



Universitat
de les Illes Balears

EXTRACCIÓN ACÚSTICA DE BIOCOMPUESTOS DE SUBPRODUCTOS DE LA ALCACHOFA. EFECTO DE LA TEMPERATURA.

CRISTINA RECHE LENDINEZ

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química
de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2017/2018

Fecha Septiembre 2018

Nombre Tutor del Trabajo: María Carmen Rosselló Matas

Nombre Cotutor: Susana Simal Florindo

GRACIAS a todas aquellas personas, que de una u otra forma, han estado presentes en este último año, ya que sin ellos este trabajo no hubiese sido posible.

En primer lugar, a mis directoras, Dra. Carmen Rosselló y Dra. Susana Simal, por dejarme trabajar bajo su dirección y por la confianza otorgada. A la doctora Valeria Eim y al doctor Antoni Femenia por compartir sus conocimientos conmigo.

Al Fondo Social Europeo y al Programa SOIB-Joves Qualificats junto con la Dra. Carmen Rosselló, los cuales me han dado la oportunidad de poder disfrutar de la experiencia de la investigación.

A todos mis compañeros del Grupo de Ingeniería Agroalimentaria de la Universidad de les Illes Balears por su amistad, por todos los momentos vividos y por aguantarme en mis mejores y peores momentos. Especialmente a Mónica por guiarme, enseñarme con paciencia y por tus sabios consejos.

A todos mis amigos que han sabido ayudarme, darme consejos en momentos de dudas y animarme. A mi segunda familia de la Escuela Balboa que han sabido aguantar mis momentos de agobio y estrés con palabras de ánimo y buenos momentos.

Finalmente, a toda mi familia, por quererme, guiarme por el mejor camino, apoyarme en todas mis decisiones tomadas y ayudarme a conseguir todos mis objetivos. A mis padres y a mi hermano por su apoyo incondicional, por aguantar mis nervios, estrés y malos momentos y por saber siempre que decirme para levantarme en aquellos momentos en los que me daba por vencida.

GRACIAS.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. SUBPRODUCTOS DE LA ALCACHOFA.....	8
1.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	9
1.2.1. POLIFENOLES.....	9
1.2.2. ÁCIDO CLOROGÉNICO	11
1.3. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO.....	12
1.3.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	12
1.3.2. MICROESTRUCTURA DE LA MATRIZ SÓLIDA	13
1.3.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	13
1.4. INTENSIFICACIÓN DE PROCESOS DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO MEDIANTE APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS	14
1.4.1. LOS ULTRASONIDOS DE POTENCIA	14
1.4.2. USO DE ULTRASONIDOS DE POTENCIA EN LA EXTRACCIÓN DE BIOCOMPUESTOS.....	16
1.5. MODELIZACIÓN	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. MATERIA PRIMA.....	21
3.2. EQUIPO EXPERIMENTAL	21
3.2.1. EQUIPO DE EXTRACCIÓN MECÁNICA	21
3.2.2. EQUIPO DE EXTRACCIÓN ACÚSTICA.....	22
3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA	23
3.3.1. CONTENIDO EN HUMEDAD	23
3.3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS	23
3.3.3. CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES.....	23
3.3.4. CONTENIDO EN ÁCIDO CLOROGÉNICO	24
3.3.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	24
3.3.6. ANÁLISIS DE IMAGEN	25
3.3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL	26
3.4.1. CARACTERIZACIÓN	26

3.4.2.	DETERMINACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN	26
3.5.	MODELIZACIÓN	28
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1.	POTENCIA ACÚSTICA APLICADA. CARACTERIZACIÓN DE LA SONDA DE ULTRASONIDOS	30
4.2.	CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE BIOCOMPUESTOS DE LAS FRACCIONES DE LA ALCACHOFA	30
4.2.1.	CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN	32
4.2.2.	MODELIZACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN	36
4.2.3.	ANÁLISIS DE IMAGEN	41
5.	CONCLUSIONES	45
6.	NOMENCLATURA.....	46
7.	BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de la alcachofa.....	9
Figura 2. Fracciones de la alcachofa.....	9
Figura 3.- Estructuras de los ácidos fenólicos y flavonoides más abundantes en la alcachofa: ácido clorogénico (1), cinarina (2), luteolina (3) y apigenina (4).....	11
Figura 4. Mecanismo de cavitación y difusión del solvente (Shirsath et al., 2012).	15
Figura 5. Tallo de la alcahofa. Acondicionamiento realizado a la muestra.....	21
Figura 6.- Equipo experimental empleado para los experimentos de extracción mediante agitación emcánica (experimentos de control).....	22
Figura 7. Equipo experimental y sonda empleados para los experimentos de extracción asistidos acústicamente	22
Figura 8. Conversión de las imagenes de SEM en imágenes binarias mediante Image J	25
Figura 9. Procedimiento experimental empleado para la caracterización del contenido en polifenoles y ácido clorogénico de las fracciones de la alcachofa	26
Figura 10. Diseño experimental. Estudio del efecto de temperatura sobre el proceso de extracción acústica de compuestos bioactivos del tallo de alcachofa.....	27
Figura 11.Cinética de extracción de polifenoles totales del tallo de la alcachofa. Experimentos con asistencia acústica (US) y con agitación mecánica (AG). T =25, 40 y 60°C.....	32
Figura 12. Cinéticas de extracción del ácido clorogénico en el tallo de la alcachofa	34
Figura 13. Simulación de las cinéticas de extracción de polifenoles. Experimentos realizados con agitación mecánica. T = 25, 40 y 60°C.	39
Figura 14. Simulación de las cinéticas de extracción de polifenoles. Experimentos realizados con ultrasonidos. T = 25, 40 y 60°C.	39
Figura 15. Simulación de las cinéticas de extracción de ácido clorogénico. Experimentos realizados con agitación mecánica. T = 25, 40 y 60°C.....	40
Figura 16. Simulación de las cinéticas de extracción de ácido clorogénico. Experimentos realizados con ultrasonidos. T = 25, 40 y 60°C.....	40
Figura 17. Microfotografías de las matrices sólidas tras la extracción: a-fresca, b-AG25°C, c- AG60°C, d-US25°C, e-US60°C.	42
Figura 18. Perfiles percentiles del área celular de muestras de alcachofa fresca y de las mismas después de haber realizado los diferentes procesos.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Revisión bibliográfica. Estudios relacionados con los efectos saludables sobre el organismo derivados de la ingesta de polifenoles.....	10
Tabla 2. Revisión bibliográfica. Estudios relacionados con los beneficios del ácido clorogénico para la salud	11
Tabla 3. Revisión bibliográfica. Estudios de procesos de extracción en los cuales se ha modelizado mediante la ecuación de Weibull	18
Tabla 4. Condiciones de operación. Determinación de ácido clorogénico	24
Tabla 5. Nomenclatura utilizada para los diferentes tratamientos realizados	27
Tabla 6. Densidad acústica aplicada al sistema de extracción	30
Tabla 7.- Características físico-químicas de las diferentes fracciones de la alcachofa.	31
Tabla 8. Parámetros del modelo de Weibull, obtenidos con Excel.....	36
Tabla 9. Los parámetros identificados del modelo Weibull.....	37
Tabla 10. Error relativo medio (ERM) y varianza explicada (VAR) en la comparación entre los valores experimentales y simulados	41

RESUMEN

La alcachofa (*Cynara scolymus* L.) es un vegetal comestible ampliamente consumido en la dieta mediterránea. Se estima que la producción mundial en el 2016 fue de 1452577 Tn. Los subproductos resultantes del procesado de las alcachofas representan cerca del 80% del peso de las mismas. Y han sido utilizados para la recuperación de compuestos fenólicos y para la obtención de metano por digestión anaerobia. La alcachofa es una fuente natural de ácidos fenólicos que poseen diferentes propiedades medicinales y nutricionales.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la aplicación de asistencia acústica como tecnología para favorecer la extracción de biocompuestos de subproductos de alcachofa utilizando una disolución de etanol 20% de disolvente, potenciando así su posible uso alimentario. Para alcanzar el objetivo planteado se procedió a estudiar el efecto de la temperatura sobre las cinéticas de extracción y la composición de los extractos obtenidos.

Para evaluar el efecto de la asistencia acústica (US) (24kHz), se usó como control el tratamiento con agitación mecánica a 100 rpm. Como medio de extracción se utilizó etanol 20% y se siguieron las cinéticas de extracción durante 35 min a diferentes temperaturas (25, 40 y 60°C); las cinéticas se modelizaron mediante el modelo empírico de Weibull. Asimismo, se caracterizaron los extractos obtenidos mediante la determinación de su contenido en ácido clorogénico, polifenoles y también, se estudió la estructura de la matriz sólida mediante el análisis de las imágenes obtenidas al SEM.

La aplicación de US de potencia demostró ser capaz de intensificar la extracción de polifenoles y ácido clorogénico. La temperatura afectó significativamente sobre los rendimientos de extracción, aumentando a medida que la temperatura incrementaba, de tal manera que se obtuvieron rendimientos más elevados a 60°C. El efecto de la asistencia acústica se vio potenciado a temperaturas bajas.

Mediante el modelo de Weibull fue posible simular satisfactoriamente las cinéticas de extracción. Los parámetros identificados para dicho modelo indicaron que el rendimiento máximo de extracción aumentó con la aplicación de energía acústica, permitiendo disminuir la energía de activación de los procesos de extracción de polifenoles y ácido clorogénico.

El efecto de la energía acústica se pudo observar en las matrices sólidas procesadas, ya que presentaron una microestructura con un mayor número de grietas que el control. La aplicación de ultrasonidos durante la extracción provocó la rotura de las paredes celulares de la matriz sólida, aumentando de esta manera la superficie y la velocidad de transferencia de masa.

En definitiva, los resultados experimentales obtenidos indicaron que la extracción mediante asistencia acústica permitió la obtención de rendimientos más altos que en las condiciones control, especialmente a temperaturas bajas; afectando a la estructura de las matrices sólidas, al aumentar la superficie y la velocidad de transferencia de masa del proceso de extracción.

1. INTRODUCCIÓN

La Directiva Europea (Dir. 2006/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de abril de 2006) establece que: “es importante favorecer la valorización de los residuos y la utilización de materiales valorizados a fin de preservar los recursos naturales. Su desarrollo busca contribuir a la transformación de los países miembros de la UE en una “sociedad del reciclado”, que trate de evitar la generación de residuos y que utilice los residuos como un recurso”.

Según la ley 22/2011 modificada por la ley 5/2013 se denomina “residuo” a cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseché o tenga la intención o la obligación de desechar; y “subproducto” a una sustancia resultante de un proceso de producción cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia, pero que tenga un valor comercial. Por ello, la tendencia actual en la industria es la de conseguir transformar lo que es un residuo en un subproducto.

En las últimas décadas, por razones tanto económicas como ambientales, ha habido una presión continua y creciente para recuperar y explotar los desechos de los alimentos (Lin et al., 2013). Una de las principales vías consiste en extraer de ellos compuestos bioactivos naturales, como la fibra dietética (FD) y antioxidantes, que podrían ser de gran valor para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Femenia, 2007).

En el ámbito de la alimentación, se ha detectado, tanto a nivel industrial como científico, un interés en encontrar nuevas fuentes de compuestos bioactivos que podrían usarse como ingredientes funcionales en la industria alimentaria (González-Centeno et al., 2010; Fontana et al., 2017), ya que la ingesta de determinados biocompuestos se relaciona con importantes beneficios nutricionales y de salud (Kendall et al., 2010).

El procesado de alimentos de origen vegetal genera importantes cantidades de subproductos (hojas, tallos, aguas residuales, etc.). La eliminación de estos subproductos supone un costo para el procesador de alimentos y un posible impacto negativo en el medio ambiente. La investigación realizada en los últimos 20 años ha revelado que muchos de estos subproductos podrían servir como fuente de compuestos bioactivos potencialmente valiosos (Jayathilakan et al., 2012). A veces, estos subproductos pueden alcanzar el 60% de los vegetales cosechados como en el caso de la manipulación industrial de alcachofa (Wijngaard et al., 2012).

A pesar de esto, en la actualidad, la gran mayoría de los subproductos no se explotan como fuentes de estos compuestos. Esto se debe, en parte, a la falta de técnicas apropiadas para la extracción de estos compuestos.

1.1. SUBPRODUCTOS DE LA ALCACHOFA

La alcachofa (*Cynara scolymus* L.) es un vegetal comestible ampliamente consumido en la dieta mediterránea (Coinu et al., 2007). El cultivo de alcachofa, con un área mundial de cultivo de 116261 ha y una producción de 1452577 Tn, se concentra principalmente en la región

mediterránea, con una producción anual de 613135 Tn. España es el segundo productor de alcachofas del mundo (Italia es el primero) con una producción de 185796 Tn anuales (FAO, 2016).



Figura 1. Planta de la alcachofa

La fracción comestible de la planta es la inflorescencia inmadura, llamada capitulum, cabeza o corazón. Los subproductos de alcachofa (hojas, brácteas externas y tallos) suponen un descarte importante (Lattanzio et al., 2009) ya que representa aproximadamente un 80-85% de la planta (Boubaker et al., 2016).



Figura 2. Fracciones de la alcachofa

1.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS

1.2.1. POLIFENOLES

Los polifenoles son metabolitos secundarios presentes en las hojas de muchas plantas superiores y en las frutas. Su función principal es proteger estas hojas o frutos frente al ataque de herbívoros (Feeny, 1970). En la bibliografía se encuentran descritos alrededor de 8000 polifenoles diferentes, divididos en, al menos, diez clases en función de su estructura química. A pesar de su amplia categorización, todos comparten una característica estructural común, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.

Los polifenoles se clasifican según la naturaleza y la estructura del esqueleto carbonatado en flavonoides y no flavonoides.

La razón principal del interés de científicos y consumidores por los polifenoles presentes en los alimentos es la demostración de sus propiedades antioxidantes, su abundancia en nuestra dieta y su probable papel en la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Scalbert et al., 2005).

En las últimas décadas, son numerosos los estudios epidemiológicos que asocian los efectos beneficiosos derivados del consumo de productos de origen vegetal a la presencia, tipo y cantidad de compuestos fenólicos que incluyen en su composición. Ello se debe a la elevada capacidad antioxidante que presentan dichos compuestos, ya que ésta les permite prevenir y/o inhibir los procesos oxidativos y bloquear la incidencia-ataque de radicales libres, tanto en los alimentos como en el cuerpo humano (Babbar et al., 2011). Gracias a la prevención de la oxidación de biomoléculas del organismo, tales como lípidos, proteínas y/o ácidos nucleicos, la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos incluidos en la dieta se traduce en toda una serie de efectos beneficiosos para la salud que se resumen en la Tabla 1 (González-Centeno, 2013).

Tabla 1. Revisión bibliográfica. Estudios relacionados con los efectos saludables sobre el organismo derivados de la ingesta de polifenoles.

Efecto para la salud	Referencias bibliográficas
Anticancerígeno	Gollucke et al., (2013)
Antiinflamatorio	Overman et al., (2010)
Antimutagénico	Anter et al., (2011)
Antiulceroso	Wang et al., (2010)
Antimicrobiano	Cueva et al., (2012)
Cardioprotector	Olas et al., (2012)
Dermoprotector	Perde-Schrepler et al., (2013)
Hepatoprotector	Gupta et al., (2011)
Neuroprotector	Pasinetti et al., (2012)

Los ácidos fenólicos son compuestos que juegan un papel importante durante el procesado de alimentos vegetales debido a su influencia sobre la estabilidad del color y su capacidad para inhibir las reacciones de pardeamiento enzimático (Aguirre Santos et al., 2018).

El ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquinico) y el ácido 1,5-di-O-cafeoilquinico (cinarina), son los ácidos fenólicos más abundantes presentes en tejidos de alcachofa, mientras que la luteolina y apigenina, son las flavonas más abundantes (Colantuono et al., 2018).

