y la prevención de ECNT (Castenmiller y West, 1998; Martin y Appel, 2009). Es por esto, que el diseño de productos innovadores como

partículas de hidrogel con CBs proveniente de frutas colombianas es una apuesta al aprovechamiento de la biodiversidad del país, al desarrollo productivo nacional y al crecimiento económico de la región. Además, la mejoría de la bioaccesibilidad de los CBs podría aumentar su biodisponibilidad y contribuir a la prevención de ECNT, no solo a nivel local sino también a nivel mundial y aportar al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU que se ocupan de la nutrición, el consumo y la salud, como los objetivos 2 y 3 que son hambre cero y salud y bienestar. Y al apoya al cumplimiento del objetivo 12, que es crecimiento económico, producción y consumo responsable.

3.1.Antecedentes

Consumo de frutas y su relación con las ECNT.

Se ha demostrado que patrones dietéticos saludables ayudan a la prevención de las ECNT, especialmente aquellos alimentos ricos en compuestos antioxidantes como las frutas, y otros alimentos derivados de plantas (Grosso et al., 2017). Un metaanálisis de estudios prospectivos en humanos, concluyó que el consumo de carotenoides está relacionado con un riesgo significativamente menor de mortalidad por todas las causas (Zhao et al., 2016); no obstante, el bajo consumo de alimentos ricos en estos compuestos se ha asociado a una reducción de los niveles plasmáticos de carotenoides (Couillard et al., 2016), que a su vez está asociado con factores de riesgo para la mortalidad por ECNT (Shardell et al., 2011). En el mismo sentido una dieta rica en polifenoles ha demostrado tener potencial inmunorregulador y antiinflamatorio. (Schoe et al., 2009). En el estudio realizado por Yuan et al., 2020 analizaron, como la ingesta de frutas y verduras puede modificar la relación entre la ingesta de grasa total con el riesgo de sufrir hipertensión en 4368 voluntarios, sin enfermedad cardiovascular ni diabetes, la población de estudio fue dividida en cuartiles de acuerdo a su ingesta de frutas y verduras y a su ingesta de grasa total; en general se encontró que un alto consumo de grasa está estrechamente relacionado con un mayor riesgo de padecer hipertensión en todos los participantes; los análisis de los cuartiles mostraron un aumento en las probabilidades de padecer hipertensión entre los grupos con ingesta baja de frutas y verduras, en comparación con el cuartil en el que los participantes tenían un nivel más bajo de ingesta de

grasa total, las probabilidades de padecer hipertensión fueron del 38%, 97% y 81% en los siguientes tres cuartiles; en los que los participantes tenían un nivel ascendente de ingesta de grasa total; sin embargo, entre los participantes con un alto consumo de frutas y verduras, las probabilidades de padecer hipertensión no fueron significativamente diferentes entre los cuartiles. Los autores lograron demostrar que una alta ingesta de frutas y verduras puede modificar la relación entre la ingesta de grasas y el riesgo de sufrir hipertensión; no se observó relación entre el consumo de grasa y la hipertensión entre quienes tenían una ingesta adecuada de frutas y verduras; estos resultados sugieren que, una dieta rica en CBs provenientes de frutas y verduras, como la vitamina C, los polifenoles, los flavonoides y el magnesio, puede retrasar el desarrollo de la hipertensión y otras ECNT de gran relevancia en la salud pública a nivel mundial. Los CBs con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes presentes en diversas frutas y verduras pueden lograr reducir la proteína C reactiva circulante, el factor de necrosis tumoral (TNF-α) y la interluquina-6 (IL-6). Como ejemplo se tiene el estudio realizado por Ellulu et al. 2015 quienes evaluaron el efecto del consumo de un suplemento que contenía 1 g de vitamina C al día, sobre los marcadores sistemáticos de inflamación, la proteína C reactiva circulante e la IL-6, en pacientes obesos con un IMC ≥30 kg/m^2, hipertensos y/o diabéticos entre 20 y 60 años. El análisis de resultados arrojó una reducción de los niveles de proteína C reactiva circulante y de la IL-6, logrando demostrar la efectividad clínica de la vitamina C para aliviar la inflamación. Los autores concluyen que estas propiedades antiinflamatorias y antioxidantes pueden atribuirse a su capacidad para modular la actividad de unión del ADN al factor nuclear (NF-kB); esta activación es promovida principalmente por el estrés oxidativo y conduce a la expresión de moléculas de adhesión celular inducida por citoquinas proinflamatorias.

A pesar de la evidencia científica ampliamente reportada que indica que un alto consumo de frutas y verduras puede retrasar o prevenir el desarrollo de ECNT, el consumo de la porción adecuada de frutas y verduras al día es difícil de lograr para algunos consumidores. Por lo tanto, se plantea la suplementación de algunos nutrientes como vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes, como los polifenoles y los carotenoides. Así pues, Tresserra-Rimbau et al., 2015 estudiaron el efecto de la suplementación mediante el consumo de polifenoles provenientes de la dieta mediterránea en 3430 voluntarios no diabéticos entre 50 y 70 años. Entre los resultados

reportados, se destaca que una alta ingesta de compuestos polifenólicos y flavonoides totales, estilbenos y algunas subclases de flavonoides (di-hidroflavonoles y flavanonas) presentan una relación inversamente proporcional a la incidencia de diabetes tipo II; sin embargo, los autores afirman que podría existir algunos factores de confusión desconocidos o no medidos, tal como, la biodisponibilidad de las moléculas. Por otra parte, en el trabajo de Sansone et al. 2015 realizaron un ensayo de intervención controlado, aleatorizado y doble ciego con 100 hombres y mujeres sanos, con edades entre 35 y 60 años; en este estudio los participantes fueron divididos en dos grupos: al primerole suministraron un suplemento que contenía 450 mg de polifenoles de cacao totales, dos veces al día durante 1 mes y al segundo grupo (grupo control), le suministraron un suplemento que contenía 0 mg de polifenoles de cacao bajo las mismas condiciones; los resultados mostraron que, la ingesta del suplemento de polifenoles de cacao disminuye la presión arterial, la rigidez vascular y el colesterol, y además puede reducir el colesterol total y el LDL en 0,2 mmol/L durante 1 mes, dichos hallazgos sugieren que la ingesta de polifenoles de cacao puede mantener o mejorar la salud cardiovascular en personas sanas.

Considerando que el estrés oxidativo y la inflamación crónica están estrechamente vinculados y desempeñan un papel importante en la aparición y el desarrollo de diversas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), y dado que varias de estas enfermedades comparten mecanismos fisiopatológicos, existen numerosos tratamientos farmacológicos disponibles. Sin embargo, se han reportado reacciones adversas a algunos de estos tratamientos, incluidos los antiinflamatorios esteroides y no esteroides, así como a los antioxidantes sintéticos, debido al uso prolongado de los mismos (Chandrasekhar et al., 2018; Tian et al., 2021). Por lo que se ha generado la necesidad de buscar medidas terapéuticas y profilácticas comunes, teniendo en cuenta los CBs presente en frutas y verduras (Camps y García-Heredia, 2014). Algunas investigaciones se han realizado con el fin de estudiar los mecanismos moleculares por los cuales los carotenoides ejercen su efecto en la salud humana; tal es el caso de, Tian et al. 2021 estudiaron la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los polifenoles, luteolina, kaempferol, apigenina y quercetina, por separado; encontrando que, la concentración de óxido nítrico disminuyó significativamente en los diferentes grupos experimentales; además demostraron que la luteolina, el kaempferol y la quercetina tienen una actividad antioxidante mayor que el BHT (antioxidante

sintético comercial); además, la luteolina y la quercetina mostraron mejor actividad que la vitamina C. En cuanto a la actividad antiinflamatoria, el kaempferol y la quercetina presentaron mayor actividad que la apigenina y la luteolina. Los autores concluyen que la actividad antioxidante de los compuestos evaluados es directamente proporcional al número de grupos hidroxilo fenólicos, y que la actividad antiinflamatoria de los compuestos con presencia de grupos enol es mayor que la de los compuestos en ausencia de ellos.

Uchuva (Physalis peruviana l)

El fruto de uchuva es una fuente importante de polifenoles, provitamina A, vitamina C, E, K1 y complejo vitamínico B (Fischer G., Ebert G., 2009). En el fruto se ha identificado algunos compuestos polifenólicos y carotenoides como la rutina, miricetina, quercetina, kaempferol, β-caroteno, α-caroteno, β-criptoxantina y luteína (Etzbach et al., 2018). Estos compuestos son los responsables de las propiedades medicinales que han sido reportados en literatura científica, como el efecto antiinflamatorio, antitumoral, hipocolesterolémico, efecto diurético, antiséptico, sedante, analgésico, entre otros (Puente et al., 2011; Ramadan M., Sitohy M., 2008). En el estudio realizado por Sathyadevi y Subramanian, 2015 se identificaron por cromatografía líquida los siguientes compuestos polifenólicos presentes en el fruto de uchuva: rutina, miricetina, quercetina y kaempferol y con un contenido de polifenoles totales de 76,84±3,65 mg/g de uchuva seca, concluyendo así que los frutos de uchuva tienen un gran potencial para la obtención de productos saludables y alimentos funcionales. Otros autores como Dong et al., 2019 lograron aislar cinco withanólidos de la uchuva (esteroideos naturales), donde la evaluación de su efecto biológico mostró que dos de ellos ejercían más efecto inhibidor del óxido nítrico con valores de IC50 por debajo de 8 µM. Por otra parte en el trabajo realizado por Mejia et al. 2020 cuantificaron la actividad antioxidante de varias frutas exóticas colombianas, entre ellas la uchuva, que a pesar de no era el extracto con mayor contenido de polifenoles y no tenía la mejor actividad antioxidante, mostró una mejor capacidad para inhibir la generación de ROS intracelulares en comparación con las otras frutas estudiadas, como por ejemplo la guayaba agria que tenía una mayor actividad antioxidante (2602,08 ± 51,94 µmol Trolox/g cuantificada por ORAC) que la uchuva (350,13 ± 5,5451,94 µmol Trolox/g). Por otro lado, en el estudio realizado por Hassan et al., 2017 evaluaron

el papel modulador del jugo de uchuva sobre los efectos adversos relacionados con el carcinoma hepatocelular, así como su actividad como quimio-sensibilizador para el tratamiento con adriamicina en modelos murinos. En este estudio las ratas fueron divididas en 5 grupos: el grupo 1 fue el control (sin ningún tratamiento) el grupo 2 con carcinoma hepatocelular inducido, el grupo 3 con carcinoma hepatocelular inducido y tratamiento con adriamicina, el grupo 4 con carcinoma hepatocelular inducido y tratamiento con jugo de uchuva y el grupo 5 con carcinoma hepatocelular inducido, tratamiento con adriamicina y con jugo de uchuva. Los resultados mostraron, que las ratas del grupo 5 presentaron un efecto antitumoral y un papel modulador sobre los efectos adversos relacionados con el carcinoma hepatocelular. Adicional a esto, Sathyadevi et al., 2014 estudiaron los efectos antidiabéticos de los frutos de uchuva en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina y una dieta rica en grasas; las ratas fueron divididas en 4 grupos: el grupo 1 fue el control, el grupo 2 con diabetes inducida sin tratamiento, el grupo 3 con diabetes inducida y tratadas con 200 mg/kg de extracto de fruto de uchuva y el grupo 4 tratadas con metformina (200 mg/kg). Los resultados mostraron que el nivel de glucosa en sangre se redujo significativamente en las ratas diabéticas tratadas con el extracto de uchuva (grupo 3) y con la metformina (grupo 4) en comparación con el grupo 2 de ratas diabéticas sin tratamiento, así mismo mostraron un mejor nivel de insulina. El consumo del extracto de esta fruta logró mejorar la sensibilidad a la insulina en ratas con diabetes mellitus tipo II.

Gulupa (Passiflora edulis f. edulis sims)

En general los frutos del género *Pasiflora* son ricos en minerales (calcio y fósforo) y vitaminas; también son una buena fuente de carotenoides, antocianinas y alcaloides (Shanmugam et al., 2018). En la *Passiflora edulis f. edulis Sims* comúnmente conocida como gulupa (Ocampo and Wyckhuys, 2012), curuba morada o maracuyá morado, se ha reportado la presencia de triterpenoides, flavonoides, glucósidos (*passiflorina*), glucósidos cianogénicos, compuestos aromáticos, glucósidos flavonoides (luteolina-6-C-chinovóside), alcaloides y saponinas; carotenoides como β-caroteno, vitaminas como el ácido L-ascórbico (vitamina C), vitamina A, riboflavina, resveratrol, piceatannol, colina, g-lactonas, ésteres, aceites volátiles, eugenol, aminoácidos, carbohidratos y una gran cantidad de compuestos polifenólicos, flavonoides y

antocianinas (Xu et al., 2016; Germán Franco, José R. Cartagena V., Guillermo Correa L., Benjamín Rojano, 2014). Todos estos compuestos son responsables de las propiedades funcionales sobre la salud humana que se le han atribuido a esta fruta. En el estudio realizado por Carmona-Hernández et al. 2019, evaluaron la composición de polifenoles del maracuyá, la gulupa y la granadilla y su acción inhibidora *in vitro* sobre la función de barrera intestinal alterada por la inflamación en células Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal) expuestas a citocinas proinflamatorias y lipopolisacáridos. Los resultados mostraron que, los polifenoles más abundantes detectados en gulupa colombiana fueron catequina, epicatequina y ácido rosmarínico con un contenido total de polifenoles de 1,62±0,09 mg AG/g de peso seco para extractos obtenidos con metanol al 70% (v/v), dicha concentración es significativamente mayor para el maracuyá (1,18 ± 0,01 mg AG/g de peso seco) y la granadilla (1,55 ± 0,00 mg AG/g de peso seco). Sin embargo, se encontró que, a las 48 h, la granadilla inhibió la disfunción de la barrera Caco-2 de manera más efectiva que la gulupa y el maracuyá a una concentración de 10 mg/dL. Por otro lado, el residuo de extracción de la gulupa fue más eficaz para inhibir la disfunción de la barrera Caco-2 que su extracto metanólico a 10 mg/dL. Adicionalmente, los autores discuten que, aunque los polifenoles mostraron efectos directos, es posible que su inestabilidad durante la digestión y su microbiota cambie el perfil de polifenoles en el intestino; por ejemplo, la microbiota intestinal cataboliza las antocianinas a ácidos fenólicos, la epicatequina se cataboliza a dihidroxifenil-γ-valerolactonas y por esto, es importante considerar la estabilidad de las antocianinas y otros compuestos fenólicos durante la digestión. Estos resultados sugieren que el consumo de pasifloras colombianas podría ser relevante para la prevención o el tratamiento de enfermedades que involucran una barrera intestinal comprometida, como obesidad, enfermedades inflamatorias del intestino, diabetes y cáncer de colon.

Extracción de compuestos bioactivos.

Los productos vegetales como las frutas son mezclas complejas de vitaminas, azúcares, proteínas, lípidos, fibras y antioxidantes, entre otros. Los extractos procedentes de estas fuentes se utilizan en gran medida como ingredientes en la industria debido a sus propiedades tecnológicas y como compuestos activos; sin embargo, en el campo de los alimentos es bien sabido que algunos compuestos son termolábiles y muy propensos a cambios químicos, físicos y microbiológicos, en

especial cuando se utilizan métodos convencionales de procesamiento que suelen consumir mucho tiempo, energía y grandes volúmenes de agua. Convencionalmente, dichos extractos se obtienen mediante un proceso de extracción sólido-líquido, que se compone de varios procesos como el pretratamiento del material vegetal y el postratamiento del extracto líquido. El postratamiento es crucial en especial cuando no se ha optimizado, ya que puede consumir bastante tiempo, energía y agua o solventes orgánicos que generan una gran cantidad de residuos y pueden contener trazas de los solventes utilizados. Debido a la necesidad de obtener procesos más ecológicos, sostenibles y económicamente viables en los últimos años ha habido una demanda creciente por nuevas técnicas "verdes e innovadoras" en el procesamiento, pasteurización y extracción, que normalmente implican menos tiempo, agua y energía (Chemat et al., 2017).

Algunas investigaciones como la realizada por Heffernan et al. 2014, se centran en la obtención de compuestos antioxidantes utilizando agua como solvente en una extracción sólido-líquido, en este caso, compararon los métodos de extracción líquida presurizada y extracción sólido-líquido, con el fin de obtener antioxidantes de cuatro especies de macroalgas irlandesas que pueden resultar útiles para el desarrollo de alimentos funcionales o ingredientes para inhibir la oxidación y deterioro de los alimentos. Los resultados mostraron que la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales fueron mayores en los extractos obtenidos por extracción sólido-líquido, en comparación con aquellos obtenidos por extracción líquida presurizada; en conclusión, dado el poco equipo requerido, a que es relativamente económico y fácil de operar, además de ser fácilmente escalable en la industria, la extracción sólido-líquido es el método más apropiado para la extracción de antioxidantes de las macroalgas estudiadas. En otro estudio realizado por Mercado-Mercado et al. 2017 evaluaron la influencia de la extracción asistida por ultrasonido en la bioaccesibilidad de los carotenoides de subproductos de mango, mediante un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*, los resultados mostraron que, la bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides aumentó en los extractos obtenidos por ultrasonido y sustentan que el ultrasonido, provocó que la estructura de los carotenoides estuviera más expuesta para su liberación gastrointestinal simulada. En el trabajo realizado por Quintero-Quiroz et al. 2019 estudiaron la extracción de polifenoles de semillas de achiote, comparando la extracción sólido-líquido convencional con la extracción sólido-líquido asistido por ultrasonido, los autores logaron

aumentar aproximadamente en 11 veces el contenido de polifenoles utilizando el ultrasonido durante la extracción, aumentando así las actividades antioxidante y antimicrobiana del extracto de semillas de achiote, concluyendo que la técnica de ultrasonido acelera el proceso de extracción de los CBs y puede reducir el gasto energético.

Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos

Muchas investigaciones se han centrado en determinar la actividad biológica de los CBs y más recientemente en explicar los mecanismos de cómo estos se metabolizan y se vuelven biodisponibles en el cuerpo humano (Grgić et al., 2020). Los carotenoides pertenecen a un grupo de fitoquímicos con funciones esenciales en la salud, ya que son precursores del retinol (vitamina A) y tienen la capacidad de actuar como antioxidantes reduciendo las especies reactivas de oxígeno (ROS), sin embargo se ha reportado que solo una baja proporción de los carotenoides que son consumidos en la dieta alcanzan a ser bioaccesibles (Castenmiller y West, 1998), por ejemplo, en el estudio realizado por Nimalaratne et al., 2015, evaluaron la bioaccesibilidad de los CBs de tres diferentes preparaciones de huevo: hervido, frito y revuelto, encontrándose que la luteína presentó valores de bioaccesibilidad del 44, 41 y 39%, respectivamente, mientras que la de zeaxantina fue del 45, 42 y 24%, respectivamente. Estos resultados pueden ser debido a que su liposolubilidad determina las etapas del proceso de liberación desde la matriz alimentaria hacia el intestino delgado, su incorporación a glóbulos lipídicos en el estómago, a la formación de micelas y a la absorción del contenido de éstas por las células intestinales (Edge R., 2010). Para los compuestos polifenólicos; su biodisponibilidad es mucho más baja, ya que sólo cerca del 10% del contenido total de polifenoles en el alimento, se puede absorber en el intestino delgado y llegar al plasma (Chiou et al., 2014), este es debido a la mala absorción, a la extensa biotransformación y a la rápida eliminación de los CBs del organismo; Así puesla bioaccesibilidad entre los diversos compuestos polifenólicos parece ser muy diferente entre ellos, y puede estar determinada por su peso molecular, su estructura básica, el grado de polimerización o glicosilación, la solubilidad y la conjugación con otros compuestos fenólicos, además de su forma de ingesta, de la matriz alimentaria, del procesamiento de los alimentos y de la interacción con otros componentes presentes en los mismos (Martin y Appel, 2009; Costea et al., 2019).

Algunos autores han logrado mejorar la bioaccesibilidad de algunos compuestos polifenólicos con ayuda de la microencapsulación, a través de diferentes técnicas tales como: encapsulación por gelación iónica, precipitación con anti-disolvente y deposición electrostática, entre otras. En el estudio realizado por Huang *et al*. 2019, evaluaron el efecto de la encapsulación sobre la bioaccesibilidad *in vitro* del resveratrol y compararon la actividad antioxidante del compuesto encapsulado y sin encapsular, para cumplir dicho objetivo obtuvieron nanopartículas de zeína y pectina cargadas con resveratrol mediante los métodos de precipitación con anti-disolvente y deposición electrostática; dichas partículas fueron sometidas a un modelo de liberación gastrointestinal simulado. La solubilidad del resveratrol encapsulado fue significativamente mayor en la fase gástrica que la del resveratrol sin encapsular y por ende, la cantidad de resveratrol liberada en la fase gástrica fue mayor para el sistema de nanopartículas (37%) que para el resveratrol libre (13,10%) y se observó una tendencia similar en la fase del intestino delgado, los resultados mostraron que la fracción de resveratrol liberada de las nanopartículas aumentó ligeramente en la fase gástrica y mucho más abruptamente en la fase del intestino delgado; en conclusión este sistema de nanopartículas desarrolladas tiene un gran potencial para la aplicación en alimentos o bebidas funcionales que ejerzan un beneficio sobre la salud. Así mismo, Vuli´cvuli´c et al., 2019, estudiaron la biodisponibilidad y bioactividad de compuestos fenólicos y carotenoides de subproductos de pimiento rojo encapsulados mediante emulsiones secadas por liofilización y por atomización, durante una digestión gastrointestinal simulada *in vitro*. La liberación de CBs se vio afectada significativamente por el pH a lo largo del proceso de digestión, presentando niveles más altos en el fluido intestinal simulado con pH 7,5, después de esta digestión las cápsulas obtenidas por liofilización y por secado por atomización presentaron porcentajes de retención de polifenoles totales del 62,12 y 56,88%, respectivamente y de carotenoides totales del 79,60 y 84,95 % respectivamente. En conclusión, las técnicas de encapsulación pueden afectar las características fisicoquímicas de los compuestos bioactivos y por tanto, la calidad de los encapsulados obtenidos. El uso de CBs encapsulados, en lugar de compuestos libres, puede contribuir a solucionar las dificultades presentadas anteriormente. Además, la adición de estas microcápsulas a diferentes matrices alimentarias, como bebidas, productos de panificación o cárnicos, entre otros, puede transformar un alimento común en un alimento funcional, es por esto, que, en los últimos años,

muchas investigaciones se han enfocado en el desarrollo de varios sistemas de encapsulación de CBs con el fin de protegerlos de influencias ambientales y de las condiciones adversas del sistema gastrointestinal con el objetivo de mejorar su bioaccesibilidad. Algunos autores como Flores *et al.* en 2015 encapsularon un extracto de arándanos (rico en compuestos fenólicos) con proteína de suero de leche, logrando observar una capacidad antioxidante mayor en el extracto encapsulado en comparación con el extracto libre, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la liberación de los compuestos polifenólicos durante la digestión *in vitro.* Así mismo, Fredes et al., 2018 evaluaron la estabilidad y la bioaccesibilidad de los polifenoles y antocianinas de micropartículas de jugo de maqui; obtenidas mediante la técnica de secado por aspersión con inulina y alginato de sodio como agentes encapsulantes, y lograron observar que ambos agentes encapsulantes mejoraron la bioaccesibilidad en un 10% sin diferencias significativas entre sí.

Encapsulación por gelación iónica de compuestos bioactivos

La encapsulación permite integrar CBs en productos alimenticios al incluirlos en materiales de recubrimiento como biopolímeros, polisacáridos y proteínas. La funcionalidad del sistema encapsulado está determinada por su composición y estructura. Por ejemplo, las partículas de hidrogel obtenidas mediante gelación iónica consisten en una red tridimensional de biopolímeros que puede retener grandes cantidades de agua, aceite o aire. Esta última, es un proceso químico que ocurre cuando dos polímeros o un polímero y un ion multivalente con cargas opuestas interactúan entre sí. La unión de estos iones a la cadena del polímero provoca un reordenamiento estructural, creando un sistema coloidal en el que la fase continua es sólida y la dispersa es líquida, lo que da como resultado la formación del gel y, eventualmente, la partícula. La estabilidad del gel, así como su capacidad de retención y liberación, depende de varios factores, incluidos el tamaño y la morfología de los poros y las partículas y del material de recubrimiento. Estos parámetros se pueden ajustar modificando la naturaleza del biopolímero, su formulación, su concentración y el grado de reticulación (González et al., 2015, Pasin et al., 2012, Benavides et al., 2016, Blanco-Morales et al., 2024). Estudios como el realizado por Rasool y Fahmy en 2013, desarrollaron partículas de alginato y quitosano mediante gelación iónica convencional, con

diferentes recubrimientos para la liberación controlada del cefaclor, un antibiótico con baja vida media en sangre. La formulación que presentó la mejor liberación sostenida en el tiempo era aquella cubierta con goma laca al 15 % (m/v) Además, se evidenció que tanto la formulación con diferentes materiales de pared como la técnica empleada para obtener microcápsulas pueden contribuir a mejorar y optimizar la entrega de compuestos de interés a nivel intestinal. En este sentido, en el trabajo realizado por Morales et al., en 2017 se evaluó la digestión in vitro de cápsulas de aceite de girasol obtenidas mediante gelación iónica, utilizando como material encapsulante alginato de calcio y goma laca. Los resultados mostraron que, tras la digestión gástrica, solo hubo un decrecimiento del contenido inicial de aceite en las cápsulas del 4,66%, mientras que en la fase intestinal se cuantificó un 47,9% de decrecimiento en la concentración inicial. Concluyeron que esta mezcla puede ser utilizada para el desarrollo de sistemas de entrega a nivel intestinal de compuestos lipofílicos, como los carotenoides. Asimismo, se observó que el hinchamiento de la partícula de alginato y la liberación de aceite incrementan a pH básico. Igualmente, en el trabajo realizado por Belscak-Cvitanovic et al., en 2016 se encapsuló un extracto de diente de león, rico en polifenoles y β-caroteno, utilizando como materiales de pared alginato de sodio, pectina, proteína de suero de leche y hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Los resultados del estudio demostraron que las mezclas binarias de alginato de sodio con proteínas de suero o HPMC presentan un perfil de liberación intestinal más prolongado. Teniendo en cuenta lo anterior, se evidencia que mediante el uso de mezclas de diferentes materiales es posible mejorar la eficiencia del proceso de encapsulación (EE). Teniendo en cuenta lo anterior, se evidencia que mediante el uso de mezclas de diferentes materiales es posible mejorar la eficiencia del proceso de encapsulación (EE) (Grgić et al., 2020) y la bioaccesibilidad de los CBs. Del mismo modo, en el trabajo realizado por Tan et al., 2017 se encapsularon tocotrienoles mediante gelación iónica, utilizando la formación de una emulsión Pickering con quitosano-alginato, con el objetivo de investigar los efectos del estrés ambiental y la digestión in vitro, sobre el perfil de liberación de los tocotrienoles y su estabilidad térmica durante la pasteurización. Encontraron un descenso en la liberación de tocotrienoles cuando el pH está por debajo de 7, siendo la liberación mínima observada a pH 1; esto indica que el complejo alginato-quitosano resiste las condiciones de pH extremo de la digestión gástrica. Adicionalmente, se observó que la liberación de tocotrienoles es mayor cuando las microcápsulas se someten a pH más básico (pH = 9). En conclusión, la pared de

quitosano-alginato de las microcápsulas protege a los tocotrienoles contra los estímulos externos, especialmente ante las altas temperaturas del tratamiento térmico y los bajos pH del fluido gástrico. De esta manera, se logra liberar una cantidad constante de tocotrienoles en la fase intestinal posterior (a pH 6,8). Estos resultados sugieren que las microcápsulas de quitosano-alginato podrían utilizarse como una herramienta efectiva para la administración de tocotrienoles, los cuales tendrían una mayor probabilidad de ser absorbidos en el sistema sanguíneo, confiriendo así beneficios significativos para la salud humana.

A pesar de las múltiples ventajas presentadas en la encapsulación por gelación iónica con diferentes materiales de pared, el tamaño de partícula obtenido en condiciones normales es demasiado grande para algunas aplicaciones (en promedio de 2 a 3 mm de diámetro), debido a que la tensión superficial de la solución polimérica es un factor limitante a la hora de generar gotas pequeñas que den como resultados cápsulas con un tamaño de partícula más pequeño y una mayor área superficial de contacto (Mehregan Nikoo et al., 2018, Partovinia y Vatankhah, 2019), El tamaño de partícula es uno de los factores más importantes en el desarrollo de sistemas de encapsulación, ya que puede influir en la bioaccesibilidad y estabilidad del CB, así como en la textura y el sabor final de los productos alimentario. En este sentido, la disminución del tamaño de partícula incrementa el área superficial, lo que puede acelerar el proceso de digestión al aumentar la tasa de reacciones químicas interfaciales, mejorando así la bioaccesibilidad, Adicionalmente, la forma de las partículas también puede afectar la solubilidad, siendo las partículas no simétricas generalmente más solubles que las simétricas (Blanco-Morales et al., 2024). Es por esto que, se han planteado alternativas para disminuir el tamaño de partícula, como el uso de la electropulverización, que consiste en utilización de un campo eléctrico a través del cual se atomiza atomizar una polimérica, durante el proceso, las gotas se deforman y se rompen en partículas más pequeñas, en la gelación iónica, estas gotas caen en una solución gelificante, donde se convierten en partículas de hidrogel. En el trabajo realizado por Loznjak et al. 2020, encapsularon folato mediante electropulverización utilizando una combinación de carbohidratos, como materiales de recubrimiento. El proceso se realizó a temperatura ambiente y con una humedad relativa entre el 26-50%, las soluciones de biopolímero se extruyeron a través de una jeringa, el campo electrostático fue creado mediante una fuente de alto voltaje conectado a la punta de la jeringa y a

una placa colectora de acero inoxidable de 15 × 15 cm, de manera horizontal con una distancia de 15 cm y se probaron diferentes caudales y voltajes en los rangos de 0,001–0,007 ml / min y 16–20 kV respectivamente; en dicho proceso encontraron que, la capacidad de electropulverización de las soluciones probadas estuvo controlada principalmente por la concentración y el peso molecular de los biopolímeros utilizados, la adición de Tween-20 mejoró la productividad y redujo la tensión superficial de la solución de biopolímero, lo que implica el uso de voltajes más bajos y un proceso de electropulverización más estable, adicionalmente demostraron que un caudal reducido (0,006 ml/min) y el voltaje aumentado (20 kV) permitió un proceso estable y sin goteos, manteniendo una alta productividad, es este proceso se logró un tamaño de partícula de hasta 0,55±0,34 μm. Por otra parte, en el trabajo realizado por Nikoo et al. 2018 desarrollaron micropartículas de alginato de calcio electropulverizadas para encapsular cafeína como un modelo de molécula de estructura pequeña, las partículas se recubrieron con quitosano para reforzar la estructura del hidrogel y se evaluaron la resistencia a las condiciones gastrointestinales y la velocidad de liberación de la cafeína. La técnica de electropulverización permitió reducir el tamaño de partícula de 2740 ± 115 μm hasta 765,29 ± 14,53 μm y el refuerzo de la cápsulas con quitosano aumentó la eficiencia de encapsulación desde 37,51% hasta 64,28%, lo que significa que una cantidad significativa de cafeína es liberada en el proceso de la gelación a través de la matriz tridimensional del gel, adicionalmente, se demostró que el quitosano mejoró significativamente la retención de cafeína dentro de las partículas, al controlar la tasa de hinchamiento, en el mismo sentido, en los experimentos de liberación en un modelo gastrointestinal, la tasa más alta de liberación se observó en las partículas de alginato de calcio no recubiertas con quitosano. En conclusión, las micropartículas de alginato de calcio electropulverizadas y recubiertas con quitosano, tienen un gran potencial para la liberación controlada de una amplia gama de CBs debido a su tamaño ajustable y comportamiento de liberación prolongada o sostenida. Así mismo, Azad et al. 2020 encapsularon aceite de neguilla en alginato de calcio mediante la técnica de gelación iónica asistida por electropulverización para lograr menores tamaños de partícula, con el objetivo de desarrollar un sistema de liberación controlada de fármacos a nivel intestinal. Los autores evaluaron el comportamiento de hinchamiento de las partículas en fluidos gástrico e intestinal simulados. Como resultados, las partículas mostraron una liberación significativamente mayor en la fase intestinal, liberándose menos del 5% de aceite de neguilla en la fase gástrica y más del 90% en la fase

intestinal a las dos horas, demostrando así que dichas partículas eran sensibles al cambio de pH del medio de liberación con un gran potencial para liberar controladamente compuestos bioactivos a nivel intestinal.

4. Justificación

La pandemia de las ECNT pone en riesgo el avance hacia la consecución de los ODS, y aunque afecta a todos los países, en particular a la población de edad avanzada, los datos muestran una notable tendencia de muertes prematuras en países de ingresos bajos y medios. Los países con ingresos bajos suelen contar con una capacidad limitada para prevenir y controlar las ECNT, lo que sugiere que es poco probable que puedan implementar efectivamente intervenciones contra estas enfermedades y avanzar en el cumplimiento de los ODS. Es por esto que las intervenciones de gran impacto son aquellas con énfasis en prevención y detección temprana de las ECNT; los factores de riesgo modificables como la dieta y la actividad física, que se relacionan con la obesidad y la inflamación crónica, son factores de vital importancia a la hora de abordar el tema de la prevención de las ECNT (Siddiqi, 2010). Es así, como el consumo de alimentos ricos CBs como las frutas ayuda a la prevención de ECNT como el cáncer en el tracto digestivo (Grosso et al., 2017). No obstante, se estima que, en promedio se consume solo alrededor de dos tercios de las cantidades mínimas recomendadas de frutas y verduras. Algunos de los factores que influyen en este bajo consumo son: la disponibilidad, la educación y cultura, la asequibilidad, la falta de conocimiento, las políticas nacionales de algunos gobiernos y finalmente la competencia con otras alternativas menos saludables (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 2020). Al mismo tiempo, el bajo consumo de alimentos ricos en CBs se ha asociado a una reducción de los niveles plasmáticos de carotenoides (Couillard et al., 2016), que a su vez está asociado con factores de riesgo para la mortalidad por ECNT (Shardell et al., 2011). En el mismo sentido, una dieta rica en polifenoles ha demostrado tener potencial inmunorregulador y antiinflamatorio (Schoen et al., 2009).

