



**Universitat**  
de les Illes Balears

# Uso del análisis de imagen para evaluar el efecto de los ultrasonidos de potencia sobre la microestructura de vegetales en procesos de tratamiento por inmersión.

MARINA CALAHORRO GARCÍA

**Memoria del Trabajo de Fin de Máster**

Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química  
(Especialidad en Química y Tecnologías Alimentarias)  
de la  
UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2018-19

*Fecha:* septiembre 2019

*Nombre Tutor del Trabajo:* Susana Simal Florindo

*Nombre Cotutor:* Valeria Soledad Eim Iznardo



## Índice

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
1.1. INTENSIFICACIÓN DE PROCESOS MEDIANTE ULTRASONIDOS DE POTENCIA .....	9
1.1.1. <i>Equipo de ultrasonidos de potencia</i> .....	11
1.2. ANÁLISIS DE LA MICROESTRUCTURA .....	12
1.2.1. <i>Análisis de imagen</i> .....	15
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1. MATERIA PRIMA .....	19
3.2. LÍQUIDOS DE PRETRATAMIENTO .....	20
3.3. EQUIPO DE ULTRASONIDOS MEDIANTE SONOTRODO EN MEDIO LÍQUIDO .....	20
3.4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES .....	21
3.4.1. <i>Caracterización del sonotrodo de ultrasonidos</i> .....	21
3.4.2. <i>Tratamiento osmótico asistido por ultrasonidos</i> .....	22
3.4.3. <i>Análisis de la microestructura</i> .....	23
3.4.4. <i>Análisis químicos</i> .....	24
3.5. ANÁLISIS DE IMAGEN.....	25
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	28
3.7. PLANIFICACIÓN DE EXPERIENCIAS .....	28
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS Y LOS LÍQUIDOS DE INMERSIÓN .....	30
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL SONOTRODO .....	30
4.3. ANÁLISIS DE LA MICROESTRUCTURA .....	31
4.3.1. <i>Análisis cualitativo</i> .....	31
4.3.2. <i>Análisis cuantitativo</i> .....	43
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>52</b>

## Índice de figuras

Figura 1.1. Esquema de la formación de un microjet. ....	10
Figura 1.2. Equipos de aplicación de ultrasonidos: baño (A) y sonda (B). ....	12
Figura 1.3. Imágenes de la microestructura de una muestra de manzana, obtenidas mediante SEM (A) y MO (B) (Dalmau et al., 2017). ....	15
Figura 1.4. Procesamiento típico de imágenes obtenidas mediante tomografía computarizada de rayos X para el análisis del tamaño y la forma de los poros y las células del tejido de frutas (Herremans et al., 2015). ....	16
Figura 3.1. Materia prima: berenjena <i>black enorme</i> (A), manzana <i>Granny Smith</i> (B) y remolacha <i>conditiva</i> (C). ....	19
Figura 3.2. Esquema de la obtención de las láminas de manzanas. ....	19
Figura 3.3. Zonas de corte de las diferentes materias primas: berenjena (A), manzana (B) y remolacha (C). ....	20
Figura 3.4. Generador de ultrasonidos UP400S. ....	21
Figura 3.5. Sonotrodo H22. ....	21
Figura 3.6. Esquema del equipo de ultrasonidos mediante sonotrodo. ....	22
Figura 3.7. Esquema del corte de una lámina de berenjena posterior al tratamiento por inmersión en zumo de berenjena con asistencia de ultrasonidos de potencia. ....	23
Figura 3.8. Microscopio Electrónico de Barrido HITACHI S-3400N. ....	23
Figura 3.9. Microscopio Óptico BX60. ....	24
Figura 3.10. Optimización de imágenes microestructurales de berenjena y remolacha. ....	25
Figura 3.11. Esquema del procesamiento de imagen de muestras de manzana con ImageJ. ....	26
Figura 3.12. Esquema de la planificación de experimentos realizados. ....	28
Figura 4.1. Imágenes representativas de las muestras control de cada materia prima, obtenidas mediante SEM y MO. ....	32

Figura 4.2. Imágenes de SEM representativas de las diferentes muestras de berenjena. Ruptura celular (R), fisura del tejido (F), tejido apelotonado (A) y microcanal (C). .....	35
Figura 4.3. Imágenes de SEM representativas de las diferentes muestras de manzana. Ruptura celular (R), fisura del tejido (F), tejido apelotonado (A) y microcanal (C). .....	36
Figura 4.4. Imágenes de SEM representativas de las diferentes muestras de remolacha. Ruptura celular (R), fisura del tejido (F) y tejido apelotonado (A). .....	37
Figura 4.5. Imágenes de MO en las que se observan las paredes celulares de las diferentes muestras de berenjena. Se señalan en rojo las rupturas de pared celular. ....	40
Figura 4.6. Imágenes de MO en las que se observan las paredes celulares de las diferentes muestras de manzana. Se señalan en rojo las rupturas de pared celular.....	41
Figura 4.7. Imágenes de MO en las que se observan las paredes celulares de las diferentes muestras de remolacha. Se señalan en rojo las rupturas de pared celular. ....	42
Figura 4.8. Perfiles de los percentiles del área celular de las muestras control de berenjena, manzana y remolacha. ....	44
Figura 4.9. Perfiles de los percentiles del área celular de las muestras sin tratar y tratadas de berenjena, manzana y remolacha. ....	47

## Índice de tablas

Tabla 3.1. Macros aplicadas en el análisis de imagen de las diferentes materias primas. .....	27
Tabla 4.1. Caracterización inicial de las muestras.....	30
Tabla 4.2. Caracterización de los líquidos de tratamiento.....	30
Tabla 4.3. Caracterización del sonotrodo de ultrasonidos.....	31
Tabla 4.4. Potencia e intensidad del sonotrodo de ultrasonidos.....	31
Tabla 4.5. Valores del percentil 50 del tamaño celular ( $\text{mm}^2$ ) y número de células por unidad de superficie de tejido (número de células/ $\text{mm}^2$ ) de las muestras control de berenjena, manzana y remolacha.....	43
Tabla 4.6. Valores del percentil 50 del tamaño celular ( $\text{mm}^2$ ) y número de células por unidad de superficie de tejido (número de células/ $\text{mm}^2$ ) de las muestras de berenjena, manzana y remolacha. ....	45

## Resumen

El objetivo fundamental del presente trabajo consistió en estudiar la microestructura de vegetales de diferente porosidad mediante análisis de imagen y evaluar la influencia del uso de ultrasonidos en el tratamiento por inmersión en fase líquida, sobre dicha microestructura.

La aplicación de ultrasonidos en medio líquido puede modificar las propiedades tecnológicas y las características de calidad de los alimentos. El efecto de los ultrasonidos de potencia sobre las muestras tratadas por inmersión en diferentes líquidos se evaluó sobre la microestructura de los vegetales.

Se seleccionaron tres vegetales con microestructuras porosidades iniciales diferentes, berenjena (muy poroso), manzana (porosidad media) y remolacha (porosidad baja). Láminas de 5 mm de espesor de cada vegetal, fueron sumergidas en diferentes líquidos (agua destilada, disolución acuosa de ácido cítrico 1% y zumo del propio vegetal) durante 5 min a 25°C, sin y con asistencia de ultrasonidos de potencia, aplicados mediante un sonotrodo de 22 mm de diámetro. Se caracterizó el sonotrodo utilizado, determinándose la potencia efectiva generada en cada medio de inmersión. Se observó que el medio de inmersión no afectó significativamente a la potencia del sonotrodo, siendo el valor medio de la intensidad en los cinco líquidos de  $20.9 \pm 0.4 \text{ W/cm}^2$ . Como control, se utilizó muestra fresca que no se sometió a tratamiento.

La microestructura de los vegetales se estudió mediante imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía óptica (MO). Mediante análisis de las imágenes, se analizó la microestructura de forma cualitativa (SEM y MO) y también cuantitativa (MO). El procesamiento y análisis de imágenes microestructurales obtenidas por microscopía óptica se llevó a cabo con el software ImageJ 1.52k.

Se observó que el tratamiento por inmersión en diferentes líquidos modificó la microestructura de los distintos vegetales. En general, se puede concluir que los efectos de la inmersión sobre la microestructura son dependientes, tanto del líquido de inmersión como de las características iniciales de la estructura del vegetal. La asistencia de ultrasonidos durante el tratamiento por inmersión de los diferentes vegetales provocó, en todos los casos, mayores cambios microestructurales, destacando el aumento de la ruptura celular y del tamaño de partícula (entre un 11 y un 29 %).

## 1. Introducción

Las técnicas de procesado de alimentos (congelado, secado, etc.) producen modificaciones en las propiedades de los alimentos, como son las propiedades físicas y estructurales, la composición química y nutricional inicial, la estabilidad de los nutrientes y la liberación y absorción de compuestos beneficiosos (Dalmau, Bornhorst, Eim, Rosselló, & Simal, 2017).

La evolución del procesado de alimentos está impulsada por los cambios en las preferencias de los consumidores y en la necesidad de producir alimentos seguros y de alta calidad (Alarcon-Rojo, Carrillo-Lopez, Reyes-Villagrana, Huerta-Jiménez, & Garcia-Galicia, 2019). De este modo, el aumento de la conciencia sobre la sostenibilidad energética, las preocupaciones medioambientales, las nuevas materias primas y los recientes avances en la optimización de procesos, han renovado el interés por la intensificación de procesos (PI) (Demirel, Li, & Hasan, 2019).

La intensificación de procesos (PI) es una de las vías con mayor potencial de desarrollo en la industria alimentaria y una de las áreas de estudio más interesantes en el campo de la ingeniería de alimentos (Rodríguez Barragán, 2014). Consiste en mejorar el procesado modificando procesos convencionales o desarrollando nuevas tecnologías para reducir las necesidades de energía, aumentar rendimientos y/o incrementar la calidad de productos.

Entre las diferentes técnicas que se pueden utilizar para dicha intensificación (microondas, infrarrojos, pulsos eléctricos, etc.) cabe destacar la aplicación de energía acústica.

Los ultrasonidos de potencia son ampliamente utilizados en la industria alimentaria en multitud de operaciones de procesado de alimentos, como son el secado, marinado, filtración, congelación, esterilización, pasteurización, extracción, corte, homogenización, etc. (Alarcon-Rojo et al., 2019; Chemat, Zill-e-Huma, & Khan, 2011; Robles-Ozuna & Ochoa-Martínez, 2012). También son utilizados como tratamiento previo a dichos procesos, entre los que destaca el secado, y consisten en tratar el alimento por inmersión en agua o en una disolución acuosa mediante aplicación de ultrasonidos de potencia (Miano, Rojas, & Augusto, 2019). Estos pretratamientos tienen la ventaja de poder llevarse a cabo a temperatura ambiente, sin necesidad de calentamiento, lo que

reduce la probabilidad de degradación de los alimentos (Fernandes, Linhares, & Rodrigues, 2008).

Varios estudios han demostrado la eficacia de los tratamientos asistidos por ultrasonidos para la modificación de la microestructura y las características de textura de los productos alimenticios, la modificación de las propiedades funcionales de las proteínas, la inactivación o la aceleración de la actividad enzimática y la inactivación de varios microorganismos, entre otros (Welti-Chanes, Morales-de la Peña, Jacobo-Velázquez, & Martín-Belloso, 2017)

La manzana, la berenjena y la remolacha han sido reconocidas como alimentos saludables para el cuerpo humano, especialmente en los países orientales (Vallespir, Rodríguez, Eim, Rosselló, & Simal, 2019). La manzana tiene una participación significativa en la producción mundial de frutas, pudiéndose consumir frescas o procesadas en forma de jugo, mermelada, manzanas secas, etc. (Doymaz, 2010). La berenjena es un cultivo importante en América del Norte, Asia y el área del Mediterráneo (Puig, Perez-Munuera, Carcel, Hernando, & Garcia-Perez, 2012) y actualmente es cultivada alrededor del mundo (Niño-Medina, Urías-Orona, Muy-Rangel, & Heredia, 2017). La remolacha se caracteriza por contener betalainas, un compuesto bioactivo usado en la industria alimentaria como pigmento natural de color rojo (Tutunchi, Roufegarinejad, Hamishehkar, & Alizadeh, 2019).

### **1.1. Intensificación de procesos mediante ultrasonidos de potencia**

Los ultrasonidos son ondas acústicas de frecuencia superior al límite de audición humano. Éstos se clasifican en baja frecuencia (20-100 kHz) y alta frecuencia (>100 kHz) (Liu et al., 2019).

Los ultrasonidos de potencia (US) son aquellos de intensidad alta y frecuencia comprendida entre los 20 y 100 kHz. Este tipo de ultrasonidos tiene la capacidad de producir cambios en las propiedades físicas, mecánicas, químicas y/o bioquímicas del material o proceso en el que se aplican, derivando de ello una amplia gama de aplicaciones industriales (Chemat et al., 2011). Además, los ultrasonidos se consideran una tecnología segura, no tóxica y ecológica, por ello reciben una atención especial en la industria alimentaria (Liu et al., 2019).

La principal característica de los ultrasonidos de potencia es su capacidad para mejorar los procesos de transferencia de materia mediante una serie de mecanismos (como la formación de microcorrientes, difusión, microagitación, etc.) activados por los efectos que producen las ondas ultrasónicas de elevada amplitud (J. a. Cárcel, Garcia-Perez, Riera, & Mulet, 2011).

Los efectos que producen los ultrasonidos de potencia sobre un proceso determinado vienen dados por las características de la onda ultrasónica (intensidad y frecuencia) y por el tipo de medio en el que se propaga dicha onda ultrasónica.

Cuando estas ondas acústicas son transmitidas a través de un líquido en el cual hay sumergida una pieza de alimento, los efectos que se pueden producir son:

- *Cavitación*. Este efecto se produce cuando las burbujas provocadas por la agitación del medio colapsan entre ellas, o al implosionar sobre ellas mismas, generando energía y aumentos de temperatura en esa zona. Cuando la implosión de una burbuja se produce cerca de la superficie del sólido, se genera una corriente de líquido (llamada *microjet*) hacia el interior de la burbuja que puede golpear en el sólido si se dirige hacia él (Figura 1.1). Este hecho provoca la ruptura de las capas externas del sólido, lo que mejora la transferencia de materia entre el líquido y el sólido (Deng & Zhao, 2008).

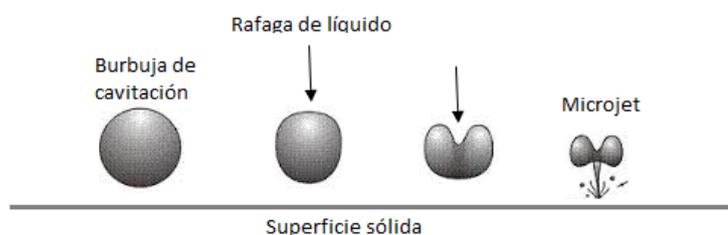


Figura 1.1. Esquema de la formación de un microjet.

- *Calentamiento*. La propagación de ondas ultrasónicas en un medio tiene como consecuencia la vibración de todas las partículas que se encuentren en dicho medio. La resistencia de las partículas del medio a vibrar (viscosidad) produce la conversión de parte de la energía acústica en calor. Este calentamiento favorece los procesos de transferencia de materia.

- *Microagitación*. Este fenómeno se genera por la interacción de las ondas acústicas, que viajan por el líquido, con el sólido. La microagitación únicamente se produce en las interfaces líquido-sólido y puede afectar de manera considerable al espesor de la capa límite de difusión, reduciéndola y favoreciendo la transferencia de materia.
- *Efecto esponja*. Los ultrasonidos de potencia producen sucesivos ciclos de compresión y descompresión. Cuando en el medio hay un sólido, estas sucesivas compresiones y descompresiones producen el llamado “efecto esponja” del sólido (Nowacka, Wiktor, Śledź, Jurek, & Witrowa-Rajchert, 2012). Este efecto puede favorecer los procesos de transferencia de materia, ya que produce microfisuras en la estructura de algunos materiales, creando así canales microscópicos.