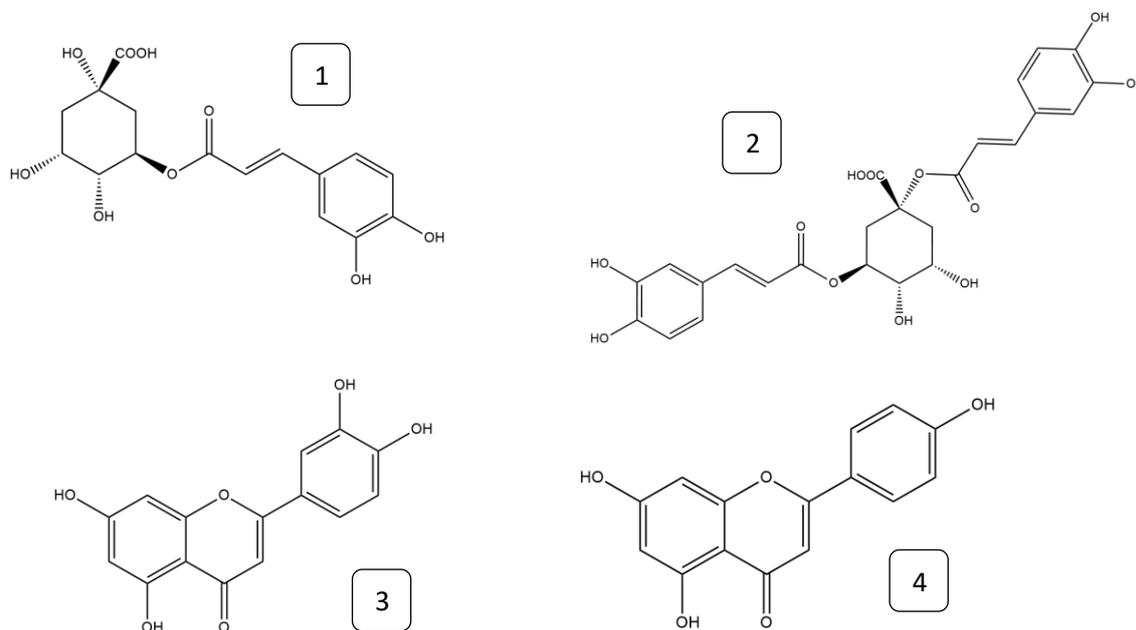


Figura 3.- Estructuras de los ácidos fenólicos y flavonoides más abundantes en la alcachofa: ácido clorogénico (1), cinarina (2), luteolina (3) y apigenina (4)

1.2.2. ÁCIDO CLOROGÉNICO

El ácido clorogénico es el isómero más abundante del ácido cafeoilquinico y se trata de uno de los ácidos fenólicos más abundantes en alimentos como los extractos de café verde y té (Naveed et al., 2018). El ácido clorogénico posee muchos efectos positivos para la salud, tal y como se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Revisión bibliográfica. Estudios relacionados con los beneficios del ácido clorogénico para la salud

Efecto para la salud	Referencias bibliográficas
Antiinflamatorio	dos Santos et al., (2006)
Hepatoprotector	Yun et al., (2012)
Cardioprotector	Wan et al., (2013)
Estimulador del sistema nervioso central	Naveed et al., (2018)

Diferentes estudios realizados sobre los compuestos bioactivos de la alcachofa han demostrado su actividad hepatoprotectora, anticarcinogénica e hipocolesterolémica (Mehmetçik et al., 2008, Lattanzio et al., 2009).

1.3. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

Las materias primas vegetales contienen en general, pequeñas concentraciones de soluto activo, pero de alto valor añadido que justifica el desarrollo de procesos de separación de alto rendimiento (Romdhane & Gourdon, 2002). La extracción sólido-líquido es una de las operaciones unitarias más ampliamente utilizadas en la industria alimentaria y, entre otros fines, se aplica en la recuperación de ciertos compuestos bioactivos retenidos en la matriz de productos naturales (Delgado-Adámez et al., 2017). La extracción sólido-líquido (S-L) es un proceso de transferencia de materia mediante el cual el compuesto de interés pasa desde la matriz del sólido hasta el seno de la fase líquida. Dicho mecanismo tiene lugar en dos etapas: una primera en la que se produce una rápida transferencia del soluto desde la superficie del sólido al disolvente; y una segunda etapa de transferencia en el interior del sólido por difusión (Sturzoiu & Stroescu, 2011). En la mayoría de sistemas de extracción utilizados en la industria alimentaria, se asume que la segunda etapa es el paso limitante del proceso, debido a la resistencia natural que ofrece la fase sólida (a menudo tejidos de origen vegetal) a la transferencia de materia y/o penetración de líquidos (Hojnik et al., 2008).

1.3.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA

La temperatura de extracción es una variable importante que debe optimizarse para minimizar el costo de energía del proceso. La temperatura afecta al equilibrio y a la velocidad de transferencia de masa del proceso de extracción. Muchos autores coinciden en que un aumento en la temperatura de trabajo favorece la extracción, mejorando tanto la solubilidad del soluto como el coeficiente de difusión, pero también en que más allá de cierto valor, ciertos compuestos pueden desnaturalizarse (Spigno et al., 2006, Spigno & De Faveri, 2007).

Cabe destacar, que ciertos compuestos de interés son termosensibles, es decir que una temperatura lo suficientemente alta puede contribuir a la degradación de estos.

Dent et al., (2013) quienes estudiaron el efecto de la temperatura en la extracción de polifenoles de la salvia (*Salvia officinalis* L.) usando como disolvente tres soluciones acuosas diferentes (30, 50 o 70%) de etanol y acetona, así como agua destilada; y a dos temperaturas, 60 y 90°C. Bucić-Kojić et al., (2009) estudiaron el efecto de la temperatura en la extracción de compuestos fenólicos de semilla de uva usando como disolvente etanol 50%, agitación (200 rpm) y temperaturas de 25 a 80°C. Ma et al., (2008) realizaron el estudio del efecto de la temperatura en la extracción de hesperidina con ultrasonidos (20kHz), utilizando metanol como disolvente y a diversas temperaturas (30, 40 y 50°C).

En dichos estudios se pudo observar un aumento en el rendimiento de extracción a medida que la temperatura incrementaba.

1.3.2. MICROESTRUCTURA DE LA MATRIZ SÓLIDA

La microestructura de los alimentos puede definirse como la organización de sus constituyentes, lo que da como resultado una estructura espacial de diferentes fases materiales microscópicamente visible. En algunos casos, también se considera que la microestructura de los alimentos incluye la interacción de las moléculas dentro de la matriz microestructural (Verboven et al., 2018).

La caracterización cuantitativa de la microestructura de materiales heterogéneos, como los alimentos, es de crucial importancia para muchas aplicaciones prácticas. De hecho la transferencia de calor y masa, las propiedades mecánicas y electromagnéticas, etc., se ven fuertemente afectadas por la estructura tridimensional de los sólidos (Derossi et al., 2013).

El estudio de la estructura celular de los alimentos generalmente requiere un examen microscópico en el cual las imágenes microscópicas generalmente, se digitalizan y posteriormente se analizan mediante técnicas de análisis de imagen. El microscopio óptico es la técnica más utilizada, pero también microscopía confocal, la microscopía electrónica, la microscopía de fuerza atómica, la resonancia magnética o la tomografía computarizada (Sun, 2012).

Como técnica de análisis de imagen, en la industria alimentaria se utiliza ampliamente la de textura estadística por su alta precisión y menor tiempo de cálculo. La distribución espacial de los valores de gris es una de las cualidades definitorias de la textura. Los métodos estadísticos analizan la distribución espacial de dichos valores, al calcular las características locales en cada punto de la imagen y derivar un conjunto de operaciones estadísticas de las distribuciones de dichas características locales (Selvarajah & Kodituwakku, 2011).

Muñoz et al., (2012) observaron el cambio en la microestructura de la semilla de chía realizando la extracción del mucílago, con agua sin ayuda externa, a una temperatura de 20 a 80°C, un pH de 4 a 8 y una relación semilla: agua de 1:20 y 1:40. Minjares-Fuentes et al., (2016) observaron la microestructura posteriormente a la extracción de hemicelulosa de orujo de uva, mediante la aplicación de ultrasonidos (140W) con KOH a 20°C.

1.3.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La extracción de compuestos fenólicos de material vegetal está influenciada por su naturaleza química, así como por la presencia de sustancias que pueden provocar interferencias (Rajbhar et al., 2015).

El proceso de extracción de polifenoles también se encuentra influenciado por:

- La composición del solvente, debido a que los extractos fenólicos vegetales son siempre una mezcla de diferentes clases de fenoles, que son selectivamente solubles en diversos solventes (Wissam et al., 2012).

- El tiempo de extracción (Brglez Mojzer et al., 2016).
- La temperatura, que afecta simultáneamente a la solubilidad y la velocidad de transferencia de masa, así como también disminuye la viscosidad y la tensión superficial de los solventes, lo que contribuye a una mayor tasa de extracción (King & Srinivas, 2009).
- El pH, ya que los polifenoles son más estables a pH bajo por lo que se extraen fácilmente en solventes orgánicos (Khoddami et al., 2013).
- La relación sólido-líquido (Radojković et al., 2012).
- El tamaño de partícula (Makanjuola, 2017).

1.4. INTENSIFICACIÓN DE PROCESOS DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO MEDIANTE APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS

La intensificación de procesos es actualmente una de las áreas con mayor potencial de desarrollo en la industria alimentaria. Consiste en modificar procesos convencionales o desarrollar nuevas tecnologías para reducir las necesidades de energía, aumentar rendimientos y/o incrementar la calidad de productos con el consiguiente beneficio medioambiental (Benali & Kudra, 2010).

Tradicionalmente, los procesos basados en solventes se han usado para la extracción de muchos compuestos bioactivos. Sin embargo, los mecanismos de extracción estándar como la extracción soxhlet presenta limitaciones, tales como un importante gasto de solvente, gran costo de operación y tiempos de operación elevados que frecuentemente resultan en rendimientos más bajos. La aplicación de ultrasonidos de potencia para la intensificación de procesos de extracción posibilita mayores rendimientos en un tiempo más corto, con un aporte de energía menor y sin la necesidad de agregar reactivos adicionales a la extracción (Naveena, Armshaw, & Pembroke, 2015).

1.4.1. LOS ULTRASONIDOS DE POTENCIA

La energía acústica es uno de los tipos fundamentales de energía que pueden encontrarse en la naturaleza. Las ondas que la componen son oscilaciones mecánicas en el tiempo y en el espacio que, a diferencia de las ondas electromagnéticas, necesitan de un medio material para su propagación (Juan A. Cárcel, 2003).

A su vez, los ultrasonidos pueden clasificarse según sus aplicaciones industriales, a partir de su frecuencia e intensidad. Por una parte, se distinguen los ultrasonidos de señal, de baja potencia o de baja intensidad. Éstos se caracterizan por presentar frecuencias comprendidas entre 500 kHz y 10 MHz, e intensidades inferiores a 1 W/cm². Dado que la energía transmitida

al medio por este tipo de ultrasonidos es débil, su aplicación no induce cambios en el sistema. De ahí, su uso en el control de procesos y en el análisis no invasivo de materiales (Cárcel et al., 2012)

Por otra parte, se definen los ultrasonidos de potencia (US), también conocidos como de alta intensidad, cuyas frecuencias oscilan entre los 20 y 100 kHz y su intensidad es superior a 1 W/cm². 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 (Awad et al., 2012).

La intensificación del proceso de extracción mediante aplicación de ultrasonidos de potencia se ha atribuido a los fenómenos de cavitación, que consiste en la formación, crecimiento e implosión de nano/microburbujas de gas en el seno del líquido como consecuencia de las fluctuaciones de presión generadas por el paso de las ondas ultrasónicas (Shirsath et al., 2012). Cuando los ultrasonidos se propagan a través de un fluido, las moléculas oscilan alrededor de su posición de equilibrio, haciendo que las distancias intermoleculares se modifiquen continuamente siguiendo ciclos alternos de compresión y descompresión.

Durante La expansión puede crear burbujas o cavidades en un líquido, las cuales se forman, crecen y sufren un colapso implosivo. Las condiciones dentro de estas burbujas implosionantes pueden ser dramáticas, con temperaturas de 4500°C y presiones de hasta 100 MPa, que a su vez producen ondas de energía de cizallamiento muy alta y turbulencia en la zona de cavitación. La combinación de estos factores (presión, calor y turbulencia) se usa para acelerar la transferencia de masa en el proceso de extracción (Vardanega, et al, 2014).

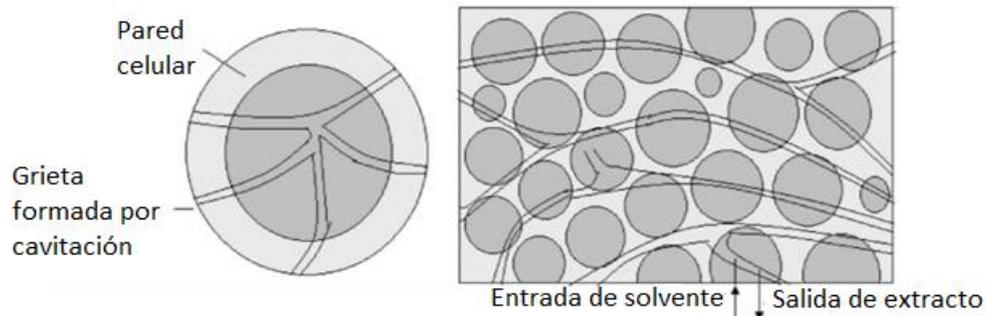


Figura 4. Mecanismo de cavitación y difusión del solvente (Shirsath et al., 2012).

El ultrasonido también ejerce un efecto mecánico. En los líquidos puros, la burbuja conserva su forma esférica durante el colapso, ya que su entorno es uniforme. Sin embargo, cuando la burbuja colapsa cerca de una superficie sólida, se produce asimétricamente y produce corrientes de solvente de alta velocidad hacia las paredes de la celda. Estas corrientes tienen un fuerte impacto en la superficie sólida, por lo tanto, aumentan la penetración del solvente en la celda y aumentan el área de superficie de contacto entre la fase sólida y la líquida (Rostagno et al., 2009).

Otro efecto causado por la onda ultrasónica sobre el material sólido es que puede facilitar el hinchamiento y la hidratación y, por lo tanto, causar una ampliación en los poros de la pared

celular. Esto mejorará el proceso de difusión y, por lo tanto, mejorará la transferencia de masa (Chemat, et al, 2011).

Dado que el fenómeno de la cavitación es el principal responsable por la intensificación del proceso de extracción, los parámetros que afectan a la cavitación también afectan el proceso de extracción realizado bajo efectos de ultrasonido. Además de los parámetros intrínsecamente relacionados con los dispositivos ultrasónicos (como la frecuencia, la longitud de onda y la amplitud de la onda), la potencia ultrasónica y, en consecuencia, la intensidad también tienen un efecto sobre la extracción (Patist & Bates, 2008).

En general, los mayores efectos sonoquímicos se observan a temperaturas más bajas, cuando la mayoría del contenido de la burbuja está en el gas (Vardanega et al., 2014).

1.4.2. USO DE ULTRASONIDOS DE POTENCIA EN LA EXTRACCIÓN DE BIOCMPUESTOS

Los ultrasonidos de potencia se caracterizan por una amplia y potencial aplicabilidad en la industria alimentaria. De entre sus principales aplicaciones destaca su uso en procesos industriales de extracción, emulsificación, cristalización, esterilización, secado, tenderización y marinado de carne (Alarcon-Rojo et al., 2015; Mason et al., 2015).

En el área de la extracción de compuestos bioactivos, destaca la actividad de la empresa italiana Giotti que durante más de 20 años ha utilizado procesos asistidos acústicamente para la producción de bebidas alcohólicas, alimentos y aditivos nutracéuticos; afirmando que la extracción asistida acústicamente es rápida, limpia y eficiente (Mason et al., 2015).