Colombia, con su clima tropical y biodiversidad, es hogar de una gran variedad de frutas ricas en CBs. En el departamento de Antioquia se cultivan 19 especies de frutas, principalmente en la

región del oriente antioqueño (Plan Frutícola Nacional, Desarrollo de Fruticultura En Antioquia., 2006). Entre estas frutas destacan la uchuva (*Physalis peruviana L.)* y la gulupa (*Passiflora edulis f. edulis Sims*). El género Passiflora, que incluye alrededor de 500 especies, es especialmente notable en Colombia, que alberga la mayor diversidad de este género con 170 especies. En general, las frutas exóticas colombianas son de alta demanda en los mercados, lo que hace que el sector agrícola sea pilar del desarrollo económico del país (Gabriel Antonio Mosquera Romero., 2020). Sin embargo, para aprovechar al máximo el potencial del desarrollo agrícola, es crucial abordar problemas como la falta de infraestructura, baja competitividad y productividad. Con el fin de aportar al desarrollo de la agricultura en Colombia, el PECTIA 2017-2027, definió algunos objetivos estratégicos, en temas de seguridad alimentaria; específicamente el siguiente: "mejorar la calidad e inocuidad de los productos alimenticios agropecuarios y agroindustriales", (Colciencias et al., 2017) que, alineado con los ODS y con la crisis desatada por la pandemia de COVID-19, puso en evidencia que la producción nacional de alimentos no solo es indispensables para lograr la seguridad y soberanía alimentaria, sino también para mejorar la calidad de vida de los pequeños agricultores (Cadavid Castro et al., 2020). La ciencia, la tecnología y la innovación son necesarias en todas las etapas de la cadena de suministro de frutas, las nuevas tecnologías permiten aprovechar y dar valor agregado a las frutas producidas en el país.

A pesar de los beneficios que ha demostrado tener el consumo de CBs como carotenoides y polifenoles provenientes de frutas en la salud humana, su baja bioaccesibilidad puede limitar su eficacia en la prevención de las ECNT. Para abordar este problema, la encapsulación por gelación iónica para la obtención de partículas de hidrogel con extractos obtenidos del procesamiento de frutas exóticas colombianas como la uchuva y gulupa, es una alternativa que permite el diseño de productos con procesos innovadores e incluso alimentos funcionales procedentes de la agroindustria colombiana. De la misma forma, el desarrollo de estas partículas podría mejorar la bioaccesibilidad de los CBs de los frutos en fresco. Con el desarrollo de este trabajo se quiso optimizar el proceso de encapsulación mediante la técnica de gelación iónica asistida por electropulverización, una técnica emergente muy prometedora con varias ventajas en comparación con otros métodos de encapsulación, como su bajo costo, el no uso de solventes orgánicos ni de altas temperaturas, la baja toxicidad, su interior acuoso y estructura porosa. Además, permite

encapsular una mezcla de frutas en partículas de hidrogel con un tamaño de partícula reducido, y mejorar la bioaccesibilidad de los CBs encapsulados, aumentando su solubilidad en los fluidos gastrointestinales, promoviendo su absorción y reduciendo su metabolismo antes de la absorción. Para que éstos puedan ejercer efectos benéficos sobre la salud humana y la prevención del desarrollo de ECNT como el cáncer en el tracto digestivo, aportando así, al avance científico en el área, la salud de los consumidores, al desarrollo productivo nacional, al aprovechamiento de la Biodiversidad del país, al crecimiento de la economía de la región y a la consecución de los ODS que tiene que ver con hambre cero , salud y bienestar, y trabajo decente y crecimiento económico (ODS 2,3 y 8 respectivamente).

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Diseñar un ingrediente activo microencapsulado, mediante la técnica de gelación iónica asistida por electropulverización, a partir de extractos de frutas colombianas (uchuva y gulupa) como estrategia para incrementar la bioaccesibilidad *in vitro* de sus compuestos bioactivos.

5.2 Objetivos específicos

- ✓ Obtener un extracto estandarizado a partir de los frutos de uchuva y gulupa con alto poder antioxidante
- ✓ Optimizar el proceso de microencapsulación del extracto estandarizado obtenido por la técnica de gelación iónica asistida por electropulverización.
- ✓ Evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos bioactivos del extracto estandarizado libre y microencapsulado.

6. Hipótesis

El proceso de microencapsulación mediante la técnica de gelación iónica asistida electropulverización de los extractos de uchuva y gulupa puede mejorar la bioaccesibilidad de los compuestos biológicamente activos presentes en dichas frutas

7. Marco teórico

Estrés oxidativo y ECNT.

El estrés oxidativo se produce debido a que la generación de ROS supera las defensas antioxidantes endógenas, estas especies son un subproducto del metabolismo del cuerpo humano y algunas de las vías oxidativas donde mayormente se producen son: la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, los sistemas enzimáticos de NADPH oxidasa y xantina oxidasa, las citoquinas y sistemas de señalización, sin embargo desempeñan un papel crucial en la defensa contra infecciones, en la regulación de las vías de señalización celular y en las respuestas inflamatorias e inmunológicas. (Mejia et al., 2020). La inflamación crónica, es el proceso mediante el cual el sistema inmunológico reconoce y elimina los estímulos dañinos, también se conoce como una inflamación lenta y prolongada que dura períodos de varios meses o años (Fleit, 2014). El estrés oxidativo y la inflamación están asociados al desarrollo de muchas ECNT como el cáncer gastrointestinal a través de la inducción de daños en múltiples moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ADN, llevando a la pérdida de la función o incluso la muerte celular (Hozawa et al., 2007). En general, la obesidad y la mala alimentación están estrechamente relacionadas con estas enfermedades; ya que juegan un rol muy importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina que desencadena las comorbilidades asociadas del síndrome metabólico, como aterosclerosis, dislipidemia, hipertensión, estado protrombótico e hiperglucemia. Como consecuencia de la obesidad y la inflamación existe la sobreexpresión de las citoquinas proinflamatorias, interluquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF-α). Los niveles altos de estas citoquinas están asociados a bajos niveles de óxido nítrico y al incremento de ROS, dicho estado conduce a disfunción endotelial y microvascular, y a su vez, un aumento sérico de niveles de IL-6 que estimula al hígado a sintetizar y secretar la proteína C reactiva como marcador inflamatorio sistémico (Ellulu et al., 2015). Los compuestos antioxidantes que se consumen en la dieta pueden neutralizar radicales libres, ROS y RNS, mejorar el desequilibrio hemostático entre estos y las defensas antioxidantes endógenas. Algunos CBs como los carotenoides poseen una actividad antioxidante ampliamente reportada ya que son potentes captadores físicos y químicos del oxígeno singlete ($^*O_2$), así como potentes eliminadores de ROS (Fiedor y Burda, 2014); otros, como los polifenoles, ejercen una actividad antioxidante a través de dos vías, la primera como captadores de radicales para prevenir el daño celular producido por ROS, donde el hidrógeno fenólico del grupo orto-dihidroxi o catecol en el anillo B de los flavonoides se transfiere a radicales alquil-peroxi, formando una quinona como un compuesto estable, y la segunda forma, como moléculas que previenen la generación de ROS (Costea et al., 2019). Probablemente, las propiedades antioxidantes de los CBs presentes en la uchuva y la gulupa pueden lograr reducir la proteína C reactiva circulante, el TNF-α y IL-6.

Frutas exóticas colombianas

La demanda de frutas exóticas en los mercados nacionales e internacionales crece continuamente, Colombia como un país agrícola, rico en biodiversidad, recursos naturales y tierras fértiles, es el noveno proveedor de frutas exóticas en el mundo, con 433 especies nativas de frutas comestibles identificadas (OECD, 2015; ColCapital y AGROFUTURO., 2016). Frutas como la uchuva y la gulupa son ampliamente consumidas en nuestro país y tiene una importante participación en la exportación de frutas.

Uchuva (Physalis peruviana l)

Es un arbusto herbáceo semi-erguido y perenne que produce un grupo de tallos ramificado perteneciente a la familia *Solanaceae* y al género *Physalis*. Es originario de los andes suramericanos, pero se adapta a una amplia gama de altitudes, suelos y condiciones climáticas. Su fruto es comúnmente conocido en Colombia como uchuva y en Perú como aguaymanto. Además, es ampliamente reconocida por sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y medicinales (Mejia et al., 2020; Kasali et al., 2021) debido a que es una fuente importante de polifenoles, provitamina A (α-caroteno, β-caroteno, β-criptoxantina), vitamina C, E, K1 y complejo vitamínico B (Fischer G., Ebert G., 2009).

Gulupa (Passiflora edulis f. edulis sims)

Es una especie tropical perteneciente a la familia *Passifloraceae*, originaria de Brasil (Alméciga y Herrera 2008; Fonseca-Trujillo et al., 2009, Porto-Figueira et al., 2015). Es tolerante al frio y se reproduce bien en elevaciones entre 600 y 2000 msnm, en Colombia crece en las regiones Andina, Pacífica y Amazónica entre 1100 y 2750 msnma (Xu et al., 2016). Es conocida como gulupa en Cundinamarca y como curuba redonda en Antioquia, Caldas, Risaralda y Quindío. (Ángel-Coca et al., 2011) El género *Passiflora* L. produce frutos comestibles que se les denominan, frutas de la pasión, siendo la *Passiflora edulis Sims* la especie más importante; el maracuyá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa Degener)* y la gulupa (*Passiflora edulis* Sims f. edulis) son las dos variedades pertenecientes a esta especie. En general los frutos del género *Pasiflora* son ricos

en minerales (calcio y fósforo) y vitaminas, especialmente A y C, tiamina, riboflavina y niacina; también son una buena fuente de carotenoides, antocianinas y alcaloides (Shanmugam et al., 2018).

Los CBs presentes en estas frutas, como los carotenoides y polifenoles, han demostrado tener numerosos beneficios para la salud humana, incluyendo actividades, antiinflamatorias y anticancerígenas y una reconocida actividad antioxidantes expresada como la inhibición de la oxidación mediada por ROS o como equivalentes de un antioxidante de referencia, como trolox, ácido ascórbico u otros compuestos, esta actividad antioxidante de los CBs puedes darse por dos mecanismo principales basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), y los basados en la transferencia de un electrón (SET) por sus siglas en inglés, el mecanismo que predomina en un sistema determinado depende de las características del antioxidante, como su estructura, solubilidad, coeficiente de partición y el tipo de disolvente utilizado (Shahidi & Zhong, 2015). Sin embargo, a pesar de estos beneficios potenciales, la bioaccesibilidad de estos compuestos es a menudo limitada, lo que puede afectar su eficacia en la prevención del estrés oxidativo y las ECNT. Adicionalmente, el procesamiento y almacenamiento de frutas pueden afectar la integridad de estos compuestos. La exposición a condiciones adversas, como altas temperaturas y oxidación, puede degradar los CBS, reduciendo su eficacia y disponibilidad.

Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos presentes en frutas

La bioaccesibilidad es el factor clave del que depende la bioactividad de los CBs en el cuerpo humano, además, la bioactividad de los CBs, determinada en condiciones *in vitro*, puede diferir significativamente de la bioactividad determinada en condiciones *in vivo.* Esta diferencia se atribuye a la baja bioaccesibilidad de los CBs; esta última se refiere a la cantidad de un compuesto que se libera desde una matriz alimentaria o farmacéutica en el tracto gastrointestinal, para su absorción (Rein et al., 2013). La interacción de la sustancia de interés con otros nutrientes o con los principales factores necesarios para el proceso de digestión, como el pH, las enzimas digestivas, la microbiota intestinal o sales biliares, son de vital importancia a la hora de poder determinar dicha bioaccesibilidad (Grgić et al., 20201, Castenmiller y West, 1998; Martin y Appel, 2009). Para comprender la respuesta fisiológica a los CBs, es necesario analizar con mayor detalle los

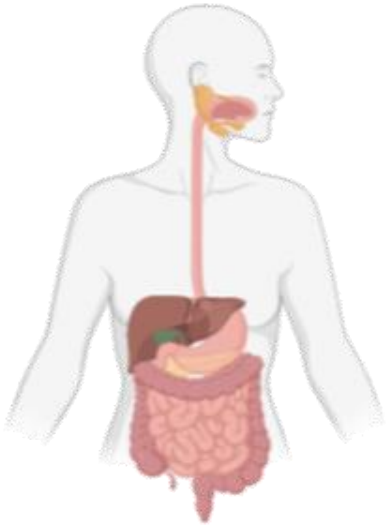
complejos procesos digestivos dentro del tracto gastrointestinal humano, para ello existen diferentes modelos que tienen como objetivo simular las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal superior, incluyendo las fases oral, gástrica e intestinal; el método INFOGEST, es un método estáticos ampliamente reportado, estandarizado y caracterizado por concentraciones de sal, niveles de pH, actividades enzimáticas y diluciones adaptadas para la vía oral, gástrica e intestinal (Brodkorb et al., 2019). El proceso de digestión por el método de INFOGEST se divide en tres fases: preparación, digestión y análisis de muestras (Figura 1). La fase de preparación es crucial, ya que requiere la determinación precisa de la actividad enzimática y las concentraciones de sales biliares. La fase de la digestión *in vitro* se divide en tres fases: oral, gástrica e intestinal. En la fase oral, la muestra se diluye con fluido salival simulado. En la fase gástrica, se añade fluido gástrico simulado y enzimas a pH 3.0, y se incuba durante 2 horas. Luego, en la fase intestinal, se diluye con fluido intestinal simulado, sales biliares y enzimas pancreáticas a pH 7 durante otras 2 horas. Las condiciones experimentales se basan en datos fisiológicos Esta metodología nos permite recolectar las fracciones bioaccesibles (FBs) de los alimentos en cuestión en la fase de muestreo, con el fin de poder realizar ensayos con estas FBs fuera del tracto gastrointestinal.

Figura 1. *Diagrama de flujo del método de digestión INFOGEST, muestra las etapas de la digestión in vitro para alimentos*



Soluciones Stock

i. Fluido salival (α-amilasa) (FSS)
ii. Fluido gástrico (pepsina) (FGS)
iii. Fluido intestinal (sales biliares y pancreatina) (FIS)

	Fase Oral i. 5 g de muestra ii. FSS hasta completar 10 ml iii. Incubación a 185 rpm por 2 min a 37°C. Fase Gástrica i. FGS hasta 20 ml ii. Incubación a 13 rpm por 2h a 37 °C. Fase Intestinal i. FIS hasta 40 ml ii. Incubación a 45 rpm por 2h a 37°C
	Muestreo i. Filtración ii. Congelación

Nota. El método incluye el uso de fluido salival simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS). Adaptado de Brodkorb et al., 2019 y creado en www.biorender.com

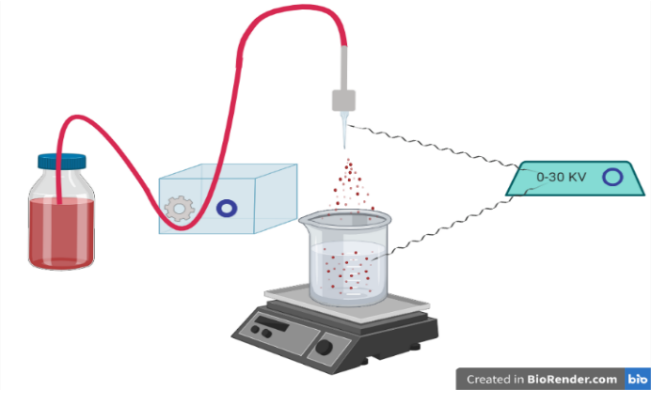
La bioaccesibilidad de los CBs presentes en frutas es una gran variable que se debe conocer para lograr aprovechar las diversas actividades biológicas de estos y que estas logren ejercer el efecto deseado para la salud. Investigar la interacción entre la digestión de los alimentos y la actividad de sus CBs *in vitro* es de vital importancia, para evaluar mecánicamente el destino y la efectividad de los mismos (Kondrashina et al., 2023). Con el fin de abordar, el desafío de la estabilidad de los CBs en el tracto gastrointestinal que permitan mejora su bioaccesibilidad, se han desarrollado diversas estrategias, como la encapsulación de CBs. Sin embargo, optimizar estas técnicas sigue siendo un área activa de investigación. Mejorar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos no solo puede aumentar su efectividad en la promoción de la salud, sino que también puede contribuir al desarrollo de alimentos funcionales y a la maximización de los beneficios de las frutas en la dieta humana.

Gelación iónica asistida por electropulverización

La encapsulación es una técnica que implica rodear uno o más compuestos (fase central o interna) con materiales protectores (materiales de pared o portadores) para resguardarlos de factores ambientales adversos. Las diversas técnicas de encapsulación, que emplean diferentes materiales de pared y tecnologías, han demostrado ser muy efectivas para mejorar la estabilidad y la bioaccesibilidad de los CBs (Blanco-Morales et al., 2024). Aunque existen diferentes metodologías para la obtención de partículas con CBs una de las más prometedoras es la gelación iónica externa cuyo ejemplo más claro se logra utilizando alginato de calcio como material encapsulante. Las cápsulas de alginato de calcio se utilizan ampliamente para la inmovilización celular, el suministro de células completas, fármacos y enzimas en diferentes campos biomédicos y biotecnológicos, incluida la ingeniería de tejidos, la formulación de alimentos probióticos, fermentación, biorremediación y aplicaciones agrícolas. Su amplio espectro de aplicación se puede atribuir a la sencillez del proceso, al bajo costo, a la buena estabilidad mecánica (Partovinia y Vatankhah, 2019); a la alta biocompatibilidad y la baja toxicidad (Mehregan Nikoo et al., 2018). A diferencia de otras técnicas, la gelación iónica no requiere del uso de altas temperaturas ni de disolventes orgánicos que puedan afectar la estabilidad de nutrientes sensibles e impedir su aplicación en alimentos debido a problemas de toxicidad. Otras ventajas incluyen su interior acuoso, distribución uniforme de los CBs en toda la matriz, fácil manipulación y escalabilidad industrial, lo que la convierte en una técnica prometedora que además cumple con los estándares ecológicos de la industria verde (González et al., 2015; Massounga Bora et al., 2018; Nikoo et al., 2018). El proceso de gelación iónica consiste en la interacción entre dos polímeros o entre un polímero y un ion multivalente con cargas opuestas; la unión del ion con la cadena polimérica produce un reordenamiento estructural en el espacio, dando como resultado un sistema coloidal donde la fase continua es sólida y la fase dispersa es líquida, denominado gel, que finalmente origina la cápsula (Benavides et al., 2016; Pasin et al., 2012; González et al., 2015). A pesar de las numerosas ventajas de esta técnica, el tamaño de partícula obtenido en condiciones normales puede ser demasiado grande para algunas aplicaciones, llegando incluso a 2 o 3 mm de diámetro. La tensión superficial de la solución polimérica es un factor limitante en la generación de gotas pequeñas, lo que impide la producción de cápsulas con un tamaño de partícula reducido y una

mayor área superficial. Reducir el tamaño de las partículas es crucial para mejorar la transferencia de masa a través de la cápsula en el medio (Mehregan Nikoo et al., 2018; Partovinia y Vatankhah, 2019). La gelación iónica asistida por electropulverización logra reducir el tamaño de partícula, mediante la atomización de una solución líquida o polimérica a través de un campo eléctrico. En este proceso, una gota de una solución polimérica que es extruida a través de la punta de una boquilla, sufre una deformación cónica (conocida como cono de Taylor), que debido a repulsiones electrostáticas internas y fuerzas de Coulomb de atracción externas, se rompe en gotas mucho más finas (Mehregan Nikoo et al., 2018), que para el caso del proceso de gelación iónica, las gotas que están compuestas por una solución polimérica y un compuesto de interés a encapsular, caen a la solución gelificante donde finalmente ocurre el proceso de gelificación formando así las partículas de hidrogel (Figura 2) (Loznjak et al., 2020).

Figura 2. *Esquematización del prototipo de electropulverización, utilizando gelación iónica externa*



Nota: creado en www. Biorender.com

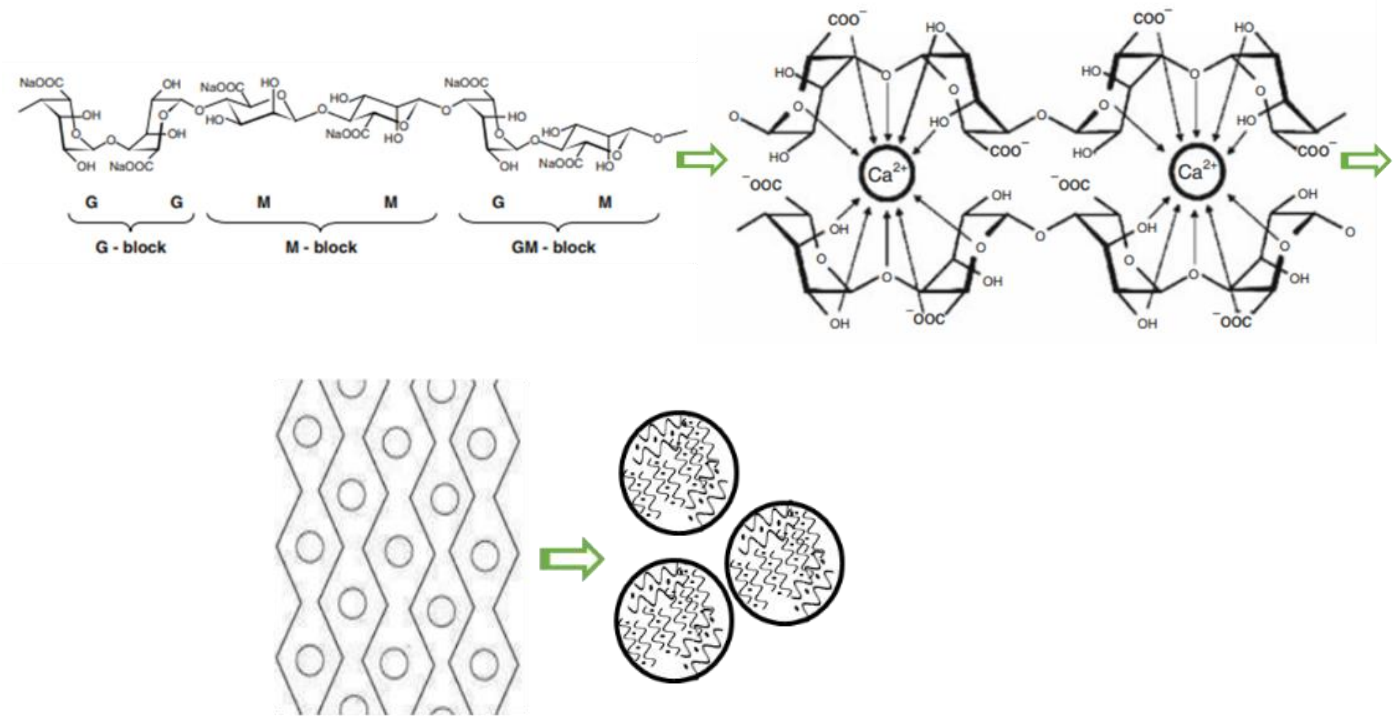
Por lo descrito anteriormente, los polímeros que son más utilizados en procesos de gelación iónica, son aquellos que son capaces de formar geles al interactuar con iones en soluciones acuosas, como los son: las pectinas presentes en diferentes de frutas y forman geles en presencia de iones de calcio o en condiciones ácidas, y los polímeros iónicos cono el quitosano y el alginato de sodio capaces de formar geles en presencia de iones con carga opuestas (Sun et al., 2019; Carrasco-Sandoval et al., 2021). Estos son seleccionados por sus propiedades específicas, como la biocompatibilidad, la capacidad de formar geles a temperaturas y condiciones diversas, y la facilidad para ser manipulados en procesos de encapsulación. Adicionalmente, algunos polímeros

como la goma arábiga (Li et al., 2017) y la hidroxipropilmetilcelulosa (Gayatri et al., 2021) son utilizadas para reforzar las propiedades mecánicas de los hidrogeles obtenidos por gelación iónica

Alginato de sodio

El alginato de sodio (AS) es un biopolímero aniónico que se extrae de algas marrones, está compuesto por dos estructuras monoméricas: el ácido 1-4βD-manurónico (M) y el ácido α-L-gulurónico (G). Los iones de calcio inducen un efecto cooperativo entre bloques G y bloque M del alginato de sodio en solución para formar una red 3D que se conoce como "caja de huevo" (Figura 3). Las cadenas del alginato se disponen en forma paralela y simétrica, formando cavidades cargadas negativamente en donde encaja el catión dando lugar a hidrogeles de alginato de calcio (Paoletti, 2009; Aguirre Calvo, 2013)).

Figura 3. *Esquematización del proceso de gelación iónica entre el alginato de sodio y el ion polivalente Ca2+*



Nota: adaptado de (Paoletti, 2009; Aguirre Calvo, 2013))

Estos hidrogeles presentan excelentes propiedades mucoadhesivas y posee un comportamiento dependiente del pH, debido a su naturaleza aniónica y a la presencia de grupos carboxilo cargados negativamente a pH> 5; el biopolímero se contrae en el pH ácido y se hincha y absorbe agua cuando se expone a pH neutro o básico (Agarwal et al., 2015). Dadas estas características, las partículas de alginato de calcio presenta varias ventajas a la hora de proteger los CBs en el sistema gastrointestinal, evitando la pérdida de estos compuestos en la fase gástrica y liberándolos en mayor proporción en la fase intestinal donde son absorbidos normalmente los carotenoides y los polifenoles; sin embargo, las cápsulas de alginato de calcio no retienen de forma eficaz compuestos de estructuras pequeñas debido a su red de poros abiertos que por lo general conducen a una liberación en ráfaga inicial en medios acuosos; por lo cual se hace necesario retrasar la velocidad de difusión de tales compuestos revistiendo o reforzando su estructura con un material secundario para propósitos de administración controlada.

Goma arábiga

La goma arábiga (GA) es un polisacárido complejo derivado del exudado natural del árbol Acacia Senegal, tiene una estructura compleja que aún no se comprende completamente, sin embargo, se conoce que sus tres fracciones principales son el péptido arabinogalactano que comprende entre el 85 y el 90% de la GA, la proteína arabinogalactano con aproximadamente 10% y la glicoproteína con aproximadamente 2%. Estas tres fracciones tienen un elipsoide en forma de disco, bloques de carbohidratos altamente ramificados unidos a una cadena polipeptídica y una mezcla de estructuras de glicoproteínas en forma de anillo esferoidal. Presenta varias ventajas para ser utilizada en los procesos de encapsulación de productos alimenticios, ya que biocompatible, biodegradable, altamente hidrosoluble, posee una baja viscosidad en comparación con otras gomas diluidas gracias a su estructura compacta (Restrepo, 2016), tiene una gran estabilidad a diferentes pH, y es capaz de formar geles (Nayak et al., 2012), además puede formar una película protectora y es conveniente para usar con otros materiales (Sabet et al., 2021).

Hidroxipropilmetilcelulosa

La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) es un polímero aniónico derivado de la celulosa con grupos hidroxipropoxilo y metoxilo. Los grupos metoxilo constituyen entre el 16,5 y el 30% y grupos hidroxipropoxilo entre el 4 y el 32%, los cuales determinan sus características fisicoquímicas. Es comúnmente utilizado en la industria alimentaria como agente espesante, emulsionante y estabilizante con bajas propiedades de sabor y aroma, alta solubilidad en agua. Para los procesos de encapsulación, presenta con buenas propiedades de barrera, es estable en el rango de pH de 3,0 a 11,0 que permiten reducir la tasa de permeabilidad al agua en un matriz polimérica y mejorar sus propiedades mecánicas (Andueza et al., 2000; Song et al., 2021; Aydogdu et al., 2018).

8. Metodología

8.1. *Materiales*

El SA, NaCl, KCl, HCl, KH2PO4, NaHCO3, MgCl2(H2O)6, (NH4)2CO3, CaCl2(H2O)2, el reactivo de Folin–Ciocalteu, el ácido gálico, α-amilasa de cerdo, extracto biliar (EE.UU.), pepsina de páncreas porcino (Dinamarca) y pancreatina de páncreas porcino, FeCl2, TPTZ, acetato de sodio, carbonato de sodio (Na2CO3), ácido acético, ácido fórmico, β-caroteno estándar secundario, metanol grado HPLC, tetrahidrofurano grado HPLC, acetonitrilo grado HPLC y Trolox fueron adquiridos de Sigma Aldrich, EE.UU. El diclorofluoresceína diacetato (DCFDA), 2,2-Azobis(2-metilpropionamidin) dihidrocloruro (AAPH), 3, (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT), Fluo 3-AM, sal sódica de fluoresceína, 5-fluorouracilo (5-FU), yoduro de propidio (PI), ribonucleasa A (RNasa A) y dimetilsulfóxido (DMSO) fueron adquiridos de Merck LifeScience S.L.U. (Madrid, España). El 5-Clorometilfluoresceína diacetato (Green CMFDA) fue adquirido de Abcam (Cambridge, Reino Unido). El D-MEM + GlutaMAXTM (4.5 g/L glucosa), solución de aminoácidos no esenciales de MEM (MEM NEAA) (100×), solución tampón HEPES (1 M), solución antibiótica (10,000 U/mL de penicilina y 10,000 µg/mL de estreptomicina), solución antimicótica (250 µg/mL de anfotericina B), suero fetal bovino (FBS), PBS pH 7.4 (1×) y solución de tripsina-EDTA (2.5 g/L de tripsina y 0.2 g/L de EDTA) fueron adquiridos de Gibco™ (Escocia, Reino Unido). El kit de detección de apoptosis FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I fue adquirido de BD Biosciences (San José, CA, EE.UU.). El agua desionizada se obtuvo utilizando un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore™, Bedford, MA, EE.UU.).

8.2.Selección de las frutas

Los frutos de uchuva y gulupa fueron comprados en la plaza de mercado de los municipios de la Ceja y Rionegro, donde son vendidas las frutas que no son destinada a exportación por los productores locales. Se seleccionaron los frutos categoría II para ambas frutas; de acuerdo con la NTC 4580:1999 (Frutas Frescas. Uchuva. Especificaciones NTC 4580:1999, 1999) para la uchuva y a la NTC 6456:2020 (Frutas Frescas. Gulupa. Especificaciones NTC 6456:2020, 2020) para el

caso de la gulupa. Posteriormente fueron clasificados según su índice de madurez siguiendo los parámetros de color (Figuras 4 y 5), acidez titulable y grados °Brix (Tabla 1).

Figura 4. *Tabla de color para frutos de uchuva durante 6 estados de maduración, desde totalmente verde (0) hasta sobre maduro (6).*

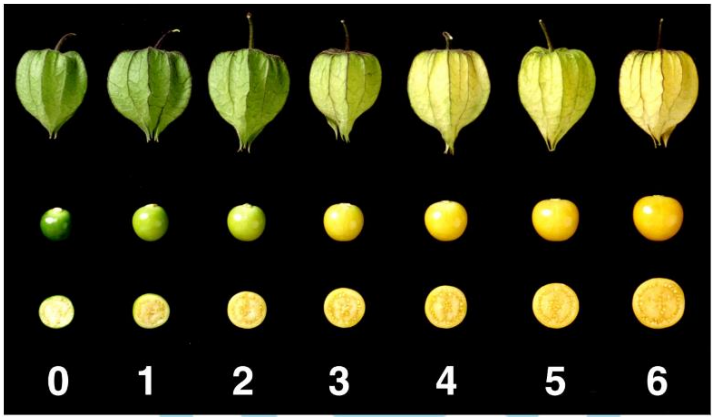


Figura 5. Tabla de color para frutos de gulupa durante 6 estados de maduración, desde totalmente verde (0) hasta sobre maduro (6).



Tabla 1. *Estado de madurez de las frutas para la uchuva y la gulupa*

	Uchuva			**Gulupa**		
Color	° Brix	% ácido cítrico (máx)	Índice de madurez (mín)	° Brix	% ácido cítrico (máx)	Índice de madurez (mín)
0	9,4	2,69	3,5	11,89	5,73	2,08
1	11,4	2,70	4,2	13,79	5,14	2,68
2	13,2	2,56	5,2	15,17	4,99	3,04
3	14,1	2,34	6,0	15,90	4,65	3,42
4	14,5	2,03	7,1	15,92	3,97	4,01
5	14,8	1,83	8,1	16,21	3,92	4,14
6	15,1	1,68	9	16,14	3,72	4,34

Nota.

Acidez Titulable

La acidez titulable de ambas frutas se realizó mediante titulación potenciométrica, la pulpa de fruta fue tamizada con el fin de separar las semillas y la piel, posteriormente, se tomaron 10 ml de esta y se llevó a un balón volumétrico de 100 ml aforando con agua destilada, esta solución fue titulada con NaOH al 0,1022 N según el método potenciométrico descrito en la NTC 4623 , se adicionó rápidamente NaOH a través de una bureta sobre la solución de fruta hasta un pH de 7±0,2

y posteriormente se goteo hasta un pH de 8,1±0,2, de acuerdo al volumen utilizado de NaOH se calculó el porcentaje de acidez en términos de ácido crítico de acuerdo a la ecuación 1.

$$\%\ de\ acidez = \frac{V * N * K}{V_1} * 100\ (EC.1)$$

V: ml del NaOH que se gastaron en la titulación

N: Normalidad del NaOH

K: peso equivalente del ácido cítrico (0,064 g/meq)

V_1: Volumen de la muestra

Grados ° Brix

La cuantificación de ° Brix en ambas frutas se le realizó a la fruta ya tamizada sin piel y sin semillas a 20 °C según la norma técnica colombiana NTC 4624 (NTC 4624. JUGOS DE FRUTAS Y HORTALIZAS. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS SOLUBLES. MÉTODO REFRACTOMÉTRICO, 1999). Se adicionó una gota de pulpa de fruta sobre el vidrio inferior del refractómetro donde se tomó la medida.

Índice de madurez

El índice de madurez de las frutas se calculó de acuerdo con la ecuación 2.

$$Índice\ de\ madurez = \frac{°Brix}{\%\ acidez\ titulable} Ec.2$$

8.3. Obtención y caracterización de los extractos de las frutas

Las frutas fueron lavadas y desinfectadas en inmersión con hipoclorito a 100 ppm por 20 min, la gulupa fue despulpada manualmente dadas sus características físicas, mientras que la uchuva fue procesada sin capacho. Las pulpas fueron escaldadas en agua a 78 °C durante 5 min, con el fin de inactivar térmicamente las enzimas, tales como la polifenoloxidasa y la peroxidasa, que catalizan los procesos de degradación una vez la fruta es sometida a trituración (Chutintrasri y Noomhorm,

2006; Kamble et al., 2021), las cuales en presencia de oxígeno transforman los polifenoles de las frutas en benzoquinonas (Ciou et al., 2011).

