

CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

INVESTIGACIÓN

Evaluación de la digestión *in vitro* de compuestos bioactivos de arándanos

Zampedri, Carolina Ayelen*; Zampedri, Patricia Andrea*; Scattolaro, Ornella*; Zapata, Luz Marina*; Castagnini, Juan Manuel*

Resumen

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las antocianinas provenientes de los arándanos ejercen efectos biológicos beneficiosos sobre la salud de los consumidores. Existen métodos de análisis *in vitro* que permiten evaluar la estabilidad de las antocianinas en relación con la interacción de los distintos componentes de las matrices alimentarias, el pH, la temperatura, presencia de inhibidores o potenciadores de absorción y presencia de enzimas. El objetivo del trabajo fue poner a punto la metodología de digestión *in vitro* y evaluar la biodisponibilidad *in vitro* de antocianinas presentes en jugo de arándanos y un snack formulado con jugo de arándanos y manzana. Los resultados indican que si bien hay una pérdida de antocianinas durante el proceso digestivo, éstas son capaces de atravesar todas las etapas y llegar al intestino, posibilitando la liberación controlada de estos antioxidantes presentes en el jugo de arándano y en el snack desarrollado.

Palabras clave: Digestión *in vitro*; antocianinas; jugo de arándanos; snack

El presente artículo es resultado de las actividades desarrolladas por la becaria Carolina Ayelen Zampedri en el marco de la Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas 2015 del CIN y el proyecto de investigación PID-UNER 8068. Presentado el 13/03/2017 y admitido el 27/06/2018.

Autores: *Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos.

Contacto: castagninij@fca.uner.edu.ar



In vitro bioavailability evaluation of blueberries bioactive compounds

Abstract

In vivo and in vitro studies have shown that blueberry anthocyanins exert beneficial biological effects on consumers health. In vitro methodology allows to evaluate the stability of the anthocyanins in relation to the interaction of the different components of the dietary matrices, the pH, the temperature, the presence of inhibitors or absorption enhancers and the presence of enzymes. The aims of this research were to develop a methodology of in vitro digestion and to evaluate the in vitro bioavailability of anthocyanins present in blueberry juice and in a snack formulated with blueberry juice and apple. The results indicate that, although there is a loss of anthocyanins during the digestive process, they are able to cross all the stages and reach the intestine, allowing controlled release of these antioxidants present in blueberry juice and the snack.

Keywords: In vitro digestion; Anthocyanins; Blueberry juice; Snack

Avaliação da digestão *in vitro* de compostos bioativos de mirtilos

Resumo

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que as antocianinas dos mirtilos exercem efeitos biológicos benéficos sobre a saúde dos consumidores. Existem métodos de análise *in vitro* que permitem avaliar a estabilidade das antocianinas em relação à interação dos diferentes componentes das matrizes alimentares, o pH, a temperatura, a presença de inibidores ou potenciadores de absorção e a presença de enzimas. O objetivo do trabalho foi ajustar a metodologia de digestão *in vitro* e avaliar a biodisponibilidade *in vitro* de antocianinas presentes em suco de mirtilos e um snack formulado com suco de mirtilos e maçã. Os resultados indicam que, embora haja uma perda de antocianinas durante o processo digestivo, elas são capazes de atravessar todos os estágios e chegar ao intestino, permitindo a liberação controlada destes antioxidantes presentes no suco de mirtilos e no snack desenvolvido.

Palavras-chave: Digestão *in vitro*; antocianinas; suco de mirtilos; snack

I. Introducción

Las antocianinas forman el grupo más grande de pigmentos vegetales hidrófilos y se pueden encontrar en muchas frutas y hortalizas. El interés en los beneficios que tiene para la salud el consumo de antocianinas ha aumentado en los últimos años (Flores *et al.*, 2015). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las antocianinas ejercen un amplio rango de actividades biológicas como capacidad antioxidante; con efectos cardioprotectores; propiedades antiinflamatorias; reducción de riesgo a padecer diabetes e inhibición del desarrollo de células tumorales, especialmente en el colon (He y Giusti, 2010; Norberto *et al.*, 2013; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Algunos investigadores han propuesto que las antocianinas pueden influenciar la salud modulando la comunidad microbiana del intestino (Forester y Waterhouse, 2010; Hidalgo *et al.*, 2012).