Según Mason (2011) los ultrasonidos de potencia incrementan la eficacia del proceso de extracción mediante cuatro mecanismos interconectados:

- Rotura de las paredes celulares: como consecuencia de la formación de microinyecciones por la implosión de las burbujas de cavitación, aumentando la permeabilidad del tejido vegetal. Este efecto también reduce el tamaño de partícula y aumenta la superficie sólida en contacto con el disolvente de extracción.
- Incremento de la solubilidad de los analitos: provocada por un incremento de la temperatura por la energía liberada en la implosión.
- Mejora de la penetración del disolvente en la matriz del soluto: como consecuencia del aumento localizado de presión que genera poros en la pared celular, promoviendo la introducción del solvente en la célula.
- Mejora de la transferencia de materia: debido a que los ultrasonidos provocan microcorrientes que favorecen la continua renovación de la capa límite en contacto con la superficie sólida.

Recientemente, se han llevado a cabo diversos estudios sobre la extracción acústica de biocompuestos en tejidos vegetales, entre los cuales se pueden mencionar: lípidos

(Meullemiestre et al., 2016); polisacáridos (Minjares-Fuentes et al., 2014) y, compuestos antioxidantes, fenólicos (González-Centeno, 2013).

1.5. MODELIZACIÓN

La modelización matemática de procesos constituye una herramienta básica para nuevos sistemas de producción ya que permite estimar, controlar, predecir y optimizar el comportamiento de un proceso bajo diferentes condiciones de operación (Bon et al., 2007). Al mismo tiempo, la modelización puede contribuir a un mejor aprovechamiento de la energía, tiempo, materia prima y disolventes invertidos en el proceso (Radha Krishnan et al., 2013).

En el planteamiento matemático del modelo, una vez determinadas las variables que influyen en el proceso, deben establecerse las relaciones matemáticas existentes entre las mismas para definir las ecuaciones representativas. Estas relaciones matemáticas pueden ser de carácter fenomenológico o empírico. Los modelos fenomenológicos son aquéllos cuyo principio de formulación se basa en leyes físicas, siendo los derivados de la teoría de difusión, o segunda Ley de Fick, los más utilizados en procesos de extracción (Blasco et al., 2006). Por su parte, los modelos empíricos o no paramétricos son aquéllos que se formulan a partir de datos experimentales, que, en el caso de la extracción, deben ser representativos de la transferencia de materia que tiene lugar en cada momento (Garau, 2008).

En general, los modelos empíricos no interpretan el fenómeno físico, dado que su único objetivo es determinar las variables relevantes y describir las relaciones existentes entre las mismas. Sin embargo, resultan de gran utilidad para ciertas aplicaciones industriales o para simplificar el estudio de sistemas complejos, difícilmente formulables y/o solucionables mediante modelos fenomenológicos (Blasco et al., 2006). Tal es el caso de la extracción de compuestos bioactivos de materiales de origen natural, dada la heterogeneidad de las muestras y la complejidad del mecanismo de transferencia de materia debido al carácter multicomponente de las mismas.

A pesar de que los parámetros de los modelos empíricos carecen de significado físico, en la bibliografía, frecuentemente se establecen relaciones matemáticas entre estos parámetros y diferentes variables del proceso, como la temperatura del aire de secado, la velocidad del flujo de aire, el contenido en humedad inicial, etc (Onwude et al., 2016).

El modelo de Weibull representa la distribución de la resistencia a la rotura de los materiales y, posteriormente, describe el comportamiento de sistemas o eventos que tienen cierto grado de variabilidad. El modelo empírico está basado en una función probabilística utilizada para predecir el comportamiento de sistemas complejos variantes. Concretamente, en el campo de la tecnología de alimentos, el modelo de Weibull ha sido ampliamente utilizado para describir procesos degradativos, inactivación enzimática, crecimiento y supervivencia de microorganismos, digestión in vitro y/o degradación química de los atributos de un producto. No obstante, también se ha aplicado satisfactoriamente a cinéticas de secado-rehidratación y, más recientemente, de extracción (Eim et al., 2013; Sant'Anna et al., 2012). El modelo de Weibull se presenta en la ecuación 1.

$$\frac{C - C_{eq}}{C_0 - C_{eq}} = e^{\left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right]} = e^{-(kt)^\beta} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde C es la concentración, C_{eq} la concentración final y C_0 la concentración inicial del analito a extraer; el parámetro α está relacionado con la cinética del proceso, presentando una relación inversa con la constante de velocidad del mismo; en él quedan englobados los efectos de variables como temperatura o tamaño de partícula entre otros (Blasco et al., 2006).

En el modelo de Weibull (Ecuación 1), β es un parámetro de forma que representa un índice de comportamiento de la materia prima durante el proceso de extracción Sturzoiu et al., (2011). Cuando este parámetro es igual a 1, la extracción sigue una cinética de primer orden, con una velocidad de extracción constante. Sin embargo, cuando $\beta < 1$ la cinética de extracción adquiere forma convexa, presentando una velocidad que disminuye con el tiempo; y cuando $\beta > 1$, la curva presenta una forma cóncava y la velocidad de extracción aumenta progresivamente con el tiempo (Odriozola-Serrano et al., 2008). La concavidad y convexidad de las curvas de extracción serán tanto más acentuadas cuanto más se aleje de la unidad el valor de β .

La inclusión del parámetro de forma además del parámetro cinético α , es lo que confiere al modelo de Weibull flexibilidad y potencial para describir un gran número de procesos (González-Centeno, 2013).

En general, el parámetro α se interpreta como una constante de reacción cinética, que depende de la temperatura según una ecuación de tipo Arrhenius:

$$k = k_0 \cdot e^{\left[-\left(\frac{E_a}{R \cdot T}\right)\right]} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde E_a es la energía de activación, que se trata de la energía mínima necesaria para que se lleve a cabo una reacción, en este caso, que se produzca la extracción sólido-líquido; R es la constante de gases universal ($8.3145 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T la temperatura en grados Kelvin y k_0 el valor preexponencial. En la Tabla 3 se presentan diferentes estudios de extracción en los cuales se ha utilizado el modelo de Weibull.

Tabla 3. Revisión bibliográfica. Estudios de procesos de extracción en los cuales se ha modelizado mediante la ecuación de Weibull

Materia prima	Compuesto de interés	Bibliografía
Escaramujo	β -caroteno	Sturzoiu et al., (2011)
Hongos medicinales	Sólidos solubles	Cheung et al., (2012)
Orujo de uva	Antocianos	Sant'Anna et al., (2012)

Pepitas de quinoa	Saponinas	Quispe-Fuentes et al., (2013)
Zumo de tomate	Licopeno	Odriozola-Serrano et al., (2008)
Orujo de uva	Polifenoles	González-Centeno et al., (2015)

2. OBJETIVOS

Los residuos de la industria alimentaria tienen un elevado potencial al ser ricos en biocompuestos. Los subproductos de alcachofa son ricos en compuestos fenólicos, de los cuales cabe destacar el ácido clorogénico por sus múltiples aplicaciones.

El objetivo principal del presente trabajo consistió **en evaluar la aplicación de la energía acústica como tecnología para intensificar el proceso de extracción biocompuestos (polifenoles y ácido clorogénico) de subproductos de alcachofa y el efecto de la temperatura.**

Para la consecución de este objetivo general se plantearon como objetivos concretos:

- Evaluar el efecto de la potencia acústica y la temperatura en el rendimiento del proceso de extracción de polifenoles y ácido clorogénico.
- Determinar el efecto de la potencia acústica y de la temperatura en la matriz sólida de la alcachofa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA

La materia prima utilizada en este trabajo fueron alcachofas (*Cynara scolymus*) cultivadas en Palma de Mallorca (España) y adquiridas en mercados locales de la isla, que fueron seleccionadas en función del diámetro del tallo de las mismas (1.7-2.1 cm).

La alcachofa se dividió en tres fracciones: tallo, brácteas y corazón. Cada una de ellas se congeló a -80°C en un ultra-congelador (CVF 525/86 Ing. Climas, España), y posteriormente fueron sometidas a liofilización (LyoQuest, Telstar, España) a 0.3 mbar y -50°C , molturación (A10, Ika Werke, Alemania) y tamizado (FIT-0200, Filtra, España) hasta un tamaño de partícula menor de 0.5 mm. Finalmente, la muestra tamizada se envasó al vacío (EVT-10, Tecnotrip, España), en bolsas de poliamida/polietileno 20/70 con permeabilidad al O_2 $2.58 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, suministradas por Guerrero Coves SL (Valencia, España). Las mismas se conservaron a 4°C y fueron protegidas de la luz hasta su procesado.

Para los experimentos de extracción de biocompuestos se utilizó el tallo de la alcachofa, cortado en láminas de 0.5 mm de grosor.



Figura 5. Tallo de la alcahofa. Acondicionamiento realizado a la muestra

3.2. EQUIPO EXPERIMENTAL

3.2.1. EQUIPO DE EXTRACCIÓN MECÁNICA

El equipo experimental utilizado para llevar a cabo los tratamientos de extracción en medio líquido mediante agitación mecánica se muestra en la Figura 6. Consta de un agitador convencional (RZR 2021, Heidolph, Alemania) dotado con una hélice de cuatro álabes que describen un círculo de 50 mm de diámetro a una velocidad de giro de 100 rpm y un vaso encamisado con una capacidad de 250 ml conectado a un baño termostático (Thermomix 1441, Braun, Alemania) para el control de la temperatura. El agitador se situó en el eje central del vaso y en el centro del volumen de líquido.

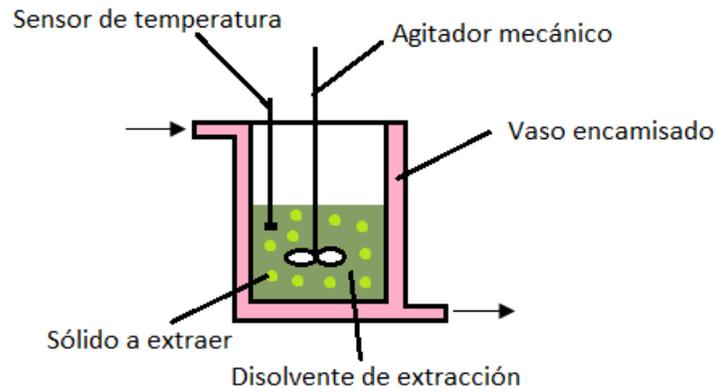


Figura 6.- Equipo experimental empleado para los experimentos de extracción mediante agitación mecánica (experimentos de control)

3.2.2. EQUIPO DE EXTRACCIÓN ACÚSTICA

El equipo experimental utilizado para llevar a cabo los tratamientos en medio líquido mediante extracción asistida acústicamente se muestra en un esquema en la Figura 7. Consta de un vaso encamisado de 250 ml conectado a un baño termostático de recirculación Selecta, Tectron Bio, España) para el control de la temperatura. La aplicación de los ultrasonidos de potencia se lleva a cabo mediante el uso de un generador ultrasónico UP400S (Hielscher Ultrasonics, Alemania) con una potencia de 400 W y una frecuencia ultrasónica de 24 KHz. Se utilizó un sonotrodo de titanio de 22 mm de diámetro y una longitud de 100 mm (Hielscher Ultrasonics, Alemania) (Figura 7).

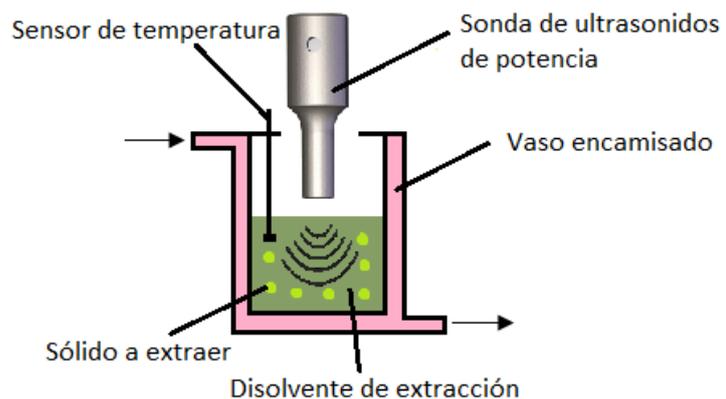


Figura 7. Equipo experimental y sonda empleados para los experimentos de extracción asistidos acústicamente

Con el objetivo de medir la potencia acústica (W) suministrada al fluido de inmersión se utilizaron técnicas calorimétricas. Este método consiste en la medida del incremento de temperatura durante los primeros 300 s de aplicación de los ultrasonidos (Arzeni et al., 2012). El cálculo de la densidad acústica se realizó empleando la Ecuación 3 (Yanjun et al., 2014), a partir de la curva de temperatura-tiempo determinada experimentalmente por triplicado.

$$P = mC_p \frac{dT}{dt}$$

Ecuación 3

Donde:

- P : Potencia acústica ($J s^{-1}$)
- C_p : Capacidad calorífica en $J kg^{-1} K^{-1}$ del solvente
- dT : Diferencial de temperatura ($^{\circ}C$)
- dt : Diferencial de tiempo (s)
- m : masa del disolvente (kg)

La determinación se llevó a cabo por triplicado.

3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado.

3.3.1. CONTENIDO EN HUMEDAD

La determinación experimental del contenido de humedad de la materia se llevó a cabo siguiendo el método oficial de la AOAC No. 934.06 (AOAC, 2006). Se pesaron aproximadamente 4.0 ± 0.3 g de muestra prima y se deshidrató en una estufa de vacío (Vaciotem-T, Selecta, España) a $80 \pm 2^{\circ}C$ hasta peso constante (aproximadamente 24 h). A partir de la variación de peso se calculó el valor del contenido de humedad y el resultado se expresó en g agua/ gss (b.s).

3.3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS

Para la determinación del contenido de polifenoles y de ácido clorogénico se prepararon extractos metanólicos. Se pesó 1.0 ± 0.1 g de muestra, se añadieron 40 mL de metanol y se homogenizó la mezcla con la ayuda de un Ultra-Turrax T25 Digital (Ika, Alemania) durante 60 s, a 12500 rpm, a $4^{\circ}C$ y protegido de la luz. En el caso de las muestras liofilizadas se añadió 40 mL de metanol. El homogeneizado se refrigeró durante 24 h. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min (ALC 4218, Thermo Scientific, Italia). El sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 4 y se almacenó a $4^{\circ}C$ en oscuridad hasta su análisis.

3.3.3. CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES

El contenido en polifenoles totales se determinó de acuerdo al método de cuantificación de fenoles Folin-Ciocalteu adaptado a microplacas de 96 pocillos descrito por Eim et al.,(2013), con algunas modificaciones.

Una alícuota de 10 μL de extracto metanólico se diluyó con 95 μL de agua destilada, se le adicionaron 5 μL del reactivo Folin-Ciocalteu y se incubó durante 5 min a 25°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 80 μL de Na_2CO_3 al 7.5%. Se leyó la absorbancia a 745 nm cada 5 min, durante 30 min usando un espectrofotómetro UV/Vis/NIR (Thermo Scientific Multiskan, Finlandia) empleando como blanco de reacción el disolvente de extracción (25 μL de metanol). El contenido de polifenoles totales se cuantificó usando una curva de calibración de ácido gálico (0.025-0.25 μM), expresándose el resultado como mg de ácido gálico (AG)/g ss.

Los diferentes ensayos se realizaron primeramente con extractos metanólicos para saber la cantidad total inicial de cada fracción de la alcachofa y posteriormente, con los extractos obtenidos de las cinéticas de extracción.

3.3.4. CONTENIDO EN ÁCIDO CLOROGÉNICO

El contenido en ácido clorogénico (AC) se determinó utilizando el método descrito por (Mingfu Wang et al., 2003).

La identificación y cuantificación del ácido clorogénico se realizó utilizando un sistema analítico HPLC Thermo-Finnigan Surveyor (Thermo Scientific, Francia) equipado con una bomba Waters 600E, un detector de matriz de fotodiodos Waters 2966 y un automuestreador Waters 717 plus controlado por software (Empower). Para ello, se inyectaron 10 μL de extracto en una columna Atlantis dC18 (3 μm ; 3,9 \times 150 mm) (Waters, Milford, EE. UU.).