Obtención del extracto de gulupa

La pulpa escaldada de gulupa se procesó en un extractor de prensa en frío a 60 rpm a temperatura ambiente, a los residuos se les añadió agua a 60 °C en proporción 1:5, para una segunda extracción. Las dos fases extraídas se mezclaron y se ajustaron a 7° Brix, para evitar la caramelización durante el proceso de liofilización. El extracto liofilizado se almacenó en oscuridad a -20°C hasta su uso final.

Obtención del extracto de uchuva

Los frutos escaldados se procesaron en un extractor de prensa en fría a 60 rpm a temperatura ambiente, a los residuos se les añadió agua a 60 °C (en proporción 1:5) para una segunda extracción asistida por ultrasonido, según la metodología descrita por Civan y Kumcuoglu, 2019 con algunas modificaciones, utilizando un baño de ultrasonido con una amplitud del 60% durante 5 min, y nuevamente el extractor de prensa fría. Las dos fases extraídas se mezclaron, se ajustaron a 7° Brix y se llevaron a secado por liofilización. El extracto liofilizado se almacenó en oscuridad a -20°C hasta su uso final.

Caracterización fisicoquímica de los extractos

Los extractos liofilizados fueron caracterizados fisicoquímicamente según las metodologías oficiales de la AOAC (proteína, grasa, cenizas y humedad) (Olvera et al., 1993) descritas a continuación:

Proteína

Se realizó por el método de la AOAC en un equipo Kjeldahl. A 1g de muestra, en un matraz Kjeldahl, se le agregaron 10g de sulfato de potasio, 0,7g de óxido de mercurio y 20 ml de ácido sulfúrico; el matraz se colocó en un digestor en un ángulo inclinado y se llevó a ebullición hasta que la solución se veía clara y se dejó en ebullición por media hora más; posteriormente se dejó enfriar y se agregó 90 ml de agua destilada; se agregaron 25 ml de solución de sulfato de sodio y 80 ml de una solución de hidróxido de sodio al 40%. Este matraz se conectó a la unidad de destilación y se recolectaron 50 ml del destilado, los cuales se titularon con una solución estándar de ácido clorhídrico. La proteína cruda fue calculada con las ecuaciones 3 y 4.

$$(\%)\text{Nitrógeno} = \left\{\frac{Acido\ clorhídrico\ \ (ml) * Normalidad\ del\ ácido\ estándar}{Peso\ de\ la\ muestra} * 0{,}014\right\} * 100\ \ Ec.3$$

$$(\%)\text{Proteína cruda} = (\%)\text{Nitrógeno} * 6{,}25\ \ EC.4$$

Grasa total

Se realizó por el método de la AOAC en un equipo de extracción Soxhlet. Se pesaron los balones del equipo de Soxhlet y se adicionaron 250 ml de éter de petróleo, por otra parte, se pesaron entre 3 y 5 g de muestra seca en el filtro de extracción del equipo y se colocaron en la unidad de extracción. Se conectó la unidad de extracción con el balón y se llevó a ebullición durante 6 h para hacer reflujo constante. Finalmente, el éter de petróleo del balón se evaporó, una vez el balón estuvo frío y libre de solvente fue pesado nuevamente. La grasa total se calculó con la ecuación 5:

$$(\%)Grasa\ total = \frac{Peso\ del\ balón\ 2 - Peso\ del\ balón\ 1}{Peso\ de\ la\ muestra} * 100\ \ Ec.5$$

Cenizas totales

En un crisol de porcelana tarado se pesaron entre 2,5 a 5g de muestra seca, este crisol se llevó a una mufla a 550°C por 12 h, se dejó enfriar y se pesó nuevamente. El contenido de cenizas totales se calculó con la ecuación 6:

$$(\%)Cenizas = \frac{Peso\ del\ crisol\ con\ la\ muestra - Peso\ del\ crisol\ con\ la\ ceniza}{Peso\ de\ la\ muestra} * 100\ Ec.6$$

Humedad

Este análisis fue realizado en una balanza halógena de humedad, alrededor de 2 g fueron cargados en la balanza tarada, se cerró y se dejó por el tiempo requerido por la balanza. La balanza arrojó el porcentaje masa a masa de humedad de la muestra.

8.4.Identificación de los CBs presentes en la uchuva y la gulupa por HPLC-MS.

Identificación de carotenoides

Se realizó con la metodología descrita por Etzbach et al. 2018 Se pesaron entre 0,5-1,5 g de extracto liofilizado y se mezclaron con 5 ml de agua mili-Q, los carotenoides de esta mezcla fueron extraídos con 20 ml de hexano/acetona/etanol (50:25:25, v/v/v) y BHT al 0,1%, esta mezcla se sometió a agitación en un Vortex (Heidolph) durante 1 min y luego se centrifugó a 35000 g durante 5 min, este procedimiento se repitió dos veces, las fases orgánicas se mezclaron y secaron en speed-vac (eppendorf- Vacufuge plus) para luego ser re-suspendidos en 2 ml metanol/metil tert-butil éter (50:50, v/v) con 0,1% BHT, finalmente fueron filtradas a través de una membrana de 0,22 µm y finalmente inyectado en el equipo de HPLC- MS UltiMate 3000 (ThermoScinetific) y para la detección se utilizó un detector de arreglo de diodos (DAD)., se utilizó una columna Accucore™ C30 (2,6 µm, 150 × 2,1 mm) (Thermo Scientific) en dos fases móviles, la fase (A) fue metanol/metil tert-butil-éter/agua (85/5/10, v/v/v) enriquecida con 5 mmol/l de formato de amonio, y la fase (B) fue metanol/metil tert-butil-éter/agua (11/85/4, v/ v/v) enriquecido con 5 mmol/l de formato de amonio , en gradiente de elución. Los picos obtenidos se compararon con bases de datos para identificar los CBs.

Identificación de polifenoles

Esta identificación se realizó con la metodología descrita por Shanmugam et al. 2018**.** Se pesaron 2 g de extracto liofilizado y se mezclaron con 15 ml de etanol al 70% (extracción), esta mezcla se dejó en baño de ultrasonido a 35°C por 30 min, posteriormente se centrifugó a 5000g y se secó en un speed-vac (eppendorf- Vacufuge plus), finalmente se re-suspendió en metanol grado HPLC a una concentración de 50mg/ml y se filtró por una membrana de 0,22µm. Luego, 2 µL del filtrado fueron inyectados en el equipo de HPLC- MS UltiMate 3000 (ThermoScinetific) y para la detección se utilizó un detector de arreglo de diodos (DAD). Se utilizó una columna C-18 5 µm, 150 × 4,6 mm) (SiliaChrom) y como fases móviles se utilizó (A): ácido fórmico (0,1% v/v) y (B): acetonitrilo (B) con un flujo de 0,2 ml/min a 40 °C, en gradiente de elución. Los picos obtenidos se compararon con bases de datos para identificar los CBs.

8.5. Cuantificación de los CBs y la actividad antioxidante

Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales fue cuantificado espectrofotométricamente de acuerdo con la metodología de descrita por Nun1es et al. 2018. En un microplato de 96 pozos, se adicionaron 30µL de muestra, 150µL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 0,2 N (1:10) y 120µL de Na2CO3 al 7,5%; posteriormente se dejaron reaccionando en oscuridad por 15 min a 45 °C y por 30min más a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 765nm en un espectrómetro UV-Vis Multiskan (ThermoScientific). El contenido de polifenoles totales se determinó por medio de una curva estándar de ácido gálico 0-110 µM/ml Las mediciones se realizaron al menos 5 veces

Carotenoides totales mediante HPLC-DAD

La extracción de lo los carotenoides de las muestras se pesaron entre 0,5-1,5 g de muestra y se mezclaron con agua mili-Q, hexano/acetona/etanol (50:25:25, v/v/v) y BHT al 0,1%, las fase orgánica secó en speed-vac (eppendorf- Vacufuge plus), a partir de estas muestras secas se pesaron entre 15-20 mg aprox. de cada muestra y disolvieron en 1 ml de metanol:tetrahidrofurano (50:50

(v/v)), las muestras se filtraron por un poror de 0,45 µm y se empaquetaron en viales cromatográficos. La detección y cuantificación del β-caroteno como carotenoide principal de las muestras. Para la separación, se utilizó una columna C30 (2,6 µm, 150 × 2,1 mm) (ThermoScientific) a una temperatura de 20,0 °C. Se utilizó como fase móvil un gradiente compuesto por metanol, tetrahidrofurano grado HPLC y agua ultrapura con un caudal de 0,5 ml/min. Se inyectaron 10 µL en un cromatógrafo UltiMate 3000 HPLC/UHPLC (ThermoFísher, Alemania) y para la detección se utilizó un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 454 nm. En la curva de calibración para la cuantificación de β-caroteno, se preparó una solución madre de 990 ppm usando metanol:tetrahidrofurano (50:50 (v/v)) como disolvente. Posteriormente se realizaron diluciones entre 247,5 y 3,90 ppm para la curva de calibración (Etzbach et al., 2018).

Evaluación de la capacidad de las muestras para reducir el hierro férrico (FRAP)

Esta evaluación fue cuantificada espectrofotométricamente de acuerdo con la metodología reportada por Nuñes et al. 2018. En un microplato de 96 pozos, se adicionaron 35µl de muestra y 265µl de reactivo FRAP (buffer acetato 0,3 M: TPTZ 10 mM: Cloruro férrico 20 mM (10:1:1)); posteriormente las muestras se dejaron reaccionando durante 30min a 37°C y en oscuridad. Finalmente se leyó la absorbancia en un espectrómetro UV-Vis Multiskan (ThermoScientific) a una longitud de onda de 595nm. La actividad antioxidante se determinó por medio de una curva estándar de Trolox entre 0-500 µM ($r^2 = 1$). Las mediciones se realizaron al menos 5 veces.

Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical $ABTS^+$

La capacidad de las muestras para atrapar el radical libre $ABTS^+$ fue cuantificada espectrofotométricamente de acuerdo con la metodología reportada por Lim et al., 2019. En un microplato de 96 pozos, se adicionaron 10µl de muestra y 190µl del radical $ABTS^+$ (ABTS 14 mM - Persulfato de Potasio 4,8 mM (1:1) diluido en agua hasta una absorbancia de 0,7±0,02 a 740 nm), posteriormente se dejó reaccionando durante 6min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se leyó la absorbancia en un espectrómetro UV-Vis Multiskan (ThermoScientific) a

una longitud de onda 740 nm. La actividad antioxidante se determinó por medio de una curva estándar de Trolox entre 0-500 µM (r^2 = 0,9943). Las mediciones se realizaron al menos 5 veces.

Determinación de la capacidad de las muestras para atrapar el radical libre DPPH (2,2'-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

La capacidad de las muestras para atrapar el radical libre DPPH fue cuantificada espectrofotométricamente de acuerdo con la metodología reportada por Peng et al., 2019 con algunas modificaciones. En un microplato de 96 pozos, se adicionaron 100µl de muestra y 100 µl de reactivo de DPPH diluido en etanol a 200µM, posteriormente se dejó reaccionando a temperatura ambiente durante 30min. Finalmente se leyó la absorbancia en un espectrómetro UV-Vis Multiskan (ThermoScientific) a una longitud de onda de 520nm. La actividad antioxidante se determinó por medio de una curva estándar de Trolox entre 0-500 µM (Prieto, 2012; Nun1es et al., 2018). Las mediciones se realizaron al menos 5 veces.

Inhibición de la peroxidación lipídica de la yema de huevo (TBARS)

La capacidad de las muestras para inhibir la peroxidación lipídica fue cuantificada espectrofotométricamente de acuerdo con la metodología reportada Viuda-Martos et al., 2012, con algunas modificaciones. Para ello se mezclaron 200µL de muestra, 1ml de una emulsión de yema de huevo en tampón fosfato (0,1 M pH 7,4 (25g/L)) y 100 µL de sulfato de hierro (Fe^{2+} 1 mM) y se dejó a 37°C durante 1h. Posteriormente, a esta mezcla se le añadió 1ml de ácido tricloroacético al 15% (p/v) y 0,5ml del ácido tiobarbitúrico (0,02M), se incubaron a 90°C durante 45 min. Pasado este tiempo, los tubos se enfriaron en baño de hielo y se centrifugaron a 4440g durante 10min. y se leyó la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 532 nm La actividad antioxidante se determinó por medio de una curva estándar de Malondialdehido (0-100 µM). Las mediciones se realizaron al menos 3 veces. (Zeb y Ullah, 2016; Daker et al., 2008; Viuda-Martos et al., 2012; Rojano et al., 2008).

Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno ORAC:

La capacidad antioxidante por ORAC fue cuantificada de acuerdo con la metodología reportada Cilla et al., 2011. En un microplato opaco de 96 pozos se adicionaron, 80 µL de muestra,

80 µL de fluoresceína (14,66 ppm) y 40 µL de 2,2′-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro (AAPH) (120 mg/ml). Se dejó en reacción a 37°C en el Wallac 1420 VICTOR2 Multilabel Counter por 180min, y cada 5min se tomó el valor de fluorescencia a λex = 485 nm y λem =535 nm. La actividad antioxidante se determinó utilizando una solución estándar de Trolox a 20µM, de acuerdo con la ecuación 7. Todas las mediciones se realizaron al menos 5 veces.

$$ORAC\ (\mu M_{Trolox}) = 20 * K * \frac{(S_{muestra} - S_{blanco})}{(S_{Trolox} - S_{blanco})} \text{ Ec. 7}$$

Dónde: *K* es el factor de dilución y $S = \left(0{,}5 + \frac{F_5}{F_0} + \frac{F_{10}}{F_0} + \frac{F_{15}}{F_0} + \cdots \frac{F_{180}}{F_0}\right) * 5$ Ec. 8

Dónde: $F_i\ es\ la\ fluorescencia\ en\ el\ minuto\ i$

8.6. Diseño de las partículas de hidrogel con la mezcla de frutas

Diseño de la mezcla de frutas

Este diseño fue realizado para obtener una mezcla del extracto de uchuva y gulupa con la máxima capacidad antioxidante. Para tal fin, se aplicó un diseño de mezcla reticular Simplex con dos componentes: extracto de uchuva (0-1) y extracto de gulupa (0-1) utilizando el software estadístico STATGRAPGICS 19 ®; las variables respuestas fueron: actividade antioxidante de las unidades experimentadas (medidas por ABTS, DPPH, FRAP y TBARS) y el contenido total de polifenoles, como se describió en el punto 5,5. El diseño experimental arrojó un total de nueve mezclas con diferentes proporciones (Tabla 2).

Tabla 2. *Diseño experimental de mezcla para optimizar la mezcla de frutas*

Unidad experimental	**Uchuva (0–1)**	**Gulupa (0–1)**

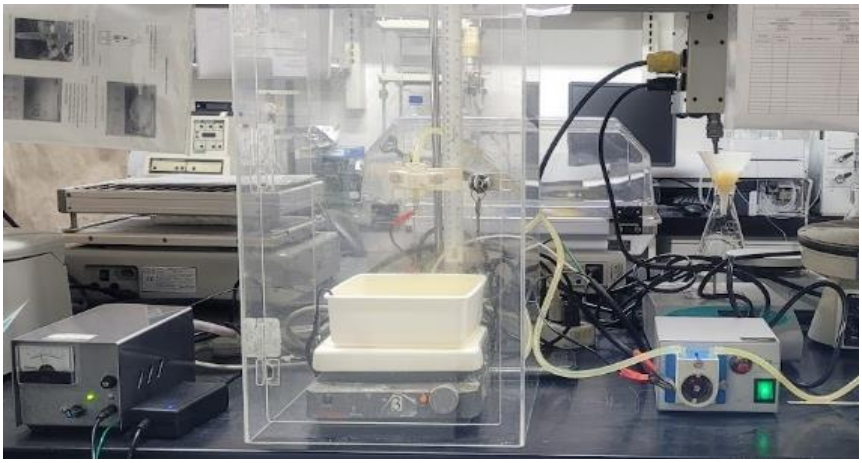
1	0,50	0,50
2	0,25	0,75
3	0,75	0,25
4	0,00	1,00
5	0,50	0,50
6	1,00	0,00
7	1,00	0,00
8	0,50	0,50
9	0,00	1,00

Nota. El diseño experimental se realzo con los extractos liofilizados de las frutas

Optimización del proceso de gelación iónica asistida por electropulverización

Un equipo prototipo de gelación iónica asistida por electropulverización (Figura 6) fue diseñado con una fuente de alto voltaje (0- 30.000 V), con una plancha de agitación, con una bomba peristáltica (Velp SP 311/2), con una cabina acrílica y con una regla. Las condiciones del proceso a controlar en el equipo son: el voltaje, la velocidad de agitación, el caudal y la altura entre la aguja y la solución gelificante. La fuente de alto voltaje fue conectada a dos polos: aguja calibre 12, alimentada por la solución encapsulante (alginato de sodio y colorante naranja) a través de una bomba peristáltica, y una solución gelificante de cloruro de calcio (CaCl2) al 0,03% (Naranjo-Durán et al., 2021).

Figura 6. *Prototipo de electropulverizador*



Diseño experimental

Para definir las condiciones óptimas de operación del proceso de gelación iónica asistida por electropulverización con alginato de sodio al 1% (w/v) mezclado con un colorante como modelo, se utilizó un diseño experimental central compuesto de superficie de respuesta utilizando el software estadístico STATGRAPGICS 19® con el fin de evaluar el efecto de los factores: voltaje (10-25kV); caudal (11,08-27,2 ml/min) y altura (15-25cm); sobre las variables respuesta: rendimiento del proceso (RP) (%), tamaño de partícula (TP) (μm), esfericidad (E) y razón de aspecto (RA). Las unidades experimentales del diseño se muestran en la Tabla 3. El RP se cuantificó por gravimetría (ecuación 9), los parámetros TP, E y RA se obtuvieron mediante análisis de imágenes digitales utilizando un microscopio estereoscópico (OLYMPUS SZ-PT) y una cámara digital, para lo cual se seleccionaron aproximadamente 12 partículas al azar en cada imagen para medirles el área proyectada y el diámetro de Feret utilizando el software libre ImageJ® (ecuaciones 10, 11 y 12) (Londoño y Rojas, 2017).

$$RP = \frac{m_f - (m_f * humedad(\%))}{m_i} * 100 \quad \text{Ec. 9}$$

$$TP = 2 * \sqrt{área} * \pi \quad \text{Ec. 10}$$

$$E = \frac{4 * área}{\pi * feret^2} \quad \text{Ec. 11}$$

$$RA = \frac{ancho}{largo} \quad \text{Ec. 12}$$

Tabla 3. *Diseño experimental de superficie de respuesta para la optimización del proceso de gelificación iónica mediante atomización por electropulverización*

Unidad experimental	Caudal (ml/min)	Altura (cm)	Voltaje (kV)	Unidad experimental	Caudal (ml/min)	Altura (cm)	Voltaje (kV)
1	18,70	20,00	17,50	**24**	18,70	20,00	17,50
2	27,20	15,00	25,00	**25**	27,20	15,00	25,00
3	18,70	20,00	17,50	**26**	18,70	20,00	17,50
4	11,10	15,00	25,00	**27**	11,10	15,00	25,00
5	27,20	15,00	10,00	**28**	27,20	15,00	10,00
6	4,30	20,00	17,50	**29**	4,33	20,00	17,50
7	11,10	15,00	10,00	**30**	11,10	15,00	10,00
8	11,10	25,00	25,00	**31**	11,10	25,00	25,00
9	18,70	20,00	17,50	**32**	18,70	20,00	17,50
10	18,70	20,00	17,50	**33**	18,70	20,00	17,50
11	18,70	20,00	17,50	**34**	18,70	20,00	17,50
12	32,40	20,00	17,50	**35**	32,40	20,00	17,50
13	18,70	20,00	17,50	**36**	18,70	20,00	17,50
14	18,70	28,40	17,50	**37**	18,70	28,40	17,50
15	18,70	11,50	17,50	**38**	18,70	11,60	17,50
16	18,70	20,00	30,10	**39**	18,70	20,00	30,10
17	11,10	25,00	10,00	**40**	11,10	25,00	10,00
18	18,70	20,00	17,50	**41**	18,70	20,00	17,50
19	18,70	20,00	17,50	**42**	18,70	20,00	17,50
20	27,20	25,00	25,00	**43**	27,20	25,00	25,00
21	18,70	20,00	4,90	**44**	18,70	20,00	4,90
22	27,20	25,00	10,00	**45**	27,20	25,00	10,00
23	18,70	20,00	17,50	**46**	18,70	20,00	17,50

Nota. El diseño experimental se realizó solo con alginato de sodio al 1% y un colorante alimentario.

Formulación del material de pared de las partículas de hidrogel

Se utilizó un diseño experimental de mezclas reticular Simplex utilizando STATGRAPGICS 19® con tres componentes (AS (0,5-1), HPMC (0-0,5) y GA (0-0,5)) y siete variables respuesta: 1. bioaccesibilidad de polifenoles, 2. bioaccesibilidad de carotenoides, 3. eficiencia de encapsulación (EE) de los polifenoles, 4. actividad antioxidante retenida en la fracción bioaccesible (BF) por ABTS, 5. actividad antioxidante retenida en la fracción bioaccesible (BF) por FRAP, 6. tamaño de partícula (TP) y 7. Esfericidad (E). El diseño experimental arrojó un total de 12 formulaciones con diferentes proporciones descritas en la Tabla 4. Para evitar la precipitación del AS, debido a su pKa = 3,65, el proceso se realizó a un pH de 4,5.

Tabla 4. *Diseño de mezcla reticular simplex para la formulación de partículas de hidrogel.*

Unidad experimental	Alginato de sodio	Hidroxipropil-metilcelulosa	Goma arábiga
1	0,50	0,50	0,00
2	0,50	0,00	0,50
3	0,50	0,25	0,25
4	0,58	0,08	0,33
5	0,83	0,08	0,08
6	1,00	0,00	0,00
7	0,75	0,25	0,00
8	0,75	0,00	0,25
9	0,58	0,33	0,08
10	0,67	0,17	0,17
11	1,00	0,00	0,00
12	0,75	0,25	0,00

Nota. El diseño experimental se realizó con la mezcla de uchuva-gulupa en relación 0,83:0.17 con una concentración de solidos del 6%

Bioaccesibilidad de los CBs de las partículas de hidrogel:

La bioaccesibilidad de los CB_S se cuantificó mediante la liberación gastrointestinal simulada *in vitro* aplicando la metodología INFOGEST (Minekus et al., 2014; Brodkorb et al., 2019): 5g de muestra, 4 ml de fluido salival simulado (FSS), 0,5ml de α- amilasa de páncreas porcino, 25µL de $CaCl_2$ (0,3M) y 475 µL de agua para obtener 10 mL de solución final, esta mezcla se dejó en incubación a 185rpm durante 2min a 37°C (fase oral). Luego se agregaron a la mezcla anterior 8ml de fluido gástrico simulado (FGS), 5µL de $CaCl_2$ (0,3M), 0,5 ml of pepsina de páncreas porcino, 0,1 ml de HCl hasta pH 3 y finalmente 1395 µL de agua para alcanzar 20 ml de solución final, la mezcla anterior se dejó en incubación a 13rpm durante 2h a 37°C (fase gástrica). Finalmente, se agregaron a la mezcla anterior 8,5ml de fluido intestinal simulado (FIS),40 µL de $CaCl_2$ (0,3M), 0,2 ml de NaOH hasta pH 7; 5ml de pancreatina de páncreas porcino, 2,5 ml de sales biliares y 3,76 ml de agua para alcanzar 40 ml de solución final, esta fase se dejó en incubación a 45 rpm durante 2h a 37°C (fase intestinal). Luego las muestras se centrifugaron dos veces a 5000rpm y la fracción bioaccesible (FB) (sobrenadante) se congeló para detener la actividad enzimática hasta su análisis. Se cuantificó el contenido de polifenoles y carotenoides tanto en la FB como en las partículas de hidrogel y

+la bioaccesibilidad se calculó con la ecuación 13 de acuerdo con Fredes et al., 2018

$$(\%)Bioaccesibilidad = \frac{CBs\ en\ la\ FB}{CBs\ en\ las\ partículas\ de\ hidrogel} * 100\ \ Ec.13$$

Eficiencia de encapsulación y carga

300mg de partículas fueron disueltas en citrato de sodio al 2% (v/v), y fue cuantificado el contenido de polifenoles totales como se describe en el numeral 5,5. La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó como el porcentaje de polifenoles encapsulado con respecto a la cantidad de polifenoles utilizado para obtener las partículas (Piornos et al., 2017). La EE y la carga se calcularon con las ecuaciones 14 y 15, respectivamente.

$$(\%)EE = \frac{ma-mb}{ma} * 100 \; Ec.14$$

Dónde, m_a y m_b corresponden a la cantidad inicial de polifenoles y la cantidad no encapsulada de estos, respectivamente.

$$Carga = \frac{mg\ de\ CB\ en\ las\ pariculas\ de\ hidrogel}{g\ de\ partículas\ de\ hidrogel} * 100 \; Ec.15$$

Morfología de las partículas de hidrogel

La morfología de las partículas de hidrogel se observó utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM, Joel 6490LV, Peabody, MA, EE. UU.) a un voltaje acelerado de 20 kV. Las partículas se fijaron a soportes de muestras de aluminio y se redujo la temperatura a -10 °C. Los descriptores de forma se obtuvieron mediante análisis de imágenes digitales utilizando un microscopio estereoscópico (OLYMPUS SZ-PT) y una cámara digital. Se seleccionaron aproximadamente 12 partículas al azar en cada imagen y su área proyectada y el diámetro de Feret se calcularon utilizando el software libre ImageJ®. El tamaño de partícula y la esfericidad se calcularon con las ecuaciones 10 y 11 siguiendo la metodología reportada por Londoño y Rojas, 2017 (Londoño y Rojas, 2017) y descritas anteriormente.

Optimización de los diseños experimentales

Los modelos obtenidos en los diseños experimentales fueron optimizados para determinar los niveles de los factores que maximicen o minimicen las variables respuestas estudiadas. La metodología de optimización que se utilizó fue la función de deseabilidad desarrollada por Derringer et al., 1980, cuyo principio consiste en transformar la variable respuesta $j_{ésima}$ a una escala de valores denominada valor deseable y sus valores estarán entre 0 y 1. La función depende de las condiciones del proceso y ésta se puede maximizar o minimizar de acuerdo con la respuesta deseada. las optimizaciones de los diseños experimentales fueron realizadas con el software STATGRAPGICS 19®

8.7. Actividad anti-proliferativa en células de carcinoma colorrectal humano

Líneas celulares y condiciones de cultivo: las células Caco-2 de cáncer de colon humano (European Collection of Cell Cultures, ECACC 86010202, Salisbury, UK) se utilizaron entre los pases 8-14 y se cultivaron en frascos de 75cm^2 (Corning™ Falcon™) con medio DMEM que contenía: 4,5g/L de glucosa, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 1% (v/v) de buffer HEPES, 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina y 0,1 % v/v fungizona con un pH entre 2 y 7,4. Todos los reactivos fueron adquiridos en Gibcoâ, Invitrogen, Carlsbad, EE. UU. Las células se mantuvieron a 37ºC en una incubadora con una atmósfera de 5% de CO_2/95 % de humedad relativa (A. Cilla et al., 2010). Para evitar cualquier efecto de citotoxicidad por el proceso de digestión, tanto las FB de las muestras como la FB del blanco de digestión se diluyeron con D-MEM (1:15v/v) (concentración seleccionada entre las concentraciones, 1:10, 1:20 1:30 1:50 previamente probadas) y se filtraron por un poro de 0,45µm para todos los experimentos.

Citotoxicidad celular por MTT

Para la línea caco-2 como modelo celular tumoral se sembraron 7,1x10^4 células/cm^2 en un microplato de 96 pozos y se dejaron adherir por 24h para luego ser tratadas. Para el caso del modelo no tumoral, se sembraron 4,2x10^4 células/cm^2 y cada 48h se cambió el medio DMEM hasta el día número 10 para que las células caco-2 se diferenciaran (López-García et al., 2020). Ambos modelos celulares fueron tratados con 200µl de las FBs de las muestras y del blanco de digestión durante 24 h. Paralelamente se procesaron células sin tratamiento que se sometieron a los mismos cambios de medio. El ensayo de citotoxicidad que se realizó, se basa en la formación de cristales purpuras de formazán (en células activas) desde la sal de tetrazolio amarillo (MTT), el tratamiento fue retirado por aspiración de las células, se adicionaron 100 µl de solución de MTT y se incubaron por 4 h, a 37°C, a 95% de humedad relativa y a 5% (v/v) CO_2, pasado este tiempo se aspiró la solución de MTT y los cristales de formazán se solubilizaron con 100 µl DMSO para medir la absorbancia en un espectrofotómetro (lector de microplacas Synergy H1, BioTek, Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) (570 nm y 690 nm). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad en comparación con el control celular. Todas las mediciones se realizaron al menos 5 veces en dos ensayos diferentes (Miedes et al., 2023).

Apoptosis

El ensayo de anexina V/IP se realizó en un microplato de 24 pozos, en el que se sembraron 5,2 x10^4 células/cm^2 y se dejaron adherir durante 24h, pasado este tiempo se aspiró el medio y se adicionaron 1000 µL de tratamiento por 24h. Se utilizó 5-fluorouracilo (5-flu) como control positivo. Para la detección de apoptosis, se utilizó un Kit de anexina V que utiliza anexina V conjugada con isotiocianto de fluoresceína (FITC) para marcar los sitios de fosfatidilserina en la superficie de la membrana que representa un evento apoptótico, y yoduro de propidio (IP) para marcar el ADN celular en células necróticas donde la membrana celular ha sido totalmente comprometida; esta combinación permite la diferenciación entre células viables (anexina y IP negativas), células apoptóticas tempranas (anexina V positiva, PI negativa), células apoptóticas tardías (anexina y IP positivas) y células necróticas (anexina V positiva, PI positiva). Las células marcadas con anexina V y/o IP se midieron mediante análisis de citometría de flujo (FACS Verse; BD Biosciences). Se analizaron al menos 10.000 eventos para cada muestra y las mediciones se realizaron por triplicado en dos días diferentes (Miedes et al., 2023).

Progresión del ciclo celular

La identificación de los diferentes estados del ciclo celular se realizó en un microplato de 24 pozos en el que se sembraron 5,2 x10^4 células/cm^2 y se dejaron adherir durante 24 h, pasado este tiempo se aspiró el medio y se adicionaron 1000µL de tratamiento por 24 h. Se utilizó 5-flu como control positivo. Pasadas las 24h, las células se incubaron en una solución de etanol:PBS 70:30 (v/v) y luego con una mezcla de RNasa A a 40µg/ml y de IP a 100µg/ml, por 30min, a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% (v/v) CO_2. El IP se une al ADN para diferenciar entre células con una cantidad normal de ADN (fase G0/G1) y células con el doble de cantidad de ADN (fase G2/M). La fase S es en el intermedio de estas y las células apoptóticas, cuyo contenido de ADN es menor, es fase sub G1. La fluorescencia se evaluó con citometría de flujo (FACS Verse; BD Biosciences). Se analizaron al menos 10,000 eventos para cada muestra y las mediciones se realizaron por triplicado en dos días diferentes (Miedes et al., 2023).

Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

En un microplato de 24 pozos se sembraron 5,2x10^4 células/cm^2 y se dejaron adherir por 24 h. Se utilizó 5-flu como control positivo. El contenido de ROS se realizó con diacetato de

diclorofluoresceína (DCFDA), que se oxida por las ROS, produciendo fluorescencia. Las células se suspendieron con DCFDA en un tubo de citometría a una concentración final de 1µM y se incubaron en oscuridad por 30min a 37 °C y 5% CO_2/95% humedad relativa, y se centrifugaron a 450g por 5min. El pellet celular fue resuspendido en 300µL de PBS y analizado mediante citometría de flujo (FACS Verse, BD Biosciences). Se analizaron al menos 10.000 eventos para cada muestra (Miedes et al., 2023).

Glutatión Reducido Intracelular (GSH)

En un microplato de 24 pozos se sembraron $5{,}2x10^4$ células/cm^2 y se dejaron adherir por 24 h, se utilizó 5-flu como control positivo. El contenido de GSH se determinó con CMFDA, un colorante específico capaz de unirse al tiol no proteico como el GSH. El CMFDA se mezcló con 500µL de suspensión celular en un tubo de citometría a una concentración final de 1µM, las células se incubaron con el colorante por 40min a 37°C y 5% CO_2/95% de humedad relativa, y se centrifugaron a 450g por 5min. El pellet celular fue resuspendido en 300 µL de PBS y analizado mediante citometría de flujo (FACS Verse, BD Biosciences). Se analizaron al menos 10.000 eventos para cada muestra (Miedes et al., 2023).

8.8. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar (DE). Las comparaciones de medias se realizaron con la prueba Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% mediante STATGRAPGICS 19®.

9. Resultados

9.1. Obtención y caracterización de los extractos de las frutas

Efecto del estado de madurez sobre la actividad antioxidante de las frutas.

Los resultados del estado de madurez según las Tablas de color de las normas técnicas colombiana para la uchuva (NTC 4580) (Frutas Frescas. Uchuva. Especificaciones NTC 4580:1999, 1999) y para la gulupa (NTC 6456) (Frutas Frescas. Gulupa. Especificaciones NTC 6456:2020, 2020) se describen en la Tabla 5. Los estados de madurez de la uchuva seleccionadas fueron 1, 3, 5 y 6, con valores de índices de madurez de 4,33±0,04; 7,84±0,14; 8,90±1,06 y 10,00±0,38, respectivamente. Para el caso de la gulupa, fueron seleccionados frutos con estados de madurez de 3, 4 y 6 con valores de índices de madurez de 3,21±0,45; 4,49±0,50 y 5,38±0,36, respectivamente.