El arándano (*Vaccinium corymbosum*) contiene grandes cantidades de antocianinas (Seeram, 2008; Vrhovsek *et al.*, 2012; Kalt *et al.*, 1999). Se ha demostrado que su consumo diario disminuye la concentración de hidroxiperóxidos lipídicos, siendo estos compuestos marcadores del estrés oxidativo de un organismo (McAnulty *et al.*, 2005). Estudios en humanos mostraron que el consumo de estos berries mejoró la sensibilidad a la insulina y mejoró los indicadores de riesgo cardiovascular en obesos, no diabéticos y participantes resistentes a la insulina (Basu *et al.*, 2010; Moghe *et al.*, 2012; Stull *et al.*, 2010; Kay y Holub, 2002). En estudios *in vivo* fueron aisladas antocianinas del hígado y de los ojos de cerdos alimentados con arándanos y también se demostró que las antocianinas pueden atravesar la barrera sangre-cerebro, lo que implica que poseen efectos en la visión y neuroprotectores (Kalt *et al.*, 2008).

La ingesta de polifenoles y la biodisponibilidad a través del tracto gastrointestinal son factores clave para determinar su importancia biológica en la salud humana. La estabilidad y absorción de estos compuestos pueden modificarse durante la digestión gástrica e intestinal dependiendo de la matriz alimenticia, pH, temperatura, la presencia de inhibidores o potenciadores de la absorción, la presencia de enzimas, la microbiota intestinal y otros factores relacionados (Tagliazucchi *et al.*, 2010). Por estas razones, existe una necesidad de estudiar la biodisponibilidad de compuestos polifenólicos y su actividad antioxidante en el tracto intestinal. Los métodos *in vivo*, utilizando animales o seres humanos, proporcionan los resultados más reales relacionados con el consumo de un alimento o compuesto en cuestión, pero requieren de mucho tiempo y son costosos, es por esto que adquieren relevancia los desarrollos de procedimientos *in vitro* (Boisen y Eggum, 1991). El modelo ideal de digestión *in vitro* proporcionará resultados lo más cercanos al efecto real en un corto

período de tiempo y podría, por lo tanto, utilizarse como una herramienta de análisis rápido y de menor costo para componentes alimenticios específicos o sistemas de liberación con diferentes estructuras y composición (Coles et al., 2005). Otra ventaja de los métodos *in vitro* es que no se ven obstaculizados por limitaciones éticas que a menudo limitan la experimentación humana o animal (Blanquet et al., 2004). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la digestión *in vitro* de antocianinas presentes en jugo de arándanos y un snack formulado con jugo de arándanos y manzana.

II. Materiales y métodos

II.1. Materia prima: se utilizaron arándanos (*Vaccinium corymbosum*) provenientes de la producción local de la ciudad de Concordia, Entre Ríos. La fruta fue lavada, desinfectada y almacenada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior utilización en los ensayos.

II.2. Obtención de jugo de arándanos: Los arándanos se trituraron y se sometieron a un proceso de despectinización enzimática a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un baño termostático durante 1,3 h utilizando una combinación de las enzimas LAFASE® CLARIFICATION en una concentración de 4 mg/100 g de fruta y LAFASE® HE GRAND CRU en una concentración de 8 mg/100 g de fruta. A continuación, el jugo se filtró a través de un tamiz de $50\text{ }\mu\text{m}$ y se pasteurizó a $77\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 85 s. esta metodología fue descrita por Castagnini et al. (2017).