Las fases móviles estaban formadas por $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ 0.2% (v/v, disolvente A) y CH_3CN (disolvente B). El sistema de elución binario utilizado se describe en la Tabla 4. El caudal se fijó a 1 mL/min y la temperatura a 25°C, la longitud de onda de detección por UV/vis a 330 nm.

Tabla 4. Condiciones de operación. Determinación de ácido clorogénico

Tiempo (min)	0	20	25
% Disolvente A	94	70	70
% Disolvente B	6	30	30

La identificación y cuantificación del pico principal se realizó a través de un calibrado con estándares externos. Los resultados se expresaron en mg AC/gss.

3.3.5. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La microestructura de tallo de alcachofa se observó de acuerdo con la metodología propuesta por Minjares-Fuentes et al. (2014). Las muestras obtenidas posteriormente a haberles realizado el proceso de extracción se liofilizaron, se fijaron en el soporte con adhesivos de carbón, y seguidamente se observaron directamente en el microscopio electrónico de barrido

(S-3400N, Hitachi, Japón) a resolución 5 μm , voltaje de aceleración de 10 kV, y presión de trabajo de 40 Pa. Las imágenes se adquirieron a 50x de aumentos.

3.3.6. ANÁLISIS DE IMAGEN

Se observaron las paredes celulares del tallo de alcachofa antes (fresca) y después de finalizado el proceso de extracción bajo diferentes condiciones mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se analizaron un mínimo de siete imágenes de cada muestra.

Las fotografías del microscopio electrónico de barrido se analizaron mediante el uso de una metodología de procesamiento de imagen automático, basada en el software Image J 2.0.0. (Creative commons license). Las imágenes en escala de grises se convirtieron en imágenes binarias (Figura 8) y se limpiaron con la función de filtro de despegado. Se analizan las células mediante la función 'analyze particles', de esta forma el programa selecciona un área de sección transversal de la imagen de SEM para la determinación de las mismas.

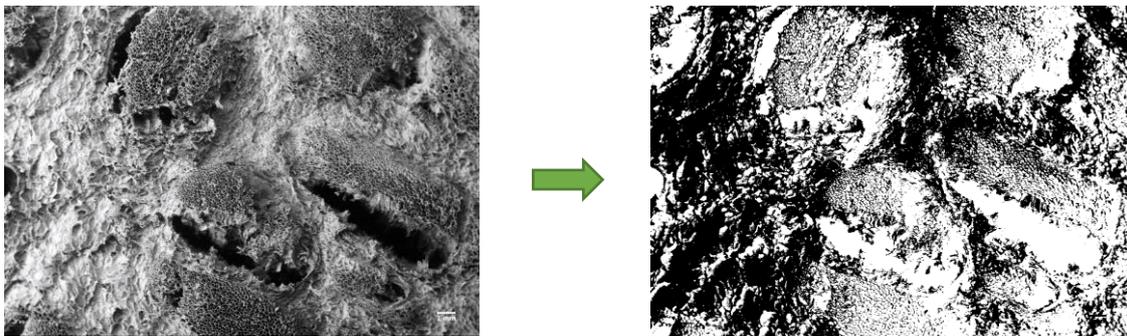


Figura 8. Conversión de las imágenes de SEM en imágenes binarias mediante Image J

El perfil percentil de las áreas celulares y el número de células por unidad de superficie de tejido de cada muestra se calculó utilizando la función "prctile" del software Matlab 2017b (Mathworks Inc., EE. UU.).

3.3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados experimentales se presentaron como la media \pm desviación estándar de las n mediciones realizadas. El estudio de la variabilidad de las muestras respecto a los diferentes parámetros analizados se llevó a cabo con ayuda del paquete estadístico R (versión 2.14.2, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

Se evaluó la normalidad y homocedasticidad de los datos para todas las variables en estudio, utilizando el test de *Shapiro-Wilk* y el test de *Levene*, respectivamente. Cuando la población siguió una distribución normal y presentó homogeneidad de varianzas, se utilizaron los tests paramétricos ANOVA y *Tukey* para evaluar, respectivamente, la existencia y grado de diferencias significativas. Dichos análisis estadísticos fueron substituidos por los correspondientes tests no paramétricos, *Kruskal-Wallis* y *pairwise-Wilcox* (con corrección BH),

cuando la población no seguía una distribución normal y/o presentaba heterogeneidad de varianzas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.4.1. CARACTERIZACIÓN

Con el fin de poder evaluar que parte de la materia prima presenta un mayor contenido en biocompuestos, se realizó la caracterización en biocompuestos de cada una de ellas. Para ello, a partir de la materia fresca, se determinó la humedad, se liofilizó y sobre la muestra liofilizada se determinó el contenido total de polifenoles y el contenido de ácido clorogénico.

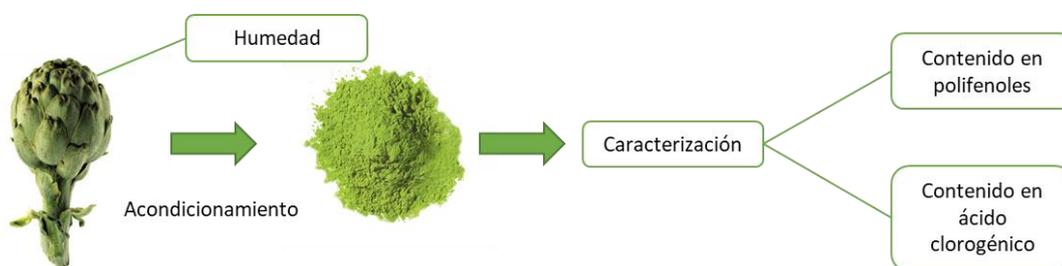


Figura 9. Procedimiento experimental empleado para la caracterización del contenido en polifenoles y ácido clorogénico de las fracciones de la alcachofa

3.4.2. DETERMINACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN

Se realizaron dos series de experimentos con el objetivo de obtener las cinéticas de extracción, en diferentes condiciones de temperatura (25, 40 y 60°C). La primera serie consistió en experiencias de extracción de biocompuestos (ácido clorogénico y polifenoles) mediante agitación mecánica (control) y la segunda serie consistió en la extracción mediante energía acústica.

Se analizó el contenido en polifenoles totales y el contenido en ácido clorogénico, con la finalidad de conocer el rendimiento del proceso de extracción en las diferentes condiciones. Estas determinaciones se llevaron a cabo en todos los extractos obtenidos desde 4 a 35 min de operación. Al finalizar la extracción, se observó la microestructura mediante SEM de la matriz sólida obtenida, y posteriormente se llevó a cabo un análisis de las imágenes obtenidas. En la Figura 10 se muestra un esquema del diseño experimental seguido en este trabajo final de máster.

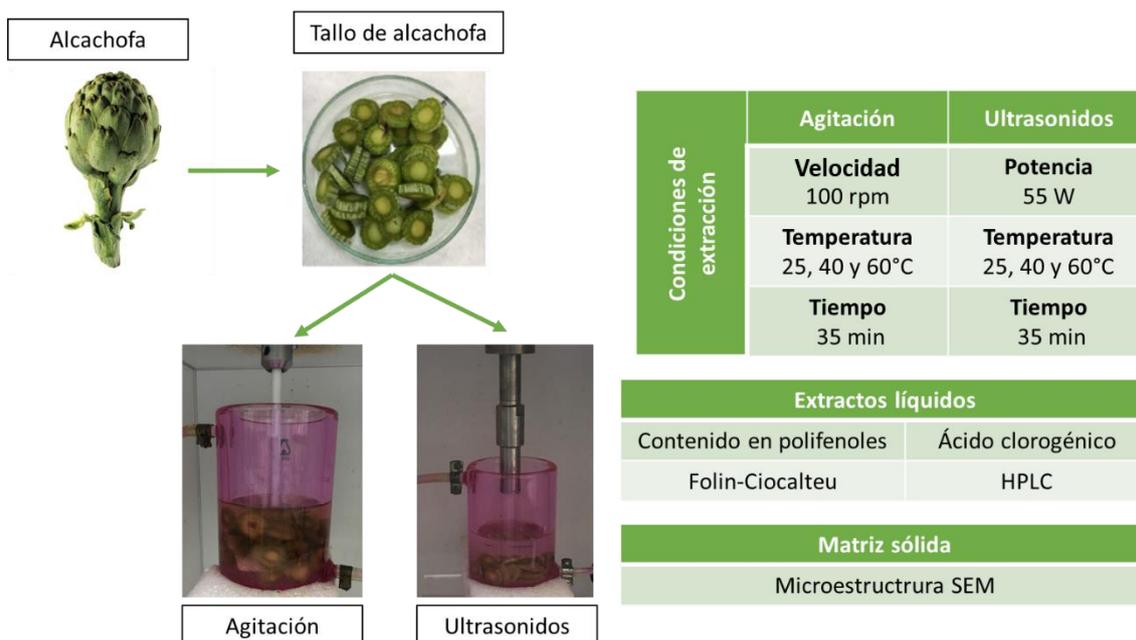


Figura 10. Diseño experimental. Estudio del efecto de temperatura sobre el proceso de extracción acústica de compuestos bioactivos del tallo de alcachofa

Se utilizaron láminas de tallo de alcachofa que fueron sometidas a experimentos asistidos acústicamente (US) haciendo uso del equipo de extracción detallado en el apartado 3.2.2. Como experimentos de control, las muestras fueron sometidas a procesos de extracción mediante agitación mecánica (apartado 3.2.1). En todos los casos se ha utilizado una relación de sólido/disolvente de 40/200 (w/v, g/ml). Como disolvente de extracción se utilizó una disolución de etanol-agua al 20% y la temperatura se fijó, según el experimento, a 25, 40, 60°C.

Los tiempos de extracción fueron de 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 y 35 min. Pasado el tiempo correspondiente, se extrajeron 2 mL de extracto mediante una jeringa, se filtraron con un filtro de Politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.45 μm y se conservaron a 4°C con el fin de determinar posteriormente el ácido clorogénico y el contenido en polifenoles.

La nomenclatura seguida en los experimentos de extracción se puede observar en la Tabla 5.

Tabla 5. Nomenclatura utilizada para los diferentes tratamientos realizados

Temperatura	Tratamiento		Nomenclatura
25°C	Agitación mecánica	100 rpm	AG25
	Ultrasonidos	54.5 W	US25
40°C	Agitación mecánica	100 rpm	AG40
	Ultrasonidos	54.5 W	US40

60°C	Agitación mecánica	100 rpm	AG60
	Ultrasonidos	54.5 W	US60

3.5. MODELIZACIÓN

Para la modelización de las cinéticas de extracción del contenido en compuestos fenólicos totales y de ácido clorogénico se utilizó el modelo de Weibull (Ecuación 1):

$$\frac{C - C_{eq}}{C_0 - C_{eq}} = e^{\left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right]} = e^{-(kt)^\beta} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde α , C_{eq} y β son los parámetros del modelo. En general, el parámetro α y su inversa, k , se interpretan como constantes de reacción cinética, dependientes de la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius:

$$k = k_0 \cdot e^{\left(\frac{-Ea}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 2}$$

Los valores iniciales de cada parámetro se obtuvieron aplicando la herramienta de identificación paramétrica SOLVER (método GRG2) incluida en la hoja de cálculo de Microsoft Excel 2010 al conjunto de datos obtenidos en cada cinética de extracción.

Se utilizó el error relativo medio (ERM) como función objetivo a minimizar. El error relativo medio (ERM) se calcula según la ecuación 4:

$$ERM = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|Y_{exp_i} - Y_{calc_i}|}{Y_{exp_i}} \quad \text{Ecuación 4}$$

siendo:

Y_{exp} : valores obtenidos experimentalmente (kg/kg ss)

Y_{calc} : valores correspondientes a la estimación (kg/kg ss)

N : el número total de puntos

Una vez obtenidos los valores iniciales, la identificación de los parámetros del modelo de Weibull se llevó a cabo utilizando la herramienta de optimización de Matlab 7.5 (The MathWorks Inc., Natick, EE. UU.) utilizando la función 'nlinfit'.

El error relativo medio se ha utilizado en la bibliografía para evaluar la calidad del ajuste para diversos modelos matemáticos (González-Centeno et al., 2015).

Para realizar una evaluación exhaustiva y objetiva de la bondad de los modelos se utilizan como criterios estadísticos el error relativo medio y el porcentaje de varianza. Está generalmente aceptado que los valores de ERM por debajo de la del 10% proporciona un buen ajuste (Mousa et al., 2014)

El porcentaje de varianza explicada por el modelo, se determina por comparación entre los resultados experimentales y aquellos proporcionados por el modelo, de acuerdo con la ecuación 5 (Vicente et al., 2012).

$$\%var = \left[1 - \frac{S_{yx}}{S_y} \right] \cdot 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

S_{yx} : desviación estándar de la muestra

S_y : desviación estándar de la correspondiente estimación

Los valores de las desviaciones se obtienen a partir de:

$$S_{yx} = \frac{\sum(Y_{calc} - Y_{exp})^2}{N_e - 2} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$S_y = \frac{\sum(Y_{calc} - \bar{Y}_{exp})^2}{N_e - 2} \quad \text{Ecuación 7}$$

Siendo:

Y_{exp} : valores obtenidos experimentalmente (kg/kg ss)

Y_{calc} : valores correspondientes a la estimación (kg/kg ss)

\bar{Y}_{exp} : media de los valores experimentales (kg/kg ss)

N_e : número de puntos que se comparan

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objeto de intensificar el proceso de extracción mediante la aplicación de ultrasonidos de potencia y evaluar el efecto de la temperatura, se estudió la cinética del proceso de extracción de biocompuestos de alcachofa utilizando el modelo de Weibull para llevar a cabo la simulación matemática.

A continuación, se presentan y discuten los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo final de máster.

En esta sección se presentan, en primer lugar, los resultados obtenidos relativos al estudio calorimétrico realizado para determinar la potencia acústica aplicada al sistema, posteriormente los resultados obtenidos en la caracterización físico-química de las diferentes fracciones de la alcachofa y seguidamente se presentan las cinéticas de extracción, analizando los efectos de la temperatura y de la aplicación de ultrasonidos. Finalmente se detalla la composición de los extractos obtenidos y la microestructura de la matriz sólida.

4.1. POTENCIA ACÚSTICA APLICADA. CARACTERIZACIÓN DE LA SONDA DE ULTRASONIDOS.

La potencia acústica generada por la sonda de ultrasonidos se determinó mediante técnicas calorimétricas (apartado 3.2.2). En la Tabla 6 se detalla la densidad acústica obtenida.

Tabla 6. Densidad acústica aplicada al sistema de extracción

Sonda (diámetro mm)	Densidad acústica (W/L)
22	273±35

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE BIOCMPUESTOS DE LAS FRACCIONES DE LA ALCACHOFA

La humedad de las diferentes fracciones fue de 82.6±2.4, 87.1±1.4, 84.5±1.8 g agua/ gss para el corazón, el tallo y las brácteas respectivamente.

Se puede observar como los valores obtenidos correspondientes a las diferentes fracciones, no difieren significativamente, obteniendo valores del mismo orden. Además, dichos valores son similares a la bibliografía (Zurro, 2014), el cual obtuvo un valor promedio de 83.4±1.9 g agua/ gss.

Se ha llevado a cabo la caracterización de cada una de las fracciones de la alcachofa, con el fin de poder evaluar su contenido en biocompuestos. En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos relativos al contenido total en polifenoles y en ácido clorogénico.

Tabla 7.- Características físico-químicas de las diferentes fracciones de la alcachofa.