Se debe enfatizar en que los mecanismos que aceleran la transferencia de materia pueden causar cambios irreversibles en la estructura del producto. De este modo, como todas las ondas mecánicas, los ultrasonidos deben considerarse como un factor que puede influir en la estructura interna de las células. Cada célula contiene varios componentes que pueden verse afectados (Rajewska & Mierzwa, 2017):

- La pared celular y la membrana plasmática pueden romperse mecánicamente.
- En la vacuola y el citoplasma puede producirse cavitación.
- El núcleo celular, debido a su composición, es sensible a la alteración por presión.

### 1.1.1. Equipo de ultrasonidos de potencia

El equipo necesario para la aplicación de ultrasonidos de potencia está constituido por tres elementos fundamentales (García Pérez, 2007):

- **Generador**: Transforma la señal eléctrica de la red a la frecuencia deseada.
- **Transductor**: Genera los ultrasonidos a partir de la señal eléctrica de alta frecuencia que recibe del generador. Suele ser un cuerpo vibrante.
- **Emisor**: Transmite la energía acústica generada por el transductor al medio que se desea tratar.

La aplicación de ultrasonidos se puede llevar a cabo de tres formas distintas: aplicada directamente sobre el producto, acoplada con el dispositivo o sumergido en un medio ultrasónico (Chemat et al., 2011).

De entre los equipos de aplicación de ultrasonidos en medios acuosos destacan principalmente los baños y los sistemas tipo sonda (Figura 1.2). Los primeros presentan algunas desventajas, como la poca potencia que suministran al medio, la dificultad en el control de la temperatura y la variación de la intensidad (González-Centeno, 2013).

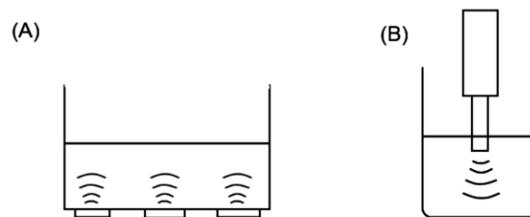


Figura 1.2. Equipos de aplicación de ultrasonidos: baño (A) y sonda (B).

## 1.2. Análisis de la microestructura

El conocimiento sobre la estructura alimentaria ha avanzado considerablemente en los últimos 30 años. Además del interés académico por comprender la compleja estructura y el comportamiento de los alimentos, estos avances están permitiendo el diseño de nuevos alimentos para mejorar la seguridad, la calidad y los beneficios nutricionales y saludables de los alimentos, tanto naturales como procesados (Aguilera, 2005; Morris & Groves, 2013). Cabe incidir en que la comprensión de la microestructura de los alimentos y cómo cambia ésta durante las operaciones de procesamiento es esencial para producir alimentos de alta calidad (Verboven, Defraeye, & Nicolai, 2018).

La microestructura de los alimentos puede definirse como la organización e interacción de sus componentes y es estudiada mediante diversas técnicas microscópicas, como son: microscopía electrónica de barrido, microscopía de transmisión electrónica, microscopía óptica, microscopía confocal láser de barrido, tomografía computarizada de rayos X, resonancia magnética nuclear, microscopía de fuerza atómica, etc.

En los últimos años, se ha observado que el efecto de los diferentes métodos de procesamiento sobre la estructura de los materiales puede apreciarse en imágenes obtenidas a nivel microscópico, las cuales muestran la influencia de las diferentes variables de operación en la estructura del tejido vegetal, los cambios en su composición y en su configuración interna (Rajewska & Mierzwa, 2017).

Numerosos autores (Ortuño, Pérez-Munuera, Puig, Riera, & Garcia-Perez, 2010; Ozuna, Álvarez-Arenas, Riera, Cárcel, & Garcia-Perez, 2014; Ozuna, Cárcel, Walde, & Garcia-Perez, 2014; Rodríguez, Santacatalina, et al., 2014; Santacatalina, Contreras, Simal, Cárcel, & Garcia-Perez, 2016; Vallespir, Rodríguez, Eim, Rosselló, & Simal, 2018) han utilizado el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar la topografía de la superficie de alimentos. Las imágenes obtenidas mediante SEM, gracias a su gran profundidad de campo, proporcionan una imagen tridimensional de la superficie que se está estudiando, lo que hace posible evaluar la morfología y la porosidad, aunque no permite la observación de los componentes de las células, como el núcleo, las vacuolas, el citoplasma, etc. (Rajewska & Mierzwa, 2017).

Este tipo de microscopía ha sido ampliamente utilizada para analizar la microestructura de diferentes vegetales y estudiar los daños causados por los ultrasonidos de potencia en sus estructuras:

- Puig et al. (2012) estudiaron el efecto de la aplicación de ultrasonidos de potencia durante el secado convectivo a dos potencias diferentes (45W y 90W) sobre la microestructura de la berenjena. La microestructura de las muestras sin tratar y tratadas se analizó mediante el uso de SEM y CryoSEM y observaron que el secado convectivo a potencia ultrasónica moderada (45 W) y temperatura de 313K causó una degradación estructural menos severa en comparación al secado en las mismas condiciones, pero sin asistencia de ultrasonidos, debido al menor tiempo de secado y a los leves efectos mecánicos producidos en las células por los ultrasonidos.
- Nowacka et al. (2012) estudiaron el uso de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el tratamiento previo al secado a diferentes tiempos (10, 20 y 30 min.) como método para mejorar la transferencia de masa en muestras de manzana. La microestructura de las muestras de manzanas se analizó mediante el uso de SEM a 265x aumentos y observaron que la aplicación de ultrasonidos de potencia previa al secado provocó rotura celular y cambios en el tejido, siendo mayor la destrucción cuanto más tiempo se exponía la muestra a la aplicación de las ondas.

- Esquivel-González et al. (2017) estudiaron el efecto de la aplicación de ultrasonidos de potencia durante la extracción del pigmento natural de la remolacha, a diferente pH (3.5, 5.0 y 6.5), amplitudes de ultrasonido (40, 60 y 80%) y tiempos (2, 6 y 10 min.). La microestructura de las muestras de puré de remolacha se analizó mediante el uso de SEM a diferentes aumentos (250x y 10000x) y observaron que la aplicación de ultrasonidos de potencia causó la formación de microcanales y modificó la superficie del tejido, siendo ésta más rugosa cuánto mayor fue la amplitud de ultrasonido aplicada.

Otros autores (Eim, García-Pérez, Rosselló, Femenia, & Simal, 2012; Fernandes, Gallão, & Rodrigues, 2009; González-Fésler, Salvatori, Gómez, & Alzamora, 2008; Ramírez, Troncoso, Muñoz, & Aguilera, 2011; Sigurgisladottir, Ingvarsdottir, Torrissen, Cardinal, & Hafsteinsson, 2000) han estudiado la microestructura de vegetales a partir de las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (MO). La microscopía óptica es una técnica estándar para la visualización de la microestructura de muestras de alimentos mediante la interacción de un haz de luz (fotones), utilizando diferentes lentes para obtener una imagen bidimensional de contraste.

Se ha encontrado en la bibliografía el uso de este instrumento en estudios sobre la microestructura de diferentes vegetales:

- Vallespir et al. (2019) estudiaron los efectos del tratamiento de congelado a diferentes temperaturas (-20, -80 y -196 °C) previo al secado convectivo en vegetales de diferente porosidad (berenjena, manzana y remolacha). La microestructura de las muestras se analizó mediante el uso de MO, observando que el pretratamiento de congelado previo al secado afectó de manera diferente a la microestructura de cada vegetal, dependiendo de la velocidad de congelación y de la microestructura original.
- Dalmau et al. (2017) estudiaron los efectos de distintos tratamientos (congelado, liofilización y secado convectivo) sobre la digestión gástrica *in vitro* de muestras de manzana. Se analizaron los cambios microestructurales de las muestras mediante el uso de SEM y MO, y observaron una destrucción celular significativa debida a los tratamientos y digestión gástrica llevados a cabo.

- Valerga et al. (2019) estudiaron los cambios microestructurales y de calidad de tres etapas de crecimiento distintas de berenjena (*Baby*, *Commercial maturity* y *Advanced commercial maturity*) en tres momentos de producción: finales de primavera, finales de verano y finales de otoño. Los cambios microestructurales se analizaron mediante el uso de MO y observaron que tanto el metabolismo como la microestructura se ven afectados por la temporada de crecimiento del vegetal.

En la siguiente figura (Figura 1.3) pueden observarse dos imágenes de la microestructura de una muestra de manzana sin tratar, obtenidas mediante dos técnicas de microscopía diferentes: SEM (Figura 1.3A) y MO (Figura 1.3B).

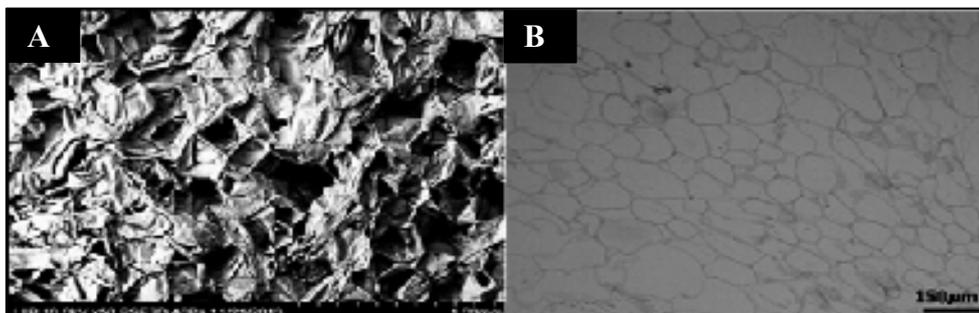


Figura 1.3. Imágenes de la microestructura de una muestra de manzana, obtenidas mediante SEM (A) y MO (B) (Dalmau et al., 2017).

### 1.2.1. Análisis de imagen

El sistema visual humano no permite realizar de forma adecuada determinaciones objetivas y cuantitativas de las características de la imagen que vemos a través de un microscopio. Por ello, para obtener información cuantitativa y datos numéricos de una imagen, es necesario trabajar con *software* adecuado que permita reconocer, diferenciar y cuantificar los objetos de la imagen. De este modo, el análisis y el procesamiento de imágenes proporcionan los datos cuantitativos necesarios para el análisis y diseño de la microestructura alimentaria (Aguilera, 2005).

Existe una gran variedad de *software* para llevar a cabo el procesamiento de imágenes, entre los que se encuentran ImageJ, Cell Profiler, MATLAB, Axiovision AC y analySIS, entre los más habituales en investigación.

Los diferentes pasos del procesamiento de imágenes generalmente son la mejora de la imagen, la segmentación de la imagen y el análisis cuantitativo (Verboven et al., 2018):

- Los dos primeros pasos consisten en mejorar la separación de los objetos de la imagen. Generalmente las imágenes se obtienen en una escala de grises característica y, además, es posible que las imágenes tengan un cierto nivel de ruido o artefactos que podrían confundirse con una zona de la estructura. Por ello, previamente a la segmentación, se suele filtrar y mejorar el contraste de la imagen, un paso que, generalmente, implica una considerable fase de prueba-error para realizar la mejora óptima. Al llevar a cabo la segmentación, convertimos la imagen optimizada en escala de grises en una imagen en blanco y negro, lo que permite diferenciar el espacio vacío, del material sólido. Para mejorar el proceso o eliminar posibles componentes aislados, pueden aplicarse pasos complementarios, como la erosión o la dilatación. En la Figura 1.4 se muestra un ejemplo de procesamiento de imagen típico.

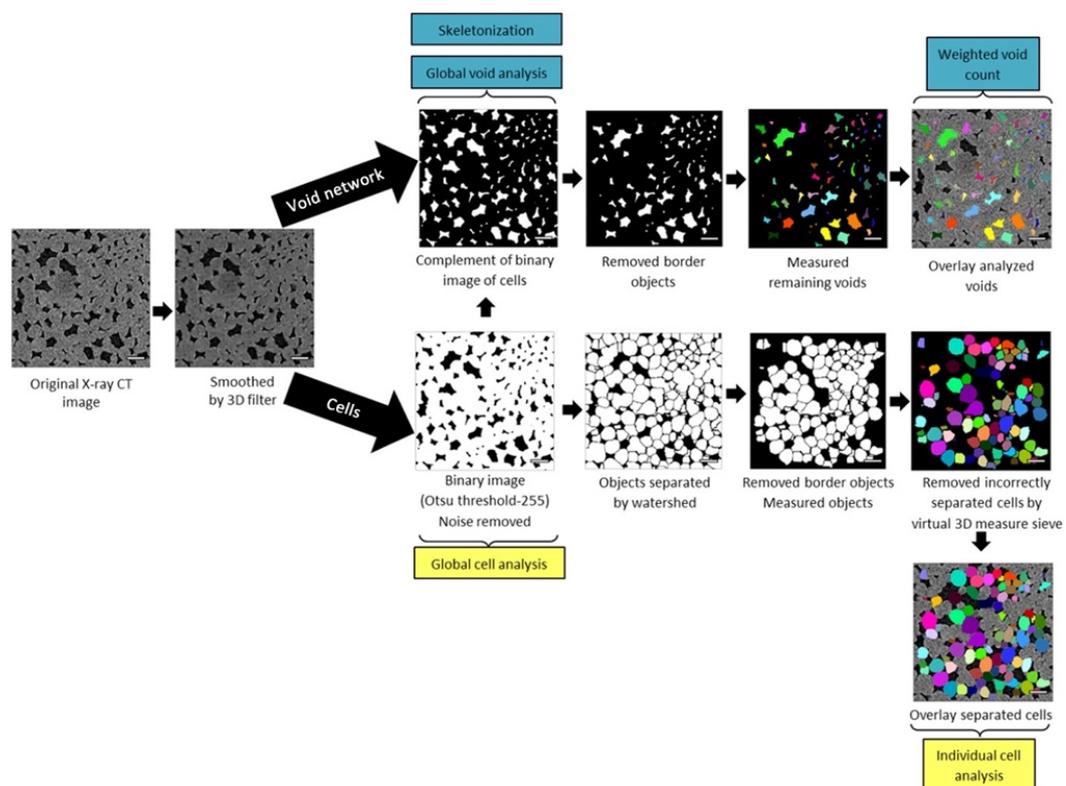


Figura 1.4. Procesamiento típico de imágenes obtenidas mediante tomografía computarizada de rayos X para el análisis del tamaño y la forma de los poros y las células del tejido de frutas (Herremans et al., 2015).

- El último paso consiste en caracterizar cada una de las fases segmentadas. Resulta relativamente sencillo el cálculo de volumen y el área de la superficie de partículas, burbujas o poros para realizar una distribución de tamaño. También pueden aplicarse algoritmos de separación de ajuste de esfera para ayudar a caracterizar cómo cambian las dimensiones a lo largo de la microestructura. La comparación estadística de las distribuciones de tamaño permite cuantificar las diferencias entre microestructuras (Russ, 2005).

## 2. Objetivo

El presente trabajo presentado se llevó a cabo en el marco del un proyecto de investigación desarrollado por el Grupo de Ingeniería Agroalimentaria de la Universidad de las Islas Baleares. Este proyecto, financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (INIA) y cofinanciados con fondos del FEDER, lleva por título:

“Revalorización integral de subproductos en función de sus usos potenciales: Extracción de compuestos de interés mediante aplicación de US de potencia y estudios de bioaccesibilidad in vitro (RTA 2015-00060- C04-03)” dentro del proyecto coordinado: “Gestión sostenible y revalorización de subproductos agroalimentarios para alimentación, energía y uso agronómico”.

Hipótesis de partida: la aplicación de ultrasonidos de potencia en medio líquido puede modificar las características microestructurales de los alimentos.