II.3. Antocianinas totales: la concentración de antocianinas monoméricas totales (AT) se cuantificó por espectroscopía UV-Visible, mediante el método de pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001). Una alícuota de muestra se diluyó con buffer de pH 1,0 y otra alícuota con buffer de pH 4,5 y se registró la absorbancia a 510 y 700 nm. Las muestras de jugo fueron analizadas directamente: Para determinar las antocianinas en la manzana impregnada (snack) antes sin digestión, se realizó una extracción con metanol acidificado al 1% (v/v) con ácido clorhídrico. La AT fue calculada mediante las Ecuaciones 1 y 2.

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4,5} \quad \text{Ec. 1}$$

$$AT = \frac{\Delta A \cdot PM \cdot FD \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l} \quad \text{Ec. 2}$$

Dónde ΔA = cambio en la absorbancia, AT= concentración de antocianinas monoméricas totales (mg cianidina-3-glucósido/L); PM= masa molecular para

cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol), FD= factor de dilución, ϵ = coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido (26900), l= longitud de paso de celda (1 cm), 1000= factor de conversión de gramos a miligramos (Giusti & Wrolstad, 2001).

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado.

II.4. Actividad acuosa: se determinó por triplicado con un higrómetro de punto de rocío Aqualab Series 3.

II.5. Obtención de snack a base de manzana y jugo de arándanos: rodajas de manzana (*Granny Smith*) de 5 mm de espesor, 65 mm de diámetro exterior y 20 mm de diámetro interior fueron sumergidas en jugo de arándanos y sometidas a un proceso de impregnación vacío (presión de vacío de 5000 Pa durante 10 minutos) en estufa de vacío según la metodología descrita por Betoret et al. (2007). A continuación, se restauró la presión atmosférica y se mantuvieron sumergidos los discos por 10 minutos más. Finalmente, las manzanas impregnadas con jugo de arándanos fueron secadas en una estufa a 50 °C durante 24 h.

II.6. Digestión *in vitro*: se realizó según el método de Flores et al. (2014) con adaptaciones. Se prepararon las soluciones de saliva, jugo duodenal, jugo gástrico y jugo biliar según la **Tabla 1**.

II.7. Análisis estadístico: mediante software Statgraphics Centurion xv se realizó un análisis de la varianza con el fin de determinar si existían diferencias significativas en la concentración de antocianinas como consecuencia del avance del proceso digestivo. Se utilizó un nivel de significancia (α) de 0,05.

Tabla 1. Formulación de las soluciones modelos para la digestión *in vitro*

Saliva	Jugo gástrico	Jugo duodenal	Jugo Biliar
0,117 mg/mL NaCl	5,504 mg/mL NaCl	14,024 mg/mL NaCl	10,58 mg/mL NaCl
0,149 mg/mL KCl	1,648 mg/mL KCl	1,128 mg/mL KCl	0,752 mg/mL KCl
2,1 mg/mL NaHCO ₃	0,532 mg/mL NaH ₂ PO ₄	6,776 mg/mL NaHCO ₃	11,57 mg/mL NaHCO ₃
	0,798 mg/mL CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,16 mg/mL KH ₂ PO ₃	
2 mg/mL α -amilasa		18 mg/mL Pancreatina	
pH: 6,8 \pm 0,2	pH: 1,3 \pm 0,02	pH: 8,1 \pm 0,2	pH: 8,2 \pm 0,2

Fuente: elaboración propia.

III. Resultados y discusión

Se adaptó la metodología de Flores *et al.* (2014) para poder realizar las determinaciones de antocianinas dentro del rango de sensibilidad de las técnicas y equipamiento utilizado. Puesto que las matrices alimentarias utilizadas, manzana y jugo tienen un muy bajo contenido en proteína y la naturaleza de los compuestos de interés, las antocianinas, no son protéicas; en la fase de digestión gástrica no se utilizó pepsina.