Tabla 5. *Estado de madurez de la uchuva y la gulupa*

	Uchuva			
Estado de madurez (color)				
	1	**3**	**5**	**6**
° Brix	8,00±0,00	10,00±0,00	11,33 ± 0,58	13,00±0,00
%Á. cítrico	1,85±0,02	1,27±0,02	1,28±0,11	1,28±0,04
Índice de madurez	4,33±0,04	7,84±0,14	8,90±1,06	10,00±0,38
	Gulupa			

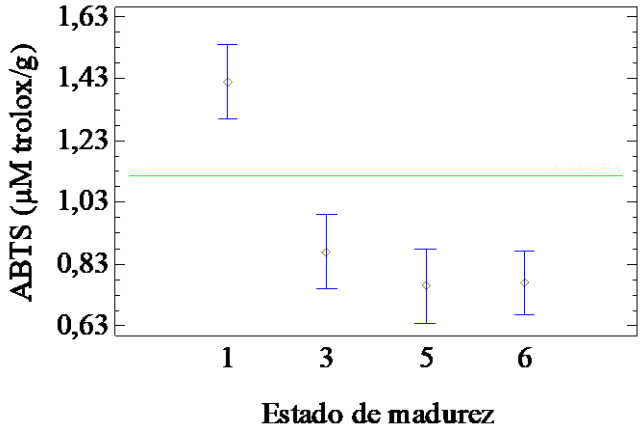
Estado de madurez (color)	 **3**	 **4**	 **6**
° Brix	18,33±0,58	16,67±0,58	13,67±0,58
%Á. cítrico	5,76±0,64	3,73±0,35	2,55±0,12
Índice de madurez	3,21±0,45	4,49±0,50	5,38±0,36

Como se mencionó en la metodología la actividad antioxidante de ambas frutas, en sus diferentes estados de madurez, fue cuantificada por ABTS, FRAP y DPPH, además, se les determinó el contenido de polifenoles totales. Los resultados del ANOVA para este experimento indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre la actividad antioxidante de los frutos con respecto a sus diferentes estados de madurez (*valores-p*<0,0001). La prueba de rangos múltiples se aplicó sobre estos resultados utilizando la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un 95% de confianza (Figuras 7 y 8). En la Figura 7a se muestra que el estado de madurez 1 para el fruto de uchuva presenta una mayor actividad antioxidante, cuantificada por ABTS, con respecto a los otros tres estados de madurez, con diferencias estadísticamente significativas. Mientras que, en la Figura 7b se muestra que los frutos con estado de madurez 6 tienen una mayor capacidad para atrapar el radical libre DPPH con respecto a los otros tres estados de madurez, con diferencias estadísticamente significativas. Por último, en las Figuras 7c y 7d, la uchuva con estado de madurez 3 presenta una mayor capacidad reductora de hierro (5,69±0,27µMTrolox/g) y un mayor contenido de polifenoles totales (0,50±0,024 µgAG /g) con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros tres estados de madurez. Los resultados para el fruto de gulupa se muestran en las Figuras 8a, 8b, 8c y 8d en las cuales se evidencia claramente que los frutos con estado de madurez 3 presentan una mayor actividad antioxidantes cuantificada por todas las metodologías (ABTS (3,57±0,19µMTrolox/g); DPPH (4,18±0,08µMTrolox/g); FRAP (8,57±0,18 µM Trolox/g)) y además, su contenido total de polifenoles totales (1,03±0,06µgAG/g) también fue mayor, con diferencia estadísticamente significativas (p<0,0001) con respecto a los frutos con estados de madurez 4 y 6. todos los valores

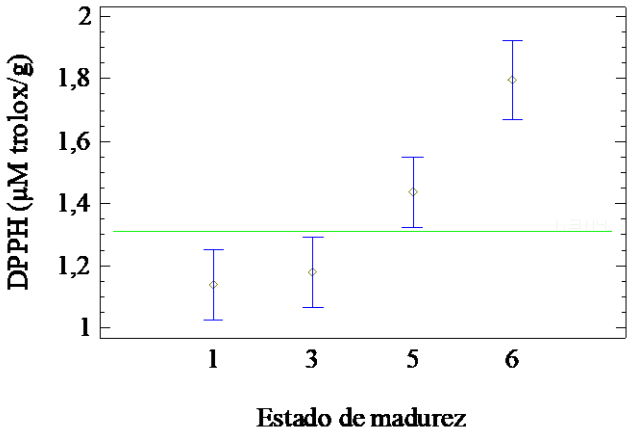
obtenidos fueron reportados en peso húmedo para ambas frutas. Teniendo en cuenta los resultados de este experimento se decidió seleccionar frutos de uchuva y de gulupa con estado de madurez 3 para continuar con el desarrollo de esta investigación.

Figura 7. *Gráficas de medias de la prueba LSD de Fisher para actividad antioxidante cuantificada por ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c) y el contenido de polifenoles totales (d) con respecto al estado de madurez de la uchuva.*

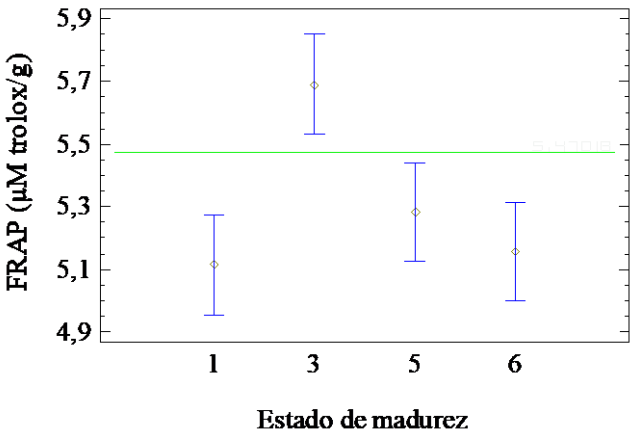
a)



b)



c)



d)

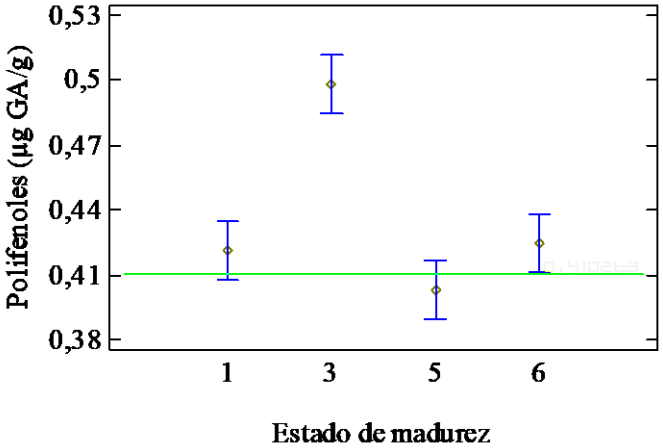
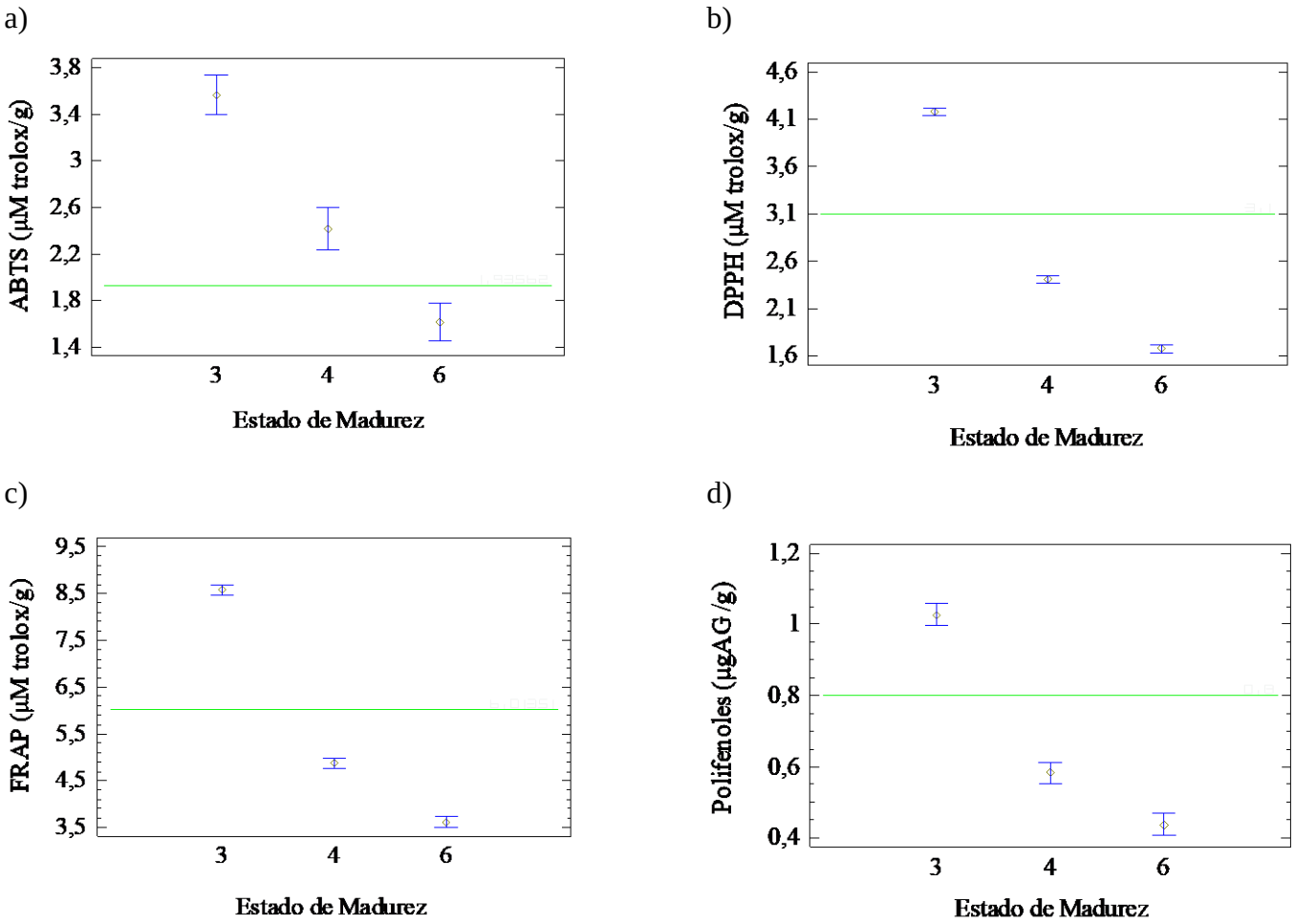


***Figura 8**. Gráficas de medias de la prueba LSD de Fisher para actividad antioxidante cuantificada por ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c) y el contenido de polifenoles totales (d) con respecto al estado de madurez de la gulupa*



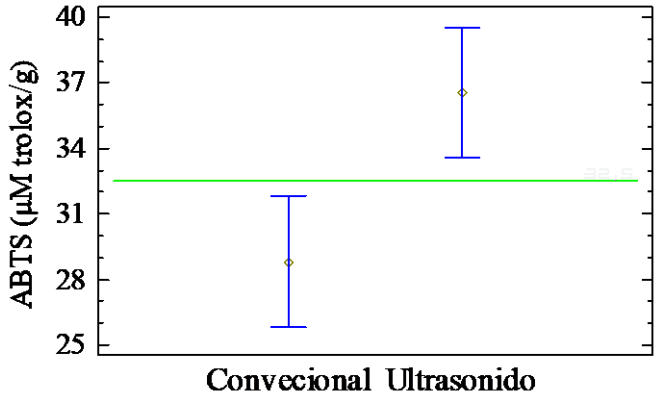
Efecto de la extracción asistida por ultrasonido sobre la concentración de compuestos bioactivos en la uchuva

Los efectos del uso de ultrasonido versus la extracción convencional en los extractos de uchuva fueron comparados mediante ANOVA. Los resultados obtuvieron $p < 0,05$ para ABTS, FRAP y polifenoles totales, lo que indica diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos de extracción. Los valores para la actividad antioxidantes fueron: 36,53±2,66µMTrolox/g y 28,82±0,59µMTrolox/g para ABTS (p = 0,0229), 34,39±1,07 µM Trolox/g y 30,61±0,85 µMTrolox/g (p = 0,0087) para FRAP y 5,29±0,34 µg AG/g y 3,51±0,55 µg AG/g para los

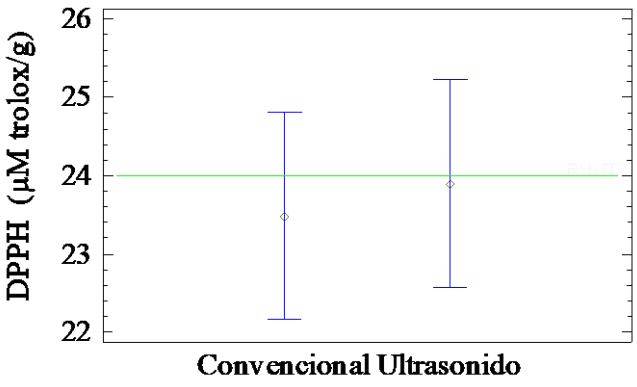
polifenoles totales (p=0,0090), para extracción asistida ultrasonido y convencional, respectivamente. Para en el caso DPPH no se observaron diferencias significativas entre los métodos de extracción con un p=0,6824 (Figura 9b). Todos estos valores fueron reportados en peso húmedo. Las pruebas LSD de Fisher con un 95% de confianza (Figura 9) evidencian que el extracto de uchuva obtenido con ultrasonido tiene una mayor actividad antioxidante cuantificada, por ABTS y FRAP (Figuras 9a y 9c), y un mayor contenido de polifenoles totales (Figura 9d) comparado con el extracto obtenido de manera convencional. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió aplicar el ultrasonido durante el proceso de extracción de los CBs del fruto de uchuva para continuar con el desarrollo de este trabajo.

Figura 9. *Gráficas de medias de la prueba LSD de Fisher para el efecto del método de extracción para la uchuva sobre la actividad antioxidante cuantificada por ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c) y el contenido de polifenoles totales (d).*

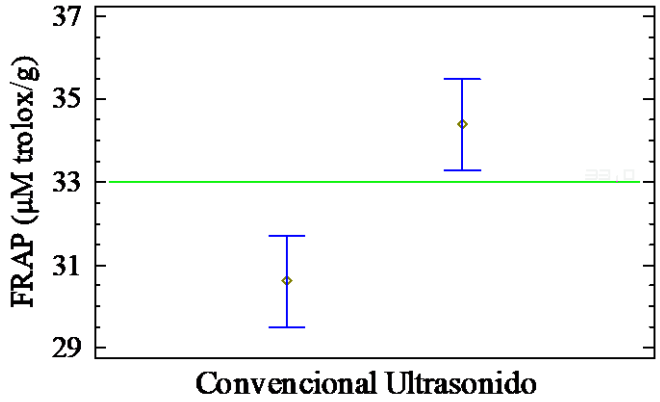
a)



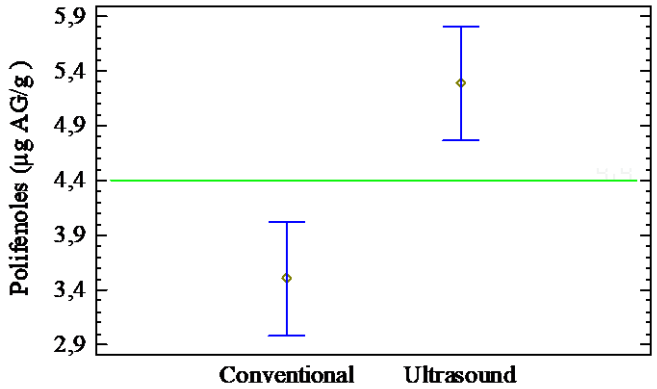
b)



c)



d)

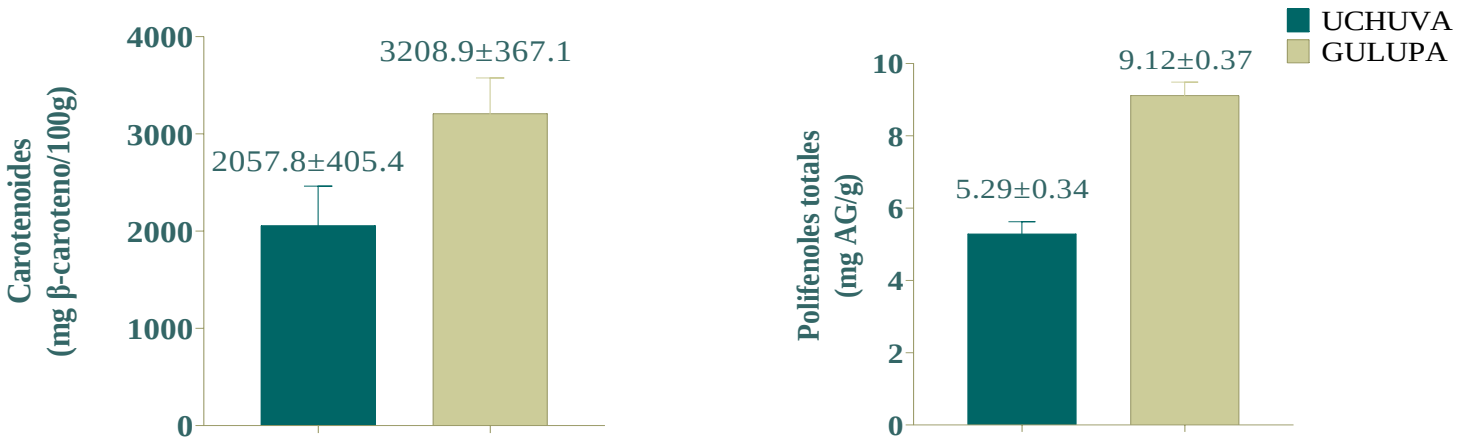


Caracterización fisicoquímica de los extractos de uchuva y de gulupa

Los resultados para la caracterización fisicoquímica del extracto liofilizado de uchuva con estado de madurez 3 en peso húmedo, fueron humedad = 15,12±0,48% p/p; grasa = 0,39±0,51% p/p; proteína = 4,00 ±0,00% p/p y ceniza = 15,94 ± 0,00% p/p. Para el extracto liofilizado de gulupa con estado de madurez 3, los resultados fueron humedad = 9,38±0,74 % p/p; grasa = 2,63±0,42% p/p; proteína = 7,70±0,00% p/p y ceniza = 3,47±0,00% p/p. Por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos para los extractos liofilizados en peso húmedo, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de los CBs presentes en ambos frutos, tanto para polifenoles (*p*=0,0002) totales como para carotenoides totales (p=0,0075). La Figura 10 muestra claramente que la gulupa tiene una mayor concentración de compuestos carotenoides y compuestos polifenólicos que la uchuva. La uchuva tiene un contenido total de carotenoides de 2057,80±405,40 mg β-caroteno/100g (Figura 10a) y un contenido total de polifenoles de 5,29±0,34 mg GA/g (Figura 10b), en peso húmedo. Para la gulupa el contenido total de carotenoides fue de 3208,90±367,10 µg β-caroteno/mg y un contenido de polifenoles de 9,12±0,37 mg GA/g.

Figura 10. *Carotenoides totales (a) y polifenoles totales (b) para ambas frutas.*

a) b)



CBs en los extractos de uchuva y gulupa identificados por HLPC-MS gulupa

En las Tablas 6 y 7 se reportan los 14 carotenoides y los 37 polifenoles que se lograron identificar mediante HLPC-MS en los extractos de uchuva y de gulupa.

Tabla 6. *Carotenoides presentes en los extractos de uchuva y gulupa*

Compuesto	**Fórmula molecular**	**Peso molecular**	**Peso molecular (MS/MS)**	**Gulupa**	**Tiempo de retención (min)**	**Uchuva**	**Tiempo de retención (min)**
Luteína	$C_{40}H_{56}O_2$	568,9	568,42748	X	2,61	X	2,67
Luteína 5,6-epóxido	$C_{40}H_{56}O_3$	584,9	584,4224	X	2,56	X	2,31
Taraxantina	$C_{40}H_{56}O$	552,9	552,43257	X	8,51	X	8,49
Zeinoxantina	$C_{40}H_{56O}$	552,9	552,43257	X	8,51	X	8,49
Criptoxantina	$C_{40}H_{56}$	536,9	536,43765	X	12,83	X	12,79

α-Caroteno	$C_{40}H_{64}$	544,9	544,50025	X	3,21	X	3,12
Fitoeno	$C_{40}H_{62}$	542,9	542,4846	X	4,36	X	25,25
Fitoflueno	$C_{40}H_{56}$	536,9	536,43765	X	12,82	X	12,79
β-Caroteno	$C_{40}H_{56}$	536,9	536,43765	X	12,82	X	12,79
Licopeno	$C_{54}H_{82}O_2$	763,2	762,63093	X	3,18	X	1,96
(all-E)-α-Criptoxantina miristato	$C_{40}H_{56}O_3$	584,9	584,4224	X	2,56	X	2,53
(all-E)-Anteraxantina	$C_{40}H_{56}O_3$	584,9	584,4224	X	2,56	X	2,53
(13Z)-Luteína y/o (13′Z)-Luteína	$C_{40}H_{56}O_3$	584,9	600,41731	X	5,06	X	2,24
(all-E)-Violaxantina	$C_{70}H_{112}O_6$	1049,6	1048,84534	X	4,13	X	37,46
Violaxantina palmitato	$C_{72}H_{116}O_6$	1077,7	1076,87664	X	16,83		

Nota. La identificación de los carotenoides se realizó mediante base de datos.

Tabla 7. *Polifenoles presentes en los extractos de uchuva y gulupa*

Compuesto	**Fórmula molecular**	**Peso molecular (MS/MS)**	**Compuesto**	**Fórmula molecular**	**Peso molecular (MS/MS)**
Apigenina	$C_{15}H_{10}O_5$	271,06010	Kaempferol 3-glucósido	$C_{21}H_{20}O_{11}$	449,10784
Artepillina C	$C_{19}H_{24}O_3$	301,17982	Luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	287,05501
Ácido cafeico	$C_9H_8O_4$	181,04954	Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$	273,07575
Cafeína	$C_8H1_0N_4O_2$	195,08765	Orientina	$C_{21}H_{20}O_{11}$	449,10784
Ácido carnosico	$C_{20}H_{28}O_4$	333,20604	Ácido p-cumárico	$C_9H_8O_3$	165,05462
Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	291,08631	Pelargonidina	$C_{15}H_{11}O_5^+$	271,0601
Ácido clorogénico	$C_{16}H_{18}O_9$	355,10236	Pelargonidina 3-glucósido	$C_{21}H_{21}O_{10}^+$	433,11292
Ácido cinámico	$C_9H_8O_2$	149,05971	Pinocembrina	$C_{15}H_{12}O_4$	257,08084

Cianidina	$C_{15}H_{11}O_6^+$	287,05501	Ácido protocatecuico	$C_7H_6O_4$	155,03389
Cianidina 3-rutinosido	$C_{27}H_{31}ClO_{15}$	631,14242	Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	303,04993
Epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6$	291,08631	Quercetina 3-glucósido	$C_{21}H_{20}O_{12}$	465,10275
Epigalocatequina	$C_{15}H_{14}O_7$	324,10778	Ácido rosmarínico	$C_{18}H_{16}O_8$	361,09179
Eriodictyol	$C_{15}H_{12}O_6$	289,0706	Rutina	$C_{18}H_{16}O_8$	611,16066
Ácido ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$	195,06519	Teobromina	$C_7H_8N_4O_2$	181,0720
Ácido gálico	$C_7H_6O_5$	171,0288	Ácido ursólico	$C_{30}H_{48}O_3$	457,36762
Isoorientina	$C_{21}H_{20}O_{11}$	449,10784	Vanilina	$C_8H_8O_3$	153,05462
Isovitexina	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433,11292	Ácido vainílico	$C_8H_8O_4$	169,04954
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	287,05501			

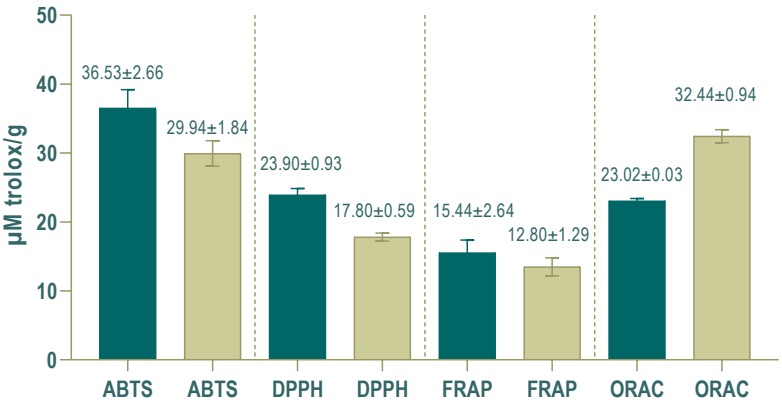
Nota. La identificación de los polifenoles se realizó mediante base de datos.

Actividad antioxidante de los extractos liofilizados

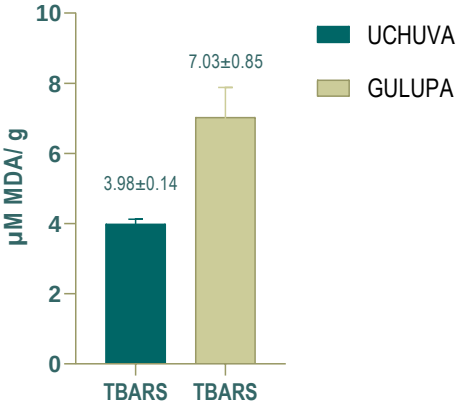
En la Figura 11 se reporta los valores de la actividad antioxidante de los extractos liofilizados de uchuva y de gulupa. Los resultados del ANOVA comparando la actividad antioxidante de los extractos liofilizados en peso húmedo para el estado de madurez 3 en ambos frutos mostraron valores p inferiores a 0,05 para la actividad antioxidante cuantificada por ABTS ($p = 0,0442$), DPPH ($p = 0,0007$), TBARS ($p = 0,0000$) y ORAC ($p = 0,0057$). Estos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre la media de estas variables evaluadas en cada extracto con un nivel de confianza estadística del 95%. Sin embargo, para la capacidad de las muestras para reducir el FRAP de hierro férrico, el $p = 0,8390$, indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos extractos.

Figura 11. *Actividad antioxidante de extractos liofilizados cuantificada mediante a) ABTS. DPPH, FRAP y ORAC y b) T-BARS*

a)



b)



9.2. Formulación de la mezcla de frutas

Se aplicó un diseño experimental tipo mezclas para obtener, a partir de los extractos de uchuva y gulupa, una formulación con la máxima capacidad antioxidante, los resultados del diseño se muestran en la Tabla 8. Los *valores-p* para cada una de las variables de respuesta fueron menores a 0,05 excepto para la prueba de TBARS, lo que indica que la proporción de cada uno de los extractos en la mezcla tienen un efecto estadísticamente significativo en las variables respuesta ABTS, DPPH, FRAP y ORAC, con un 95% de confianza estadística. Los modelos matemáticos que describen el efecto de la proporción de cada fruta en la mezcla sobre las variables de respuesta ABTS, DPPH, FRAP y ORAC se describen en las ecuaciones 16, 17, 18 y 19, respectivamente. En todos los casos, excepto para la prueba de TBARS, se obtuvo un r^2 *ajustado* por encima del 75%. La optimización de múltiples respuestas se realizó para maximizar la actividad antioxidante cuantificada por ABTS, DPPH, FRAP y ORAC y para minimizar los resultados obtenidos con la prueba de TBARS, considerando que la concentración de MDA en el medio es inversamente proporcional a la actividad antioxidante de las muestras. La combinación de los niveles de los componentes que maximiza la función de 'deseabilidad', con un 97%, se alcanza con una proporción de uchuva de 0,83 y una proporción de gulupa de 0,17.

Tabla 8. *Diseño experimental para la mezcla de frutas*

Unidades experimentales	**Componentes**		**Variables respuesta**				
	(A) Uchuva (0-1)	**(B) Gulupa (0-1)**	**ABTS (µM Trolox /g)**	**DPPH (µM Trolox /g)**	**FRAP (µM Trolox /g)**	**TBARS (µM MDA / 100g)**	**ORAC (µM Trolox / 100 g)**
1	0,5	0,5	13,56	14,27	18,82	137,09	2914,23
2	0,25	0,75	13,01	11,73	17,61	134,57	3118,46
3	0,75	0,25	13,03	16,05	19,95	63,11	2632,20
4	0	1	10,99	8,08	16,99	94,02	3310,50
5	0,5	0,5	13,21	14,37	17,47	105,95	2962,56
6	1	0	13,29	16,58	21,66	122,28	2328,22
7	1	0	15,21	18,55	19,52	68,45	2276,61
8	0,5	0,5	13,74	12,69	19,11	124,61	2453,88
9	0	1	10,19	7,86	16,06	114,30	3177,06
Valor-p			**0,0126**	**0,0001**	**0,0009**	**0,2230**	**0,0176**
r^2			**86,64%**	**96,24%**	**81,28%**	**55,39%**	**84,68%**
r^2-ajustado			**78,62%**	**94,98%**	**78,60%**	**28,62%**	**75,50%**
Valor predicho			13,34	16,48	20,14	72,30	2476,55
Valor experimental			12,91±1,37	18,10±1,66	22,74±0,86	58,085±3,96	47,06±9,31
Errores relativos			3,20	-9,80	-12,91	19,69	--

$$\boldsymbol{ABTS} = 14{,}2301 * A + 10{,}5705 * B + 4{,}11275 * A * B - 9{,}66613 + * A * B * (A - B) Ec. 16$$

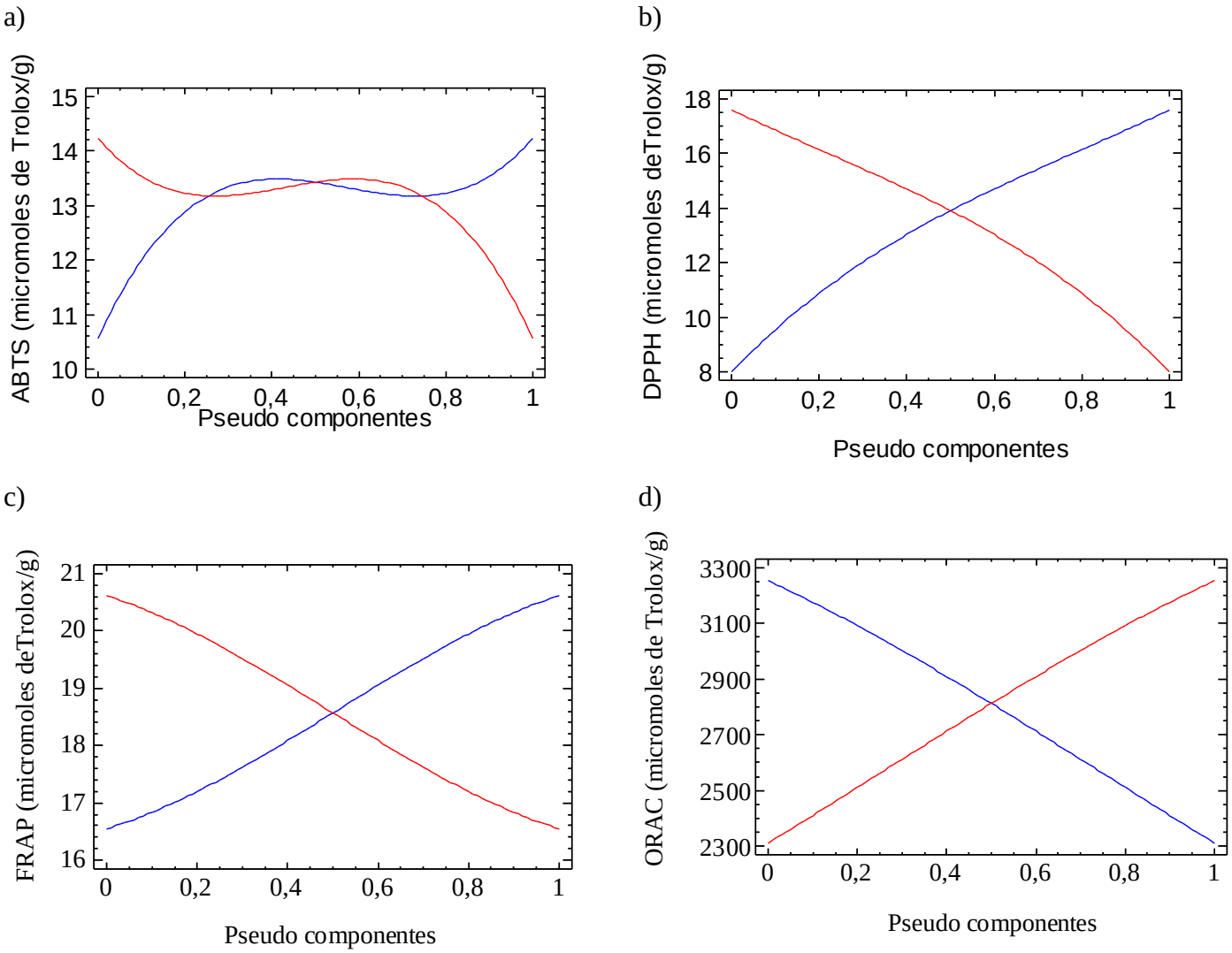
$$\boldsymbol{DPPH} = 17{,}5944 * A + 8{,}00635 * B + 4{,}42383 * A * B - 2{,}55012 * A * B * (A - B) Ec. 17$$

$$\boldsymbol{FRAP} = 20{,}6136 * A + 16{,}5499 * B - 0{,}0458133 * A * B + 1{,}6268 * A * B * (A - B) Ec. 18$$

$$\boldsymbol{ORAC} = 2311{,}25 * A + 3252{,}61 * B + 121{,}184 * A * B - 83{,}08 * A * B * (A - B) Ec.19$$

La Figura 12 muestra los gráficos de trazas para una mezcla de referencia 0,5-0,5 (uchuva-gulupa) donde se evidencia el comportamiento de la actividad antioxidante de la mezcla a medida que se va variando su proporción, donde, la proporción de uchuva en la mezcla esta representadas por la línea azul y la proporción de gulupa por la línea roja en todos los casos.

Figura 12. *Gráfico de traza para la mezcla de referencia (0,5-0,5) para ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c) y ORAC (d).*



Optimización del proceso de gelación iónica asistida por electropulverización

La Tabla 9 muestra el ANOVA para los resultados del diseño experimental de superficie de respuesta. El caudal, su forma cuadrática y su interacción lineal con la altura tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el tamaño de partícula (TP) con p=0,0001; p=0,0001 y p= 0,0006 respectivamente; así mismo, la altura y su interacción lineal con el volteje también tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el TP (p=0,0001 y p=0,0284, respectivamente); sin embargo, el voltaje, su forma cuadrática y su interacción con otros factores no presentan un efecto estadísticamente significativo sobre este (p<0,05). Para el caso de la E de las partículas, solo el caudal y el voltaje, (p= 0,0168 y p=0,0251, respectivamente), tienen un efecto estadísticamente significativo. Para el RP, los tres factores evaluados, sus términos lineales y cuadráticos y sus interacciones, excepto la interacción cuadrática del voltaje, tienen un efecto significativo, con valores p<0,05 (Tabla 9). Finalmente, los tres factores y sus interacciones, excepto nuevamente la forma cuadrática de voltaje, tienen un efecto significativo sobre la RA (p<0,05). La Figura 13a muestra el gráfico de superficie de respuesta que evidencia el comportamiento de la interacción entre la altura y el caudal sobre el TP, mientras que el efecto de la interacción entre caudal y el voltaje sobre la E se muestra en la Figura 13b, en el mismo sentido la Figura 13c, muestra la interacción entre el caudal y la altura y su efecto sobre el RP. Finalmente, la Figura 13d muestra el efecto de la interacción entre el caudal y la altura sobre la RA. Con una deseabilidad del 87%, las condiciones óptimas para el proceso de obtención de las partículas de hidrogel de alginato de calcio son: un caudal de 4,33ml/min, una altura de 11,59cm y un voltaje de 12,56kV. La Tabla 9 también muestra los valores predichos y experimentales obtenidos con estas condiciones óptimas.