El objetivo fundamental del presente trabajo consiste en estudiar la microestructura de diferentes tejidos vegetales mediante microscopía y análisis de imagen y evaluar la influencia del uso de ultrasonidos en el tratamiento por inmersión en fase líquida, sobre dicha microestructura.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Materia prima

Como materia prima (Figura 3.1) para este estudio se utilizó berenjena (*Solanum melongena*) de la variedad *black enorme*, manzana (*Malus domestica*) de la variedad *Granny Smith* y remolacha (*Beta vulgaris*) de la variedad *conditiva*.



Figura 3.1. Materia prima: berenjena *black enorme* (A), manzana *Granny Smith* (B) y remolacha *conditiva* (C).

Todos los vegetales se adquirieron en un mercado local de Palma de Mallorca (España). Criterios como la uniformidad del color, el grado de maduración y la ausencia de golpes, fueron usados en la selección. Los vegetales fueron almacenados a  $2\pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Para llevar a cabo los experimentos, los vegetales fueron lavados y cortados en rodajas y de cada rodaja se extrajo una lámina rectangular de 5mm de grosor, como se muestra esquemáticamente para el caso de la manzana en la Figura 3.2.

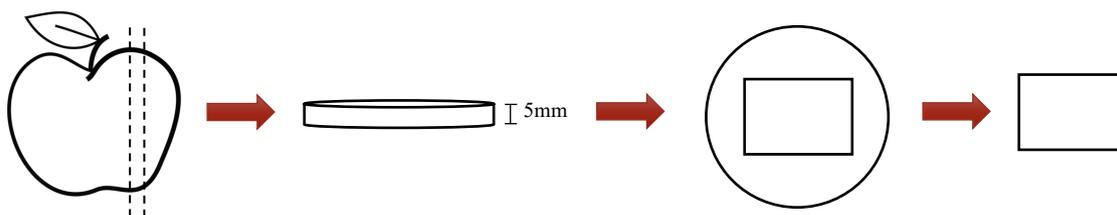


Figura 3.2. Esquema de la obtención de las láminas de manzanas.

Con la finalidad de obtener unas láminas uniformes y homogéneas, evitando en la medida de lo posible semillas e irregularidades, se trabajó con las zonas de corte de cada vegetal que se señalan en la Figura 3.3. En manzanas y remolachas, se trabajó con los costados del vegetal, mientras que en berenjenas se trabajó con la parte superior de cada unidad.

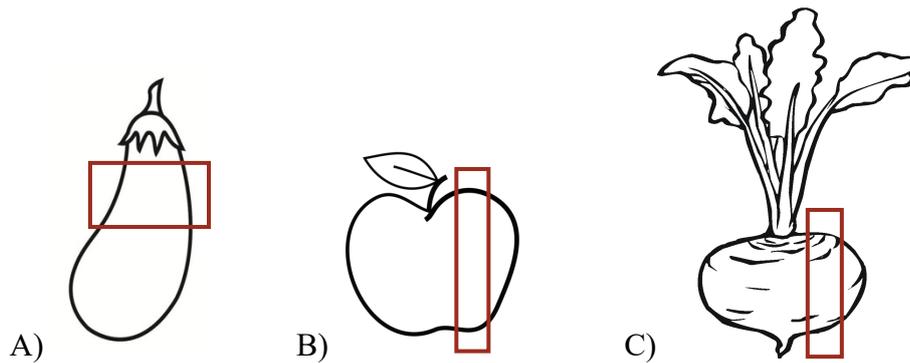


Figura 3.3. Zonas de corte de las diferentes materias primas: berenjena (A), manzana (B) y remolacha (C).

### 3.2. Líquidos de pretratamiento

La propagación de los ultrasonidos tuvo lugar en medio líquido, utilizándose las disoluciones siguientes:

- Agua destilada
- Disolución acuosa de ácido cítrico 1% (p/v)
- Zumo de berenjena de la variedad *black enorme*, extraído con una licuadora de cocina inmediatamente antes de su utilización.
- Zumo de manzana de la variedad *Granny Smith*, extraído con una licuadora de cocina inmediatamente antes de su utilización.
- Zumo de remolacha de la variedad *conditiva*, extraído con una licuadora de cocina inmediatamente antes de su utilización.

### 3.3. Equipo de ultrasonidos mediante sonotrodo en medio líquido

La instalación utilizada en el desarrollo del presente estudio consta principalmente del equipo de ultrasonidos mediante sonotrodo en medio líquido, el cual se muestra en un esquema en la Figura 3.6. Consta de un vaso encamisado de 0.6 L conectado a un baño termostático de recirculación FRIGITERM-10 (J. P. Selecta, España) para el control de la temperatura ( $25 \pm 2$  °C).

La aplicación de los ultrasonidos de potencia se lleva a cabo mediante el uso de un generador ultrasónico UP400S (Hielscher Ultrasonics, Alemania) como el de la Figura

3.4, con una potencia de 400 W y una frecuencia ultrasónica de 24 kHz. Se dispone de un sonotrodo H22 de titanio con una punta de 22 mm de diámetro (Hielscher Ultrasonics, Alemania) (Figura 3.5) para obtener los niveles de intensidad acústica necesarios.



Figura 3.4. Generador de ultrasonidos UP400S.



Figura 3.5. Sonotrodo H22.

### 3.4. Técnicas experimentales

#### 3.4.1. Caracterización del sonotrodo de ultrasonidos

Se determinó la intensidad acústica aplicada a cada disolución utilizando un método calorimétrico (J. A. Cárcel, Benedito, Rosselló, & Mulet, 2007). Se midió el incremento de temperatura producido en el medio en el que se introduce la lámina de materia prima durante el tiempo de operación establecido. Así, se determinó el incremento de temperatura por unidad de tiempo, y mediante la Ecuación 3.1 se pudo conocer la potencia transmitida:

$$P = M \cdot C_p \cdot \frac{dT}{dt} \quad 3.1$$

donde  $P$  es la potencia acústica,  $M$  es la masa de líquido,  $C_p$  la capacidad calorífica del líquido,  $T$  es la temperatura y  $t$  el tiempo. El incremento de temperatura se midió empleando 3 termopares tipo K conectados a un registrador de datos Diligence EV N2014 (Comark, España). Para cada líquido de inmersión se llevaron a cabo al menos 3 replicados. La intensidad acústica ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) se determinó dividiendo la potencia ultrasónica por la superficie de emisión del sonotrodo.

### 3.4.2. Tratamiento osmótico asistido por ultrasonidos

El tratamiento osmótico consistió en la inmersión de la lámina de materia prima durante un periodo de 5 min en 400 ml de la disolución correspondiente (agua destilada, disolución de ácido cítrico 1% o zumo del propio vegetal) a 25°C, en ausencia o presencia de la asistencia de ultrasonidos de potencia con un sonotrodo de 22 mm. Cada experimento se llevó a cabo por sextuplicado.

La muestra y la disolución se colocaron en el interior del vaso encamisado, conectado al baño termostático previamente estabilizado a 25°C. El sonotrodo se sumergió 1 cm en la disolución y la lámina de vegetal se colocó 4 cm por debajo, sobre una rejilla centrada respecto al sonotrodo, tal y como se muestra en la Figura 3.6. Se trabajó con una potencia del sonotrodo del 100% y un intervalo de pulsos de 0.5 pulsos/s.

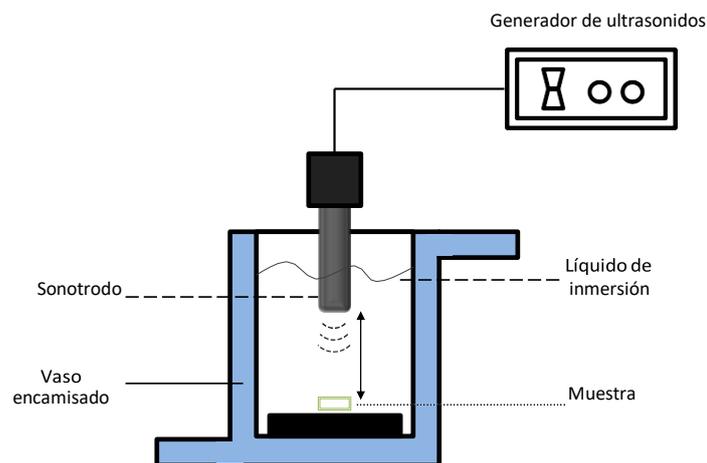


Figura 3.6. Esquema del equipo de ultrasonidos mediante sonotrodo.

Cada lámina, una vez tratada, fue cortada obteniendo del centro de cada lámina, un disco de 16 mm de diámetro y 5 mm de alto. Dichos discos, se cortaron a su vez por la mitad obteniendo dos porciones: de una se realizó el análisis mediante microscopía electrónica de barrido y de la otra, el análisis de microscopía óptica. Esta metodología se esquematiza en la Figura 3.7 para una muestra de berenjena como ejemplo, tratada por inmersión en zumo de berenjena con asistencia de ultrasonidos de potencia.

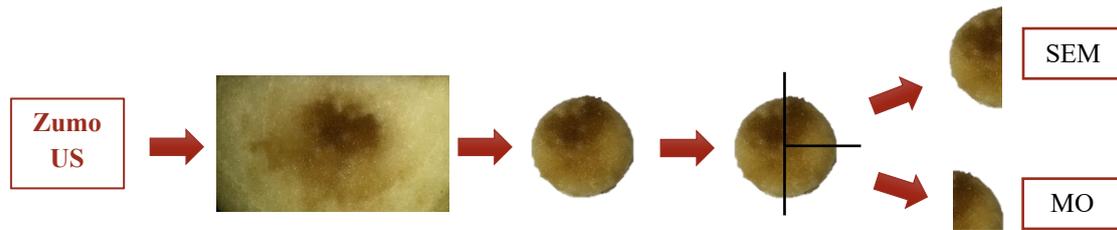


Figura 3.7. Esquema del corte de una lámina de berenjena posterior al tratamiento por inmersión en zumo de berenjena con asistencia de ultrasonidos de potencia.

### 3.4.3. Análisis de la microestructura

La microestructura de cada muestra fue observada mediante las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Óptica (MO).

#### 3.4.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Todas las muestras fueron congeladas a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador CVF525/86 (Ing. Climas, España) y posteriormente liofilizadas en un liofilizador LyoQuest (Telstar, España) a una temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0,3 mbar.

Las imágenes fueron obtenidas a 50x aumentos mediante un microscopio electrónico de barrido HITACHI S-3400N (Krefeld, Alemania), el cual se muestra en la Figura 3.8, a una aceleración de 15,0kV y una presión de vacío de 40Pa. Se obtuvieron doce imágenes del total de láminas de cada muestra.



Figura 3.8. Microscopio Electrónico de Barrido HITACHI S-3400N.

### 3.4.3.2. Microscopía óptica (MO)

Todas las muestras fueron fijadas en formaldehído (10%) y enviadas al laboratorio de anatomía patológica del Hospital Son Espases, donde fueron deshidratadas y incluidas en parafina (60°C durante 3h) para obtener cortes de 4-5  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótomo Finesse 325 (Thermo Shandon, Reino Unido). Los cortes se colocaron en un portaobjetos de vidrio y se tiñeron con ácido peryódico de Schiff (PAS), con la finalidad de poder visualizar las paredes celulares en el microscopio.

Las imágenes microestructurales fueron obtenidas a 50x aumentos mediante un microscopio óptico BX60 (Olympus, Japan) y una cámara Moticam 3 (Motic, China) de resolución 3.0 MP, cuyo montaje se muestra en la Figura 3.9. Se obtuvieron, al menos, cuarenta imágenes del total de láminas de cada muestra.



Figura 3.9. Microscopio Óptico BX60.

### 3.4.4. Análisis químicos

Se determinó el pH de los diferentes líquidos de inmersión y materias primas usando un pH-metro marca Crison pH25 con un electrodo tipo 5051 y el contenido en sólidos solubles, utilizando un refractómetro marca Zuzi expresando los resultados en °Brix.

### 3.5. Análisis de imagen

Las imágenes obtenidas por MO fueron analizadas mediante una metodología basada en el procesamiento de imágenes utilizando el software ImageJ 1.52k (National Institutes of Health, EE. UU.). ImageJ es un software de código abierto desarrollado para el procesamiento digital de imágenes científicas.

Previamente a la segmentación de las imágenes de berenjena y remolacha, éstas tuvieron que ser optimizadas mediante el software Fotos 3.0 (Apple Inc., EE. UU.) para macOS High Sierra 10.13.6. Se mejoró el contraste de las imágenes de berenjena y remolacha y, además, las imágenes de berenjena se convirtieron a escala de grises. Los resultados de esta optimización se muestran en la Figura 3.10.

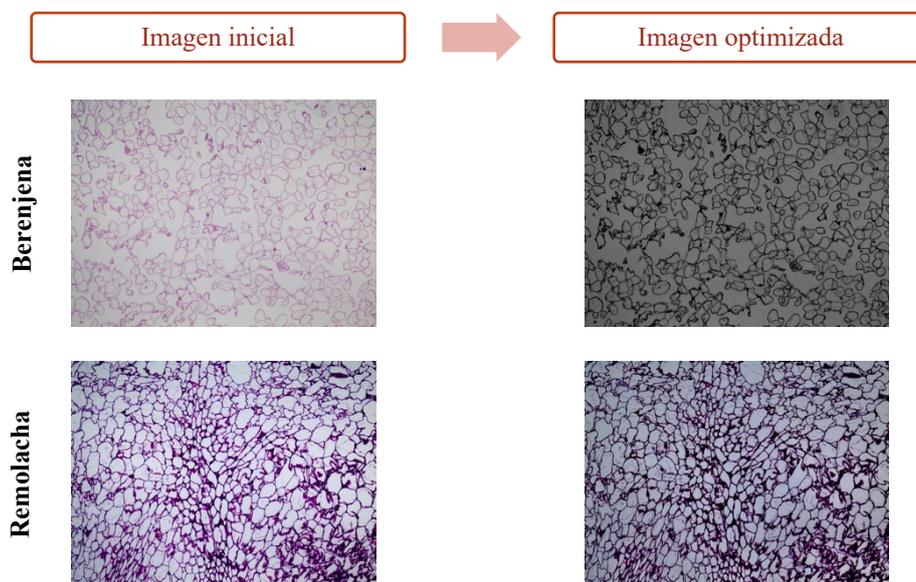


Figura 3.10. Optimización de imágenes microestructurales de berenjena y remolacha.

El procesamiento de imagen consistió, en primer lugar, en realizar una transformación binaria mediante la opción "Make Binary", que dejaba las imágenes únicamente en dos colores (blanco y negro), y en dilatar el espesor de la pared celular para definir mejor las células mediante la opción "Dilate". Posteriormente, por medio de la opción "Threshold", se ajustaba el fondo de la imagen a color negro para poder delimitar el perímetro las células (las zonas negras marcan el interior de la célula y las zonas blancas marcan las paredes celulares). Con la opción "Set Measurements...", se configuró el software para obtener los datos referentes al área de las células. Por último, la opción "Analyze Particles..." permitió seleccionar el área mínima y la circularidad de

las células sometidas a estudio para evitar medir impurezas e irregularidades, y “Overlay” para marcar y numerar cada una de las células analizadas. En este último paso, también se seleccionó “Exclude on edge” para no tener en cuenta las células de los bordes de las imágenes ya que aparecen cortadas. En la Figura 3.11 se muestra un esquema del procedimiento descrito aplicado para una imagen de la microestructura de una muestra de manzana.