	Corazón	Tallo	Brácteas
Contenido total en polifenoles (mg AcG/gss)	96.5±1.0 a	93.9±3.2 a	74.9±4.4 b
Contenido total en ácido clorogénico (mg AC/gss)	24.2±1.1 a	22.5±1.0 a	5.8±1.3 b

* Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas $p < 0.05$

En cuanto al contenido total en polifenoles, presentó valores significativamente ($p < 0.05$) superiores en el contenido del corazón y del tallo respecto al contenido de las brácteas. El corazón presenta los mayores contenidos en este compuesto, reduciéndose su valor en un 22% y un 3% en las brácteas y en el tallo respectivamente.

Los resultados obtenidos en este estudio difieren de los encontrados en la bibliografía, siendo los experimentales mayores que los bibliográficos. El contenido en polifenoles totales publicado para el corazón es de 88.9 ± 2.3 mg AcG/gss (Rouphael et al., 2017), 48.9 ± 9.9 mg AcG/gss para las brácteas (Negro et al., 2012) y 56.5 ± 0.5 mg AcG/gss para el tallo (Georgieva et al., 2016).

Negro et al., (2012) estudiaron el efecto del genotipo en el contenido en polifenoles de la alcachofa, observando variaciones de 15.7 a 66.7 mg AcG/gss utilizando el corazón como materia prima. Grassmann et al., (2007) estudiaron el efecto del tipo de cultivo en el contenido en polifenoles de la zanahoria, observando una diferencia del 43% entre la cultivada de manera convencional y la cultivada usando estiércol orgánico de origen animal. Søltoft et al., (2010) realizaron el estudio de la variación del contenido en polifenoles de patatas según la añada y la zona de cultivo, según el año en que se ha cultivado, se observó una diferencia de un 24% y hasta un 90% según la zona de cultivo.

Por lo tanto, los polifenoles son unos biocompuestos sensibles a diversos factores, tanto naturales como humanos, que pueden justificar las diferencias entre los valores bibliográficos y los experimentales obtenidos en el presente trabajo final de máster.

El contenido en ácido clorogénico presentó valores significativamente ($p < 0.05$) superiores en el contenido del corazón y del tallo respecto al contenido de las brácteas. El corazón presenta los mayores contenidos en este compuesto, reduciéndose su valor en un 76% y un 7% en las brácteas y en el tallo respectivamente.

Los resultados obtenidos difieren de los obtenidos por otros autores, siendo los valores experimentales obtenidos en este trabajo mayores que los bibliográficos, en cambio, la tendencia seguida es la misma, es decir, el que posee mayor contenido es el corazón y la fracción de menor contenido son las brácteas.

El contenido en ácido clorogénico publicado para la fracción correspondiente al corazón por Lattanzio et al., (2009) es de 15.4 mg AC/gss, en el caso de las brácteas es de 6.9 ± 0.9 mg AC/gss (Saleh et al., 2016), y en el tallo de 8.86 ± 0.04 mg AC/gss. (Maietta et al., 2017).

Fritsche et al., (2002) estudiaron la extracción de los compuestos minoritarios de las hojas de la alcachofa, observando una diferencia de 0.79 a 18.34 mg AC/g de extracto según el país de procedencia de la alcachofa.

Por lo tanto, el ácido clorogénico es un biocompuesto sensible a diversos factores, tanto naturales como humanos, que pueden justificar las diferencias entre los valores bibliográficos y los experimentales obtenidos en el presente trabajo final de máster.

4.2.1. CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN

Se ha llevado a cabo el seguimiento de las curvas de extracción de polifenoles y ácido clorogénico del tallo de la alcachofa. El proceso se ha llevado a cabo a una temperatura de 25 ± 1 , 40 ± 2 y 60 ± 4 °C mediante el uso de ultrasonidos para intensificar el proceso. Asimismo, se han realizado experimentos de control a las mismas temperaturas utilizando agitación mecánica.

CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11. En ella puede observarse como la influencia de la temperatura sobre el rendimiento de extracción es importante tanto en los experimentos asistidos acústicamente (US) como en los realizados con agitación mecánica (AG).

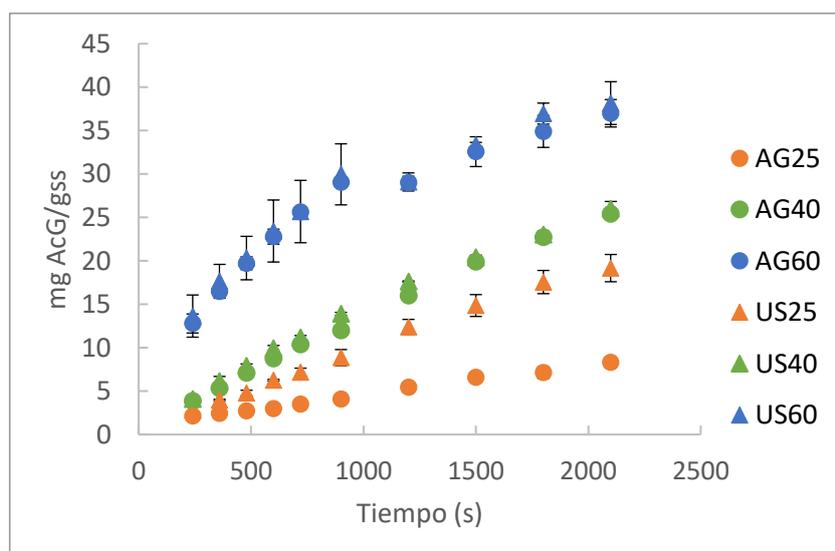


Figura 11. Cinética de extracción de polifenoles totales del tallo de la alcachofa. Experimentos con asistencia acústica (US) y con agitación mecánica (AG). T = 25, 40 y 60 °C.

En la Figura 11 se observó la existencia de un evidente efecto de la temperatura de extracción sobre las cinéticas de extracción de polifenoles, obteniéndose rendimientos más elevados a medida que la temperatura aumenta, tanto en los experimentos realizados con agitación mecánica (control) como en los experimentos realizados con ultrasonidos.

A manera de ejemplo, para un tiempo de extracción de 1500 s, a 25°C, mediante los experimentos de control, se extrajo 6.58 mg AcG/gss, a 40°C un 302% más y a 60°C un 487%. El valor máximo extraído fue de 8.3 mg AcG/gss a 25°C, 25.4 mg AcG/gss a 40°C y 36.2 mg AcG/gss a 60°C. Estos valores suponen el 9%, 27% y 39%, respectivamente, del contenido en polifenoles inicial del tallo.

En el caso del uso de energía acústica, para un tiempo de extracción de 1500 s, se extrajo 14.9 mg AcG/gss, a 40°C un 145% más y a 60°C un 225%. El valor máximo extraído fue de 19.2 mg AcG/gss a 25°C, 26.0 mg AcG/gss a 40°C y 39.6 mg AcG/gss a 60°C. Estos valores suponen el 20%, 28% y 42%, respectivamente, del contenido en polifenoles inicial del tallo.

En diversos estudios donde se llevó a cabo la extracción de polifenoles por métodos convencionales, se observó un efecto de la temperatura que coincide con el observado en este trabajo. Spigno (2006) realizó la extracción con etanol absoluto, de los polifenoles de orujo de uva mediante agitación a 45 y 60°C, pudiendo observar un aumento en el rendimiento de extracción al trabajar a 60°C, del 34%. Este incremento es similar al observado en el presente trabajo de final de máster, (28% al aumentar la temperatura de 40 a 60°C).

Bucic´ et al., (2006) realizó la extracción mediante agitación de los polifenoles de semillas de uva, con etanol 50% y a 25, 50 y 80°C. Estos autores observaron un incremento del 33% al aumentar la temperatura de 25°C a 80°C.

Si se comparan los resultados de los experimentos acústicos con los experimentos control a igualdad de temperatura, se puede observar que a 40 y 60°C no se aprecia efecto de las ondas ultrasónicas; es decir los ultrasonidos ejercen únicamente un efecto de agitación del medio similar al obtenido mediante agitación mecánica.

Khan et al., (2010), extrajeron polifenoles de piel de naranja mediante la aplicación de ultrasonidos de potencia (150W). Utilizaron etanol 80% y 40°C, y un experimento de control mediante agitación mecánica. Estos autores concluyeron que la aplicación de energía acústica daba lugar a mayores rendimientos, ya que se extraía un 31% más que mediante agitación mecánica. En el caso del presente trabajo, la extracción de polifenoles del tallo de alcachofa a 40°C y a 60°C no presentó diferencias significativas entre la extracción realizada con agitación mecánica y acústica.

González-Centeno et al., (2015), extrajeron polifenoles de orujo de uva mediante la aplicación de ultrasonidos de 55kHz de potencia, en agua y a 20°C, 35°C y 50°C. Estos autores observaron un aumento en el rendimiento de extracción a temperaturas de 50°C respecto a 20°C del 149%. En el presente trabajo se pudo observar una tendencia similar (225% la incrementar la temperatura de 25 a 60°C).

En la Figura 11 se observó el incremento del rendimiento de la extracción con la aplicación de energía acústica frente a la agitación mecánica, ya que a 25°C aumenta un 212%, a 40°C aumenta un 102% y a 60°C aumenta un 109%. Como se ha comentado en el apartado 1.2.2, la cavitación se ve favorecida a temperaturas más bajas, lo que puede explicar que el mayor incremento se haya dado a 25°C (Vardanega et al., 2014)

Kong et al., (2015) realizaron la extracción de polisacáridos de la piel de la guayaba mediante extracción acústica (240W), utilizando agua como solvente y en un rango de temperaturas de 20 a 60°C. Se observó que el rendimiento de la extracción aumentó a medida que la temperatura aumentaba de 20°C a 40°C; sin embargo, cuando la temperatura excedió los 40°C, el rendimiento de polisacárido exhibió una disminución lineal. Similares resultados obtuvieron Ma et al., (2008) en la extracción de hesperidina de la piel de la mandarina mediante extracción acústica (30W), utilizando metanol como solvente observaron que el rendimiento aumentó a medida que la temperatura aumentaba de 30°C a 40°C; sin embargo, cuando la temperatura superó los 40°C, el rendimiento disminuyó.

De acuerdo con la literatura, Cho et al., (2006) observó que sólo 1 minuto de extracción acústica de 47 kHz de potencia, con etanol 80% y a temperatura ambiente condujo a la recuperación de las mismas cantidades de resveratrol de tallos de uva que 30 minutos de extracción convencional (con agitación mecánica, sin condiciones especificadas) a 60°C.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo final de master con estudios anteriores realizados sobre la extracción de polifenoles por métodos convencionales, a partir de subproductos de alcachofa, se observó que el valor máximo obtenido por Georgieva (2016) fue de 41 mg AcG/gss (agitación a 160 rpm, con etanol 20% y a 70°C).

ÁCIDO CLOROGÉNICO

Los resultados obtenidos en los experimentos de extracción de ácido clorogénico se muestran en la Figura 12; en la misma puede observarse como, en el intervalo de temperaturas estudiado, la influencia de la temperatura sobre el rendimiento de extracción fue importante.

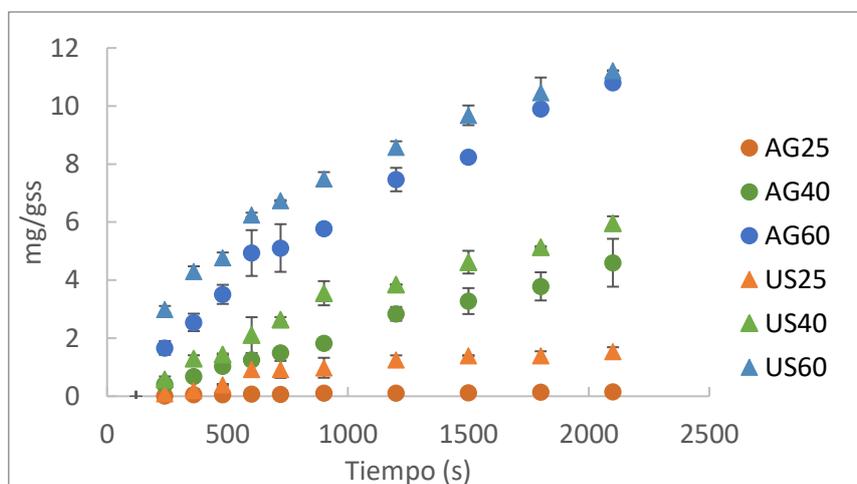


Figura 12. Cinéticas de extracción del ácido clorogénico en el tallo de la alcachofa

En la Figura 12 se presentan las cinéticas de extracción de ácido clorogénico, obteniéndose rendimientos más elevados a medida que la temperatura aumenta, tanto en los experimentos de control como en los realizados con asistencia acústica.

A modo de ejemplo para los experimentos control, para un tiempo de extracción de 1500 s, a 25°C se extrajo 0.12 mg AC/g ss, a 40°C un 2688% más y a 60°C un 6777%. El valor máximo extraído fue de 0.15 mg AC/gss a 25°C, 4.6 mg AC/gss a 40°C y 10.8 mg AC/gss a 60°C. Estos valores suponen el 0.6%, 20% y 48%, respectivamente, del contenido en de ácido clorogénico inicial del tallo.

En el caso de los experimentos acústicos, para un tiempo de extracción de 1500 s, se extrajo 1.5 mg AC/gss, a 40°C un 300% más y a 60°C un 629%. El valor máximo extraído fue de 1.5 mg AC/gss a 25°C, 5.8 mg AC/gss a 40°C y 11.2 mg AC/gss a 60°C. Estos valores suponen el 7%, 26% y 49%, respectivamente, del contenido de ácido clorogénico inicial del tallo.

En diversos estudios donde se estudió la extracción de ácido clorogénico por métodos convencionales, se observó un efecto de la temperatura que coincide con el observado en este trabajo. Zhang et al., (2008) en su estudio sobre la extracción de ácido clorogénico de flores secas de madreselva (*Lonicera japonica*), mediante baño de agua caliente con agitación y utilizando etanol como solvente, a 40, 60°C y 80°C, observaron un aumento en el rendimiento de extracción de un 106% a 60°C, aunque no se apreciaron diferencias significativas con la realizada a 80°C debido a la posible degradación del compuesto.

Dibert et al., (1989) realizó la extracción de ácido clorogénico de granos de café verde, con metanol al 70% y mediante agitación, a 30, 40 y 50°C, observando un aumento en el rendimiento de extracción a 50°C, respecto al experimento a 30°C del 110%. En el caso del tallo de alcachofa, se observó un aumento del 7267% al incrementarse la temperatura de 25 a 60°C.

Por otro lado, cabe destacar que, a igualdad de temperatura, los rendimientos obtenidos en los experimentos asistidos acústicamente fueron superiores a los obtenidos mediante agitación. Li et al., (2004) que estudiaron la extracción de ácido clorogénico de las hojas de *Eucommia ulmodies* con metanol en un baño de ultrasonidos durante 30 min, concluyeron que la aplicación de energía acústica incrementaba el rendimiento un 15%. Liu et al., (2010) estudiaron la extracción de ácido clorogénico de las hojas de *Folium eucommiae* mediante agua y un baño de ultrasonidos, y llegaron a la conclusión de que a medida que aumentaba la temperatura con la aplicación de ultrasonidos, se observaba un aumento en el rendimiento de la extracción, ya que a 50°C se produjo un aumento de 235% frente a 20°C. En el estudio realizado para el trabajo de fin de máster, se observó un aumento del 733% de 25 a 60°C mediante la aplicación de energía acústica.

En la Figura 12 se puede observar el incremento del rendimiento de la extracción con la aplicación de energía acústica frente a la aplicación de energía mecánica, ya que a 25°C aumenta un 833%, a 40°C aumenta un 127% y a 60°C aumenta un 101%. Por lo tanto, el mayor incremento también se observa a la menor temperatura, 25°C.

4.2.2. MODELIZACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN

Con el fin de describir matemáticamente la transferencia de materia que tiene lugar durante el proceso de extracción se utilizó el modelo de Weibull. A partir de la Ecuación 1 y mediante los datos experimentales de rendimiento obtenidos a través de las experiencias realizadas a 25, 40 y 60°C, tanto con agitación mecánica como con aplicación de ultrasonidos, se identificaron, los parámetros α , β y C_{eq} del modelo, considerando concentración cero para tiempo inicial. En la Tabla 8 se pueden observar los valores obtenidos para cada parámetro.