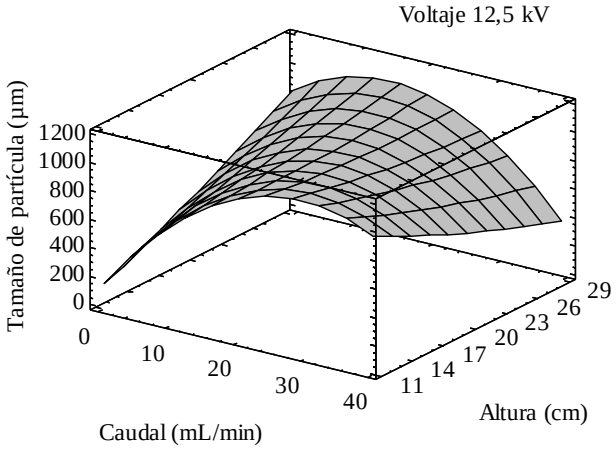
Tabla 9. *ANNOVA para el diseño experimental de superficie de respuesta para la optimización del proceso de gelificación iónica asistido por electropulverización.*

	Tamaño de partícula (µm)	**Esfericidad**	**Rendimiento del proceso (%)**	**Razón de aspecto**
	Valor-p	*Valor-p*	*Valor-p*	*Valor-p*
Caudal (A)	0,0000	0,0168	0,0225	0,0046

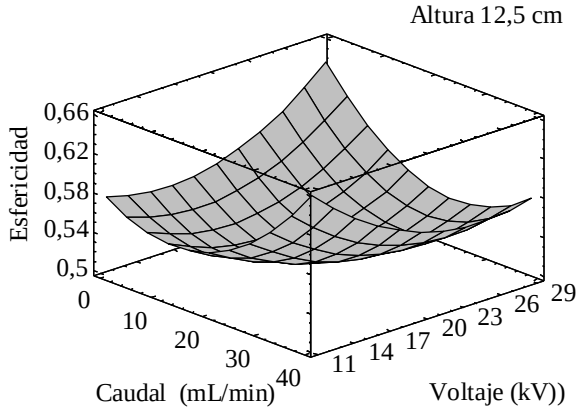
Altura (B)	0,0001	0,2503	0,0022	0,0245
Voltaje (C)	0, 8607	0,0251	0,0001	0,0250
AA	0,0001	0,0024	0,0139	0,0007
AB	0,0006	0,0594	0,0166	0,0002
AC	0,4969	0,0198	0,0320	0,0014
BB	0,3331	0,0006	0,0041	0,0001
BC	0,0284	0,1545	0,0000	0,0005
CC	0,1928	0,0001	0,2179	0,3059
Carencia de ajuste	0,4185	0,4043	0,6516	0,1171
r^2	82,31%	74,36%	86,10%	90,52%
r^2-ajustado	74,94%	62,70%	79,48%	84,20%
Valor predicho	400,89	0,55	87,50	0,63
Valor experimental	929,51±374,48	0,53±0,11	89,59±2,25	0,65±0,16
Errores relativos	56,87%	3,77%	2,33%	3,08%

Figura 13. *Gráficos de superficie de respuesta para: a) Tamaño de partícula, b) Rendimiento de procesos, c) Esfericidad y d) Razón de aspecto.*

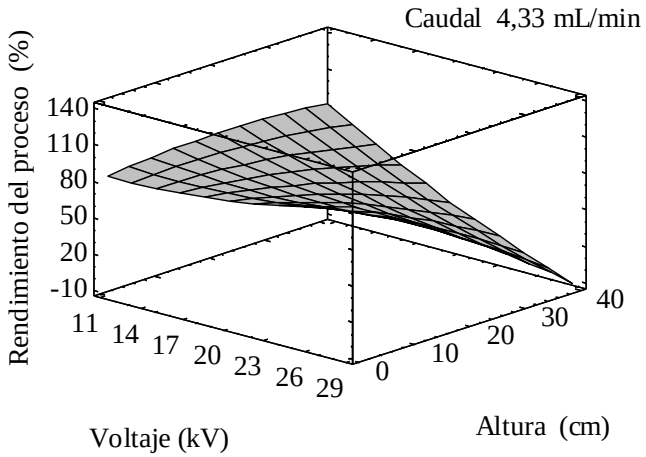
a)



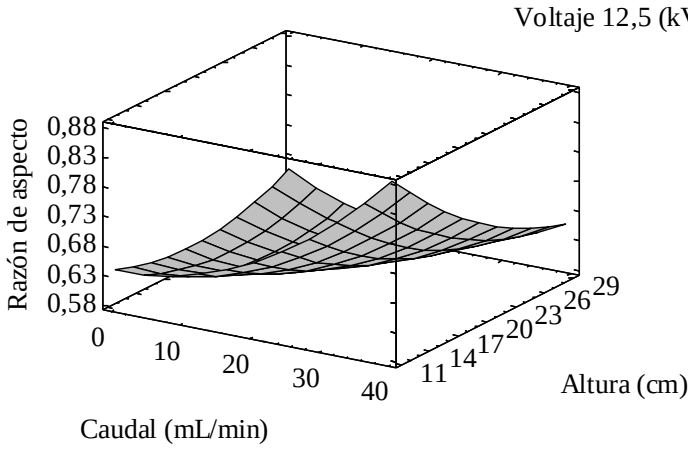
b)



c)



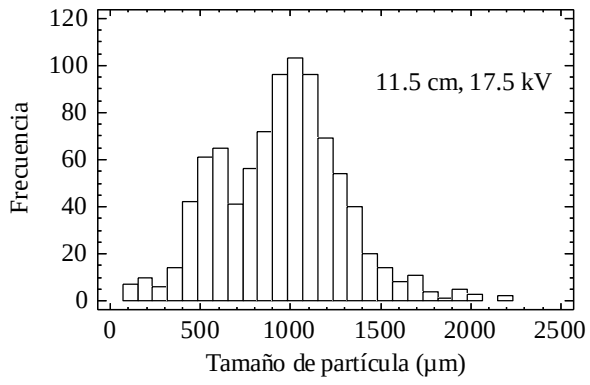
d)



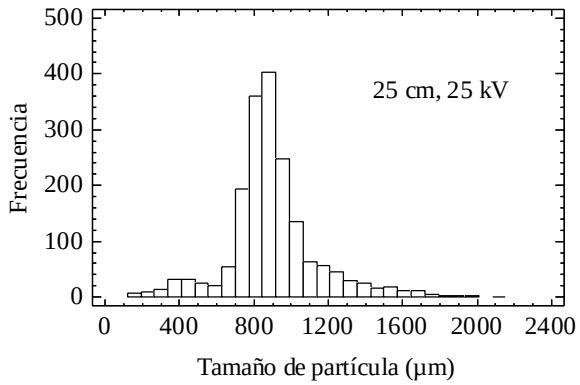
Las Figuras 14a, 14b y 14c muestran el efecto de la interacción de la altura y el voltaje en la distribución del tamaño de las partículas obtenidas con alturas de 11,5cm con 17,5 kV y 25cm con 25 kV. Por otro lado, la Figura 14d y 14e muestra el efecto del caudal en la distribución de TP

Figura 14*. Histogramas de frecuencia de la distribución del TP en el proceso de gelación iónica asistida por electropulverización. a) y b) Efecto de la altura sobre la distribución del TP; c) y d) efecto del voltaje sobre la distribución del TP y e) efecto del caudal sobre la distribución del TP.*

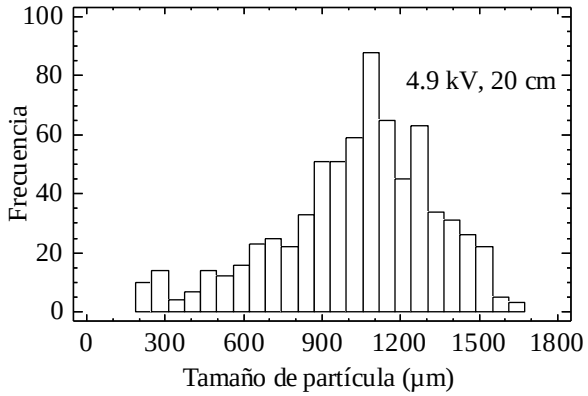
a)



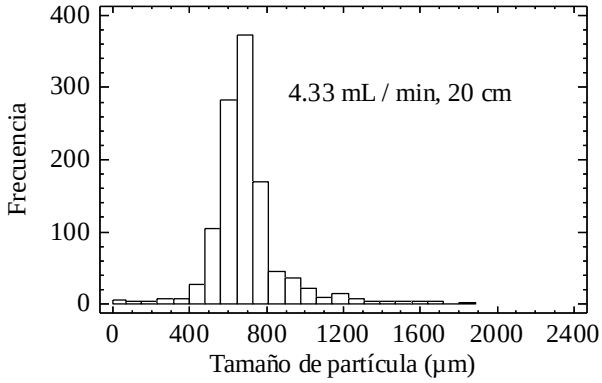
b)



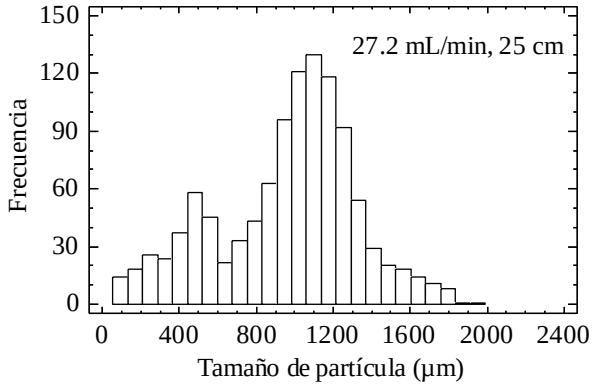
c)



d)



e)



Selección de la carga de las partículas de hidrogel

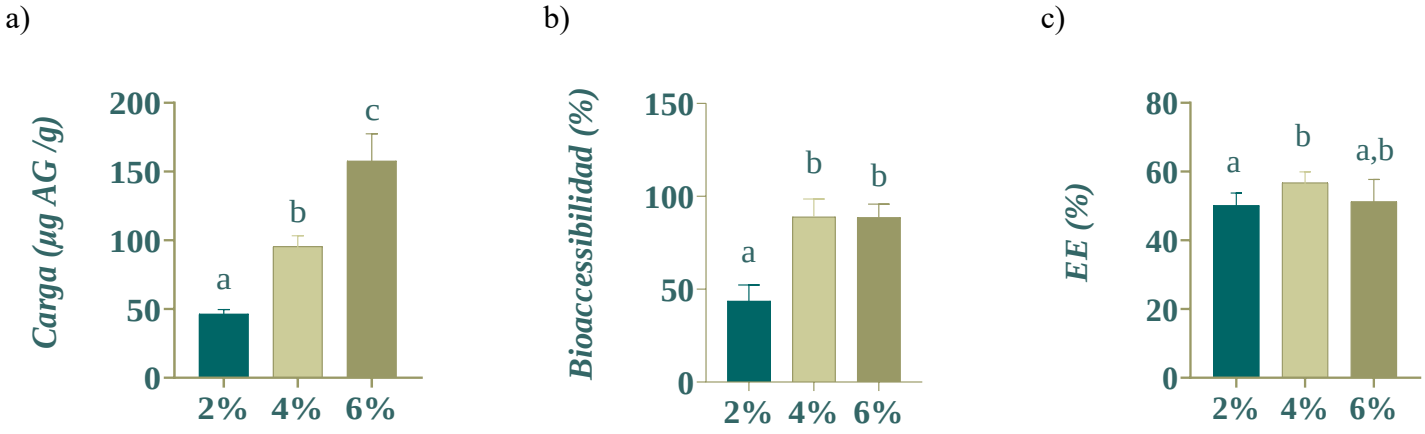
Se evaluaron concentraciones del 2%, 4% y 6% de sólidos de la mezcla de los extractos de uchuva y gulupa para incorporar dentro de las partículas de hidrogel de alginato de calcio. Los resultados y el ANOVA se observan en la Tabla 10 y en la Figura 15, encontrándose que tanto la carga de polifenoles (p=0,0000) como la bioaccesibilidad de los polifenoles (p=0,0038) exhibieron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de sólidos estudiadas. Figura 15a evidencia que la mayor carga de polifenoles (162,97±15,82mgAG/g) se obtiene con la concentración de sólidos del 6%. Por último, la concentración de solidos de la mezcla de frutas

utilizados no presento un efecto estadísticamente significativo sobre la EE de los polifenoles en las partículas (Figura 15c)

Tabla 10. *Resultaos de la evaluación de las diferentes cargas*

	2%	**4%**	**6%**	***Valor-p***
Carga (mg AG / g)	45,46±2,51	94,39±7,34	162,97±15,82	0,000
Bioaccesibilidad de los Polifenoles (%)	43,62±6,16	88,88±7,92	88,61±5,90	0,0038
EE de los Polifenoles (%)	50,16±3,29	56,74±3,20	51,29±5,72	0,0776

Figura 15. *Efecto del porcentaje de sólidos de fruta en la formulación de partículas de hidrogel sobre a) La carga de las partículas. b) La bioaccesibilidad de los polifenoles y c) La eficiencia de encapsulación de los polifenoles.*



Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas

Formulación del material de pared de las partículas de hidrogel

En la Tabla 11 se muestran los resultados del diseño experimental de mezclas para definir la formulación del material encapsulante, todas las variables respuesta presentaron un r^2 ajustado superior al 70%, excepto por la EE de los polifenoles, y un $p<0,05$, excepto para la bioaccesibilidad de los carotenoides (p=0,1823), lo que indica que la variación en las proporciones de la formulación con AS-HPMC-GA no tiene un efecto estadísticamente significativo sobre esta última, pero si tiene un efecto sobre el resto de las variables respuesta estudiadas. La Figura 16 muestra los gráficos de trazas para una mezcla de referencia de AS-HPMC-GA con proporciones de 0,66-0,17-0,17,

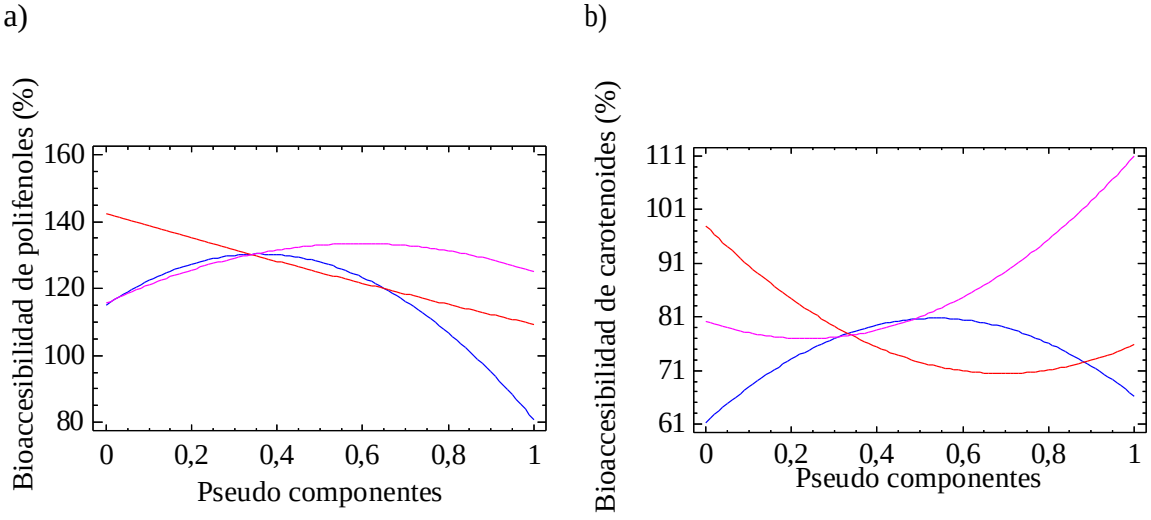
respectivamente y su efecto sobre cada una de las variables respuesta. La línea roja representa el cambio en la proporción de HPMC en la mezcla, la línea fucsia el cambio en la proporción de GA, y la línea azul representa el cambio en la proporción de AS en la mezcla. Con una deseabilidad del 92%, la formulación del material de pared compuesta de una proporción de 0,75 de AS y 0,25 de GA maximiza: la bioaccesibilidad de los polifenoles (213,17±19,57%), la EE de los polifenoles (89,46±6,64%), la retención de la actividad antioxidante por ABTS (68,38±0,00%), la retención de la actividad antioxidante por FRAP (95,62±11,81%), la E (0,69) y, además, minimiza el TP (1194,48±167,34µm).

Tabla 11. *Resultados del diseño experimental de mezclas para la formulación del material de pared de las partículas de hidrogel*

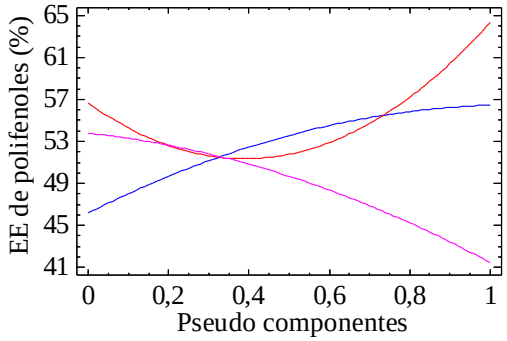
Unidad experimental	Bioaccesibilidad de polifenoles (%)	Bioaccesibilidad de carotenoides (%)	Eficiencia de encapsulación de polifenoles (%)	Tamaño de partícula (µm)	ABTS (%)	FRAP (%)	Esfericidad
1	105,16	75,79	64,7	1539,27	123,01	57,83	0,71
2	126,59	50,96	40,8	2224,47	44,02	72,7	0,66
3	110,20	61,34	49,4	2078,63	47,59	97,39	0,63
4	132,54	88,24	46,2	1625,8	43,78	51,06	0,66
5	156,93	105,41	51,4	1825,81	78,14	90,1	0,67
6	85,37	70,11	57,1	1866,22	129,55	91,24	0,76
7	73,48	85,42	58,5	1701,86	71,28	168,48	0,68
8	142,13	97,26	59,8	1592,14	34,41	106,78	0,66

9	135,70	55,38	49,6	1349,00	93,86	120,17	0,72
10	125,98	59,81	51,1	1149,88	95,02	130,33	0,65
11	77,55	62,50	55,9	1787,01	127,7	49,99	0,74
12	109,97	74,70	52,8	1720,6	55,79	170,53	0,69
Valor-p	**0,0341**	**0,1823**	**0,0274**	**0,0313**	**0,0111**	**0,0374**	**0,0032**
r^2	**90,74,**	**92,27**	**82,74**	**95,48**	**91,27**	**85,42**	**94,77**
r^2-ajustado	**79,18**	**72,93**	**68,35**	**87,95**	**82,54**	**70,84**	**89,54**
Valor predicho	141,60	97,26	56,86	1637,62	44,63	91,79	0,66
Valor experimental	213,17± 19,57	68,18± 0,00	89,46± 6,64	1194,48±167,34	68,38± 0,00	95,62± 11,81	0,69±0,11
Errores relativos	-33,57	42,65	-36,44	37,10	-34,73	-4,00	-4,45

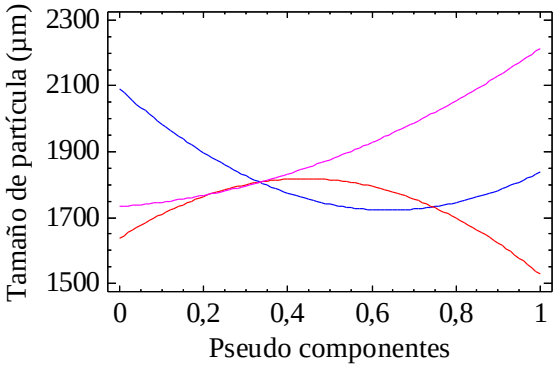
Figura 16. *Gráficos de trazas para a) bioaccesibilidad de polifenoles, b) bioaccesibilidad de carotenoides, c) EE de polifenoles, d) Tamaño de partícula e) Esfericidad.*



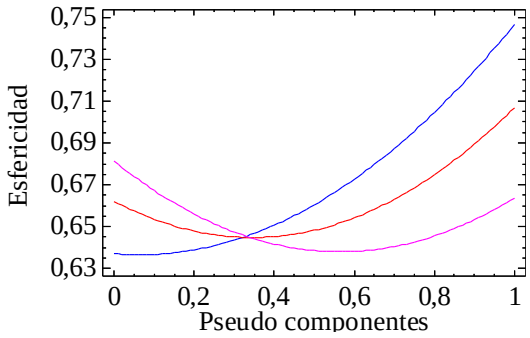
c)



d)



e)

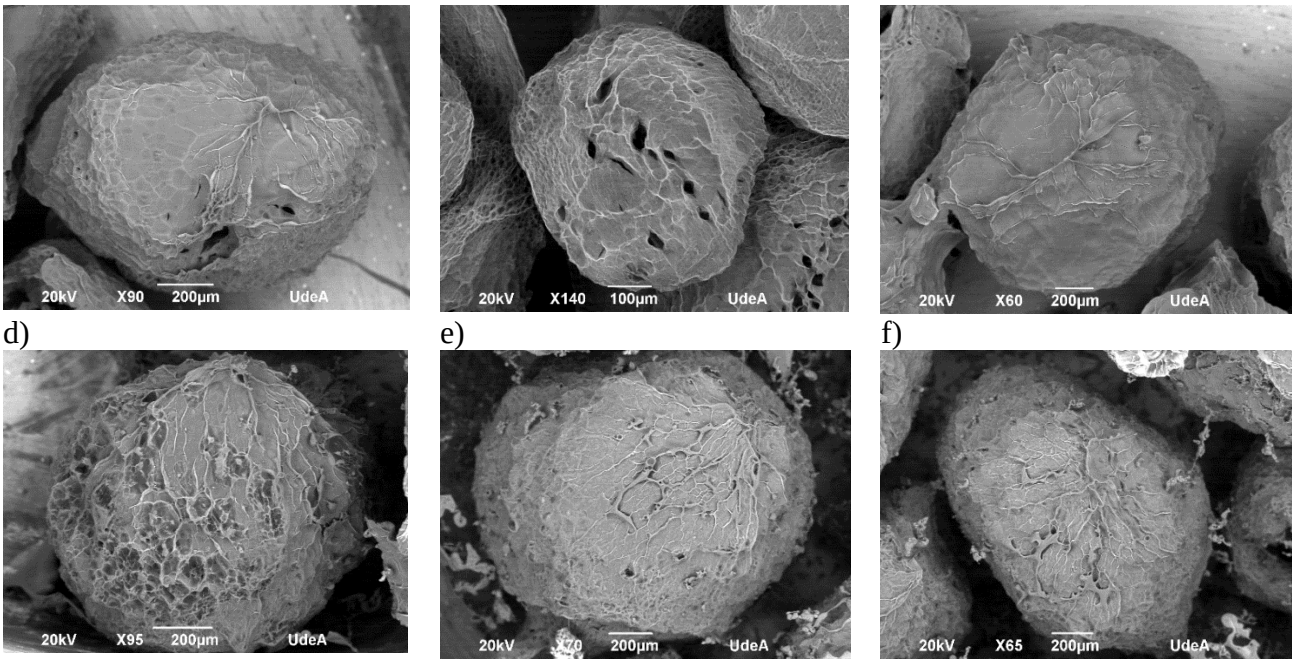


Nota: *la línea roja representa el cambio en la proporción de HPMC en la mezcla, la línea fucia el cambio en la proporción de GA, y la línea azul representa el cambio en la proporción de AS*

Las microfotografías tomadas por el microscopio electrónico de barrido SEM se muestran en la Figura 17. En las Figuras 17a, 17b y 17c se observan partículas en blanco con una morfología uniforme, esférica y semiesférica, mientras que la incorporación de la mezcla de fruta en las partículas de hidrogel dio lugar a una superficie más rugosa y a un número menor de cavidades en el interior (Figuras 17d, 17e y 17f), estas diferencias son más notorias entre las Figuras 17b y 17e.

Figura 17. *Microfotografías SEM a, b y c) para partículas de hidrogel en blanco (sin frutas) y d, e y f) para partículas de hidrogel con mezcla de frutas*

a) b) c)



Actividad antioxidante para la mezcla de frutas, las partículas de hidrogel y sus fracciones bioaccesibles

La actividad antioxidante de la mezcla de frutas (F), de las partículas de hidrogel con frutas (PHF), de las partículas de hidrogel en blanco (PHB) y sus respectivas fracciones bioaccesibles se muestran en la Tabla 12. El contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC en PHF es menor con respecto a F, con diferencias estadísticamente significativas. Estas diferencias podrían deberse a que, en el proceso de producción de las PHF la EE de los polifenoles solo fue del 89,46% y a que probablemente la liberación de los CBs en el TGI no fue completa. En la Tabla 12 también se evidencia que la bioaccesibilidad de los polifenoles de F aumenta después del proceso de digestión en 1,13 veces mientras, la de PHF aumenta en 2,22 veces. Un comportamiento similar se encontró para la actividad antioxidante medida por ORAC, el valor de ORAC para F fue de 47,06±9,31µMTrolox/100g y para su fracción bioaccesible fue de 7865,90±1238,55µM Trolox/100g (Tabla 12), este valor representa un aumento de 167 veces con respecto al primero. Para el caso de PHB este aumento fue de 479 veces, y para las PHB el aumento fue de 1.006 veces. Sin embargo, la actividad antioxidante cuantificada por ABTS y FRAP

presentaron comportamientos similares tanto de las muestras como de sus fracciones bioaccesibles, sin diferencias significativas para PHB.

Tabla 12. *Actividad antioxidante para la mezcla de frutas, las partículas de hidrogel con mezcla de frutas y las partículas de hidrogel en blanco como control negativo y sus fracciones bioaccesibles.*

	Mezcla de frutas (F)	**Partículas de hidrogel con frutas (PHF)**	**Partículas de hidrogel en blanco (PHB)**
Polifenoles Totales	**µg AG/ 100 g**		
Sin digerir	23807,69±783,29^{a}	11404,89 ±335,04^{c}	153,21±43,33^{d}
Fracción bioaccesible	26946,15±1201,58^{b}	25346,15±1786,21$^{a, b}$	16330,77±554,70^{e}
ABTS	**µM trolox /100g**		
Sin digerir	91,50±1,43^{a}	69,33±7,11^{b}	16,81±3,56^{d}
Fracción bioaccesible	75,85±16,293^{b}	47,41±0,00^{c}	15,41±2,51^{d}
FRAP	**µM trolox /100g**		
Sin digerir	77,34±1,31^{a}	22,13±1,92^{c}	7,23±3,18^{d}
Fracción bioaccesible	72,85±2,60^{b}	20,54±2,40^{c}	6,70±0,71^{d}
ORAC	**µM trolox /100g**		
Sin digerir	47,06±9,31^{a}	32,10±4,73^{c}	7,32±1,79^{e}
Fracción bioaccesible	7865,90±1238,55^{b}	15382,15±2781,93^{d}	7362,72±2692,69^{b}

9.3. Efecto anti-proliferativo de las partículas de hidrogel sobre las células del carcinoma colorrectal humano.

Citotoxicidad por MTT

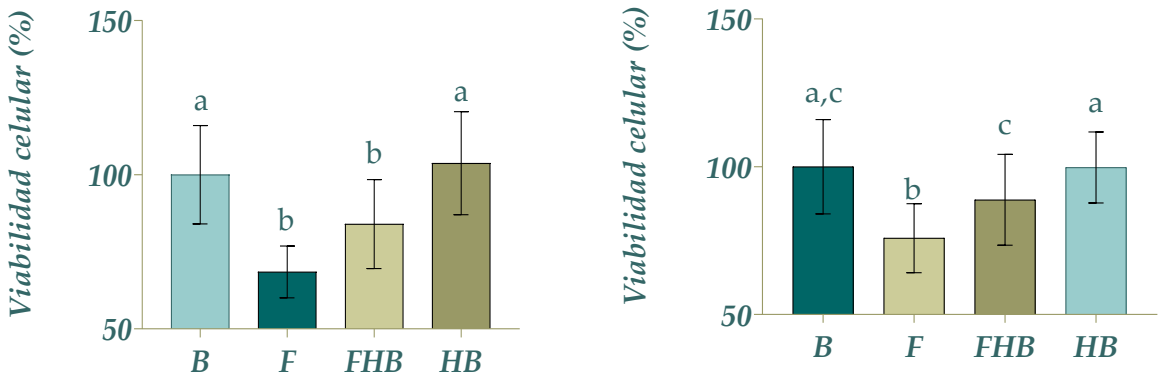
Dada la correlación positiva que se puede sugerir entre la capacidad antioxidante, el contenido fenólico y la actividad anti-proliferativa (Jilani et al., 2020), se analizó el potencial antiproliferativo de las fracciones bioaccesibles de las muestras frente a las siguientes líneas

celulares de colon: Caco-2 no diferenciadas como modelo tumoral y Caco-2 diferenciadas como modelo no tumoral y de tipo epitelial intestinal (Figura 18). Considerando que es posible una pequeña disminución de la viabilidad celular debido a las enzimas restantes en las fracciones bioaccesibles (Jilani et al., 2020), los valores de viabilidad celular obtenidos con la fracción bioaccesible del blanco de digestión (agua) se consideraron como referencia. Las PHF y la F fueron capaces de inhibir la proliferación del modelo de células tumorales en 17 y 25%, respectivamente, en comparación con el control ($p<0,05$) sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas, mientras que las PHB y el B no presentaron diferencias con respecto a las células control ($p>0,05$) (Figura 18a). Por otro lado, para el modelo de células no tumorales (células caco-2 diferenciadas), se evidenció un efecto citotóxico significativo sobre la viabilidad celular en comparación con el control ($p<0,05$) (Figura 18B), pero mucho menos pronunciado que en el modelo de células tumorales.

Figura 18. *Efecto de fracciones bioaccesibles de muestras (diluidas 1:15 v/v con DMEM) (mezcla de frutas (F), partículas de hidrogel con frutas (PHF) y partículas de hidrogel en blanco*

(PHB)) sobre la viabilidad celular de las líneas celulares Caco-2. no diferenciado como modelo tumoral (a) y diferenciado como modelo no tumoral de tipo epitelial intestinal (b).

a) b)

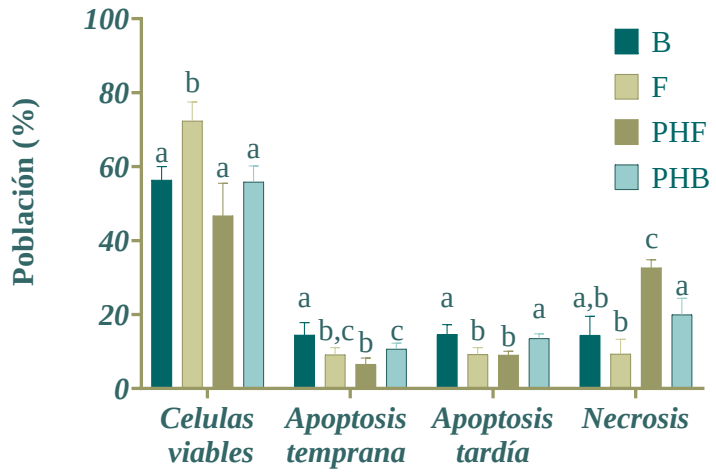


Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Apoptosis

La distribución del estado de muerte celular después de los tratamientos con la F, las PHF y las PHB se muestran en la Figura 19 donde se evidencia que el porcentaje de la población de células en apoptosis temprana para los tres tratamientos son menores al tratamiento B (blanco de digestión), con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). De manera similar, después del tratamiento con la F y con las PHF, la población de células en apoptosis tardía fue menor (p<0,05) en comparación con el B y con las PHB. Sin embargo, el resultado más relevante fue para el tratamiento con las PHF que evidenció que la población de las células en estado necrótico aumentó significativamente en un 18% en comparación con el control de digestión y con las otras muestras.

***Figura 19**. Efecto de fracciones bioaccesibles de muestras (diluidas 1:15 v/v con DMEM) (mezcla de frutas (F), partículas de hidrogel de frutas (PHF) y partículas de hidrogel en blanco (PHB)) sobre la distribución del estado de muerte celular del modelo tumoral Caco-2*

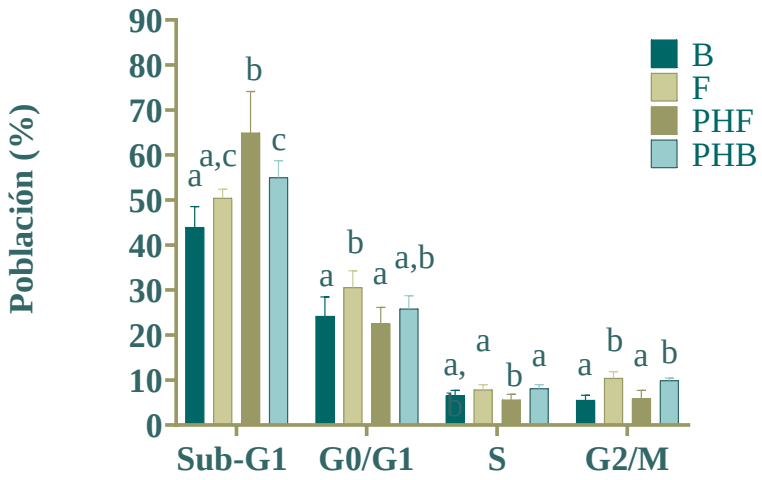


Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre muestras en el mismo estado celular.

Distribución del estado de las células en el ciclo celular

La distribución celular en las diferentes fases del ciclo celular se representa en la Figura 20. Entre estos resultados se destaca que, el tratamiento con PHF produjo un aumento estadísticamente significativo (vs. B ($p < 0,05$)) de la población de células en fase Sub G1 (marcador de apoptosis), en consecuencia, la proporción de todas las fases posteriores se redujo significativamente y ninguna mostró un arresto con diferencia significativa en (vs. B). Por su parte el tratamiento con F produjo un aumento estadísticamente significativo (vs. B ($p < 0.05$)) de células en las fases G0/G1 y G2/M, Adicionalmente, si bien el tratamiento con PHF produjo un arresto en fase S con diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos con F y PHB, este arresto no tiene diferencias significativas con respecto al tratamiento B.