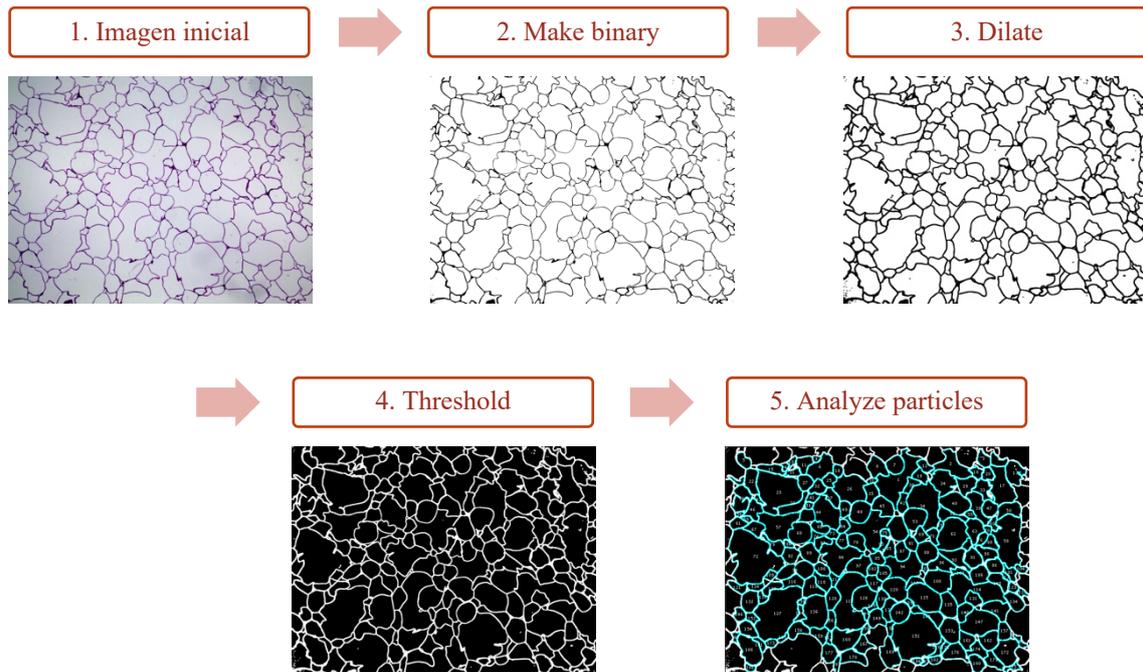


Figura 3.11. Esquema del procesamiento de imagen de muestras de manzana con ImageJ.

Este procedimiento se grabó en una macro específica para cada materia prima, puesto que para cada una de ellas el análisis de imagen fue ligeramente diferente por las diferencias estructurales entre ellas:

- Las imágenes microestructurales de berenjena y manzana se dilataron dos veces, mientras que fue suficiente dilatar una vez las imágenes de remolacha puesto que la pared celular es más densa, además las células de remolacha son demasiado pequeñas para realizar una segunda dilatación.
- Se analizaron las células de berenjena, manzana y remolacha a partir de 300, 1000 y 500 píxeles, respectivamente, para evitar analizar imperfecciones estructurales.
- En el procesamiento de imágenes de muestras de berenjena no se incluyó la opción de análisis de huecos por su estructura abierta y el gran espacio intercelular.

Las diferentes macros se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Macros aplicadas en el análisis de imagen de las diferentes materias primas.

<b>Berenjena</b>	<b>Manzana</b>	<b>Remolacha</b>
run("Make Binary");	run("Make Binary");	run("Make Binary");
run("Dilate");	run("Dilate");	run("Dilate");
run("Dilate");	run("Dilate");	//run("Threshold...");
//run("Threshold...");	//run("Threshold...");	setAutoThreshold("Default");
setAutoThreshold("Default");	setAutoThreshold("Default");	setAutoThreshold("Default dark");
setAutoThreshold("Default dark");	setAutoThreshold("Default dark");	//setThreshold(0, 128);
//setThreshold(0, 128);	//setThreshold(0, 128);	run("Convert to Mask");
run("Convert to Mask");	run("Convert to Mask");	run("Analyze Particles...",
run("Analyze Particles...",	run("Analyze Particles...",	"size=500-Infinity
"size=300-Infinity	"size=1000-Infinity	show=Overlay display exclude
show=Overlay display exclude	show=Overlay display exclude	include summarize in_situ");
summarize in_situ");	include summarize in_situ");	run("Labels...", "color=white
run("Labels...", "color=white	run("Labels...", "color=white	font=14 show bold");
font=14 show bold");	font=14 show bold");	run("Flatten");
run("Flatten");	run("Flatten");	

La macro de cada materia prima fue utilizada con el conjunto de imágenes de cada muestra por medio de la opción “Batch” seleccionando “Macro...”. Con la finalidad de establecer un análisis estructural representativo, se seleccionaron entre veinte y cuarenta imágenes de cada experimento, analizando así un mínimo de 5000 células para cada muestra.

Mediante esta metodología se pudieron obtener los tamaños de las células para calcular los percentiles de distribución del tamaño de las células. El valor real del área celular se obtuvo mediante correlación con la imagen estándar de un círculo de dimensiones conocidas (0,15mm de diámetro) de acuerdo con los aumentos utilizados (50x).

### 3.6. Análisis estadístico

En todas las determinaciones analíticas, los resultados representan la media y la desviación estándar de las mediciones realizadas. Se utilizó el análisis de varianza ANOVA de una vía para evaluar la significación estadística de la influencia de las diferentes variables sobre las características analizadas en las diferentes muestras, empleando la función “Análisis de varianza de un factor” de Microsoft Excel para Mac (Microsoft Office 365, versión 16.28).

Se realizó la distribución del tamaño celular de las muestras de cada experimento a partir de los percentiles, utilizando la función “PERCENTIL.EXC” de Microsoft Excel para Mac (Microsoft Office 365, versión 16.28), empleando como matriz todos los resultados de área celular de cada experimento obtenidos mediante el software ImageJ. El percentil 50 (d50) representa el valor medio del tamaño de las células de los vegetales.

### 3.7. Planificación de experiencias

La figura siguiente (Figura 3.12) muestra un esquema de la planificación de experimentos realizados en el presente trabajo.

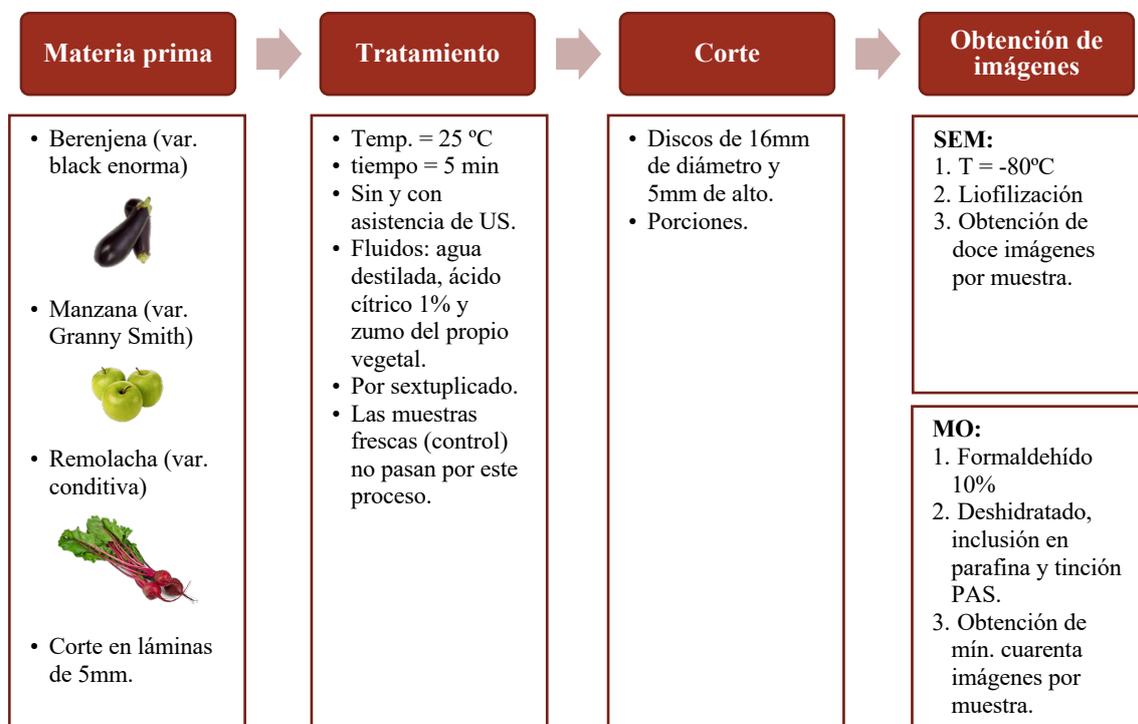


Figura 3.12. Esquema de la planificación de experimentos realizados.

Los vegetales, una vez cortados en láminas, fueron sometidos al tratamiento por inmersión en diferentes líquidos (agua destilada, ácido cítrico 1% y zumo del propio vegetal) sin o con asistencia de ultrasonidos de potencia, con excepción de la muestra de control (fresca) que no se sometió a ningún tratamiento. Posteriormente, de cada lámina de vegetal tratada se obtuvo un disco que se seccionó, tal y como se muestra en la Figura 3.7, para llevar a cabo la obtención de imágenes por SEM y MO.

En la Tabla 3.2 se presenta la nomenclatura utilizada para designar cada una de las muestras. Dependiendo de la materia prima utilizada, éstas se designan numéricamente con 1 (berenjena), 2 (manzana) o 3 (remolacha); y según el tratamiento osmótico al que se sometieron las muestras, se designan con H (inmersión en agua destilada), A (inmersión en ácido cítrico al 1%), Z (inmersión en zumo del propio vegetal), seguido de U cuando el tratamiento se realizó asistido por ultrasonidos o S cuando se realizó sin asistencia de ultrasonidos. Como muestras control se utilizaron muestras frescas sin tratar osmóticamente, designadas con C después de la numeración correspondiente.

Tabla 3.2. Nomenclatura utilizada para cada una de las muestras.

Materia prima	Líquido inmersión	Ultrasonidos	Nomenclatura
<b>Berenjena</b>	- (control)	NO	1C
	Agua destilada	NO	1HS
		SI	1HU
	Ácido cítrico 1%	NO	1AS
		SI	1AU
	Zumo de berenjena	NO	1ZS
SI		1ZU	
<b>Manzana</b>	- (control)	NO	2C
	Agua destilada	NO	2HS
		SI	2HU
	Ácido cítrico 1%	NO	2AS
		SI	2AU
	Zumo de manzana	NO	2ZS
SI		2ZU	
<b>Remolacha</b>	- (control)	NO	3C
	Agua destilada	NO	3HS
		SI	3HU
	Ácido cítrico 1%	NO	3AS
		SI	3AU
	Zumo de remolacha	NO	3ZS
SI		3ZU	

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Caracterización de las muestras y los líquidos de inmersión

Se determinaron el contenido de sólidos solubles (°Brix) y el pH en las diferentes materias primas y en los líquidos utilizados en los tratamientos de inmersión. Los datos de porosidad media ( $\epsilon$ ) y contenido en humedad de las muestras se obtuvieron de forma bibliográfica. Los resultados se muestran en la Tabla 4.1 y Tabla 4.2.

Tabla 4.1. Caracterización inicial de las muestras.

Medio	°Brix	pH	$\epsilon^1$	Humedad <sup>2</sup> (kg/kg s.s.)
<b>Berenjena</b>	2.5 ± 0.2	5.46 ± 0.07	0.641	10.8 ± 0.8
<b>Manzana</b>	13.3 ± 0.3	3.14 ± 0.06	0.210	6.1 ± 0.3
<b>Remolacha</b>	8.3 ± 0.3	5.87 ± 0.09	0.043	9.8 ± 0.6

1. (Boukouvalas, Krokida, Maroulis, & Marinos-Kouris, 2006)
2. (Vallespir et al., 2018)

Tabla 4.2. Caracterización de los líquidos de tratamiento.

Medio	°Brix	pH
<b>Agua destilada</b>	0.0 ± 0.0	6.05 ± 0.06
<b>Ácido cítrico 1%</b>	0.6 ± 0.0	2.02 ± 0.03
<b>Zumo de berenjena</b>	2.4 ± 0.0	5.42 ± 0.04
<b>Zumo de manzana</b>	13.0 ± 0.0	3.13 ± 0.01
<b>Zumo de remolacha</b>	8.4 ± 0.0	6.03 ± 0.01

Los ultrasonidos son ondas elásticas cuya propagación y efectos son altamente dependientes de las características del medio por el que viajan y el sólido. Por ese motivo, en el presente estudio se seleccionaron materias primas con porosidades medias diferentes, como son las de la berenjena, la manzana y la remolacha (Tabla 4.1).

### 4.2. Caracterización del sonotrodo

La potencia efectiva generada por el sonotrodo de ultrasonidos de 22 mm de diámetro se midió mediante calorimetría, sumergiendo el sonotrodo en la disolución a igual profundidad que en los experimentos de tratamiento osmótico de manzana. Se midió el incremento de temperatura a intervalos de 1 s durante 150 s. A partir de los resultados obtenidos y utilizando la ecuación 3.1 se determinó la potencia del sonotrodo en las condiciones de trabajo.

En la Tabla 4.3 se muestran los valores de potencia obtenidos en los diferentes líquidos.

Tabla 4.3. Caracterización del sonotrodo de ultrasonidos.

Líquido	Potencia (J/s)
Agua destilada	$78 \pm 3$
Ácido cítrico 1%	$81 \pm 6$
Zumo de berenjena	$80 \pm 2$
Zumo de manzana	$79 \pm 1$
Zumo de remolacha	$78 \pm 1$

Llevando a cabo un análisis estadístico sobre los valores de potencia obtenidos para cada líquido, no se obtuvieron diferencias significativas entre ellos. Por tanto, el valor de la intensidad acústica se obtuvo como media de todos los experimentos realizados. Estos resultados se presentan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Potencia e intensidad del sonotrodo de ultrasonidos.

Potencia (J/s)	Intensidad (W/cm <sup>2</sup> )
$79 \pm 2$	$20.9 \pm 0.4$

### 4.3. Análisis de la microestructura

#### 4.3.1. Análisis cualitativo

Con el propósito de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos, asistidos o no por ultrasonidos de potencia, sobre la microestructura de los vegetales, se observaron las imágenes de las muestras obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía óptica (MO).

##### 4.3.1.1. Comparación entre materias primas

La Figura 4.1 muestra imágenes representativas de las microestructuras de las muestras control de berenjena, manzana y remolacha.

En las diferentes imágenes microestructurales se observan células isodiamétricas y poliédricas típicas con espacios intercelulares. La manzana y la remolacha presentan una estructura más cohesionada tipo panal de abeja, mientras que la berenjena presenta una estructura más abierta.

Los mayores espacios intercelulares se observan en la microestructura de la berenjena, hecho que se relaciona con la porosidad del alimento y la berenjena presenta el valor más alto de los tres vegetales (Boukouvalas et al., 2006), como se muestra en la Tabla 4.1. En muestras de manzana y berenjena se observan pocos espacios intercelulares. Estas características microestructurales son similares a las definidas por otros autores para estos vegetales (Vallespir et al., 2018, 2019).