Tabla 8. Parámetros del modelo de Weibull, obtenidos con Excel

Tratamiento	Variable	POLIFENOLES			ÁCIDO CLOROGÉNICO		
		Temperatura			Temperatura		
		25°C	40°C	60°C	25°C	40°C	60°C
AG	α (s)	8813.9	4473.1	1001.2	7736.9	4500.0	2656.1
	β	0.80	0.99	0.75	0.88	0.99	0.99
	C_{eq} (mg /gss)	29.2	67.9	45.1	0.6	9.9	20.1
US	α (s)	3671.5	2293.9	1208.6	7053.1	3422.4	1150.0
	β	0.98	1.00	0.78	0.78	1.00	0.90
	C_{eq} (mg /gss)	39.87	42.31	47.11	3.85	13.00	13.90

Una vez que se identificaron los tres parámetros para cada experimento, se confirmó que α seguía una relación de tipo Arrhenius (Ecuación 2) con la temperatura de extracción. También se observó que, tanto en experimentos convencionales como acústicos, el rendimiento de extracción en el equilibrio (C_{eq}) varió linealmente con la temperatura de operación. Para ilustrar este efecto, la ecuación propuesta fue la siguiente, considerando C_{e0} y C_{e1} como constantes:

$$C_{eq} = C_{e0} + C_{e1} \cdot T \quad \text{Ecuación 9}$$

De esta manera, a partir de los resultados experimentales obtenidos a las diferentes temperaturas, se identificaron simultáneamente 5 parámetros (k_0 , E_a , β , C_{e0} y C_{e1}) utilizando las funciones de Matlab descritas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9, junto con los intervalos de confianza correspondientes y el error estándar asociado con cada parámetro estimado.

Tabla 9. Los parámetros identificados del modelo Weibull.

Tratamiento	Variable	POLIFENOLES	ÁCIDO CLOGÉNICO
		Valor	Valor
AG	k_0 (s^{-1})	1.0E12	264.7
	E_a (kJ/mol)	95.9	33.8
	C_{e0} (mg/gss)	11.6	-27.3
	β	0.502	0.939
	C_{e1} (mg/gss)	0.11	0.21
US	k_0 (s^{-1})	19.79	0.0068
	E_a (kJ/mol)	27.9	4.2
	C_{e0} (mg/gss)	-23.90	-70.89
	β	1.003	1.706
	C_{e1} (mg/gss)	0.194	0.242

En los experimentos de extracción convencional, los valores de α variaron, para temperaturas entre 25 y 60°C, de 8813.9 a 1001.2 s para la extracción de compuestos fenólicos totales; y de 7736.9 a 2656.1 s para el ácido clorogénico. Por otro lado, en las extracciones asistidas por ultrasonidos, los valores variaron entre 3671.45 y 1208.60 s para el contenido de compuestos fenólicos totales y 7053.0 a 1150.0 s para el contenido en ácido clorogénico.

El parámetro α disminuyó con el aumento de la temperatura de operación independientemente del tipo de extracción y el atributo de calidad considerado, como se observó previamente en la modelización, utilizando el modelo Weibull, del proceso de extracción de saponinas de semillas de quinoa (extracción acuosa y agitación a 20, 30, 40, 50 y 60°C) por Quispe-Fuentes et al., (2013) y β -caroteno de rosa mosqueta por Sturzoio et al., (2011); mediante extracción con éter de petróleo y agitación a 25, 35, 45 y 55°C.

Este comportamiento del parámetro α puede justificarse en base a que está relacionado con la inversa de la constante de velocidad de extracción, que es directamente proporcional a la temperatura. De acuerdo con los resultados experimentales, tanto los experimentos de extracción realizados con agitación como con aplicación con energía acústica presentaron velocidades de extracción superiores. Este incremento en la velocidad de extracción con la temperatura está de acuerdo con los artículos de Bucić-Kojić et al., (2006) para la extracción fenólica convencional de semillas de uva dentro de un rango de temperatura de 20 a 80°C y González-Centeno et al., (2015) para la extracción de polifenoles en orujo de uva entre 25 y 50°C. Sin embargo, es importante señalar que la temperatura solo tiene un efecto positivo cuando no es demasiado elevada (inferior a 60°C (Spigno & De Faveri, 2007)), ya que la mayoría de los compuestos bioactivos son susceptibles de degradación a temperaturas más altas, lo que reduce el rendimiento de extracción.

El parámetro α puede ser considerado como una constante cinética dependiente de la temperatura según la ecuación de Arrhenius (Ecuación 2). De esta manera, se permite la estimación de la energía de activación (E_a) para los procesos de extracción, que puede

describirse como la barrera de energía que los compuestos bioactivos deben alcanzar para poder ser eliminados de la matriz sólida.

La E_a estimada para el proceso de extracción mediante agitación y asistencia acústica de polifenoles fue de 95.9 y 27.9 kJ/mol, respectivamente y de 33.8 kJ/mol y 4.25 kJ/mol para el contenido en ácido clorogénico, respectivamente. La aplicación de ultrasonidos redujo significativamente la E_a del proceso de extracción de los compuestos fenólicos totales y de la extracción de ácido clorogénico.

De acuerdo con la bibliografía, si la velocidad viene controlada por una reacción de solubilización, la E_a es superior a 40 kJ/mol, si la velocidad es controlada por un proceso de difusión, la E_a es inferior a 20 kJ/mol, y si el valor de E_a se encuentra entre 40 kJ/mol y 20 kJ/mol se espera un régimen de transferencia mixto (Wang et al., 2002). Según esta clasificación, los valores de E_a estimados sugieren que la extracción de polifenoles mediante agitación mecánica se ve controlada por una reacción de solubilización; la misma extracción, pero realizada mediante extracción acústica se ve controlada tanto por un proceso de solubilización, como por difusión; y finalmente la extracción de ácido clorogénico, mediante agitación y ultrasonidos, es controlada por un proceso de difusión.

Los valores del parámetro E_a pueden depender de diferentes factores relacionados con el proceso de extracción, como la estructura de la matriz sólida, los biocompuestos de interés, el pretratamiento realizado sobre la muestra y el disolvente utilizado, entre otros (Sant'Anna et al., 2012).

Los valores experimentales obtenidos son similares a los descritos en la bibliografía; Cacace y Mazza (2003) propusieron valores de energía de activación de 97.1 kJ/mol para la extracción de polifenoles en bayas mediante agitación a 40°C. Khan et al., (2010) obtuvieron un valor de energía de activación de 6.34 kJ/mol para la extracción de polifenoles de la piel de naranja mediante (W) y de 34.21 kJ/mol para la extracción mediante agitación, pudiéndose observar una disminución de la misma cuando se realiza la extracción mediante ultrasonidos.

El parámetro β presentó un valor diferente según el proceso y el compuesto de interés, pero resultó ser independiente de la temperatura de extracción. En el caso del proceso de extracción de polifenoles mediante agitación (control), β presentó un valor de 0.502, es decir, la velocidad de extracción disminuyó con el tiempo. En cambio, para la extracción de polifenoles mediante extracción acústica, β presenta un valor de aproximadamente 1, lo que significa que la cinética es de primer orden, es decir que la velocidad de extracción es constante. Para el proceso de extracción de ácido clorogénico se observa un comportamiento similar, ya que para la extracción mecánica se obtiene un valor de 0.939 y de 1.706 para la extracción acústica; que este valor sea superior a la unidad significa que la velocidad de extracción aumenta progresivamente con el tiempo.

Como se ha podido observar, el valor de β aumentó al incrementarse la potencia acústica, por lo que se puede deducir que con la aplicación de energía acústica se obtienen cinéticas de extracción más rápidas.

Haciendo uso de los parámetros identificados mediante el modelo de Weibull, se simularon las curvas de extracción. En las Figuras 13, 14, 15 y 16 se puede observar una representación gráfica de los valores de rendimiento calculados (puntos) y experimentales (línea sólida) con su respectiva desviación estándar, para las experiencias control y las realizadas con asistencia acústica en la extracción de polifenoles y de ácido clorogénico. Puede observarse una buena concordancia entre los valores experimentales y los estimados mediante el modelo propuesto, excepto en la simulación del proceso de extracción de polifenoles con agitación a 40°C.

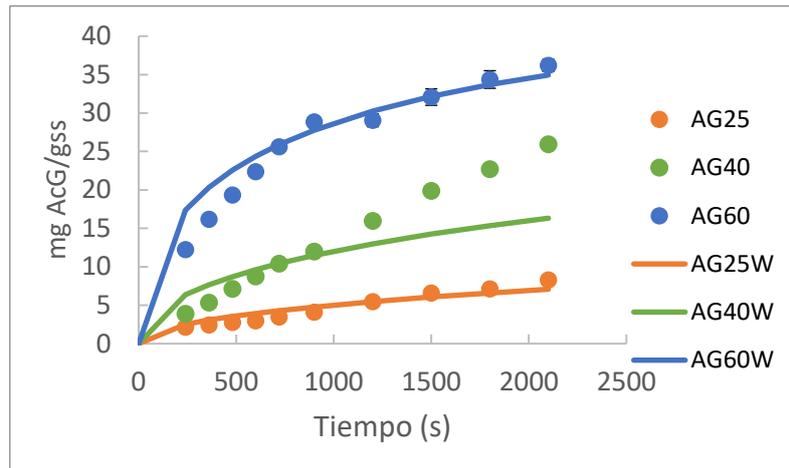


Figura 13. Simulación de las cinéticas de extracción de polifenoles. Experimentos realizados con agitación mecánica. $T = 25, 40$ y 60°C .

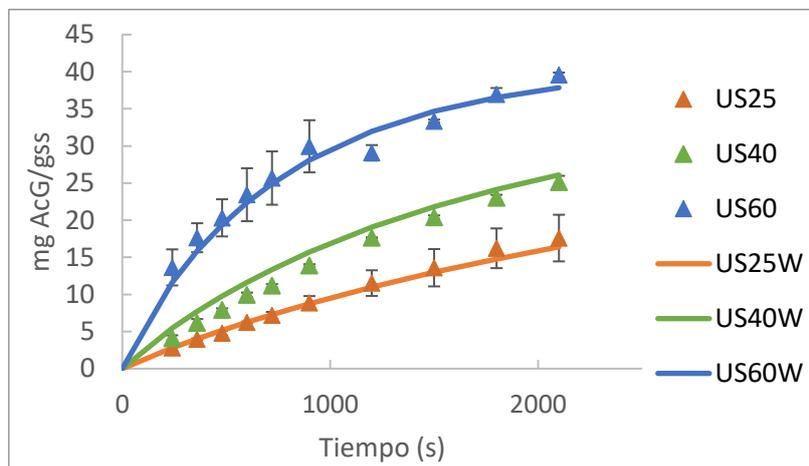


Figura 14. Simulación de las cinéticas de extracción de polifenoles. Experimentos realizados con ultrasonidos. $T = 25, 40$ y 60°C .

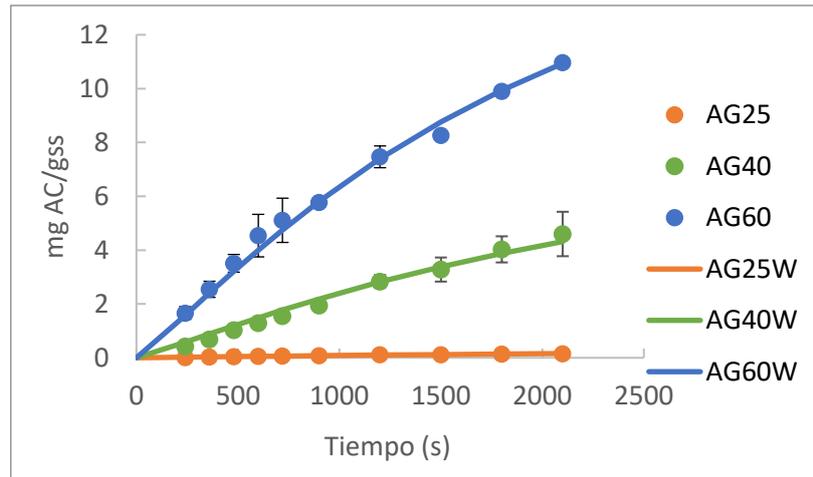


Figura 15. Simulación de las cinéticas de extracción de ácido clorogénico. Experimentos realizados con agitación mecánica. $T = 25, 40$ y 60°C .

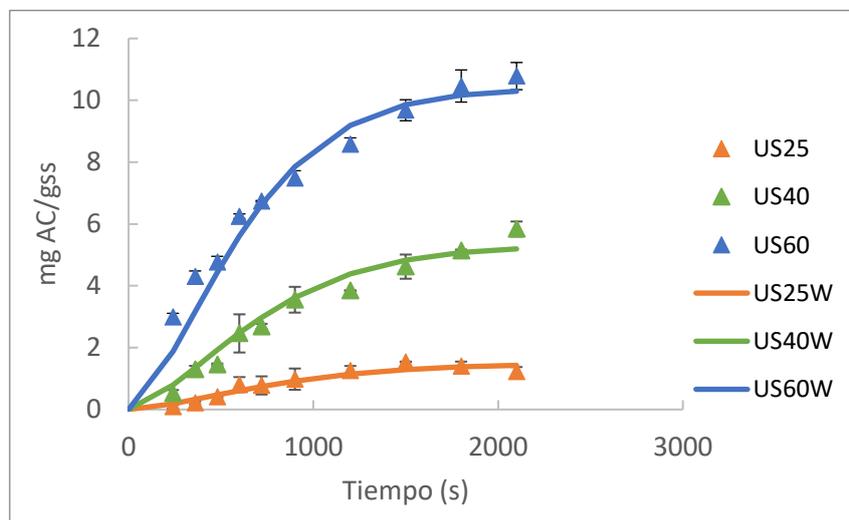


Figura 16. Simulación de las cinéticas de extracción de ácido clorogénico. Experimentos realizados con ultrasonidos. $T = 25, 40$ y 60°C .

A pesar de la variabilidad experimental, principalmente atribuible a la heterogeneidad de la materia prima, se obtuvo una elevada correlación entre ambos grupos de datos, experimentales y calculados.

Con el objeto de evaluar estadísticamente la precisión del modelo matemático propuesto y, por tanto, su capacidad para representar los resultados experimentales y predecir variaciones en el sistema, se estimaron el porcentaje de error relativo medio (ERM) (Ecuación 5) y el porcentaje de varianza explicada por el modelo (VAR) (Ecuación 6) para las diferentes condiciones de extracción. Cuanto menor es el ERM y más cercano a 100 el porcentaje de VAR, mejor es la bondad de la simulación proporcionada por el modelo (Baş & Boyacı, 2007) (Tabla 10).

Tabla 10. Error relativo medio (ERM) y varianza explicada (VAR) en la comparación entre los valores experimentales y simulados

		POLIFENOLES		ÁCIDO CLOROGÉNICO	
		ERM (%)	Var (%)	ERM (%)	Var (%)
AG	25°C	18	91	11	97.9
	40°C	26	68	14	98.3
	60°C	11	94	5	99.3
	Media	18±8	84±14	10±4	98.5±0.7
US	25°C	4	99	21	94.9
	40°C	16	96	13	96.6
	60°C	6	98	10	96.1
	Media	9±6	97±1	15±5	95.9±0.9

Tal y como puede observarse en la Tabla 10, los valores de ERM fueron en su mayoría $\leq 20\%$ y los porcentajes de VAR $\geq 94.6\%$, indicando la validez del modelo matemático propuesto. Atendiendo a los valores medios de ambos parámetros estadísticos, puede afirmarse que el modelo propuesto permitió simular satisfactoriamente la transferencia de materia que tuvo lugar durante el proceso de extracción, especialmente a la temperatura más alta.