Figura 20. *Efecto de fracciones bioaccesibles de muestras (diluidas 1:15 v/v con DMEM) (mezcla de frutas (F), partículas de hidrogel con frutas (FHB) y partículas de hidrogel en blanco (PHB)) sobre las diferentes fases del ciclo celular de Caco- Línea modelo tumoral*



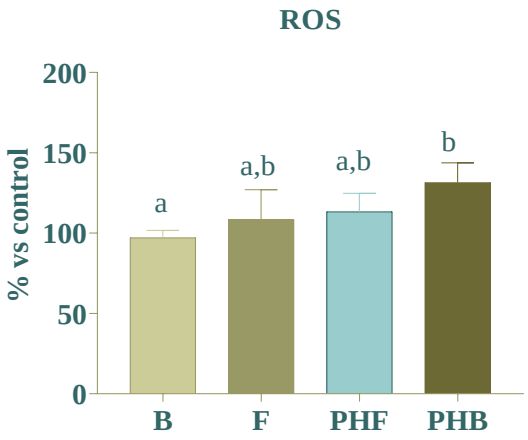
Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) en una misma fase del ciclo celular.

Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y glutatión reducido intracelular (GSH)

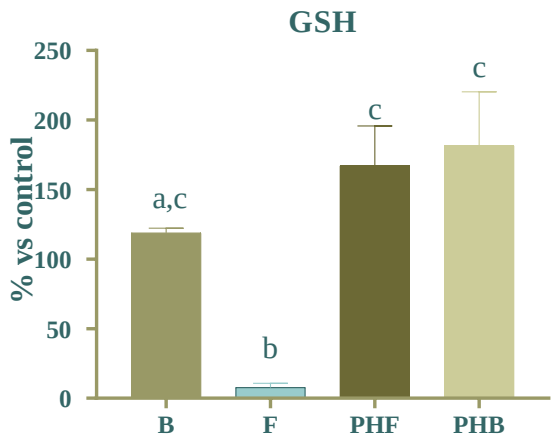
Los resultados para los niveles de ROS y GSH se muestra ene la Figura 21, para el tratamiento con las partículas de hidrogel con fruta y para la mezcla de frutas, evidenciaron una tendencia a elevar la producción de ROS sin diferencias estadísticamente significativas con respecto al blanco de digestión. Mientras que, el tratamiento con la mezcla de frutas provocó una disminución significativa (p<0,05) de más del 90% en los niveles de GSH en comparación con el blanco de digestión.

Figura 21. *Efecto de fracciones bioaccesibles de muestras (diluidas 1:15 v/v con DMEM) (F, HFB y HB) sobre los niveles intracelulares de ROS (A) y GSH (B) de la línea modelo tumoral de células Caco-2.*

a)



b)



Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

10. Discusión

10.1. Obtención y caracterización de los extractos de las frutas

Los resultados del estado de madurez, según las Tablas de color de las normas técnicas colombianas, se presentan en las Figuras 4 y 5 para la uchuva y la gulupa, respectivamente, y se detallan en la Tabla 5. Los estados de madurez 1, 3, 5 y 6 de la uchuva corresponden a los índices de madurez de 4,33 ± 0,04, 7,84 ± 0,14, 8,90 ± 1,06 y 10,00 ± 0,38, respectivamente (Tabla 1.). Estos valores coinciden con los reportados en la NTC 4580 (Frutas Frescas. Uchuva. Especificaciones NTC 4580:1999, 1999). Para el caso de la gulupa, los estados de madurez 3, 4 y 6; corresponden a los índices de madurez 3,21± 0,45, 4,49±0,50, y 5,38±0,36, respectivamente (Tabla 1.), y están en concordancia con los reportando por Pinzón, et al., 2007. Los resultados del ANOVA para la actividad antioxidante de estas frutas, medida mediante los ensayos ABTS, FRAP y DPPH, así como para el contenido de polifenoles totales en los diferentes estados de madurez estudiados, mostraron $p<0,0001$ en todos los casos. Esto indica que hay diferencias estadísticamente significativas en las medias de cada variable evaluada en función del estado de madurez. Por lo tanto, el estado de madurez, que se puede determinar fácilmente utilizando la Tabla de colores, es un factor crucial que influye en la actividad antioxidante de estos frutos. Esto se debe a que el cambio de color es la característica más evidente durante su proceso de maduración en la mayoría de las frutas. Adicionalmente, la variabilidad de la actividad antioxidante según el estado de madurez puede explicarse por el hecho de que la degradación del color verde está asociada a la síntesis de pigmentos cuyos colores van del amarillo al rojo violeta y que están ligados a la presencia de carotenoides y algunas antocianinas (del Pilar Pinzón, et al., 2007)

El estado de madurez 3 de la uchuva presentó una mayor capacidad reductora de hierro (Figura 7c) y mayor contenido de polifenoles totales (Figura 7d) con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros tres estados de madurez evaluados. En este mismo, los frutos de gulupa con estado de madurez 3 presentó una mayor actividad antioxidante cuantificada por todas la metodología y un contenido mayor de polifenoles totales (Figura 8). Estos estados de madurez que presentaron mayor capacidad antioxidante no son los óptimos para el consumo de

ninguna de las dos frutas, por lo tanto, representa una fruta con menor valor comercial; que podría usarse en procesos tecnológicos innovadores que permitan evitar desperdicios durante todo el proceso de postcosecha en frutas calidad exportación. Los resultados encontrados por Hou et al., 2021, corroboran este hecho, en su estudio evaluaron la actividad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) y el contenido total de polifenoles y flavonoides en pulpa de naranja en cinco diferentes estados de madurez; encontraron que todos los parámetros evaluados disminuían gradualmente a medida que la fruta maduraba. De acuerdo con los resultados anteriores, el estado de madurez 3 para ambas frutas fue seleccionado para continuar el desarrollo de todo el estudio.

La aplicación del ultrasonido durante el proceso de extracción de los CBs de la uchuva reveló que el uso de esta tecnología emergente aumenta la extracción de los polifenoles totales del fruto y, por consiguiente, la actividad antioxidante del extracto obtenido es mucho mayor que el obtenido de forma convencional (Figuras 9a, 9c y 9d). Estos resultados pueden explicarse por el hecho que los procesos de ultrasonido provocan procesos de cavitación que favorecen la transferencia de masa sin el uso de altas temperaturas (Serna-Jiménez et al., 2023), además demuestran que la extracción asistida por ultrasonido es un proceso de extracción eficiente y sostenible debido al uso de agua como solvente. Estos resultados son acordes a los reportados por Quintero-Quiroz et al., 2019 quienes estudiaron el efecto de la extracción asistida por ultrasonido de los CBs de las semillas de achiote. Los autores obtuvieron un extracto con una mayor actividad antioxidante y antimicrobiana que el extracto obtenido de manera tradicional, además, concluyeron que la aplicación de ultrasonido mejora el proceso de extracción, reduce el gasto energético y aumenta el rendimiento del proceso, además de favorecer algunas actividades biológicas como la actividad antimicrobiana y antioxidante atribuidas a los diferentes CBs. En el mismo sentido, Serna-Jiménez et al., 2023 concluyeron que, la extracción asistida por ultrasonido es más eficiente que la extracción convencional sólido-líquido en cuanto al rendimiento de extracción de los polifenoles de la pulpa de café con un requerimiento energético notablemente menor.

La composición fisicoquímica del fruto uchuva es similar a la caracterización reportada por Carrasco, 2008, en frutos nativos de Perú con: grasa: 0,0%; proteína: 1,9%; ceniza.1,0%; carbohidratos 17,3% y fibra total 6,3% (m/m), En nuestro caso, el contenido total de carotenoides

de 2057,80±405,4mgβ-caroteno/100g (Figura 10a) en peso húmedo fue significativamente mayor a la concentración reportada por Carrasco en 2008 de 2,64± 0,03mg β-caroteno/100g en peso seco y por Etzbach L. et al., 2020 de 11,85 mg/100 g en peso seco, adicionalmente el contenido de polifenoles (5,29 ± 0,34 mg GA/g (Figura 10b), también superior a los resultados reportados por Carrasco, 2008, que fue de 1,54 ±0,03 mg GA/g en pulpa liofilizada. Con respecto a la composición fisicoquímica del fruto de gulupa se encontró una similitud con los resultados reportados por Ramos dos Reis et al., 2018, con un contenido de: 1,09±0,04% de grasa, 6,53±0,23% de proteína, 2,95±0,14% de cenizas, 89,42±0,00% de carbohidratos y 1,40±0,18% (p/p) de fibra total. Tanto el contenido de carotenoides (3208,9 ± 367,1 mg β-caroteno/100 g; (Figura 10a) como el de polifenoles en el extracto de gulupa (9,12 ± 0,37 mg ácido gálico/g; (Figura 10b) fueron significativamente superiores a los valores reportados por Ramos dos Reis et al., 2018, quienes encontraron 0,29 ± 0,00 mg/100 g para carotenoides, y por Carmona-Hernandez et al. 2019, quienes reportaron 1,62 ± 0,09 mg ácido gálico/g para un extracto obtenido con metanol al 70%. Esta diferencia observada en el contenido de carotenoides entre los resultados informados y la literatura disponible puede atribuirse a diversos factores, como el estado de madurez, el tipo y forma de cultivo, el tiempo de cosecha y al pretratamiento de las muestras, así como como a la posible falta de precisión en los métodos espectrofotométricos, que tienden a sobreestimar el contenido de carotenoides (Bravo et al., 2015)

Por otra parte, de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 10, se encontró que el fruto de gulupa tiene una mayor concentración de compuestos carotenoides y compuestos polifenólicos que el fruto de uchuva, con diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, los resultados de la evaluación antioxidante demostraron que el fruto de uchuva presenta una mayor actividad que el fruto de gulupa (Figura 11). En la Figura 11a se muestra que el extracto de uchuva tiene una mayor capacidad de atrapar los radicales libres ABTS y DPPH; así como, una mayor capacidad para reducir el hierro férrico (FRAP). En el mismo sentido, en la Figura 11b se muestra que la concentración de malondialdehido (MDA) es menor cuando la yema de huevo es tratada con el extracto de uchuva, teniendo en cuenta que el MDA es el principal producto de la degradación de los hidroperóxidos generados por la oxidación de lípidos, se concluye que el extracto de uchuva tiene una mayor capacidad de inhibir la oxidación de lípidos que el extracto de gulupa. Para el caso

de los resultados obtenidos por ORAC, se encontró que la gulupa (32,44 ± 0,94 μM Trolox/g) fue la que presentó una mayor actividad antioxidante que la uchuva (23,02±0,36 μM Trolox/g). Esta diferencia puede ser debida a que la metodología ORAC es el único método evaluado que se basa en la transferencia del átomo de hidrógeno (HAT), es decir mide la actividad de un antioxidante por la capacidad de la muestra de eliminar radicales libres o ROS mediante la donación de un átomo de hidrógeno. En conclusión, el hecho de que la uchuva tenga una mayor actividad antioxidante que la gulupa, a pesar de que esta última tenga una mayor concentración de CBs, puede deberse a la presencia de otros compuestos que exhiben actividad antioxidante, como por ejemplo la vitamina C que puede actuar directamente al reaccionar con radicales peroxilos acuosos, e indirectamente al restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E (Bendich et al., 1986). Según reportes de varios autores, la uchuva tiene un mayor contenido de vitamina C que la gulupa; es así como en el trabajo realizado por Bazalar Pereda *et al.*, 2019; reportaron una concentración de 33,35 ± 0,37mg de ácido ascórbico/100 g de peso húmedo en uchuvas cultivadas en la región andina de argentina; y Ramadán, 2011 reportó 43 mg de ácido ascórbico/100 g en peso húmedo de uchuva. Mientras que, para la gulupa Franco *et al.*, 2014 reportó solo una concentración de 24,4mg de ácido ascórbico/100 g de gulupa colombiana a los 7 días de ser cosechada.

En general, la bioactividad de los frutos está directamente relacionada con su perfil químico, de aquí la importancia de caracterizar el perfil de los CBs presentes en las frutas estudiadas, de acuerdo con el estudio realizado por Etzbach et al., 2018 quienes encontraron 53 carotenoides presentes en frutos de uchuva en diferentes estados de maduración e identificaron tentativamente 42, lograron concluir que la composición de carotenoides de la uchuva estaba dominada por todos los isómeros (E) de β-caroteno. Para el caso de la gulupa existe una evidente falta de estudios sobre su composición de compuestos carotenoides; sin embargo, hay algunos descritos para el maracuyá, por ejemplo, Pertuzatti *et al*., 2015, reportaron la presencia de β-caroteno, licopeno β-criptoxantina y luteína en el maracuyá amarillo. En este estudio, se identificaron por HLPC-MS algunos de los carotenoides presentes en ambos extractos de frutas (Tabla 6), dentro de los que se encuentran: la luteína, la luteína 5,6-epóxido taraxantina, la zeinoxantina, el α y β-caroteno, la criptoxantina, el fitoeno, el fitoflueno, el licopeno, todos los isómeros (E) de miristato de α-criptoxantina, todos los isómeros (E) de anteraxantina, todos los isómeros (E) de violaxantina y

finalmente se logró identificar la presencia del palmitato de violaxantina únicamente en el extracto de gulupa. Para el caso de los polifenoles, se lograron identificar un total de 37 compuestos en ambos extractos (Tabla 7), dentro de los compuestos con notable actividad biológica, los más destacados en términos de actividad antioxidante y anticancerígena son: catequina, rutina, ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido clorogénico y apigenina (Hong et al., 2020; Farha et al., 2022; Hitl et al., 2021; Ekbatan et al., 2018; Zayed et al., 2022). Estos resultados concuerdan con los de Carmona-Hernández 2021, quienes identificaron la presencia de catequina, epicatequina y ácido rosmarínico en un extracto metanólico de gulupa colombiana, además, demostraron que estos tres compuestos polifenólicos son los de mayor concentración en este fruto. Del mismo modo, Gomes *et al*., 2017 reportaron la presencia de isovitexina en la gulupa. Por otra parte, en el trabajo realizado por Abou Baker y Mohammed, 2022 encontraron que los polifenoles con mayor concentración en la uchuva son la rutina y el ácido clorogénico.

10.2. Formulación de la mezcla de frutas

La Figura 12 presenta los gráficos de traza para una mezcla de referencia (0,5-0,5) en el punto de intersección de las líneas. La proporción de uchuva en la mezcla está representada por la línea azul, mientras que la proporción de gulupa se indica con la línea roja en todos los casos. En estos gráficos se puede observar el comportamiento de la mezcla en relación con las variables de respuesta estudiadas. Las Figuras 12a, 12b y 12c muestran que, a medida que aumenta la proporción de uchuva (línea azul) en la mezcla, también se incrementa la actividad antioxidante, cuantificada mediante los métodos ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente. En el caso de ORAC, la Figura 12d indica que, a medida que aumenta la proporción de gulupa en la mezcla, también aumenta la actividad antioxidante medida por ORAC. Estos resultados son consistentes con los presentados previamente en la Figura 11, donde se ha cuantificado que la uchuva tiene una actividad antioxidante mayor que la gulupa según ABTS, DPPH y TBARS, mientras que la gulupa presenta una actividad antioxidante mayor que la uchuva cuantificada por ORAC. Estas gráficas también sustentan el comportamiento del modelo matemático descrito. Por ejemplo, la Figura 12c (FRAP) tiene un comportamiento lineal que concuerda con la ecuación 18, donde las variables cuadrática y cúbica son prácticamente insignificantes en comparación con las otras dos variables

lineales. La optimización de múltiples respuestas se realizó para maximizar la actividad antioxidante en la mezcla de frutas cuantificada por todas las metodologías evaluadas, encontrándose que la mezcla de un 83% de extracto de uchuva con un 17% de extracto de gulupa se logra la máxima capacidad antioxidante con un valor de deseabilidad del 97%. En la tabla 9 se observa los valores obtenidos para la validación experimental de la actividad antioxidante de la mezcla optima del diseño experimental de mezclas; el error relativo más alto (19,69%), fue para la actividad antioxidantes cuantificada por TBARS, la cual fue la que menos ajuste presentó en el diseño experimental con un r2 de 55,39 y un p=0,2230 , mientras que el error relativo obtenido para la actividad antioxidante cuantificada por FRAP, DPPH y ABTS fue de -12,9, -9,80 y 3,2 ; respectivamente.

De acuerdo con Wang *et al.*, 2011 una mezcla de diferentes alimentos con una actividad antioxidantes determinada puede exhibir interacciones aditivas, sinérgicas o antagónicas entre sus diferentes CBs. El antagonismo ocurre cuando la suma de los efectos es menor que la suma matemática prevista. Estos efectos antagónicos pueden tener implicaciones negativas para la salud de las personas que intentan aumentar la ingesta de antioxidantes mediante el consumo de mezclas de alimento. Un comportamiento sinérgico pudo observarse en las unidades experimentales 1 y 5 para la variable de respuesta DPPH (Tabla 8), donde la suma de las actividades antioxidantes esperadas debería haber sido de 12,77µMtrolox/g, pero el resultado experimental fue de 14,27 y 14,37µM Trolox/g para las unidades 1 y 5, respectivamente; correspondiente a una mezcla en relación 0,5:0,5. Las demás variables de respuesta muestran resultados similares, excepto FRAP cuyo resultado debería haber sido 18,56µM Trolox /g y las unidades 1 y 5 del diseño de mezcla experimental muestran valores de 18,82 y 17,47µM trolox/g, respectivamente, lo que significa un comportamiento aditivo. En el mismo sentido la unidades experimental 3, que corresponde a la mezcla de uchuva:gulupa en relación 0,75:0,25, arrojó un valor experimental de 16,05µM trolox/g para DPPH mientras que el esperado era 14,15µM trolox/g, lo que implica un comportamiento sinérgico entre ambos extractos que también se puede observar para ABTS, FRAP y ORAC con valores esperados de 9,67 trolox/g, 17,45 trolox/g y 2123,94 trolox/100g, respectivamente. En el mismo sentido, en el trabajo realizado por Wang *et al*., 2011, evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* mediante DPPH, FRAP y ORAC, y el contenido total de polifenoles de extractos

metanólicos de 11 alimentos diferentes: tres frutas (frambuesas, moras y manzanas), cuatro verduras (brócoli, tomates, champiñones y coliflor morada) y cuatro legumbres. (soja, frijol adzuki, frijol rojo y frijol negro). Estos extractos se evaluaron individualmente y luego en mezclas binarias en proporción 1:1 para un total de 55 mezclas. Los resultados demostraron que diferentes categorías de alimentos exhiben un potencial antioxidante diferente, el grupo de vegetales tuvo la menor capacidad antioxidante en comparación con los grupos de frutas y legumbres. En todas las mezclas se observaron los tres tipos de interacciones (sinérgica, aditiva y antagonista); entre la combinación de alimentos dentro de una misma categoría se evidenció que el 13% tiene interacciones sinérgicas, el 68% interacciones aditivas y el 21% interacciones antagónicas, mientras que la combinación entre las categorías mostró un 21% de interacciones sinérgicas, el 54% interacciones aditivas y 25% interacciones antagónicas. Por lo tanto, las combinaciones de distintas categorías de alimentos tienen más probabilidades (21%) de demostrar interacciones sinérgicas en comparación con las combinaciones dentro de una categoría (13%). Estos resultados demuestran que las interacciones entre antioxidantes no solo pueden producir efectos positivos sino también negativos, ya que la combinación de alimentos antioxidantes no garantiza que la actividad antioxidante sea igual al valor esperado. En otro estudio realizado por Schiassi *et al.,* 2020, quienes optimizaron una mezcla de jugo de bayas elaborado con agua de coco, utilizando el diseño de mezcla y la metodología de superficie de respuesta para verificar la influencia de las frutas sobre los factores físicos, fisicoquímicos, nutricionales y características sensoriales del producto final. Los componentes de las mezclas fueron: fresa, mora, frambuesa roja, sucralosa y agua de coco verde con proporciones establecidas de 50% de la mezcla, 50% de agua de coco y 0,05 g de sucralosa por cada 1L de jugo. Los resultados mostraron que la formulación compuesta por mora y frambuesa roja (0,5:0,5) presentó la mayor actividad antioxidante cuantificada por ABTS y DPPH y un mayor contenido de compuestos fenólicos y antocianinas, incluso mayor que los jugos de frutas individuales, demostrando nuevamente que las mezclas de diferentes alimentos antioxidantes pueden tener un posible efecto sinérgico.

10.3. Optimización del proceso de gelación iónica asistida por electropulverización:

Se evidenció que el análisis de varianza (ANOVA) para los resultados del diseño experimental de superficie de respuesta, utilizado en la optimización del proceso de obtención de partículas de hidrogel mediante gelación iónica y electropulverización (Tabla 9), indica que los factores estudiados (el caudal y la altura, y su interacción lineal) tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el valor del TP. Este comportamiento se observa en la gráfica de superficie de respuesta (Figura 13a), donde se muestra que a menor caudal y menor altura se logra disminuir el TP. Además, el análisis ANOVA también reveló que el caudal y el voltaje tienen un efecto estadísticamente significativo sobre E. En la Figura 13b se observa la interacción entre estos dos factores respecto a la E; se puede notar que al disminuir el caudal y aumentar el voltaje se maximiza el valor de E. De manera similar, el trabajo de Partovinia y Vatankhah., 2019 quienes, en un proceso de gelación iónica asistido por electropulverización, reportaron que la altura tiene un efecto significativo sobre el TP, mientras que el caudal y el voltaje lo tienen sobre la E de las partículas. Por el contrario, Alkhatib et al., 2020 encontraron que el TP estuvo significativamente afectado por el voltaje aplicado durante la extrusión y que, además, la interacción caudal-voltaje muestra que el TP no cambia a un voltaje de 0kV. Adicionalmente, Además, al aumentar el caudal de 0,1 ml/min a 0,8 ml/min, el TP se mantuvo en 1,4 ± 0 mm y 1,41 ± 0,02 mm, respectivamente; mientras que el TP aumentó significativamente de 0,67 ± 0 mm a 0,1 ml/min a 0,86 ± 0,04 mm a 0,8 ml/min cuando se aplicó un voltaje de 6 kV. Las diferencias con este estudio pueden deberse, a que en el diseño experimental aplicado en este trabajo no se tuvo en cuenta el nivel 0kV para el voltaje, y por lo tanto el rango de trabajo de este factor puede ser la causa por la que no tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el TP. Alkhatib et al. 2020 también, encontraron que el TP aumentó de 1,35mm a una altura de 15cm hasta 1,41mm a una altura de 25cm ($p<0,05$), adicionalmente, el TP también aumentó de 1,31 a 1,46 mm a medida que el caudal aumentó de 1 a 2ml/min ($p<0,05$), resultados que concuerdan con los reportados en este estudio (Tabla 9 y Figura 13a).

Para el caso al rendimiento del proceso (RP), los tres factores evaluados, sus términos lineales y cuadráticos y sus interacciones, excepto la interacción cuadrática del voltaje, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el RP ($p<0,05$) (Tabla 9). En la Figura 13c se muestra el efecto de la interacción entre el caudal y la altura sobre el RP. En este gráfico se observa que el RP

aumenta cuando se utilizan los valores mínimos de ambos factores. Además, es posible visualizar el efecto tan grande que tiene la disminución del voltaje con respecto al aumento del RP, cuando se mantiene constante la altura. Finalmente, los tres factores y sus interacciones, excepto nuevamente la forma cuadrática de voltaje, tienen un efecto significativo sobre la RA (Tabla 9). En la Figura 13d se observa que cuando se aumenta el caudal y se disminuye la altura, se aumenta la RA de las partículas. El tamaño, la esfericidad y la RA de las partículas de hidrogel son factores cruciales para muchas aplicaciones alimentarias, ya que las partículas más pequeñas son más resistentes a las fuerzas de corte y compresión por lo tanto poseen grandes espacios interfaciales sólido-líquido que facilitan la transferencia de masa, mientras que la esfericidad de la partícula puede afectar su estabilidad mecánica y química, por lo que las partículas más esféricas reportan un valor más alto de resistencia del gel. En el mismo sentido, las partículas con mayor RA presentan a las mayores áreas superficiales de contacto favoreciendo la transferencia de masa y por ende la liberación (Partovinia y Vatankhah, 2019).

Las Figuras 14a y 14b ilustran el efecto de la interacción de la altura y el voltaje en la distribución del TP para las partículas obtenidas a alturas de 11,5 y 25cm y voltajes de 17,5 kV y 25 kV, respectivamente. La Figura 14a muestra una distribución más amplia en comparación con la Figura 14b. Este fenómeno puede explicarse por el hecho de que, al aumentar la altura (definida como la distancia entre la boquilla y el baño gelificante) el campo eléctrico disminuye, lo que provoca un incremento en el TP. Teóricamente, el aumento del voltaje debería conducir a una disminución del TP; sin embargo, lo realmente determinante es el campo eléctrico generado. Por lo tanto, es necesario ajustar el voltaje en función de la distancia para mantener el campo eléctrico en un nivel óptimo (Morais et al., 2020). Este comportamiento se observa en la Figura 13a y se respalda por los resultados del análisis de varianza (ANOVA) presentados en la Tabla 9, que muestran que la interacción entre el voltaje y la altura tiene un impacto significativo (p=0,0284) sobre el TP. Por otra parte, en la Figura 14c se muestra el efecto del voltaje en la distribución de TP a 4,9 kV y 20 cm de altura, aquí se observa que a voltajes más bajos (4,9 kV) la distribución del TP es más amplia en comparación con voltajes más altos (25 kV y 20 cm; (Figura 14b)), donde la distribución de TP es más homogénea. La Figura 14d ilustra el efecto del caudal en la distribución del TP a un caudal de 4,33 ml/min, donde la distribución es más homogénea en

contraste con caudales más altos de 27,2 ml/min (Figura 14e) que muestran una distribución del TP notablemente más amplia. Similarmente, Joaquim *et al*., 2022 reportaron que caudales de 0,3 y 0,45ml/h resultaron en un TP promedio de 2,671µm ± 0,256 y 3,563µm±0,275, respectivamente, mientras que con caudales más altos de 0,6; 0,8 y 1,0ml/h produjeron partículas con un mayor TP promedio.

Finalmente, con un valor de deseabilidad del 87% se obtuvo que las condiciones óptimas del proceso de gelación iónica asistida por electropulverización para minimizar el TP y maximizar el RP, la E y la RA, fueron: un caudal de 4,33ml/min, una altura de 11,59cm y un voltaje de 12,56kV; a estas condiciones se predicen un valor mínimo del TP (400,89µm) y valores máximos de E (0,55), RP (87,50%) y de RA (0,63). Esta optimización fue validada experimentalmente y se obtuvieron los siguientes resultados: 929,51±374,48µm de TP, un valor de E de 0,53±0,11, un RP del 89,59±2,25% y 0,65±0,16 de RA, con errores relativos entre el valor predicho y el experimental de: 56,87%, 3,77%, 2,33% y 3,08%, respectivamente para cada variable respuesta (Tabla 9). El error relativo tan amplio para el TP (56,87) puede deberse a la amplia distribución del TP obtenido en algunas unidades experimentales, como se muestra en la Figura 14, lo que influye directamente en la alta desviación estándar obtenido a nivel experimental (929,51±374,48µm). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Zakeri *et al*., 2019, quienes encontraron que las condiciones óptimas para minimizar el TP de partículas de alginato mediante electropulverización eran un caudal mínimo de 0,33ml/min y un voltaje de 9 kV con valores de TP entre 290 y 300µm. Del mismo modo, en el trabajo realizado por Alkhatib et al., 2020 encontraron que a un voltaje de 4kV y un caudal de 0,8ml/min lograron producir partículas esféricas de alginato de calcio con TP de 1100 µm.

10.4. Formulación de las partículas de hidrogel:

Se evidenció en el análisis de varianza (ANOVA) para los resultados de la selección de la carga de las partículas de hidrogel (Tabla 10) y en la prueba de LSD observada en la Figura 15a que, la mayor carga de polifenoles (162,97±15,82mgAG/g) se obtiene con la concentración de sólidos de la mezcla de frutas del 6%, seguida de una carga de polifenoles de 94,39±7,34 mgAG/g para las

partículas formuladas con 4% y de una carga de 45,46±2,51mgAG/g para las partículas formuladas con 2% de sólidos de fruta. Así mismo, en la prueba de LSD observada en Figura 15b se evidenció que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las partículas con 4% y 6% de sólidos (88,88±7,92% y 88,61±5,90%, respectivamente), pero si existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a las partículas formuladas con 2% de sólidos de frutas (43,62±6,16%). Por otro lado, si bien la EE de las partículas con 2% de frutas fue de 50,16±3,29% y es estadísticamente diferente al de las partículas con 4% (56,74±3,20%), estas no muestran diferencias estadísticas (Figura 15c) con respecto a las formuladas con 6% de sólidos de fruta (51,29±5,72%). Por lo tanto, la concentración de sólidos de la mezcla de frutas del 6% es la formulación más adecuada para incorporar en las partículas de hidrogel.

El ANOVA del diseño experimental de mezclas (Tabla 11) demostró que las diferentes formulaciones de AS-HPMC-GA, como material de pared de las partículas de hidrogel, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre todas las variables respuestas tenidas en cuenta en el experimento, excepto para la bioccesibilidad de carotenoides. En los gráficos de trazas se evidencia que al aumentar la proporción de GA (línea fucsia) en la formulación se favorece la bioaccesibilidad de los polifenoles (Figura 16a) y de los carotenoides (Figura 16b). Por otro lado, en la Figura 16c se muestra que el aumento de la proporción de HPMC (línea roja) así como el aumento de AS (línea azul) favorecen la EE de los polifenoles, mientras que, esta se reduce al aumentar la proporción de GA (línea fucsia).

En la Tabla 11 también se observa que algunas de las unidades experimentales dieron valores por encima del 100% para la bioaccesibilidad de los polifenoles y para la retención de la actividad antioxidante por ABTS y FRAP, estos resultados pueden ser debido a los procesos de transformación de los polifenoles que ocurren en el tracto gastrointestinal, ya que los polifenoles pueden hidrolizarse como resultado de los cambios enzimáticos y de pH; por ejemplo, en el estudio realizado por García-Martínez et al., 2023 encontraron que algunos polifenoles pueden cambiar su estructura química debido a cambios de pH durante la digestión; particularmente los ácidos fenólicos cítricos, como el ácido ferúlico, que pueden aumentar después de la digestión, ya que las proteasas (como la pepsina) y el pH bajo (≤ 3) pueden favorecer la liberación del ácido fenólico y

mantener su estabilidad química en la matriz alimentaria (Agudelo et al., 2018). Estos resultados también con acordes con los presentados por Agudelo et al., 2018, quienes informaron un aumento de 2,81 veces en la bioaccesibilidad del ácido cafeico y elágico durante una digestión gástrica simulada del arándano andino (*Vaccidium meridionale*). De manera similar, en el estudio realizado por Sánchez-Velázquez et al., 2021 encontraron que durante una digestión gástrica simulada algunos polifenoles, como la cianidina-3-rutinósido, presente en moras, exhibieron una bioaccesibilidad del 460% para moras silvestres y del 314% para moras cultivadas, adicionalmente, los autores reportaron que la petunidina-3-glucósido en las moras silvestres presentaron una bioaccesibilidad del 629%. En el mismo trabajo se estudiaron dos isómeros del ácido vanílico (ácido vanílico iso-1 y ácido vanílico iso-2), el ácido vanílico iso-1 tuvo una bioaccesibilidad del 118% para las moras cultivadas y del 842% para las silvestres; mientras que el ácido vanílico iso-2 tuvo una bioaccesibilidad del 175% y del 30% para las moras cultivadas y las silvestres, respectivamente. Finalmente, los autores concluyen que las condiciones de digestión son uno de los principales factores responsables de la biotransformación de polifenoles de alto peso molecular. Por tanto, la digestión aumenta la cantidad de metabolitos fenólicos (fenólicos de bajo peso molecular), potenciando su bioaccesibilidad; lo que podría tener un efecto directo sobre su biodisponibilidad y su bioactividad. En nuestro trabajo se logró mejorar la bioaccesibilidad *in vitro* de los CBs, lo que se evidencia en las Figuras 16a y 16b que demuestran que al aumentar la proporción de GA en la formulación de las partículas se favorece la bioaccesibilidad, tanto de los polifenoles como de los carotenoides, de la misma manera, García-Martínez, et al., 2023 encontraron que al incorporar GA en una formulación liofilizada del extracto de coproductos de jugo de naranja se mejora la bioaccesibilidad *in vitro* de polifenoles y carotenoides.

El rango de valores obtenidos para la EE de los polifenoles (Tabla 11) fue similar a los reportados por Martinović et al., 2023, quienes lograron una EE del 40,08% encapsulando polifenoles de un extracto de orujo de uva usando solo AS, y aumentaron la EE combinando el AS con gelatina y quitosano a concentraciones de 52,63% y 56,25%, respectivamente. En este estudio la EE de los polifenoles varió desde un valor mínimo del 40,80%, para las partículas formuladas con 0,5:0,5 de AS:GA, hasta un valor máximo del 64,7% para la mezcla de 0,5 de AS y 0,5 de HPMC (Tabla 11). Estos hallazgos se corroboran también en la Figura 16c en donde se observa

que tanto el aumento en la proporción de HPMC (línea roja) como el aumento del AS (línea azul) favorecen la EE de los polifenoles; y por el contrario, el aumento en la proporción de GA (línea fucsia) lo reduce. Estos resultados demuestran que la solubilidad del recubrimiento usado y el ingrediente activo, así como sus interacciones, son muy importantes para la EE; por ejemplo, el aumento en la EE debida al HPMC en la formulación podría deberse a que este puede reducir la tasa de permeabilidad al agua en la matriz polimérica, reduciendo así la pérdida de compuestos polifenólicos, al disminuir la difusividad efectiva a través de la microestructura del hidrogel (Gayatri et al., 2021).