Se seleccionó un tamaño de muestra de 4 mL para el jugo y 4 g para el snack. Los volúmenes para agregar en cada una de las etapas se determinaron teniendo en cuenta la dilución final de la muestra. En la **Tabla 2** se pueden observar los volúmenes adicionados y el tiempo de digestión de cada una de las etapas. En el caso del estómago se realizó una disminución del tiempo de digestión, puesto que no se utilizó enzima en esta etapa y, además, las antocianinas presentan una mayor estabilidad a pH ácidos.

Tabla 2. Metodología de digestión

Fase modelada	Solución agregada	Tiempo de digestión
Boca	6mL de saliva	5 min
Estomago	12mL de jugo gástrico	30 min
Intestino	12mL de jugo duodenal 6mL de jugo biliar	60 min

Fuente: elaboración propia.

Por último, cada media hora se tomaron 250 μ L y se colocaron en los respectivos tubos con 3 mL de buffer para realizar la determinación de antocianinas por el método del pH diferencial. De esta manera todas las determinaciones quedaron dentro del rango de detección de la metodología analítica utilizada.

En cuanto a la formulación del snack a base a jugo de arándanos y manzanas, el cambio de masa de los discos de manzana debido a la impregnación a vacío y secado se presenta en la **Tabla 3**. El porcentaje de impregnación calculado en función de la masa inicial del snack de manzana fue del orden del $10,54 \pm 3,04\%$ y el proceso de secado redujo en un $85,65 \pm 0,94\%$ el peso inicial de la rodaja, lo cual indica que se eliminó una gran cantidad de agua durante el proceso de secado. La actividad acuosa final del snack fue de $0,355 \pm 0,038$.

Tabla 3. Evolución de la masa de los snacks durante el proceso productivo

Muestra	Masa (g)
Manzana inicial	11,11 ± 0,23
Manzana impregnada a vacío	12,27 ± 0,34
Manzana secada a 50 °C	1,76 ± 0,16

Fuente: elaboración propia.

La concentración inicial de antocianinas en el jugo de arándanos fue de $369,83 \pm 8,37$ mg/L de jugo y en la manzana impregnada con jugo y seca a 50 °C fue de $471,68 \pm 10,44$ mg/kg de manzana seca. En la **Tabla 4** se presentan los resultados de la concentración de antocianinas en distintos momentos del proceso de digestión. El tiempo inicial (0 minutos) corresponde a la etapa de digestión con saliva, la muestra analizada a los 30 minutos se corresponde con la etapa de digestión gástrica y, por último, la etapa de digestión intestinal corresponde a los 60 y 90 minutos. Al tiempo inicial no se pudo determinar el contenido de antocianinas en la manzana impregnada, ya que, a los 0 minutos, el tiempo transcurrido es insuficiente para permitir una difusión de las antocianinas desde el snack a la solución modelo en una concentración detectable por el método espectrofotométrico utilizado.

La comparación de las condiciones de digestión con y sin enzima permitió evaluar el efecto del pH y la carga iónica sobre la estabilidad de las antocianinas. En el caso de la digestión *in vitro* sin la utilización de enzimas se registraron pérdidas del orden del 34% para el jugo de arándanos y del 54% para el snack de manzana y jugo de arándanos. Esta disminución de antocianinas está directamente relacionada con el efecto del pH en la fase intestinal (pH = 8), según lo informado por Murugan et al. (2016). En efecto, las antocianinas son estables a pH ácido, pero a pH neutro y básico experimentan reacciones de hidratación, fisión del anillo aromático y formación de chalconas ionizadas (Liang et al., 2012; Stevenson et al., 2007). En el caso del modelo digestivo con enzimas hidrolíticas se observó una reducción aún mayor, del orden del 73 y 58% para el jugo y el snack de manzana respectivamente. Otros autores han observado un incremento característico en la concentración de antocianinas durante la digestión gástrica, seguido por una disminución durante la fase intestinal (Noguer et al., 2008). Han sido informadas reducciones en la concentración de antocianinas después de la fase gástrica desde un 42% (Oidtmann et al., 2012) hasta un 4-5% (Liang et al., 2012; McDougall et al., 2005), o valores por debajo de los límites

de detección, especialmente si las concentraciones de partida eran bajas (Bouayed et al., 2011).