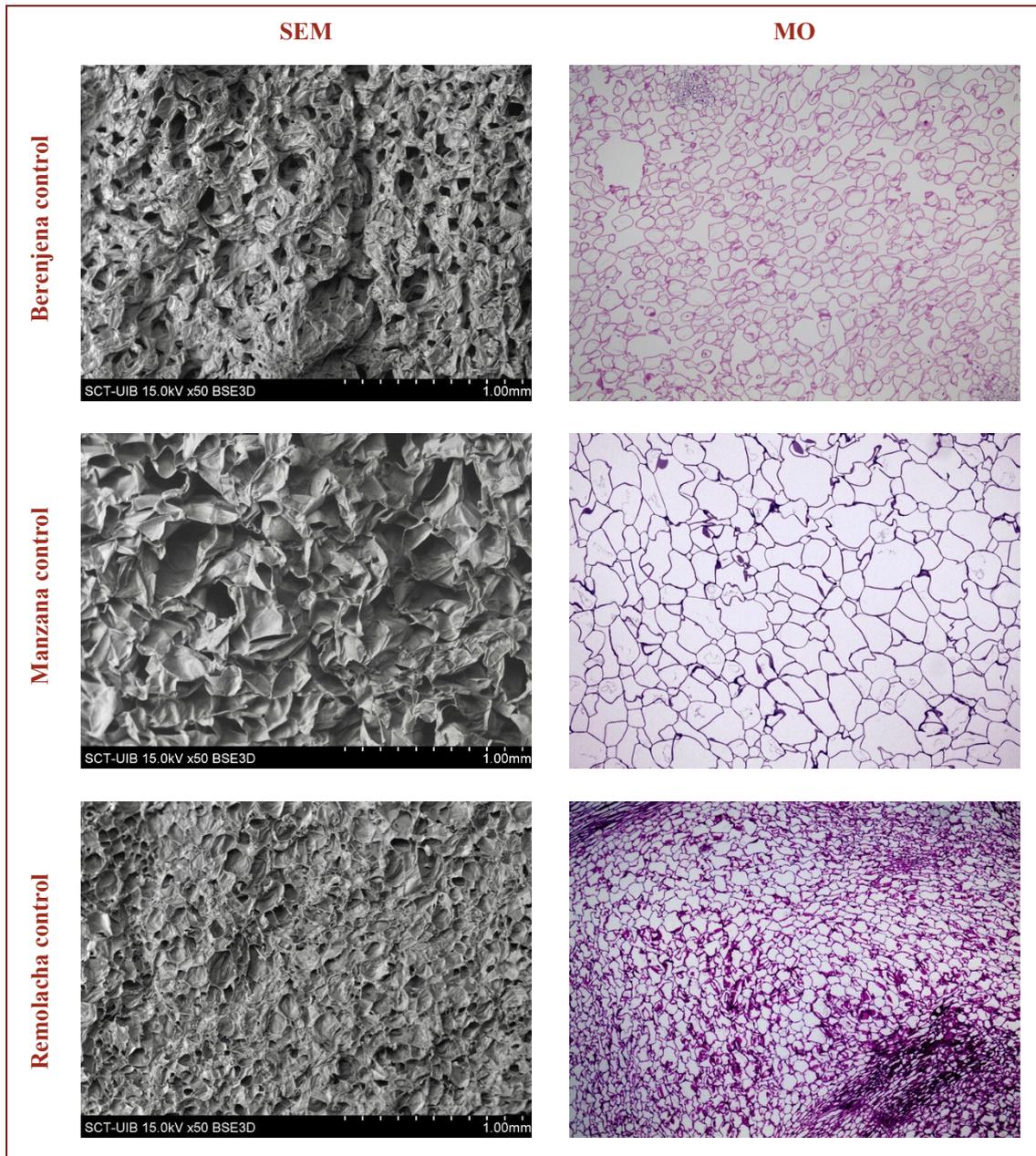


Figura 4.1. Imágenes representativas de las muestras control de cada materia prima, obtenidas mediante SEM y MO.

#### 4.3.1.2. Comparación entre tratamientos

Las figuras 4.2 (berenjena), 4.3 (manzana) y 4.4 (remolacha) muestran imágenes obtenidas mediante SEM, representativas de las muestras sin tratar y tratadas mediante inmersión sin y con asistencia de ultrasonidos, de berenjena, manzana y remolacha, respectivamente. En las imágenes se señalan rupturas celulares (R), fisuras del tejido (F), tejidos apelotonados (A) y microcanales (C).

En todas las imágenes (figuras 4.2 a 4.4) se puede observar como el tratamiento llevado a cabo ha influido sobre la superficie de la muestra de cada vegetal, aunque de forma diferente dependiendo del líquido de inmersión, la aplicación de ultrasonidos y la microestructura original.

Cuando se ha sometido la muestra a tratamiento, en las imágenes pueden apreciarse algunas cavidades vacías, tejido apelotonado y formación de microcanales, posiblemente debido a la ruptura de las paredes celulares y pérdida de material celular. Estas apreciaciones son más acentuadas cuando el tratamiento se ha llevado a cabo con asistencia de ultrasonidos de potencia. Se sugiere que esta acentuación puede ser causada por la microagitación, cavitación y efecto esponja que producen las ondas ultrasónicas. Los efectos mentados son similares a los definidos por otros autores (Esquivel-González et al., 2017; Nowacka et al., 2012; Puig et al., 2012; Rodríguez, Llabrés, Simal, Femenia, & Rosselló, 2014).

En berenjena, el apelotonamiento superficial del tejido es superior en comparación a la manzana y la remolacha, sobre todo en muestras que se han sometido a tratamientos de inmersión con asistencia de ultrasonidos de potencia. En la totalidad de las imágenes, el número de roturas es inferior en comparación a las muestras de manzana y remolacha sometidas a los mismos tratamientos. Las muestras sometidas a tratamientos por inmersión con aplicación de ultrasonidos, presentan mayores daños, sobre todo aquellas que se sometieron a inmersión en ácido cítrico. Las muestras que presentan menos efectos sobre la microestructura son aquellas tratadas por inmersión en zumo de berenjena, sin y con aplicación de ultrasonidos, que prácticamente no presentan rupturas celulares. Se aprecian superficies con mayores espacios intercelulares en las muestras tratadas por inmersión sin asistencia de ultrasonidos.

En manzana, se aprecia un mayor número de rupturas celulares y microcanales, en comparación a la berenjena y la remolacha. Las muestras que se sometieron a tratamientos por inmersión sin asistencia de ultrasonidos de potencia, muestran rupturas celulares y apelotonamientos, mientras que las muestras tratadas por inmersión con asistencia de ultrasonidos de potencia muestran mayor número de rupturas celulares y un apelotonamiento superior, además de un gran número de microcanales y fisuras en el tejido. Las muestras tratadas por inmersión en agua destilada y zumo de manzana, ambos con aplicación de ultrasonidos, son las que presentan mayores efectos superficiales. Sin embargo, mediante la observación de las imágenes, no parece posible determinar qué muestras presentan mayores cambios entre aquellas que han sido sometidas a tratamientos por inmersión sin asistencia de ultrasonidos de potencia.

En remolacha no se observan microcanales debido, posiblemente, a la baja porosidad de la estructura del vegetal. Las muestras tratadas que presentan menores daños microestructurales, son aquellas que se sometieron a tratamientos por inmersión sin asistencia de ultrasonidos, mientras que las muestras que presentan mayores efectos sobre su superficie son las que fueron tratadas por inmersión en ácido cítrico al 1% y zumo de remolacha, ambos con aplicación de ultrasonidos de potencia. Además, las muestras tratadas osmóticamente por inmersión en zumo de remolacha con asistencia de ultrasonidos de potencia presentan tamaños celulares mayores.

En general, se aprecian modificaciones sobre el tejido superficial de las muestras de los diferentes vegetales cuando éstas se someten a tratamiento por inmersión. Se aprecian mayores modificaciones sobre la superficie de las diferentes muestras cuando el tratamiento se llevó a cabo por inmersión con aplicación de ultrasonidos, posiblemente a causa de los efectos producidos por las ondas ultrasónicas (cavitación, efecto esponja, microagitación, formación de canales, microjet, etc.).

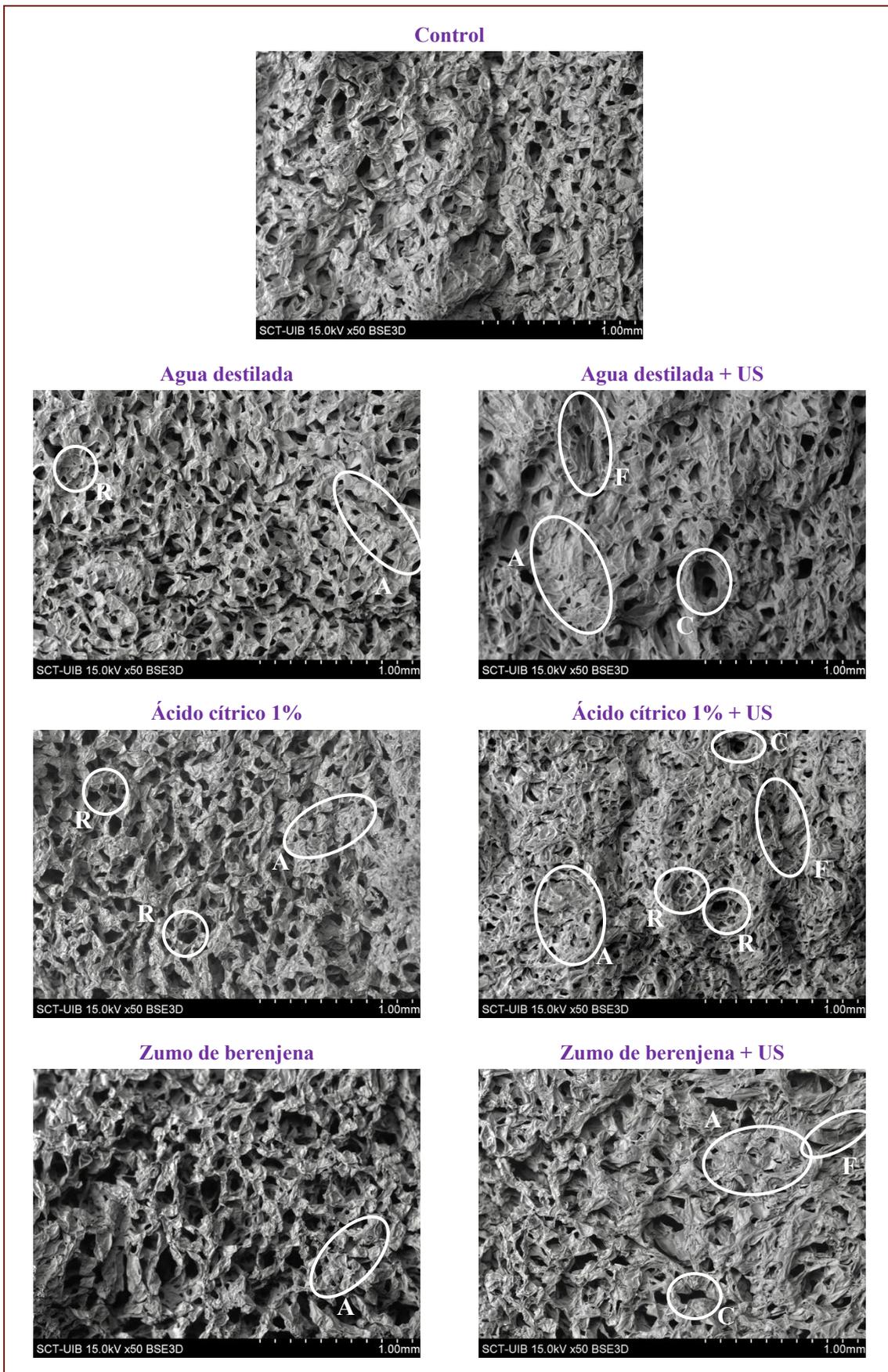


Figura 4.2. Imágenes de SEM representativas de las diferentes muestras de berenjena. Ruptura celular (R), fisura del tejido (F), tejido apilotonado (A) y microcanal (C).

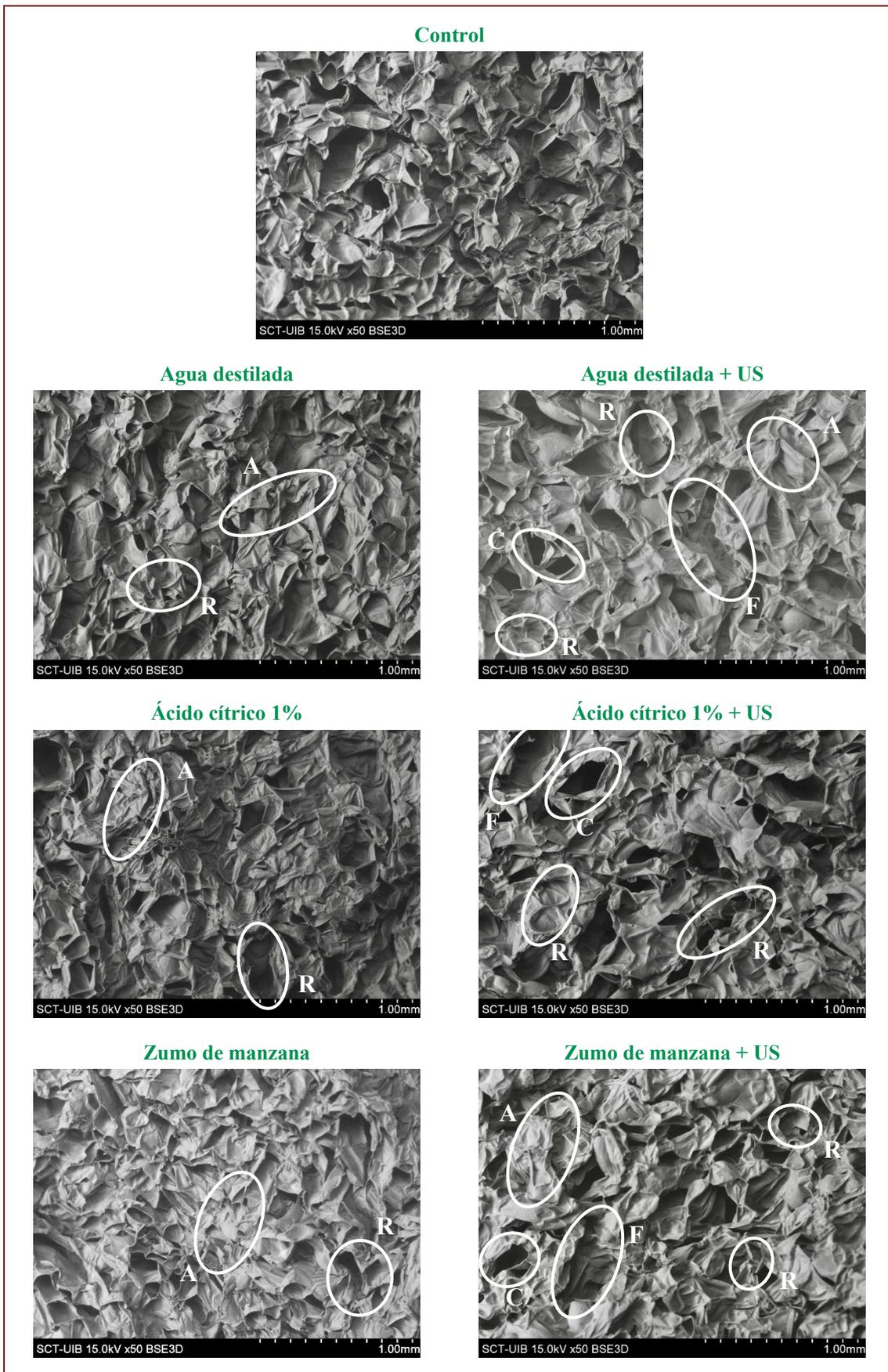


Figura 4.3. Imágenes de SEM representativas de las diferentes muestras de manzana. Ruptura celular (R), fisura del tejido (F), tejido apelotonado (A) y microcanal (C).