El TP y la E de las partículas de hidrogel son propiedades físicas que dependen del método de encapsulación y del material de recubrimiento utilizado y afectan las propiedades dinámicas y cinéticas del material encapsulado. Por ejemplo, las partículas que presenta una EE más alta, suelen tener un mayor espesor, lo que provoca una liberación más lenta, mientras que las partículas con un tamaño más pequeño tienen un área de contacto mayor, lo que facilita una liberación más rápida de los CBs al medio (Martinović et al., 2023). El TP más bajo se logró para la unidad experimental #10 con una formulación de 0,67 de AS, 0,17 de HPMC y 0,17 de GA, este comportamiento logra observarse en la Figura 16d donde a medida que aumenta la proporción de AS y HPMC en la mezcla el TP disminuye, por su parte, los valores de esfericidad más altos corresponden a las unidades experimentales #6 y #11 con valores de 0,759 y 0,739, respectivamente (Tabla 11), en cuyas formulaciones solo contenían AS, en el mismo sentido, la Figura 16e se observa como a medida que aumenta la proporción de AS en la mezcla, la E de las partículas aumenta. Resultados que concuerdan con los encontrados por Martinović *et al.* 2023, quienes concluyeron que las micropartículas elaboradas con AS tenían los valores más grandes de circularidad, que es una medida de la desviación de esfericidad de las partículas, lo que indica que las micropartículas de AS tenían una forma más esférica en comparación con las partículas de alginato-gelatina y alginato-quitosano que también fueron evaluadas.

Con una deseabilidad del 92% la formulación que logró maximizar la bioaccesibilidad de los polifenoles hasta un 213,17±19,57%; la EE de los polifenoles hasta un 89,46±6,64%, la retención de la actividad antioxidante por ABTS hasta 68,38±0,00%, y por FRAP hasta 95,62±11,81% y la

E a 0,69 y al mismo tiempo, logró disminuir el TP hasta 1194,48±167,34 µm, fue una mezcla compuesta por 75% AS y 25% GA. Estos resultados están en concordancia con los de Ćujić-Nikolić et al. 2018 quienes usaron GA como material de encapsulación por secado por aspersión de polifenoles de aronia y obtuvieron una EE de los polifenoles del 85,29±6,15%. La morfología de estas partículas de hidrogel optimas formuladas con 6% de solidos de la mezcla de frutas y fue una mezcla de biopolímeros compuesta por 75% AS y 25% GA se observa en la Figura 17, en la cual se evidenció que la superficie de las partículas en blanco y con la mezcla de frutas son diferentes entre sí, para el caso de las partículas en blanco (Figuras 17a, b y c) se observó una superficie lisa y una estructura porosa con cavidades. La incorporación de la mezcla de frutas en las partículas de hidrogel (Figuras 17d, e y f) dio lugar a una superficie más rugosa y a un número menor de cavidades en el interior comparadas con las partículas en blanco. Las micrografías SEM también mostraron un TP similar al obtenido mediante el software image J ® (1194,48±167,34 µm).

La formulación de partículas de hidrogel con AS y GA tienen la ventaja de que ambos polímeros son biodegradables, biocompatibles, y además se les considera seguros (GRAS), según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (USFDA) (Nayak et al., 2012). La GA es un polisacárido complejo derivado del exudado natural del árbol Acacia senegal cargado negativamente a un pH superior a 2,2, cuyas tres fracciones principales son el péptido arabinogalactano, la proteína arabinogalactano y la glicoproteína, sus principales aminoácidos son hidroxiprolina, serina, ácido aspártico y treonina. Por otro lado, el AS tiene carga negativa a un pH superior a 3,5. Es un polisacárido lineal natural compuesto por unidades repetidas de ácido β-D-manurónico con enlaces (1,4) (bloques M, pKa = 3,38) y ácido α-L-gulurónico (bloques G, pKa=3,65). El AS se puede reticular para formar hidrogeles mediante una variedad de métodos de reticulación iónicos y covalentes. Independientemente del hecho de que ambos polisacáridos están cargados negativamente a pH 4,5 (pH utilizado en nuestro proceso para evitar la precipitación del AS), y que no debería haber una fuerte atracción electrostática entre estos dos, Sabet *et al.* 2021 encontraron que la goma arábiga interactúa con el alginato a pH de 4, gracias interacciones electrostáticas entre regiones cargadas positivamente en la proteína de la GA o sus fracciones, con grupos carboxilato cargados negativamente del AS

10.5. Actividad antioxidante para la mezcla de frutas, las partículas de hidrogel y sus fracciones bioaccesibles:

El contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC en las PHF fue menor, en comparación con la F, con diferencias estadísticamente significativas. Estas diferencias podrían deberse a que el proceso de producción de las PHF presentó una EE de polifenoles de 89,46 % y a que la liberación de los CBs en el TGI probablemente no fue completa. Por si parte, la bioaccesibilidad de los polifenoles de F aumenta después del proceso de digestión en 1,13 veces, mientras que la de las PHF aumentó en 2,22 veces (Tabla 12); sin embargo, este aumento significativo puede deberse en parte al contenido de polifenoles encontrado en las PHB después del proceso de digestión. Este resultado es similar al encontrado por Chen *et al*., 2016, quienes reportaron un aumento de 1,26 veces en el contenido de polifenoles totales de *Rubus hirsutus Thunb* al final del TGI. Un comportamiento similar se encontró para la actividad antioxidante medida por ORAC, y puede deberse al hecho que el método ORAC también se presenta como un simulador de la actividad antioxidante de los fenoles en sistemas biológicos (Mirghani et al., 2018). El valor de ORAC para la mezcla de frutas (F) fue de 47,06±9,31µMTrolox/100g en peso húmedo (784,33 Trolox/100g en peso seco), Sin embargo, teniendo en cuenta los valores previamente descritos para la uchuva de 2302,0±36µMTrolox/100g y para la gulupa de 3244,0±94 µMTrolox/100g (Figura 11), para los extractos liofilizados en peso húmedo, el valor de ORAC esperado sería 2859,57Trolox/100g en peso seco para una mezcla de estos en relación 0,83:0,17, no obstante, el valor esperado es 3,65 veces mayor que el experimental, lo que puede indicar un valor subestimado. El comportamiento anterior puede deberse a posibles interacciones como la formación de enlaces de hidrógeno entre el AS y las moléculas de los polifenoles (Biao et al., 2019) o la interacción de diferentes grupos polares de los polifenoles con los grupos hidroxilo o carboxilato del AS (Anbinder et al., 2011). Por otro lado, los polifenoles pueden unirse de forma no covalente a polisacáridos como la GA, afectando la capacidad de unión, el peso molecular, la flexibilidad estructural y el número de grupos OH, además del contenido en CBs, los extractos de frutas también contienen lignina y polisacáridos sin almidón como celulosa, hemicelulosa y pectina que también pueden contribuir a estas interacciones (Ćujić-Nikolić et al.,

2018). Todas estas interacciones pueden explicar la gran diferencia entre los valores ORAC de las muestras y sus fracciones bioaccesibles (Tabla 12). Además, pueden disminuir la actividad antioxidante de las PHF medida por FRAP, ORAC y ABTS en comparación con la F (Tabla 12). Sin embargo, la actividad antioxidante cuantificada por ABTS y FRAP antes y después de la digestión gastrointestinal *in vito* tanto para la F como para las PHF no evidencio diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos (Tabla 12). En el trabajo realizado por Aguirre-Calvo et al., 2022 evaluaron la bioaccesibilidad *in vitro* de polifenoles encapsulados en partículas de hidrogel de alginato de calcio en diferentes matrices alimentarias (una galleta dulce y un producto tipo gomita llamado delicia turca), obtuvieron en una menor bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en el dulce turco en comparación con las galletas. sin embargo, la actividad antioxidante cuantificada por ABTS y FRAP de los compuestos bioaccesibles en el dulce turco fue mayor en comparación con las galletas, por lo tanto, enfatizan en que diferentes matrices ofrecen resultados distintos en términos de bioaccesibilidad por varias razones, como las interacciones entre compuestos, la composición química y sus características físicas, como el tamaño de partícula, la solubilidad, asociación con complejos indigeribles, así como los procesos de preparación de alimentos.

Los compuestos fenólicos se almacenan en las estructuras celulares de las frutas y están unidos a macromoléculas, como proteínas y péptidos (que unen el grupo fenólico del anillo de fenol con el grupo de péptidos –NH) o carbohidratos (preferidos por enlaces glucosídicos α y β). Estas macromoléculas sufren una marcada degradación en el tracto gastrointestinal, convirtiéndose en azúcares biodisponibles y pequeños péptidos/aminoácidos, y o compuestos fenólicos, lo que en ocasiones da lugar a la liberación de los CBs más bioaccesibles y con capacidad de entrar en la circulación sanguínea y llegar a los órganos (Hurtado-Romero et al., 2021). Por ejemplo, las condiciones fisicoquímicas de la cavidad bucal (pH, electrolitos, temperatura, oscuridad, disminución del contenido de O_2, enzimas, etc.) tienen una influencia negativa en la estabilidad de algunos compuesto polifenólicos con alto peso molecular, tal es el caso de las antocianinas que generalmente su paso por la cavidad oral resulta en una degradación del compuesto; recientemente, se ha sugerido que la amilasa es la responsable de la desglicosilación de las antocianinas cuyos subproductos más comunes son los ácidos protocatequiico, cafeico, gálico y vanílico. Los últimos

tres subproductos podrían producirse mediante otros procesos de escisión espontánea, descarboxilación, carboxilación, hidratación simple o deshidratación, metilación del ácido protocatequiico y/o hidratación simple + carboxilación del ácido gálico de las antocianinas como la cianidina presente en los extractos de uchuva y gulupa (Tabla 7). Asimismo, el ácido ferúlico es un producto intermedio del catabolismo de los flavonoides, y el ácido cafeico es un ácido hidroxicinámico, cuyos principales metabolitos son los isómeros del ácido vanílico, presente también en los extractos de uchuva y gulupa (Tabla 7), que podrían producirse por escisión espontánea del ácido protocatequiico (Sánchez-Velázquez et al., 2021). Todas estas reacciones pueden explicar el aumento de la concentración de los polifenoles después de la digestión gastrointestinal para la mezcla de frutas encapsuladas y sin encapsular (Tabla 12), ya que los CBs pueden transformarse en otros compuestos con diferente bioaccesibilidad y actividad biológica afectando el potencial antioxidante original de cada uno de estos componentes estudiados (Cilla et al., 2009), incluidos, además, los biopolímeros utilizados para la fabricación de las partículas de hidrogel, ya que por ejemplo, en el estudio realizado por Mirghani et al. 2018 encontraron una actividad antioxidantes relevante cuantificada por ORAC para diferentes muestras de GA de hasta 3266±7 µMTrolox/100 mg; 1877±7µMTrolox/100 mg y 976,6±4,8 µMTrolox /100 mg además discuten que varios estudios encontraron que la GA podría mejorar el estado antioxidante del cuerpo humano al proteger el hígado mediante la modulación de la expresión de genes de estrés oxidativo. Estos resultados pueden sugerir que tanto la GA como el AS pueden tener una actividad antioxidante relevante después del proceso de digestión.

10.6. Efecto anti-proliferativo de las partículas de hidrogel sobre las células del carcinoma colorrectal humano

La actividad antioxidante y anti-proliferativa de los polifenoles está asociada a sus propiedades anticancerígenas y sus efectos sobre el ciclo celular y la apoptosis. Específicamente, los anillos fenólicos que presentan pueden aceptar electrones para formar radicales fenoxilo relativamente estables, que protegen a las células del daño provocado por reacciones oxidativas. Así mismo, se ha demostrado que estos compuestos ejercen efectos citotóxicos contra células cancerosas, al inducir la detención del ciclo celular y promover la apoptosis (Arango et al., 2017).

Algunos de los polifenoles identificados en la uchuva y la gulupa (Tabla 7) han mostrado actividad anticancerígena, como la catequina (Hong et al., 2020), la rutina (Farha et al., 2022), el ácido rosmarínico (Hitl et al., 2021), el ácido cafeico y el ácido clorogénico (Ekbatan et al., 2018), De manera similar, la apigenina ha demostrado su capacidad para inducir la apoptosis y detener el ciclo celular (Zayed et al., 2022).

Los resultados mostrados en la Figura 18a indican que los mayores efectos antiproliferativos se obtuvieron con los tratamientos de la F y de las PHF. Para el caso del modelo no tumoral (células caco-2 diferenciadas), solo la F tuvo un efecto anti proliferativo significativo sobre la viabilidad celular (Figura 18b), sin diferencias significativas respecto las PHF y con diferencias estadísticamente significativas con respecto al blanco de digestión (B) y con las PHB. Estos resultados sugieren que la encapsulación de compuestos bioactivos (CBs) no disminuye su actividad anti-proliferativa, a pesar de los hallazgos previos que indicaban un menor contenido de polifenoles y actividad antioxidante en las PHF en comparación con la F. Además, el menor efecto antiproliferativo (no significativo) de las PHF en comparación con la F también podría atribuirse a la falta de liberación completa de los CBs, resultando en una dosis liberada que posiblemente no alcanzó el umbral eficaz para reducir la viabilidad celular tanto como la muestra F. Coincidiendo con estos hallazgos, Zayed et al., 2022 documentaron un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración de la apigenina en líneas celulares de carcinoma hepatocelular (HePG-2) y líneas celulares Hela. De manera similar, Tsai y Chen; 2016 informaron efectos antiproliferativos, observando una disminución de la viabilidad celular dependiente de la dosis en células de adenocarcinoma de próstata (PC-3) y fibroblastos (CCD-986SK) tras el tratamiento con extractos de catequina, ya sea en forma libre o en nanoemulsión. Su estudio halló una alta viabilidad celular (92,7%) para la dosis más baja de extracto de catequina (2,5 µg/ml), mientras que al aumentar la dosis a 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml y 30 µg/ml, la viabilidad celular disminuyó a 92,1%, 75,7%, 75,2%, 28,6% y 5,9%, respectivamente, en células PC-3, y a 88,1%, 61,6%, 44%, 15% y 2,7% en CCD-986SK. Igualmente, El-Beltagi *et al.*, 2019, evaluaron la actividad antioxidante por DPPH y la actividad anticancerígena *in vitro* en una línea celular de cáncer de pulmón humano y en una línea de adenocarcinoma colorrectal de un extracto de frutos de uchuvas. Sus resultados mostraron que el porcentaje de viabilidad en la línea celular de cáncer de pulmón se redujo con el

aumento de las concentraciones del extracto, mientras que la viabilidad en el adenocarcinoma colorrectal se vio afectada únicamente a altas concentraciones (800 µg/ml). Esto sugiere que el extracto de frutos de uchuva podría inhibir las células cancerosas mediante la modulación de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, alterando la activación metabólica de carcinógenos.

La muerte celular apoptótica se considera un destino común para células normales; sin embargo, esta ruta se inhibe en células malignas. Durante la muerte celular apoptótica, la célula muestra fragmentación del núcleo y distorsión de la membrana plasmática, lo que activa el proceso de fagocitosis. En contraste, en el modo de muerte celular necrótica, la célula se extiende debido a la permeabilidad de la membrana plasmática, resultando en una explosión que causa inflamación en las células cercanas (Zayed et al., 2022). Tras el tratamiento con las fracciones bioaccesibles de la F, de las PHF y de las PHB (Figura 19), el porcentaje de células en apoptosis temprana para los tres tratamientos es significativamente menor con respecto al tratamiento con el blanco de digestión. Para el caso de la apoptosis tardía, hay disminución de los porcentajes para los tratamientos con las fracciones bioaccesibles de la F y de las PHF, con diferencias significativas con respecto a las PHB y al blanco de digestión. Sin embargo, el hecho de que el tratamiento con PHF presentara una mayor población de células en estado necrótico, con diferencias significativas tanto respecto al control como al resto de tratamientos, respalda el efecto antiproliferativo observado en el ensayo de MTT para las PHF. No obstante, la falta de efecto observada en la muestra F sugiere un perfil antiproliferativo vinculado a una acción citostática, mas no citotóxica, en estas células. De manera similar, Zayed et al., 2022 demostraron que el modo de acción de la apigenina ocurre principalmente a través de la apoptosis, y que, cuando la apigenina se encapsula en quitosano recubierto con albúmina sérica bovina conjugada con ácido fólico, su acción apoptótica se ve potenciada. Concluyendo que la apigenina encapsulada resulta más efectiva que la apigenina libre para inducir apoptosis en células HePG-2. Otros autores también han reportado un aumento en la apoptosis dependiente de la dosis en células de cáncer de próstata (PC-3); Tsai y Chen 2016 encontraron un aumento en las células en apoptosis temprana (18,7%) y en las células en apoptosis tardía (7,9%), utilizando una nanoemulsión de catequina una concentración de10 µg/ml, respectivamente, pero para el tratamiento con extracto de catequina, no hubo diferencias significativas en las células en apoptosis temprana entre las distintas dosis, pero se encontró una alta proporción (13%) de células en apoptosis tardía con 20µg/ml ($p < 0,05$). No se observaron

diferencias significativas en las células en necróticos bajo el tratamiento con nanoemulsión de catequina entre las distintas dosis. En resumen, ambos tratamientos con extracto de catequina y catequina en nanoemulsión resultan en una mayor proporción de células PC-3 experimentando apoptosis temprana en comparación con apoptosis tardía o necrótica, siendo la dosis un factor crítico para modular estos proc

La división celular es un proceso que ocurre durante la replicación, con fases definidas que inician con G1 (Gap 1), seguida de la fase S (síntesis), G2 (interfase) y finalmente la fase M (mitosis). El tratamiento con las fracciones bioaccesibles de las PHF generó un aumento estadísticamente significativo de células en la fase Sub G1 (marcador de apoptosis) en comparación con el blanco de digestión (Figura 20), además de producir un arresto en la fase S con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los tratamientos con las fracciones bioaccesibles de la F y de las PHB. Estos resultados que muestran una detención en algunas de las fases del ciclo celular pueden asociarse con la actividad anti-proliferativa sin inducción completa de apoptosis, y son consistentes con los resultados observados en la muerte celular descrita anteriormente (Figura 19). En cuanto al tratamiento con la F, se observó una detención en las fases del ciclo celular G0/G1 y G2/M en comparación con el blanco de digestión, hallazgo que puede correlacionarse con una disminución en la proliferación celular de acuerdo con los resultados de la viabilidad celular (Figura 18). Adicionalmente, el hecho de que no estuviese acompañado de un aumento en la fase subG1 podría sugerir nuevamente un efecto antiproliferativo citostático no citotóxico. En el mismo sentido, Cilla et al., 2010, evaluaron los efectos antiproliferativos de las fracciones bioaccesibles de bebidas de frutas elaboradas a partir de concentrados de jugo de uva, naranja y albaricoque, suplementados con hierro, zinc y leche contra líneas celulares Caco-2, encontrando que el digerido de las bebidas de frutas suplementadas con zinc y leche mostró la mayor actividad anti-proliferativa, con un 35% de inhibición de la proliferación, sugiriendo que podría modularse al bloquear la progresión del ciclo celular en la fase S de las células Caco-2. Además, Cilla et al. 2009 reportaron un efecto antiproliferativo del 53% de inhibición de la proliferación tras 24 h de tratamiento continuo con 7,5% de digerido de bebidas de frutas, mostrando arresto en la fase S junto con una disminución en G0/G1. Otros autores han documentado un comportamiento dependiente de la concentración para catequina en forma libre y nano-emulsionada, observando disminuciones en la fase G0/G1 del 61,2%, 55,8% y 43,4% a concentraciones de 5 μg/ml, 7,5 μg/ml

y 10 μg/ml, respectivamente. Comparativamente, a la misma dosis, la nano-emulsión de catequina dio lugar a una proporción menor en la fase G0/G1 que el extracto de catequina. Tanto para la fase Sub-G1 como para la fase S, se observó un aumento dependiente de la dosis para tanto la catequina libre como la nano-emulsionada. De igual forma, a la misma dosis, se registró una mayor proporción en la fase S para la catequina en nano-emulsión en comparación con la catequina libre (Tsai y Chen, 2016). En concordancia, el trabajo de Zayed et al., 2022 demostró que las células HePG-2 tratadas con apigenina encapsulada presentaron arresto en la fase S y aumento en la fase Sub-G1 en comparación con las células no tratadas, mientras que la apigenina libre indujo la detención del ciclo celular en la fase G2/M. El autor sugiere que la apigenina encapsulada penetra en el núcleo celular y se une al ADN de doble cadena, lo que interfiere con su síntesis y provoca acumulación en la fase S. La estimulación del gen p53 resultó en la sobreexpresión de caspasa-9 en las células HePG-2 tratadas con apigenina encapsulada en comparación con las tratadas con apigenina libre, y esto de manera dependiente de la concentración. Por lo tanto, la encapsulación de apigenina transforma su acción en el ciclo celular.

Finalmente, la actividad metabólica de las células cancerosas es más intensa que la de las células normales, lo que eleva su tasa de multiplicación y, en consecuencia, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción excesiva de ROS puede contribuir a la progresión del cáncer al inducir daño en el ADN y reprogramar el metabolismo celular (Zayed et al., 2022).

La tendencia hacia una producción elevada de ROS tras el tratamiento con la F y las PHF, sin diferencias estadísticamente significativas respecto a las PHB y el blanco de digestión, junto con una disminución del 90% en los niveles de glutatión reducido (GSH) después del tratamiento con la formulación F, sugiere una alteración en el estado redox de las células. Estos hallazgos podrían correlacionarse con el efecto antiproliferativo observado, ya que la disfunción mitocondrial puede atribuirse a un aumento en los niveles de ROS y a la disminución del contenido de GSH (Cilla et al., 2018). De manera comparable, Cilla et al., 20218, encontraron que el tratamiento de células Caco-2 con digeridos de pulpas de cítricos (incluyendo mandarinas clementinas de reciente cosecha almacenadas a 12 °C, y naranjas Navel y Cara Cara) no mostró un aumento significativo en los niveles de ROS. Sin embargo, después del pretratamiento con las FB de las pulpas de las frutas y la posterior exposición a estrés oxidativo con H_2O_2, se observó una disminución

significativa de los niveles de ROS en las células tratadas con los digeridos de mandarinas y naranjas Cara Cara en comparación con las células de control estresadas.

11. Conclusiones

Los resultados demostraron que el estado de madurez de las frutas es un factor de vital importancia en la actividad antioxidante de las frutas, en ambas frutas se seleccionó el estado de madurez 3. Para el caso de la uchuva, este estado de madurez presentó un contenido significativamente mayor de polifenoles y capacidad reductora de hierro (FRAP) en comparación con otros estados de madurez; y para el caso de la gulupa, este estado de madurez tuvo el mayor contenido de polifenoles y la mayor actividad antioxidante por todas las metodologías evaluadas. La uchuva tuvo una mayor actividad antioxidante que la gulupa, cuantificada por ABTS, DPPH y TBARS; sin embargo, la gulupa tuvo un mayor contenido de compuestos polifenólicos y carotenoides y una mayor actividad antioxidante cuantificada por ORAC. Se logro identificar la presencia de 14 carotenoides diferentes en ambas frutas, los más relevantes fueron β-caroteno, criptoxantina, fitoeno, fitoflueno y la presencia de dipalmitato de violaxantina en la gulupa. Para el caso de los polifenoles, se lograron identificar un total de 37, como la catequina, la epicatequina, el ácido rosmarínico, la rutina y el ácido clorogénico. La mezcla de estos frutos tuvo un efecto sinérgico, con una mayor actividad antioxidante con la mezcla compuesta por 83% de uchuva y 17% de gulupa.

Para el proceso de obtención de las partículas de hidrogel por gelación iónica asistida por electropulverización, los tres factores estudiados de tienen un efecto estadísticamente significativo en las variables respuesta del diseño experimental, es decir, son condiciones operativas importantes para el proceso. De acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones óptimas de operación para el prototipo de electropulverizador son: una altura de 11,59 cm, un voltaje de 12,56 kV y un caudal de 4,33 ml/min, estas condiciones permitieron obtener partículas más pequeñas (1194,48 ± 167,34 µm) y esféricas (0,69±0,11), con un mayor RP (89,59±2,25)

Finalmente, se logró una mezcla de biopolímeros óptima para la formulación de las partículas de hidrogel cargadas con la mezcla de frutas, que comprende 0,75 AS y 0,25 GA. Esta mezcla permitió maximiza la bioaccesibilidad de los polifenoles a 213,17 ± 19,57 %, la EE de los polifenoles a 89,46 ± 6,64 %, la recuperación de la actividad antioxidante por ABTS a 68,38 ± 0,00 %, y por FRAP a 95,62 ± 11,81 % y la E a 0,69±0,03. Al mismo tiempo, minimizar el TP a 1194,48 ± 167,34 µm. Finalmente, la mezcla de frutas de uchuva y gulupa demostró tener una potencial actividad anti-proliferativa en células caco-2 que no se ven afectadas por su incorporación en partículas de hidrogel.

En resumen, el estado de madurez de las frutas estudiadas es fundamental para su actividad antioxidante. La uchuva mostró una mayor actividad antioxidante general, mientras que la gulupa destacó por su mayor contenido de polifenoles y carotenoides. Se identificaron 14 carotenoides y 37 polifenoles significativos, como el dipalmitato de violaxantina en la gulupa y catequina y ácido clorogénico en ambas frutas. La mezcla de frutas (83% uchuva y 17% gulupa) exhibió un efecto sinérgico en la actividad antioxidante. las condiciones óptimas del proceso de gelación iónica asistido por electropulverización, lograron un rendimiento del 89,59 ± 2,25%, con partículas de tamaño 1194,48 ± 167,34 µm y una esfericidad de 0,69 ± 0,03. Los biopolímeros utilizados, goma arábiga y alginato de sodio, mejoraron la bioaccesibilidad y la eficiencia de encapsulación de los polifenoles. Además, las partículas de hidrogel obtenidas mostraron un potencial anti-proliferativo en células Caco-2.

12. Recomendaciones

Es fundamental llevar a cabo estudios del comportamiento y las cinéticas de liberación de los CBs desde las partículas de hidrogel en el tracto gastrointestinal y analizar la transformación de las moléculas tras la digestión, evaluando también diferentes matrices alimentarias. Estos estudios nos

permitirían comprender mejor cómo se comportan estos compuestos en un entorno complejo como el sistema digestivo o como un alimento, además se podría optimizar su eficacia y desarrollar formulaciones de alimentos funcionales más efectivas.

12. Referencias

Abou Baker, D. H., & Mohammed, D. M. (2022). Polyphenolic rich fraction of Physalis peruviana calyces and its nano emulsion induce apoptosis by caspase 3 up-regulation and G2/M arrest in hepatocellular carcinoma. Food Bioscience, 50(PA), 102007. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102007

Afshin, A., Sur, P. J., Fay, K. A., Cornaby, L., Ferrara, G., Salama, J. S., Mullany, E. C., Abate, K. H., Abbafati, C., Abebe, Z., Afarideh, M., Aggarwal, A., Agrawal, S., Akinyemiju, T., Alahdab, F., Bacha, U., Bachman, V. F., Badali, H., Badawi, A., Murray, C. J. L. (2019). Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. The Lancet, 393(10184), 1958–1972. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30041-8

Agarwal, T., Narayana, S. N. G. H., Pal, K., Pramanik, K., Giri, S., & Banerjee, I. (2015). Calcium alginate-carboxymethyl cellulose beads for colon-targeted drug delivery. International Journal of Biological Macromolecules, 75, 409–417. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.12.052

Agudelo, C. D., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Loarca-Pina, G., & Maldonado-Celis, M. E. (2018). Bioaccessibility during in Vitro Digestion and Antiproliferative Effect of Bioactive Compounds from Andean Berry (Vaccinium meridionale Swartz) Juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(28), 7358–7366. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B01604/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2018-016044_0005.JPEG

Aguillón-Osma, J., Luzardo-Ocampo, I., Cuellar-Nuñez, M. L., Maldonado-Celis, M. E., Loango-Chamorro, N., & Campos-Vega, R. (2019). Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (Passiflora edulis) leaves and juice extracts. Journal of Food Biochemistry, 43(7), 1–11. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfbc.12879

Aguirre-Calvo, T. R., Sosa, N., López, T. A., Quintanilla-Carvajal, M. X., Perullini, M., & Santagapita, P. R. (2022). Bioaccessibility assay, antioxidant activity and consumer-oriented sensory analysis of Beta vulgaris by-product encapsulated in Ca(II)-alginate beads for different

foods. Food Chemistry: Molecular Sciences, 5(May). https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100140

Aguirre Calvo, T. (2013). Encapsulación de licopeno empleando polielectrolitos . Influencia del secado y congelado sobre su estabilidad.

Alkhatib, H., Mohamed, F., Akkawi, M. E., Alfatama, M., Chatterjee, B., & Doolaanea, A. A. (2020). Microencapsulation of black seed oil in alginate beads for stability and taste masking. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 60, 102030. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102030

Anbinder, P. S., Deladino, L., Navarro, A. S., Amalvy, J. I., & Martino, M. N. (2011). Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences, 1, 80–87. https://doi.org/10.4236/jeas.2011.14011

Andueza, I., Ávila, G., & Attias, D. (2000). Caracterización física de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica: pH, tensión superficial, característica de la película. Revista de La Sociedad Química de México, 44(3).

Ángel-Coca, C., Nates-Parra, G., Ospina-Torres, R., Ortiz, C. D. M., & Amaya-Márquez, M. (2011). Biología floral y reproductiva de la gulupa Passiflora edulis sims f. edulis. Caldasia, 33(2), 433–451.

Arango, S., Ramírez, V., Maldonado, M. E., Uribe, D., & Aguillón, J. (2017). Cytotoxic and Apoptotic Activities of the Aqueous Fruit Extract of Passiflora edulis Sims var flavicarpa in an In vitro Model of Human Colon Cancer. Available Online Www.Jocpr.Com Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 9(9), 258–264. https://www.researchgate.net/publication/320623568

ANALDEX (Asociación Nacional de Comercio Exterior). (2024). Informe de exportaciones colombianas de frutas Enero a Junio 2024.

Aydogdu, A., Sumnu, G., & Sahin, S. (2018). A novel electrospun hydroxypropyl methylcellulose/polyethylene oxide blend nanofibers: Morphology and physicochemical properties. Carbohydrate Polymers, 181, 234–246. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.10.071

Azad, A. K., Al-Mahmood, S. M. A., Chatterjee, B., Wan Sulaiman, W. M. A., Elsayed, T. M., & Doolaanea, A. A. (2020). Encapsulation of black seed oil in alginate beads as a ph-sensitive carrier for intestine-targeted drug delivery: In vitro, in vivo and ex vivo study. Pharmaceutics, 12(3). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030219

Bazalar Pereda, M. S., Nazareno, M. A., & Viturro, C. I. (2019). Nutritional and Antioxidant Properties of Physalis peruviana L. Fruits from the Argentinean Northern Andean Region. Plant Foods for Human Nutrition, 74(1), 68–75. https://doi.org/10.1007/s11130-018-0702-1

Bel S Cak-Cvitanovi, A., Bu Si C A, A., Bari Si C A, L., Vrsaljko, D., Karlovi C, S., Spoljari, I., Vojvodi, A., Mr Si C C, G., & Zenka Komes, D. (2016). Emulsion templated microencapsulation of dandelion (Taraxacum officinale L.) polyphenols and β-carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. 57, 139–152. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.020

Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. Food Chemistry, 204, 77–83. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.104

Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W., & Wayner, D. D. M. (1986). The antioxidant role of vitamin C. Advances in Free Radical Biology & Medicine, 2(2), 419–444. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S8755-9668(86)80021-7

Biao, Y., Yuxuan, C., Qi, T., Ziqi, Y., Yourong, Z., McClements, D. J., & Chongjiang, C. (2019). Enhanced performance and functionality of active edible films by incorporating tea polyphenols into thin calcium alginate hydrogels. Food Hydrocolloids, 97(April), 105197. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105197

Blanco-Morales, V., Mercatante, D., Rodriguez-Estrada, M. T. and Garcia-Llatas, G. (2024). Current and New Insights on Delivery SystemsforPlantSterolsinFood. In Implication of Oxysterols and Phytosterols in Aging and Human Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology (Vol. 1440, pp. 403–435). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-031-43883-7_20

Bravo, K., Sepulveda-Ortega, S., Lara-Guzman, O., Navas-Arboleda, A. A., & Osorio, E. (2015). Influence of cultivar and ripening time on bioactive compounds and antioxidant properties

in Cape gooseberry (Physalis peruviana L.). Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(7), 1562–1569. https://doi.org/10.1002/jsfa.6866

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

Cadavid Castro, M. A., Mora-Cubillos, L. X., Parrado Barbosa, Á., Caicedo Ortíz, P. N., & Del Castillo Matamoros, S. E. (2020). ¿QUÉ HEMOS APRENDIDO SOBRE LOS SISTEMAS AGROALIMENTARIOS EN TIEMPOS DE LA COVID-19? In Aprendizajes en tiempos de la COVID-19 (pp. 32,33,34, 35).

Camps, J., & García-Heredia, A. (2014). Introduction: Oxidation and Inflammation, A Molecular Link Between Non-communicable Diseases. In Advances in experimental medicine and biology (Vol. 824, pp. 1–4). https://doi.org/10.1007/978-3-319-07320-0_1

Carmona-Hernandez, Juan C, Taborda-Ocampo, G., & González-Correa, C. H. (2021). Folin-Ciocalteu Reaction Alternatives for Higher Polyphenol Quantitation in Colombian Passion Fruits. https://doi.org/10.1155/2021/8871301

Carmona-Hernandez, Juan Carlos, Taborda-Ocampo, G., Valdez, J. C., Bolling, B. W., & González-Correa, C. H. (2019). Polyphenol extracts from three Colombian passifloras (passion fruits) prevent inflammation-induced barrier dysfunction of Caco-2 cells. Molecules, 24(24). https://doi.org/10.3390/molecules24244614

Carrasco-Sandoval, J., Aranda-Bustos, M., Henríquez-Aedo, K., López-Rubio, A., & Fabra, M. J. (2021). Bioaccessibility of different types of phenolic compounds co-encapsulated in alginate/chitosan-coated zein nanoparticles. LWT, 149, 112024. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112024

Carrasco, R. R. De. (2008). Determinación De La Capacidad Antioxidante Y Compuestos Bioactivos De Frutas Nativas Peruanas. Revista de La Sociedad Química Del Perú, 74(2), 108–124.