4.2.3. ANÁLISIS DE IMAGEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de los ultrasonidos de potencia sobre la microestructura de la matriz sólida, se observaron las muestras por microscopía electrónica de barrido. Para ello se realizaron micrografías a un aumento de 50x de las matrices sólidas obtenidas en las diferentes condiciones estudiadas (Figura 17).

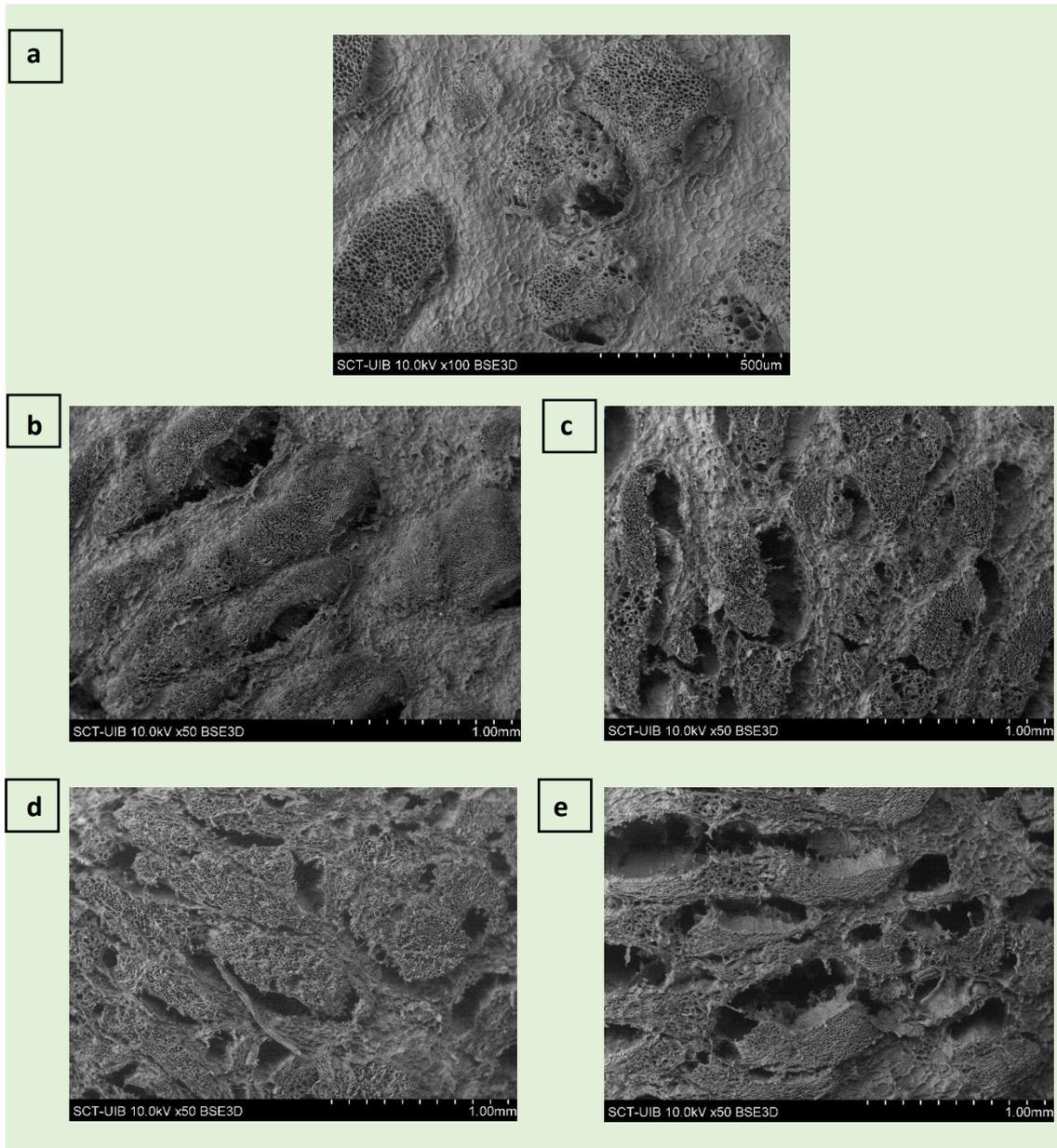


Figura 17. Microfotografías de las matrices sólidas tras la extracción: a-fresca, b-AG25°C, c-AG60°C, d-US25°C, e-US60°C.

Como se puede observar en la Figura 17, la alcachofa fresca presenta una superficie lisa con ligera presencia de grietas pequeñas. Después de la aplicación de agitación mecánica y una temperatura de 25°C aparecen grietas de mayor tamaño debido a la rotura de células vegetales, pero se sigue observando parte de la superficie lisa. Un aumento en la temperatura con el mismo proceso realiza el mismo efecto, pero en mayor grado ya que la fisura del tejido vegetal ya es considerable.

En cambio, la aplicación de agitación acústica tanto a 25°C como a 60°C produce una gran rugosidad en la superficie de la muestra. También se puede observar la rotura de los tejidos, que se incrementa con la temperatura. Las diferencias observadas en la microestructura de las muestras tratadas con energía mecánica o acústica son considerables, ya que, en este último caso, la superficie es más rugosa y las alteraciones de las paredes celulares son mayores.

En el estudio realizado por Minjares-Fuentes et al., (2016) sobre imágenes del SEM antes y después de la aplicación de ultrasonidos a orujo de uva, observó la transformación de la superficie. Antes de la aplicación de ultrasonidos, el orujo de uva poseía una superficie lisa, en cambio, después del tratamiento, la superficie presentaba una rugosidad significativa.

La Figura 18 representa el perfil percentil (representación del porcentaje de células cuya área es igual o menor al valor obtenido) para las imágenes de la alcachofa fresca y para la misma después de haberse realizado cada proceso en distintas condiciones.

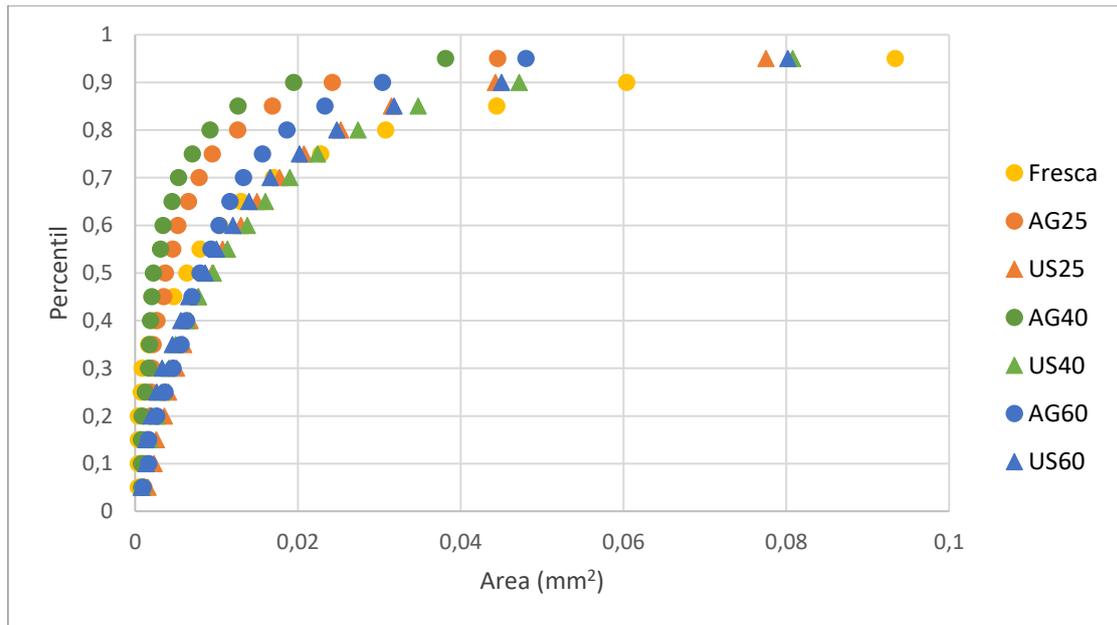


Figura 18. Perfiles percentiles del área celular de muestras de alcachofa fresca y de las mismas después de haber realizado los diferentes procesos.

En la Figura 18, se observan los diferentes perfiles percentiles para cada muestra.

Los perfiles percentiles de muestras fresca y las obtenidas después del proceso de agitación a 25 y 40°C fueron coincidentes hasta aproximadamente alcanzar el valor percentil de 0,4. A partir de ahí, se observan dos grupos de muestras, uno constituido por la muestra fresca, y el segundo, por las muestras procesadas, lo que indica que los procesos de extracción a baja temperatura causan cambios similares en la estructura celular. Desde un principio se puede observar como las muestras tratadas con ultrasonidos y con agitación a alta temperatura, se separan de las otras, lo cual nos indica que poseen menos células con áreas tan pequeñas, es decir que poseen más células de mayor tamaño, hecho que se puede observar mediante las fotos obtenidas por SEM. Los percentiles de las muestras tratadas con ultrasonidos coinciden en todo momento y se puede observar la diferencia con las muestras tratadas con agitación mecánica, las cuales presentan diferentes comportamientos.

En la muestra fresca, el porcentaje de área más grande fue más alto, por ejemplo, el 90% de las áreas eran más pequeñas que 0,06 mm² en muestras frescas y después del tratamiento con ultrasonidos o con agitación eran menores de 0,045mm².

Este resultado puede ser debido a que la aplicación de ultrasonidos produce el fenómeno de cavitación el cual crea unas burbujas que implosionan contra la superficie del tallo de alcachofa. Dichas burbujas, pueden ser las responsables de las roturas de los tejidos, debido a la fractura de las paredes celulares del lugar de impacto dando lugar a la unión de células y que por lo tanto haya un mayor percentil con células de mayor tamaño.

La presencia de células de mayor tamaño y las grietas observadas en las imágenes del SEM, crean un aumento en el área superficial lo que produce que la velocidad de transferencia de masa aumente sustancialmente y los compuestos puedan transferirse a mayor velocidad al disolvente, como consecuencia de la fragmentación celular. Este proceso mejora el rendimiento de la extracción de biocompuestos.

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluó la intensificación del proceso de extracción de biocompuestos (polifenoles y ácido clorogénico) de subproductos de alcachofa (*Cynara scolymus*), por aplicación de energía acústica. A partir de los resultados obtenidos se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- La aplicación de US de potencia, utilizando etanol 20% como medio de extracción, demostró ser eficaz en la ruptura de las paredes celulares de los subproductos de alcachofa facilitando la extracción de polifenoles y ácido clorogénico.
- La temperatura afectó significativamente los rendimientos de extracción, de tal manera que se obtuvieron rendimientos más elevados a 60°C, tanto en los procesos realizados con agitación mecánica como en los asistidos acústicamente.
- Los procesos de extracción asistidos acústicamente permiten obtener rendimientos más altos y cinéticas de extracción más rápidas.
- El incremento en los rendimientos de extracción, respecto al control, producido por la aplicación de la energía acústica, fueron significativamente más altos a 25°C que a 60°C por lo que se puede concluir que el efecto de la asistencia acústica se ve potenciado a temperaturas bajas.
- Mediante el modelo de Weibull fue posible simular satisfactoriamente las cinéticas de extracción. Los parámetros identificados para dicho modelo indicaron que el rendimiento máximo de extracción aumentó con la aplicación de energía acústica y el parámetro β aumentó significativamente con la aplicación de ultrasonidos.
- La aplicación de ultrasonidos permite disminuir la energía de activación de los procesos de extracción de polifenoles y ácido clorogénico.
- Las matrices sólidas obtenidas posteriormente a la aplicación de energía acústica presentaron una microestructura más agrietada que aquellos obtenidos mediante agitación, consecuencia de que la aplicación de ultrasonidos pudiera provocar cambios estructurales en la matriz.
- La aplicación de ultrasonidos provoca la rotura de las paredes celulares de los subproductos de alcachofa, aumentando de esta manera la superficie y la velocidad de transferencia de masa en la extracción

Por tanto, se puede concluir que en este trabajo se ha observado un importante efecto de la aplicación de energía acústica sobre las cinéticas de extracción polifenoles y ácido clorogénico, permitiendo rendimientos significativamente más altos. En cuanto a la temperatura, los ultrasonidos intensificaron el proceso de extracción, en mayor proporción, a temperaturas bajas.

6. NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidades
k	Constante cinética [2]	s ⁻¹
k ₀	Factor preexponencial [2]	s ⁻¹
E _a	Energía de activación [2]	J/mol
α	Parámetro cinético del modelo de Weibull [1]	s
β	Parámetro del modelo de Weibull [1]	
t	Tiempo	s
ERM	Error relativo medio	%
VAR	Porcentaje de varianza explicada	%
S _y	Desviación estándar (muestra)	
S _{yx}	Desviación estándar (modelo)	
C ₀	Contenido en humedad inicial	mg/gss
C _{eq}	Concentración en el equilibrio del modelo de Weibull [X2]	mg/gss
C _{e0}	Constante de la ecuación 9	mg/gss
C _{e1}	Constante de la ecuación 9	mg/gss K
T	Temperatura	K
R	Constante de los gases ideales	J/K mol
AcG	Ácido gálico	
AC	Ácido clorogénico	
AG25	Cinética experimental. Agitación mecánica a 25°C	
AG40	Cinética experimental. Agitación mecánica a 40°C	
AG60	Cinética experimental. Agitación mecánica a 60°C	
US25	Cinética experimental. Ultrasonidos de potencia a 25°C	
US40	Cinética experimental. Ultrasonidos de potencia a 40°C	
US60	Cinética experimental. Ultrasonidos de potencia a 60°C	
AG25W	Simulación del experimento con agitación mecánica a 25°C	
AG40W	Simulación del experimento con para agitación mecánica a 40°C	
AG60W	Simulación del experimento con agitación mecánica a 60°C	
US25W	Simulación del experimento con ultrasonidos a 25°C	
US40W	Simulación del experimento con ultrasonidos a 40°C	
US60W	Simulación del experimento con ultrasonidos a 60°C	

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre Santos, E. A., Schieber, A., & Weber, F. (2018). Site-specific hydrolysis of chlorogenic acids by selected *Lactobacillus* species. *Food Research International*, *109*, 426–432. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.04.052>
- Alarcon-Rojo, A. D., Janacua, H., Rodriguez, J. C., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2015). Power ultrasound in meat processing. *Meat Science*, *107*, 86–93. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2015.04.015>
- Anter, J., de Abreu-Abreu, N., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Alonso-Moraga, A., & Muñoz-Serrano, A. (2011). Targets of red grapes: oxidative damage of DNA and leukaemia cells. *Natural Product Communications*, *6*(1), 59–64.
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018>
- Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, *48*(2), 410–427. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.05.004>
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., & Patil, R. T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, *44*(1), 391–396. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.10.001>
- Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, *78*(3), 836–845. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2005.11.024>
- Benali, M., & Kudra, T. (2010). Process Intensification for Drying and Dewatering. *Drying Technology*, *28*(10), 1127–1135. <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.502604>
- Blasco, M., García-Pérez, J. V., Bon, J., Carreres, J. E., & Mulet, A. (2006). Effect of Blanching and Air Flow Rate on Turmeric Drying. *Food Science and Technology International*, *12*(4), 315–323. <https://doi.org/10.1177/1082013206067352>
- Bon, J., Rosselló, C., Femenia, A., Eim, V., & Simal, S. (2007). Mathematical Modeling of Drying Kinetics for Apricots: Influence of the External Resistance to Mass Transfer. *Drying Technology*, *25*(11), 1829–1835. <https://doi.org/10.1080/07373930701677918>
- Boubaker, M., Omri, A. EL, Blecker, C., & Bouzouita, N. (2016). Fibre concentrate from artichoke (*Cynara scolymus* L.) stem by-products: Characterization and application as a bakery product ingredient. *Food Science and Technology International*, *22*(8), 759–768. <https://doi.org/10.1177/1082013216654598>
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, *21*(7), 901. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., & Šeruga, M. (2009). Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science & Technology*, *44*(12),