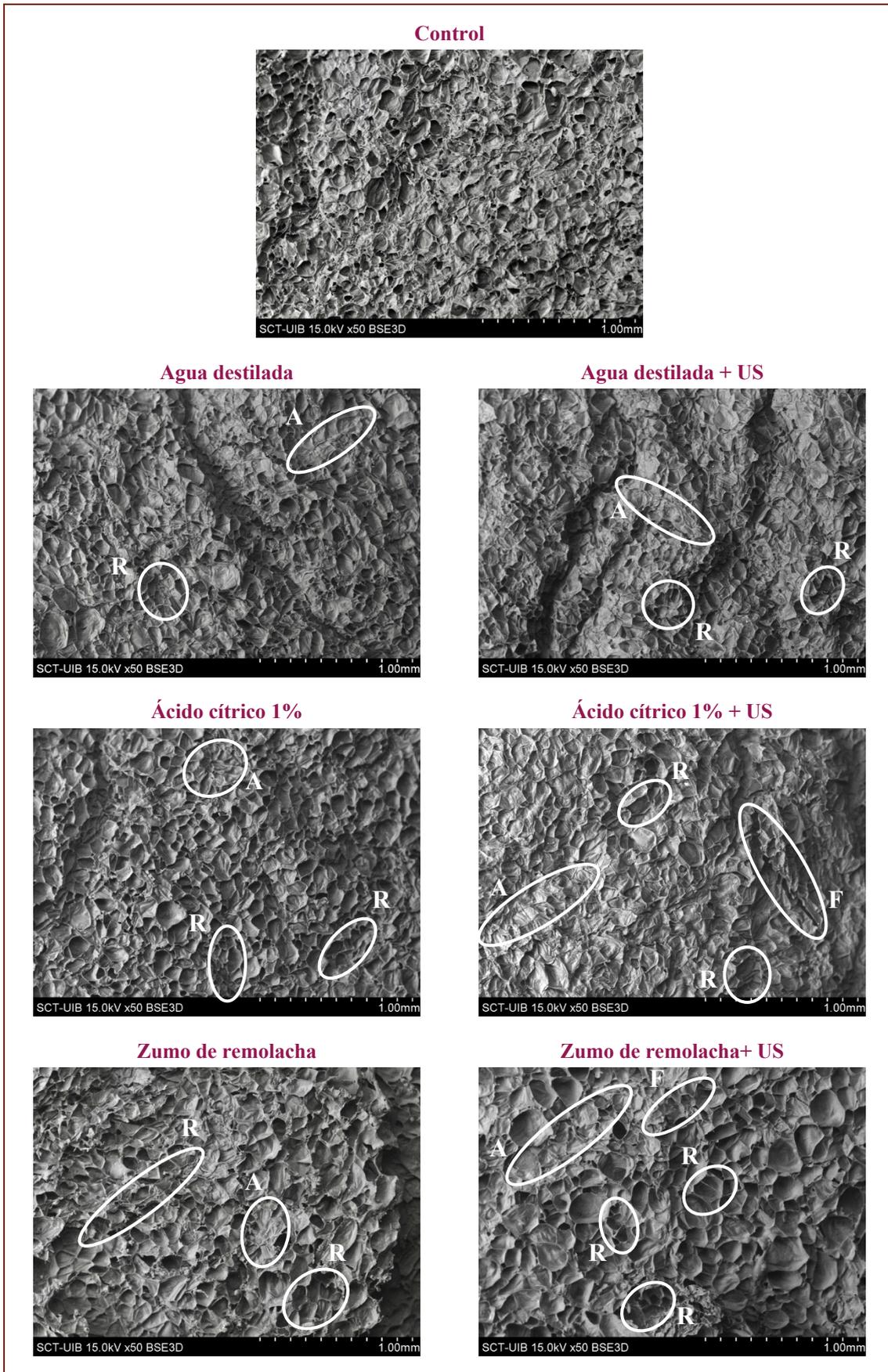


Figura 4.4. Imágenes de SEM representativas de las diferentes muestras de remolacha. Ruptura celular (R), fisura del tejido (F) y tejido apelotonado (A).

Las figuras 4.5 (berenjena), 4.6 (manzana) y 4.7 (remolacha) muestran imágenes representativas obtenidas por MO de las muestras control y las muestras tratadas mediante inmersión, de berenjena, manzana y remolacha, respectivamente.

En las imágenes se pueden apreciar las paredes celulares de las células que componen la estructura del vegetal. En las figuras se señalan las rupturas de las paredes celulares. Se puede observar como el tratamiento llevado a cabo ha modificado la estructura de las muestras de cada vegetal, dependiendo del líquido de inmersión, la aplicación de ultrasonidos y la microestructura original.

En berenjena, se observaron menos rupturas celulares en comparación a las muestras de manzana y remolacha. El mayor número de rupturas celulares se observó en aquellas muestras que fueron tratadas por inmersión en ácido cítrico al 1% con asistencia de ultrasonidos de potencia, mientras que el menor número de rupturas se observó en muestras tratadas por inmersión en zumo de berenjena, sin y con asistencia de ultrasonidos. En cambio, se pudo apreciar que las muestras tratadas por inmersión en zumo de berenjena, sin y con asistencia de ultrasonidos, tienen tamaños celulares mayores. Este hecho sugiere que se ha producido una transferencia de materia hacia el interior de la célula, aumentando el tamaño celular sin fisurar las paredes celulares.

En manzana, se observó ruptura celular en todas las muestras tratadas osmóticamente, con o sin aplicación de ultrasonidos. Las muestras que han sido tratadas por inmersión con aplicación de ultrasonidos de potencia presentan una mayor cantidad de rupturas de las paredes celulares, mientras que las muestras tratadas por inmersión en agua destilada sin asistencia de ultrasonidos presentan menor número rupturas celulares. Además, en las muestras tratadas por inmersión en agua destilada y zumo de manzana, ambos con aplicación de ultrasonidos, se observa un tamaño celular mayor. Es posible que este aumento en el tamaño celular esté causado por la transferencia de materia hacia el interior de la célula y por las fisuras de las paredes celulares que han juntado el volumen de dos o más células.

En remolacha, también se observa ruptura celular en todas las muestras tratadas osmóticamente, con o sin aplicación de ultrasonidos. Las muestras que han sido tratadas por inmersión con aplicación de ultrasonidos de potencia presentan una mayor cantidad de rupturas celulares, sobre todo cuando la inmersión se produjo en ácido cítrico al 1% y en zumo de remolacha. Se observaron el menor número de rupturas de la pared celular

cuando el tratamiento se llevó a cabo por inmersión en zumo de remolacha sin asistencia de ultrasonidos de potencia.

En resumen, se aprecia ruptura de la pared celular en las diferentes microestructuras vegetales de berenjena, manzana y remolacha cuando éstas se someten a tratamiento, sobre todo cuando el tratamiento por inmersión se lleva a cabo con asistencia de ultrasonidos de potencia. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el análisis de imágenes de SEM.

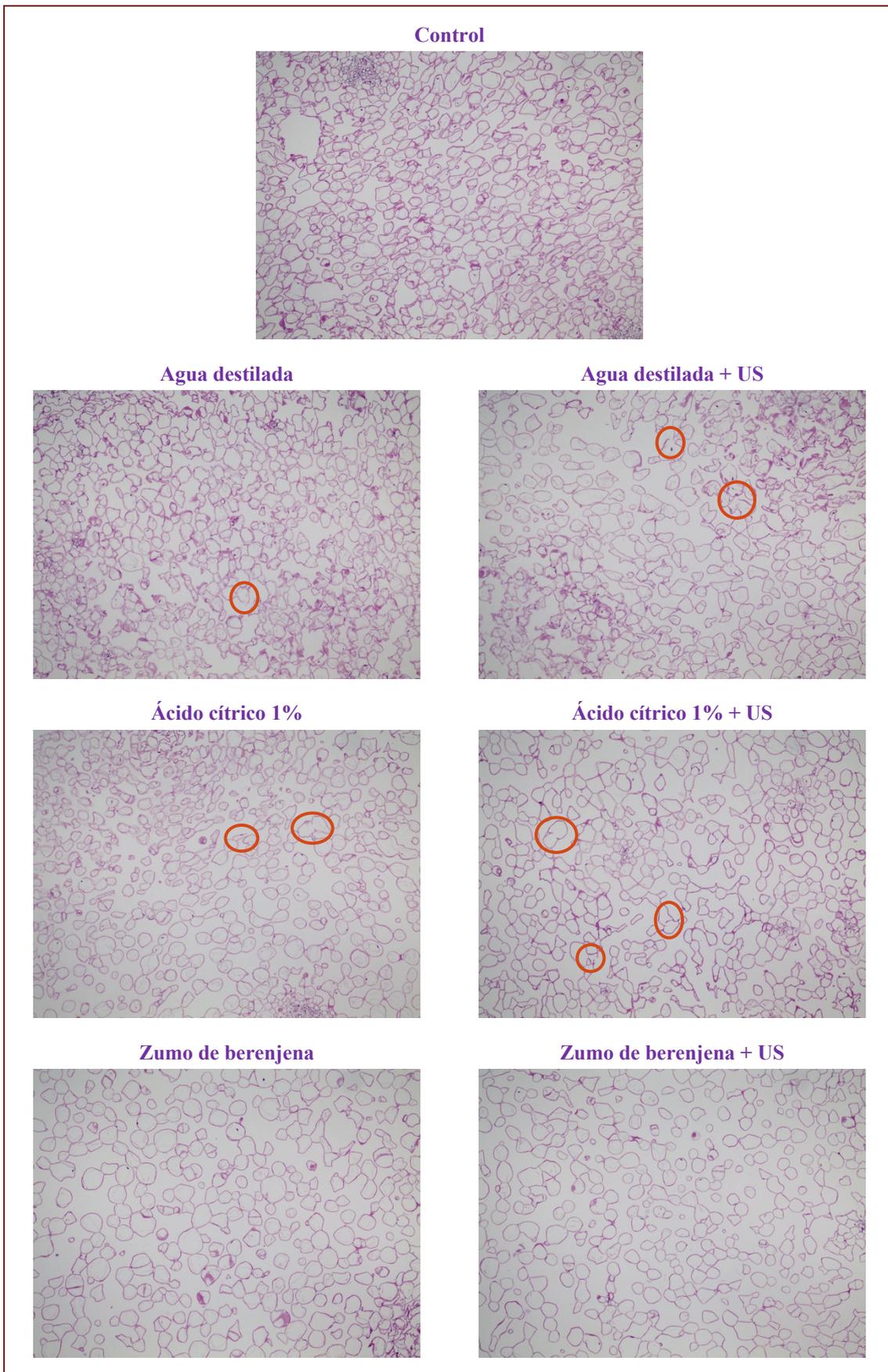


Figura 4.5. Imágenes de MO en las que se observan las paredes celulares de las diferentes muestras de berenjena. Se señalan en rojo las rupturas de pared celular.

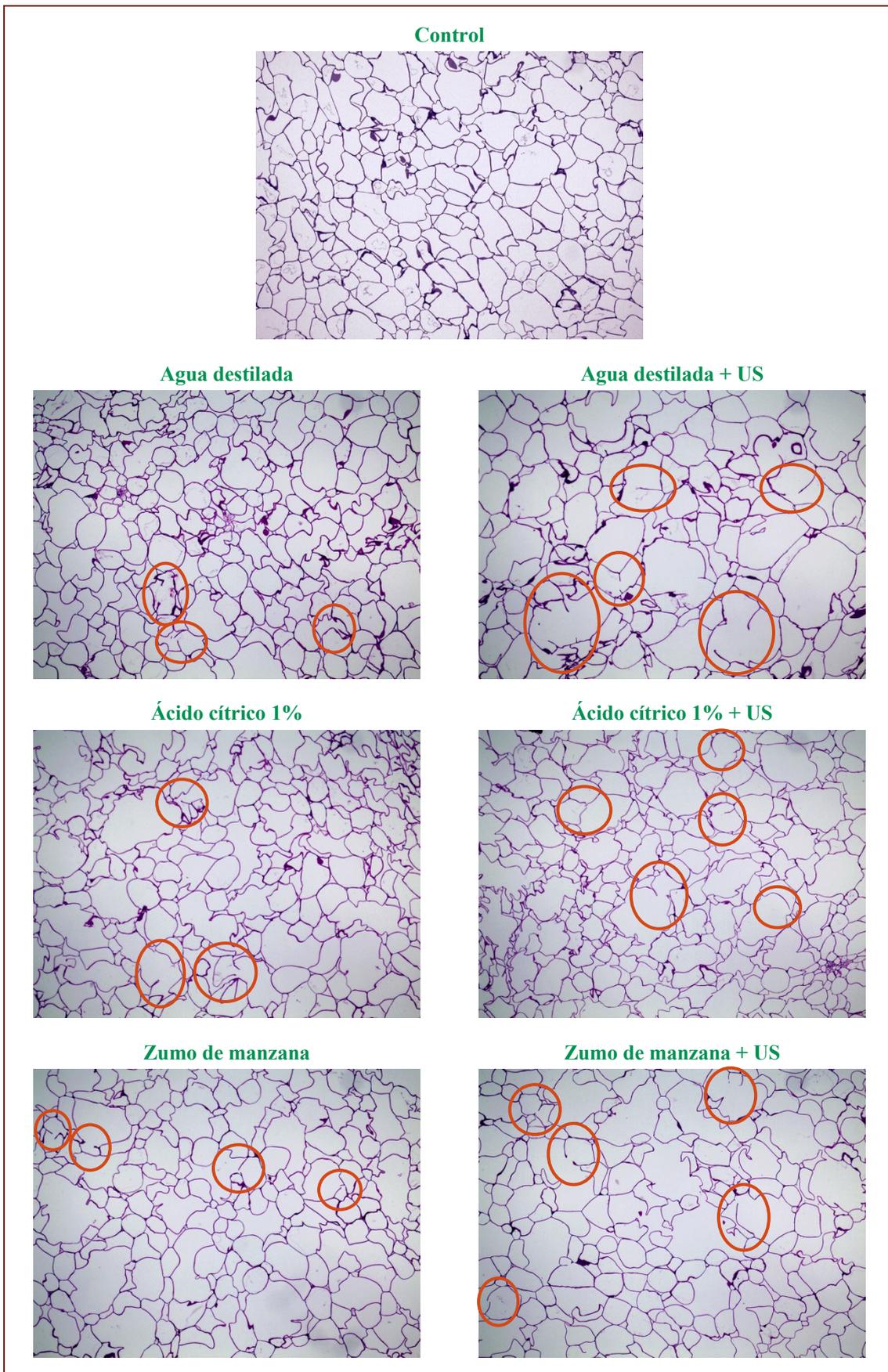


Figura 4.6. Imágenes de MO en las que se observan las paredes celulares de las diferentes muestras de manzana. Se señalan en rojo las rupturas de pared celular.

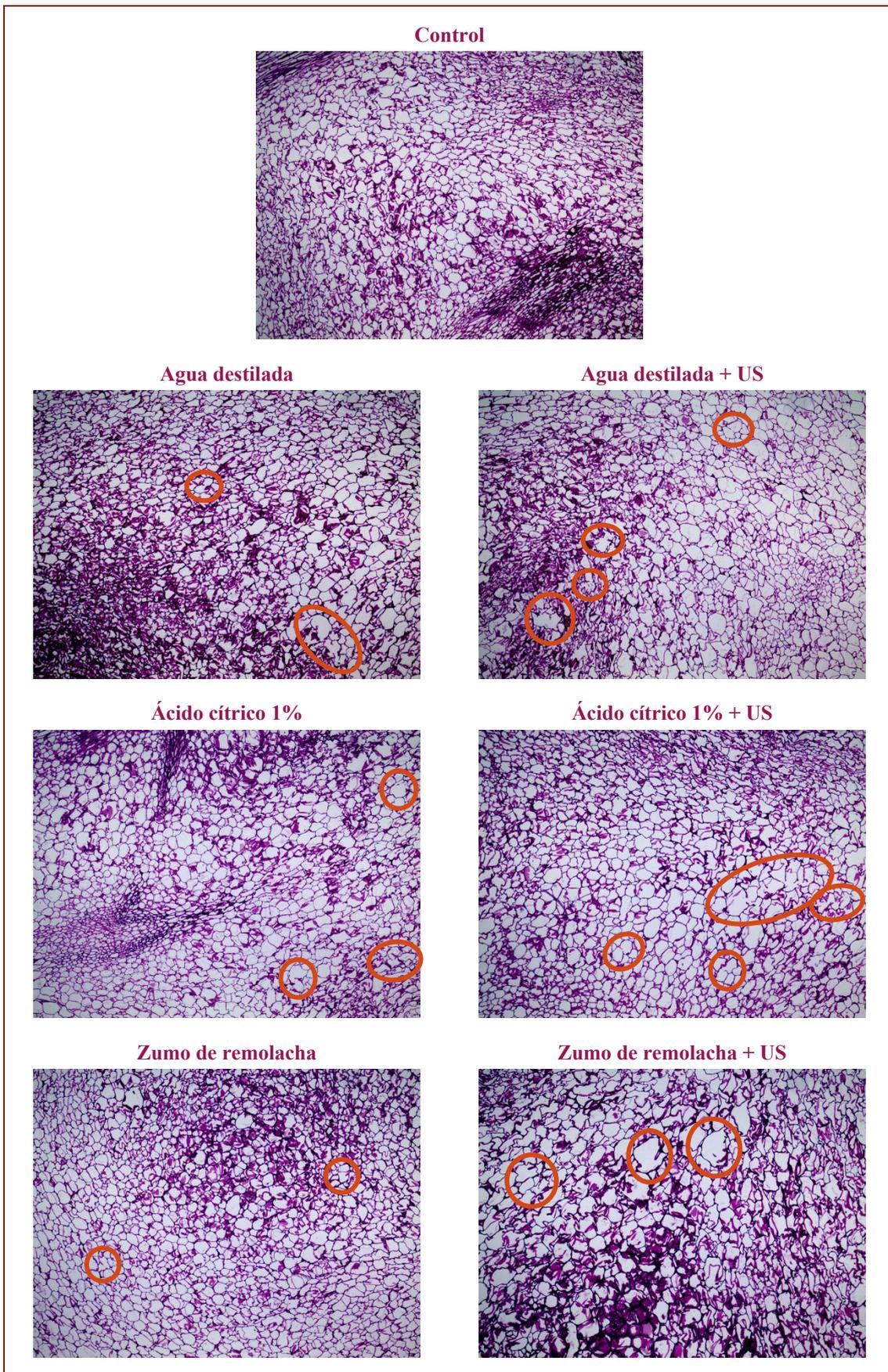


Figura 4.7. Imágenes de MO en las que se observan las paredes celulares de las diferentes muestras de remolacha. Se señalan en rojo las rupturas de pared celular.