Castenmiller, J. J. M., & West, C. E. (1998). Bioavailability and bioconversion of carotenoids. In Annual Review of Nutrition (Vol. 18, Issue 1, pp. 19–38). https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.18.1.19

Chandrasekhar, D., Jose, M., Jomy, A., Joseph, A., Pradeep, A., & Geoji, A. S. (2018). Antiglycation property of passiflora edulis f. Flavicarpa deg. foliage in type 2 diabetic patients. Clinical Epidemiology and Global Health, 7, 409–412. https://doi.org/10.1016/j.cegh.2018.07.002

Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., & Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037

Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016

Chen, W., Su, H., Xu, Y., Bao, T., & Zheng, X. (2016). Protective effect of wild raspberry (Rubus hirsutus Thunb.) extract against acrylamide-induced oxidative damage is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry, 196, 943–952. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.024

Chiou, Y. S., Wu, J. C., Huang, Q., Shahidi, F., Wang, Y. J., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2014). Metabolic and colonic microbiota transformation may enhance the bioactivities of dietary polyphenols. Journal of Functional Foods, 7(1), 3–25. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.006

Chutintrasri, B., & Noomhorm, A. (2006). Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. LWT - Food Science and Technology, 39(5), 492–495. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.04.006

Cilla, A., Lagarda, M. J., Barberá, R., & Romero, F. (2010). Polyphenolic profile and antiproliferative activity of bioaccessible fractions of zinc-fortified fruit beverages in human colon cancer cell lines. Nutricion Hospitalaria, 25(4), 561–571. https://doi.org/10.3305/nh.2010.25.4.4480

Cilla, A, González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., & Barberá, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. Food Chemistry, 114(3), 813–820. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.019

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. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.029

Cilla, A, Rodrigo, M. J., Zacarías, L., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Barberá, R., & Alegría, A. (2018). Protective effect of bioaccessible fractions of citrus fruit pulps against H2O2-induced oxidative stress in Caco-2 cells. Food Research International, 103(October 2017), 335–344. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.066

Ciou, J. Y., Lin, H. H., Chiang, P. Y., Wang, C. C., & Charles, A. L. (2011). The role of polyphenol oxidase and peroxidase in the browning of water caltrop pericarp during heat treatment. Food Chemistry, 127(2), 523–527. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.034

Civan, M., & Kumcuoglu, S. (2019). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoid and capsaicinoid from the pulp of hot pepper paste based on the bio-refinery concept. LWT, 113, 108320. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108320

ColCapital y AGROFUTURO. (2016). Estudio del universo de los potenciales inversionistas en el sector agopecuario, agroindustrial y forestal en Colombia y Latinoamerica.

Colciencias, MADR, & Corpoica. (2017). Plan Estratégico de Ciencias, Tecnología e Innovación del sector agropecuario Colombiano (2017 - 2027). In Pectia.

Costea, T., Nagy, P., Ganea, C., Szöllősi, J., & Mocanu, M. M. (2019). Molecular mechanisms and bioavailability of polyphenols in prostate cancer. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 20, Issue 5, p. 1062). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms20051062

Couillard, C., Lemieux, S., Vohl, M.-C., Couture, P., & Lamarche, B. (2016). Carotenoids as biomarkers of fruit and vegetable intake in men and women. British Journal of Nutrition, 116(7), 1206–1215. https://doi.org/10.1017/S0007114516003056

Ćujić-Nikolić, N., Stanisavljević, N., Šavikin, K., Kalušević, A., Nedović, V., Bigović, D., & Janković, T. (2018). Application of gum Arabic in the production of spray-dried chokeberry polyphenols, microparticles characterisation and in vitro digestion method. Lekovite Sirovine, 38(38), 9–16. https://doi.org/10.5937/leksir1838009c

Daker, M., Abdullah, N., Vikineswary, S., Goh, P. C., & Kuppusamy, U. R. (2008). Antioxidant from maize and maize fermented by Marasmiellus sp. as stabiliser of lipid-rich foods. Food Chemistry, 107(3), 1092–1098. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.09.027

del Pilar Pinzón, Igrid Mónica; Fischer, G. ;, & Corredor, G. (2007). Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (Passiflora edulis Sims.). Agronomia Colombiana, 25(1), 83–95.

Derringer G, S. R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. Journal of Quality Technology, 12(4), 214–219.

Dong, B., An, L., Yang, X., Zhang, X., Zhang, J., Tuerhong, M., Jin, D.-Q., Ohizumi, Y., Lee, D., Xu, J., & Guo, Y. (2019). Withanolides from Physalis peruviana showing nitric oxide inhibitory effects and affinities with iNOS. Bioorganic Chemistry, 87, 585–593. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.051

Edge R., T. T. G. (2010). Properties of Carotenoid Radicals and Excited States and Their Potential Role in Biological Systems. In Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties (pp. 283–308).

Ekbatan, S. S., Li, X. Q., Ghorbani, M., Azadi, B., & Kubow, S. (2018). Chlorogenic acid and its microbial metabolites exert anti-proliferative effects, S-phase cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer caco-2 cells. International Journal of Molecular Sciences, 19(3), 1–13. https://doi.org/10.3390/ijms19030723

El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I., Safwat, G., Gamal, M., & Megahed, B. M. H. (2019). Chemical Composition and Biological Activity of Physalis peruviana L. Gesunde Pflanzen, 71(2), 113–122. https://doi.org/10.1007/s10343-019-00456-8

Ellulu, M., Rahmat, A., Patimah, I., Khaza, H., & Abed, Y. (2015). Drug Design, Development and Therapy Dovepress Effect of vitamin C on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: a randomized controlled trial. Drug Design, Development and Therapy. https://doi.org/10.2147/DDDT.S83144

Etzbach, L., Meinert, M., Faber, T., Klein, C., Schieber, A., & Weber, F. (2020). Effects of carrier agents on powder properties, stability of carotenoids, and encapsulation efficiency of goldenberry (Physalis peruviana L.) powder produced by co-current spray drying. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.03.002

Etzbach, L., Pfeiffer, A., Weber, F., & Schieber, A. (2018). Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (Physalis peruviana L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MSn. Food Chemistry, 245, 508–517. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.10.120

Farha, A. K., Gan, R. Y., Li, H. Bin, Wu, D. T., Atanasov, A. G., Gul, K., Zhang, J. R., Yang, Q. Q., & Corke, H. (2022). The anticancer potential of the dietary polyphenol rutin: Current status, challenges, and perspectives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 62(3), 832–859. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1829541

Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. Nutrients, 6(2), 466–488. https://doi.org/10.3390/nu6020466

Fischer G., Ebert G., L. P. (2009). Provitamin A Carotenoids, organic acids and ascorbic acid content of cape gooseberry (Physalis peruviana L.) ecotypes grown at two tropical altitudes. Acta Horticulturae, 531, 263-268. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.531.43 CITATIONS

Fleit, H. B. (2014). Chronic Inflammation. In Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms (pp. 300–314). StatPearls Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01808-6

Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Phillips, D. R., & Kong, F. (2015). In vitro release properties of encapsulated blueberry (Vaccinium ashei) extracts. Food Chemistry, 168, 225–232. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.07.059

Fonseca-Trujillo, N., Márquez-Cardona, M. D. P., Moreno-Osorio, J. H., Terán-Pérez, W., & Schuler-García, I. (2009). Caracterización molecular de materiales cultivados de gulupa (Passiflora edulis f. edulis). Universitas Scientiarum, 14(2–3), 135. https://doi.org/10.11144/javeriana.sc14-2-3.cmdm

Franco, G., Cartagena V, J. R., Guillermo Correa, L., Rojano, B., & Piedrahita C, A. M. (2014). Actividad antioxidante del jugo de Passiflora edulis Sims (Gulupa) durante la poscosecha. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 19(3), 154–166. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=pt

Fredes, C., Osorio, M. J., Parada, J., & Robert, P. (2018). Stability and bioaccessibility of anthocyanins from maqui (Aristotelia chilensis [Mol.] Stuntz) juice microparticles. LWT - Food Science and Technology, 91(February), 549–556. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.090

Gabriel Antonio Mosquera Romero. (2020). Tendencias agroexportadoras del aguacate hass y la uchuva frente al contexto de acuerdo de paz en colombia (2015-2019). In Universidad santiago de cali facultad de ciencias economicas y empresariales.

García-Martínez, E., Camacho, M. del M., & Martínez-Navarrete, N. (2023). In Vitro Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Citrus. Molecules Article, 810(28), 1–13. https://doi.org/https:// doi.org/10.3390/molecules28020810

Gayatri, A., Hudiyono, S., & Setiasih, S. (2021). Optimization and evaluation of ionically cross-linked alginate-hpmc nanospheres for encapsulation of bromelain as antiplatelet. Journal of Physics: Conference Series, 1918(3). https://doi.org/10.1088/1742-6596/1918/3/032003

Germán Franco, José R. Cartagena V., Guillermo Correa L., Benjamín Rojano, A. M. P. C. (2014). Actividad antioxidante del jugo de Passiflora edulis Sims (Gulupa) durante la poscosecha. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 19(1), 154–166. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962014000300004&script=sci_arttext&tlng=pt

Gomes, S. V. F., Portugal, L. A., dos Anjos, J. P., de Jesus, O. N., de Oliveira, E. J., David, J. P., & David, J. M. (2017). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in Passiflora species. Microchemical Journal, 132, 28–35. https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021

González, R. E., Tarón, A., & Morón, L. B. (2015). Formación de Microcápsulas de Tamaño Controlado por Gelación Iónica Utilizando Mezclas Biopoliméricas Binarias. Información Tecnológica, 26(6), 31–38. https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000600005

Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., & Bucić-Kojić, A. (2020). Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. Antioxidants, 9(10), 923. https://doi.org/10.3390/antiox9100923

Grosso, G., Micek, A., Godos, J., Pajak, A., Sciacca, S., Galvano, F., & Giovannucci, E. L. (2017). Dietary Flavonoid and Lignan Intake and Mortality in Prospective Cohort Studies: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. American Journal of Epidemiology, 185(12), 1304–1316. https://doi.org/10.1093/aje/kww207

Guiné, R. P. F., Gonçalves, F. J. A., Oliveira, S. F., & Correia, P. M. R. (2020). Evaluation of Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Bioaccessibility in Physalis Peruviana L. International Journal of Fruit Science, 20(S2), S470–S490. https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1741056

Hassan, H. A., Serag, H. M., Qadir, M. S., & Fawzy Ramadan, M. (2017). Cape gooseberry (Physalis peruviana) juice as a modulator agent for hepatocellular carcinoma-linked apoptosis and cell cycle arrest. Biomedicine & Pharmacotherapy, 94, 1129–1137. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.014

Heffernan, N., Smyth, T. J., Fitzgerald, R. J., Soler-Vila, A., & Brunton, N. (2014). Antioxidant activity and phenolic content of pressurised liquid and solid-liquid extracts from four Irish origin macroalgae. International Journal of Food Science and Technology, 49(7), 1765–1772. https://doi.org/10.1111/ijfs.12512

Hernández-Galdamez, D. R., González-Block, M. Á., Romo-Dueñas, D. K., Lima-Morales, R., Hernández-Vicente, I. A., Lumbreras-Guzmán, M., & Méndez-Hernández, P. (2020). Increased Risk of Hospitalization and Death in Patients with COVID-19 and Pre-existing Noncommunicable Diseases and Modifiable Risk Factors in Mexico. Archives of Medical Research, 51(7), 683–689. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.07.003

Hitl, M., Kladar, N., Gavarić, N., & Božin, B. (2021). Rosmarinic Acid-Human Pharmacokinetics and Health Benefits. Planta Medica, 87(4), 273–282. https://doi.org/10.1055/a-1301-8648

Hong, S. C., Park, K. M., Hong, C. R., Kim, J. C., Yang, S. H., Yu, H. S., Paik, H. D., Pan, C. H., & Chang, P. S. (2020). Microfluidic assembly of liposomes dual-loaded with catechin and curcumin for enhancing bioavailability. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 594(February), 124670. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124670

Hou, J., Liang, L., Su, M., Yang, T., Mao, X., & Wang, Y. (2021). Variations in phenolic acids and antioxidant activity of navel orange at different growth stages. Food Chemistry, 360(October 2020), 129980. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129980

Hozawa, A., Jacobs, D. R., Steffes, M. W., Gross, M. D., Steffen, L. M., Lee, D.-H., & Lee, D.-H. (2007). Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: the Coronary Artery Risk

Development in Young Adults (CARDIA)/Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALT. Clinical Chemistry, 53(3), 447–455. https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.074930

Huang, X., Liu, Y., Zou, Y., Liang, X., Peng, Y., McClements, D. J., & Hu, K. (2019). Encapsulation of resveratrol in zein/pectin core-shell nanoparticles: Stability, bioaccessibility, and antioxidant capacity after simulated gastrointestinal digestion. Food Hydrocolloids, 93(December 2018), 261–269. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.039

Hurtado-Romero, A., Del Toro-Barbosa, M., Gradilla-Hernández, M. S., Garcia-Amezquita, L. E., & García-Cayuela, T. (2021). Probiotic properties, prebiotic fermentability, and gaba-producing capacity of microorganisms isolated from mexican milk kefir grains: A clustering evaluation for functional dairy food applications. Foods, 10(10). https://doi.org/10.3390/foods10102275

Frutas frescas. Uchuva. Especificaciones NTC 4580:1999, (1999).

Frutas frescas. Gulupa. Especificaciones NTC 6456:2020, (2020).

NTC 4624. JUGOS DE FRUTAS Y HORTALIZAS. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS SOLUBLES. MÉTODO REFRACTOMÉTRICO., (1999).

Ntc4623No Productos de Frutas y Verduras. Determinacion de La Acidez TitulableTitle, (1999).

Jilani, H., Cilla, A., Barberá, R., & Hamdi, M. (2020). Antiproliferative activity of green, black tea and olive leaves polyphenols subjected to biosorption and in vitro gastrointestinal digestion in Caco-2 cells. Food Research International, 136(April), 109317. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109317

Joaquim, A., Paul, O., Ibezim, M., Johnson, D., Falconer, A., Wu, Y., Williams, F., & Mu, R. (2022). Electrospray Deposition of Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Microparticles: Impact of Solvents and Flow Rate. Polymers, 14(13), 1–9. https://doi.org/10.3390/polym14132702

Kamble, H. A., Gatade, A. A., Sahoo, A. K., & Annapure, U. S. (2021). Effect of blanching treatment on antioxidant activity and color values of sugarcane juice. Materials Today: Proceedings, 47, 5663–5667. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.706

Kasali, F. M., Tusiimire, J., Kadima, J. N., Tolo, C. U., Weisheit, A., & Agaba, A. G. (2021). Ethnotherapeutic Uses and Phytochemical Composition of Physalis peruviana L.: An Overview. Scientific World Journal, 2021. https://doi.org/10.1155/2021/5212348

Kondrashina, A., Arranz, E., Cilla, A., Faria, M. A., Santos-Hernández, M., Miralles, B., Hashemi, N., Rasmussen, M. K., Young, J. F., Barberá, R., Mamone, G., Tomás-Cobos, L., Bastiaan-Net, S., Corredig, M., & Giblin, L. (2023). Coupling in vitro food digestion with in vitro epithelial absorption; recommendations for biocompatibility. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 0(0), 1–19. https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2214628

Laokuldilok, N., Thakeow, P., Kopermsub, P., & Utama-ang, N. (2016). Optimisation of microencapsulation of turmeric extract for masking flavour. Food Chemistry, 194, 695–704. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.150

Li, M., Li, H., Li, X., Zhu, H., Xu, Z., Liu, L., Ma, J., & Zhang, M. (2017). A Bioinspired Alginate-Gum Arabic Hydrogel with Micro-/Nanoscale Structures for Controlled Drug Release in Chronic Wound Healing. ACS Applied Materials and Interfaces, 9(27), 22160–22175. https://doi.org/10.1021/acsami.7b04428

Lim, S., Choi, A.-H., Kwon, M., Joung, E.-J., Shin, T., Lee, S.-G., Kim, N.-G., & Kim, H.-R. (2019). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from Sargassum serratifolium and its major antioxidant components. Food Chemistry, 278, 178–184. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.11.058

Londoño, C., & Rojas, J. (2017). Effect of different production variables on the physical properties of pellets prepared by extrusion-spheronization using a multivariate analysis. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, 41(2), 69–75.

López-García, G., Cilla, A., Barberá, R., & Alegría, A. (2020). Anti-Inflammatory and Cytoprotective Effect of Plant Sterol and Galactooligosaccharides-Enriched Beverages in Caco-2 Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(7), 1862–1870. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03025

Loznjak, P., Svarc, García-Moreno, P. J., Mendes, A. C., Fallahasghari, E. Z., & Jakobsen, J. (2020). Encapsulation of L-5-methyltetrahydrofolate by electrospraying for food applications. Journal of Food Engineering, 277, 109901. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109901

Martin, K. R., & Appel, C. L. (2009). Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. Nutrition and Dietary Supplements, 2, 1. https://doi.org/10.2147/NDS.S6422

Martinović, J., Lukinac, J., Jukić, M., Ambrus, R., Planinić, M., Šelo, G., Klarić, A. M., Perković, G., & Bucić-Kojić, A. (2023). In Vitro Bioaccessibility Assessment of Phenolic

Compounds from Encapsulated Grape Pomace Extract by Ionic Gelation. Molecules, 28(13). https://doi.org/10.3390/molecules28135285

Massounga Bora, A. F., Ma, S., Li, X., & Liu, L. (2018). Application of microencapsulation for the safe delivery of green tea polyphenols in food systems: Review and recent advances. In Food Research International (Vol. 105, pp. 241–249). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.047

Mehregan Nikoo, A., Kadkhodaee, R., Ghorani, B., Razzaq, H., & Tucker, N. (2018). Electrospray-assisted encapsulation of caffeine in alginate microhydrogels. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.167

Mejia, N. M., Castro, J. P., Ocampo, Y. C., Salas, R. D., Delporte, C. L., & Franco, L. A. (2020). Evaluation of antioxidant potential and total phenolic content of exotic fruits grown in Colombia. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 10(9), 50–58. https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.10906

Mercado-Mercado, G., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., Alvarez-Parrilla, E., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2017). Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from mango (Mangifera indica L. 'Ataulfo') by-products on in vitro bioaccessibility. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.012

Miedes, D., Cilla, A., & Alegría, A. (2023). Chemopreventive Effect of an In Vitro Digested and Fermented Plant Sterol-Enriched Wholemeal Rye Bread in Colon Cancer Cells. Foods, 13(1), 112. https://doi.org/10.3390/foods13010112

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., … Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. Food and Function, 5(6), 1113–1124. https://doi.org/10.1039/c3fo60702j

Mirghani, M. E. S., Elnour, A. A. M., Kabbashi, N. A., Alam, M. Z., Musa, K. H., & Abdullah, A. (2018). Determination of antioxidant activity of gum Arabic: An exudation from two different locations. ScienceAsia, 44(3), 179–186. https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2018.44.179

Morais, A. Í. S., Vieira, E. G., Afewerki, S., Sousa, R. B., Honorio, L. M. C., Cambrussi, A. N. C. O., Santos, J. A., Bezerra, R. D. S., Furtini, J. A. O., Silva-Filho, E. C., Webster, T. J., & Lobo, A. O. (2020). Fabrication of polymeric microparticles by electrospray: The impact of experimental parameters. Journal of Functional Biomaterials, 11(1). https://doi.org/10.3390/jfb11010004

Morales, E., Rubilar, M., Burgos-Díaz, C., Acevedo, F., Penning, M., & Shene, C. (2017). Alginate/Shellac beads developed by external gelation as a highly efficient model system for oil encapsulation with intestinal delivery. Food Hydrocolloids, 70, 321–328. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.012

Naranjo-Durán, A. M., Quintero-Quiroz, J., Rojas-Camargo, J., & Ciro-Gómez, G. L. (2021). Modified-release of encapsulated bioactive compounds from annatto seeds produced by optimized ionic gelation techniques. Scientific Reports, 11(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-80119-1

Nayak, A. K., Das, B., & Maji, R. (2012a). Calcium alginate/gum arabic beads containing glibenclamide: Development and in vitro characterization. International Journal of Biological Macromolecules, 51(5), 1070–1078. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.021

Nayak, A. K., Das, B., & Maji, R. (2012b). Calcium alginate/gum Arabic beads containing glibenclamide: Development and in vitro characterization. International Journal of Biological Macromolecules, 51(5), 1070–1078. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2012.08.021

Nikoo, A. M., Kadkhodaee, R., Ghorani, B., Razzaq, H., & Tucker, N. (2018). Electrospray-assisted encapsulation of caffeine in alginate microhydrogels. International Journal of Biological Macromolecules, 116, 208–216. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.04.167

Nimalaratne, C., Savard, P., Gauthier, S. F., Schieber, A., & Wu, J. (2015). Bioaccessibility and Digestive Stability of Carotenoids in Cooked Eggs Studied Using a Dynamic in Vitro Gastrointestinal Model. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(11), 2956–2962. https://doi.org/10.1021/jf505615w

Nunñes, M. A., Costa, A. S. G., Bessada, S., Santos, J., Puga, H., Alves, R. C., Freitas, V., & Oliveira, M. B. P. P. (2018). Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. Science of the Total Environment, 644, 229–236. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.350

Ocampo, J., & Wyckhuys, K. A. G. (2012). Tecnología para el cultivo de la Gulupa en Colombia (Passiflora edulis f. edulis Sims).

OECD. (2015). OECD Review of Agricultural Policies: Colombia 2015. In La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. OECD Publishing. https://doi.org/10.1787/9789264227644-en

Olvera, M., Martinez, C., & Real de Leon, E. (1993). Manual De Tecnicas Para Laboratorio De Nutricion De Peces Y Crustaceos. In Documento preparado para el Proyecto GCP/RLA/102/ITA Apoyo a las Actividades Regionales de Acuicultura para América Latina y el Caribe (AQUILA II), FAO.: Vol. No 7. (p. 120). http://www.fao.org/3/AB489S/AB489S03.htm

Organización de las Naciones Unidas. (2020). Objetivo 3: Salud y bienestar | PNUD. ONU. https://www1.undp.org/content/undp/es/home/sustainable-development-goals/goal-3-good-health-and-well-being.html

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. (2020). Frutas y verduras – esenciales en tu dieta. In Frutas y verduras – esenciales en tu dieta. https://doi.org/10.4060/cb2395es

Paoletti, I. D. and S. (2009). Material Properties of Alginates. In B. H. A. Rehm (Ed.), Alginates: Biology and Applications (pp. 1–55).

Partovinia, A., & Vatankhah, E. (2019). Experimental investigation into size and sphericity of alginate micro-beads produced by electrospraying technique: Operational condition optimization. Carbohydrate Polymers, 209, 389–399. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.01.019

Pasin, B. L., González Azón, C., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 3(1), 130–151. http://www.rvcta.org

Peng, Y., Bishop, K. S., & Quek, S. Y. (2019). Extraction optimization, antioxidant capacity and phenolic profiling of extracts from flesh, peel and whole fruit of New Zealand grown feijoa cultivars. Antioxidants, 8(5). https://doi.org/10.3390/antiox8050141

Pertuzatti, P. B., Sganzerla, M., Jacques, A. C., Barcia, M. T., & Zambiazi, R. C. (2015). Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (Passiflora edulis) grown

under different cultivation systems. LWT - Food Science and Technology, 64(1), 259–263. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.031

Piornos, J. A., Burgos-Díaz, C., Morales, E., Rubilar, M., & Acevedo, F. (2017). Highly efficient encapsulation of linseed oil into alginate/lupin protein beads: Optimization of the emulsion formulation. Food Hydrocolloids, 63, 139–148. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.031

Plan Frutícola Nacional, Desarrollo de fruticultura en Antioquia. (2006).

Porto-Figueira, P., Freitas, A., Cruz, C. J., Figueira, J., & Câmara, J. S. (2015). Profiling of passion fruit volatiles: An effective tool to discriminate between species and varieties. Food Research International, 77, 408–418. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.007

Prieto, J. M. (2012). Procedure : Preparation of DPPH Radical , and antioxidant scavenging assay (pp. 7–9).

Puente, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S., & Cortés, M. (2011). Physalis peruviana Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Research International, 44(7), 1733–1740. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.09.034

Quintero Quiroz, J., Naranjo Duran, A. M., Silva Garcia, M., Ciro Gomez, G. L., & Rojas Camargo, J. J. (2019). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from annatto seeds, evaluation of their antimicrobial and antioxidant activity, and identification of main compounds by LC/ESI-MS analysis. International Journal of Food Science, 2019. https://doi.org/10.1155/2019/3721828

Ramadan M., Sitohy M., M. J.-T. (2008). Solvent and enzymeaided aqueous extraction of goldenberry (Physalis peruviana L.) pomace oil: impact of processing on composition and quality of oil and mealitle. European Food Research and Technology, 226(6), 1445–1458. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0676-y

Ramadan, M. F. (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (Physalis peruviana): An overview. Food Research International, 44(7), 1830–1836. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.12.042

Ramos dos Reis, L. C., Facco, E. M. P., Salvador, M., Flôres, S. H., & de Oliveira Rios, A. (2018). Antioxidant potential and physicochemical characterization of yellow, purple and orange

passion fruit. Journal of Food Science and Technology, 55(7), 2679–2691. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3190-2

Rasool, B. K. A., & Fahmy, S. A. (2013). Development of coated beads for oral controlled delivery of cefaclor: In vitro evaluation. Acta Pharmaceutica, 63(1), 31–44. https://doi.org/10.2478/acph-2013-0003

Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. British Journal of Clinical Pharmacology, 75(3), 588–602. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x

Restrepo Betancur, L. F., & Mejía Giraldo, L. M. (2023). Pérdida poscosecha en los principales cultivos en Sudamérica en la década 2010-2019. Acta Agronómica, 72(1), 55–62. https://doi.org/10.15446/acag.v72n1.109477

Restrepo, M. (2016). Evaluación técnica de microencapsulación de compuestos bioactivos empleando los métodos de coacervación y gelificación.

Rojano, B., Gaviria, C., & Sáez, J. (2008). Antioxidant activity determination in a lipidic peroxidation model of butter inhibited by isoespintanol. Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica, 15(2), 212–218.

Sabet, S., Rashidinejad, A., Melton, L. D., Zujovic, Z., Akbarinejad, A., Nieuwoudt, M., Seal, C. K., & McGillivray, D. J. (2021). The interactions between the two negatively charged polysaccharides: Gum Arabic and alginate. Food Hydrocolloids, 112(September 2020), 106343. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106343

Sahin, O. I., Uzuner, K., Dundar, A. N., Parlak, M. E., Gul, L. B., Dagdelen, A. F., Saricaoglu, F. T., & Simsek, S. (2023). Functional properties and bioaccessibility of alginate based phycocyanin-honey hydrogels. Lwt, 184(January), 115099. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115099

Sánchez-Velázquez, O. A., Mulero, M., Cuevas-Rodríguez, E. O., Mondor, M., Arcand, Y., & Hernández-Álvarez, A. J. (2021). In vitro gastrointestinal digestion impact on stability, bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols from wild and commercial blackberries (Rubus spp.). Food & Function, 12(16), 7358–7378. https://doi.org/10.1039/D1FO00986A

Sansone, R., Rodriguez-Mateos, A., Heuel, J., Falk, D., Schuler, D., Wagstaff, R., Kuhnle, G. G. C., Spencer, J. P. E., Schroeter, H., Merx, M. W., Kelm, M., & Heiss, C. (2015). Cocoa flavanol intake improves endothelial function and Framingham Risk Score in healthy men and women: a randomised, controlled, double-masked trial: the Flaviola Health Study. https://doi.org/10.1017/S0007114515002822

Santhakumar, A. B., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. Food and Chemical Toxicology, 113, 49–65. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.022

Sathyadevi, M., & Subramanian, S. (2015). Extraction, isolation and characterization of bioactive flavonoids from the fruits of physalis peruviana linn extract. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 8(1), 152–157. https://pdfs.semanticscholar.org/c880/f00abd85789d74de5a09993a2aeaa92788d6.pdf

Sathyadevi, Suchithra, & Subramanian. (2014). Physalis peruviana Linn. fruit extract improves insulin sensitivity and ameliorates hyperglycemia in high-fat diet low dose STZ-induced type 2 diabetic rats. Journal of Pharmacy Research, 8(4), 625–632.

Schiassi, M. C. E. V., Carvalho, C. D. S., Lago, A. M. T., Curi, P. N., Pio, R., Queiroz, F., Resende, J. V. de, & de SOUZA, V. R. (2020). Optimization for sensory and nutritional quality of a mixed berry fruit juice elaborated with coconut water. Food Science and Technology, 40(4), 985–992. https://doi.org/10.1590/fst.28919

Schoen, C., Schulz, A., Schweikart, J., Schütt, S., & von Baehr, V. (2009). Regulatory effects of a fermented food concentrate on immune function parameters in healthy volunteers. Nutrition, 25(5), 499–505. https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.10.022

Sęczyk, Ł., Sugier, D., Świeca, M., & Gawlik-Dziki, U. (2021). The effect of in vitro digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds. Food Chemistry, 344(October 2020). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128581

Serna-Jiménez, J. A., Torres-Valenzuela, L. S., Sanín Villarreal, A., Roldan, C., Martín, M. A., Siles, J. A., & Chica, A. F. (2023). Advanced extraction of caffeine and polyphenols from

coffee pulp: Comparison of conventional and ultrasound-assisted methods. Lwt, 177(November 2022). https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114571

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. Journal of Functional Foods, 18, 757–781. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047

Shanmugam, S., Gomes, I. A., Denadai, M., dos Santos Lima, B., de Souza Araújo, A. A., Narain, N., Neta, M. T. S. L., Serafini, M. R., Quintans-Júnior, L. J., & Thangaraj, P. (2018). UHPLC-QqQ-MS/MS identification, quantification of polyphenols from Passiflora subpeltata fruit pulp and determination of nutritional, antioxidant, α-amylase and α-glucosidase key enzymes inhibition properties. Food Research International, 108, 611–620. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.006

Shardell, M. D., Alley, D. E., Hicks, G. E., El-Kamary, S. S., Miller, R. R., Semba, R. D., & Ferrucci, L. (2011). Low-serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Nutrition Research (New York, N.Y.), 31(3), 178–189. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.03.003

Siddiqi, K. (2010). Non-communicable diseases. In Public Health: An action guide to improving health. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199238934.003.15

Song, J., Feng, H., Wu, M., Chen, L., Xia, W., & Zhang, W. (2021). Development of a bioactive chitosan HPMC-based membrane with tea polyphenols encapsulated in β-cyclodextrin as an effective enhancement. Materials Today Communications, 27, 102324. https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102324

Sun, X., Cameron, R. G., & Bai, J. (2019). Microencapsulation and antimicrobial activity of carvacrol in a pectin-alginate matrix. Food Hydrocolloids. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.01.006

Tan, P. Y., Tan, T. B., Chang, H. W., Tey, B. T., Chan, E. S., Lai, O. M., Sham Baharin, B., Nehdi, I. A., & Tan, C. P. (2017). Effects of Environmental Stresses and in Vitro Digestion on the Release of Tocotrienols Encapsulated Within Chitosan-Alginate Microcapsules. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(48), 10651–10657. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03521

Tian, C., Liu, X., Chang, Y., Wang, R., Lv, T., Cui, C., & Liu, M. (2021). Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin A

R T I C L E I N F O. South African Journal of Botany, 137, 257–264. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.022

Tresserra-Rimbau, A., Guasch-Ferré, M., Salas-Salvadó, J., Toledo, E., Corella, D., Castañer, O., Guo, X., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Fitó, M., Babio, N., Martínez-González, M. A., Sorli, J. V, López-Sabater, M. C., … Lamuela-Raventós, R. M. (2015). Intake of Total Polyphenols and Some Classes of Polyphenols Is Inversely Associated with Diabetes in Elderly People at High Cardiovascular Disease Risk. The Journal of Nutrition, 146(4), 767–777. https://doi.org/10.3945/jn.115.223610

Tsai, Y. J., & Chen, B. H. (2016). Preparation of catechin extracts and nanoemulsions from green tea leaf waste and their inhibition effect on prostate cancer cell PC-3. International Journal of Nanomedicine, 11, 1907–1926. https://doi.org/10.2147/IJN.S103759

Viuda-Martos, M., Ciro-Gómez, G. L., Ruiz-Navajas, Y., Zapata-Montoya, J. E., Sendra, E., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2012). In vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Annatto (Bixa orellana L.) Leaves and Seeds. Journal of Food Safety, 32(4), 399–406. https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00393.x

Vuli´cvuli´c, J., Šeregelj, V., Kaluševi´ckaluševi´c, A., Levi´c, S. L., Nedovi´cnedovi´c, V., Tumbas Šaponjac, V., Jasnaˇ, J., Jasnačanadanovi´c-Brunet, J., & Cetkovi´c, G. C. (2019). molecules Bioavailability and Bioactivity of Encapsulated Phenolics and Carotenoids Isolated from Red Pepper Waste. Molecules, 24(2837), 11. https://doi.org/10.3390/molecules24152837

Wang, S., Meckling, K. A., Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Tsao, R. (2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(3), 960–968. https://doi.org/10.1021/jf1040977

Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., Bao, W., & Hu, F. B. (2014). Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. BMJ (Online), 349, g4490. https://doi.org/10.1136/bmj.g4490

WHO. (2020). Non-communicable diseases. Progress monitor 2020. In World Health (Issue Oct). https://doi.org/10.5005/jp/books/11410_18

Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and

antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. Nutrients, 12(5). https://doi.org/10.3390/nu12051401

Xu, F. Q., Wang, N., Fan, W. W., Zi, C. T., Zhao, H. S., Hu, J. M., & Zhou, J. (2016). Protective effects of cycloartane triterpenoides from Passiflora edulis Sims against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cell. Fitoterapia, 115, 122. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.013

Yang, J., Zheng, Y., Gou, X., Pu, K., Chen, Z., Guo, Q., Ji, R., Wang, H., Wang, Y., & Zhou, Y. (2020). Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. International Journal of Infectious Diseases, 94, 91–95. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.017

Yuan, S., Yu, H.-J., Liu, M.-W., Tang, B.-W., Zhang, J., Gasevic, D., Larsson, S. C., & He, Q.-Q. (2020). Fat Intake and Hypertension Among Adults in China: The Modifying Effects of Fruit and Vegetable Intake. American Journal of Preventive Medicine, 58(2), 294–301. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2019.09.004

Zakeri, M., Moghadam, H., Samimi, A., & Mohebbi-Kalhori, D. (2019). Optimization of calcium alginate beads production by electrospray using response surface methodology. Materials Research Express, 6(9). https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab3377

Zayed, M. M. M., Sahyon, H. A., Hanafy, N. A. N., & El-Kemary, M. A. (2022). The Effect of Encapsulated Apigenin Nanoparticles on HePG-2 Cells through Regulation of P53. Pharmaceutics, 14(6). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061160

Zeb, A., & Ullah, F. (2016). A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. https://doi.org/10.1155/2016/9412767

Zhao, L. G., Zhang, Q. L., Zheng, J. L., Li, H. L., Zhang, W., Tang, W. G., & Xiang, Y. B. (2016). Dietary, circulating beta-carotene and risk of all-cause mortality: A meta-analysis from prospective studies. Scientific Reports, 6(1), 26983. https://doi.org/10.1038/srep26983