Tabla 4. Contenido de antocianinas totales a diferentes tiempos de digestión *in vitro*

Tiempo (min)	Jugo de arándanos (mg cianidina-3-glucósido/L)		Snack (mg cianidina-3-glucósido/kg)	
	Sin enzima	Con enzima	Sin enzima	Con enzima
0	368,23 ± 5,52 ^a	377,02 ± 8,13 ^a	-	-
30	337,3 ± 6,94 ^b	370,41 ± 5,06 ^a	154,60 ± 5,38 ^a	174,56 ± 2,05 ^a
60	308,14 ± 2,50 ^c	171,56 ± 6,08 ^b	143,71 ± 7,89 ^a	101,39 ± 9,21 ^b
90	241,57 ± 8,18 ^d	100,40 ± 9,64 ^c	65,69 ± 2,35 ^b	72,86 ± 4,51 ^c

Letras distintas indican diferencias significativas entre los valores de una misma columna.

Fuente: elaboración propia.

IV. Conclusiones

Se ha estudiado satisfactoriamente la estabilidad de las antocianinas mediante un método de digestión *in vitro* propuesto por Flores et al. (2014) con modificaciones. Se observó que la degradación de estos compuestos no ocurre sólo como consecuencia de la presencia de enzimas, sino que también las condiciones de pH y carga iónica tienen un efecto importante sobre su estabilidad. Son necesarios un mayor número de ensayos y tipos de muestras para mejorar el protocolo de digestión y validarlo.

Referencias bibliográficas

- BASU, A., Du, M., Leyva, M. J., Sanchez, K., Betts, N. M., WU, M., Aston, C. E., Lyons, T. J. (2010). Blueberries Decrease Cardiovascular Risk Factors in Obese Men and Women with Metabolic Syndrome¹²³. *The Journal of Nutrition*, 140(9), 1582-1587. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.3945%2Fjn.110.124701>
- BETORET, N., Andrés, A., Segui, L., Fito, P. (2007). Application of safes (systematic approach to food engineering systems) methodology to dehydration of apple by combined methods. *Journal of Food Engineering*, 83(2), 186-192. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.018>
- BLANQUET, S., Zeijdner, E., Beyssac, E., Meunier, J. P., Denis, S., Havenaar, R., Alric, M. (2004). A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various

- physiological conditions. *Pharmaceutical Research*, 21(4), 585-591.
- BOISEN, S. y Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4(1), 141-162. Recuperado de <https://doi.org/10.1079/NRR19910012>
- BOUAYED, J., Hoffmann, L. y Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- CASTAGNINI, J. M., Zapata, L. M., Quinteros, C. F. y Noceti, A. (2017). Multiple response optimization of blueberry juice depectinization. *Ciencia Rural*, 47(4), 1-9. Recuperado de <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160501>
- COLES, L. T., Moughan, P. J. y Darragh, A. J. (2005). In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, P(0), 421-444. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.021>
- FLORES, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Pegg, R. B. y Kong, F. (2014). Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 153, 272-278. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.063>
- FLORES, G., Ruiz del Castillo, M. L., Costabile, A., Klee, A., Bigetti Guergoletto, K. y Gibson, G. R. (2015). In vitro fermentation of anthocyanins encapsulated with cyclodextrins: Release, metabolism and influence on gut microbiota growth. *Journal of Functional Foods*, 16, 50-57. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.022>
- FORESTER, S. C. y Waterhouse, A. L. (2010). Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5320-5327. Recuperado de <https://doi.org/10.1021/jf904017z>
- GIUSTI, M. M. y Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp. 1-13). John Wiley & Sons, Inc. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- HE, J. y Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 163-187. Recuperado de <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>
- HIDALGO, M., Oruna-Concha, M. J., Walton, G. E., Kallithraka, S., Spencer, J. P. E., Gibson, G. R. y Pascual-Teresa, S. DE. (2012). Metabolism of Anthocyanins by Human Gut Microflora and Their Influence on Gut Bacterial Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3882-3890.
- KALT, W., Blumberg, J. B., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Fillmore, S. A. E., Graf, B. A., O'leary, J. M., Milbury, P. E. (2008). Identification of anthocyanins in the liver, eye,