### 4.3.2. Análisis cuantitativo

Para evaluar matemáticamente los resultados obtenidos a través de la observación de las imágenes de todas las muestras obtenidas mediante MO y SEM, se utilizó el procesamiento de imágenes. Al tratar osmóticamente las muestras de los diferentes vegetales, sin o con asistencia de ultrasonidos de potencia, se observaron cambios en la microestructura de los vegetales. Estos cambios pueden sugerir que la ruptura de la pared celular y el proceso de ósmosis hace que el área celular observada sea mayor y el recuento de células por unidad de superficie de tejido sea menor.

Por tanto, se procedió a llevar a cabo un análisis cuantitativo de las imágenes de microscopía óptica. Se estimaron los valores del número y área de cavidades celulares para evaluar los cambios de tamaño y la aparición de rupturas celulares. Los resultados se muestran en las tablas 4.5 y 4.6.

#### 4.3.2.1. Comparación entre materias primas

En la Tabla 4.5 se muestran los resultados de tamaño celular obtenidos en el percentil 50 (d50) y del número de células por unidad de área, para las muestras control de cada vegetal.

La manzana, como se puede observar en la Figura 4.1, es el vegetal que tiene el tamaño celular mayor, por ello el número de células por unidad de superficie es el más bajo. A pesar de que la berenjena tenga un tamaño celular superior a la remolacha, el número de células por unidad de superficie es significativamente menor a causa del tipo de estructura, que es más abierta con grandes espacios intercelulares.

Tabla 4.5. Valores del percentil 50 del tamaño celular ( $\text{mm}^2$ ) y número de células por unidad de superficie de tejido (número de células/ $\text{mm}^2$ ) de las muestras control de berenjena, manzana y remolacha.

Materia prima	Nomenclatura	d50 ( $10^3$ ) ( $\text{mm}^2$ )	Número de células por área (núm. células/ $\text{mm}^2$ )
<b>Berenjena</b>	1C	$1.7 \pm 0.3$	$386 \pm 78$
<b>Manzana</b>	2C	$8.3 \pm 0.4$	$81 \pm 14$
<b>Remolacha</b>	3C	$1.4 \pm 0.1$	$533 \pm 85$

A continuación, se presentan los perfiles de los percentiles del área celular de las muestras control, de berenjena, manzana y remolacha, en la Figura 4.8. El percentil representa el porcentaje de células que es igual o menor al valor obtenido. Cuánto menor es la separación existente entre los perfiles, menores son las diferencias de tamaño celular. Al contrario, cuanto más alejados estén los perfiles, mayores cambios celulares se habrán producido. Así, el tamaño celular será mayor cuanto más a la derecha del gráfico se encuentre el valor de área celular en un mismo percentil.

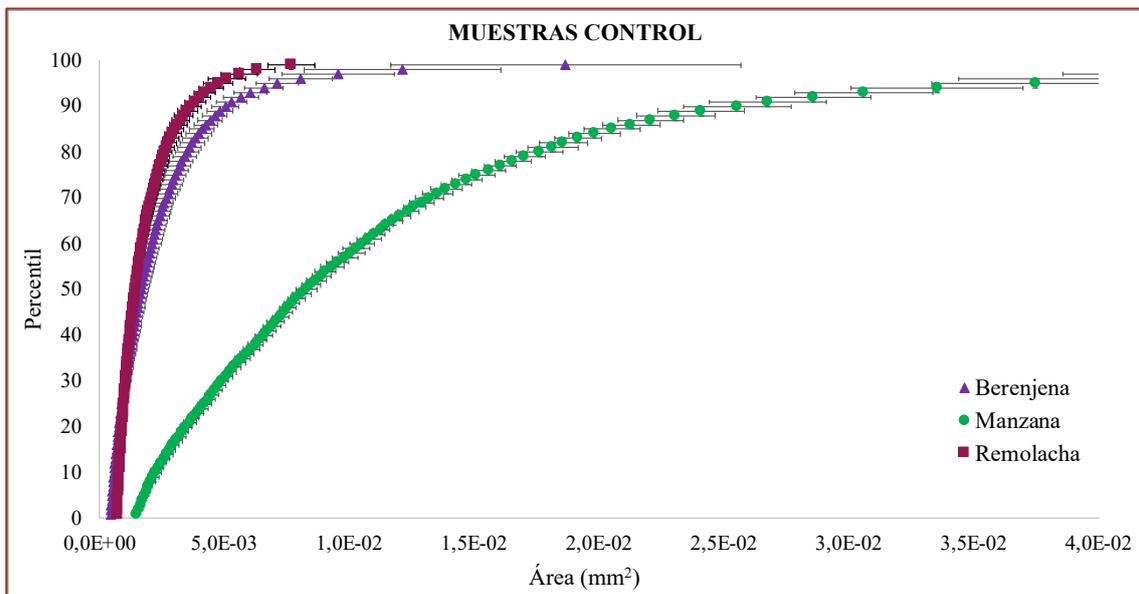


Figura 4.8. Perfiles de los percentiles del área celular de las muestras control de berenjena, manzana y remolacha.

Como puede observarse en la Figura 4.8, se obtuvieron diferentes perfiles de percentiles para cada vegetal. Se observa que los perfiles de las muestras control de remolacha y berenjena se encuentran a la izquierda del gráfico, mientras que el perfil de la muestra control de manzana se encuentra mucho más desplazado hacia la derecha. Este hecho indica que la manzana tiene un tamaño celular mucho mayor al de la berenjena y la remolacha, que tienen tamaños celulares similares. El perfil de los percentiles del área celular de la remolacha es la que se sitúa más a la izquierda, indicando los menores tamaños celulares.

#### 4.3.2.2. Comparación entre tratamientos

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados de tamaño celular obtenidos en el percentil 50 (d50) y del número de células por unidad de área. Se puede observar que se obtuvieron diferente número de células y tamaño celular después de llevar a cabo los diferentes tratamientos en tejidos de berenjena, manzana y remolacha.

Tabla 4.6. Valores del percentil 50 del tamaño celular (mm<sup>2</sup>) y número de células por unidad de superficie de tejido (número de células/mm<sup>2</sup>) de las muestras de berenjena, manzana y remolacha.

Experimento	Muestra	d50 (10 <sup>3</sup> ) (mm <sup>2</sup> )	Número de células por área (núm. células/mm <sup>2</sup> )
<b>Berenjena</b>			
Control	1C	1.7	386 ± 78
Inmersión agua destilada	1HS	1.8	357 ± 70
Agua destilada + US	1HU	2.0	336 ± 79
Ácido cítrico 1%	1AS	1.8	377 ± 65
Ácido cítrico 1% + US	1AU	2.0	371 ± 63
Zumo berenjena	1ZS	2.2	359 ± 69
Zumo berenjena + US	1ZU	2.2	346 ± 75
<b>Manzana</b>			
Control	2C	8.3	81 ± 14
Inmersión agua destilada	2HS	8.8	78 ± 13
Agua destilada + US	2HU	10.9	53 ± 9
Ácido cítrico 1%	2AS	8.8	71 ± 15
Ácido cítrico 1% + US	2AU	8.4	68 ± 17
Zumo manzana	2ZS	8.2	76 ± 19
Zumo manzana + US	2ZU	10.3	63 ± 11
<b>Remolacha</b>			
Control	3C	1.4	533 ± 85
Inmersión agua destilada	3HS	1.5	474 ± 93
Agua destilada + US	3HU	1.6	445 ± 91
Ácido cítrico 1%	3AS	1.6	443 ± 90
Ácido cítrico 1% + US	3AU	1.8	407 ± 61
Zumo remolacha	3ZS	1.4	520 ± 124
Zumo remolacha + US	3ZU	1.8	399 ± 98

En berenjena se observaron los mayores aumentos en el tamaño celular (d50) cuando las muestras fueron tratadas por inmersión en zumo de berenjena, sin y con asistencia de ultrasonidos, y por inmersión en agua destilada con aplicación de ultrasonidos de potencia. Estos aumentos fueron de aproximadamente un 31, 32 y 23 %, respectivamente. Cabe mencionar que, en el percentil 80, las muestras que presentaron un mayor aumento de tamaño son aquellas tratadas por inmersión en zumo de berenjena

con asistencia de ultrasonidos de potencia (27%). Esta discusión coincide con los resultados obtenidos en el recuento celular, ya que las muestras tratadas por inmersión en agua destilada y zumo de berenjena, ambos con asistencia de ultrasonidos, presentan la mayor reducción del número de células por superficie de tejido (13 y 10%, respectivamente).

En manzana, se observaron los mayores aumentos en el tamaño celular (d50) cuando las muestras fueron tratadas por inmersión en agua destilada y zumo de manzana, ambos con asistencia de ultrasonidos. Estos aumentos fueron del 32 y 24%, respectivamente. No se observaron aumentos significativos en el tamaño celular (d50) cuando las muestras fueron tratadas por inmersión en ácido cítrico al 1% con asistencia de ultrasonidos, aunque sí presentó un aumento destacable en el percentil d80, siendo este del 12%. Esta discusión coincide con los resultados obtenidos en el recuento celular, ya que las muestras tratadas por inmersión en agua destilada y zumo de manzana, ambos con asistencia de ultrasonidos, presentan la mayor reducción del número de células por superficie de tejido (35 y 21%, respectivamente), seguida por la reducción de las muestras tratadas por inmersión en ácido cítrico al 1% con asistencia de ultrasonidos, que fue del 16%.

En remolacha, se observaron los mayores aumentos en el tamaño celular (d50) cuando las muestras fueron tratadas por inmersión en ácido cítrico y zumo de remolacha, ambos con asistencia de ultrasonidos. Estos aumentos fueron del 23 y 25%, respectivamente. Esta discusión coincide con los resultados obtenidos en el recuento celular, ya que las muestras tratadas por inmersión en ácido cítrico y zumo de remolacha, ambos con asistencia de ultrasonidos, presentan la mayor reducción del número de células por superficie de tejido (24 y 25%, respectivamente).

En definitiva, en las diferentes microestructuras vegetales se aprecia un considerable aumento del tamaño celular y disminución del número de células por superficie de tejido cuando las muestras han sido tratadas por inmersión, especialmente utilizando el zumo del propio vegetal y con asistencia de ultrasonidos de potencia.

A continuación, en la Figura 4.9, se presentan los perfiles de los percentiles del área celular de las muestras sin tratar y tratadas mediante inmersión, de berenjena, manzana y remolacha.

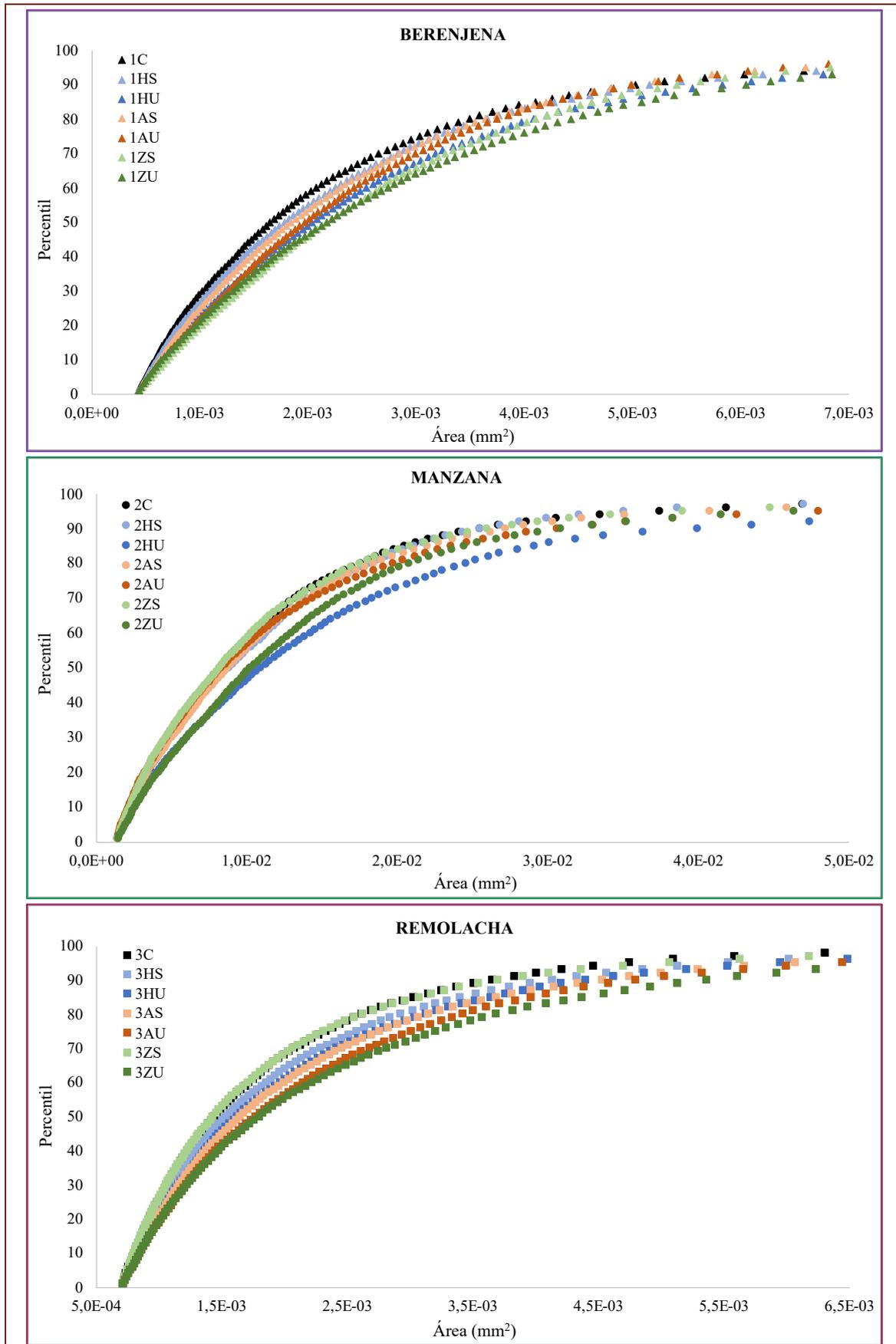


Figura 4.9. Perfiles de los percentiles del área celular de las muestras sin tratar y tratadas de berenjena, manzana y remolacha.