- 2394–2401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x>
- Bucic´, A., Kojic´, B., Kojic´, K., Planinic´, M., Srec´ko, P., Tomas, S., ... Velic´, V. (2006). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1)
- Cárcel, J. A. (2003). *Influencia de los ultrasonidos de potencia en procesos de transferencia de materia*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V., Benedito, J., & Mulet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 200–207. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2011.05.038>
- 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>
- Cheung, Y.-C., Siu, K.-C., & Wu, J.-Y. (2012). Kinetic Models for Ultrasound-Assisted Extraction of Water-Soluble Components and Polysaccharides from Medicinal Fungi. *Food and Bioprocess Technology*, 6(10), 2659–2665. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0929-z>
- Cho, Y.-J., Hong, J.-Y., Chun, H. S., Lee, S. K., & Min, H.-Y. (2006). Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 725–730. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2005.06.076>
- Coinu, R., Carta, S., Urgeghe, P. P., Mulinacci, N., Pinelli, P., Franconi, F., & Romani, A. (2007). Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke. *Food Chemistry*, 101(2), 524–531. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.02.009>
- Colantuono, A., Ferracane, R., & Vitaglione, P. (2018). Potential bioaccessibility and functionality of polyphenols and cynaropicrin from breads enriched with artichoke stem. *Food Chemistry*, 245, 838–844. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.11.099>
- Cueva, C., Mingo, S., Muñoz-González, I., Bustos, I., Requena, T., del Campo, R., ... Moreno-Arribas, M. V. (2012). Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), 557–563. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03248.x>
- Delgado-Adámez, J., Garrido, M., Bote, M. E., Fuentes-Pérez, M. C., Espino, J., & Martín-Vertedor, D. (2017). Chemical composition and bioactivity of essential oils from flower and fruit of *Thymbra capitata* and *Thymus* species. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 1857–1865. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2617-5>
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brčić, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84–91. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-13-11>

- Derossi, A., De Pilli, T., & Severini, C. (2013). Statistical Description of Food Microstructure. Extraction of Some Correlation Functions From 2D Images. *Food Biophysics*, 8(4), 311–320. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9307-2>
- Dibert, K., Cros, E., & Andrieu, J. (1989). Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *Journal of Food Engineering*, 10(3), 199–214. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(89\)90026-5](https://doi.org/10.1016/0260-8774(89)90026-5)
- dos Santos, M. D., Almeida, M. C., Lopes, N. P., & de Souza, G. E. P. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2236–2240.
- Eim, V. S., Urrea, D., Rosselló, C., García-Pérez, J. V., Femenia, A., & Simal, S. (2013). Optimization of the Drying Process of Carrot (*Daucus carota* v. Nantes) on the Basis of Quality Criteria. *Drying Technology*, 31(8), 951–962. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.707162>
- FAO. (2016). STATE OF THE WORLD'S FORESTS.
- Feeny, P. (1970). Seasonal Changes in Oak Leaf Tannins and Nutrients as a Cause of Spring Feeding by Winter Moth Caterpillars. *Ecology*, 51(4), 565–581. <https://doi.org/10.2307/1934037>
- Femenia, A. (2007). High-value co-products from plant foods: cosmetics and pharmaceuticals. *Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing*, 470–501. <https://doi.org/10.1533/9781845692520.4.470>
- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2017). 7: Extraction, Isolation and Utilisation of Bioactive Compounds from Rice Waste. In B. T. Ho & K. N. Tran (Eds.), *Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Waste* (pp. 195–212). 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315151540-8>
- Fritsche, J., Beindorff, C. M., Dachtler, M., Zhang, H., & Lammers, J. G. (2002). Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *Eur Food Res Technol*, 2015, 149–157. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0507-0>
- Garau, M. C. (2008). *Optimización del proceso de secado de diferentes productos agrícolas para la obtención de concentrados de frutas y hortalizas de elevada calidad*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Georgieva, S. S., Boyadzhieva, S. S., & Angelov, G. (2016). Intensification of extraction of bioactive substances from artichoke wastes. *Bulgarian Chemical Communications*, 48.
- Gollucke, A. P. B., Peres, R. C., Odair A, & Ribeiro, D. A. (2013). Polyphenols: a nutraceutical approach against diseases. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 5(3), 214–219.
- González-Centeno, M. R. (2013, October 11). *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*. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat de les Illes Balears.

- González-Centeno, M. R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., & Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, *22*, 506–514. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2014.05.027>
- González-Centeno, M. R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M. C., López, F., & Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(10), 1580–1586. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.024>
- Grassmann, J., Schnitzler, W. H., & Habegger, R. (2007). Evaluation of different coloured carrot cultivars on antioxidative capacity based on their carotenoid and phenolic contents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *58*(8), 603–611. <https://doi.org/10.1080/09637480701359149>
- Gupta, N. K., & Dixit, V. K. (2011). Absorption enhancement of grape seed polyphenols by complexation with phosphatidyl choline. *Drug Delivery*, *18*(5), 312–319. <https://doi.org/10.3109/10717544.2010.544691>
- Hojnik, M., Škerget, M., & Knez, Ž. (2008). Extraction of lutein from Marigold flower petals – Experimental kinetics and modelling. *LWT - Food Science and Technology*, *41*(10), 2008–2016. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2007.11.017>
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. S. (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*, *49*(3), 278–293. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>
- Kendall, C. W. C., Esfahani, A., & Jenkins, D. J. A. (2010). The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids*, *24*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2009.08.002>
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, *119*, 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- King, J. W., & Srinivas, K. (2009). Multiple unit processing using sub- and supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, *47*(3), 598–610. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.08.010>
- Kong, F., Yu, S., Feng, Z., & Wu, X. (2015). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) leaves using response surface methodology. *Pharmacognosy Magazine*, *11*(43), 463–469. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.160451>
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., & Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, *1*(2), 131–144. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2009.01.002>

- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., & Cardinalli, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, *1*(2), 131–144. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2009.01.002>
- Li, H., Chen, B., & Yao, S. (2004). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.033>
- Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H., ... Luque, R. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, *6*(2), 426. <https://doi.org/10.1039/c2ee23440h>
- Liu, Q. M., Yang, X. M., Zhang, L., & Majetich, G. (2010). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Folium eucommiae* and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, *4*(23), 2503–2511.
- Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G., & Liu, D. (2008). Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, *15*(3), 227–232. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2007.03.006>
- Maietta, M., Colombo, R., Lavecchia, R., Sorrenti, M., Zuorro, A., & Papetti, A. (2017). Artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) waste as a natural source of carbonyl trapping and antiglycative agents. *Food Research International*, *100*, 780–790. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.08.007>
- Makanjuola, S. A. (2017). Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea-ginger blend. *Food Science & Nutrition*, *5*(6), 1179–1185. <https://doi.org/10.1002/fsn3.509>
- Mason, T. J., Chemat, F., & Ashokkumar, M. (2015). Power ultrasonics for food processing. *Power Ultrasonics*, 815–843. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-028-6.00027-2>
- Mason, T. J., Paniwnyk, L., Chemat, F., & Vian, M. A. (2011). *Ultrasonic food processing*. RSC Green Chemistry.
- Mehmetçik, G., Özdemirler, G., Koçak-Toker, N., Çevikbaş, U., & Uysal, M. (2008). Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *60*(6), 475–480. <https://doi.org/10.1016/J.ETP.2008.04.014>
- Meullemiestre, A., Breil, C., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2016). Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application. *Bioresource Technology*, *211*, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.040>
- Mingfu Wang, James E. Simon, Irma Fabiola Aviles, Kan He, Qun-Yi Zheng and, & Tadmor, Y. (2003). Analysis of Antioxidative Phenolic Compounds in Artichoke (*Cynara scolymus* L.). <https://doi.org/10.1021/JF020792B>
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Candelas-Cadillo, M. G., Simal, S., & Rosselló, C. (2016). Ultrasound-assisted extraction of hemicelluloses from grape pomace using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, *138*, 180–191.

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.045>
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Meza-Velázquez, J. A., Simal, S., & Rosselló, C. (2014). Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers*, *106*, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.013>
- Mousa, W., Mohamad Ghazali, F., Jinap, S., Mohd Ghazali, H., & Radu, S. (2014). Sorption isotherms and isosteric heats of sorption of Malaysian paddy. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0799-4>
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, *108*(1), 216–224. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2011.06.037>
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., ... XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *97*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.10.064>
- Naveena, B., Armshaw, P., & Pembroke, J. T. (2015). Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields. *Biotechnol Biofuels*, *8*. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0321-0>
- Negro, D., Montesano, V., Grieco, S., Crupi, P., Sarli, G., De Lisi, A., & Sonnante, G. (2012). Polyphenol Compounds in Artichoke Plant Tissues and Varieties. *Journal of Food Science*, *77*(2), C244–C252. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02531.x>
- Ordiozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Gimeno-Añó, V., & Martín-Belloso, O. (2008). Modeling changes in health-related compounds of tomato juice treated by high-intensity pulsed electric fields. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.019>
- Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2012). The polyphenol-rich extract from grape seeds inhibits platelet signaling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Platelets*, *23*(4), 282–289. <https://doi.org/10.3109/09537104.2011.618562>
- Onwude, D. I., Hashim, N., Janius, R. B., Nawi, N. M., & Abdan, K. (2016). Modeling the Thin-Layer Drying of Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(3), 599–618. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12196>
- Overman, A., Bumrungpert, A., Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C.-C., West, T., ... McIntosh, M. (2010). Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *International Journal of Obesity*, *34*(5), 800–808. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.296>
- Pasinetti, G. (2012). Novel Role of Red Wine-Derived Polyphenols in the Prevention of Alzheimer's Disease Dementia and Brain Pathology: Experimental Approaches and Clinical Implications. *Planta Medica*, *78*(15), 1614–1619. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315377>
- Patist, A., & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory

- to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2007.07.004>
- Perde-Schrepler, M., Chereches, G., Brie, I., Tatomir, C., Postescu, I. D., Soran, L., & Filip, A. (2013). Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 118, 16–21. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2012.10.008>
- Quispe-Fuentes, I., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Lemus-Mondaca, R., Lozano, M., & Ah-Hen, K. (2013). A kinetic approach to saponin extraction during washing of quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) Seeds. *Journal of Food Process Engineering*, 36(2), 202–210. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2012.00673.x>
- Radha krishnan, K., Sivarajan, M., Babuskin, S., Archana, G., Azhagu Saravana Babu, P., & Sukumar, M. (2013). Kinetic modeling of spice extraction from *S. aromaticum* and *C. cassia*. *Journal of Food Engineering*, 117(3), 326–332. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.03.011>
- Radojković, M., Zeković, Z., Jokić, S., Vidović, S., Lepojević, Z., & Milošević, S. (2012). Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, 50(2), 167–176.
- Rajbhar, K., Dawda, H., & Mukundan, U. (2015). POLYPHENOLS: METHODS OF EXTRACTION. *Sci. Revs. Chem. Commun*, 5(1), 1–6. Retrieved from www.sadgurupublications.com
- Romdhane, M., & Gourdon, C. (2002). Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 87(1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(01\)00206-6](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(01)00206-6)
- Rostagno, M. A., Villares, A., Guillamón, E., García-Lafuente, A., & Martínez, J. A. (2009). Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2–29. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.035>
- Rouphael, Y., Colla, G., Graziani, G., Ritieni, A., Cardarelli, M., & De Pascale, S. (2017). Phenolic composition, antioxidant activity and mineral profile in two seed-propagated artichoke cultivars as affected by microbial inoculants and planting time. *Food Chemistry*, 234, 10–19. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.175>
- Saleh, I. A., Vinatoru, M., Mason, T. J., Abdel-Azim, N. S., Aboutabl, E. A., & Hammouda, F. M. (2016). A possible general mechanism for ultrasound-assisted extraction (UAE) suggested from the results of UAE of chlorogenic acid from *Cynara scolymus* L. (artichoke) leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 330–336. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.01.002>
- Sant'Anna, V., Brandelli, A., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2012). Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology*, 100, 82–87. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2012.09.004>
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Selvarajah, S., & Kodituwakku, S. R. (2011). *Analysis and Comparison of Texture Features for*

- Content Based Image Retrieval. International Journal of Latest Trends in Computing (E* (Vol. 2). Retrieved from http://www.scs.pdn.ac.lk/personal/salukak/papers/Texture_IJLTC.pdf
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 53, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>
- Søltoft, M., Nielsen, J., Laursen, K. H., Husted, S., Halekoh, U., & Knuthsen, P. (2010). Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavonoids in onions and phenolic acids in carrots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10323–10329. <https://doi.org/10.1021/jf101091c>
- Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 793–801. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2005.11.020>
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2006a). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2006b). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Sturzoiu, A., Stroescu, M., Guzun, A., & Dobre, T. (2011). Empirical models applied for kinetics extraction of beta-carotene from Rosa canina. *Revista de Chimie*. Retrieved from <http://www.revistadechimie.ro/pdf/STURZOIU A.pdf> 3 11.pdf
- Sturzoiu, A., Stroescu, M., Guzun, A. S., & Dobre, T. (2011). Empirical Models Applied for Kinetics Extraction of β -carotene from Rosa canina, (March 2011).
- Sun, D.-W. (2012). *Computer Vision Technology in the Food and Beverage Industries*. Woodhead Pub Ltd.
- Vardanega, R., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2014). Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacognosy Reviews*, 8(16), 88–95. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.134231>
- Verboven, P., Defraeye, T., & Nicolai, B. (2018). *Measurement and visualization of food microstructure. Food Microstructure and Its Relationship with Quality and Stability*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100764-8.00001-0>
- Vicente, J., -Perez, G., Ortuño, C., Puig, A., Carcel, J. A., & Perez-Munuera, I. (2012). Enhancement of Water Transport and Microstructural Changes Induced by High-Intensity Ultrasound Application on Orange Peel Drying. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2256–2265. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0645-0>
- Wan, C.-W., Wong, C. N.-Y., Pin, W.-K., Wong, M. H.-Y., Kwok, C.-Y., Chan, R. Y.-K., ... Chan, S.-W. (2013). Chlorogenic Acid Exhibits Cholesterol Lowering and Fatty Liver Attenuating Properties by Up-regulating the Gene Expression of PPAR- α in Hypercholesterolemic Rats Induced with a High-Cholesterol Diet. *Phytotherapy Research*, 27(4), 545–551. <https://doi.org/10.1002/ptr.4751>

- Wang, Y.-H., Yang, X.-L., Wang, L., Cui, M.-X., Cai, Y.-Q., Li, X.-L., & Wu, Y.-J. (2010). Effects of proanthocyanidins from grape seed on treatment of recurrent ulcerative colitis in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *88*(9), 888–898. <https://doi.org/10.1139/y10-071>
- Wang, Y. G., Yue, S. T., Li, D. Q., Jin, M. J., & Li, C. Z. (2002). KINETICS AND MECHANISM OF Y(III) EXTRACTION WITH CA-100 USING A CONSTANT INTERFACIAL CELL WITH LAMINAR FLOW. *Solvent Extraction and Ion Exchange*, *20*(3), 345–358. <https://doi.org/10.1081/SEI-120004809>
- Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K., & Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, *46*(2), 505–513. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.09.027>
- Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., & Warid, K. (2012). Effective Extraction of Polyphenols and Proanthocyanidins from Pomegranate's Peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *4*(January). <https://doi.org/10.1186/2251-6581-13-11>
- YanJun, S., Jianhang, C., Shuwen, Z., Hongjuan, L., Jing, L., Lu, L., ... Jiaping, L. (2014). Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.013>
- Yun, N., Kang, J.-W., & Lee*, S.-M. (2012). Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *23*, 1249–1255. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.018>
- Zhang, B., Yang, R., & Liu, C.-Z. (2008). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Separation and Purification Technology*, *62*(2), 480–483. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2008.02.013>
- Zuorro, A. (2014). Response surface methodology analysis of polyphenol recovery from artichoke waste. *American Journal of Applied Sciences*, *11*(9), 1463–1471. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2014.1463.1471>