- and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 705-712. <https://doi.org/10.1021/jf071998l>
- KALT, W., McDonald, J. E., Ricker, R. D. y Lu, X. (1999). Anthocyanin content and profile within and among blueberry species. *Canadian Journal of Plant Science*, 79(4), 617-623. <https://doi.org/10.4141/P99-009>
- KAY, C. D. y Holub, B. J. (2002). The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *The British Journal of Nutrition*, 88(4), 389-98. Recuperado de <https://doi.org/10.1079/BJN2002665>
- LIANG, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., Mao, G., Yang, L. (2012). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International*, 46(1), 76-82. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.024>
- MCANULTY, S. R., McAnulty, L. S., Morrow, J. D., Khardouni, D., Shooter, L., Monk, J., Gross, S., Brown, V. (2005). Effect of daily fruit ingestion on angiotensin converting enzyme activity, blood pressure, and oxidative stress in chronic smokers. *Free Radical Research*, 39(11), 1241-8. Recuperado de <https://doi.org/10.1080/10715760500306836>
- MCDUGALL, G. J., Fyffe, S., Dobson, P. y Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66, 2540-2548. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.004>
- Moghe, S. S., Juma, S., Imrhan, V. y Vijayagopal, P. (2012). Effect of Blueberry Polyphenols on 3T3-F442A Preadipocyte Differentiation. *Journal of Medicinal Food*, 15(5), 448-452. Recuperado de <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0234>
- MURUGAN, R., Chandran, R. y Parimelazhagan, T. (2016). Effect of in vitro simulated gastrointestinal digestion of Phoenix loureirii on polyphenolics, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 363-370. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.075>
- NOGUER, M., Cerezo, A. B., Rentzsch, M., Winterhalter, P., Troncoso, A. M. y García-Parrilla, M. C. (2008). Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8879-8884. Recuperado de <https://doi.org/10.1021/jf8007376>
- NORBERTO, S., Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M. y Calhau, C. (2013). Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *Journal of Functional Foods*, 1-11. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.015>
- OIDTMANN, J., Schantz, M., Mäder, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. (2012). Preparation and comparative release characteristics of three anthocyanin encapsulation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 844-851. Recuperado de <https://doi.org/10.1021/jf2047515>
- SEERAM, N. P. (2008). Berry fruits for cancer prevention: Current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 630-635. Recuperado de <https://doi.org/10.1021/jf072504n>

- STEVENSON, D. E., Cooney, J. M., Jensen, D. J., Zhang, J. y Wibisono, R. (2007). Comparison of the relative recovery of polyphenolics in two fruit extracts from a model of degradation during digestion and metabolism. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(8), 939-945. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700087>
- STULL, A. J., Cash, K. C., Johnson, W. D., Champagne, C. M. y Cefalu, W. T. (2010). Bioactives in Blueberries Improve Insulin Sensitivity in Obese, Insulin-Resistant Men and Women. *Journal of Nutrition*, 140(10), 1764-1768. Recuperado de <https://doi.org/10.3945/jn.110.125336>
- TAGLIAZUCCHI, D., Verzelloni, E., Bertolini, D. y Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.030>
- VRHOVSEK, U., Masuero, D., Palmieri, L. y Mattivi, F. (2012). Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1), 9-16. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.015>
- ZAFRA-STONE, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A. y Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(6), 675-683. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700002>