Al evaluar el tamaño celular, los cambios observados en desplazamientos de las curvas hacia la derecha, pueden indicar principalmente que, debido al tratamiento osmótico y a la aplicación de ultrasonidos, las células han aumentado de tamaño, lo cual, podría ser previsible especialmente cuando la inmersión se llevó a cabo en agua destilada y en disolución de ácido cítrico al 1 %, o bien que algunas paredes celulares se han roto y, por tanto, el tamaño que se mide es el resultado de dos o más células unidas al desaparecer parte de la pared que las separaba.

En la Figura 4.9 se puede observar como los perfiles de los percentiles del área celular de las muestras tratadas siguen la misma tendencia que el perfil de la muestra control, que no fue sometida a ningún tratamiento. Sin embargo, en todos los casos, la curva correspondiente a la muestra control es la que se sitúa más hacia la izquierda indicando los tamaños celulares más pequeños que en las muestras tratadas.

En berenjena, se aprecia como los perfiles más próximos al perfil perteneciente a la muestra control, son aquellos que corresponden a las muestras tratadas por inmersión en agua destilada y ácido cítrico al 1%, ambos sin asistencia de ultrasonidos de potencia. Sin embargo, el perfil correspondiente a la inmersión de berenjena en zumo se encuentra más desplazado hacia la derecha. En cambio, en manzana y remolacha tratadas por inmersión en zumo, el perfil es casi coincidente con el de la muestra control, y ligeramente desplazado a la derecha cuando el líquido de inmersión fue agua.

Por tanto, se puede concluir que los efectos de la inmersión sobre el tamaño celular son dependientes, tanto del líquido de inmersión como de la naturaleza del vegetal.

Además, de acuerdo con los resultados mostrados en la figura 4.9, las modificaciones de tamaño celular fueron mayores, en todos los casos, cuando el tratamiento de inmersión se llevó a cabo con asistencia de ultrasonidos. Las muestras que presentaron los mayores tamaños celulares fueron, por tanto, las tratadas por inmersión con aplicación de ultrasonidos de potencia, en zumo del propio vegetal para el caso de berenjena y remolacha, y en agua destilada para la manzana. Esta discusión coincide con la realizada a partir de la Tabla 4.6.

Por tanto, se puede concluir que, el tamaño celular no solo se ve modificado por el tratamiento mediante inmersión si no que los efectos son mayores cuando el proceso se lleva a cabo con aplicación de ultrasonidos de potencia. Como se comentó anteriormente, los ultrasonidos pueden provocar diferentes efectos sobre el material (cavitación, microjets, efecto esponja, microcorrientes, etc.) que, de acuerdo con los resultados obtenidos, pueden provocar el hinchamiento celular y la rotura de las paredes celulares, además de favorecer la aparición de microcanales y fisuras del tejido celular.

## 5. Conclusiones

Del análisis de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones que responden al objetivo propuesto en el proyecto de fin de máster:

Según el análisis cualitativo de las imágenes microestructurales obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica:

1. Los productos analizados (berenjena, manzana y remolacha) presentaron microestructuras iniciales muy diferentes entre sí.
2. Todos los tratamientos de inmersión modificaron la microestructura de los vegetales, aunque de forma diferente, dependiendo del líquido de inmersión (agua destilada, disolución de ácido cítrico al 1 % y zumo del propio vegetal), la aplicación de ultrasonidos y la microestructura original del vegetal.

Según el análisis de imagen (cuantitativo) y la determinación de los percentiles del tamaño celular y el número de células por superficie de tejido:

3. Los tamaños celulares y número de células por unidad de área fueron diferentes entre los tres vegetales analizados. La manzana presentó un tamaño celular entre 5 y 6 veces superior a los de la berenjena y la remolacha (datos referidos al percentil 50); y un recuento celular entre 5 y 7 veces menor.
4. En general, el tratamiento por inmersión, provocó aumentos en los tamaños celulares, de entre el 6 y 29 % (datos referidos al percentil 50), y disminuciones del recuento celular de entre el 2 y el 17 % cuando no se aplicaron ultrasonidos. Los cambios fueron diferentes en cada vegetal, siendo superiores en la manzana.
5. Cuando se aplicaron ultrasonidos, el tamaño celular de las muestras tratadas por inmersión aumentó entre un 11 y un 29 %, (datos referidos al percentil 50) y el recuento celular descendió entre un 4 y un 35 %, dependiendo del vegetal y del líquido de inmersión.

**Conclusión general:**

El tratamiento por inmersión en diferentes líquidos (agua destilada, disolución de ácido cítrico al 1% y zumo del propio vegetal), modificó la microestructura de vegetales con distinta organización celular y porosidad, como son berenjena, manzana y remolacha. En general, se puede concluir que los efectos de la inmersión sobre la microestructura son dependientes, tanto del líquido de inmersión como de las características iniciales de la estructura del vegetal. La asistencia de ultrasonidos durante el tratamiento por inmersión de los diferentes vegetales provocó, en todos los casos, mayores cambios microestructurales, destacando el aumento de la ruptura celular y del tamaño de partícula.

## 6. Bibliografía

- Aguilera, J. M. (2005). Why food microstructure? *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), 3–11. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2004.05.050>
- Alarcon-Rojo, A. D., Carrillo-Lopez, L. M., Reyes-Villagrana, R., Huerta-Jiménez, M., & Garcia-Galicia, I. A. (2019). Ultrasound and meat quality: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 55, 369–382. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2018.09.016>
- Boukouvalas, C. J., Krokida, M. K., Maroulis, Z. B., & Marinos-Kouris, D. (2006). Density and Porosity: Literature Data Compilation for Foodstuffs. *International Journal of Food Properties*, 9(4), 715–746. <https://doi.org/10.1080/10942910600575690>
- Cárcel, J. A., Benedito, J., Rosselló, C., & Mulet, A. (2007). Influence of ultrasound intensity on mass transfer in apple immersed in a sucrose solution. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.018>
- Cárcel, J. a., Garcia-Perez, J. V., Riera, E., & Mulet, a. (2011). Improvement of Convective Drying of Carrot by Applying Power Ultrasound—Influence of Mass Load Density. *Drying Technology*, 29(2), 174–182. <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.483032>
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Dalmau, M. E., Bornhorst, G. M., Eim, V., Rosselló, C., & Simal, S. (2017). Effects of freezing, freeze drying and convective drying on in vitro gastric digestion of apples. *Food Chemistry*, 215, 7–16. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.07.134>
- Demirel, S. E., Li, J., & Hasan, M. F. (2019). Systematic process intensification. *Current Opinion in Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.12.001>
- Deng, Y., & Zhao, Y. (2008). Effects of pulsed-vacuum and ultrasound on the osmodehydration kinetics and microstructure of apples (Fuji). *Journal of Food Engineering*, 85(1), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.016>

- Doymaz, I. (2010). Effect of citric acid and blanching pre-treatments on drying and rehydration of Amasya red apples. *Food and Bioprocess Processing*, 88(2–3), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.09.003>
- Eim, V. S., García-Pérez, J. V., Rosselló, C., Femenia, A., & Simal, S. (2012). Influence of the Addition of Dietary Fiber on the Drying Curves and Microstructure of a Dry Fermented Sausage (Sobrassada). *Drying Technology*, 30(2), 146–153. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.628428>
- Esquivel-González, B. E., Rutiaga-Quiñones, O. M., Rocha-Guzmán, N. E., Medina-Torres, L., Varela-Santos, E. del C., & Ochoa-Martínez, L. A. (2017). Natural dye ultrasound extraction from beetroot: role of extraction solvent pH on color and enzyme inactivation. *Journal of Chemical J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec. B*, 7(3), 784–796. <https://doi.org/10.24214/jcbps.B.7.3.78496> DOI:10.24214/jcbps.B.7.3.78496
- Fernandes, F. A. N., Gallão, M. I., & Rodrigues, S. (2009). Effect of osmosis and ultrasound on pineapple cell tissue structure during dehydration. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 186–190. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.021>
- Fernandes, F. A. N., Linhares, F. E., & Rodrigues, S. (2008). Ultrasound as pre-treatment for drying of pineapple. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(6), 1049–1054. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2008.03.009>
- García Pérez, J. V. (2007). *Tesis doctoral: Contribución al estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo de alimentos*. Universitat Politècnica de València, Valencia (España). <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/1890>
- González-Centeno, M. R. (2013). *Tesis doctoral: Caracterización de los subproductos de la industria vitivinícola como fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos. Uso de los ultrasonidos de potencia para la extracción de la fracción fenólica*. Universitat de les Illes Balears, Islas Balears (España).
- González-Fésler, M., Salvatori, D., Gómez, P., & Alzamora, S. M. (2008). Convective air drying of apples as affected by blanching and calcium impregnation. *Journal of Food Engineering*, 87(3), 323–332. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2007.12.007>

- Herremans, E., Verboven, P., Verlinden, B. E., Cantre, D., Abera, M., Wevers, M., & Nicolai, B. M. (2015). Automatic analysis of the 3-D microstructure of fruit parenchyma tissue using X-ray micro-CT explains differences in aeration. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0650-y>
- Liu, L., Li, X., Du, L., Zhang, X., Yang, W., & Zhang, H. (2019). Effect of ultrasound assisted heating on structure and antioxidant activity of whey protein peptide grafted with galactose. *LWT*, *109*, 130–136. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.04.015>
- Miano, A. C., Rojas, M. L., & Augusto, P. E. D. (2019). Structural changes caused by ultrasound pretreatment: Direct and indirect demonstration in potato cylinders. *Ultrasonics Sonochemistry*, *52*, 176–183. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2018.11.015>
- Morris, V. J., & Groves, K. (2013). Preface. In *Food Microstructures: Microscopy, Measurement and Modelling* (pp. xxvii–xxviii). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-525-1.50021-X>
- Niño-Medina, G., Urías-Orona, V., Muy-Rangel, M. D., & Heredia, J. B. (2017). Structure and content of phenolics in eggplant (*Solanum melongena*) - a review. *South African Journal of Botany*, *111*, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.016>
- Nowacka, M., Wiktor, A., Śledź, M., Jurek, N., & Witrowa-Rajchert, D. (2012). Drying of ultrasound pretreated apple and its selected physical properties. *Journal of Food Engineering*, *113*(3), 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.013>
- Ortuño, C., Pérez-Munuera, I., Puig, A., Riera, E., & Garcia-Perez, J. V. (2010). Influence of power ultrasound application on mass transport and microstructure of orange peel during hot air drying. *Physics Procedia*, *3*, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2010.01.022>
- Ozuna, C., Álvarez-Arenas, T. G., Riera, E., Cárcel, J. A., & Garcia-Perez, J. V. (2014). Influence of material structure on air-borne ultrasonic application in drying. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*, 1235–1243. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.12.015>

- Ozuna, C., Cárcel, J. A., Walde, P. M., & Garcia-Perez, J. V. (2014). Low-temperature drying of salted cod (*Gadus morhua*) assisted by high power ultrasound: Kinetics and physical properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *23*, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.03.008>
- Puig, A., Perez-Munuera, I., Carcel, J. A., Hernando, I., & Garcia-Perez, J. V. (2012). Moisture loss kinetics and microstructural changes in eggplant (*Solanum melongena* L.) during conventional and ultrasonically assisted convective drying. *Food and Bioproducts Processing*, *90*(4), 624–632. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2012.07.001>
- Rajewska, K., & Mierzwa, D. (2017). Influence of ultrasound on the microstructure of plant tissue. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *43*, 117–129. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2017.07.034>
- Ramírez, C., Troncoso, E., Muñoz, J., & Aguilera, J. M. (2011). Microstructure analysis on pre-treated apple slices and its effect on water release during air drying. *Journal of Food Engineering*, *106*(3), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.020>
- Robles-Ozuna, L. ., & Ochoa-Martínez, L. . (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesado de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, *13*(2), 109–122. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/813/81325441002.pdf>
- Rodríguez Barragán, Ó. A. (2014). *Tesis doctoral: Intensificación de procesos de transferencia de materia mediante ultrasonidos de potencia. Aplicación al secado convectivo y a la extracción con fluidos supercríticos*. Universitat de les Illes Balears, Islas Balears (España). Retrieved from [http://repositori.uib.cat/xmlui/bitstream/handle/11201/149186/Rodriguez\\_Barragan\\_Oscar\\_Alberto.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositori.uib.cat/xmlui/bitstream/handle/11201/149186/Rodriguez_Barragan_Oscar_Alberto.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rodríguez, Ó., Llabrés, P. J., Simal, S., Femenia, A., & Rosselló, C. (2014). Intensification of Predrying Treatments by Means of Ultrasonic Assistance: Effects on Water Mobility, PPO Activity, Microstructure, and Drying Kinetics of Apple. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(3), 503–515. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1424-5>

- Rodríguez, Ó., Santacatalina, J. V., Simal, S., Garcia-Perez, J. V., Femenia, A., & Rosselló, C. (2014). Influence of power ultrasound application on drying kinetics of apple and its antioxidant and microstructural properties. *Journal of Food Engineering*, *129*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2014.01.001>
- Russ, J. C. (2005). *Image Analysis of Food Microstructure*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC. Retrieved from [www.crcpress.com](http://www.crcpress.com)
- Santacatalina, J. V., Contreras, M., Simal, S., Cárcel, J. A., & Garcia-Perez, J. V. (2016). Impact of applied ultrasonic power on the low temperature drying of apple. *Ultrasonics Sonochemistry*, *28*, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.06.027>
- Sigurðsladottir, S., Ingvarsdottir, H., Torrissen, O. J., Cardinal, M., & Hafsteinsson, H. (2000). Effects of freezing/thawing on the microstructure and the texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Research International*, *33*(10), 857–865. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00105-8)
- Tutunchi, P., Roufegarinejad, L., Hamishehkar, H., & Alizadeh, A. (2019). Extraction of red beet extract with  $\beta$ -cyclodextrin-enhanced ultrasound assisted extraction: A strategy for enhancing the extraction efficacy of bioactive compounds and their stability in food models. *Food Chemistry*, *297*, 124994. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.124994>
- Valerga, L., Darré, M., Zaro, M. J., Arambarri, A., Vicente, A. R., Lemoine, M. L., & Concellón, A. (2019). Micro-structural and quality changes in growing dark-purple eggplant (*solanum melongena* L.) as affected by the harvest season. *Scientia Horticulturae*, *244*, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.032>
- Vallespir, F., Rodríguez, Ó., Eim, V. S., Rosselló, C., & Simal, S. (2018). Freezing pre-treatments on the intensification of the drying process of vegetables with different structures. *Journal of Food Engineering*, *239*, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.008>
- Vallespir, F., Rodríguez, Ó., Eim, V. S., Rosselló, C., & Simal, S. (2019). Effects of freezing treatments before convective drying on quality parameters: Vegetables with different microstructures. *Journal of Food Engineering*, *249*, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.01.006>

- Verboven, P., Defraeye, T., & Nicolai, B. (2018). Measurement and visualization of food microstructure: Fundamentals and recent advances. In *Food Microstructure and Its Relationship with Quality and Stability* (pp. 3–28). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100764-8.00001-0>
- Welti-Chanes, J., Morales-de la Peña, M., Jacobo-Velázquez, D. A., & Martín-Belloso, O. (2017). Opportunities and Challenges of Ultrasound for Food Processing: An Industry Point of View. In *Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation* (pp. 457–497). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804581-7.00019-1>

### **Agradecimientos**

La autora quiere agradecer al Dr. Fernando Hierro, técnico superior de los Servicios Científicotécnicos (SCT) de la Universitat de les Illes Balears, su participación en la adquisición de las imágenes por microscopía electrónica de barrido, y al Sr. Carles Saus, patólogo del Hospital Universitari Son Espases, su participación en la preparación de las muestras para el análisis de microscopía óptica. Así mismo, se agradece el apoyo financiero del INIA, (proyecto RTA2015-00060-C04-03) cofinanciado con fondos FEDER).